

Aus der Klinik für Gastroenterologie,
Infektiologie und Rheumatologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Phänotyp und Aktivierungsstatus von CD4⁺ T-Zellen im Blut und
entzündeten Gelenk rheumatischer Patienten

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Christopher Sichau

aus Herne

Datum der Promotion: 09. September 2016

Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

TABELLENVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG

ABSTRACT

1. EINLEITUNG	1
1.1 AS ALS PROTOTYP DER SPA	1
1.1.1 DEFINITION, EPIDEMIOLOGIE UND KLINIK	1
1.1.2 PATHOGENESE DER AS	2
1.1.3 DIAGNOSE UND THERAPIE	4
1.1.4 DIE PSA ALS WEITERE SPA-FORM	6
1.2 DIE RA ALS KONTROLLGRUPPE	7
1.2.1 DEFINITION, EPIDEMIOLOGIE, KLINIK UND PATHOGENESE	7
1.2.2 DIAGNOSE UND THERAPIE	8
1.3 DAS IMMUNSYSTEM, AUTOIMMUNITÄT UND DIE BEDEUTUNG VON CD4⁺ T-ZELLEN	9
1.3.1 AKTIVIERUNG VON CD4 ⁺ T-ZELLEN	11
1.3.2 REZIRKULATION VON CD4 ⁺ T-ZELLEN EINSCHLIEßLICH DER ADHÄSIONSKASKADE	12
1.3.3 AN DER REZIRKULATION VON CD4 ⁺ T-ZELLEN BETEILIGTE MOLEKÜLE UND REZEPTOREN	14
1.3.4 INDUKTION DER TOPOGRAPHISCHEN PRÄGUNG DER CD4 ⁺ T-ZELLEN	16
1.3.5 FUNKTIONELLE DIFFERENZIERUNG DER CD4 ⁺ T-ZELLEN IN T _{EM} -ZELLEN	18
1.3.6 DIFFERENZIERUNG VON REGULATORISCHEN CD4 ⁺ T-ZELLEN	19
1.3.7 PHÄNOTYPISCHE MARKER DER AKTIVIERUNG UND DER ZELLERSCHÖPFUNG VON T _{EM} -ZELLEN UND T _{REG} -ZELLEN	21
1.4 ZIELE DIESER ARBEIT	24
2. MATERIAL UND METHODEN	26
2.1 TECHNISCHE GERÄTE	26
2.2 SOFTWARE	26
2.3 VERBRAUCHSMATERIALIEN	26
2.4 CHEMIKALIEN UND VERBRAUCHSMITTEL	27
2.4.1 CHEMIKALIEN	27

2.4.2 PUFFER UND MEDIEN	28
2.4.3 ZELLSTIMULANZIEN	28
2.4.4 ANTIKÖRPER	29
2.5 BIOLOGISCHES MATERIAL	29
2.5.1 PATIENTENCHARAKTERISTIKA (BLUTPROBEN)	30
2.5.2 PATIENTENCHARAKTERISTIKA (SF-PROBEN)	31
2.6 DURCHFLUSSZYTOMETRIE	31
2.6.1 OBERFLÄCHENFÄRBUNGEN DER <i>HOMING</i> REZEPTOREN (CCR4, CCR5, CCR9, CLA, BETA7)	33
2.6.2 KOMBINIERTE FÄRBUNGEN VON AKTIVIERUNGSMARKERN AUF DER ZELLOBERFLÄCHE (4-1BB, PD-1) UND INTRAZELLULÄREN TRANSKRIPTIONSFAKTOREN (FOXP3, HELIOS)	34
2.7 FUNKTIONELLE UNTERSUCHUNG VON CD4⁺ T-ZELLEN AUS DER SYNOVIALFLÜSSIGKEIT	35
2.7.1 ZELLSEPARATION HUMANER MONONUKLEÄRER ZELLEN UND LAGERUNG	35
2.7.2 STIMULATION VON CD4 ⁺ T-ZELLEN	36
2.7.3 INTRAZELLULÄRE FÄRBUNG ZUM NACHWEIS VON ZYTOKINEN	37
2.8 STATISTISCHE AUSWERTUNG	38
3. ERGEBNISSE	39
<hr/>	
3.1 VERTEILUNG VON T_{EM}-ZELLEN IN VOLLBLUT UND SF	39
3.2 BESTIMMUNG DES ANTEILS DER DARMSPEZIFISCHEN UND HAUTSPEZIFISCHEN T_{EM}-ZELLEN IN VOLLBLUT UND SF UND BESTIMMUNG DER EXPRESSION VON CHEMOKINREZEPTOREN AUF DEN T_{EM}-ZELLEN	42
3.2.1 FREQUENZ DARMSPEZIFISCHER T _{EM} -ZELLEN IN VOLLBLUT UND SF BEI PATIENTEN MIT AS, PSA UND RA	42
3.2.2 FREQUENZ HAUTSPEZIFISCHER T _{EM} -ZELLEN IN VOLLBLUT UND SF BEI PATIENTEN MIT AS, PSA UND RA	46
3.2.3 ANALYSE DER EXPRESSION DER CHEMOKINREZEPTOREN CCR4 UND CCR5	49
3.3 UNTERSUCHUNG DES AKTIVIERUNGSSTATUS VON T_{EM}-ZELLEN UND T_{REG}-ZELLEN IM VOLLBLUT UND SF	54
3.3.1 BESTIMMUNG DER EXPRESSION VON 4-1BB UND CD25 BEI CD4 ⁺ T-ZELLEN	55
3.3.2 EXPRESSION DER TRANSKRIPTIONSFAKTOREN HELIOS UND FOXP3 INNERHALB DER CD45RA ⁻ T-ZELLEN	64
3.3.3 PD-1 ALS PHÄNOTYPISCHER MARKER FÜR T-ZELLERSCHÖPFUNG UND CHRONISCHE AKTIVIERUNG INNERHALB DER CD4 ⁺ CD45RA ⁻ T-ZELLEN	69
3.4 PROINFLAMMATORISCHE ZYTOKINSEKRETION BEI CD4⁺ T-ZELLEN IN ABHÄNGIGKEIT VON DER PD-1-EXPRESSION	73

4. DISKUSSION	76
4.1 ERHÖHTE FREQUENZ VON CD4⁺CD45RA⁻ T-ZELLEN IM PERIPHEREN BLUT BEI PATIENTEN MIT RA	76
4.2 FEHLENDE AKKUMULATION VON DARMSPEZIFISCHEN T_{EM}-ZELLEN GEMESSEN ANHAND DER EXPRESSION DES INTEGRINS β₇ IM ENTZÜNDETEN GELENK VON PATIENTEN MIT SPA-ASSOZIIERTER ARTHRITIS	77
4.2.1 EXPRESSION DARMSPEZIFISCHER <i>HOMING</i> REZEPTOREN AUF CD4 ⁺ T-ZELLEN IM BLUT UND SF BEI PATIENTEN MIT SPA IM VERGLEICH ZU RA-PATIENTEN	77
4.2.2 EXPRESSION HAUTSPEZIFISCHER <i>HOMING</i> REZEPTOREN AUF CD4 ⁺ T-ZELLEN IM BLUT UND SF BEI PATIENTEN MIT SPA UND RA	78
4.2.3 ZUSAMMENFASSUNG DER ANALYSE PERIPHERER <i>HOMING</i> MARKER AUF T-ZELLEN IM ENTZÜNDETEN GELENK	79
4.2.4 ANREICHERUNG VON CCR5 ⁺ CD4 ⁺ T-ZELLEN IN DER SF IN AS-, PSA- UND RA-PATIENTEN	80
4.3 VERTEILUNG UND AKTIVIERUNGSZUSTAND VON T_{EM}-ZELLEN UND T_{REG}-ZELLEN IM BLUT UND IN DER SF BEI AS-, PSA- UND RA-PATIENTEN	81
4.3.1 VERTEILUNG UND AKTIVIERUNGSZUSTAND DER T _{EM} -ZELLEN UND FOXP3 ⁺ T _{REG} -ZELLEN IN SF UND BLUT	81
4.3.2 EXPRESSION DES TRANSKRIPTIONSFAKTORS HELIOS IN FOXP3 ⁺ T _{REG} -ZELLEN IN SF UND BLUT BEI AS-, PSA- UND RA-PATIENTEN	84
4.3.3 ERHÖHTE PD-1-EXPRESSION INNERHALB DER CD4 ⁺ CD45RA ⁻ FOXP3 ⁺ T-ZELLEN UND DER CD4 ⁺ CD45RA ⁻ FOXP3 ⁻ T-ZELLEN ALS HINWEIS AUF CHRONISCHE AKTIVIERUNG UND T-ZELLERSCHÖPFUNG	85
4.4 PROINFLAMMATORISCHE ZYTOKINSEKRETION BEI CD4⁺ T-ZELLEN IN ABHÄNGIGKEIT VON DER PD-1-EXPRESSION	87
5. REFERENZEN	88
EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	102
LEBENS LAUF	103
DANKSAGUNG	105

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Induktion des darmspezifischen Phänotyps von T- und B-Zellen im mesenterischen Lymphknoten durch dendritische Zellen.....	17
Abb. 1.2:	Induktion des hautspezifischen Phänotyps von T- und B-Zellen im peripheren Lymphknoten durch dendritische Zellen.....	17
Abb. 1.3:	Polarisierung von T-Zellen durch auslösende Zytokine und Haupteffektorzytokine der diversen T-Zell-Subpopulationen.....	19
Abb. 1.4:	Mögliche Rezeptorinteraktionen zwischen APZ und T-Zellen mit intrazellulärer Inhibition durch PD-1.....	23
Abb. 3.1:	Beispielfärbung mit <i> gating</i> strategie von PB und SF.....	40
Abb. 3.2:	Prozentualer Anteil der CD4 ⁺ CD45RA ⁻ T _{EM} -Zellen in PB und SF bei Patienten mit AS, PsA, RA und Kontrollen.....	41
Abb. 3.3:	Beispiel (<i>Pseudocolor-Dotplot</i>) einer Analyse der Expression der darmspezifischen Marker β_7 und CCR9 auf CD4 ⁺ CD45RA ⁻ T-Zellen in PB und SF.....	42
Abb. 3.4:	Frequenz darmspezifischer T _{EM} -Zellen gemessen anhand des <i>Homing</i> rezeptors β_7 in PB und SF bei Patienten mit AS, PsA, RA und Kontrollen.....	43
Abb. 3.5:	Frequenz darmspezifischer T _{EM} -Zellen gemessen anhand des <i>Homing</i> rezeptors CCR9 in PB und SF bei Patienten mit AS, PsA, RA und Kontrollen.....	44
Abb. 3.6:	Vergleich des Anteils β_7^+ T-Zellen und CCR9 ⁺ T-Zellen innerhalb der CD4 ⁺ CD45RA ⁻ T-Zellen in PB und SF von individuellen AS-Patienten.....	45

Abb. 3.7:	Beispiel (<i>Pseudocolor-Dotplot</i>) einer Analyse der Expression des hautspezifischen Rezeptors CLA im Vergleich zur Expression des darmspezifischen Markers β_7 auf $CD4^+CD45RA^-$ T-Zellen in PB und SF.....	46
Abb. 3.8:	Frequenz hautspezifischer T_{EM} -Zellen gemessen anhand des <i>Homing</i> rezeptors CLA in PB und SF bei Patienten mit AS, PsA, RA und Kontrollen.....	47
Abb. 3.9:	Vergleich des Anteils CLA^+ T-Zellen innerhalb der $CD4^+CD45RA^-$ T-Zellen in PB und SF von individuellen AS-Patienten.....	48
Abb. 3.10:	Beispiel (<i>Pseudocolor-Dotplot</i>) einer Analyse der Expression von CCR4 und CCR5 auf $CD4^+CD45RA^-$ T-Zellen in PB und SF.....	49
Abb. 3.11:	Frequenz $CCR4^+$ T_{EM} -Zellen in PB und SF bei Patienten mit AS, PsA, RA und Kontrollen.....	50
Abb. 3.12:	Frequenz $CCR5^+$ T_{EM} -Zellen in PB und SF bei Patienten mit AS, PsA, RA und Kontrollen.....	51
Abb. 3.13:	Frequenz der doppelpositiven $CCR4^+CCR5^+$ T_{EM} -Zellen in PB und SF bei Patienten mit AS, PsA, RA und Kontrollen.....	52
Abb. 3.14:	Vergleich des Anteils $CCR4^+$ T-Zellen, $CCR5^+$ T-Zellen und $CCR4^+CCR5^+$ T-Zellen innerhalb der $CD4^+CD45RA^-$ T-Zellen in PB und SF von individuellen AS-Patienten.....	53
Abb. 3.15:	Beispiel (<i>Pseudocolor-Dotplot</i>) einer Analyse der Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 und des Rezeptors 4-1BB auf $CD4^+$ T-Zellen in PB und SF.....	55
Abb. 3.16:	Frequenz der $FoxP3^+$ T-Zellen innerhalb der $CD4^+$ T-Zellen in PB und SF bei Patienten mit AS, PsA, RA und Kontrollen.....	56
Abb. 3.17:	Frequenz der $4-1BB^+$ T-Zellen innerhalb der $CD4^+FoxP3^+$ T-Zellen in PB und SF bei Patienten mit AS, PsA, RA und Kontrollen.....	57

Abb. 3.18:	Frequenz der 4-1BB ⁺ T-Zellen innerhalb der CD4 ⁺ FoxP3 ⁻ T-Zellen in PB und SF bei Patienten mit AS, PsA, RA und Kontrollen.....	58
Abb. 3.19:	Vergleich der Anteile der FoxP3 ⁺ T-Zellen innerhalb der CD4 ⁺ T-Zellen, der 4-1BB ⁺ T-Zellen innerhalb der CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ T-Zellen und der 4-1BB ⁺ T-Zellen innerhalb der CD4 ⁺ FoxP3 ⁻ T-Zellen in PB und SF von individuellen AS-Patienten.....	59
Abb. 3.20:	Beispiel (<i>Pseudocolor-Dotplot</i>) einer Analyse der Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 und des Rezeptors CD25 auf CD4 ⁺ T-Zellen in PB und SF.....	60
Abb. 3.21:	Frequenz der CD25 ⁺ T-Zellen innerhalb der CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ T-Zellen in PB und SF bei Patienten mit AS, PsA, RA und Kontrollen.....	61
Abb. 3.22:	Frequenz der CD25 ⁺ T-Zellen innerhalb der CD4 ⁺ FoxP3 ⁻ T-Zellen in PB und SF bei Patienten mit AS, PsA, RA und Kontrollen.....	62
Abb. 3.23	Vergleich der Anteile der CD25 ⁺ T-Zellen innerhalb der CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ T-Zellen und der CD25 ⁺ T-Zellen innerhalb der CD4 ⁺ FoxP3 ⁻ T-Zellen in PB und SF von individuellen AS-Patienten.....	63
Abb. 3.24:	Beispiel (<i>Pseudocolor-Dotplot</i>) einer Analyse der Expression der Transkriptionsfaktoren FoxP3 und Helios auf CD4 ⁺ CD45RA ⁻ T-Zellen in PB und SF.....	64
Abb. 3.25:	Frequenz der FoxP3 ⁺ T-Zellen innerhalb der CD4 ⁺ CD45RA ⁻ T-Zellen in PB und SF bei Patienten mit AS, PsA, RA und Kontrollen.....	65
Abb. 3.26:	Frequenz der Helios ⁺ T-Zellen innerhalb der CD4 ⁺ CD45RA ⁻ FoxP3 ⁺ T-Zellen in PB und SF bei Patienten mit AS, PsA, RA und Kontrollen.....	66
Abb. 3.27	Frequenz der Helios ⁺ T-Zellen innerhalb der CD4 ⁺ CD45RA ⁻ FoxP3 ⁻ T-Zellen in PB und SF bei Patienten mit AS, PsA, RA und Kontrollen.....	67
Abb. 3.28:	Vergleich der Anteile der Helios ⁺ T-Zellen innerhalb der CD4 ⁺ CD45RA ⁻ FoxP3 ⁺ T-Zellen in PB und SF von individuellen AS-Patienten.....	68

Abb. 3.29:	Beispiel (<i>Pseudocolor-Dotplot</i>) einer Analyse der Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 und des Markers PD-1 auf CD4 ⁺ CD45RA ⁻ T-Zellen in PB und SF.....	69
Abb. 3.30:	Frequenz der PD-1 ⁺ T-Zellen innerhalb der CD4 ⁺ CD45RA ⁻ FoxP3 ⁺ T-Zellen in PB und SF bei Patienten mit AS, PsA, RA und Kontrollen.....	70
Abb. 3.31:	Frequenz der PD-1 ⁺ T-Zellen innerhalb der CD4 ⁺ CD45RA ⁻ FoxP3 ⁻ T-Zellen in PB und SF bei Patienten mit AS, PsA, RA und Kontrollen.....	71
Abb. 3.32:	Vergleich der PD-1 ⁺ T-Zellen innerhalb der CD4 ⁺ CD45RA ⁻ FoxP3 ⁺ T-Zellen und der PD-1 ⁺ T-Zellen innerhalb der CD4 ⁺ CD45RA ⁻ FoxP3 ⁻ T-Zellen in PB und SF von individuellen AS-Patienten.....	72
Abb. 3.33:	Beispiel (<i>Density-Dotplot</i>) der CD154-Expression und IFN γ -Produktion nach PMA/Ionomycin und aCD3/aCD28-Stimulation in Abhängigkeit von der PD-1-Expression.....	74
Abb. 3.34:	Vergleich der Frequenz von CD154 ⁺ T-Zellen und IFN γ -produzierenden T-Zellen innerhalb der CD3 ⁺ CD8 ⁻ T-Zellen in Abhängigkeit von der PD-1-Expression.....	75

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1:	Verwendete Puffer und Medien und deren Zusammensetzung.....	28
Tab. 2.2:	Verwendete Antigene und deren Hersteller.....	28
Tab. 2.3:	Verwendete Antikörper mit Spezifität, Klon, Markierung und Hersteller....	29
Tab. 2.4:	Charakteristika der Blutproben der AS-, PsA-, RA-Patienten und Kontrollen.....	30
Tab. 2.5:	Charakteristika der SF-Proben der AS-, PsA- und RA-Patienten.....	31
Tab. 2.6:	Absorptions- und Emissionswellenlängen der Fluoreszenzfarbstoffe des FACSCalibur.....	32
Tab. 2.7:	Absorptions- und Emissionswellenlängen ausgewählter Fluoreszenzfarbstoffe des FACSCanto II.....	33
Tab. 2.8:	Verwendete Antikörper inklusive Verdünnung zur Färbung der Oberflächenmoleküle (<i>Homing</i>).....	33
Tab. 2.9:	Verwendete Antikörperkombinationen zur Färbung der oberflächlichen und intrazellulären Moleküle.....	35
Tab. 2.10:	Verwendete Antikörper zur Färbung der oberflächlichen und intrazellulären Rezeptoren und IFN γ	37

Abkürzungsverzeichnis

α	anti- (für Antikörper)
AB-Serum	Mischserum der Blutgruppen A und B
Anti-CCP	Antikörper gegen citrullinierte Peptide
ACR	<i>American College of Rheumatology</i>
Ag	Antigen
AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
APZ	Antigen präsentierende Zelle
AS	Ankylosierende Spondylitis
ASAS	<i>Assessment of Spondyloarthritis</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
BSG	Blutkörperchen-Senkungs-Geschwindigkeit
CCL	C-Chemokin-Ligand
CCR	C-C Chemokin-Rezeptor
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CED	Chronisch-entzündliche Darmerkrankung
CLA	<i>Cutaneous Lymphocyte-associated Antigen</i>
CrP	C-reaktives Protein
CTL	<i>Cytotoxic T-lymphocyte</i>
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte Antigen 4</i>
Cy5.5	Cychrome5.5
Cy7	Cychrome7
DMARD	<i>Disease modifying anti-rheumatic drugs</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DZ	Dendritische Zelle
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	<i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>

FITC	Fluoreszein-5-Isothiocyanat
FoxP3	<i>Transkriptionsfaktor Forkhead box P3</i>
FSC	Vorwärtsstreulicht
GlyCAM	<i>Glycosylation-dependent Cell Adhesion Molecule-1</i>
h	human
HBSS	Hanks`s buffered salt solution
HEV	<i>High Endothelial Venules</i>
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
ICAM	<i>Intercellular Adhesion Molecule</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
LFA-1	<i>Lymphocyte Function-associated Antigen-1</i>
LPAM-1	<i>Lymphocyte Peyer`s Patch Adhesion Molecule-1</i>
MAdCAM-1	<i>Mucosal vascular Addressin Cell Adhesion Molecule 1</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
Min	Minute
m	milli
μ	mikro-
n	nano-
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NSAR	Nichtsteroidales Antirheumatikum
p	piko
PB	Peripheres Blut
PBMNC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphat-gepufferte Salinelösung
PD-1	<i>Programmed cell Death 1</i>
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll

PMA	Phorbol-12-myastate-13-acetat
PsA	Psoriasis-Arthritis
RA	Rheumatoide Arthritis
RF	Rheumafaktor
rpm	<i>rounds per minute</i>
RPMI-Medium	Rosewell Park Memorial Institute Medium
RT	Raumtemperatur
SF	Synovialflüssigkeit
SFMNC	Mononukleäre Zellen der Synovialflüssigkeit
SSC	Seitwärtsstreulicht
SpA	Spondyloarthritiden
T _{CM}	zentrale T-Effektorgedächtniszelle
T _{EFF}	T-Effektorzelle
T _{EM}	T-Effektor/Gedächtniszelle (<i>T-effector/memory</i>)
TGFβ	<i>Transforming Growth Factor-beta</i>
Th	T-Helferzelle
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Tr/T _{REG}	regulatorische T-Zelle
TZR	T-Zell Rezeptor
VCAM	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule</i>
VLA-4	<i>Very Late Antigen-4</i>

Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, durch deskriptive Analyse des Phänotyps von CD4⁺ T-Zellen aus Synovialflüssigkeit (SF) und Blut Hinweise auf eine distinkte Genese der peripheren Arthritis bei Spondyloarthritis (SpA) und Rheumatoider Arthritis (RA) zu gewinnen.

So können sich bei der Ankylosierenden Spondylitis (AS) als Prototyp der SpA subklinische Entzündungsreaktionen im Darm finden, während Patienten mit Psoriasisarthritis (PsA) oft entzündliche Hautveränderungen zeigen. Kreuzreaktivität von T-Zellen mit mikrobiellen Strukturen könnte somit zur Pathogenese beitragen. Bei der RA scheint dagegen eine Autoreaktion gegen körpereigene Gelenkstrukturen zu bestehen.

Methodik

Es wurden antigenerfahrene CD4⁺ T-Zellen (T_{EM}-Zellen) im Blut und SF von SpA- und RA-Patienten mittels FACS hinsichtlich ihrer Expression von darm-, haut- und entzündungsspezifischen *Homing*rezeptoren analysiert, um Hinweise auf den Ort ihres *Primings* zu erhalten.

Außerdem erfolgte eine Analyse des Aktivierungszustandes anhand CD25 und 41BB und der funktionellen Erschöpfung anhand des Markers PD-1 einschließlich präliminärer Experimente zur Zytokinexpression. Diese Analysen erfolgten selektiv für die Subpopulationen der konventionellen und regulatorischen T-Zellen (T_{REG}-Zellen). Die Analyse der Helios-Expression sollte zwischen natürlichen nT_{REG}-Zellen, die dem Thymus entstammen, und in der Peripherie induzierten iT_{REG}-Zellen, diskriminieren.

Ergebnisse

Als erstes Ergebnis fand sich eine höhere Frequenz von T_{EM}-Zellen im Blut bei RA-Patienten.

Zweitens fand sich trotz der genannten Assoziationen keine erhöhte Expression von *Homing*rezeptoren auf den T-Zellen in der SF oder im Blut bei SpA-Patienten.

Drittens ließ sich bei der Analyse der Expression der Chemokinrezeptoren eine Anreicherung von CCR5-positiven T-Zellen im entzündeten Gelenk feststellen.

Viertens zeigte sich eine tendenziell erhöhte Frequenz von T_{REG}-Zellen und Hinweise auf eine höhere Aktivierung in der SF ohne Unterschiede innerhalb der Erkrankungen. Auch fand sich kein Frequenzunterschied von nT_{REG}-Zellen anhand des postulierten Markers Helios zwischen SpA und RA.

Fünftens zeigte sich eine höhere Expression des T-Zellerschöpfungsmarkers PD-1 auf konventionellen als auch T_{REG}-Zellen in der SF gegenüber Blut. Im Blut exprimierten besonders die T-Zellen von RA-Patienten das Molekül. Gleichzeitig fanden sich Hinweise auf eine Beeinträchtigung der antigenspezifischen Aktivierung der PD-1-exprimierenden T-Zellen.

Schlussfolgerungen

In dieser Arbeit konnten keine Hinweise für eine Anreicherung von darm- oder hautspezifischen T-Zellen am Ort der Entzündung bei SpA gefunden werden. Unsere Analysen bestätigen frühere Untersuchungen, die eine hohe Expression von CCR5 auf T-Zellen im Gelenk zeigen. Sowohl die lokale Anreicherung von PD-1-positiven T_{EM}-Zellen und das Auftreten von aktivierten T_{REG}-Zellen spricht für die Bedeutung von T-Zellen sowohl für die SpA als auch die RA-assoziierte Arthritis, eindeutige Unterschiede ließen sich hier nicht eruieren. Die Assoziation mit der Chronizität der Arthritis muss in größeren Kohorte untersucht werden.

Abstract

The aim of this thesis was to obtain indications of a distinct genesis of peripheral arthritis in spondyloarthritides (SpA) and rheumatoid arthritis (RA) by descriptive analysis of the phenotype of CD4⁺ T-cells from synovial fluid (SF).

Ankylosing spondylitis (AS) as a prototype of SpA can show subclinical inflammatory reactions in the intestine, while patients with psoriasis arthritis (PsA) often show inflammatory skin changes. The cross-reactivity of T-cells with microbial structures could contribute to the pathogenesis. By contrast, in RA there appears to be an autoreaction against structures of the joints.

Methodology

Antigen-experienced CD4⁺ T-cells (T_{EM}-cells) in blood and SF of patients with SpA and RA were analyzed by FACS with regard to their expression of intestinal, dermal and inflammatory homing receptors to detect indications of the region of their priming.

Further, an analysis of the activation state was performed on the basis of CD25 and 41BB and of the functional exhaustion on the basis of the marker PD-1, including preliminary experiments of cytokine expression. These analyses occurred selectively for the subpopulation of the conventional and regulatory T-cells (T_{REG}-cells). The analysis of the Helios-expression should discriminate between natural nT_{REG}-cells which are derived from the thymus, and iT_{REG}-Zellen which are induced in the periphery.

Results

First, a higher frequency of T_{EM}-cells was found in the blood of patients with RA.

Second, no increased expression of homing receptors on T-cells in SF or blood of SpA-patients was found, in spite of the associations discussed above.

Third, an enrichment can be ascertained in the analysis of the expression of the chemokine receptors by CCR5-positive T-cells in the inflamed joint.

Fourth, a higher frequency of T_{REG}-cells and indications of a higher activation in SF without differences in the illnesses was shown. Also no difference in the frequency of nT_{REG}-cells between SpA and RA was detected with the help of the postulated marker Helios.

Fifth, a higher expression of the marker of T-cell-exhaustion PD-1 on conventional as well as on T_{REG}-cells in SF compared with blood was found. In blood particularly the T-cells of patients with RA expressed the molecule. At the same time some evidence of an interference of the antigen-specific activation of PD-1 expressing T-cells was found.

Conclusions

In this thesis no indications could be found for an accumulation of intestinal or skin specific T-cells at sides of inflammation within SpA. Our analyses confirm former investigations which show a high expression of CCR5 on T-cells in the joint. The local accumulation of PD-1-positive T_{EM}-cells and the appearance of activated T_{REG}-cells underline the importance of T-cells in both SpA- and the RA-associated arthritis, clear differences could not be found. The association with the chronicity of the arthritis will have to be examined in bigger cohorts.

1. Einleitung

Im Fokus dieser Arbeit steht die Charakterisierung des Phänotyps und Aktivierungszustandes von Immunzellen im entzündeten Gelenk von Patienten mit Spondyloarthritis (SpA), um Hinweise auf mögliche Unterschiede gegenüber der RA-Kontrollgruppe und gesunden Kontrollen auf der T-Zell-Ebene zu suchen. Zur Gruppe der Spondyloarthritiden werden unterschiedliche Erkrankungen gezählt, die zum einen durch eine Assoziation mit dem Vorhandensein des *Human Leukocyte Antigen* HLA-B27 charakterisiert sind und die sich zum anderen sowohl hinsichtlich der eruierbaren Symptome als auch bei der Pathogenese überschneiden. In dieser Arbeit werden vor allem Patienten mit Ankylosierender Spondylitis (AS) als Prototyp der SpA sowie Patienten mit Psoriasisarthritis (PsA), einer weiteren SpA-Form, die häufig mit peripheren Gelenkmanifestationen einhergeht, untersucht. Zur Gewährleistung der Validität wurden außerdem Patienten mit Rheumatoider Arthritis (RA), bei der es sich um eine entzündliche Gelenkerkrankung anderer Entität und mit anderer Pathogenese handelt, analysiert.

In den Kapitel 1.1 – 1.3 wird die AS als der Prototyp der SpA sowie die PsA dargestellt. Zudem erfolgen Erläuterungen zur RA, die als Vergleichsgruppe herangezogen wurde. Ergänzend werden die für das Verständnis der vorliegenden Untersuchung notwendige Grundsätze der T-Zell-Immunität aufgezeigt sowie der aktuelle Forschungsstand zum Wanderungsverhalten der T-Zellen (*Homing*), zur Entstehung von Autoimmunität und Mechanismen der Gegenregulation dargestellt. Im zweiten Kapitel werden zunächst der Versuchsaufbau und verwendete Methoden dargelegt, im dritten Kapitel erfolgt die Darstellung der Versuchsergebnisse. Das letzte Kapitel fasst die Ergebnisse zusammen und diskutiert sie vor dem Hintergrund des aktuellen Kenntnisstandes.

1.1 AS als Prototyp der SpA

1.1.1 Definition, Epidemiologie und Klinik

Mit der Symptomkombination entzündlicher Rückenschmerz, asymmetrische periphere Oligoarthritis und Enthesitis ist die AS der Prototyp einer rheumatischen Krankheitsgruppe, die zusammenfassend als Spondyloarthritiden (SpA) bezeichnet werden [1]. Neben der AS umfasst die Gruppe auch die reaktiven Arthritiden (ReA), die Psoriasisarthritis (PsA) und die undifferenzierte SpA sowie die Arthritiden, die im

Zusammenhang mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) auftreten. Je nach klinischer Manifestationsform mit entweder vorwiegend entzündlichen Veränderungen im Bereich des Achsenskeletts oder vorwiegend peripheren Manifestationen wie Arthritis, Enthesitis oder Daktylitis wird innerhalb der Gruppe der SpA zusätzlich nach axialer SpA mit dem Prototypen AS und peripherer SpA mit z.B. der ReA oder PsA differenziert.

Epidemiologisch wird heute davon ausgegangen, dass die AS als Prototyp der axialen SpA nur geringfügig häufiger bei Männern als bei Frauen auftritt, wobei ein Großteil der Patienten schon vor dem 30. Lebensjahr davon betroffen ist. Bei Patienten mit einem positiven HLA-B27-Status wird durchschnittlich ein früheres Auftreten der Erkrankung und ein häufigeres Auftreten einer Uveitis beschrieben als beim HLA-B27-negativen Patientenkollektiv [2]. Insgesamt beläuft sich die Prävalenz der gesamten Gruppe in europäischen Ländern auf etwa 1-2%, was ungefähr der Häufigkeit des Auftretens der RA entspricht [3]. Klinisch ist das Leitsymptom der AS klassischerweise ein Rückenschmerz, der die Patienten zum Teil nachts aufwachen lässt. Dem liegt eine Entzündung im Bereich der Sakroiliakalgelenke, später auch der Wirbelkörperkanten, zugrunde. Nach längerer Krankheitsdauer kommt es zum knöchernen Umbau der Sakroiliakalgelenke und zur Ausbildung von Knochenspangen im Bereich der Wirbelsäule, den sogenannten Syndesmophyten. Dies führt zur Versteifung und Einschränkung der Wirbelsäulenbeweglichkeit [4]. Zusätzlich können die AS-Patienten unter einer asymmetrischen mono- bzw. oligoartikulären peripheren Arthritis und einer schmerzhaften Enthesitis, die grundsätzlich alle Sehnenansätze des Körpers betreffen kann, leiden [5].

1.1.2 Pathogenese der AS

Die Pathogenese der AS ist bis heute unbekannt. Es besteht eine starke Assoziation mit dem Vorhandensein von HLA-B27, welches bei 90-95% der AS-Patienten nachweisbar ist. Das Vorhandensein von HLA-B27 bedeutet jedoch nicht zwangsläufig das Auftreten der Erkrankung. Nur ca. 1-5% der Träger des Merkmals erkranken tatsächlich an einer AS, was für einen wesentlichen Anteil anderer Gene oder Umweltfaktoren an der Krankheitsauslösung spricht [6]. HLA-B27 dient als MHC-Klasse-I-Molekül der Präsentation von Peptiden an Immunzellen. Zum pathogenetischen Zusammenhang existieren drei grundlegende Theorien, die die Erkrankung allerdings und trotz intensiver Forschung bislang nicht gänzlich zu erklären

vermögen. Vor dem Hintergrund neuer Erkenntnisse zu Interleukinen (IL) beziehungsweise dem IL-23-Th17-Signalweg bedarf es zudem einer Weiterentwicklung der Pathogenesevorstellungen [7]. Die erste Theorie zum HLA-B27-Molekül und der Krankheitsentstehung wird als arthritogene Peptid-Theorie bezeichnet und basiert auf der Idee des molekularen Mimikry zwischen pathologischen bakteriellen Peptiden und im Gelenk vorkommenden Eiweißen [8]. Dem HLA-B27-Molekül wird dabei die Präsentation distinkter bakterieller Antigene mit potenzieller Kreuzreaktivität mit endogenen Proteinen zugerechnet. Eine weitere Theorie geht von einer fehlerhaften Faltung des HLA-B27-Moleküls im endoplasmatischen Retikulum aus, welche eine zelluläre Stressreaktion mit krankhafter Freisetzung von Entzündungsmediatoren hervorruft. Zuletzt ist die Homodimer-Theorie zu nennen, die davon ausgeht, dass HLA-B27 zur Dimerisierung und übermäßigen Generierung von auf der Zelloberfläche exprimierten Homodimeren führt, die von sogenannten natürlichen Killerzellen erkannt werden und zu deren Aktivierung führen. Zellstress, bakterielle Infektionen oder Hypoxien werden als Trigger der Homodimerbildung angesehen.

Die Entdeckung von Tumornekrosefaktor-alpha-Blockern (TNF α -Blockern) und deren Einführung in die Therapie der SpA hat das Augenmerk auf die pathologische Rolle von Zytokinen gerichtet. Neben TNF α scheint besonders IL-23, welches die Polarisierung von T-Zellen in Th17-Zellen fördert, an der Pathogenese der SpA beteiligt zu sein. IL-23 wird auch im Rahmen von Zellstress, zum Beispiel ausgelöst durch Fehlfaltung von HLA-B27, freigesetzt [9]. Als Auslöser der Immunreaktionen scheinen bakterielle Antigene bedeutsam für die SpA zu sein. Die ReA beispielsweise wird durch verschiedene intestinale und urogenitale Infektionen ausgelöst und es ließ sich bei Patienten nach einer Yersiniose mit ReA bakterielles Antigen von Yersinien in der Synovialflüssigkeit (SF) per Immunfluoreszenz, aber nicht in Kultur nachweisen [10]. Besonders die Patienten, die das Merkmal HLA-B27 tragen, entwickeln nach einer ReA Jahre später das Vollbild einer AS [11]. Daneben erhöhen auch chronisch-entzündliche Darmerkrankungen und Psoriasis das Risiko für die Entwicklung einer AS-Erkrankung. Ca. 5-10% der AS-Patienten leiden gleichzeitig an einer CED [12]. Innerhalb der Gruppe der CED-Patienten erhöht offenbar das Vorhandensein von HLA-B27 das Risiko an einer AS zu erkranken: Ca. 50% der für das Merkmal HLA-B27 positiven Patienten mit einer bekannten CED-Erkrankung entwickeln über die Zeit eine AS-Erkrankung [13].

Darmentzündung ist aber auch bei AS-Patienten ohne klinische Zeichen einer CED häufig anzutreffen. So lassen sich auch bei ungefähr 60% der AS-Patienten ohne bekannte CED-Erkrankung und gastrointestinale Symptome Läsionen im Gastrointestinaltrakt nachweisen, die histologische Zeichen der akuten oder chronischen Entzündung zeigen [14, 15].

Die genannten Beispiele zeigen mögliche Eintrittspforten von Mikroorganismen, zum Beispiel auch kommensalen Darmbakterien, auf. Allerdings ist der direkte Nachweis bakterieller Strukturen per Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in Punktionsgeweben der Sakroiliakalgelenke bisher nicht gelungen [16]. Dies kann aber auch für ein Vorherrschen autoimmuner Prozesse im Sinne eines molekularen Mimikry sprechen. So ließen sich im Blut und im entzündeten Gelenk *in vitro* auch Immunantworten auf Proteinstrukturen des Knorpels (G1-Domäne des Aggrecans) nachweisen, wobei CD4⁺ T-Zellen an den Reaktionen des Immunnetzwerkes beteiligt sind, bei denen die CD4⁺ T-Zellen antigenspezifisch Gamma-Interferon (IFN γ) und TNF α ausschütten [17].

Andererseits ließ sich in der SF von AS-Patienten im Gegensatz zu RA-Patienten auch eine vermehrte T-Zellreaktivität gegenüber konservierten Proteinen von *Escherichia coli* (*E. coli*), einem kommensalen Darmbakterium, nachweisen [18]. Darüber hinaus wurde im Tierexperiment gezeigt, dass HLA-B27 transgene Ratten, die spontan eine Entzündung des Gastrointestinaltraktes, eine Spondylitis und periphere Arthritis entwickeln, dies nicht tun, wenn sie in einer keimfreien Umgebung aufwachsen. Dies spricht auch für die Bedeutung der Darmbakterien als Krankheitsauslöser [19]. Ebenso ließ sich bei diesen Versuchen ein Zusammenhang zwischen der Krankheitsstärke und der Anzahl von Enterokokken und *E. coli* in der Mikroflora des Darms der Tiere nachweisen [20].

1.1.3 Diagnose und Therapie

Die Diagnose wird aus der Anamnese und der sorgfältigen klinischen Untersuchung sowie mit laborchemischer und bildgebender Diagnostik gestellt. Rudwaleit *et al.* [21] beschreiben verschiedene Kriterien, die den entzündlichen Rückenschmerz, der als spezifisch für die axiale SpA gilt, charakterisieren. Dazu zählt das Auftreten des Rückenschmerzes vor dem 50. Lebensjahr, das zusätzliche Vorhandensein einer Morgensteifigkeit über 30 Minuten, die Besserung der Beschwerden durch Bewegung, das nächtliche Aufwachen aufgrund der Schmerzen und das Bestehen eines

alternierenden Gesäßschmerzes. Wenn mindestens zwei Punkte zutreffen, gelten die Beschwerden bei ausreichender Sensitivität und Spezifität als starker Hinweis auf eine axiale SpA. Die klinische Untersuchung beinhaltet neben der Feststellung des allgemeinen internistischen Status die Evaluierung der Flexion und Extension der Lendenwirbelsäule (Schober-Maß) und der lateralen spinalen Flexion. Als weitere Untersuchungen schließen sich die Bestimmung des HLA-B27-Status und die Bestimmung des C-reaktiven Proteins (CRP) an. Das CRP ist jedoch nur bei ca. 40% der Patienten erhöht, ein normales CRP schließt somit eine SpA nicht aus [22]. Differentialdiagnostisch zu bestimmende Autoantikörper werden bei der Erkrankung nicht gefunden, weshalb man die Erkrankung im rheumatologischen Formenkreis auch als seronegativ bezeichnet. Die Bildgebung spielt bei der Diagnosestellung eine wichtige Rolle. In der Vergangenheit wurde hierzu vor allem auf die modifizierten New York-Kriterien zurückgegriffen, in die neben dem oben beschriebenen Symptomkomplex auch der Nachweis struktureller Veränderungen in der klassischen Röntgenaufnahme der Sakroiliakgelenke eingeht [23]. Dabei werden als pathologische Röntgenveränderungen das Vorhandensein von Erosionen, Sklerose, Gelenkspaltverschmälerung und im fortgeschrittenen Stadium der Nachweis einer Gelenkankylose berücksichtigt. Die modifizierten New York-Kriterien gelten als erfüllt bei einseitigem Nachweis eindeutiger Erosionen oder beginnender Ankylose (Sacroiliitis Grad III oder IV) oder dem beidseitigem Nachweis eines sicheren Sacroiliitis Grad II. Derartige Veränderungen treten jedoch oft erst im fortgeschrittenen Krankheitsstadium auf, was dazu führt, dass sowohl Diagnosestellung als auch Therapiebeginn sehr verspätet erfolgen. Durch den Einzug der Magnetresonanztomographie (MRT) in die medizinische Praxis, die im Bereich der Sakroiliakgelenke entzündliche Veränderungen im Sinne eines Knochenmark-Ödems deutlich vor Auftreten röntgenologischer Veränderungen detektieren kann [24, 25], konnten auf Grundlage der Forschungsergebnisse der ASAS-Gruppe (*Assessment of SpondyloArthritis international Society*) und der Durchführung von prospektiven Studien neue Diagnosekriterien entwickelt werden [26].

Die Behandlung der SpA kann grundsätzlich an verschiedenen Punkten ansetzen und muss sich nach der klinischen Präsentation und dem Empfinden des Patienten richten. Die Therapie fußt auf physiotherapeutischen Übungen, dem Besuch von Selbsthilfegruppen und der Einnahme von NSAR (Nichtsteroidale Antirheumatika) als

Erstlinientherapie [27]. Zusätzlich hat sich – wie bereits erwähnt – die vergleichsweise neue Medikamentengruppe der TNF α -Blocker als sehr wirksam erwiesen und ist als Zweitlinientherapie beim Versagen der NSAR-Therapie zugelassen [28]. Interessanterweise scheint die TNF-Blockade sogar besser bei AS-Patienten zu wirken als bei RA-Patienten [29]. Demgegenüber wirkt das Standardmedikament Methotrexat (MTX) in der AS-Gruppe nicht zufriedenstellend auf die Symptome des Achsenskeletts [30], was auch als klinischer Hinweis auf die unterschiedliche Pathogenese der axialen und peripheren Manifestationen gesehen wird [31].

1.1.4 Die PsA als weitere SpA-Form

Die Psoriasisarthritis (PsA) gehört aufgrund der Überschneidungen bei den Symptomen (Wirbelsäulenbeteiligung, peripher-destruierende Arthritis, Entesitis und Uveitis) ebenfalls zur Gruppe der SpA. Zum möglichen Zusammenhang der dermatologischen Erscheinungsform der Psoriasis vulgaris und der möglichen Manifestation im rheumatologischen Bereich existieren verschiedene Übersichtsarbeiten [32-35]. Epidemiologisch lässt sich festhalten, dass in Mitteleuropa 1-2% der Menschen an einer Psoriasis erkranken. Ca. 20% der Psoriasis-Patienten entwickeln zusätzlich eine PsA [36], dabei treten die Hautveränderungen meist vor der Arthritis auf., wobei der Terminus PsA vor allem für das Krankheitsbild der peripheren Gelenkmanifestation verwendet wird und die axiale Manifestation der AS beziehungsweise der axialen SpA zugeordnet wird. Das gehäufte Auftreten der Psoriasis in Familien legt eine genetische Beteiligung nahe, und es wurden in den letzten Jahren einige Risikogene identifiziert, auf die hier nicht im Detail eingegangen werden kann. Interessanterweise findet sich im Falle der PsA allerdings ebenfalls ein Zusammenhang mit HLA-Molekülen [37].

Diagnostisch stellt sich die PsA wie die AS als seronegativ, d.h., es können keine Autoantikörper nachgewiesen werden. Sie imponiert oft durch eine Gelenkschwellung und erhöhte Entzündungsparameter. Radiologisch zeigen sich neben Erosionen auch Zeichen der Knochenneubildung in Form von Osteophyten und Ankylosen. Als Klassifikationswerkzeug werden die CASPAR-Kriterien (*Classification criteria for the diagnosis of Psoriatic Arthritis*) eingesetzt, die eine Entzündung der Gelenke, der Wirbelsäule oder der Sehnen, die zu Schmerzen und Schwellungen führen, erfassen. Zudem werden anhand eines Punktesystems weitere Kriterien wie anamnestische Psoriasis, Daktylitis, Seronegativität, Nageldystrophien oder der erbrachte radiologische Nachweis zusammengerechnet [38].

Therapeutisch ist bei einer individuell sehr unterschiedlichen Symptompräsentation auch ein individuelles Vorgehen nötig. Dieses beinhaltet als Erstlinientherapie die Verabreichung von NSAR sowie lokale Steroidinjektionen, nachfolgend kann bei fehlendem Ansprechen, strukturellen Veränderungen oder Progress der Einsatz von DMARD (*disease-modifying anti-rheumatic drugs*) wie Methotrexat (MTX) und bei deren Versagen TNF-Blocker erwogen werden [39].

1.2 Die RA als Kontrollgruppe

1.2.1 Definition, Epidemiologie, Klinik und Pathogenese

Die RA ist eine chronisch-autoimmune Entzündung der Gelenke, die meist symmetrisch befallen werden. Dabei sind vor allem die kleinen Gelenke der Hände und Füße betroffen. Die früher als chronische Polyarthritis bezeichnete Erkrankung wurde von Wahle *et al.* [40] und Scott *et al.* [41] zusammenfassend dargestellt. Klinisch imponiert die symmetrische Gelenkschwellung. Anfangs führt der Entzündungsschmerz zu Bewegungsproblemen, durch die nachfolgende Destruktion, die radiologisch im Verlauf nachgewiesen werden kann, kommt es aber auch zu Einschränkungen der Funktion der Gelenke [42]. Zusätzlich kann es durch kardiovaskuläre Komplikationen und Infektionen zu einer Einschränkung der Lebenserwartung der Patienten kommen. Die RA hat eine Prävalenz von 1% und betrifft meist Patienten zwischen dem 40. und 50. Lebensjahr. Dabei sind Frauen in einem ungefähren Verhältnis von 3:1 häufiger betroffen als Männer [43]. Pathophysiologisch scheint eine Kombination aus erblichen und erworbenen Fehlfunktionen des Immunsystems die Entstehung der Erkrankung zu beeinflussen. So fand man beispielsweise eine Assoziation der RA mit dem gehäuftem Auftreten des HLA-DRB1-Gens. Es handelt sich dabei um ein MHC-II-Molekül (*Major Histocompatibility Complex*), welches Peptide an Immunzellen präsentiert. Hier scheint eine Fehlfunktion im Zusammenspiel mit arthritogenen Peptiden zu existieren. Die in diesem Zusammenhang zu nennende Hypothese der *shared-epitopes* erachtet das Vorkommen einer bestimmten Aminosäuresequenz in der Region unterschiedlicher MHC-II-Moleküle, die so gleiche Peptide binden können, als ausschlaggebend [44]. Diese These ist allerdings nicht in der Lage, die Krankheit vollständig zu erklären. Zusätzlich tragen spezifische Umweltfaktoren und Lebensweisen, wie der Konsum von Tabak und die damit verbundene Inhalation unterschiedlichster chemischer Inhaltsstoffe, zur Krankheitsentwicklung bei [45]. Pathophysiologisch beobachtet man Reaktionen des Immunsystems gegen Gelenkstrukturen, die zu lymphozytärer

Infiltration der Synovia, einem veränderten Zytokinnetzwerk, Autoantikörperbildung und der Affektion von gewebsständigen Zellen wie z.B. Fibroblasten mit Pannusbildung und pathologischer Angiogenese führen [46, 47]. Die Autoantikörperbildung gegen körpereigene Strukturen scheint hierbei von besonderer Bedeutung zu sein. So finden sich bei etwa 50-80% der RA-Patienten erhöhte Spiegel des sogenannten Rheumafaktors (RF), der als Immunglobulin (Ig) M- oder IgA-Antikörper gegen das Fc-Fragment (*Fragment crystallizable*) von IgG gerichtet ist, oder anti-CCP-Antikörper beziehungsweise beide Autoantikörper. Anti-CCP steht hierbei für Antikörper gegen zyklisch citrullinierte Peptide. Dieser wird bei ca. 70% der RA-Patienten gefunden. Im Gegensatz zum RF korrelieren die Serumspiegel des anti-CCP-Autoantikörpers mit der Krankheitsaktivität [48].

1.2.2 Diagnose und Therapie

Die Diagnose wird durch die klinische Präsentation, Labortests auf RF und anti-CCP-Antikörper, Entzündungsparameter sowie die Bildgebung gestellt. Aufgrund des individuellen Verlaufs der Erkrankung und der sehr unterschiedlichen Spezifität und Sensitivität der apparativen Diagnostik ist allerdings eine Zusammenschau aller Befunde unerlässlich. Hilfreich für die Diagnosestellung sind die Kriterien des *American College of Rheumatology* (ACR) von 1987 [49], die aufgrund neuer Erkenntnisse im Bereich der Früherkennung 2010 in Zusammenarbeit mit der *European League Against Rheumatism* (EULAR) überarbeitet wurden [50]. Im Zuge dessen fanden neben der Gelenkbeteiligung laborchemische und serologische Parameter Eingang in die neuen ACR-Kriterien, während radiologische Befunde, die häufig erst als Spätfolge langjähriger Entzündung auftreten, ausgeschlossen wurden. Gleichzeitig dürfen die Organmanifestationen wie Vaskulitiden und Lungenbeteiligung, welche die Mortalität erhöhen können, nicht außer Acht gelassen werden. Therapeutisch unterscheidet man zwischen Akuttherapie und Basismedikation. Als Akuttherapie dienen Glukokortikoide, die eine schnelle Verbesserung der klinischen Beschwerden, also die Induktion einer Krankheitsremission, ermöglichen. Zur langfristigen Therapie und möglichst dauerhaften Aufrechterhaltung der Remission dienen die Basistherapeutika beziehungsweise DMARD. Diese Medikamente können das Auftreten struktureller Veränderungen mindern beziehungsweise verzögern [51]. Dazu wird primär auf das Medikament MTX zurückgegriffen. Bei nicht ausreichendem Therapieerfolg kann MTX mit Wirkstoffen wie Sulfasalazin und Anti-Malariamitteln kombiniert werden. Bei

Kontraindikationen oder Versagen der konventionellen DMARD-Therapie kommen Biologika zum Einsatz. Hier existieren unterschiedliche Therapiemöglichkeiten: TNF-Blocker hemmen die Wirkung des proinflammatorischen Zytokins $\text{TNF}\alpha$, während Abatacept und Rituximab die T-Zell-Aktivierung modulieren oder zur Depletion von B-Zellen führen [52]. Allerdings sollte die Therapie auch zusätzliche Ansätze wie Training und den Besuch von Selbsthilfegruppen beinhalten. Angestrebt wird die klinische und durch Bildgebung und Laborchemie bestätigte Remission. Diese wird durch klinische *Scoringsysteme* wie den *Disease Activity Score 28* (DAS28) abgebildet [53]. Die RA weist somit einige fundamentale Unterschiede zur Gruppe der SpA auf.

1.3 Das Immunsystem, Autoimmunität und die Bedeutung von CD4^+ T-Zellen

In der Interaktion mit unserer Umwelt sind wir ständig der Bedrohung durch fremde Organismen wie Bakterien, Viren oder Pilzen ausgesetzt. Die anerkannten Grundprinzipien dieses komplexen Konfliktes, die für das Verständnis dieser Arbeit wichtig sind, werden in den folgenden Abschnitten dargestellt und sind verschiedenen Standardwerken entnommen [54-58].

Zur Verteidigung gegen körperfremde Organismen haben sich in der Evolution verschiedene Mechanismen entwickelt. Zuerst wird der Eintritt durch unsere geschlossene Körperoberfläche wie Haut und Darmepithel mechanisch verhindert. Die Tränenflüssigkeit bedingt schon mechanisch die ständige Ausschwemmung von potenziell pathogenen Erregern. Gleichzeitig tragen wir auf der Haut und dem intestinalen Epithel auch kommensale Bakterien. Diese müssen, genau wie die trotz der beschriebenen Schutzmechanismen eintretenden pathogenen Mikroorganismen, auch aktiv kontrolliert werden. Kommt es zum Eintritt von Erregern über diese physikalischen Barrieren hinweg, wird das hochkomplexe und sehr effektive Immunsystem aktiviert, welches in das angeborene und erworbene Immunsystem eingeteilt wird. Die angeborene Immunität besteht aus Granulozyten, Makrophagen, Dendritischen Zellen (DZ) und natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) als zelluläre Elemente und dem löslichen Komplementsystem. Die angeborene Immunität ist in der Lage, konservierte Strukturen von Pathogenen zu erkennen und zu attackieren. Die erworbene Immunität wird durch T- und B-Zellen gebildet und durchläuft einen individuellen Reifungsprozess, der durch Genrekombination eine große Fülle von spezifischen Antigenrezeptoren hervorbringt.

Diese haben die Fähigkeit, spezifische pathogene Bestandteile, sogenannte Antigene, zu erkennen. Die Erkennung des spezifischen Antigens führt zur Aktivierung der sogenannten naiven B- und T-Zellen und leitet die Expansion dieser Zellen sowie weitere funktionelle Differenzierung in Effektor- und Gedächtniszellen ein. Diese Effektor-/Gedächtniszellen sind somit die Träger des immunologischen Gedächtnisses, d.h. sie sind in der Lage eine erneute Infektion schnell und adäquat zu bekämpfen. Die Epidemie des Humanen Immundefizienz Virus (HIV) beispielsweise, das T-Zellen befällt und zu deren Elimination führt, weist auf die Wichtigkeit der T-Zelle als Verstärker, aber auch als Regulator der Immunreaktion hin. So erleiden HIV-Patienten Infektionen, die für ein gesundes Immunsystem leicht abwehrbar sind. Gleichzeitig kann der Entstehungsprozess des erworbenen Immunsystems aber auch die Reaktion gegen körpereigene Strukturen bedingen. Dieses als Autoimmunität bezeichnete Phänomen zeigt in verschiedenen Krankheitsbildern auch die zerstörerische Kraft der Immunreaktion.

Im Fokus dieser Arbeit stehen die Charakteristika und Funktionen von $CD4^+$ T-Zellen, die eine zentrale Aufgabe in adaptiven Immunreaktionen übernehmen und denen eine pathogenetische Rolle für Autoimmunerkrankungen sowie chronische Erkrankungen zugeschrieben wird.

Die Vorläufer der T-Zellen stammen zwar wie die der B-Zellen (B für *Bone marrow*) aus der fetalen Leber und dem Knochenmark, ihre Reifung findet aber im Thymus statt, was sich auch in ihrer Bezeichnung als T-Zelle (Thymus-gereifte Zelle) widerspiegelt. Die große Mehrheit der T-Zellen zeichnet sich durch das Vorhandensein des aus der α - und β -Kette bestehenden $\alpha\beta$ T-Zellrezeptors (TZR) aus. Dieser Rezeptor ermöglicht das Erkennen von Proteinen und Proteinfragmenten, die von verschiedensten Zellen auf MHC-Klasse I oder MHC-Klasse II-Molekülen präsentiert werden. Sogenannte $CD8^+$ T-Zellen erkennen auf MHC-Klasse I präsentierte Antigene, während $CD4^+$ T-Zellen auf MHC-Klasse II präsentierte Antigene erkennen. $CD8^+$ T-Zellen töten hauptsächlich infizierte Zellen ab, $CD4^+$ T-Zellen regulieren die humorale als auch die zelluläre Immunantwort, weshalb sie auch als T-Helferzellen bezeichnet werden. Die große Heterogenität des TZR basiert auf der somatischen Rekombination von V-, D- und J-Genen, auf die hier jedoch nicht weiter eingegangen werden kann. Im komplex aufgebauten Thymus durchlaufen die Zellen die oben genannte Rekombination und einen Selektionsprozess, der sowohl die Funktionalität des TZR gewährleistet als auch

vor der pathologischen Erkennung von körpereigenen Strukturen schützt. So beginnt im subkapsulären Bereich des Thymus die Differenzierung und Proliferation der Zellen und die β -Kette des TZR wird rearrangiert. Ähnliches findet für die α -Kette im Kortex statt. Der nun reife TZR wird anschließend der positiven Selektion unterzogen, indem seine Affinität zu körpereigenen MHC-Molekülen des Thymusepithels geprüft wird. Bei fehlerhaftem Verhalten enden die Zellen in der Apoptose, dem programmierten Zelltod, und werden von Makrophagen abgeräumt. In der Medulla des Thymus erfolgt dann die sogenannte negative Selektion, bei der autoreaktive T-Zellen, die auf vom Epithel präsentierte körpereigene Proteine reagieren, ebenfalls als Endstrecke in der Apoptose enden [59]. Etwa 5% der Zellen überleben diesen Prozess und können in die Blutzirkulation als naive T-Zellen entlassen werden, wobei naive T-Zellen durch ein passendes Antigen aktiviert werden (siehe Abschnitt 1.3.1). Naive T-Zellen rezirkulieren im Körper (siehe Abschnitte 1.3.2 und 1.3.3). Die Erkennung des spezifischen Antigens durch den TZR führt zur Aktivierung der naiven T-Zellen. Außerdem werden die T-Zellen topographisch geprägt (siehe Abschnitt 1.3.4). Im Zuge der Aktivierung kommt es zur Induktion von aktivierungsassoziierten Genen, die als Aktivierungsmarker detektiert werden können und in Abhängigkeit von polarisierenden Zytokinen zur Differenzierung in verschiedene Gedächtniszell-Subpopulationen oder *Subsets* mit unterschiedlichsten Funktionen beitragen (siehe Abschnitt 1.3.5). Neben den naiven T-Zellen verlässt eine weitere distinkte Subpopulation von $CD4^+$ T-Zellen den Thymus, die als natürliche regulatorische T-Zellen bezeichnet werden. Diese Zellen besitzen wie auch die in der Peripherie aus naiven $CD4^+$ T-Zellen induzierten T_{REG} -Zellen suppressive Funktionen (siehe Abschnitt 1.3.6). Die entstandenen Gedächtniszellen werden im Rahmen sekundärer Immunreaktionen aktiviert, was zu einer schnelleren Elimination von Krankheitserregern führt, oder im Rahmen pathologischer Immunreaktionen eine Chronifizierung von Entzündungsreaktionen bedingen kann. Eine persistente Immunaktivierung kann dann zu einer Zellerschöpfung führen (siehe Abschnitt 1.3.7).

1.3.1 Aktivierung von $CD4^+$ T-Zellen

Nach ihrer Reifung im Knochenmark und Thymus nehmen die $CD4^+$ T-Zellen ihre Funktion im Immunsystem wahr. Sie rezirkulieren zwischen Blut und den sekundär-lymphatischen Organen. Zu diesen Organen gehören die Milz, die peripheren und mesenterialen Lymphknoten sowie die Peyer-Plaques im Gastrointestinaltrakt. Typischerweise kommt es in einem Lymphknoten zur Aktivierung und funktionellen

Differenzierung der naiven $CD4^+$ T-Zellen. Diese Aktivierung findet nach der Präsentation eines passenden Antigens durch DZ statt.

Nach heutigem Wissenstand werden beispielsweise im Darm und der Haut Antigene in die Lamina propria beziehungsweise Dermis geleitet, wo sie von DZ endozytotisch aufgenommen und prozessiert werden. Zusätzlich unterliegen Umgebungsproteine diesem Mechanismus. Anschließend wandern die DZ in die mesenterialen Lymphknoten oder die peripheren Lymphknoten der Haut und präsentieren das Antigen im Parakortex im MHC-II-Molekül an die naiven $CD4^+$ T-Zellen. Entsprechend der Zwei-Signal-Hypothese kommt es zur Ausbildung der immunologischen Synapse. Diese besteht aus dem Kontakt zwischen TZR-CD3-Komplex, flankiert von CD4 und dem antigentragenden MHC-II-Molekül. Dieses Signal reicht meist aber nicht für die Aktivierung der naiven T-Zellen aus. Deshalb erfolgt ein zweites Signal beispielsweise durch CD28 auf Seiten der $CD4^+$ T-Zellen und Mitgliedern der B7-Familie auf DZ. Erfolgen nicht beide Signale, findet keine intrazelluläre Weiterleitung und somit keine Differenzierung zu T_{EM} -Zellen statt. Dieser Zustand wird als Anergie bezeichnet. Die weitere funktionelle Polarisierung der T-Zellen in Effektorzellsubsets wird durch polarisierende Signale, meist in Form von Interleukinen, reguliert [60]. Die Aktivierung und Differenzierung der $CD4^+$ T-Zellen ist mit der Induktion und Expression von Aktivierungsmarkern, wie zum Beispiel CD40-Ligand oder 41BB verbunden. Außerdem beeinflusst die Aktivierung die Expression von CD45RA, einem Glykoprotein, welches in verschiedenen Isoformen vorkommt. CD45RA wird typischerweise auf naiven $CD4^+$ T-Zellen exprimiert und nach Aktivierung herunterreguliert [61]. Dementsprechend sind T_{EM} -Zellen negativ für CD45RA, was im vorliegenden Forschungsprojekt zur Unterscheidung zwischen naiven $CD4^+$ T-Zellen und T_{EM} -Zellen diente.

1.3.2 Rezirkulation von $CD4^+$ T-Zellen einschließlich der Adhäsionskaskade

Naive $CD4^+$ T-Zellen rezirkulieren zwischen Blut und den sekundär-lymphatischen Organen, vor allem den Lymphknoten. Kommt es nach Einwanderung in den Lymphknoten nicht zum Auffinden eines Antigens, verlassen die naiven T-Zellen den Lymphknoten über das efferente Lymphgefäß. Sie gelangen dann über den *Ductus thoracicus*, der in den linken Venenwinkel – gebildet durch den Zusammenfluss von *Vena jugularis externa*, *Vena jugularis interna* und *Vena subclavia* – mündet, wieder in den systemischen Blutstrom [62]. Auch die aktivierten Lymphozyten verlassen den Lymphknoten über diesen Weg und gelangen wieder in das Blut. Im Gegensatz zu den

naiven T-Zellen können aber die T_{EM}-Zellen dann in periphere Gewebe, z.B. die Haut oder den Darm, einwandern und sich mit ihren Effektorfunktionen an der Elimination von Krankheitserregern beteiligen. Gleichzeitig verlieren sie die Fähigkeit, aus dem Blutstrom in die Lymphknoten einzuwandern. Um in Lymphknoten und Gewebe zu gelangen, müssen die T-Zellen aus dem Blutstrom durch die Barriere des Endothels wandern. Dies wird als Migration bezeichnet. Es handelt sich dabei um einen hochregulativen Prozess, der durch Adhäsionsmoleküle und chemotaktische Moleküle, die Chemokine, vermittelt wird. Zum prinzipiellen Verständnis der Migration existiert ein Modell, das hier mit den zugehörigen Molekülen zuerst im Allgemeinen für Leukozyten beschrieben werden soll. Dieses Modell der Adhäsionskaskade lässt sich grundsätzlich in vier Schritte einteilen. Dabei kommt es im ersten Schritt zum Rollen der Leukozyten auf der Gefäßwand. Diese lösen Kontakte zwischen Leukozyten und Endothel werden durch transmembranöse Glykoproteine (Selektine) oder durch membranständige Integrine vermittelt. Im zweiten Schritt kommt es zur Ligandierung von Chemokinrezeptoren auf Leukozyten durch auf dem Endothel präsentierte Chemokine. Dies führt zur Aktivierung und Konformationsänderung von Integrinen. Diese vermitteln dann die feste Adhäsion, den dritten Schritt der Adhäsionskaskade. Abschließend erfolgt die Transmigration der Zellen (Schritt 4) in das Gewebe [63, 64].

Die für das Anhaften und Rollen verantwortlichen Selektine werden in E-, P- und L-Selektine unterschieden. E- und P-Selektine werden vor allem auf entzündeten Endothelien exprimiert, L-Selektine auf Leukozyten. Liganden für E- und P-Selektine finden sich auf myeloiden, dendritischen und zum Teil auf leukozytären Zellen exprimiert. Ein Beispiel eines leukozytären E- und P-Selektin-Liganden ist das im Rahmen dieser Arbeit auch analysierte *Cutaneous Lymphocyte-associated Antigen* (CLA) [65].

Das Rollen ermöglicht die Ligandierung von Chemokin-Rezeptoren auf den Leukozyten. Von den an der Migration beteiligten Molekülen zeigen die Chemokin-Rezeptoren und Chemokine die größte Vielfalt. Mittlerweile sind mehr als 40 unterschiedliche Chemokine und mehr als 20 verschiedene Chemokin-Rezeptoren bekannt. Die Chemokin-Rezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die zur Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden führen und somit beispielsweise zur Konformationsänderung der Integrine führen [66].

Bei den Integrinen handelt es sich um heterodimere Glykoproteine aus einer α - und β -Untereinheit. Durch ihren intra- und extrazellulären Aufbau spielen sie bei der Adhäsion von Immunzellen, aber auch bei der Kommunikation, eine wichtige Rolle. Als Bindungspartner dienen Moleküle der Immunglobulin-Superfamilie (Ig-Superfamilie) auf dem Endothel, bei denen es sich um transmembranäre Glykoproteine handelt. Ihr Name geht auf ihre extrazelluläre Proteinmuster zurück, die Immunglobulinen ähneln. Mit Hilfe von LPAM-1 (*Lymphocyte Peyer's patch Adhesion Molecule-1*, in dieser Arbeit $\alpha_4\beta_7$ -Integrin) können Leukozyten mit MAdCAM-1 (*Mucosal Adressin Cell Adhesion Molecule-1*) und VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule-1*) interagieren, VLA-4 (*Very Late Antigen-4*, $\alpha_4\beta_1$ -Integrin) ermöglicht eine Interaktion nur mit VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule-1*) [67]. LFA-1 (*Lymphocyte Function-associated Antigen-1*, $\alpha_L\beta_2$) kann zudem eine Bindung mit ICAM-1 (*Intracellular Adhesion Molecule-1*) eingehen [68]. Die Bindungspartner auf dem Endothel werden konstitutiv oder als Folge von proinflammatorischen Signalen wie $\text{TNF}\alpha$ exprimiert. So wird eine verstärkte Einwanderung von Leukozyten in entzündliche Gewebe vermittelt.

1.3.3 An der Rezirkulation von CD4^+ T-Zellen beteiligte Moleküle und Rezeptoren

Wie schon oben bemerkt, unterscheiden sich naive und T_{EM} -Zellen in ihrem Rezirkulationsverhalten. Darüber hinaus nimmt die Diversität der Rezirkulation bei antigenerfahrenen T-Zellen zu [69-71]. Die Basis der differenziellen Rezirkulationsmuster ist die distinkte differenzierungsabhängige Expression von Adhäsionsmolekülen und Rezeptoren.

Die Einwanderung der naiven CD4^+ T-Zellen in die peripheren Lymphknoten erfolgt hauptsächlich über L-Selektin (CD62L) und den C-C Chemokin-Rezeptor 7 (CCR7). L-Selektine vermitteln dabei das oben beschriebene Rollen. CCR7 interagiert mit dem C-Chemokin-Rezeptor-Ligand 19 (CCL19) und CCL21 auf den hochendothelialen Venolen (HEV) der Lymphknoten. Die Adhäsion und Transmigration erfolgt über die Bindung von LFA-1 und ICAM-1. Im Zuge der Aktivierung und Differenzierung in T_{EM} -Zellen werden L-Selektine und CCR7 herunterreguliert, weshalb T_{EM} -Zellen nicht mehr über die HEV in die Lymphknoten einwandern [62]. Die Einwanderung in die mesenterialen Lymphknoten und die Peyer-Plaques erfolgt durch Ligation der erwähnten Moleküle $\alpha_4\beta_7$ -Integrin und MAdCAM-1 [72].

In der vorliegenden Arbeit lag das Augenmerk besonders auf der Gruppe der antigenerfahrenen T_{EM} -Zellen. Diese können im Gegensatz zu den naiven T-Zellen in periphere Gewebe einwandern, wobei Studien der letzten Jahre zeigen, dass die Rezirkulation der T_{EM} -Zellen topografischen Grenzen, welche durch Organe vorgegeben werden, unterliegt. Dies hat zum Begriff des organspezifischen *Homings* geführt. Für diese Arbeit und die bereits dargelegten Krankheitszusammenhänge ist insbesondere der Migrationsvorgang in die Darmmukosa und die Haut von Interesse.

Für das erste Rollen auf dem Hautendothel nutzen die T_{EM} -Zellen den Rezeptor CLA, welcher mit E-Selektinen des Hautendothels interagiert [73]. Daneben werden die Chemokin-Rezeptoren CCR4 [74] und CCR10 [75] für die Einwanderung in die Haut und Epidermis von T_{EM} -Zellen benötigt. Ihre Liganden CCL17/TARC (*Thymus and Activation-regulated Chemokine*) und CCL27/CTACK (*Cutaneous T-cell Attracting Chemokine*) finden sich sowohl im Entzündungsgeschehen als auch in der gesunden Haut [74].

Für den Darm gibt es unterschiedliche Erklärungsansätze zum Eintritt der T_{EM} -Zellen, je nach Höhe des Darmsegmentes. Im Dünndarm scheint die Migration grundsätzlich von der Expression von CCR9 und $\alpha_4\beta_7$ -Integrin abzuhängen. MAdCAM-1 findet sich als Bindungspartner für $\alpha_4\beta_7$ -Integrin [72, 76] und CCL25/TECK (*Thymus-expressed chemokine*) als Bindungspartner für CCR9 auf den Venolen des Dünndarmgewebes [77]. Für $CD8^+$ T-Zellen konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass sowohl das Fehlen von β_7 -Integrin [78] als auch das Blockieren von CCL25 und das Abschalten der CCR9-Expression [79] zu Funktionseinschränkungen in der Rekrutierung von T-Zellen führt. Im Dickdarm scheinen andere Konstellationen nötig zu sein, was in dieser Arbeit nicht weiter beschrieben werden soll.

Zusätzlich können T_{EM} -Zellen von sogenannten Gedächtniszellen oder *central-memory* T-Zellen (T_{CM}) abgegrenzt werden, die durch ein hohes proliferatives Potenzial gekennzeichnet sind und bei erneutem Auftreten des Erregers stark expandieren und Effektorfunktionen ausüben können [80, 81]. Die T_{CM} -Zellen, die hier der Vollständigkeit halber erwähnt werden, unterscheiden sich von den T_{EM} -Zellen durch die Expression von CCR7 und L-Selektin, weshalb sie, ähnlich den naiven T-Zellen, hauptsächlich in periphere Lymphknoten einwandern können, was die Proliferation auf ein bereits bekanntes Antigen ermöglicht [82, 83]. Demgegenüber sind die antigenerfahrenen T_{EM} -

Zellen darauf spezialisiert, in nicht-lymphatische Gewebe, insbesondere entzündetes Gewebe, einzuwandern [84].

1.3.4 Induktion der topographischen Prägung der CD4⁺ T-Zellen

Die topographische Prägung erfolgt während der Aktivierung der CD4⁺ T-Zellen im Lymphknoten. Dabei haben lokale Gewebefaktoren einen großen Einfluss und es entsteht der für die organspezifische Gewebeinfiltration beschriebene Phänotyp.

In den drainierenden mesenterialen Lymphknoten des Darms spielt das lipophile Vitamin A eine entscheidende Rolle. Dieses können die mesenterialen DZ mittels ihrer Enzymausstattung in Retinolsäure umwandeln, welche im Nukleus an den Retinolsäurerezeptor (RAR) bindet und auf transkriptioneller Ebene die Zelldifferenzierung, insbesondere die Expression von *Homing*rezeptoren beeinflusst. Dieser Vorgang ist in Abbildung 1.1 dargestellt.

In der Haut (siehe Abbildung 1.2) scheinen Metabolite von Vitamin D, welches ebenfalls lipophil ist, eine wesentliche Rolle zu spielen. Vitamin D entsteht aus seinem Cholesterinvorläufer durch Sonnenstrahlung. Im Körper wird das biologisch aktive 1,25(OH)₂D₃ in Zwischenschritten in der Leber und der Niere erzeugt, aber auch DZ verfügen über die nötigen Enzyme des Vitamin D-Stoffwechsels [85].

Forschungsergebnisse konnten detailliert zeigen, dass Retinolsäure im Gastrointestinaltrakt die Induktion der beschriebenen Rezeptoren $\alpha_4\beta_7$ -Integrin und CCR9 begünstigt und gleichzeitig die Induktion des Moleküls CLA auf T-Zellen *in vitro* hemmt [86]. In der Haut fördert das aktivierte Vitamin D die Expression von CCR10, welcher T-Zellen innerhalb der Haut von der Dermis in die Epidermis leitet. Gleichzeitig kommt es zu einer Hemmung der Induktion von $\alpha_4\beta_7$ und CCR9 [87].

Es konnte zudem gezeigt werden, dass die induzierten *Homing*rezeptoren zumindest auf einem Teil der T_{EM}-Zellen dauerhaft exprimiert werden und somit das topografische Gedächtnis langfristig in den T_{EM}-Zellen fixiert wird [88].

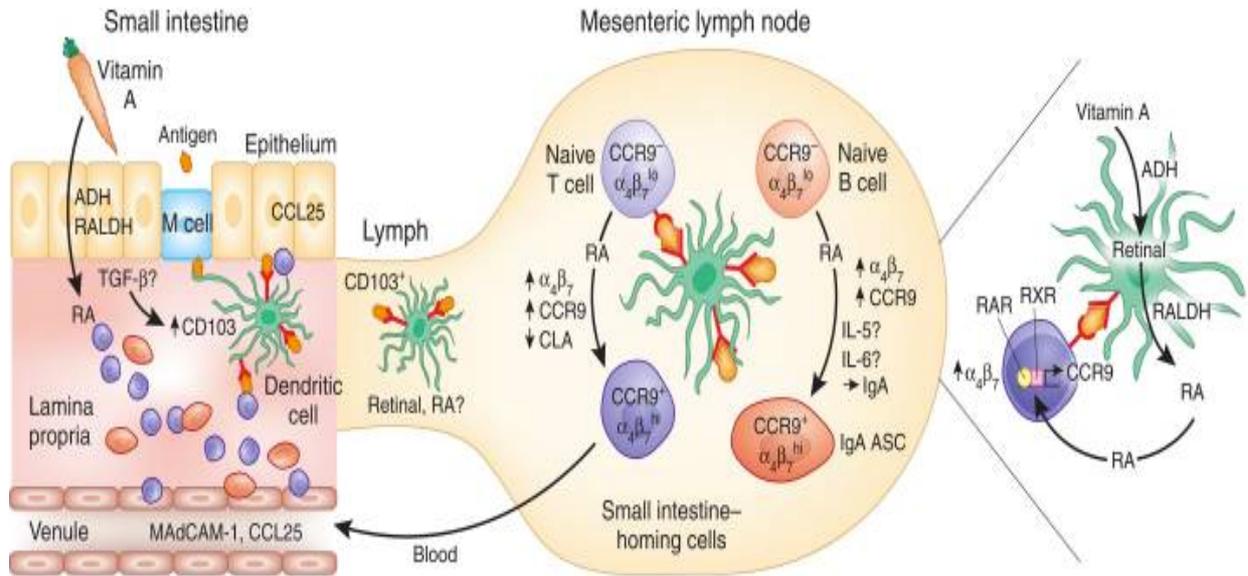


Abb. 1.1: Induktion des darmspezifischen Phänotyps von T- und B-Zellen im mesenterischen Lymphknoten durch dendritische Zellen [85]

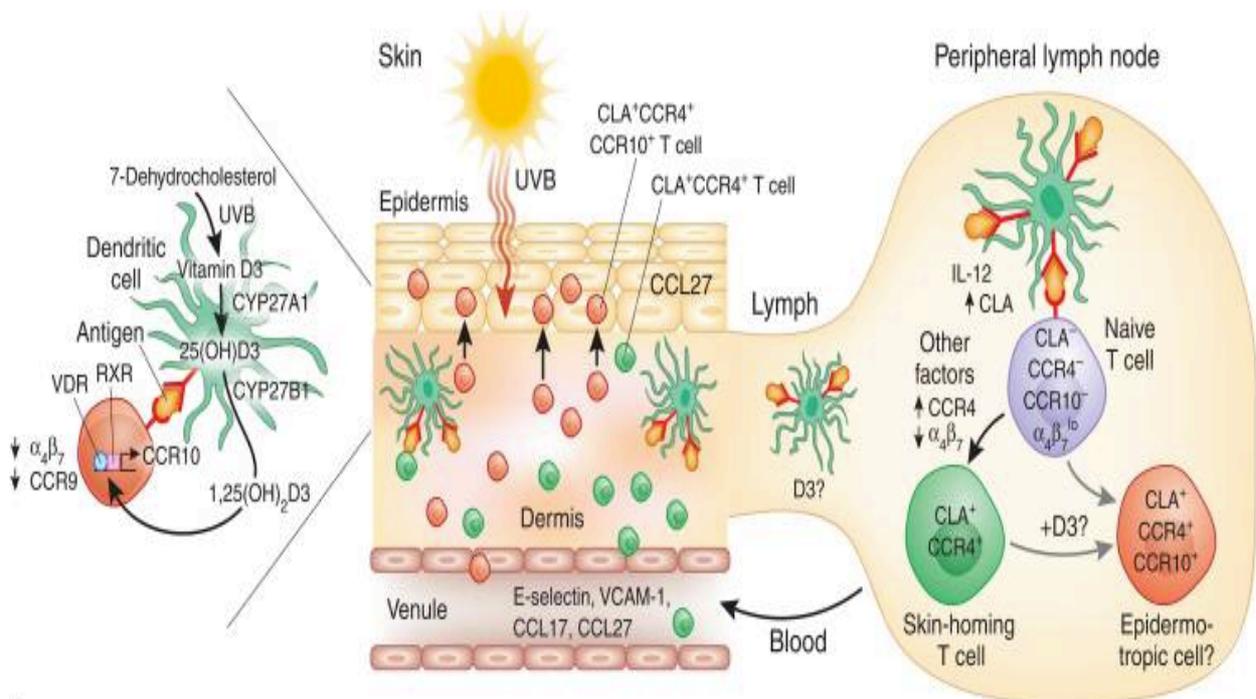


Abb. 1.2: Induktion des hautspezifischen Phänotyps von T- und B-Zellen im peripheren Lymphknoten durch dendritische Zellen [85]

1.3.5 Funktionelle Differenzierung der CD4⁺ T-Zellen in T_{EM}-Zellen

Die Aktivierung von naiven T-Zellen zu T_{EM}-Zellen führt zu einer Differenzierung in unterschiedliche funktionelle *Subsets* von T_{EM}-Zellen. Die T_{EM}-Zellen stellen ein Schaltmoment verschiedener Immunreaktionen dar, indem sie mittels Zytokinen verschiedene zelluläre Mechanismen steuern. Initial wurden zwei *Subsets* unterschieden, die T-Helfer (Th)-1 und die Th2-Zellen [89]. Die Th1-Zellen zeigen proinflammatorische Aktivität und sezernieren IFN γ und TNF α . Sie tragen zur Bekämpfung intrazellulärer Erreger durch die Stimulation der Phagozytose und den toxischen Molekülausstoß von Makrophagen und zytotoxischen T-Zellen bei. Th2-Zellen sind durch die Produktion der Zytokine IL-4, IL-5 und IL-10 gekennzeichnet. Diese Zytokine unterstützen die humorale Antwort des Immunsystems und fördern dazu die Differenzierung antikörpersezernierender Plasmazellen. Außerdem stimulieren sie die Rekrutierung von Eosinophilen. So können beispielsweise Parasiten bekämpft werden. Als weitere Subpopulation werden heute Th17-Zellen angesehen, die durch die Sekretion von IL-17, IL-17F, IL-21 und IL-22 charakterisiert sind. Ihre Wirkung wird ebenfalls als proinflammatorisch eingeordnet. Weitere Populationen sind Gegenstand aktueller Forschungen. Die Entstehung dieser unterschiedlichen *Subsets* wird bestimmt durch das während der Aktivierung naiver T-Zellen vorherrschende Zytokinmilieu. Die unterschiedlichen Zytokinprofile wiederum sorgen durch Kreuzhemmung zudem für die Komplettierung dieser Differenzierungswege [90]. Eine vereinfachte Darstellung der auslösenden Zytokine der Polarisierung und der zugehörigen Effektorzytokine der T-Zell-Subpopulationen bietet Abbildung 1.3. Es gibt Hinweise darauf, dass bei verschiedenen (autoimmunen) Erkrankungen Ungleichgewichte der Subpopulationen zur immunologischen Pathogenese beitragen [91].

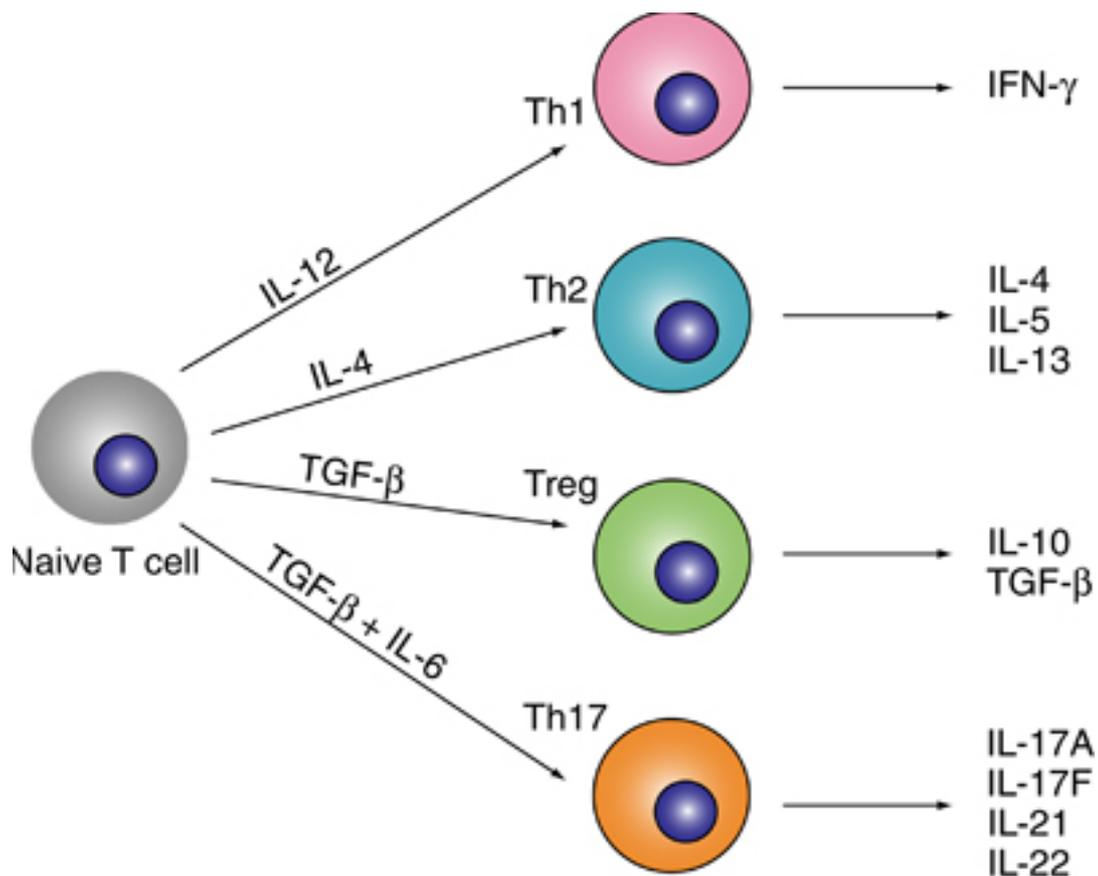


Abb.1.3: Polarisierung von T-Zellen durch auslösende Zytokine und Haupteffektorzytokine der diversen T-Zell-Subpopulationen [92]

1.3.6 Differenzierung von regulatorischen CD4⁺ T-Zellen

Neben den beschriebenen Effektorzellen sind in den letzten Jahren auch Konzepte zellulärer Regulatoren in den Fokus der Forschung gerückt. Diese Zellen werden als regulatorische T-Zellen (T_{REG}-Zellen) bezeichnet. Das Immunsystem ist neben den exogenen Fremdanitgenen auch ständig dem körpereigenen Gewebe in Form von Autoantigenen ausgesetzt. Dies impliziert die Gefahr von Immunreaktionen gegen körpereigene Strukturen, die sogenannte Autoimmunität. Zur Verhinderung von Autoreaktivität existiert der beschriebene Selektionsprozess im Thymus, welcher die sogenannte zentrale Toleranz gewährleistet. Einige potenziell autoreaktive Zellen überleben jedoch den Selektionsprozess im Thymus und wandern in die Peripherie [93, 94]. Deshalb scheinen zusätzlich T_{REG}-Zellen am Ort der Immunreaktion hemmende Eigenschaften zu vermitteln. T_{REG}-Zellen sind durch die Expression von CD25 gekennzeichnet [95]. CD25 ist die α -Kette des IL-2-Rezeptors. Bei Depletion dieser Zellen in Mäusen erkrankten diese an schweren autoreaktiven Pathologien [95]. Man

unterscheidet heute natürliche T_{REG} -Zellen (nT_{REG} -Zellen) von induzierten T_{REG} -Zellen (iT_{REG} -Zellen). Erstere entstehen im Thymus, letztere entstehen außerhalb des Thymus aus $CD4^+CD25^-$ T-Zellen [96]. T_{REG} -Zellen sind durch die Expression von FoxP3 gekennzeichnet, den Transkriptionsfaktor *Forkhead-box-protein-3*, der für die Funktion der nT_{REG} -Zellen unerlässlich zu sein scheint [97, 98]. Aufgrund dieser Erkenntnisse ist FoxP3 ein anerkannter Marker von T_{REG} -Zellen [99]. iT_{REG} -Zellen lassen sich *in vitro* durch Antigenstimulation naiver $CD4^+$ T-Zellen in Anwesenheit von TGF β und IL-2 in FoxP3 $^+$ T_{REG} -Zellen differenzieren [100], allerdings bestehen Unterschiede in der Stabilität [57, 101-103]. Ihre eigentliche immunmodulatorische Funktion erfüllen nT_{REG} - wie iT_{REG} -Zellen erst nach der Stimulation ihres TZR durch ein spezifisches Antigen [104, 105]. Von den klassischen nT_{REG} - und iT_{REG} -Zellen lassen sich *T-regulatory-1* (Tr1-Zellen) und Th-3-Zellen abgrenzen, die die antiinflammatorischen Zytokine IL-10 [106] und TGF β produzieren [107]. Th-3-Zellen scheinen besondere Bedeutung bei der oralen Toleranz zu haben [108]. In Zusammenhang mit T_{REG} -Zellen steht auch der in dieser Arbeit untersuchte Transkriptionsfaktor Helios. In der Literatur wurde anfangs postuliert, dass die Expression von Helios eine konkrete Unterscheidung von nT_{REG} - und iT_{REG} -Zellen ermögliche, wobei nT_{REG} -Zellen an der Reaktion bei Autoantigenen mitwirken sollen, während iT_{REG} -Zellen auf exogene Antigene reagieren [109]. Bei den hier untersuchten Erkrankungen und den Annahmen zu ihrer Pathogenese (klassisch autoimmun bei RA, durch Interaktionen mit Keimen ausgelöste Immunreaktion bei AS) sollte geprüft werden, ob sich distinkte, durch Helios charakterisierte Subpopulationen im Entzündungsgebiet anreichern.

Bis heute ist nicht eindeutig geklärt, wie T_{REG} -Zellen ihre suppressive Wirkung entfalten, es existieren mehrere Theorien. Außerdem können auch T-Helferzellen Funktionszustände annehmen, die zu einer Abschwächung der Immunreaktion beitragen können. Die für das Verständnis dieser Arbeit wichtigen Suppressionsmechanismen werden im Folgenden beschrieben. Ein Suppressionsmechanismus der T_{REG} -Zellen scheint die hohe Bindung von IL-2 zu sein, welches den Effektorzellen dann nicht mehr zur Verfügung steht und zur Hemmung ihrer Proliferation führt [110]. Zudem wirken die sezernierten Zytokine IL-10 und TGF β offenbar immunsuppressiv [111]. Darüber hinaus spielen Untersuchungen zufolge Zell-Zell-Kontakte über Oberflächenmoleküle der T_{REG} -Zellen wie CTLA-4 (*Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Antigen-4*) eine Rolle [112]. Dieses Molekül bindet wie CD28

an CD80 und CD86 der DZ, wobei die Interaktion mit CTLA-4 im Gegensatz zur Costimulation von CD28 inhibitorisch wirkt [113]. Allerdings ist der Transfer dieser Erkenntnisse zum Teil schwierig, da die Verhältnisse *in vivo* sehr komplex sind. So stellt sich beispielsweise in Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen die Frage, ob die Funktion der T_{REG}-Zellen bei Autoimmunerkrankungen eingeschränkt ist. Auch wird diskutiert, ob die Effektorzellen möglicherweise resistent gegen die T_{REG}-vermittelte Suppression sind [114, 115].

1.3.7 Phänotypische Marker der Aktivierung und der Zellerschöpfung von T_{EM}-Zellen und T_{REG}-Zellen

Die Erkennung des spezifischen Antigens durch eine CD4⁺ T-Zelle führt über die Ligation des TZR, die Ligation unterschiedlicher costimulatorischer Moleküle als zweites Signal und dem vorherrschenden IL-Milieu zur beschriebenen Aktivierung und Differenzierung der CD4⁺ T-Zellen. Im Zuge der Ligation wird eine intrazelluläre Signalkaskade ausgelöst, die zur Induktion und Expression verschiedener Moleküle führt. So kann es zum Beispiel zur Ausbildung von Oberflächenrezeptoren oder auch zur Produktion und Freisetzung von Effektorzytokinen kommen. Im Falle von T_{REG}-Zellen kann dies zur Aktivierung von suppressiven Funktionen führen. Dabei können je nach Kombination der Molekülinteraktionen zwischen APZ und T-Zellen unterschiedliche Aktivitätszustände entstehen. In diesem Zusammenhang spielen Moleküle der TNF/TNFR-Gruppe und B7-Gruppe eine entscheidende Rolle. So kann durch unterschiedliche Kombinationen der Oberflächenmoleküle eine funktionelle T-Zelle entstehen, aber auch Überreaktivität wird durch Inhibition vermieden und die Immunreaktion wird feinjustiert.

Um das Ausmaß der Aktivierung *in vivo* von T_{EM}-Zellen und T_{REG}-Zellen zu erfassen, ist es notwendig, einige Oberflächenmoleküle, die im Zuge der Aktivierung der CD4⁺ T-Zellen induziert werden, zu messen. So führt beispielsweise die Aktivierung von T-Zellen zur Expression von CD40L (CD154) und über die Ligation mit CD40 auf APZ, B-Zellen, Makrophagen und T-Zellen selbst zur weiteren Reifung dieser [116]. In der vorliegenden Arbeit wurden in diesem Zusammenhang außerdem CD25 und 4-1BB als Marker der T-Zellaktivierung analysiert. Neben seiner konstitutiven Expression auf T_{REG}-Zellen wird CD25 als α -Kette des IL-2-Rezeptors innerhalb weniger Stunden nach T-Zellaktivierung temporär hochreguliert [117]. Auch 4-1BB auf den T-Zellen und 4-1BBL, beispielsweise auf APZ, haben starken Einfluss und steuern etwa die klonale

Expansion, die Anreicherung im Gewebe und auch das Überleben der Zellen ausschlaggebend [118, 119]. 4-1BB wird dabei nach T-Zellaktivierung induziert und mit unterschiedlicher Kinetik auf T_{EM}-Zellen und T_{REG}-Zellen exprimiert, wobei T_{REG}-Zellen den Rezeptor verzögert exprimieren [120].

Als Marker der T-Zellerschöpfung gilt PD-1 (CD279) [121, 122]. Der Rezeptor PD-1, der mit seinen Liganden PD-L1 (CD274) und PD-L2 (CD273) einen Signalweg der B7-Gruppe darstellt, wurde von Ishida *et al.* [123] bei Versuchen mit α CD3 stimulierten Mausthymocyten nachgewiesen. PD-1 hat dabei Einfluss auf die Inhibition von autoreaktiven T-Zellen, die dem Mechanismus der zentralen Toleranz entkommen sind. Die Ligation von PD-1 durch seine Liganden führt zu einer Hemmung der TZR-abhängigen Aktivierung, sodass unter anderem weniger Effektorzytokine gebildet werden [124]. Zusätzlich scheint PD-L1 die Gewebseinwanderung von T-Lymphozyten zu verhindern [125]. Gleichzeitig wird PD-1 auch auf T_{REG}-Zellen exprimiert, wobei hier bei Ligation keine Inhibition, sondern eine Expansion der Zellen beobachtet werden kann [126]. Der Prozess der Wirkung dieses Rezeptors ist sehr dynamisch, der suppressive Mechanismus ist in Abbildung 1.4 dargestellt. Den Einfluss dieser Signalwege gegenüber ungewünschten Immunreaktionen und damit die inhibitorische Funktion zeigen Versuche mit PD-1^{-/-} Mäusen, die teilweise schwere Glomerulonephritiden und eine dem Lupus ähnliche Erkrankung entwickeln [127]. In einer Modellerkrankung der Multiplen Sklerose bei Mäusen, der EAE (Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis), wurde eine antikörpervermittelte Blockade von PD-1 herbeigeführt, in deren Folge sich eine Krankheitsverstärkung beobachten ließ [128].

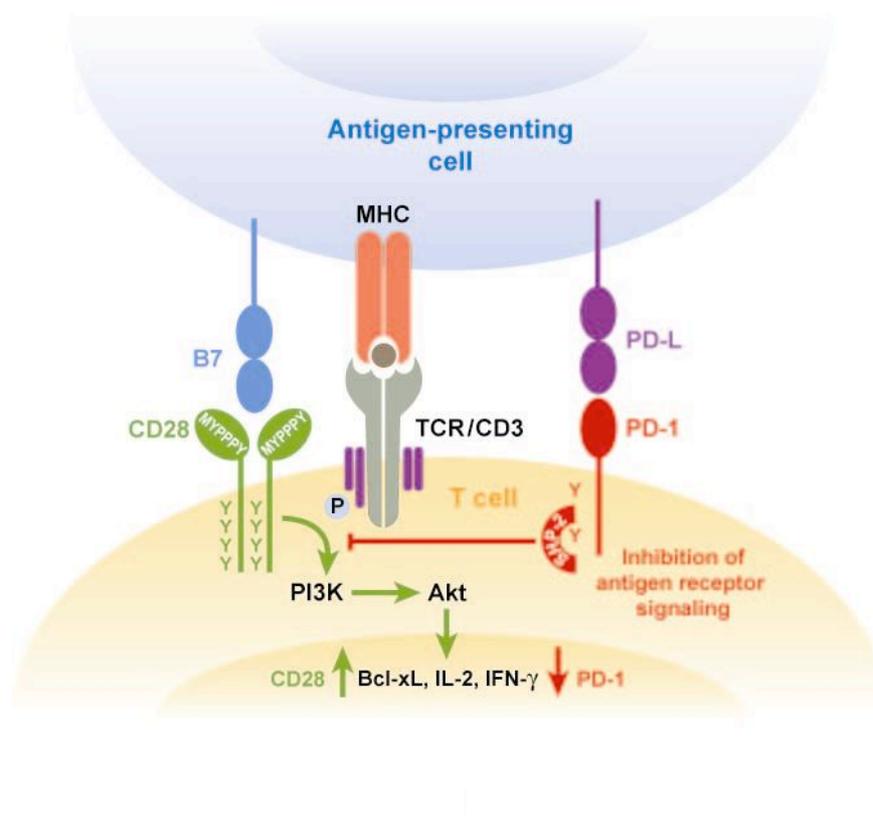


Abb. 1.4: Mögliche Rezeptorinteraktionen zwischen APZ und T-Zellen mit intrazellulärer Inhibition durch PD-1 [129]

1.4 Ziele dieser Arbeit

Im Zuge der Erkrankung an einer der verschiedenen SpA-Formen kann es zur Entzündung in peripheren Gelenken ähnlich der RA kommen. Im Gegensatz zur RA verläuft die periphere Gelenkentzündung bei den SpA nicht erosiv, zerstört also den Knochen nicht. Neben diesen andersartigen Erscheinungsformen vermutet man ätiologische Unterschiede zwischen SpA und RA. Während bei der SpA mikrobielle Auslöser wie Haut- oder Darmkeime mit der Krankheitsentstehung in Zusammenhang gebracht werden, geht man bei RA von einer klassischen Autoimmunerkrankung mit gestörter Toleranz gegenüber körpereigenen Strukturen aus. Daneben besteht eine große Überlappung bei Risikoantigenen innerhalb der SpA, nicht aber zwischen RA und SpA. Unabhängig von diesen ätiologischen und pathologischen Unterschieden spricht die SpA-Arthritis auf ähnliche Medikamente an wie die RA-Arthritis. Ziel der Arbeit war, durch deskriptive Analyse verschiedener Moleküle Hinweise auf eine distinkte Genese und Pathogenese der peripheren Arthritis bei SpA und RA zu gewinnen.

In den durchgeführten Versuchsreihen, die dieser Arbeit zugrunde liegen, erfolgte die phänotypische Charakterisierung der CD4⁺ T-Zellen im peripheren Blut, vor allem aber im entzündeten Gelenk von SpA-assoziierten Arthritiden. Hierfür wurden SpA-Patienten mit Gesunden und RA-Patienten verglichen. Dazu wurden zunächst *Homing*marker, insbesondere haut-, entzündungs- und darmspezifische Marker, Aktivierungsmarker und Marker für T-Zellerschöpfung sowie spezifische Marker für T_{REG}-Zellen bestimmt. Es sollte dann insbesondere geklärt werden, ob sich bei Patienten mit AS verstärkt darmspezifische T-Zellen in entzündeten peripheren Gelenken nachweisen lassen, während bei PsA (und auch RA) vermehrt haut- beziehungsweise entzündungsspezifische T-Zellen dominieren. Dies könnte dann ein Hinweis auf ein extraartikuläres *Priming* der T-Zellen zum Beispiel im Darm oder der Haut sein. Die Bestimmung des Aktivierungsgrades und das Ausmaß der Zellerschöpfung sollten eruiert werden, um zu klären, ob sich die Arthritis in den untersuchten Krankheitsbildern in ihrer Chronizität unterscheidet. Die T_{REG}-Charakterisierung erfolgte mit der Zielsetzung, mögliche Unterschiede in der Akkumulation von nT_{REG}-Zellen (Thymus-abhängig) und iT_{REG}-Zellen zu erfassen. Zum Zeitpunkt der Analysen ging man davon aus, dass Helios ein Marker von nT_{REG} ist [109]. Es sollte also untersucht werden, ob sich in den SpA-assoziierten Arthritiden (bei vermuteten exogen-mikrobiellen Auslösern)

und der RA (bei vermuteten autoantigenen Auslösern) Unterschiede in der Anreicherung von iT_{REG}- gegenüber nT_{REG}-Zellen finden.

2. Material und Methoden

2.1 Technische Geräte

Brutschrank Heraeus Function Line
Computer

Heraeus, Hanau, Deutschland (D)
Microsoft X86 Family 6, Microsoft
Corporation, WA, USA;

FACS Calibur

MacBook Pro, Apple Inc., CA, USA

FACS Cantoll

Becton Dickinson (BD), Heidelberg, D

Gefrierschränke

BD, Heidelberg, D

-20°C, -80°C; Bosch, Gerlingen, D; Sanyo,
Osaka, Japan

Kühlschrank

Bosch, Gerlingen, D

Lichtmikroskop Wilovert

Hund, Wetzlar, D

Magnetrührer RCT

IKA, Staufen im Breisgau, D

MinishakerMS2

IKA, Staufen im Breisgau, D

Sterilbank Class II Type A/B3

Nuaire, MN, USA

Stickstofftank WAN-70

Cryoson, Schöllkrippen, D

Waage Scout Pro SPU202

Ohaus, NJ, USA

Zentrifuge Heraeus Megafuge 1.0R

Heraeus, Hanau, D

2.2 Software

Adobe Reader 9

Adobe Systems Software Ireland Limited,
Dublin, Irland

EndNote X5

Thomson Reuters, PA, USA

Flowjo 7.6

Tree Star, OR, USA

GraphPad Prism 5 für Mac

GraphPad Software Inc., CA, USA

Microsoft Office für Mac 2008

Microsoft Corporation, WA, USA

Mac OS X Lion

Apple Inc., CA, USA

PubMed

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>

2.3 Verbrauchsmaterialien

Cyro-Röhrchen

2ml, NUNC, Dänemark

Einwegpipetten

5, 10 und 25ml; BD, Heidelberg, D

FACS Röhrenchen	BD, Heidelberg, D
Handschuhe	Gr. M, Ansell, Staffordshire, Großbritannien
<i>Multi-Step-Pipette</i>	Eppendorf, Hamburg, D
Neubauer Zählkammer	Digital Bio, Seoul, Republik Korea
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, D
Pipettenspitzen	10, 200, 1000µl; Sarstedt, Australien
Reaktionsgefäße	500, 1500µl; Eppendorf, Hamburg, D 15, 50ml; BD, Heidelberg, D
Reaktionsgefäßständer	Roth, Karlsruhe, D
Vacutainer-Röhrenchen, heparinbeschichtet	10ml, BD, Heidelberg, D
Zellfilter	40µm, BD, Heidelberg, D

2.4 Chemikalien und Verbrauchsmittel

2.4.1 Chemikalien

AB-Serum	PAA, Pasching, Österreich
A.dest (<i>Ampuwa</i>)	Fresenius, Bad Homburg v. d. Höhe, D
Beriglobin	Sigma, MO, USA
Brefeldin A	Sigma, MO, USA
BSA	Biomol, Hamburg, D
<i>Cellfix</i>	BD, Heidelberg, D
DMSO	Serva, Heidelberg, D
EDTA	Sigma, MO, USA
FACS <i>Clean</i>	BD, Heidelberg, D
FACS <i>Flow</i>	BD, Heidelberg, D
FACS <i>Rinse</i>	BD, Heidelberg, D
FACS- <i>LysingSolution</i>	BD, Heidelberg, D
FACS <i>Permeabilizing Solution 2</i>	BD, Heidelberg, D
FCS	PAA, Pasching, Österreich
Ficoll-Hypaque (Natriumdiatrizoat)	GE Healthcare, Schweden
Formalin	Sigma, MO, USA
HBSS	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, D
PBS	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, D

Penicillin-Streptomycin-Lösung	Seromed, Wien, Österreich
RPMI 1640	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, D
Trypanblau	Biochrom, Berlin, D

2.4.2 Puffer und Medien

Tab. 2.1: Verwendete Puffer und Medien und deren Zusammensetzung

Bezeichnung	Zusammensetzung
AB-Medium (Stimulationsmedium)	10% AB-Serum in RPMI + 100U/ml Penicillin/Streptomycin + 2mM L-Glutamin
Auftaumedium	20% FCS in RPMI
Einfriermedium	20% DMSO in FCS (auf Eis gelagert)
Färbelösung zur Zellzahlbestimmung	20% Trypanblau in A.dest
Fixierungsmedium	PBS-Puffer mit 2% Paraformaldehyd (w/v)
FoxP3-Kit (ebioscience, USA)	<i>Fix/Perm Buffer</i> <i>Fix/Perm Concentrate</i> <i>10x Permeabilisationbuffer</i>
PBS/BSA (PBS + 0,5% (w/v) Rinderserumalbumin)	
PBS/BSA/Azid	0,01% Natriumazid (NaH ₃) in PBS/BSA
PBS/BSA/EDTA	2 mM Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA) in PBS/BSA

2.4.3 Zellstimulanzen

Tab. 2.2: Verwendete Antigene und deren Hersteller

Antigen	Hersteller
α CD3 (purified NA/LE Mouse anti-human)	BD, Heidelberg, D
α CD28 (purified NA/LE Mouse anti-human)	BD, Heidelberg, D
PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Acetat) + Ionomycin	Sigma, MO, USA

2.4.4 Antikörper

Tab. 2.3: Verwendete Antikörper mit Spezifität, Klon, Markierung und Hersteller

Spezifität	Klon	Markierung	Hersteller
Beta7	FIB504	PE	BD
CCR4	1G1	AlexaFluor 647	BD
CCR5	2D7	FITC	BD
CD3	HIT3a	APC-Cy7	Biologend
CD4	SK3	PerCP	BD
CD8	SK1	PerCP-Cy5.5	Biologend
CD25	2A3	APC	BD
CD45RA	HI100	APC	BD
CD45RA	5H9	PE	BD
CD137 (4-1BB)	4B4-1	PE	Miltenyi Biotec
CD154 (CD40L)	24-31	Pacific Blue	Biologend
CLA	HECA	FITC	Biologend
FoxP3	PCH101	FITC	ebioscience
Helios	22F6	AlexaFluor647	Biologend
IFN γ	4S.B3	PE	Biologend
PD-1	MIH4	PE	BD
TNF α	Mab11	APC	BD

2.5 Biologisches Material

Für die hier durchgeführten Versuche wurden Blut- und Synovialflüssigkeitsproben (beide versetzt mit Heparin, siehe Tabellen 2.4 und 2.5) von Patienten und Probanden der rheumatologischen Ambulanz der Charité Campus Benjamin Franklin und zwei kooperierenden Praxen bezogen. Die Synovialflüssigkeitsproben (SF) wurden in einer therapeutischen oder diagnostischen Punktion akquiriert. Die Patienten und Probanden wurden über die Ziele der Studie aufgeklärt und haben ihr Einverständnis zur Teilnahme erklärt. Die Untersuchungen erfolgten in Übereinstimmung mit dem Ethikvotum der Ethikkommission der Charité (Nr. EA/010/11). Es wurden SpA- (AS und PsA separat) und RA-Patienten mit einer anhand der international üblichen Kriterien festgestellten gesicherten Diagnose einbezogen. Krankheitsstadien und Aktivitäten waren nicht definiert. Für die AS-Erkrankung wurden die New York-Kriterien zur Diagnosesicherung benutzt, für die Diagnosen einer PsA die CASPAR-Kriterien und für die Diagnose einer RA die ACR-Kriterien. Aufgrund der starken Variabilität in den Probenmengen der SF waren nicht immer alle Versuche am Material eines Patienten möglich.

Neben diesen „Patientenproben“ wurden Blutproben von gesunden Menschen, d.h. von Menschen ohne bekannte Autoimmunerkrankung oder aktive Infektion, aus der Institutsumgebung als „Kontrollen“ genutzt. Aufgrund der epidemiologischen

Heterogenität der untersuchten Erkrankungen konnten die Kontrollen nur näherungsweise zu den Patientenproben gewählt werden.

2.5.1 Patientencharakteristika (Blutproben)

Tab 2.4: Charakteristika der Blutproben der AS-, PsA- und RA-Patienten mit durchschnittlichem Alter, Geschlecht, HLA-B27-Status, RF- und anti-CCP-Ak-Status, durchschnittlicher Erkrankungsdauer, Medikation, BSG (Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit), CrP, BASDAI (*Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index*) und DAS28 (*28-joint-count Disease Activity Score*); Durchschnittswerte mit Errechnung von *Mean + SD*

	Ankylosierende Spondylitis (AS) n=12	Psoriasis-Arthritis (PsA) n=7	Rheumatoide Arthritis (RA) n=11	Kontrollen (Con) n=13
Alter (Jahre)	33,3 ± 11,7	56 ± 18,8	67,3 ± 11,1	40,9 ± 14,6
Geschlecht	11m/1w	2m/5w	3m/8w	6m/7w
HLA-B27	9/12	-	-	-
Rheumafaktor (RF)	-	-	9/11	-
Anti-CCP-Ak	-	-	6/11	-
Dauer der Erkrankung (Monate)	30,9 ± 37,1	47,9 ± 61,9	16,3 ± 12,1	-
Medikation	1 MTX 9 NSAR 4 TNF α -Blocker	4 MTX 2 Prednisolon 2 Sulfasalazin 1 Lefunomid 2 NSAR	5MTX 6 Prednisolon 1 Sulfasalazin 6 TNF α -Blocker	-
BSG	4,2 ± 2,3	27 ± 26,9	41,1 ± 32,7	-
CrP	5,7 ± 6	2,4 ± 1,9	3,6 ± 3,7	-
BASDAI	4,2 ± 2,3	-	-	-
DAS28	-	4,3 ± 2	2,8 ± 0,6	-

2.5.2 Patientencharakteristika (SF-Proben)

Tab 2.5: Charakteristika der SF-Proben der AS-, PsA- und RA-Patienten mit durchschnittlichem Alter, Geschlecht, HLA-B27-Status, RF- und anti-CCP-Ak-Status, durchschnittlicher Erkrankungsdauer, Medikation, BSG (Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit), CrP, BASDAI (*Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index*) und DAS28 (*28-joint-count Disease Activity Score*); Durchschnittswerte mit Errechnung von *Mean + SD*

	Ankylosierende Spondylitis (AS) n=5	Psoriasis-Arthritis (PsA) n=5	Rheumatoide Arthritis (RA) n=4
Alter (Jahre)	43,6 ± 17,9	43,4 ± 25,4	55,5 ± 23
Geschlecht	3m/2w	3m/2w	1m/3w
HLA-B27	2/5	-	-
Rheumafaktor (RF)	-	-	4/4
Anti-CCP-Ak	-	-	³ / ₄
Dauer der Erkrankung (Monate)	33,9 ± 55,1	66,1 ± 81,6	21,9 ± 14,9
Medikation	1 MTX 4 NSAR 1 TNF α -Blocker	1 MTX 1 Prednisolon 2 NSAR	1 MTX 3 Prednisolon 1 Lefunomid 2 TNF α -Blocker
BSG	-	19 ± 10,5	32,5 ± 31,7
CrP	19,1 ± 31	3,2 ± 3,3	1,2 ± 0,8
BASDAI	4,4 ± 1,8	-	-
DAS28	-	4 ± 1,6	3,5 ± 0,7

2.6 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie erlaubt die Analyse von Zellen anhand von Streulichteigenschaften oder nach Fluoreszenzmarkierung anhand der Fluoreszenzeigenschaften. Hierfür wird dazu nach dem Ansaugen der suspendierten Probe ein linearer Strom erzeugt, der die zu untersuchenden Zellen schließlich einzeln an einem Laserstrahl vorbeiführt. Dies erfolgt in einer Geschwindigkeit, welche die Analyse von mehreren tausend Zellen pro Sekunde erlaubt. Detektoren erfassen die Ablenkung des Laserstrahls (Streulicht) und bei Verwendung fluoreszenzmarkierter Zellen auch die emittierten Lichtsignale unterschiedlicher Wellenlänge. Die zelleigene Streuung in einem kleinen Winkel (Vorwärtsstreulicht, FSC) wird durch die Größe der Zellen bestimmt, während das im rechten Winkel gestreute Licht Auskunft über das Vorhandensein von Granula und die Oberfläche der Zellmembran (Seitwärtsstreulicht, SSC) gibt. So können zum Beispiel schon verschiedene zelluläre Bestandteile wie Lymphozyten und Granulozyten voneinander unterschieden werden. Durch die

Verwendung und Kombination fluoreszenzmarkierter Antikörper können außerdem die Rezeptorexpressionen und die Expression intrazellulärer Proteine und biochemischer Parameter untersucht werden. Der Laser regt die Fluorochrome der benutzten Antikörper an, die dadurch Licht emittieren. Dieses Licht gelangt durch ein Spiegelsystem und spezifische Farbfilter, die das Fluoreszenzlicht nach Spektren auftrennen, auf Detektoren. Die Eigenschaften dieser Farbstoffe, ihre Absorptions- und Emissionswellenlängen, sind für die beiden hier verwendeten Geräte FACS Calibur und FACS Canto II, das zusätzlich zu einem blauen und roten Laser noch einen violetten Laser besitzt, in den Tabellen 2.6 und 2.7 dargestellt. Die benutzten konjugierten Farbstoffe PerCP-Cy5.5 und APC-Cy7 funktionieren derart, dass der erste Farbstoff vom Laser angeregt wird und als Energiedonor für den zweiten Farbstoff wirkt. Dieser zweite Farbstoff emittiert dann die Energie, die er vom ersten Farbstoff erhalten hat, als längerwelliges Licht. Schließlich wird das so entstandene Signal verstärkt und über eine elektrische Weitergabe in eine digitale Information verarbeitet. Diese Daten werden dann mit dem Programm *Flowjo* (Tree Star, OR, USA) visualisiert und mit Hilfe von Vergleichsfärbungen und optisch diskriminierbaren Populationseigenschaften analysiert.

Tab. 2.6: Absorptions- und Emissionswellenlängen der Fluoreszenzfarbstoffe des FACS Calibur

Fluoreszenz	Absorptionsmaximum	Emissionsmaximum
FITC (FL1)	495 nm	519 nm
PE (FL2)	480/565 nm	578 nm
PerCP (FL3)	536 nm	670 nm
APC (FL4)	650 nm	660 nm
AlexaFlour 647 (FL4)	653 nm	668 nm

Tab. 2.7: Absorptions- und Emissionswellenlängen ausgewählter Fluoreszenzfarbstoffe des FACS Canto II

Fluoreszenz	Absorptionsmaximum	Emissionsmaximum
Pacific Blue (violetter Laser)	404 nm	455 nm
FITC (blauer Laser)	495 nm	519 nm
AlexaFluor488 (blauer Laser)	499 nm	519 nm
PE (blauer Laser)	480/565 nm	578 nm
PerCP (blauer Laser)	536 nm	670 nm
PerCP-Cy5.5 (blauer Laser)	490/675 nm	694 nm
APC (roter Laser)	650 nm	660 nm
APC-Cy7 (roter Laser)	650/755 nm	785 nm

2.6.1 Oberflächenfärbungen der *Homing*rezeptoren (CCR4, CCR5, CCR9, CLA, β_7)

Die Blutproben wurden unmittelbar nach Erhalt verarbeitet. Zunächst wurden 100 μ l aus Heparin-Vacutainern mit den in Tabelle 2.8 dargestellten Färbelösungen für 15 Minuten bei Dunkelheit inkubiert. Unspezifische Bindungen der Antikörper an die Fc-Rezeptoren der Zelloberfläche wurden durch Zusatz von polyklonal-humanem IgG (Beriglobin) in der Verdünnung 1:50 unterbunden. Danach wurde das Blut mit PBS gewaschen (Standardwaschschritt mit 1500rpm für 10 Minuten bei 4°C). Nach Entfernen des Überstandes wurde das Pellet zur Lysierung der Erythrozyten mit 1ml *FACSLysingpuffer* (1:10 mit A.dest) resuspendiert und bei Dunkelheit 15 Minuten gelagert. Es folgte ein Waschschritt mit 1400rpm für 15 Minuten bei 4°C. Die durch die Lyse erzeugten erythrozytenfreien Blutzellen wurden darauf ein weiteres Mal mit PBS gewaschen und bis zur Messung am FACS Calibur in *CellFix* (1:10 mit A.dest) aufgenommen.

Tab. 2.8: Verwendete Antikörper inklusive Verdünnung zur Färbung der Oberflächenmoleküle (*Homing*)

Fluoreszenz	1	2	3
FITC	CCR9 (1:10)	CLA (1:10)	CCR5 (1:10)
PE	β_7 (1:10)	β_7 (1:10)	CD45RA (1:10)
PerCp	CD4 (1:10)	CD4 (1:10)	CD4 (1:10)
APC/AF 647	CD45RA (1:10)	CD45RA (1:10)	CCR4 (1:20)

In der SF wurde nach Erhalt zuerst die sehr variable Zellzahl bestimmt. Dazu wurden 20µl der Flüssigkeit mit 80µl einer zweiprozentigen Trypanblau-Lösung gemischt und in eine Neubauer C-Chip Zählkammer übertragen. Trypanblau kann die Biomembran der toten Zellen durchdringen. Damit ist eine Tot-Lebend-Differenzierung der Zellen möglich, und die Zellzahl kann durch Auszählung von 4 x 16 Feldern (vier Großquadrate) bestimmt werden. Der Mittelwert muss dazu mit dem Verdünnungsfaktor und dem Kammerfaktor 10^4 multipliziert werden. Dadurch erhält man die Zellzahl pro Milliliter. Anschließend wurde der für die Färbungen berechnete Bedarf an nativer Synovialflüssigkeit mit HBSS resuspendiert und gewaschen. Das Pellet wurde in PBE resuspendiert und durch ein 70µm Zellsieb pipettiert. Nach einem erneuten Waschschrift wurden die Zellen in 100µl PBE wie oben beschrieben gefärbt. Nur bei blutig tingiertem Material wurden die Erythrozyten wie oben beschrieben lysiert, andernfalls wurden diese Schritte übersprungen.

2.6.2 Kombinierte Färbungen von Aktivierungsmarkern auf der Zelloberfläche (4-1BB, PD-1) und intrazellulären Transkriptionsfaktoren (Foxp3, Helios)

Für die Färbung der auf der Zelloberfläche exprimierten Aktivierungsmarker PD-1 und 4-1BB wurden die Proben wie unter 2.6.1 behandelt. Danach erfolgte die Färbung der intrazellulären Transkriptionsfaktoren FoxP3 und Helios. Um den Eintritt der Antikörper in die Zellen und den Zellkern zu ermöglichen (Tabelle 2.9; intrazelluläre Marker fettgedruckt), wurde das Pellet mit einem Fixierungs-/Permeabilisierungspuffer (*Fix/Perm*) für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Dieser Puffer setzt sich aus drei Teilen *Diluent* und einem Teil Konzentrat zusammen und wurde immer während des Versuches angesetzt. Der Permeabilisierungspuffer bewirkt einerseits die Fixierung der Zellen und führt andererseits zur Permeabilisierung, also zur Porenbildung in der Zellmembran, was den Eintritt der Antikörper ermöglicht. Danach wurde die Probe mit dem dazugehörigen Permeabilisierungspuffer gewaschen, der von 10-facher Konzentration mit A.dest zu einfacher Konzentration verdünnt wurde. Zur intrazellulären Färbung wurden dann nach einem weiteren Waschschrift mit PBE 50µl der jeweiligen Färbelösung hinzugegeben und dann für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift unter Verwendung des Permeabilisierungspuffer wurden die Zellen in *CellFix* aufgenommen und mit einem FACS Calibur gemessen.

Tab. 2.9: Verwendete Antikörperkombinationen zur Färbung der oberflächlichen und intrazellulären Moleküle (fett markiert)

Fluoreszenz	1	2	3
FITC	FoxP3	FoxP3	FoxP3
	(1:20)	(1:20)	(1:20)
PE	PD-1	CD45RA	4-1BB
	(1:10)	(1:10)	(1:10)
PerCp	CD4	CD4	CD4
	(1:10)	(1:10)	(1:10)
APC/AF 647	CD45RA	Helios	CD25
	(1:10)	(1:50)	(1:20)

2.7 Funktionelle Untersuchung von CD4⁺ T-Zellen aus der Synovialflüssigkeit

2.7.1 Zellseparation humaner mononukleärer Zellen und Lagerung

Voruntersuchungen zu dieser Arbeit hatten erbracht, dass eine Separation mononukleärer Zellen aus der SF (SFMNC) nötig ist, um eine Stimulation mit Phorbol-12-Myristat-13-Acetat und Ionomycin (PMA/Ionomycin) zur Aktivierung von Lymphozyten durchzuführen. Deshalb wurde die heparinisierte SF aufgrund ihrer Viskosität 1:3 mit HBSS verdünnt und gewaschen (Standardwaschschritt mit 1500rpm für 10 Minuten bei 4°C). Das Pellet wurde dann in 10ml PBE resuspendiert, Gewebsreste wurden durch Filtration durch einen 40µm-Zellfilter entfernt. Nach einem weiteren Standardwaschschritt wurden die Zellen in RPMI aufgenommen und 25ml der Lösung in einem 50ml Reaktionsgefäß auf 15ml Ficoll Hypaque geschichtet. Beim nachfolgenden 20-minütigen Zentrifugieren bei Raumtemperatur und 2500rpm wandern die Erythrozyten und Granulozyten aufgrund der Dichteverhältnisse zwischen Zellen und Ficollmedium auf den Boden des Gefäßes, während die mononukleären Zellen, also Lymphozyten und Monozyten, sich in der Interphase auf dem Ficoll und unter der Plasmaphase ansammeln. Die Interphase wurde mit einer Pipette abgesaugt, mit HBSS im Standardwaschschritt gewaschen, und die Zellen wurden gezählt. Aus logistischen Gründen war ein Einfrieren der Zellen vor der Stimulation nötig. Dafür wurden die gewonnenen SFMNC in Portionen von 1×10^7 Zellen vorsichtig auf Eis mit Einfriermedium aus FCS und 20% DMSO resuspendiert und nach einer Vorkühlphase in Cryoröhrchen in -80°C überführt und später bei -196°C in flüssigem Stickstoff gelagert. Einen Tag vor dem Stimulationstag wurden die Cryoröhrchen aus dem Stickstofftank sofort in ein warmes Auftaumedium aus 20% FCS-Serum und RPMI

überführt und gewaschen. Nach Abkippen des Überstandes wurde aufgrund der toxischen Wirkung des DMSO der Rücklauf abpipettiert und die Zellen in AB-Medium aufgenommen. Nach einer Nacht im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ wurde die Zellzahl erneut bestimmt und die Stimulation begonnen.

2.7.2 Stimulation von CD4⁺ T-Zellen

Zur Bestimmung der Effektorfunktionen der CD4⁺ T-Zellen *in vitro* wurden die SFMNC in runde Stimulationsreagenzgläser überführt und verschiedene Stimulationsreagenzien hinzugefügt. Neben einer unbehandelten Kontrolle wurden die SFMNC durch lösliches PMA/Ionomycin als T-Zellrezeptor-unabhängige Aktivierungsform oder durch αCD3 und αCD28 als polyklonale TZR-abhängige Aktivierungsform durch Quervernetzung dieser Oberflächenmoleküle benutzt. Während αCD3/αCD28 den physiologischen Weg der Aktivierung von T-Zellen imitiert, basiert der Wirkmechanismus von PMA auf der Aktivierung von Proteinkinase C, die enzymatisch die Stoffwechsellistung der Zelle erhöht. Zusätzlich kommt es durch das Ionophor Ionomycin zu einem Ca²⁺-Einstrom und somit zu Effekten der Ca²⁺/Calmodulin-Achse. Während PMA (25ng/ml) und Ionomycin (1μg/ml) zu den Proben hinzupipettiert wurden, wurden die Proben zur αCD3/αCD28-Aktivierung in beschichtete (*gecoatete*) Stimulationsreagenzgläser überführt. Dazu wurden die Antikörper in 1ml PBS in der Konzentration 10μg/ml für αCD3 und 1μg/ml für αCD28 gelöst und über Nacht in den Stimulationsreagenzgläsern bei 4-8°C gelagert. Vor der Stimulation der SFMNC wurde diese Lösung entfernt und die Reagenzgläser wurden mit PBS gewaschen.

Nach dem Ansetzen der Proben und unstimulierter Kontrollen wurden diese im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ für 2 Stunden inkubiert. In einem weiteren Schritt wurde 10μg/ml Brefeldin A hinzugegeben, welches die Translokation von Proteinen aus dem Golgiapparat verhindert. Dadurch wird die Sekretion dieser Moleküle unterbunden und es kommt zur Anreicherung in der Zelle. Nach Zugabe von Brefeldin A wurden die Proben für weitere 4 Stunden im Brutschrank stimuliert. Zum Abschluss des Versuches wurde den Proben 2mM EDTA-Lösung zugefügt und das Gemisch für 10 Minuten bei RT inkubiert, da sich so die Zellen von der Reagenzglaswand lösen und die Bindung von Ca²⁺ zum gewünschten Reaktionsabbruch führt. Nach Stimulation wurden die SFMNC einfach gewaschen und durch Resuspendieren in zweiprozentigem Formalin für 20 Minuten bei RT fixiert. Nach abermaligem Waschen erfolgte die Färbung der Zellen. Danach konnten die SF-Proben in FACS-Puffer bei 4°C gelagert werden.

2.7.3 Intrazelluläre Färbung zum Nachweis von Zytokinen

Am Folgetag erfolgte der Zytokinnachweis durch FACS. Dafür wurden zunächst die Oberflächenmarker gefärbt. Im Anschluss wurde die intrazelluläre Färbung durchgeführt. Da die Expression von CD4 unter der Stimulation mit PMA/Ionomycin abnimmt, wurden die Zellen für die beiden Marker CD3 und CD8 entsprechend 2.6.1 gefärbt. Die CD4⁺ T-Zellen wurden durch die Expression von CD3 und das Fehlen von CD8, d.h. als CD3⁺CD8⁻ Zellen, identifiziert. Zusätzlich erfolgte die Färbung von PD-1. Zur Färbung der synthetisierten Zytokine und CD154 als Aktivierungsmarker wurden die in Tabelle 2.10 gezeigten Markerkombinationen verwendet. Die Färbung der Zytokine und CD154 erfolgte durch Permeabilisierung der fixierten Zellen für 10 Minuten bei RT mit *Permsolution* der Firma BD (1:10 in A.dest). Dieser Schritt dient ähnlich wie unter 2.6.2 beschrieben der Permeabilisierung der Zellmembran, die den Eintritt der Zytokinantikörper ermöglicht. Anschließend wurden die Proben mit PBA gewaschen und die Pellets mit den Färbelösungen für 30 Minuten bei RT inkubiert, wobei wieder Beriglobin zur Blockierung unspezifischer Bindungen eingesetzt wurde. Nach einem letzten Waschschrift folgte die Messung am FACS Canto II.

Tab. 2.10: Verwendete Antikörper zur Färbung der oberflächlichen und intrazellulären Rezeptoren und IFN γ

Fluoreszenz	CD4⁺-Panel
APC-Cy7	CD3 (1:10)
PerCP-Cy5.5	CD8 (1:50)
APC-Cy7	X
Pacific Blue	CD154 (1:50)
AlexaFluor488	X
PE-Cy7	IFN γ (1:20)
PE	PD-1 (1:10)

2.8 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurde das Programm *Prism* 6.0 (GraphPad Software, CA, USA) verwendet. Die Darstellung der Daten erfolgte über den Mittelwert (*Mean*), während die Streuung der Werte mittels Standardabweichung bestimmt wurde. Die verwendeten statistischen Tests zur Bestimmung der p-Werte (Signifikanzwerte) wurden aufgrund der Probenanzahl und der Verteilung gewählt. Zunächst wurde geprüft, ob eine Normalverteilung vorliegt. Beim Vergleich der untersuchten vier Gruppen lagen stets nicht-normalverteilte, unverbundene Stichproben vor, weshalb für den Vergleich der Ergebnisse der Kruskal-Wallis-Test benutzt wurde. Ergab dieser Test signifikante Unterschiede zwischen den vier Gruppen, erfolgte per Dunn's Post-hoc-Test der paarweise Vergleich der Gruppen untereinander. Für den Vergleich von Parametern aus nicht-normalverteilten, gepaarten Blut- und Synovialflüssigkeitproben desselben Patienten wurde der gepaarte Wilcoxon-Rangsummentest verwendet. Bei einem Wert von $p < 0,05$ wurde der Unterschied als signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

3.1 Verteilung von T_{EM}-Zellen in Vollblut und SF

Zuerst erfolgte eine Analyse der Verteilung von naiven CD4⁺ T-Zellen und CD4⁺ T_{EM}-Zellen in Blut und SF. Diese Populationen können anhand der Expression von CD45RA, einer Tyrosinphosphatase, diskriminiert werden. Naive T-Zellen exprimieren CD45RA, welches während der Aktivierung und folgenden Differenzierung herabreguliert wird, weshalb T_{EM}-Zellen durch das Fehlen von CD45RA charakterisiert sind. In Abbildung 3.1 ist die üblicherweise verwendete Strategie zur Eingrenzung und Identifikation der CD4⁺ T-Zellen im Vollblut und der SF dargestellt. In einem ersten Schritt wurde hierbei ein Lymphozytengate anhand der Streulichteigenschaften, d.h. des Vor- und Seitwärtsscatter, definiert. Die CD4⁺ T-Zellen wurden dann durch Darstellung der Zellen des Lymphozytengates im Vorwärtsscatter und die CD4-spezifische Fluoreszenz weiter eingegrenzt (CD4⁺ T-Zellgate). Anschließend wurde die CD45RA-spezifische Fluoreszenz für die CD4⁺ T-Zellen angezeigt. Die Diskriminierung von positiven und negativen Zellen für alle Färbungen erfolgte anhand einer Negativkontrolle und visuellem Populationsgating. Für die Bearbeitung der Fragestellung der vorliegenden Arbeit waren vor allem die Eigenschaften der T_{EM}-Zellen von Interesse. Die Diskriminierungsgates der CD4⁺CD45RA⁻ T_{EM}-Zellen wurden bei der Analyse sämtlicher Färbungen beibehalten, und es erfolgte die Analyse der Zelleigenschaften der T_{EM}-Zellen. Abbildung 3.2 illustriert die Ergebnisse der Gesamtanalyse des Anteils von T_{EM}-Zellen innerhalb der CD4⁺ T-Zellen bei Gesunden, SpA- (unterteilt in AS und PsA-Patienten) und RA-Patienten im Blut und der SF.

Im Blut fand sich eine signifikant erhöhte Frequenz von T_{EM}-Zellen bei RA-Patienten im Vergleich zu Gesunden ($p = 0,0127$) und PsA-Patienten ($p = 0,0205$). Zwischen Gesunden und AS- beziehungsweise PsA-Patienten fanden sich keine Unterschiede in der Frequenz von T_{EM}-Zellen im Blut. In der SF zeigten alle Patientengruppen einen Anteil von T_{EM}-Zellen von über 98%. Somit findet sich bei RA-Patienten eine Zunahme der T_{EM}-Zellen im Blut, die bei SpA-Patienten nicht beobachtbar ist. Die CD4⁺ T-Zellen im Entzündungsgebiet besaßen – unabhängig von der Erkrankung – nahezu vollständig den Phänotyp von T_{EM}-Zellen.

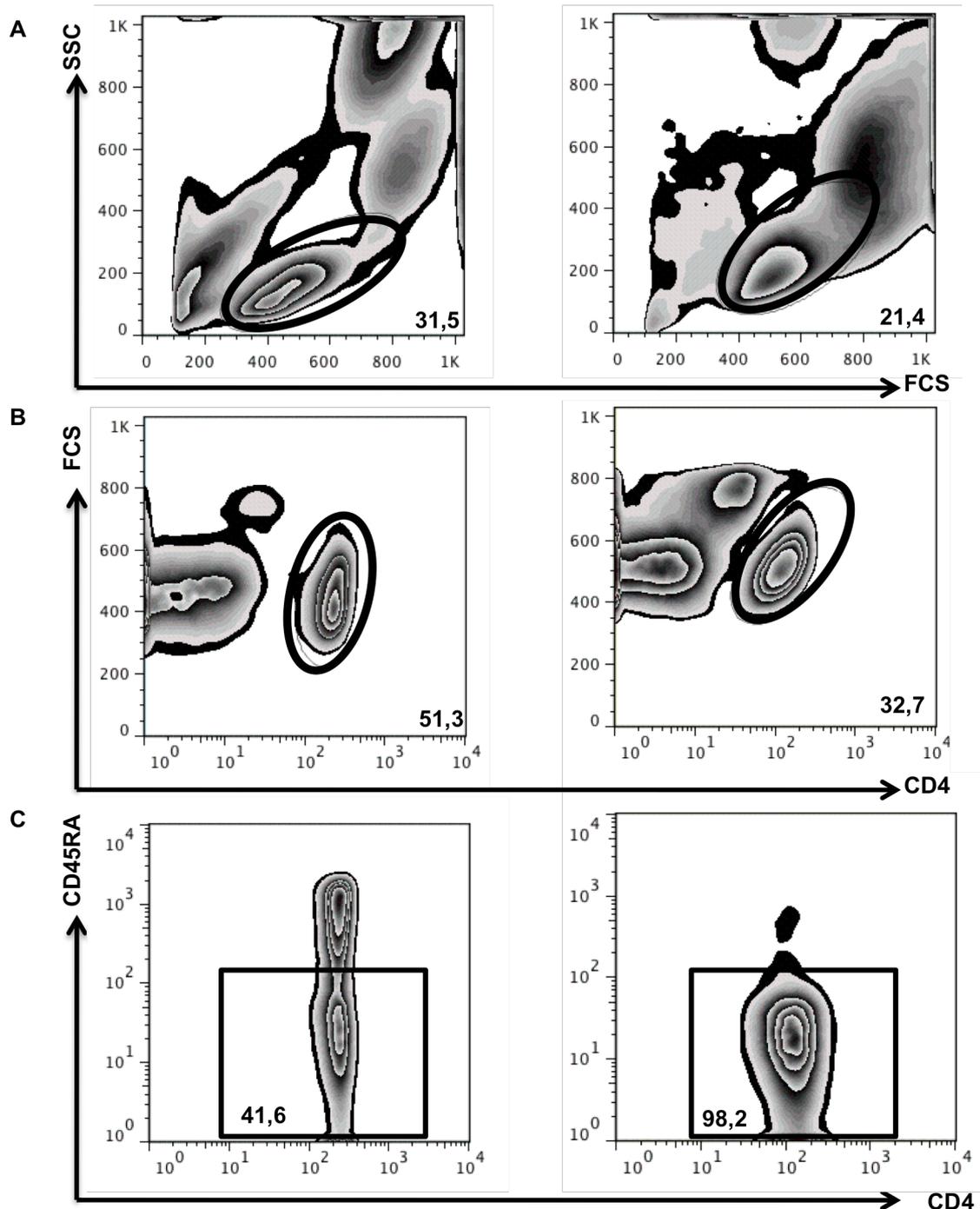
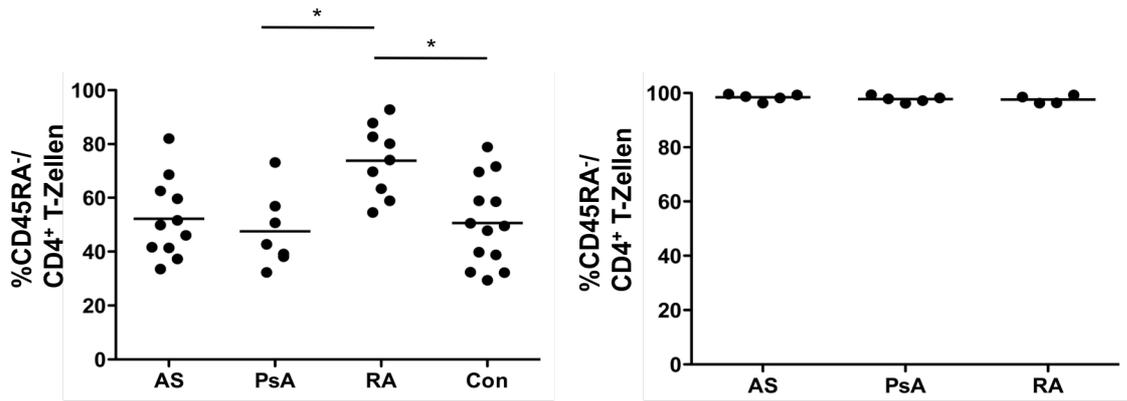


Abb. 3.1: Beispielfärbung mit Gatingstrategie von PB (links) und SF (rechts) Vollblut wurde nativ mit den Oberflächenmarkern markiert, gewaschen und mittels *FACSLysingSolution* lysiert, die SF wurde nach einem Waschschrift in PBE mittels *Cellstrainer* gefiltert und in PBE gefärbt. Hauptsächlich werden die Subpopulationen der $CD4^+CD45RA^-$ T-Zellen in den folgenden Färbungen analysiert. In (A): Eingrenzung der Lymphozyten im Lymphozytengate entsprechend der Streulichteigenschaften. In (B): Eingrenzung der Zellen des Lymphozytengates entsprechend ihrer CD4-Expression. In (C): Eingrenzung der T_{EM} -Zellen innerhalb der $CD4^+$ T-Zellen entsprechend dem Fehlen der CD45RA-Expression. Innerhalb der letztgenannten Population wurden weitere Zelleigenschaften bestimmt.



CD4 ⁺ / CD45RA ⁻ [%]		AS	PsA	RA	Con
Untersuchungsgruppe					
	Vollblut	52,2 ± 14,7	47,5 ± 13,9	73,8 ± 13,2	50,6 ± 16,1
	Synovialflüssigkeit	98,4 ± 1,3	97,8 ± 1,19	97,6 ± 1,5	-

Abb. 3.2: Prozentualer Anteil der CD4⁺CD45RA⁻ T_{EM}-Zellen in PB (links) und SF (rechts) bei Patienten mit AS, PsA, RA und Kontrollen (Con). Der Anteil der CD45RA⁻ Zellen innerhalb der CD4⁺ T-Zellen wurde nach dem in Abbildung 3.1 beschriebenen Schema bestimmt. Gezeigt sind die Einzelwerte einschließlich des Mittelwerts. In der Tabelle unterhalb der Abbildung sind die Mittelwerte ± Standardabweichung (SD) aufgetragen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis- und Dunn's Post-hoc-Test; *p < 0,05.

3.2 Bestimmung des Anteils der darmspezifischen und hautspezifischen T_{EM}-Zellen in Vollblut und SF und Bestimmung der Expression von Chemokinrezeptoren auf den T_{EM}-Zellen

3.2.1 Frequenz darmspezifischer T_{EM}-Zellen in Vollblut und SF bei Patienten mit AS, PsA und RA

Wie in 2.6.1 beschrieben, wurde die Expression verschiedener, in ihrer Regulation gut charakterisierter Adhäsionsmoleküle analysiert, um Rückschlüsse auf den Ort des *Primings* der CD4⁺ T-Zellen zu ziehen. Dabei wurde auf die Haut und den Gastrointestinaltrakt fokussiert, da diese bei SpA-Erkrankungen ebenfalls entzündliche Affektionen zeigen können und als mögliche Regionen des Antigen*primings* in Frage kommen. Als Marker für Darmspezifität wurde die Expression der Integrinkette β_7 und die Expression des Chemokinrezeptors CCR9 verwendet. Frühere Untersuchungen unseres Labors hatten gezeigt, dass β_7^+ T-Zellen im Wesentlichen α_4 koexprimieren und die Expression von β_7 nahezu deckungsgleich mit der Expression von $\alpha_4\beta_7$ ist. Abbildung 3.3 zeigt Beispielfärbungen für die Bestimmung der β_7 -Integrin- und CCR9-Expression auf T_{EM}-Zellen in PB und SF. In Abbildung 3.4 und 3.5 sind die Ergebnisse dieser Analyse für die Patientengruppen und Kontrollen dargestellt.

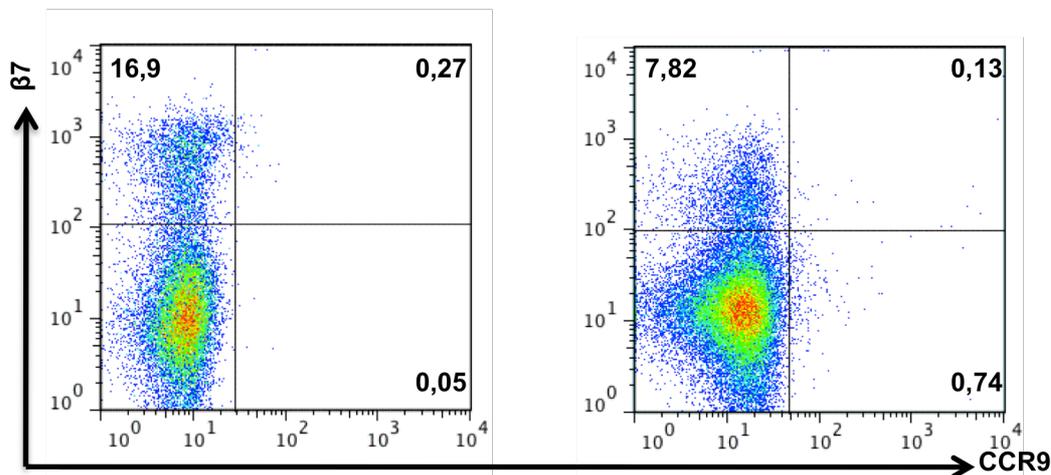
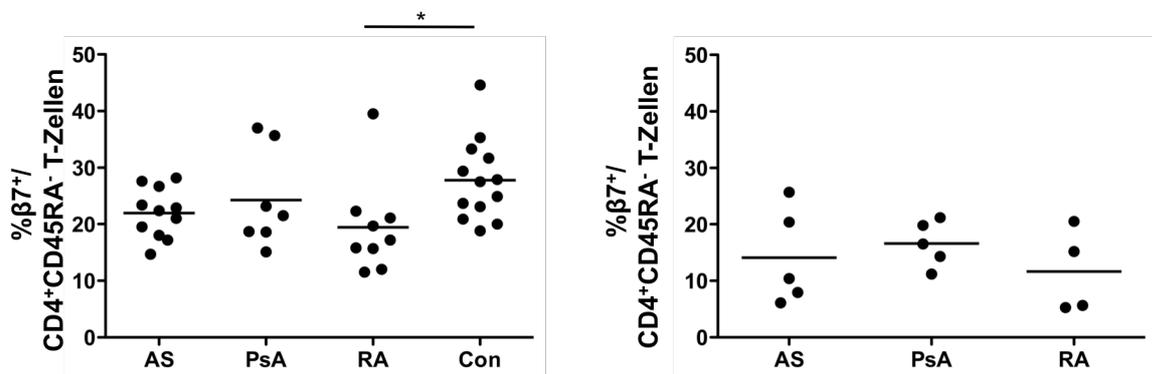


Abb. 3.3: Beispiel (Pseudocolor-Dotplot) einer Analyse der Expression der darmspezifischen Marker β_7 und CCR9 auf CD4⁺CD45RA⁻ T-Zellen in PB (links) und SF (rechts). Vollblut wurde nativ mit den Oberflächenmarkern markiert, gewaschen und mittels *FACSLysingSolution* lysiert, die SF wurde nach einem Waschschrift in PBE mittels *Cellstrainer* gefiltert und in PBE gefärbt. Analysiert wurden die CD4⁺CD45RA⁻ Lymphozyten. Die Frequenzen dieses Beispiels sind in den Quadranten angegeben.

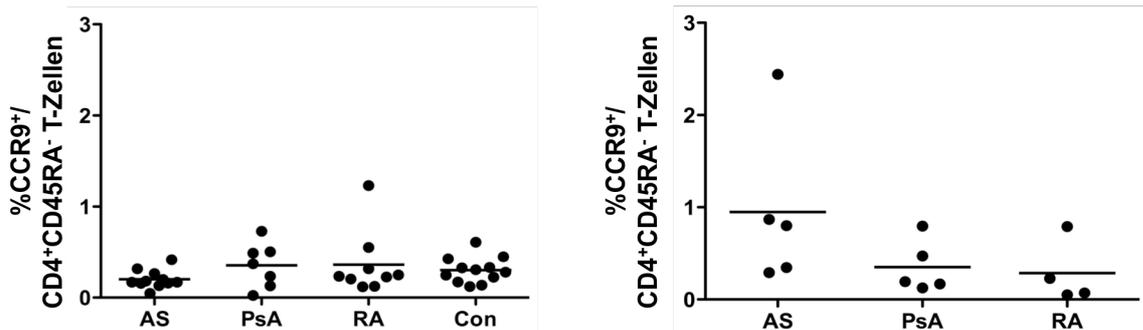
Wie die folgende Abbildung 3.4 zeigt, exprimierten ca. 30% der T_{EM}-Zellen im Vollblut gesunder Kontrollen den darmspezifischen Marker β_7 . Im Vergleich dazu war die Frequenz der β_7^+ T-Zellen innerhalb der CD4⁺CD45RA⁻ T-Zellen bei RA signifikant niedriger ($p = 0,019$); zwischen Kontrollen und SpA-Patienten, d.h. AS- und PsA-Patienten, fanden sich keine signifikanten Unterschiede. In der SF exprimierten etwa 10% der T_{EM}-Zellen die Integrinkette β_7 , unabhängig von der Erkrankung. Somit zeigten sich hier keine signifikanten Frequenzunterschiede.



β_7^+ [%] in CD4 ⁺ CD45RA ⁻	AS	PsA	RA	Con
Untersuchungsgruppe				
Vollblut	22 ± 4,41	24,3 ± 8,65	19,4 ± 8,4	27,8 ± 7,21
Synovialflüssigkeit	14,4 ± 8,51	16,6 ± 4,06	11,7 ± 7,48	-

Abb. 3.4: Frequenz darmspezifischer T_{EM}-Zellen gemessen anhand des Homingrezeptors β_7 in PB (links) und SF (rechts) bei Patienten mit AS, PsA, RA und Kontrollen (Con). Vollblut wurde nativ mit den Oberflächenmarkern markiert, gewaschen und mittels *FACSLysingSolution* lysiert, die SF wurde nach einem Waschschrift in PBE mittels *Cellstrainer* gefiltert und in PBE gefärbt. Dargestellt ist die Frequenz (Einzelwerte und Mittelwert) der β_7^+ T-Zellen innerhalb der CD4⁺CD45RA⁻ Lymphozyten. In der Tabelle unterhalb der Abbildung sind die Mittelwerte ± SD aufgetragen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis- und Dunn's Post-hoc-Test; * $p < 0,05$.

CD4⁺CD45RA⁻CCR9⁺ T-Zellen waren sowohl im Blut als auch in der SF kaum detektierbar (vergleiche Abbildung 3.5). So fanden sich im Blut Gesunder ca. 0,3% CCR9⁺ T-Zellen innerhalb der T_{EM}-Zellen. In der SF fanden sich ähnlich niedrige Frequenzen, es bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Patientengruppen.



CCR9 ⁺ [%] in CD4 ⁺ CD45RA ⁻	AS	PsA	RA	Con
Untersuchungsgruppe	AS	PsA	RA	Con
Vollblut	0,2 ± 0,1	0,35 ± 0,24	0,36 ± 0,35	0,3 ± 0,13
Synovialflüssigkeit	0,95 ± 0,87	0,35 ± 0,28	0,29 ± 0,35	-

Abb. 3.5: Frequenz darmspezifischer T_{EM}-Zellen gemessen anhand des *Homingrezeptors* CCR9 in PB (links) und SF (rechts) bei Patienten mit AS, PsA, RA und Kontrollen (Con). Vollblut wurde nativ mit den Oberflächenmarkern markiert, gewaschen und mittels *FACSLysingSolution* lysiert, die SF wurde nach einem Waschschrift in PBE mittels *Cellstrainer* gefiltert und in PBE gefärbt. Dargestellt ist die Frequenz (Einzelwerte und Mittelwert) der CCR9⁺ T-Zellen innerhalb der CD4⁺CD45RA⁻ Lymphozyten. In der Tabelle unterhalb der Abbildung sind die Mittelwerte ± SD aufgetragen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis- und Dunn`s Post-hoc-Test.

Da die Verteilung der darmspezifischen T-Zellen bei AS-Patienten für die Bearbeitung der Fragestellung von besonderem Interesse ist, erfolgte ein Vergleich gepaarter Blut- und SF-Proben, die von drei AS-Patienten verfügbar waren, den die Grafik in Abbildung 3.6 illustriert. Dabei lässt sich feststellen, dass der prozentuale Anteil von β_7^+ T-Zellen innerhalb der $CD4^+CD45RA^-$ T-Zellen im entzündeten Kompartiment des Gelenks tendenziell niedriger ist als derjenige im Blut, während $CCR9^+$ T-Zellen innerhalb der $CD4^+CD45RA^-$ T-Zellen im Gelenk geringfügig angereichert erscheinen.

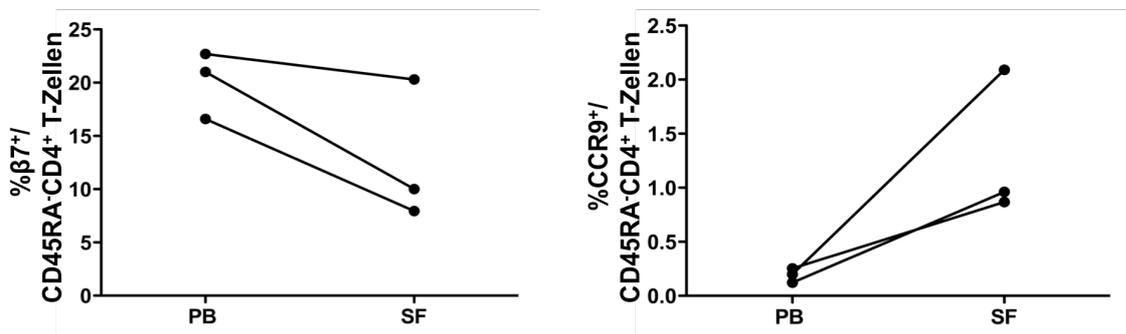


Abb. 3.6: Vergleich des Anteils von β_7^+ T-Zellen und $CCR9^+$ T-Zellen innerhalb der $CD4^+CD45RA^-$ T-Zellen im peripheren Blut (PB) und SF von individuellen AS-Patienten. Die Frequenz der oben genannten Zellen ist in SF und zugehörigen Blutproben individueller AS-Patienten vergleichend dargestellt. Statistische Auswertung mittels gepaartem Wilcoxon-Rangsummen-Test.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sich bei AS-Patienten trotz häufiger subklinischer Darmentzündungen keine Zunahme der darmspezifischen $CD4^+$ T-Zellen im Blut zeigt. Auch in der SF konnte abgesehen von einer tendenziellen Zunahme von $CCR9^+$ T-Zellen keine eindeutige Anreicherung darmspezifischer Zellen gefunden werden.

3.2.2 Frequenz hautspezifischer T_{EM}-Zellen in Vollblut und SF bei Patienten mit AS, PsA und RA

Für die Bestimmung hautspezifischer Zellen wurde der Marker CLA verwendet. CLA wurde in Kombination mit β_7 in einer Färbung detektiert. Abbildung 3.7 zeigt ein Beispiel dieser Färbung im *Gate* für T_{EM}-Zellen für Blut und SF. Dort ist zu erkennen, dass die beiden untersuchten Marker β_7 und CLA tatsächlich unterschiedliche Populationen markieren, was somit einen Rückschluss auf deren Ort des *Primings* und deren Aktivierung erlaubt.

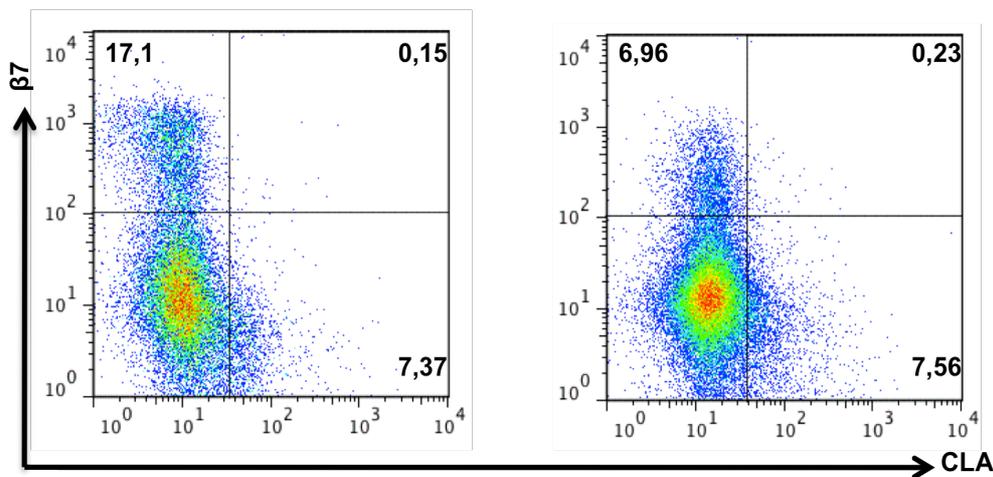
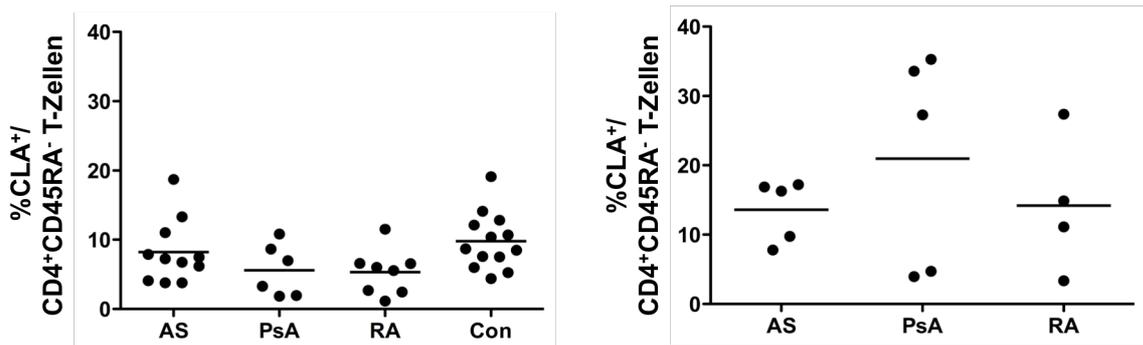


Abb. 3.7: Beispiel (*Pseudocolor-Dotplot*) einer Analyse der Expression des hautspezifischen Rezeptors CLA im Vergleich zur Expression des darmspezifischen Markers β_7 auf CD4⁺CD45RA⁻ T-Zellen in PB (links) und SF (rechts). Vollblut wurde nativ mit den Oberflächenmarkern markiert, gewaschen und mittels *FACSLysingSolution* lysiert, die SF wurde nach einem Waschschrift in PBE mittels *Cellstrainer* gefiltert und in PBE gefärbt. Analysiert wurden die CD4⁺CD45RA⁻ Lymphozyten. Die Frequenzen dieses Beispiels sind in den Quadranten angegeben.

In Abbildung 3.8 ist die Frequenz der CLA⁺ T-Zellen innerhalb der CD4⁺CD45RA⁻ T-Zellen im Blut und in der SF dargestellt. Dabei fand sich im Blut von AS-Patienten und Kontrollen eine mittlere Frequenz von 8-10%, bei PsA- und RA-Patienten fand sich eine Frequenz von ca. 5%. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Patientengruppen und den Kontrollen.



CLA ⁺ [%] in CD4 ⁺ CD45RA ⁻	AS	PsA	RA	Con
Untersuchungsgruppe				
Vollblut	8,2 ± 4,56	5,59 ± 3,76	5,32 ± 3,26	9,77 ± 4,07
Synovialflüssigkeit	13,6 ± 4,47	21 ± 15,5	14,2 ± 10	-

Abb. 3.8: Frequenz hautspezifischer T_{EM}-Zellen gemessen anhand des Homingrezeptors CLA in PB (links) und SF (rechts) bei Patienten mit AS, PsA, RA und Kontrollen (Con). Vollblut wurde nativ mit den Oberflächenmarkern markiert, gewaschen und mittels *FACSLysingSolution* lysiert, die SF wurde nach einem Waschschrift in PBE mittels *Cellstrainer* gefiltert und in PBE gefärbt. Dargestellt ist die Frequenz (Einzelwerte und Mittelwert) der CLA⁺ T-Zellen innerhalb der CD4⁺CD45RA⁻ Lymphozyten. In der Tabelle unterhalb der Abbildung sind die Mittelwerte ± SD gezeigt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis- und Dunn's Post-hoc-Test.

In der SF zeigte sich eine größere Streuung als im Vollblut, wobei im Mittel etwa 15% der T-Zellen den Rezeptor trugen. Bei den PsA-Patienten waren es im Mittel 21%, wobei hier die Variabilität besonders groß war und bei einem Teil der Patienten deutlich höhere Werte (ca. 30%) gefunden wurden.

In Abbildung 3.9 ist die Frequenz von CLA^+ T-Zellen innerhalb der $CD4^+CD45RA^-$ T-Zellen von zusammengehörigen Blut- und SF-Proben von AS-Patienten dargestellt. Tendenziell ließ sich eine Anreicherung von CLA^+ T-Zellen in der SF gegenüber PB beobachten, die allerdings statistisch nicht signifikant ist.

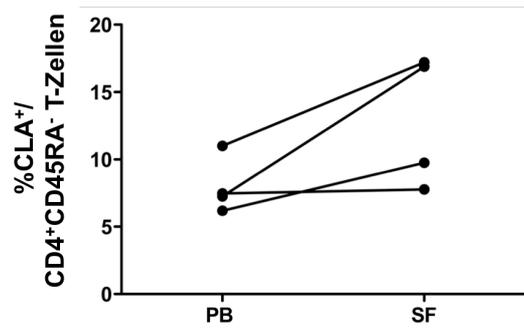


Abb. 3.9: Vergleich des Anteils CLA^+ T-Zellen innerhalb der $CD4^+CD45RA^-$ T-Zellen im peripheren Blut (PB) und SF von individuellen AS-Patienten. Die Frequenz der oben genannten Zellen ist in SF und zugehörigen Blutproben individueller AS-Patienten vergleichend dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels gepaartem Wilcoxon-Rangsummen-Test.

Zusammenfassend lässt sich hier festhalten, dass die AS-Patienten auch keine Zunahme hautspezifischer Effektorzellen im Blut zeigten, wobei sich in der SF etwas höhere Frequenzen von CLA^+ T_{EM} -Zellen fanden als im Blut. Dies reflektiert möglicherweise auch die entzündungsabhängige Expression von CLA. Bei PsA-Patienten, die in der Regel eine assoziierte Hautentzündung aufweisen, fanden sich tatsächlich bei einem Teil der Patienten in der SF erhöhte Anteile CLA^+ T-Zellen. Möglicherweise könnte dies ein Hinweis auf die in der Haut erfolgte Prägung und Aktivierung der Zellen sein.

3.2.3 Analyse der Expression der Chemokinrezeptoren CCR4 und CCR5

Die Expression der Chemokinrezeptoren CCR4 und CCR5 wurde in einer Färbung analysiert. Ein repräsentatives Beispiel einer solchen Färbung in PB und SF ist in Abbildung 3.10 gezeigt. CCR4 gilt als hautspezifischer Marker, CCR5 wird für die Rekrutierung der Zellen in Entzündungsgebiete genutzt und besonders von Th1-Zellen exprimiert.

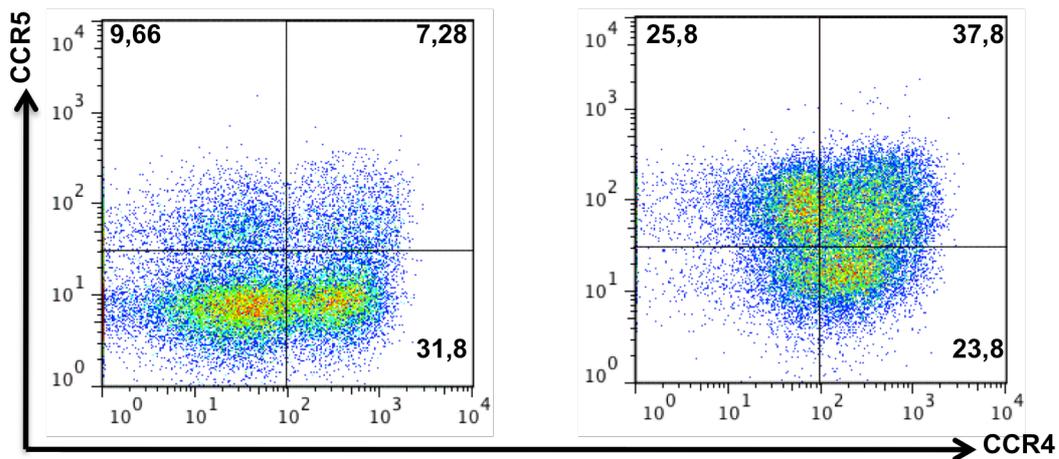
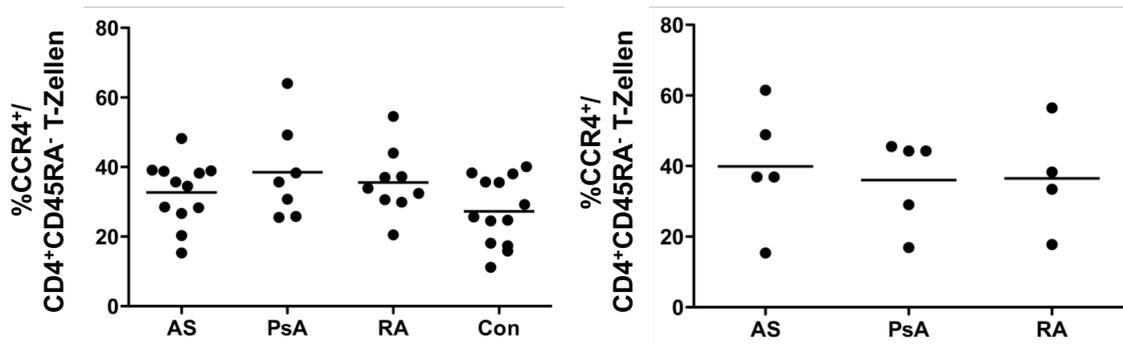


Abb. 3.10: Beispiel (*Pseudocolor-Dotplot*) einer Analyse der Expression von CCR4 und CCR5 auf CD4⁺CD45RA⁻ T-Zellen in PB (links) und SF (rechts). Vollblut wurde nativ mit den Oberflächenmarkern markiert, gewaschen und mittels *FACSLysingSolution* lysiert, die SF wurde nach einem Waschschrift in PBE mittels *Cellstrainer* gefiltert und in PBE gefärbt. Analysiert wurden die CD4⁺CD45RA⁻ Lymphozyten.

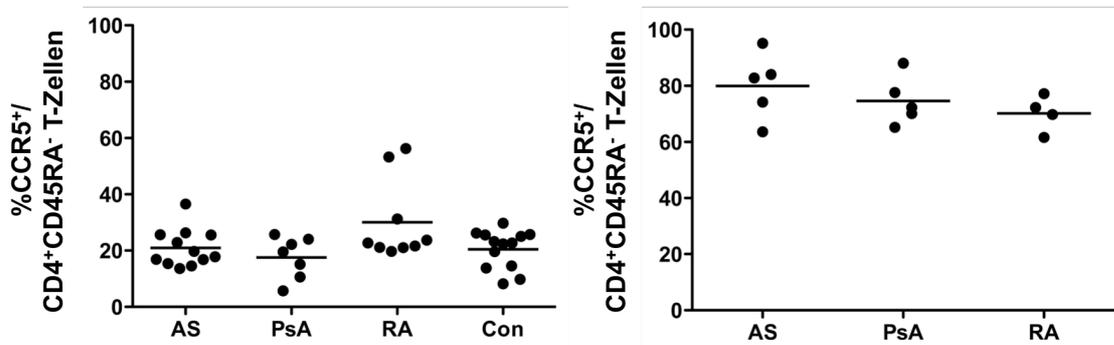
Ca. 30-40% der $CD4^+CD45RA^-$ T-Zellen im Blut exprimierten CCR4 (Abbildung 3.11). Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Patientengruppen und den Kontrollen. In der SF lag die Frequenz CCR4⁺ T-Zellen innerhalb der $CD4^+CD45RA^-$ T-Zellen ebenfalls bei ca. 40%.



CCR4 ⁺ [%] in CD4 ⁺ CD45RA ⁻				
Untersuchungsgruppe	AS	PsA	RA	Con
Vollblut	32,7 ± 9,2	38,5 ± 13,9	35,6 ± 9,6	27,2 ± 9,72
Synovialflüssigkeit	39,9 ± 17,1	36 ± 12,7	36,5 ± 15,9	-

Abb. 3.11: Frequenz CCR4⁺ T_{EM}-Zellen in PB (links) und SF (rechts) bei Patienten mit AS, PsA, RA und Kontrollen (Con). Vollblut wurde nativ mit den Oberflächenmarkern markiert, gewaschen und mittels *FACSLysingSolution* lysiert, die SF wurde nach einem Waschschrift in PBE mittels *Cellstrainer* gefiltert und in PBE gefärbt. Dargestellt ist die Frequenz (Einzelwerte und Mittelwert) der CCR4⁺ T-Zellen innerhalb der $CD4^+CD45RA^-$ Lymphozyten. In der Tabelle unterhalb der Abbildung sind die Mittelwerte ± SD aufgetragen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis- und Dunn's Post-hoc-Test.

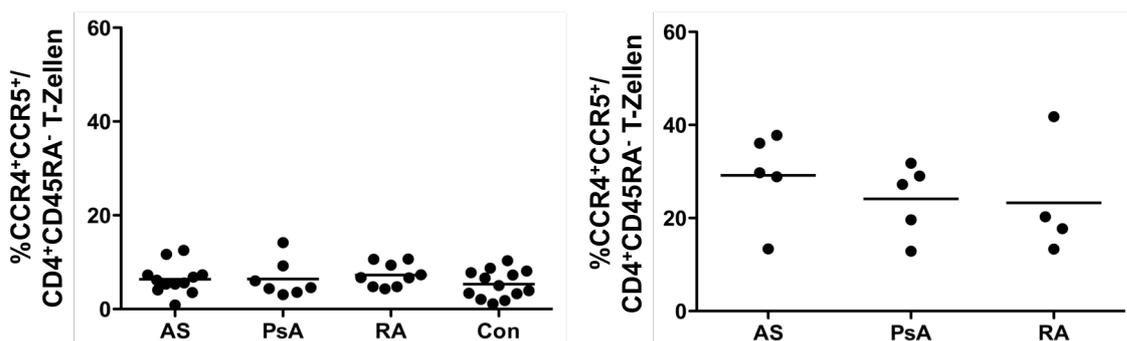
In Abbildung 3.12 sind die Ergebnisse der CCR5-Analyse dargestellt. Auffällig ist, dass die Frequenz der CCR5⁺ T-Zellen innerhalb der CD4⁺CD45RA⁻ T-Zellen im Blut zwischen 20-30% lag, während bei allen untersuchten Erkrankungen in der SF zwischen 70% bis 80% der CD4⁺CD45RA⁻ T-Zellen CCR5 exprimierten.



CCR5 ⁺ [%] in CD4 ⁺ CD45RA ⁻	AS	PsA	RA	Con
Untersuchungsgruppe	AS	PsA	RA	Con
Vollblut	21 ± 6,66	17,5 ± 7,39	30,1 ± 14,4	20,5 ± 6,79
Synovialflüssigkeit	79,9 ± 11,8	74,6 ± 8,7	70,2 ± 6,52	-

Abb. 3.12: Frequenz der CCR5⁺ T_{EM}-Zellen in PB (links) und SF (rechts) bei Patienten mit AS, PsA, RA und Kontrollen (Con). Vollblut wurde nativ mit den Oberflächenmarkern markiert, gewaschen und mittels *FACSLysingSolution* lysiert, die SF wurde nach einem Waschschrift in PBE mittels *Cellstrainer* gefiltert und in PBE gefärbt. Dargestellt ist die Frequenz (Einzelwerte und Mittelwert) der CCR5⁺ T-Zellen innerhalb der CD4⁺CD45RA⁻ Lymphozyten. In der Tabelle unterhalb der Abbildung sind die Mittelwerte ± SD aufgetragen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis- und Dunn`s Post-hoc-Test.

Darüber hinaus wurde die Anzahl der für CCR4 und CCR5 doppelpositiven Zellen analysiert (Abbildung 3.13). Im peripheren Blut lag die Frequenz bei etwa 6-8%. Auch hier fanden sich mit ca. 25-30% höhere Frequenzen in der SF im Vergleich zum Blut. Da sich die Frequenz der CCR4⁺ T-Zellen innerhalb der CD4⁺CD45RA⁻ T-Zellen nicht wesentlich zwischen Blut und SF unterschied, kann die erhöhte Frequenz der CCR4⁺CCR5⁺ Zellen in der SF auf eine Erhöhung der CCR5⁺-Zellen zurückgeführt werden.



CCR4 ⁺ CCR5 ⁺ [%] in CD4 ⁺ CD45RA ⁻				
Untersuchungsgruppe	AS	PsA	RA	Con
Vollblut	6,38 ± 3,22	6,44 ± 3,98	7,25 ± 2,48	5,34 ± 2,97
Synovialflüssigkeit	29,2 ± 9,64	24,1 ± 7,72	23,3 ± 12,7	-

Abb. 3.13: Frequenz der doppelpositiven CCR4⁺CCR5⁺ T_{EM}-Zellen in PB (links) und SF (rechts) bei Patienten mit AS, PsA, RA und Kontrollen (Con). Vollblut wurde nativ mit den Oberflächenmarkern markiert, gewaschen und mittels *FACSLysingSolution* lysiert, die SF wurde nach einem Waschschrift in PBE mittels *Cellstrainer* gefiltert und in PBE gefärbt. Dargestellt ist die Frequenz (Einzelwerte und Mittelwert) der doppelpositiven CCR4⁺CCR5⁺ T-Zellen innerhalb der CD4⁺CD45RA⁻ Lymphozyten. In der Tabelle unterhalb der Abbildung sind die Mittelwerte ± SD gezeigt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis- und Dunn's Post-hoc-Test.

Bei Proben von vier AS-Patienten erfolgte die CCR4- und CCR5-Messung sowohl in SF als auch Blut; die vergleichende Analyse dieser verbundenen Proben ist in Abbildung 3.14 dargestellt. Es zeigt sich, dass vor allem die CCR5⁺ T-Zellen in der SF angereichert waren. Eine Signifikanz ergab sich bei geringer Probenzahl jedoch nicht. Für CCR4 fand sich kein eindeutiger Unterschied zwischen Blut und SF, obwohl die doppelpositiven CCR4⁺CCR5⁺ T-Zellen auch hier tendenziell in der SF erhöht waren.

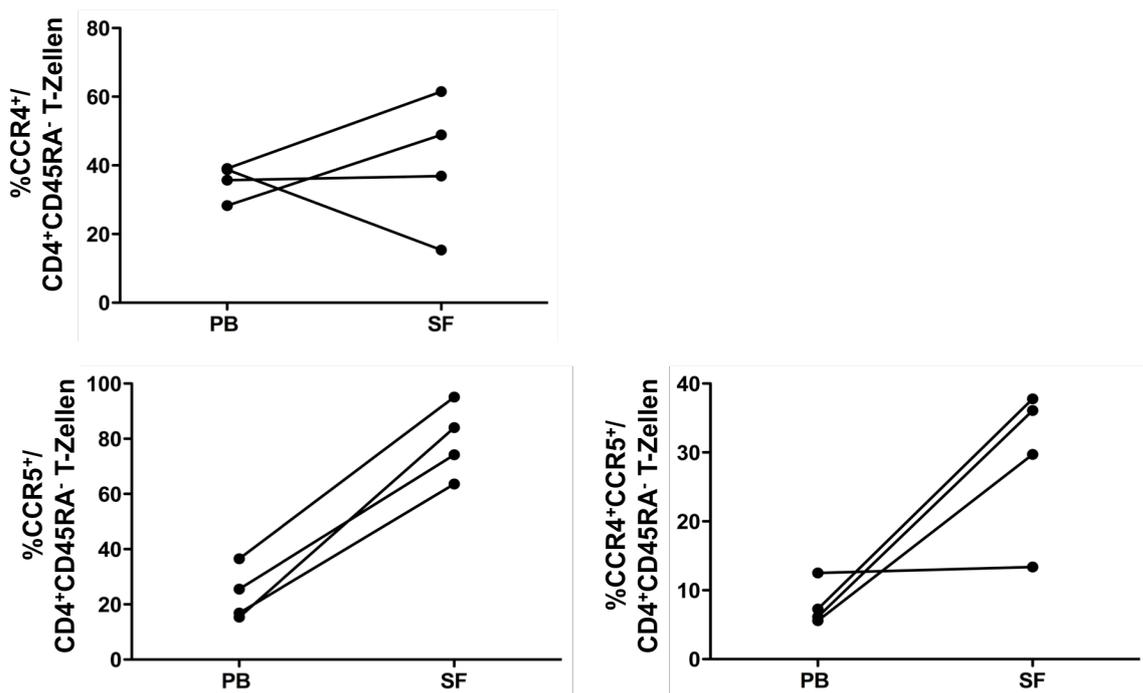


Abb. 3.14: Vergleich des Anteils CCR4⁺ T-Zellen (oben links), CCR5⁺ T-Zellen (unten links) und CCR4⁺CCR5⁺ T-Zellen (unten rechts) innerhalb der CD4⁺CD45RA⁺ T-Zellen im peripheren Blut (PB) und SF von individuellen AS-Patienten. Die Frequenz der oben genannten Zellen ist in SF und zugehörigen Blutproben individueller AS-Patienten vergleichend dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels gepaartem Wilcoxon-Rangsummen-Test.

3.3 Untersuchung des Aktivierungsstatus von T_{EM}-Zellen und T_{REG}-Zellen im Vollblut und SF

Neben den *Homingeigenschaften* der CD4⁺ T-Zellen wurden auch der Aktivierungszustand und weitere Charakteristika der T-Zellen untersucht. Hierzu wurde die Expression verschiedener oberflächlicher und intrazellulärer Moleküle innerhalb der T_{EM}-Zellen und der T_{REG}-Zellen analysiert. Die T_{REG}-Zellen wurden anhand des T_{REG}-spezifischen Markers FoxP3 bestimmt. Als Aktivierungsmarker wurde die Expression von CD25 und 4-1BB bestimmt. Als Marker für zelluläre Erschöpfung erfolgte die Bestimmung der PD-1-Expression (siehe Tabelle 2.9). Auch wurde die Helios-Expression auf den T_{REG}-Zellen analysiert. Die Bestimmung von Helios beruhte auf der initialen Annahme, dass Helios in nT_{REG}-Zellen exprimiert wird, welche vorwiegend autoantigene T-Zellantworten kontrollieren, während iT_{REG}-Zellen eher Immunantworten gegen Fremdantigene beeinflussen. Es wurde angenommen, dass Helios zwischen diesen Populationen diskriminiert (siehe Abschnitt 1.3.6).

3.3.1 Bestimmung der Expression von 4-1BB und CD25 bei CD4⁺ T-Zellen

Die folgende Analyse erfolgte aufgrund der Limitation unserer Antikörperpanels innerhalb der Versuchsreihe und der im FACS Calibur messbaren Fluoreszenzen ohne die Diskriminierung von T_{EM}-Zellen mittels CD45RA; es wird hier deshalb die Gesamtpopulation der CD4⁺ T-Zellen betrachtet. Eine Beispielfärbung für 4-1BB und FoxP3 in Blut und SF ist in Abbildung 3.15 dargestellt. Es zeigte sich, dass 4-1BB vorwiegend auf FoxP3⁺ T-Zellen exprimiert wird.

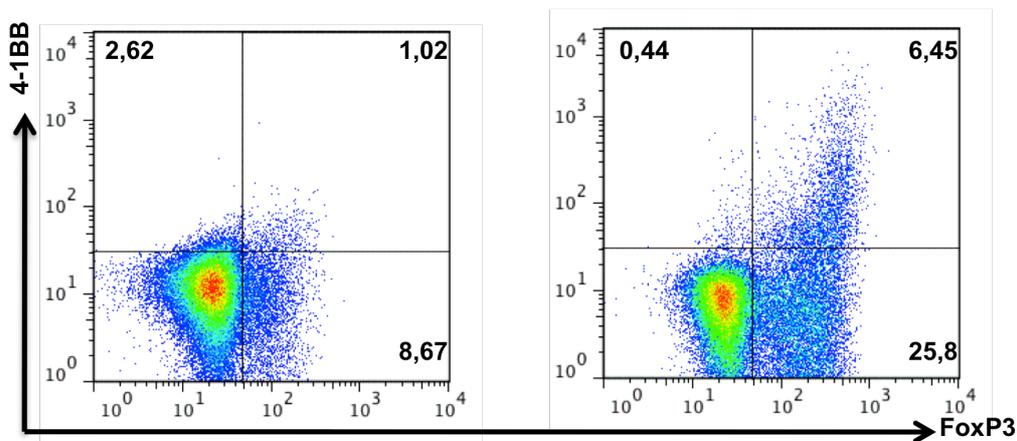
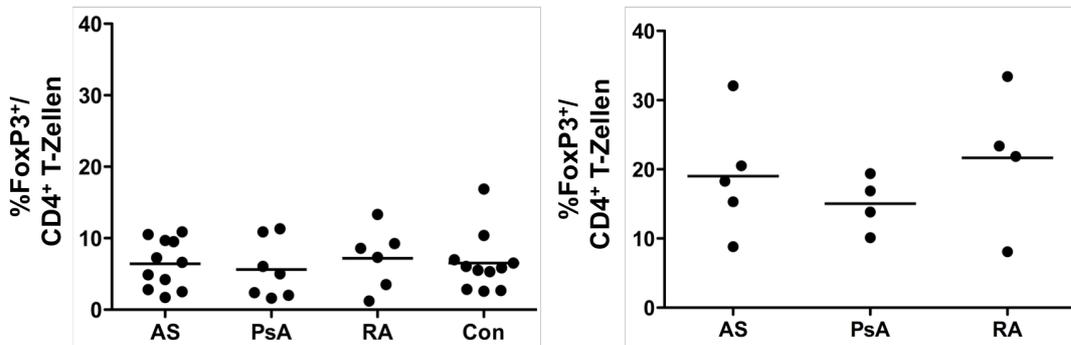


Abb. 3.15: Beispiel (Pseudocolor-Dotplot) einer Analyse der Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 und des Rezeptors 4-1BB auf CD4⁺ T-Zellen in PB (links) und SF (rechts). Vollblut wurde nativ mit den Oberflächenmarkern markiert, gewaschen und mittels *FACSLysingSolution* lysiert, die SF wurde nach einem Waschschrift in PBE mittels *Cellstrainer* gefiltert und in PBE gefärbt. Mit dem FoxP3-Kit wurden die Zellen permeabilisiert und nach einem Waschschrift bei 4°C intrazellulär gefärbt. Nach einem erneuten Waschschrift wurden die Zellen fixiert. Analysiert wurden die CD4⁺ Lymphozyten.

Zuerst bestimmten wir die Gesamtfrequenz der FoxP3⁺ T-Zellen innerhalb der CD4⁺ T-Zellen (Abbildung 3.16). Im Blut lag die Frequenz bei ca. 6-7%, in der SF bei 15-20%. Dabei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Erkrankungen.

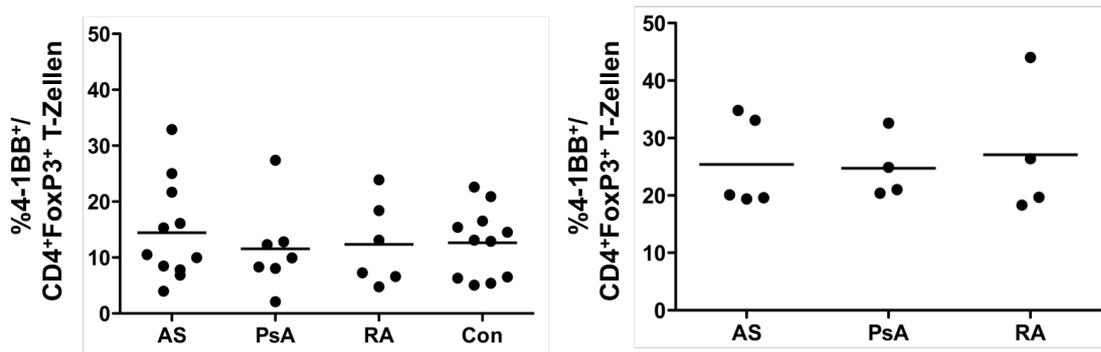


FoxP3 ⁺ [%] in CD4 ⁺	AS	PsA	RA	Con
Untersuchungsgruppe	AS	PsA	RA	Con
Vollblut	6,42 ± 3,39	5,6 ± 4,09	7,19 ± 4,31	6,51 ± 4,12
Synovialflüssigkeit	19 ± 8,54	15 ± 4,02	21,7 ± 10,4	-

Abb. 3.16: Frequenz der FoxP3⁺ T-Zellen innerhalb der CD4⁺ T-Zellen in PB (links) und SF (rechts) bei Patienten mit AS, PsA, RA und Kontrollen (Con). Vollblut wurde nativ mit den Oberflächenmarkern markiert, gewaschen und mittels *FACSLysingSolution* lysiert, die SF wurde nach einem Waschschrift in PBE mittels *Cellstrainer* gefiltert und in PBE gefärbt. Mit dem FoxP3-Kit wurden die Zellen permeabilisiert und nach einem Waschschrift bei 4°C intrazellulär gefärbt. Nach einem erneuten Waschschrift wurden die Zellen fixiert. Dargestellt ist die Frequenz (Einzelwerte und Mittelwert) der FoxP3⁺ T-Zellen innerhalb der CD4⁺-Lymphozyten. In der Tabelle unterhalb der Abbildung sind die Mittelwerte ± SD gezeigt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis- und Dunn's Post-hoc-Test.

Aufgrund der in Abbildung 3.15 sichtbaren Anreicherung von 4-1BB⁺ T-Zellen innerhalb der FoxP3⁺ T-Zellen erfolgte eine Subanalyse der Frequenzen der 4-1BB⁺ T-Zellen innerhalb der CD4⁺FoxP3⁺ T-Zellen (Abbildung 3.17) und CD4⁺FoxP3⁻ T-Zellen (Abbildung 3.18) in PB und SF.

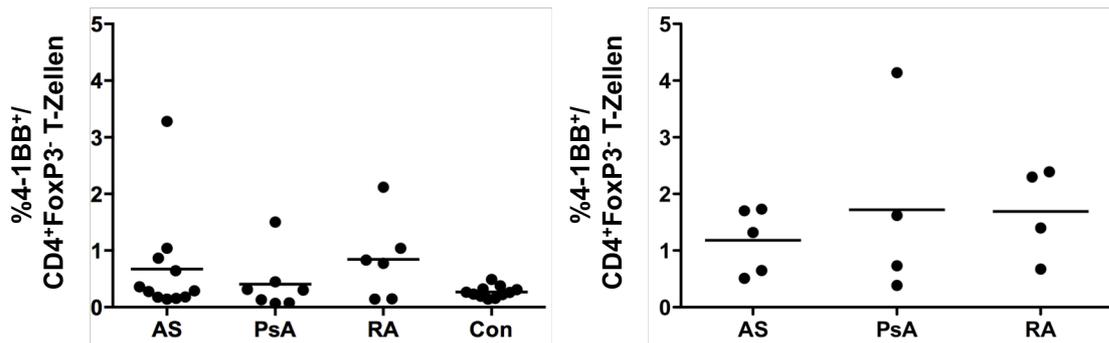
Etwa 11-15% der CD4⁺FoxP3⁺ T_{REG}-Zellen exprimierten im Blut 4-1BB, in der SF lag die Frequenz bei allen Patientengruppen innerhalb der T_{REG}-Zellen bei ca. 25%.



4-1BB ⁺ [%] in CD4 ⁺ FoxP3 ⁺	AS	PsA	RA	Con
Untersuchungsgruppe				
Vollblut	14,4 ± 8,89	11,6 ± 7,83	12,3 ± 7,57	12,7 ± 6,2
Synovialflüssigkeit	25,4 ± 7,83	24,7 ± 5,62	27,1 ± 11,8	-

Abb. 3.17: Frequenz der 4-1BB⁺ T-Zellen innerhalb der CD4⁺FoxP3⁺ T-Zellen in PB (links) und SF (rechts) bei Patienten mit AS, PsA, RA und Kontrollen (Con). Vollblut wurde nativ mit den Oberflächenmarkern markiert, gewaschen und mittels *FACSLysingSolution* lysiert, die SF wurde nach einem Waschschrift in PBE mittels *Cellstrainer* gefiltert und in PBE gefärbt. Mit dem FoxP3-Kit wurden die Zellen permeabilisiert und nach einem Waschschrift bei 4°C intrazellulär gefärbt. Nach einem erneuten Waschschrift wurden die Zellen fixiert. Dargestellt ist die Frequenz (Einzelwerte und Mittelwert) der 4-1BB⁺ T-Zellen innerhalb der CD4⁺FoxP3⁺-Lymphozyten. In der Tabelle unterhalb der Abbildung sind die Mittelwerte ± SD gezeigt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis- und Dunn's Post-hoc-Test.

Innerhalb der $CD4^+FoxP3^-$ T-Zellen fanden sich im PB $<1\%$ und in der SF ca. 1-2% 4-1BB⁺-Zellen, insgesamt also deutlich geringere Frequenzen als innerhalb der T_{REG}-Zellen (Abbildung 3.18). Auch innerhalb der $CD4^+FoxP3^-$ T-Zellen war kein Unterschied zwischen den Patientengruppen oder Kontrollen bezüglich der Anteile von 4-1BB⁺ T-Zellen feststellbar.



4-1BB ⁺ [%] in CD4 ⁺ FoxP3 ⁻		AS	PsA	RA	Con
Untersuchungsgruppe					
Vollblut		0,68 ± 0,92	0,4 ± 0,5	0,84 ± 0,73	0,27 ± 0,1
Synovialflüssigkeit		1,18 ± 0,56	1,72 ± 1,69	1,69 ± 0,81	-

Abb. 3.18: Frequenz der 4-1BB⁺ T-Zellen innerhalb der $CD4^+FoxP3^-$ T-Zellen in PB (links) und SF (rechts) bei Patienten mit AS, PsA, RA und Kontrollen (Con). Vollblut wurde nativ mit den Oberflächenmarkern markiert, gewaschen und mittels *FACSLysingSolution* lysiert, die SF wurde nach einem Waschschrift in PBE mittels *Cellstrainer* gefiltert und in PBE gefärbt. Mit dem FoxP3-Kit wurden die Zellen permeabilisiert und nach einem Waschschrift bei 4°C intrazellulär gefärbt. Nach einem erneuten Waschschrift wurden die Zellen fixiert. Dargestellt ist die Frequenz (Einzelwerte und Mittelwert) der 4-1BB⁺ T-Zellen innerhalb der $CD4^+FoxP3^-$ Lymphozyten. In der Tabelle unterhalb der Abbildung sind die Mittelwerte ± SD gezeigt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis- und Dunn's Post-hoc-Test.

In Abbildung 3.19 ist der Anteil von FoxP3⁺ T-Zellen innerhalb der CD4⁺ T-Zellen, der Anteil von 4-1BB⁺ T-Zellen innerhalb der CD4⁺FoxP3⁺ T_{REG}-Zellen und der CD4⁺FoxP3⁻ non-T_{REG}-Zellen in verbundenen Proben aus peripherem Blut und SF bei AS-Patienten dargestellt. Es fand sich eine tendenziell höhere Frequenz der FoxP3⁺ T-Zellen in der SF als im Blut. Außerdem fiel eine höhere Frequenz von 4-1BB⁺ T-Zellen innerhalb der CD4⁺FoxP3⁺ T-Zellen in der SF im Gegensatz zum Blut auf. Innerhalb der FoxP3⁻ T-Zellen fand sich dieser Unterschied nicht.

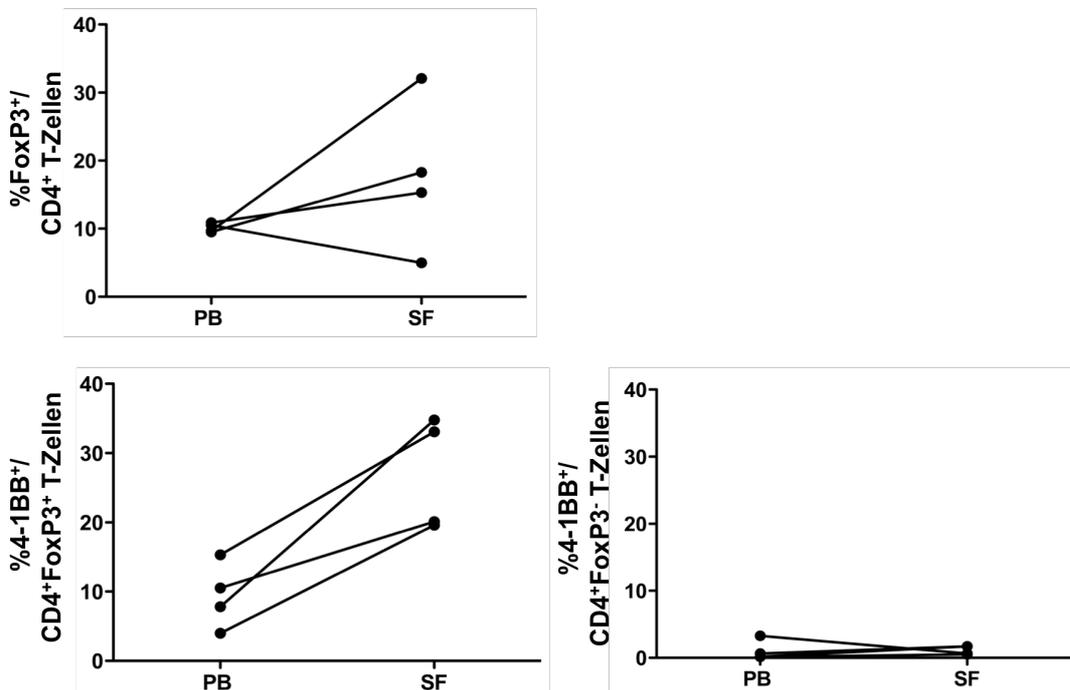


Abb. 3.19: Vergleich der Frequenz von FoxP3⁺ T-Zellen innerhalb der CD4⁺ T-Zellen (oben links), der Frequenz 4-1BB⁺ T-Zellen innerhalb der CD4⁺FoxP3⁺ T-Zellen (links unten) und der Frequenz 4-1BB⁺ T-Zellen innerhalb der CD4⁺FoxP3⁻ T-Zellen (rechts unten) im peripheren Blut (PB) und SF von individuellen AS-Patienten. Die Frequenz der oben genannten Zellen ist in SF und zugehörigen Blutproben individueller AS-Patienten vergleichend dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgtemittels gepaartem Wilcoxon-Rangsummen-Test.

Zusammenfassend lässt sich hier die Beobachtung festhalten, dass sich der Anteil von 4-1BB⁺ T_{REG}-Zellen in der SF erhöht. Dies könnte ein Hinweis auf die lokale Aktivierung von T_{REG}-Zellen sein.

Zur weiteren Charakterisierung der FoxP3⁺ T-Zellen wurde die Koexpression von CD25 bestimmt (Abbildung 3.20). Es zeigte sich, dass die FoxP3⁺ T-Zellen CD25 hoch exprimieren und der überwiegende Teil doppelpositiv ist. Innerhalb der FoxP3⁻ T-Zellen gilt CD25 als Aktivierungsmarker. Charakteristisch ist die intermediäre, d.h. deutlich schwächere Expression bei konventionellen T-Zellen gegenüber T_{REG}-Zellen, wie auch in Abbildung 3.20 erkennbar. Wir bestimmten den Anteil CD25⁺ T-Zellen innerhalb der CD4⁺FoxP3⁺ T-Zellen und innerhalb der CD4⁺FoxP3⁻ T-Zellen.

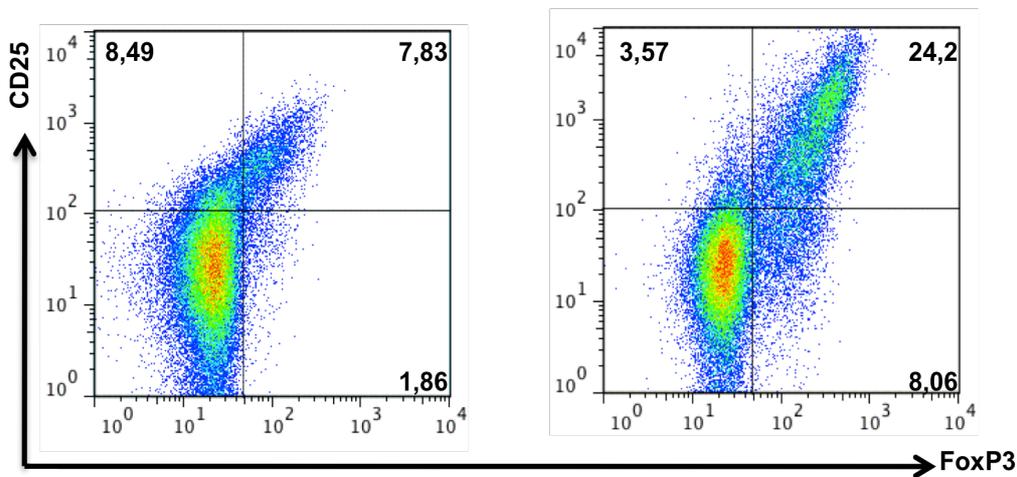
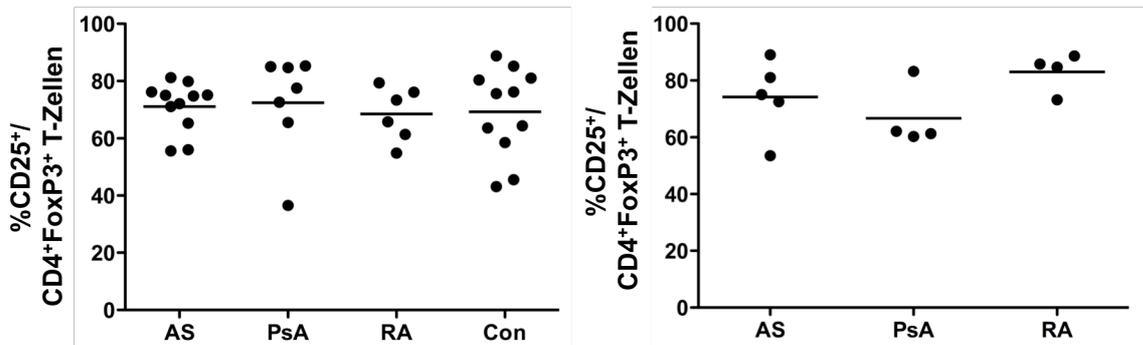


Abb. 3.20: Beispiel (Pseudocolor-Dotplot) einer Analyse der Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 und des Rezeptors CD25 auf CD4⁺ T-Zellen in PB (links) und SF (rechts). Vollblut wurde nativ mit den Oberflächenmarkern markiert, gewaschen und mittels *FACSLysingSolution* lysiert, die SF wurde nach einem Waschvorgang in PBE mittels *Cellstrainer* gefiltert und in PBE gefärbt. Mit dem FoxP3-Kit wurden die Zellen permeabilisiert und nach einem Waschschrift bei 4°C intrazellulär gefärbt. Nach einem erneuten Waschschrift wurden die Zellen fixiert. Analysiert wurden die CD4⁺ Lymphozyten.

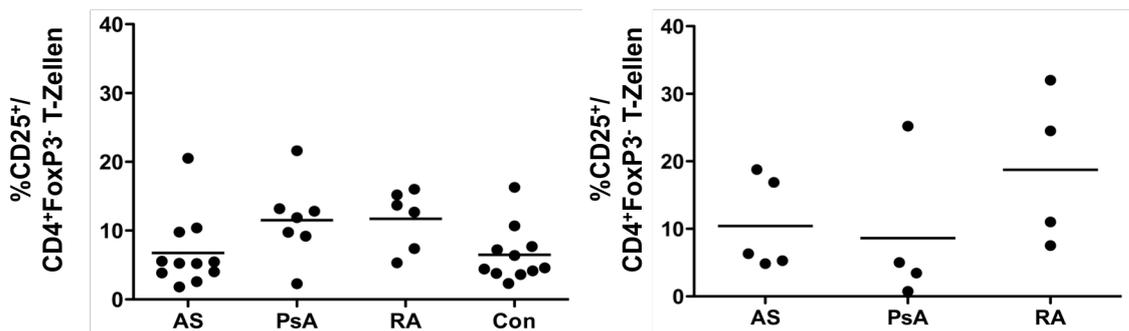
In Abbildung 3.21 sind Frequenzen von CD25⁺ T-Zellen innerhalb der CD4⁺FoxP3⁺ T-Zellen in PB und SF dargestellt. Dabei zeigte sich bei allen untersuchten Erkrankungen und bei den Kontrollen im Blut eine Frequenz von ca. 70%. Ebenso wie im peripheren Blut exprimierte ein Großteil der CD4⁺FoxP3⁺ T-Zellen CD25 auch in der SF.



CD25 ⁺ [%] in CD4 ⁺ FoxP3 ⁺	AS	PsA	RA	Con
Untersuchungsgruppe				
Vollblut	71,1 ± 8,68	72,4 ± 17,5	68,5 ± 9,42	69,3 ± 15,5
Synovialflüssigkeit	74,2 ± 13,2	66,7 ± 11	83,1 ± 6,78	-

Abb. 3.21: Frequenz der CD25⁺ T-Zellen innerhalb der CD4⁺FoxP3⁺ T-Zellen in PB (links) und SF (rechts) bei Patienten mit AS, PsA, RA und Kontrollen (Con). Vollblut wurde nativ mit den Oberflächenmarkern markiert, gewaschen und mittels *FACSLysingSolution* lysiert, die SF wurde nach einem Waschschrift in PBE mittels *Cellstrainer* gefiltert und in PBE gefärbt. Mit dem FoxP3-Kit wurden die Zellen permeabilisiert und nach einem Waschschrift bei 4°C intrazellulär gefärbt. Nach einem erneuten Waschschrift wurden die Zellen fixiert. Dargestellt ist die Frequenz (Einzelwerte und Mittelwert) der CD25⁺ T-Zellen innerhalb der CD4⁺FoxP3⁺-Lymphozyten. In der Tabelle unterhalb der Abbildung sind die Mittelwerte ± SD gezeigt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis- und Dunn`s Post-hoc-Test.

Abbildung 3.22 zeigt die Frequenz der CD25⁺ Zellen innerhalb der CD4⁺FoxP3⁻ T-Zellen in PB und SF. Im PB und in der SF fand sich bei einer großen Streubreite und kleiner Probenzahl kein eindeutiger signifikanter Unterschied in der Frequenz von CD25⁺ T-Zellen innerhalb der CD4⁺FoxP3⁻ T-Zellen, wenn auch RA-Patienten und PsA-Patienten tendenziell erhöhte Frequenzen gegenüber den Kontrollen und AS-Patienten im PB aufwiesen.



CD25 ⁺ [%] in CD4 ⁺ FoxP3 ⁻				
Untersuchungsgruppe	AS	PsA	RA	Con
Vollblut	6,77 ± 5,26	11,5 ± 5,78	11,7 ± 4,36	6,47 ± 4,03
Synovialflüssigkeit	10,4 ± 6,83	8,61 ± 11,2	18,8 ± 11,5	-

Abb. 3.22: Frequenz der CD25⁺ T-Zellen innerhalb der CD4⁺FoxP3⁻ T-Zellen in PB (links) und SF (rechts) bei Patienten mit AS, PsA, RA und Kontrollen (Con). Vollblut wurde nativ mit den Oberflächenmarkern markiert, gewaschen und mittels *FACSLysingSolution* lysiert, die SF wurde nach einem Waschschrift in PBE mittels *Cellstrainer* gefiltert und in PBE gefärbt. Mit dem FoxP3-Kit wurden die Zellen permeabilisiert und nach einem Waschschrift bei 4°C intrazellulär gefärbt. Nach einem erneuten Waschschrift wurden die Zellen fixiert. Dargestellt ist die Frequenz (Einzelwerte und Mittelwert) der CD25⁺ T-Zellen innerhalb der CD4⁺FoxP3⁻ Lymphozyten. In der Tabelle unterhalb der Abbildung sind die Mittelwerte ± SD gezeigt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis- und Dunn's Post-hoc-Test.

In Abbildung 3.23 ist dieser Zusammenhang noch einmal im Vergleich von PB und SF in gepaarten Proben von AS-Patienten dargestellt. 60-90% der FoxP3⁺ T-Zellen trugen den Rezeptor CD25, sowohl in PB als auch in SF. Innerhalb der FoxP3⁻ T-Zellen fand sich nur eine geringe Expression sowohl im Blut als auch in der SF. Dies könnte ein Hinweis auf die nur geringe lokale Aktivierung von T_{EM}-Zellen sein.

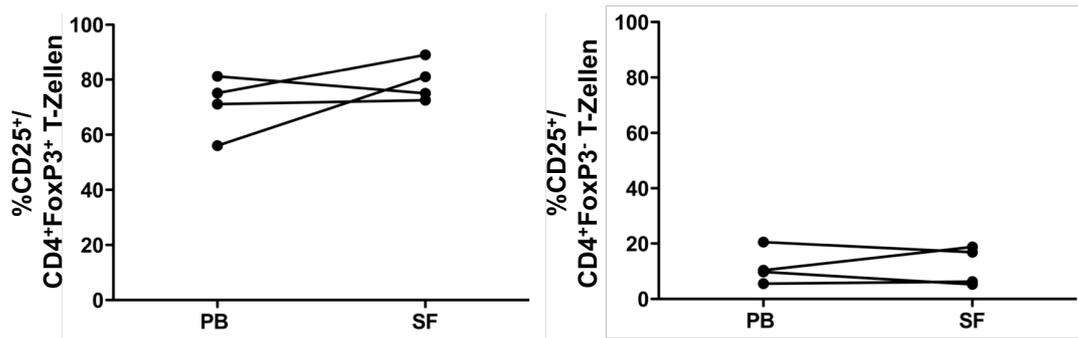


Abb. 3.23: Vergleich der Frequenz CD25⁺ T-Zellen innerhalb der CD4⁺FoxP3⁺ T-Zellen (links) und der CD25⁺ T-Zellen innerhalb der CD4⁺FoxP3⁻ T-Zellen (rechts) im peripheren Blut (PB) und SF von individuellen AS-Patienten. Die Frequenz der oben genannten Zellen ist in SF und zugehörigen Blutproben individueller AS-Patienten vergleichend dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels gepaartem Wilcoxon-Rangsummen-Test.

3.3.2 Expression der Transkriptionsfaktoren Helios und Foxp3 innerhalb der CD45RA⁻ T-Zellen

Im folgenden Abschnitt sollen die Anteile der Helios⁺ T-Zellen innerhalb der FoxP3⁺ T_{REG}-Zellen bestimmt werden. Ein repräsentatives Beispiel dieser Färbung, *gated* auf CD45RA⁻ T-Zellen, ist in Abbildung 3.24 dargestellt.

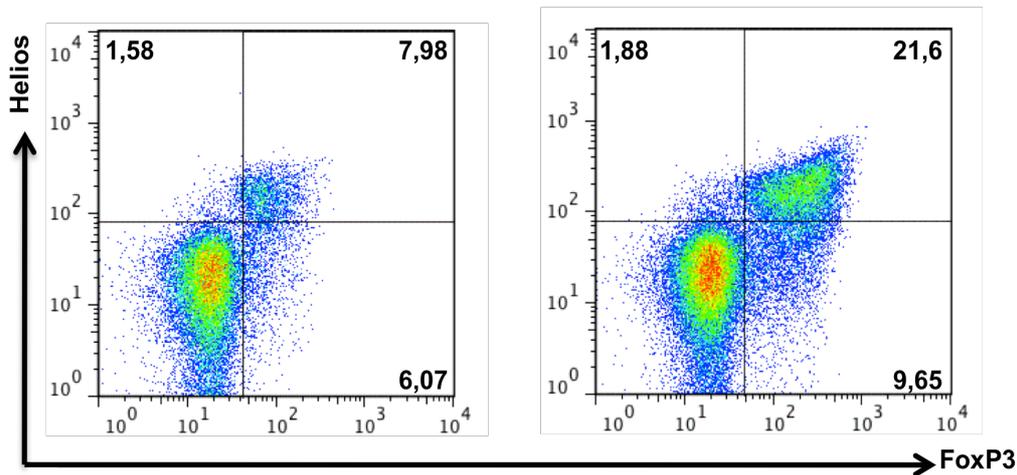
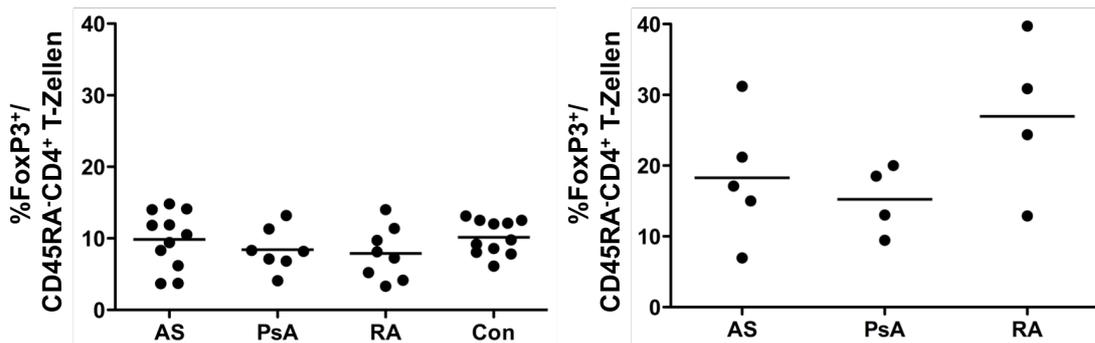


Abb. 3.24: Beispiel (*Pseudocolor-Dotplot*) einer Analyse der Expression der Transkriptionsfaktoren FoxP3 und Helios auf CD4⁺CD45RA⁻ T-Zellen in PB (links) und SF (rechts). Vollblut wurde nativ mit den Oberflächenmarkern markiert, gewaschen und mittels *FACSLysingSolution* lysiert, die SF wurde nach einem Waschschrift in PBE mittels *Cellstrainer* gefiltert und in PBE gefärbt. Mit dem FoxP3-Kit wurden die Zellen permeabilisiert und nach einem Waschschrift bei 4°C intrazellulär gefärbt. Nach einem erneuten Waschschrift wurden die Zellen fixiert. Analysiert wurden die CD4⁺CD45RA⁻ Lymphozyten.

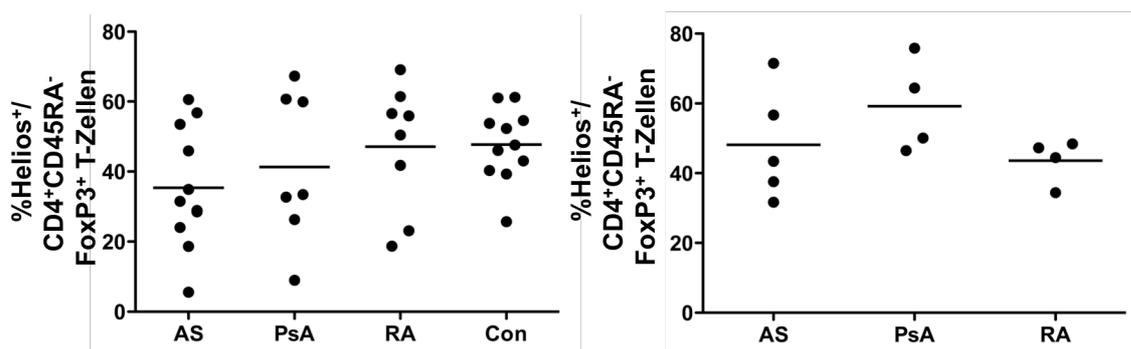
In Abbildung 3.25 ist die Frequenz von FoxP3⁺ T-Zellen innerhalb der CD4⁺CD45RA⁻ T-Zellen in PB und SF dargestellt. Dabei zeigten sich zwischen den Patientengruppen keine signifikanten Unterschiede. Im Blut lag die Frequenz etwa zwischen 8% und 10%, in der SF zwischen 15% und 27%. Es war eine große Streuung in der SF zu beobachten.



FoxP3 ⁺ [%] in CD4 ⁺ CD45RA ⁻				
Untersuchungsgruppe	AS	PsA	RA	Con
Vollblut	9,86 ± 4	8,43 ± 3,01	7,89 ± 3,69	10,16 ± 2,38
Synovialflüssigkeit	18,3 ± 8,89	15,24 ± 4,89	27 ± 11,3	-

Abb. 3.25: Frequenz der FoxP3⁺ T-Zellen innerhalb der CD4⁺CD45RA⁻ T-Zellen in PB (links) und SF (rechts) bei Patienten mit AS, PsA, RA und Kontrollen (Con). Vollblut wurde nativ mit den Oberflächenmarkern markiert, gewaschen und mittels *FACSLysingSolution* lysiert, die SF wurde nach einem Waschschrift in PBE mittels *Cellstrainer* gefiltert und in PBE gefärbt. Mit dem FoxP3-Kit wurden die Zellen permeabilisiert und nach einem Waschschrift bei 4°C intrazellulär gefärbt. Nach einem erneuten Waschschrift wurden die Zellen fixiert. Dargestellt ist die Frequenz (Einzelwerte und Mittelwert) der FoxP3⁺ T-Zellen innerhalb der CD4⁺CD45RA⁻ Lymphozyten. In der Tabelle unterhalb der Abbildung sind die Mittelwerte ± SD aufgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis- und Dunn's Post-hoc-Test.

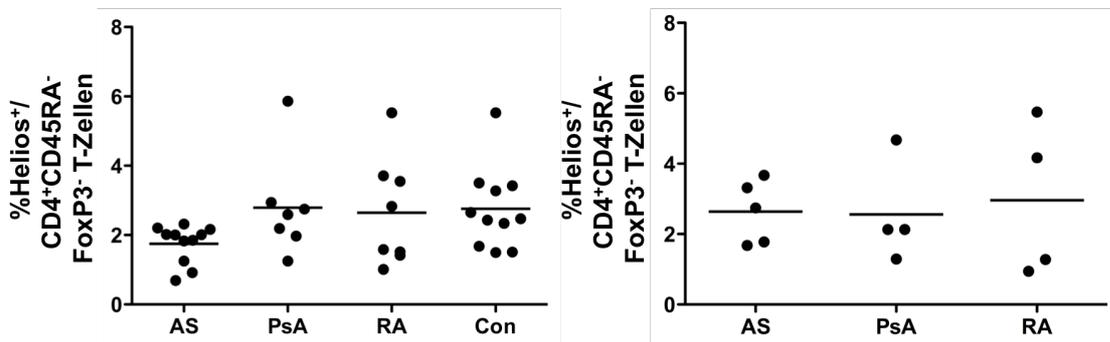
Wir bestimmten den Anteil von Helios⁺ T-Zellen innerhalb der CD4⁺CD45RA⁻FoxP3⁺ T-Zellen und innerhalb der CD4⁺CD45RA⁻FoxP3⁻ T-Zellen. Abbildung 3.26 zeigt die Frequenz der Helios⁺ T-Zellen innerhalb der CD4⁺CD45RA⁻FoxP3⁺ T-Zellen. Im Blut zeigte sich eine Frequenz von etwa 35-50% bei großer Streubreite, in der SF lagen die Werte zwischen 40% und 60%. Es sind keine Unterschiede zwischen den Patientengruppen festzustellen, anders als erwartet auch nicht zwischen AS und RA.



Helios ⁺ [%] in CD4 ⁺ CD45RA ⁻ FoxP3 ⁺	AS	PsA	RA	Con
Untersuchungsgruppe				
Vollblut	35,3 ± 17,1	41,3 ± 21,6	47,1 ± 18	47,7 ± 10,5
Synovialflüssigkeit	48,2 ± 16	59,2 ± 13,5	43,6 ± 6,38	-

Abb. 3.26: Frequenz der Helios⁺ T-Zellen innerhalb der CD4⁺CD45RA⁻FoxP3⁺ T-Zellen in PB (links) und SF (rechts) bei Patienten mit AS, PsA, RA und Kontrollen (Con). Vollblut wurde nativ mit den Oberflächenmarkern markiert, gewaschen und mittels *FACSLysingSolution* lysiert, die SF wurde nach einem Waschschrift in PBE mittels *Cellstrainer* gefiltert und in PBE gefärbt. Mit dem FoxP3-Kit wurden die Zellen permeabilisiert und nach einem Waschschrift bei 4°C intrazellulär gefärbt. Nach einem erneuten Waschschrift wurden die Zellen fixiert. Dargestellt ist die Frequenz (Einzelwerte und Mittelwert) der Helios⁺ T-Zellen innerhalb der CD4⁺CD45RA⁻FoxP3⁺-Lymphozyten. In der Tabelle unterhalb der Abbildung sind die Mittelwerte ± SD aufgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis- und Dunn's Post-hoc-Test.

Abbildung 3.27 zeigt die Frequenz der Helios⁺ T-Zellen innerhalb der CD4⁺CD45RA⁻FoxP3⁻ T-Zellen. Hier zeigte sich, wie schon in Abbildung 3.24 ersichtlich, nur eine geringe Frequenz Helios⁺ T-Zellen ohne Unterschied in der Frequenz Helios⁺ T-Zellen innerhalb der CD4⁺CD45RA⁻FoxP3⁻ T-Zellen im Blut zwischen den Patientengruppen. Der Marker Helios wurde im Blut mit einer Frequenz von 1,7-2,7% und in der SF mit einer Frequenz von ca. 2,6% innerhalb der FoxP3⁻ T-Zellen gemessen. Somit bestätigt sich die Spezifität des Markers für T_{REG}-Zellen.



Helios ⁺ [%] in CD4 ⁺ CD45RA ⁻ FoxP3 ⁻	AS	PsA	RA	Con
Untersuchungsgruppe	AS	PsA	RA	Con
Vollblut	1,75 ± 0,55	2,79 ± 1,47	2,64 ± 1,55	2,76 ± 1,17
Synovialflüssigkeit	2,64 ± 0,89	2,56 ± 1,47	2,97 ± 2,21	-

Abb. 3.27: Frequenz der Helios⁺ T-Zellen innerhalb der CD4⁺CD45RA⁻FoxP3⁻ T-Zellen in PB (links) und SF (rechts) bei Patienten mit AS, PsA, RA und Kontrollen (Con). Vollblut wurde nativ mit den Oberflächenmarkern markiert, gewaschen und mittels *FACSLysingSolution* lysiert, die SF wurde nach einem Waschschrift in PBE mittels *Cellstrainer* gefiltert und in PBE gefärbt. Mit dem FoxP3-Kit wurden die Zellen permeabilisiert und nach einem Waschschrift bei 4°C intrazellulär gefärbt. Nach einem erneuten Waschschrift wurden die Zellen fixiert. Dargestellt ist die Frequenz (Einzelwerte und Mittelwert) der Helios⁺ T-Zellen innerhalb der CD4⁺CD45RA⁻FoxP3⁻ Lymphozyten. In der Tabelle unterhalb der Abbildung sind die Mittelwerte ± SD aufgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis- und Dunn's Post-hoc-Test.

In Abbildung 3.28 ist die Frequenz von Helios⁺ T-Zellen innerhalb der CD4⁺CD45RA⁻FoxP3⁺ T-Zellen von zusammengehörigen Blut- und SF-Proben von AS-Patienten dargestellt. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen Blut- und SF-Proben.

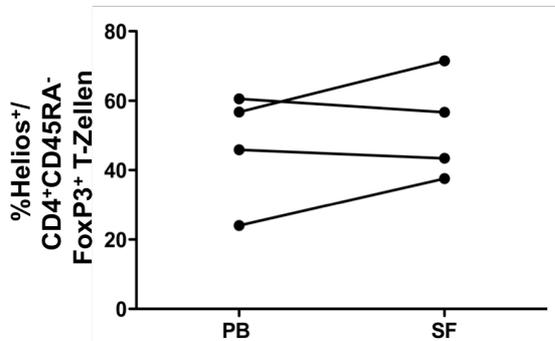


Abb. 3.28: Vergleich der Frequenz von Helios⁺ T-Zellen innerhalb der CD4⁺CD45RA⁻FoxP3⁺ T-Zellen im peripheren Blut (PB) und SF von individuellen AS-Patienten. Die Frequenz der oben genannten Zellen ist in SF und zugehörigen Blutproben individueller AS-Patienten vergleichend dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels gepaartem Wilcoxon-Rangsummen-Test.

3.3.3 PD-1 als phänotypischer Marker für T-Zellerschöpfung und chronische Aktivierung innerhalb der CD4⁺CD45RA⁻ T-Zellen

Als Marker für chronisch aktivierte T-Zellen wurde der Anteil der PD-1⁺ Zellen innerhalb der CD4⁺CD45RA⁻ T-Zellen bestimmt. In der Beispielfärbung (Abbildung 3.29) erkennt man die erhöhte Expression von PD-1 in der SF. Die gleichzeitige Färbung von FoxP3 zeigt außerdem, dass PD-1 vor allem auf FoxP3⁻ T-Zellen exprimiert wird. Jedoch ließ sich der Rezeptor auch auf T_{REG}-Zellen nachweisen, wenn auch in geringerer Höhe.

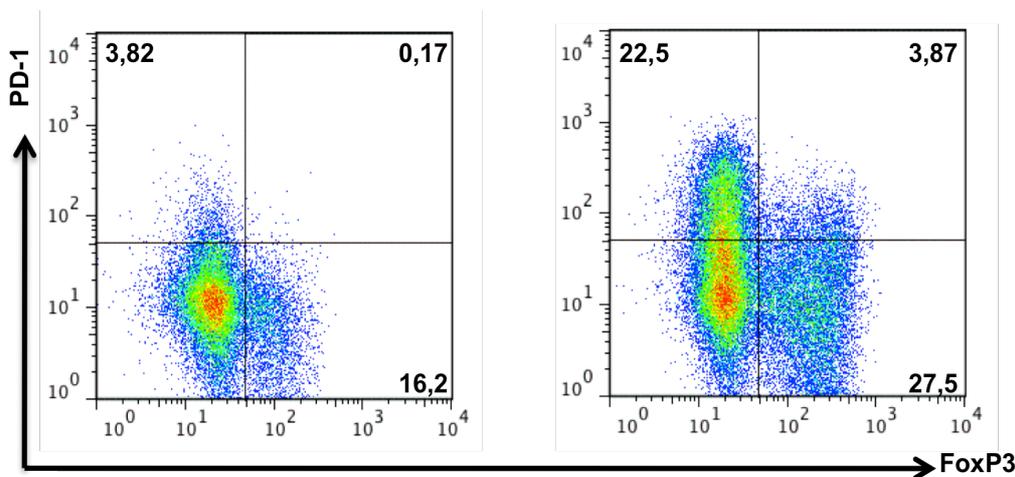
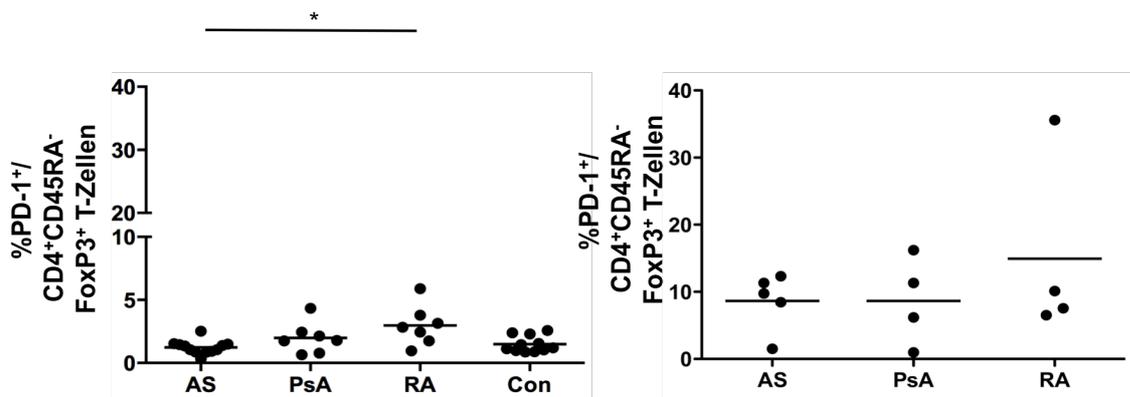


Abb. 3.29: Beispiel (*Pseudocolor-Dotplot*) einer Analyse der Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 und des Markers PD-1 auf CD4⁺CD45RA⁻ T-Zellen in PB (links) und SF (rechts). Vollblut wurde nativ mit den Oberflächenmarkern markiert, gewaschen und mittels *FACSLysingSolution* lysiert, die SF wurde nach einem Waschschrift in PBE mittels *Cellstrainer* gefiltert und in PBE gefärbt. Mit dem FoxP3-Kit wurden die Zellen permeabilisiert und nach einem Waschschrift bei 4°C intrazellulär gefärbt. Nach einem erneuten Waschschrift wurden die Zellen fixiert. Analysiert wurden die CD4⁺CD45RA⁻ Lymphozyten.

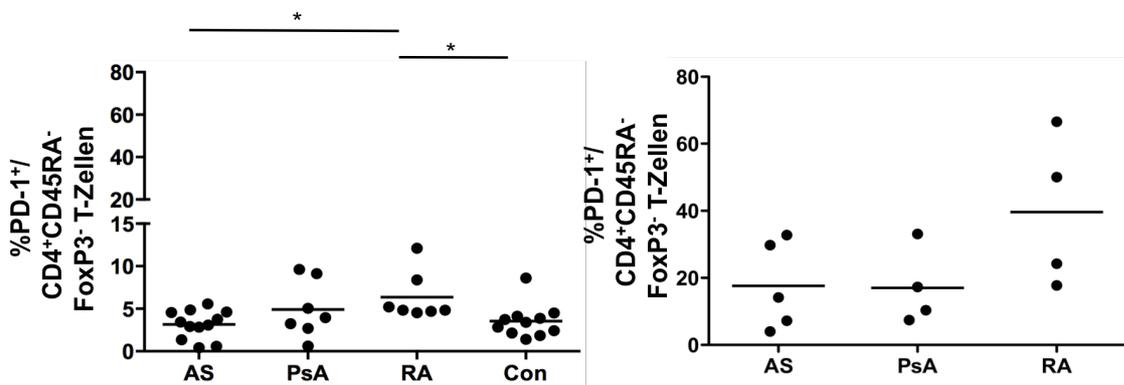
In den nachstehenden Abbildungen 3.30 und 3.31 sind die Analysen der PD-1⁺ T-Zellen innerhalb der CD4⁺CD45RA⁻FoxP3⁺ T-Zellen und innerhalb der CD4⁺CD45RA⁻FoxP3⁻ T-Zellen dargestellt. Im Blut zeigte sich innerhalb der CD4⁺CD45RA⁻FoxP3⁺ eine Frequenz der PD-1⁺ T-Zellen von ca. 1-3%, wobei die Frequenz der PD-1⁺ T-Zellen innerhalb der CD4⁺CD45RA⁻FoxP3⁺ T-Zellen bei RA-Patienten signifikant höher ($p = 0,022$) war als bei AS-Patienten. In der SF lag die Frequenz bei 8-15% (Abbildung 3.30).



PD-1 ⁺ [%] in CD4 ⁺ CD45RA ⁻ FoxP3 ⁺	AS	PsA	RA	Con
Untersuchungsgruppe				
Vollblut	1,23 ± 0,53	1,98 ± 1,23	2,97 ± 1,58	1,49 ± 0,64
Synovialflüssigkeit	8,67 ± 4,25	8,67 ± 6,56	14,9 ± 13,9	-

Abb. 3.30: Frequenz PD-1⁺ T-Zellen innerhalb der CD4⁺CD45RA⁻FoxP3⁺ T-Zellen in PB (links) und SF (rechts) bei Patienten mit AS, PsA, RA und Kontrollen (Con). Vollblut wurde nativ mit den Oberflächenmarkern markiert, gewaschen und mittels *FACSLysingSolution* lysiert, die SF wurde nach einem Waschschrift in PBE mittels *Cellstrainer* gefiltert und in PBE gefärbt. Mit dem FoxP3-Kit wurden die Zellen permeabilisiert und nach einem Waschschrift bei 4°C intrazellulär gefärbt. Nach einem erneuten Waschschrift wurden die Zellen fixiert. Dargestellt ist die Frequenz (Einzelwerte und Mittelwert) der PD-1⁺ T-Zellen innerhalb der CD4⁺CD45RA⁻FoxP3⁺-Lymphozyten. In der Tabelle unterhalb der Abbildung sind die Mittelwerte ± SD aufgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis- und Dunn's Post-hoc-Test; * $p < 0,05$.

In Abbildung 3.31 sind die Frequenzen der PD-1⁺ T-Zellen innerhalb der CD4⁺CD45RA⁻FoxP3⁻ T-Zellen illustriert. Etwa 5% der CD4⁺CD45RA⁻FoxP3⁻ T-Zellen im Blut trugen den Rezeptor PD-1, in der SF lag der Anteil bei 20-40%. Im Blut fanden sich signifikant höhere Frequenzen PD-1⁺ T-Zellen innerhalb der CD4⁺CD45RA⁻FoxP3⁻ T-Zellen in RA-Patienten im Vergleich zu AS-Patienten und im Vergleich zu Kontrollen ($p = 0,0445$ bzw. $p = 0,038$). Auch in der SF fanden sich tendenziell höhere Frequenzen in den Proben der RA-Patienten.



PD-1 ⁺ [%] in CD4 ⁺ CD45RA ⁻ FoxP3 ⁻	AS	PsA	RA	Con
Untersuchungsgruppe	AS	PsA	RA	Con
Vollblut	3,17 ± 1,67	4,9 ± 3,35	6,37 ± 2,86	3,54 ± 1,96
Synovialflüssigkeit	17,6 ± 13,1	17,1 ± 11,5	39,6 ± 22,7	-

Abb. 3.31: Frequenz der PD-1⁺ T-Zellen innerhalb der CD4⁺CD45RA⁻FoxP3⁻ T-Zellen in PB (links) und SF (rechts) bei Patienten mit AS, PsA, RA und Kontrollen (Con). Vollblut wurde nativ mit den Oberflächenmarkern markiert, gewaschen und mittels *FACSLysingSolution* lysiert, die SF wurde nach einem Waschschrift in PBE mittels *Cellstrainer* gefiltert und in PBE gefärbt. Mit dem FoxP3-Kit wurden die Zellen permeabilisiert und nach einem Waschschrift bei 4°C intrazellulär gefärbt. Nach einem erneuten Waschschrift wurden die Zellen fixiert. Dargestellt ist die Frequenz (Einzelwerte und Mittelwert) der PD-1⁺ T-Zellen innerhalb der CD4⁺CD45RA⁻FoxP3⁻ Lymphozyten. In der Tabelle unterhalb der Abbildung sind die Mittelwerte ± SD aufgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis- und Dunn's Post-hoc-Test; * $p < 0,05$.

Im Vergleich von PB und SF zeigte sich bei gepaarten Proben von AS-Patienten, dass die Frequenz von PD-1⁺ T-Zellen innerhalb CD4⁺CD45RA⁻FoxP3⁻ T-Zellen tendenziell in der SF erhöht war (Abbildung 3.32).

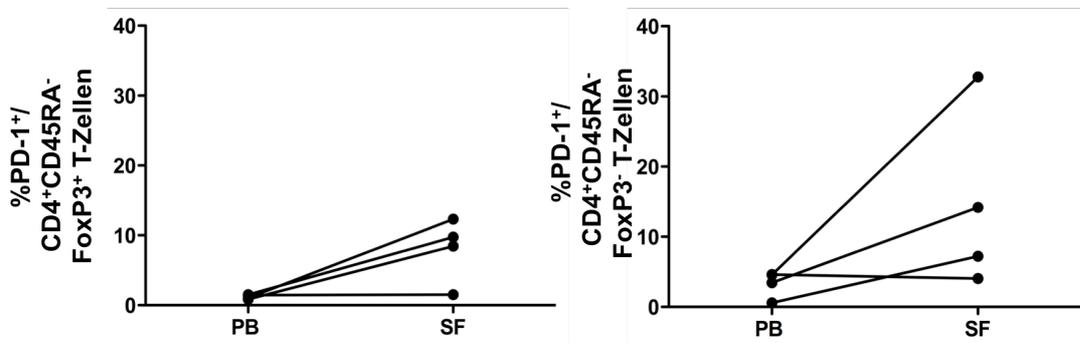


Abb. 3.32: Vergleich der Frequenz von PD-1⁺ T-Zellen innerhalb der CD4⁺CD45RA⁻FoxP3⁺ T-Zellen (links) und der PD-1⁺T-Zellen innerhalb der CD4⁺CD45RA⁻FoxP3⁻ T-Zellen (rechts) in gepaarten Blut- (PB) und SF-Proben von individuellen AS-Patienten. Die Frequenz der oben genannten Zellen ist in SF und zugehörigen Blutproben individueller AS-Patienten vergleichend dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels gepaartem Wilcoxon-Rangsummen-Test.

3.4 Proinflammatorische Zytokinsekretion bei CD4⁺ T-Zellen in Abhängigkeit von der PD-1-Expression

Wie in Abschnitt 3.3 gezeigt, fand sich vor allem bei RA-Patienten eine erhöhte PD-1-Expression auf CD4⁺CD45RA⁻FoxP3⁻ T-Zellen im Blut. Darüber hinaus war tendenziell eine Anreicherung des Rezeptors PD1 bei CD4⁺CD45RA⁻FoxP3⁻ in der SF aller Patientengruppen festzustellen. Die PD-1-Expression gilt als Marker für T-Zell-Erschöpfung. Um die PD-1⁺ CD4⁺-Zellen darüber hinausgehend auf ihre Funktion bei entzündlichen Gelenkerkrankungen zu untersuchen und zu charakterisieren, wurden *in vitro*-Stimulationen der T-Zellen vorgenommen. Es erfolgte einerseits eine TZR-unabhängige Stimulation mit PMA/Ionomycin und andererseits eine TZR-abhängige Stimulation mit α CD3 und α CD28. Angenommen wurde hierbei, dass die TZR-abhängige Stimulation von der Anwesenheit von PD-1 beeinflusst wird, die TZR-unabhängige Stimulation jedoch nicht. Da das CD4-Molekül nach Stimulation herunterreguliert wird, wurde in diesen Versuchen CD8 zur Diskriminierung verwendet. Die Daten wurden also bezogen auf CD3⁺CD8⁻ T-Zellen, was dem *Subset* der CD4⁺ T-Zellen entspricht. Nach Stimulation mit PMA/Ionomycin oder α CD3 und α CD28 wurde die Expression von CD154 und die Produktion des proinflammatorischen Zytokins IFN γ in Abhängigkeit von der PD-1-Expression gemessen, unabhängig von der zugrundeliegenden Erkrankung (Abbildung 3.33).

Die TZR-unabhängige Stimulation mit PMA/Ionomycin führte zu einer Aktivierung und Hochregulation von CD154 und IFN γ sowohl in PD-1⁺ und PD-1⁻ CD3⁺CD8⁻ T-Zellen. Abbildung 3.34 zeigt die Ergebnisse dieser Analyse in sechs SF-Proben. Die Frequenz von CD154⁺ T-Zellen war nach PMA/Ionomycin-Stimulation innerhalb der CD3⁺CD8⁻PD-1⁺ T-Zellen sogar signifikant höher als in den CD3⁺CD8⁻PD-1⁻ T-Zellen ($p = 0,0313$), während sich keine signifikanten Unterschiede in der IFN γ -Produktion, also der Frequenz von IFN γ ⁺ T-Zellen, zwischen PD-1⁻ und PD-1⁺ T-Zellen nach PMA/Ionomycin-Stimulation ergaben. Nach TZR-abhängiger Stimulation mit α CD3/ α CD28 waren keine signifikanten Unterschiede in der Hochregulation von CD154 zwischen PD-1⁻ und PD-1⁺ T-Zellen zu beobachten. Jedoch war die Produktion von IFN γ innerhalb der PD-1⁺ T-Zellen signifikant geringer gegenüber PD-1⁻ T-Zellen, was auf eine eingeschränkte Reaktivität der PD1⁺ T-Zellen nach TZR-abhängiger Stimulation hinweist.

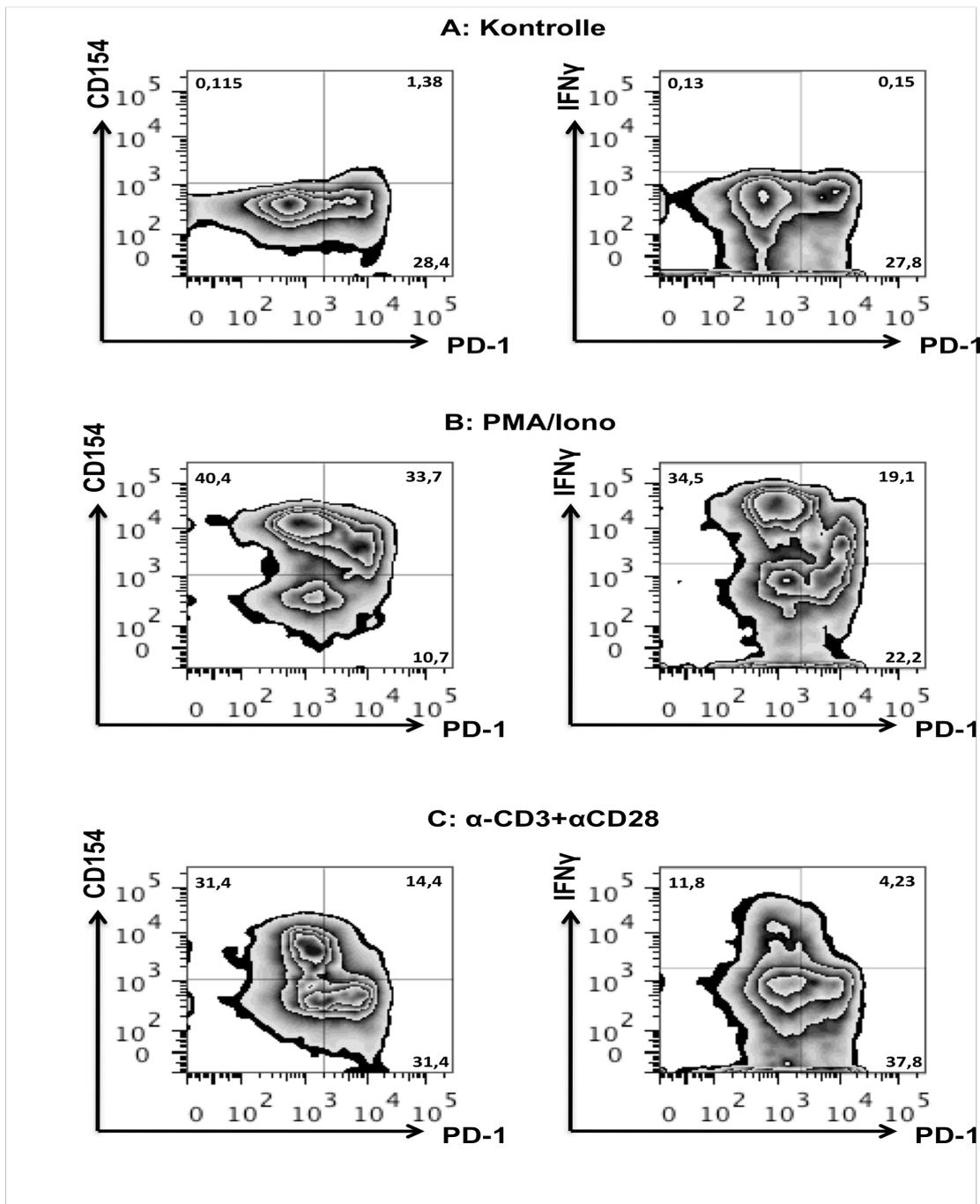


Abb. 3.33: Beispiel (*Density-Dotplot*) der CD154-Expression und IFN γ -Produktion nach PMA/Ionomycin und α CD3/ α CD28-Stimulation in Abhängigkeit von der PD-1-Expression. Nach der Gewinnung von SFMNC eines Patienten, die eingefroren gelagert wurden, wurden diese nach dem Auftauen über sechs Stunden in Kulturmedium stimuliert. Nach zwei Stunden wurde Brefeldin A zugegeben. Nach der Fixierung wurden die Zellen permeabilisiert und für das *Gating* mit CD3 und CD8 sowie die Rezeptoren PD-1 und CD154 und dem Zytokin IFN γ gefärbt und mittels FACS Canto II gemessen. (A): Kontrolle ohne Stimulanz, (B): Stimulation mit PMA/Iono, (C): Stimulation mit α CD3/28. Betrachtet wurden die CD3⁺CD8⁻ Lymphozyten, in den Quadranten sind die Frequenzen positiver Zellen angegeben.

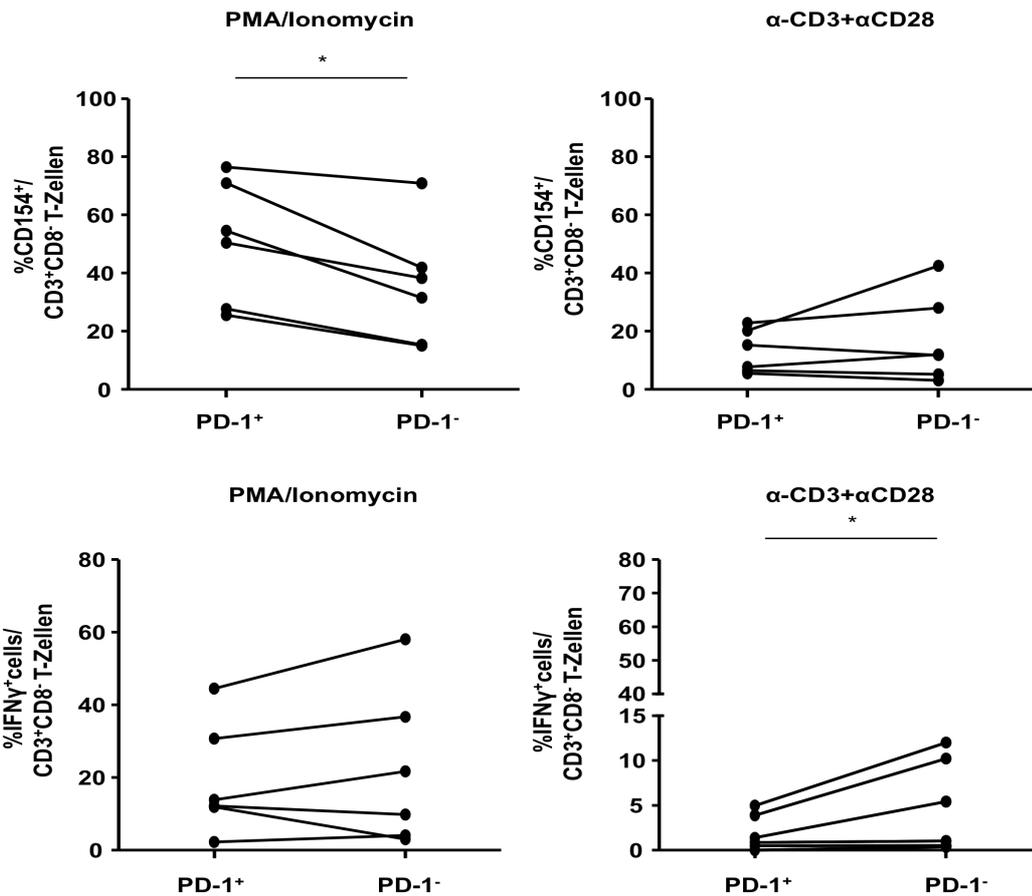


Abb. 3.34: Vergleich der Frequenz von CD154⁺ T-Zellen (oben) und IFN γ -produzierenden T-Zellen (unten) innerhalb der CD3⁺CD8⁻ T-Zellen in Abhängigkeit von der PD-1-Expression. Nach der Gewinnung von SFMNC aus Patientenproben, die eingefroren gelagert wurden, wurden diese nach dem Auftauen über sechs Stunden in Kulturmedium stimuliert. Es erfolgte die Stimulation mit PMA/Iono (links) und α CD3/28 (rechts) sowie die Zugabe von Brefeldin A nach zwei Stunden. Nach der Fixierung wurden die Zellen permeabilisiert und mit CD3- und CD8-Antikörpern sowie Antikörpern gegen PD-1, CD154 und das Zytokin IFN γ gefärbt und mittels FACS Canto II gemessen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels gepaartem Wilcoxon-Rangsummen-Test; *p < 0,05.

4. Diskussion

Die Zielsetzung der dargelegten Versuchsreihe bestand darin, anhand der phänotypischen Charakterisierung von T_{EM}-Zellen und T_{REG}-Zellen im Blut und im entzündeten Gelenk von Patienten mit SpA und RA Hinweise auf eine distinkte Genese und Pathogenese zu gewinnen. Vor dem Hintergrund der dargestellten Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Erkrankungen wurde auf die Charakterisierung von *Homingeigenschaften*, Aktivierungs- und Chronifizierungsprozessen fokussiert. Die Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche werden im Folgenden vor dem Hintergrund des aktuellen Forschungsstandes diskutiert.

4.1 Erhöhte Frequenz von CD4⁺CD45RA⁻ T-Zellen im peripheren Blut bei Patienten mit RA

Die Analyse des Anteils antigenerfahrener Gedächtnis-T-Zellen im peripheren Blut, identifiziert anhand des Fehlens von CD45RA, zeigte eine Expansion dieser Zellen bei RA-Patienten, die bei AS-Patienten und Gesunden nicht zu beobachten war. CD45RA, eine Tyrosinkinase, wird vorwiegend auf naiven T-Zellen exprimiert und nach antigenspezifischer Stimulation herabreguliert. Die Zunahme von antigenerfahrenen Gedächtniszellen bei Patienten mit RA im peripheren Blut deutet auf eine stärkere Aktivierung und Expansion antigenerfahrener CD4⁺ T-Zellen bei Vorliegen einer RA hin. So wurde insbesondere bei RA die Expansion oligoklonaler CD4⁺ T-Zellen sowohl im Blut als auch in der SF gezeigt [130]. Für Patienten mit PsA und AS konnte eine derartige CD4⁺ T-Zellexpansion nicht eindeutig nachgewiesen werden. Außerdem könnten Schwere und Dauer der Erkrankung diesen Parameter beeinflussen. Eine weiterführende Analyse dieses Zusammenhanges würde jedoch Versuche mit größeren Fallzahlen erfordern. Neben diesen krankheitsspezifischen Ursachen könnte die Expansion der Gedächtnis-T-Zellen im Blut aber auch durch das höhere Alter der RA-Patienten bestimmt sein. Im Alter kommt es bei der Involution des Thymus zu einer verminderten Freisetzung von naiven CD45RA⁺ T-Zellen, womit der Anteil CD45RA⁻ T-Zellen prozentual zunimmt [131]. Systematisch untersucht wurde dies für den Marker CD45RA im Versuch an Schafen, wo sich über die Lebensspanne vom Lamm zum geriatrischen Schaf eine Abnahme der CD45RA⁺ T-Zellen fand [132].

In der Synovialflüssigkeit fanden sich bei allen Erkrankungsformen fast ausschließlich antigenerfahrene CD4⁺CD45RA⁻ T-Zellen. Dies stimmt mit der Beobachtung überein,

dass antigenerfahrene T-Zellen – nicht aber naive T-Zellen – in periphere Entzündungsreaktionen einwandern können, was Mauro *et al.* [133] zusammenfassend darstellen. Zwar ist in der RA die Bildung tertiärer Lymphfollikel im Bereich der chronisch entzündeten Synovia beschrieben, jedoch scheint die mögliche Einwanderung naiver T-Zellen über diesen Weg nicht wesentlich zum entzündlichen Infiltrat in der SF beizutragen. So beschreiben einige Arbeiten, dass die tertiären Lymphfollikel eher Einfluss auf die B-Zellen im autoimmunen Geschehen haben [134].

4.2 Fehlende Akkumulation von darmspezifischen T_{EM}-Zellen gemessen anhand der Expression des Integrins β_7 im entzündeten Gelenk von Patienten mit SpA-assoziiierter Arthritis

4.2.1 Expression darmspezifischer *Homing*rezeptoren auf CD4⁺ T-Zellen im Blut und SF bei Patienten mit SpA im Vergleich zu RA-Patienten

Mit der Analyse der *Homing*rezeptoren auf T_{EM}-Zellen in der SF von AS-Patienten sollte überprüft werden, ob darmspezifische T-Zellen zur Gelenkentzündung bei AS beitragen, was auf eine Kreuzreaktivität dieser Zellen mit mukosalen und Gelenkantigenen hindeuten könnte. Unter Verwendung von aus dem entzündeten Darm von CED-Patienten gewonnenen T-Zellen konnte gezeigt werden, dass Zellen aus dem Darmkompartiment in der Lage sind, an synoviale Gefäße zu binden und so in Gelenke einwandern [135]. Somit lässt sich eine ähnliche Hypothese für die PsA formulieren, bei der eine Kreuzreaktivität zwischen hautspezifischen Antigenen und Gelenkantigenen zu vermuten ist.

Als darmspezifischer Marker wurde die Expression von β_7 und CCR9 analysiert. CCR9 vermittelt vor allem die Einwanderung in den Dünndarm, während β_7 als Heterodimer mit α_4 das Integrin $\alpha_4\beta_7$ bildet, welches mit MAdCAM auf intestinale Endothel interagiert. Eher überraschend fand sich eine nur geringe Expression von β_7 und CCR9 auf CD4⁺ T-Zellen in der SF. Die Frequenz β_7^+ Zellen innerhalb der CD4⁺ T-Zellen lag unabhängig von der Erkrankung bei ca. 15-20% in der SF. CCR9 exprimierten weniger als 1% der CD4⁺ T-Zellen. Dieser Prozentsatz war bei AS-Patienten noch am höchsten, jedoch ist die biologische Relevanz einer solch geringen Expression eher fraglich. Dies steht im Kontrast zu den Ergebnissen von Elewaut *et al.* [136], die eine höhere Expression von β_7 auf synovialen T-Zellen von AS-Patienten im Vergleich zu RA-Patienten fanden. Dies kann zum einen auf die geringere Anzahl untersuchter Proben in

der vorliegenden Versuchsreihe zurückgeführt werden, zum anderen auf methodische Unterschiede: In unseren Untersuchungen erfolgte die Analyse der T-Zellen aus SF direkt *ex vivo*, während Elewaut *et al.* [136] die Synovialzellen vor der Analyse der *Homing*marker mittels IL-2 expandierten, was mit einer Induktion beziehungsweise Reexpression von β_7 einhergehen kann.

In der Analyse der β_7^+ T_{EM}-Zellen im Blut fiel eine niedrigere Frequenz der Zellen bei RA-Patienten gegenüber den Kontrollen auf. Eine verminderte Frequenz kann theoretisch durch verminderte Induktion oder durch erhöhte Abwanderung erklärt werden. So wurde in Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe auch bei Patienten mit intestinaler Entzündung, d.h. mit Morbus Crohn, eine verminderte Frequenz von β_7^+ T_{EM}-Zellen im Blut gefunden. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Frequenz zirkulierender Zellen tatsächlich aufgrund von Akkumulation im Darm abnimmt. Bei RA-Patienten besteht in der Regel keine intestinale Entzündung, sodass bei dieser Patientengruppe möglicherweise andere Ursachen verantwortlich sind, wie beispielsweise die Expansion pathogener T-Zellen auf Kosten physiologischer Populationen.

4.2.2 Expression hautspezifischer *Homing*rezeptoren auf CD4⁺ T-Zellen im Blut und SF bei Patienten mit SpA und RA

Des Weiteren wurde der *Homing*marker CLA untersucht. Es handelt sich dabei um einen Selektin-Ligand, der den initialen Kontakt von T-Zellen mit der Gefäßwand der Haut und somit das Rollen ermöglicht [137, 138]. CLA wird im Rahmen akuter Entzündungen auf CD4⁺ T-Zellen hochreguliert und vermittelt die Einwanderung in akut entzündete Gewebe. Daneben wird CLA auch eine wesentliche Rolle für das *Homing* von T-Zellen in die Haut zugeschrieben. Zudem wird das Molekül in hautassoziierten Lymphknoten induziert.

Die Frequenz der CLA⁺ T-Zellen innerhalb der CD4⁺CD45RA⁻ Zellen im Blut lag bei ca. 10% und war bei allen untersuchten Patientengruppen und Kontrollen gleich. Auch innerhalb der PsA-Patientengruppe war der Anteil der CLA⁺ T-Zellen im Blut konstant. Eine andere Arbeitsgruppe konnte in diesem Zusammenhang zeigen, dass die Frequenz der CLA⁺ T-Zellen bei Patienten mit Psoriasis invers mit der Krankheitsaktivität korreliert und es wurde hier eine Anreicherung CLA-positiver T-Zellen in entzündeter Haut gefunden [139].

Der Anteil CLA⁺ T-Zellen innerhalb der CD4⁺CD45RA⁻ Zellen war mit ca. 15% in der SF etwas höher als im peripheren Blut. Nur bei einzelnen PsA-Patienten fanden sich deutlich höhere Frequenzen in der SF, was darauf hindeutet, dass CLA-positive T-Zellen tatsächlich – möglicherweise vor allem in Phasen erhöhter Entzündungsaktivität – bei PsA effektiv in die SF rekrutiert werden. Obwohl die Expression von Selektin-Liganden auf rezirkulierenden CD4⁺ T-Zellen sehr stabil zu sein scheint [88], wäre auch eine Herunterregulation von Selektin-Liganden auf Zellen, die sich dauerhaft in Entzündungsregionen aufhalten, denkbar.

Die insgesamt eher niedrige Expression von CLA ist umso überraschender, da CLA wie oben erwähnt auch als entzündungsspezifischer *Homing*rezeptor gilt. Somit wäre eine hohe Expression auch bei RA-Patienten zu erwarten gewesen. Es fanden sich jedoch im Blut und im Gelenk keine unterschiedlichen Frequenzen von CLA⁺ Zellen innerhalb der CD4⁺ T-Zellen bei RA-Patienten im Vergleich zu den Kontrollen beziehungsweise AS-Patienten.

4.2.3 Zusammenfassung der Analyse peripherer *Homing*marker auf T-Zellen im entzündeten Gelenk

In der Summe ließen sich somit nur bei ca. 30% der CD4⁺CD45RA⁻ T-Zellen im entzündeten Gelenk periphere *Homing*eigenschaften, d.h. darm- oder haut-beziehungsweise entzündungsspezifische Eigenschaften, nachweisen. Andere Untersuchungen haben höhere Frequenzen bei CD4⁺ T-Zellen, die den Selektin-Liganden exprimieren, in akuten Entzündungsreaktionen gefunden [140]. Die in unserer Studie gemessenen niedrigen Frequenzen könnten im Zusammenhang mit dem eher chronischen Charakter der rheumatischen Gelenkentzündung stehen. Hier ist eine Zunahme residenter T-Zellen oder von T_{CM}-Zellen im Gelenk vorstellbar. Dies müsste durch weitere Untersuchungen, insbesondere Analysen der CCR7-Expression für die Identifikation von T_{CM}-Zellen und CD69-Expression für Identifikation des Anteils geweberesidententer Zellen, geklärt werden. Wie schon erwähnt, ist die Regulation und Adaptation residenter T-Zellsubsets an die chronische Präsenz von Entzündungsmediatoren bislang wenig verstanden und untersucht. Geweberesidenz könnte auch mit einer Herunterregulation von *Homing*molekülen, die initial für die Einwanderung genutzt wurden, assoziiert sein, sodass die fehlende Anreicherung von darmspezifischen T-Zellen zum Zeitpunkt der Analyse mögliche Kreuzspezifitäten zwischen Darm- und Gelenkantigenen nicht vollständig ausschließt.

4.2.4 Anreicherung von CCR5⁺CD4⁺ T-Zellen in der SF in AS-, PsA- und RA-Patienten

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde auch die Expression der Chemokinrezeptoren CCR4 und CCR5 analysiert. Anfangs wurde in der Literatur eine polarisationsabhängige Expression dieser Rezeptoren auf CD4⁺ T-Zellen beschrieben [141]. Demnach wurde davon ausgegangen, dass CCR5 präferenziell auf Th1-Zellen exprimiert wird. CCR4 wurde als Th2-spezifischer Chemokinrezeptor gesehen [142, 143]. Bei Rheumatoider Arthritis [144, 145] und Multipler Sklerose [146] als Th1-gesteuerte Entzündungen wurde eine hohe Expression von CCR5 auf T-Zellen im entzündeten Gewebe gefunden. Im Gegensatz dazu fand sich bei Asthma bronchiale, einer vorwiegend Th2-vermittelten Erkrankung, eine erhöhte Expression von CCR4 [147]. Andere Arbeiten zeigten jedoch eine deutlich breitere, d.h. Th2-unabhängige, Expression von CCR4 auf unterschiedlichen *Subsets* inklusive T_{REG}-Zellen [148, 149].

In der hier durchgeführten Untersuchung konnte für alle untersuchten Patientengruppen ein erhöhter Anteil CCR5⁺CD4⁺ T-Zellen in der SF festgestellt werden. Im Blut fand sich eine Frequenz von ca. 20% CCR5⁺ T-Zellen innerhalb der CD4⁺CD45RA⁻ T-Zellpopulation, während die Frequenz der CCR5⁺CD4⁺ T-Zellen im Gelenk bei 70-80% lag.

Im Unterschied dazu waren CCR4⁺ T-Zellen in der SF nicht wesentlich höher angereichert als im Blut; sowohl im Blut als auch in der SF lag die Frequenz CCR4⁺ T-Zellen bei ca. 40%. Dies entspricht sehr wahrscheinlich nicht dem Anteil von Th2-Zellen. In der SF fand sich eine Erhöhung CCR4⁺CCR5⁺ T-Zellen, was auf eine verstärkte Expression von CCR5 auf den SF-T-Zellen zurückzuführen ist. Die hohe Expression von CCR5 auf den T-Zellen im Gelenk kann durch eine selektive Anreicherung dieser Zellen in der SF bedingt sein, andererseits könnte dies auch auf eine lokale Induktion von CCR5 im entzündlichen Milieu hindeuten.

Studien belegen, dass nicht nur auf Th2-Zellen der Rezeptor CCR4 exprimiert wird, sondern auch auf T_{REG}-Zellen, was deren Migration an den Ort der Entzündung ermöglicht [150]. Ob im Gelenk ein Großteil der T_{REG}-Zellen CCR4 exprimiert, müsste durch weitere Untersuchungen geklärt werden. Um die Polarisationen der T-Zellen gezielt zu untersuchen, wäre die Messung der heute bekannten Transkriptionsfaktoren t-bet, GATA-3 und ROR γ t als Mastertranskriptionsfaktoren der Th1-Zellen, Th2-Zellen

und Th17-Zellen hilfreich, die eine wesentlich genauere Zuordnung zum Polarisationsphänotyp ermöglichen [151].

4.3 Verteilung und Aktivierungszustand von T_{EM}-Zellen und T_{REG}-Zellen im Blut und in der SF bei AS-, PsA- und RA-Patienten

Im Rahmen der Arbeit wurde die Expression von Markern der akuten und chronischen Aktivierung untersucht, um Informationen über das Ausmaß der *in vivo*-Aktivierung der CD4⁺ T-Zellen zu gewinnen. Es galt insbesondere zu klären, ob sich die Krankheitsbilder SpA und RA im Ausmaß akuter und chronischer T-Zellaktivierung unterscheiden. Fokussiert wurde dabei auf T_{EM}-Zellen und T_{REG}-Zellen, deren ausgeglichene Funktion untereinander wesentlich ist für die Kontrolle und Regulation von Immunreaktionen. Zur Identifikation der T_{REG}-Zellen wurde FoxP3 verwendet. Der Transkriptionsfaktor FoxP3 wird selektiv in T_{REG}-Zellen exprimiert [152]. FoxP3 kontrolliert als Mastertranskriptionsfaktor der T_{REG}-Zellen wesentliche Suppressionsfunktionen. So führt die Dysfunktion von FoxP3 zu Autoimmunität, wie zum Beispiel bei der im Menschen sehr selten auftretenden Erkrankung IPEX (*Immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked syndrom*) [153]. CD25 und 4-1BB wurden zur Charakterisierung der *in vivo*-Aktivierung von T_{EM}-Zellen und T_{REG}-Zellen verwendet. Als Marker chronischer Aktivierung wurde PD-1 bestimmt. Zusätzlich erfolgte die Bestimmung des Transkriptionsfaktors Helios, da zu Beginn der Forschungsarbeit von einer Differenzierung nach natürlichen, Helios-negativen, und induzierten regulatorischen T-Zellen ausgegangen wurde, die den angenommenen unterschiedlichen Pathomechanismus von AS (exogene, mukosale Antigene) und RA (endogene Antigene) hätte ergänzend erklären können.

4.3.1 Verteilung und Aktivierungszustand der T_{EM}-Zellen und FoxP3⁺ T_{REG}-Zellen in SF und Blut

Hinsichtlich der Frequenz von Foxp3⁺ innerhalb der CD4⁺ T-Zellen zeigten sich keine Unterschiede im Blut der Untersuchungsgruppen. Auch in der Subanalyse der Frequenz von Foxp3⁺ T-Zellen innerhalb der CD4⁺CD45RA⁻ T-Zellen, die in den Helios-Färbungen analysiert wurde, fanden sich keine Unterschiede in der Frequenz von FoxP3⁺ T-Zellen innerhalb der antigenerfahrenen T-Zell-Population. Die Frequenzen von Foxp3⁺ T-Zellen innerhalb der antigenerfahrenen Population waren hierbei etwas höher als in der Gesamtpopulation der CD4⁺ T-Zellen.

Die Analyse zeigte weiterhin eine Frequenz von 15-20% FoxP3⁺ T-Zellen innerhalb der CD4⁺ T-Zellen in der SF, demgegenüber war die Frequenz im Blut mit 6-7% deutlich niedriger. Ähnliche Ergebnisse fanden sich auch bei Analyse des Anteils FoxP3⁺ T-Zellen innerhalb der CD4⁺CD45RA⁻ T-Zellen. In Übereinstimmung mit anderen Untersuchungen deutet dies darauf hin, dass T_{REG}-Zellen sich in entzündeten Geweben anreichern [154].

Als Marker für akute oder kürzlich erfolgte Aktivierung wurde die Expression von CD25 und 4-1BB analysiert. Beide Marker wurden sowohl auf T_{EM}-Zellen als auch T_{REG}-Zellen bestimmt.

CD25 wurde von 75% der FoxP3⁺ T-Zellen und damit einem Großteil der T_{REG}-Zellen exprimiert. Es fanden sich hier weder Unterschiede in der Expression zwischen Patienten mit AS, PsA, RA und Gesunden noch Unterschiede im Anteil CD25-positiver T-Zellen innerhalb der T_{REG}-Zellen im Blut und in der SF. In einer anderen Studie wurde eine Anreicherung von CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T-Zellen in der SF bei RA-Patienten bei gleichzeitig verminderten Frequenzen von CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T-Zellen im Blut beobachtet [155]. Im Gegensatz dazu fand man in einer weiteren Studie bei der Analyse von CD4⁺CD25⁺ T-Zellen in nicht gepaarten Proben nicht nur eine Anreicherung dieser Zellen in der SF, sondern auch eine erhöhte Frequenz dieser Zellen bei RA-Patienten im Blut gegenüber Kontrollen [115]. In letztgenannter Studie wurde auch ein erhöhter Aktivierungsgrad der T_{REG}-Zellen in der SF im Vergleich zu Blut anhand von Rezeptoren wie CD69 und CTLA-4 nachgewiesen. Außerdem zeigten die aus der SF isolierten T_{REG}-Zellen eine stärkere suppressive Wirkung *in vitro* als Zellen aus dem peripheren Blut, was möglicherweise auf die höhere *in vivo*-Aktivierung zurückzuführen ist. Allerdings zeigten die Effektor-T-Zellen aus der SF eine geringere Antwort auf diese Suppression. In einer weiteren Studie zeigte sich eine besondere Anreicherung von CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T-Zellen in der SF gegenüber Blut bei Patienten mit reaktiver Arthritis, einer weniger chronisch verlaufenden Gelenkentzündung [156], was darauf hindeutet, dass die Chronifizierung zu einer Veränderung des peripheren Infiltrates beiträgt. Grundsätzlich bestätigen die genannten Untersuchungen, die weniger den Anteil der CD25⁺ T-Zellen innerhalb der T_{REG}-Zellen analysierten als die Frequenz der T_{REG}-Zellen, welche zusätzlich zum FoxP3 über CD25 identifiziert wurden, die vorliegenden Forschungsergebnisse insofern, als dass sie ebenfalls eine Anreicherung von T_{REG}-Zellen im Entzündungsgebiet zeigen. In dieser Arbeit war

Innerhalb der FoxP3⁻CD4⁺CD45RA⁻ T-Zellen im Blut der Anteil der CD25⁺ T-Zellen bei ca. 8% in AS-Patienten und Kontrollen und bei PsA und RA mit ca. 12% tendenziell erhöht. Eine ähnliche hohe Frequenz von CD25⁺ non-T_{REG}-Zellen fand sich in der SF. Somit scheint die CD25-Expression auf non-T_{REG}-Zellen möglicherweise kein geeigneter Marker der *in vivo*-Aktivierung von non-T_{REG}-Zellen zu sein.

Der Rezeptor 4-1BB gilt als ein weiterer Aktivierungsmarker. Bei CD4⁺ T-Zellen führt die Ligation über 4-1BB nach Aktivierung zur Proliferation und Differenzierung [157]. Die Induktion von 4-1BB (CD137) erfolgt bei konventionellen T-Zellen, d.h. non-T_{REG}-Zellen, innerhalb der ersten sechs Stunden, während T_{REG}-Zellen 4-1BB erst etwa 24 Stunden nach Aktivierung exprimieren [120]. Eine vorwiegende Expression von 4-1BB auf T_{REG}-Zellen wurde beschrieben. Diese scheint direkt das Suppressionsvermögen von T_{REG}-Zellen zu beeinflussen [158]. So führt die Blockade des Rezeptors in Kombination mit der Blockade von PD-1 zu einer Verstärkung von Effektorzellantworten und damit zu einer effektiveren Rejektion von soliden Tumoren [159].

In Übereinstimmung mit der präferenziellen Expression von 4-1BB auf T_{REG}-Zellen zeigten die hier analysierten Daten eine Expression von nur ca. 1% auf FoxP3-negativen T-Zellen sowohl im Blut als auch in der SF, wobei hier kein Unterschied zwischen den Patientengruppen und Gesunden bestand. Innerhalb der FoxP3⁺CD4⁺ Zellen fand sich ein Anteil 4-1BB⁺ Zellen von ca. 15% im Blut und ca. 25% in der SF. Dies deutet auf eine Aktivierung von T_{REG}-Zellen vorwiegend im Entzündungsgebiet hin, wobei keine Unterschiede zwischen den untersuchten Erkrankungen auszumachen waren.

Die Ergebnisse zeigen, dass weiterführende Assays zur Funktion der Zellen und ihrer Suppressionsfähigkeit, aber auch im Zusammenhang mit anderen beschriebenen Rezeptoren wie CTLA-4 und PD-1 erforderlich sind. Dies könnte klären, ob diese Zellen im entzündeten Gelenkkompartiment die Krankheitsfolgen vermindern oder ob sie teilweise funktionsuntüchtig sind. Die Funktion des 41BB-Rezeptors der TNFR-Familie auf verschiedenen Zellpopulationen wird zwar intensiv untersucht [118, 160], eine direkte *ex vivo*-Analyse in der SF von AS-Patienten findet sich bisher aber nicht in der Literatur.

4.3.2 Expression des Transkriptionsfaktors Helios in FoxP3⁺ T_{REG}-Zellen in SF und Blut bei AS-, PsA- und RA-Patienten

Während die RA als polygenetische, klassische Autoimmunerkrankung angesehen wird, gehen wir bei den SpA davon aus, dass bakterielle Antigene für die Auslösung der Entzündungen von Bedeutung sind. Als relevante Antigene gelten bei der RA Knorpelantigene wie zyklisch citrullinierte Proteine (d.h. Autoantigene), gegen die eine starke Antikörperantwort bei Vorliegen einer RA messbar ist [161]. Bei der AS halten wir den Einfluss vor allem mukosaler Antigene für möglich [18]. Unter dieser Annahme waren die publizierten Versuchsreihen mit der Analyse von Helios als Marker für aus dem Thymus stammende nT_{REG}-Zellen, welche vorwiegend in die Kontrolle von Immunantworten gegen Autoantigene involviert sein sollen, und die dadurch mögliche Abgrenzung zu iT_{REG}-Zellen als Regulatoren weiter untersuchungswürdig [109].

In der hier vorliegenden Arbeit bestätigte sich, dass Helios vor allem von T_{REG}-Zellen exprimiert wird. Es fanden sich jedoch keine Unterschiede in der Frequenz von Helios⁺ T-Zellen innerhalb der Foxp3⁺ T-Zellen – weder in Blut und SF noch zwischen den Krankheitsgruppen AS, PsA und RA. Ca. 40% der FoxP3⁺ T-Zellen im Blut und ca. 50% der FoxP3⁺ T-Zellen in der SF exprimierten Helios.

Die hier präsentierten Daten zeigen ebenso wie andere aktuelle Erkenntnisse zur Heliosexpression die Komplexität des Forschungsfeldes und die Notwendigkeit weiterer Analysen auf. Untersuchungen von Mäusen mit genetischer Deletion von Helios belegen beispielsweise, dass ein Fehlen von Helios kaum Einfluss auf die Entwicklung und die Funktion von konventionellen T-Zellen hat [162]. Zudem wurde gezeigt, dass Helios an den *Promoter* von FoxP3 bindet und sowohl dessen Expression als auch die suppressive Funktion von T_{REG}-Zellen fördert [163]. Auf weitere funktionelle Analysen bezogen scheint die Funktion der nT_{REG}-Zellen mit oder ohne die Expression von Helios allerdings ähnlich zu sein [164]. Darüber hinaus konnte aber ebenso gezeigt werden, dass Helios auch nach Induktion *in vitro* von iT_{REG}-Zellen exprimiert wird [165]. Obwohl sich in den hier untersuchten Erkrankungen kein Unterschied in der Frequenz der Helios⁺ T_{REG}-Zellen fand und die Differenzierungsmöglichkeit zwischen nT_{REG}- und iT_{REG}-Zellen offenbar nicht gegeben ist, erscheint die Funktion von Helios im Krankheitszusammenhang mit den zunehmenden Erkenntnissen weiter analysenswert.

4.3.3 Erhöhte PD-1-Expression innerhalb der CD4⁺CD45RA⁻FoxP3⁺ T-Zellen und der CD4⁺CD45RA⁻FoxP3⁻ T-Zellen als Hinweis auf chronische Aktivierung und T-Zellerschöpfung

Neben den T_{REG}-Zellen existiert mit dem Molekül PD-1 und seinen Liganden ein weiterer Mechanismus zur Kontrolle chronischer Entzündungsreaktionen, eine Defizienz in diesem System kann Autoimmunität erzeugen [122]. PD-1 und seine beiden bekannten Liganden PD-L1 und PD-L2 vermitteln dabei eine Inhibition bestimmter Zellfunktionen bei persistierender Stimulation durch ein Antigen, beispielsweise durch ein Autoantigen, oder bei chronischen Infektionen [166]. Besonders im Zusammenhang mit chronischen Virusinfektionen wird – ausgelöst durch die ständige Konfrontation mit dem Antigen, welches nicht eliminiert werden kann – eine Population PD-1⁺ T-Zellen induziert. Funktionell wird eine verminderte Stimulierbarkeit des T-Zellrezeptors beschrieben, welche durch Blockade der PD-1/PD-L-Interaktion wiederhergestellt werden kann [167]. T-Zellerschöpfung ist somit ein Phänomen von T-Effektorzellen, in denen die repetitive TZR-Aktivierung intrazelluläre Mechanismen anstößt, die zur dauerhaften Expression von PD-1 und der Hemmung von Effektorfunktionen führen. Gleichzeitig spielt der Rezeptor auch für die Induktion von induzierten T_{REG}-Zellen aus naiven T-Zellen eine Rolle. So wurde etwa gezeigt, dass die Expression von PD-L1 auf APZ und unterschiedliche Zytokinkombinationen die Konversion von naiven T-Zellen in iT_{REG}-Zellen stimulieren [126].

Um Informationen zur chronischen Aktivierung der CD4⁺ T-Zellen im entzündeten Gelenk und im Blut von Patienten mit AS, PsA und RA zu gewinnen, wurde in der vorliegenden Untersuchung der Anteil von PD-1⁺ T-Zellen auf konventionellen T_{EM}- und auf T_{REG}-Zellen bestimmt. Die Analyse ergab innerhalb der CD4⁺CD45RA⁻FoxP3⁻ T-Zellen und innerhalb der CD4⁺CD45RA⁻FoxP3⁺ T-Zellen im Blut bei RA-Patienten eine erhöhte Frequenz von PD-1⁺ Zellen gegenüber AS-Patienten und Kontrollen. Dabei war die Expression in den CD4⁺CD45RA⁻FoxP3⁻ T-Zellen höher. Deutlich höhere Frequenzen PD1-positiver Zellen fanden sich innerhalb der CD4⁺CD45RA⁻FoxP3⁻ T-Zellen in der SF. Die höchsten Frequenzen von PD-1⁺ T-Zellen auf T_{EM}-Zellen konnten bei RA-Patienten festgestellt werden.

PD-1 ließ sich somit sowohl in T_{EM} als auch in T_{REG}-Zellen nachweisen, was auf komplexe Wechselwirkungen mit unterschiedlichen Rezeptorfunktionen bei den T-Zellsubsets hindeutet und möglicherweise Einfluss auf das Krankheitsgeschehen hat.

Auch Hatachi *et al.* fanden in einer Untersuchung von SF bei RA und Oseoarthritis eine Expression von PD-1 hauptsächlich auf T-Zellen von RA-Patienten [168]. Diese Studie erkennt zudem eine Korrelation zwischen der Höhe der PD-1-Frequenz und einem hohen Aktivitätsscore nach Larsen, aber keinen Zusammenhang mit Laborparametern wie CRP und dem RF. Auch in einer Studie mit PsA-Patienten wurde ein Zusammenhang zwischen der Frequenz PD-1-positiver Zellen und der Krankheitsaktivität gefunden [169]. Demnach scheint PD-1 als klinischer Marker bedeutsam zu sein. Für die PsA ließ sich dies in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigen. Diese Abweichung ist möglicherweise mit einer unterschiedlichen methodischen Vorgehensweise zu erklären, da Hatachi *et al.* zum einen die gesamte Population der T-Zellen ohne weitere Diskriminierung in *Subsets* untersuchten und die Patienten zum anderen vor Beginn einer medikamentösen Behandlung analysiert wurden. Der in der vorliegenden Studie nachgewiesene Unterschied in der Expression von PD-1 zwischen RA- und SpA-Patienten – die höhere Expression von PD-1 auf den T-Zellen von RA – unterstreicht die Annahme einer Expansion von Gedächtniszellen und deutet auf eine stärkere chronische T-Zellaktivierung bei RA hin. Der höhere Anteil PD-1-positiver Zellen in der SF ist vor allem ein Hinweis auf eine starke lokale chronische Aktivierung der T-Zellen, sowohl bei RA- als auch bei AS-Patienten.

Die hier vorliegenden Untersuchungsergebnisse zeigen die Notwendigkeit weiterführender Untersuchungen zum funktionellen Zusammenspiel der T-Zell*subsets* durch PD-1. Insbesondere wären Versuche mit *gesorteten* PD-1⁺ T-Zellen vom Entzündungsgebiet aufschlussreich, um beispielsweise zu klären, ob das Zytokinmilieu oder eine wiederholte Stimulation diese Expression hervorruft. Erste Versuche zur Zytokinsekretion wurden in unserer Arbeitsgruppe begonnen, müssen aber noch fortgeführt werden, um valide Aussagen treffen zu können. Sowohl die erhöhte Expression von 4-1BB auf T_{REG}-Zellen als auch die erhöhte Expression von PD-1 bei RA könnten als Zeichen einer chronischen Aktivierung gewertet werden.

4.4 Proinflammatorische Zytokinsekretion bei CD4⁺ T-Zellen in Abhängigkeit von der PD-1-Expression

PD-1 als Marker für T-Zellerschöpfung kann durch chronische TZR-Stimulation induziert werden [170]. Auch chronische Zytokinstimulation, wie zum Beispiel mit den für das Überleben und die Proliferation von T_{EM}-Zellen nötigen Zytokinen IL-2, IL-7, IL-15 und IL-21, kann eine Induktion bewirken [171]. Der Ligand PD-L1 wird durch Interferone und TNF α auf T- und B-Zellen, dem Endothel und Epithelzellen induziert [129], während Interferone, IL-4 und GM-CSF die Expression von PD-L2 auf DZ stimulieren [171]. Eine Ligation von PD-1 während der TZR-Stimulation führt zu geringerer Proliferation und Zytokinproduktion der T-Zellen als eine TZR-Stimulation ohne PD1-Ligation [172]. Dies wird vor allem nach niedrigschwelliger TZR-Stimulation beobachtet. Sowohl CD28-Kostimulation als auch IL-2 können diesen Block aufheben [173, 174]. Die vorliegende Studie untersuchte, inwiefern Aktivierung und Zytokinproduktion von T-Zellen aus der SF tatsächlich durch PD-1 beeinflusst werden. Dafür wurden SFMNC sowohl mit PMA/Ionomycin als einer TZR-unabhängigen Stimulation als auch mit α CD3/28, also TZR-abhängig, aktiviert. Eine Induktion von CD154 ließ sich sowohl nach Stimulation mit PMA/Ionomycin als auch mit α CD3/ α CD28 beobachten. Zellen, die PD-1 exprimierten, zeigten jedoch eine geringe Produktion von IFN γ nach α CD3/ α CD28-Stimulation. Dieser Effekt ließ sich nicht in der TZR-unabhängigen Stimulation nachweisen. Dies deutet auf eine funktionelle Wirksamkeit des PD-1-PDL1-Systems für die antigenspezifische Aktivierung der CD4⁺ T-Zellen in der SF hin und könnte überdies ein Hinweis auf die Bedeutung dieses Mechanismus für die Adaptation an eine dauerhafte Antigenstimulation sein. Dieser Mechanismus scheint auch für die SpA relevant zu sein, da auch hier die Frequenzen der PD-1⁺ T-Zellen in der SF höher waren als im Blut. Zukünftige Untersuchungen mit blockierenden Antikörpern müssten prüfen, ob die Blockade der PD1-PDL1-Interaktion die Effektorzytokinproduktion nach antigenabhängiger Stimulation tatsächlich wieder normalisiert.

5. Referenzen

1. Braun J and Sieper J, *Ankylosing spondylitis*. Lancet, 2007. **369**(9570): p. 1379-90.
2. Feldtkeller E, Khan MA, van der Heijde D, van der Linden S, Braun J, *Age at disease onset and diagnosis delay in HLA-B27 negative vs. positive patients with ankylosing spondylitis*. Rheumatol Int, 2003. **23**(2): p. 61-6.
3. Saraux A, Guedes C, Allain J, Devauchelle V, Valls I, Lamour A, Guillemin F, Youinou P, Le Goff P, *Prevalence of rheumatoid arthritis and spondyloarthropathy in Brittany, France. Societe de Rhumatologie de l'Ouest*. J Rheumatol, 1999. **26**(12): p. 2622-7.
4. Wanders A, Landewe R, Dougados M, Mielants H, van der Linden S, van der Heijde D, *Association between radiographic damage of the spine and spinal mobility for individual patients with ankylosing spondylitis: can assessment of spinal mobility be a proxy for radiographic evaluation?* Ann Rheum Dis, 2005. **64**(7): p. 988-94.
5. McGonagle D, Gibbon W, Emery P, *Classification of inflammatory arthritis by enthesitis*. Lancet, 1998. **352**(9134): p. 1137-40.
6. Brewerton DA, Hart FD, Nicholls A, Caffrey M, James DC, Sturrock RD, *Ankylosing spondylitis and HL-A 27*. Lancet, 1973. **1**(7809): p. 904-7.
7. McHugh K and Bowness P, *The link between HLA-B27 and SpA--new ideas on an old problem*. Rheumatology (Oxford), 2012. **51**(9): p. 1529-39.
8. Fiorillo MT, Meadows L, D'Amato M, Shabanowitz J, Hunt DF, Appella E, Sorrentino R, *Susceptibility to ankylosing spondylitis correlates with the C-terminal residue of peptides presented by various HLA-B27 subtypes*. Eur J Immunol, 1997. **27**(2): p. 368-73.
9. Colbert RA, Tran TM, Layh-Schmitt G, *HLA-B27 misfolding and ankylosing spondylitis*. Mol Immunol, 2014. **57**(1): p. 44-51.
10. Granfors K, Jalkanen S, von Essen R, Lahesmaa-Rantala R, Isomaki O, Pekkola-Heino K, Merilahti-Palo R, Saario R, Isomaki H, Toivanen A, *Yersinia antigens in synovial-fluid cells from patients with reactive arthritis*. N Engl J Med, 1989. **320**(4): p. 216-21.
11. Leirisalo-Repo M, Helenius P, Hannu T, Lehtinen A, Kreula J, Taavitsainen M, Koskimies S, *Long-term prognosis of reactive salmonella arthritis*. Ann Rheum Dis, 1997. **56**(9): p. 516-20.
12. Stolwijk C, van Tubergen A, Castillo-Ortiz JD, Boonen A, *Prevalence of extra-articular manifestations in patients with ankylosing spondylitis: a systematic review and meta-analysis*. Ann Rheum Dis, 2015. **74**(1): p. 65-73.

13. Purrmann J, Bertrams J, Munch H, Zeidler H, Juli E, Reis HE, Strohmeyer G, *[HLA association of seronegative spondylarthritis in patients with Crohn disease]*. Med Klin (Munich), 1987. **82**(17): p. 560-3.
14. De Vos M, Cuvelier C, Mielants H, Veys E, Barbier F, Elewaut A, *Ileocolonoscopy in seronegative spondylarthropathy*. Gastroenterology, 1989. **96**(2 Pt 1): p. 339-44.
15. Mielants H, De Keyser F, Baeten D, Van den Bosch F, *Gut inflammation in the spondyloarthropathies*. Curr Rheumatol Rep, 2005. **7**(3): p. 188-94.
16. Braun J, Tuszewski M, Ehlers S, Haberle J, Bollow M, Eggens U, Distler A, Sieper J, *Nested polymerase chain reaction strategy simultaneously targeting DNA sequences of multiple bacterial species in inflammatory joint diseases. II. Examination of sacroiliac and knee joint biopsies of patients with spondyloarthropathies and other arthritides*. J Rheumatol, 1997. **24**(6): p. 1101-5.
17. Zou J, Zhang Y, Thiel A, Rudwaleit M, Shi SL, Radbruch A, Poole R, Braun J, Sieper J, *Predominant cellular immune response to the cartilage autoantigenic G1 aggrecan in ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis*. Rheumatology (Oxford), 2003. **42**(7): p. 846-55.
18. Syrbe U, Scheer R, Wu P, Sieper J, *Differential synovial Th1 cell reactivity towards Escherichia coli antigens in patients with ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis, 2012. **71**(9): p. 1573-6.
19. Taurog JD, Richardson JA, Croft JT, Simmons WA, Zhou M, Fernandez-Sueiro JL, Balish E, Hammer RE, *The germfree state prevents development of gut and joint inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rats*. J Exp Med, 1994. **180**(6): p. 2359-64.
20. Onderdonk AB, Richardson JA, Hammer RE, Taurog JD, *Correlation of cecal microflora of HLA-B27 transgenic rats with inflammatory bowel disease*. Infect Immun, 1998. **66**(12): p. 6022-3.
21. Rudwaleit M, Metter A, Listing J, Sieper J, Braun J, *Inflammatory back pain in ankylosing spondylitis: a reassessment of the clinical history for application as classification and diagnostic criteria*. Arthritis Rheum, 2006. **54**(2): p. 569-78.
22. Spoorenberg A, van der Heijde D, de Klerk E, Dougados M, de Vlam K, Mielants H, van der Tempel H, van der Linden S, *Relative value of erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein in assessment of disease activity in ankylosing spondylitis*. J Rheumatol, 1999. **26**(4): p. 980-4.
23. van der Linden S, Valkenburg HA, Cats A, *Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis. A proposal for modification of the New York criteria*. Arthritis Rheum, 1984. **27**(4): p. 361-8.
24. Braun J, Baraliakos X, Golder W, Hermann KG, Listing J, Brandt J, Rudwaleit M, Zuehlendorf S, Bollow M, Sieper J, van der Heijde D, *Analysing chronic spinal changes in ankylosing spondylitis: a systematic comparison of conventional x rays with magnetic resonance imaging using established and new scoring systems*. Ann Rheum Dis, 2004. **63**(9): p. 1046-55.

25. Braun J, Bollow M, Sieper J, *Radiologic diagnosis and pathology of the spondyloarthropathies*. Rheum Dis Clin North Am, 1998. **24**(4): p. 697-735.
26. Rudwaleit M, *New approaches to diagnosis and classification of axial and peripheral spondyloarthritis*. Curr Opin Rheumatol, 2010. **22**(4): p. 375-80.
27. Zochling J, van der Heijde D, Burgos-Vargas R, Collantes E, Davis JC, Jr., Dijkmans B, Dougados M, Geher P, Inman RD, Khan MA, Kvien TK, Leirisalo-Repo M, Olivieri I, Pavelka K, Sieper J, Stucki G, Sturrock RD, van der Linden S, Wendling D, Bohm H, van Royen BJ, Braun J, *ASAS/EULAR recommendations for the management of ankylosing spondylitis*. Ann Rheum Dis, 2006. **65**(4): p. 442-52.
28. Sieper J, *Treatment challenges in axial spondylarthritis and future directions*. Curr Rheumatol Rep, 2013. **15**(9): p. 356.
29. Heiberg MS, Nordvag BY, Mikkelsen K, Rodevand E, Kaufmann C, Mowinckel P, Kvien TK, *The comparative effectiveness of tumor necrosis factor-blocking agents in patients with rheumatoid arthritis and patients with ankylosing spondylitis: a six-month, longitudinal, observational, multicenter study*. Arthritis Rheum, 2005. **52**(8): p. 2506-12.
30. Haibel H and Sieper J, *Use of methotrexate in patients with ankylosing spondylitis*. Clin Exp Rheumatol, 2010. **28**(5 Suppl 61): p. S128-31.
31. Chen J and Liu C, *Methotrexate for ankylosing spondylitis*. Cochrane Database Syst Rev, 2004(3): p. CD004524.
32. Finzel S and Englbrecht M, *[Psoriatic arthritis - a permanent challenge for rheumatologists and patients: part 2: imaging diagnostics, classification and therapy]*. Z Rheumatol, 2011. **70**(9): p. 775-89.
33. Finzel S and Englbrecht M, *[Psoriatic arthritis : a permanent challenge for rheumatologists and patients--Part 1: epidemiology, pathogenesis and clinical course]*. Z Rheumatol, 2011. **70**(8): p. 685-97.
34. Griffiths CE and Barker JN, *Pathogenesis and clinical features of psoriasis*. Lancet, 2007. **370**(9583): p. 263-71.
35. Menter A and Griffiths CE, *Current and future management of psoriasis*. Lancet, 2007. **370**(9583): p. 272-84.
36. Reich K, Kruger K, Mossner R, Augustin M, *Epidemiology and clinical pattern of psoriatic arthritis in Germany: a prospective interdisciplinary epidemiological study of 1511 patients with plaque-type psoriasis*. Br J Dermatol, 2009. **160**(5): p. 1040-7.
37. Gladman DD, Anhorn KA, Schachter RK, Mervart H, *HLA antigens in psoriatic arthritis*. J Rheumatol, 1986. **13**(3): p. 586-92.
38. Taylor W, Gladman D, Helliwell P, Marchesoni A, Mease P, Mielants H, *Classification criteria for psoriatic arthritis: development of new criteria from a large international study*. Arthritis Rheum, 2006. **54**(8): p. 2665-73.

39. Kavanaugh AF and Ritchlin CT, *Systematic review of treatments for psoriatic arthritis: an evidence based approach and basis for treatment guidelines*. J Rheumatol, 2006. **33**(7): p. 1417-21.
40. Wahle M, [*Rheumatoid arthritis*]. Dtsch Med Wochenschr, 2009. **134**(36): p. 1745-54.
41. Scott DL, Wolfe F, Huizinga TW, *Rheumatoid arthritis*. Lancet, 2010. **376**(9746): p. 1094-108.
42. Kirwan JR, *Links between radiological change, disability, and pathology in rheumatoid arthritis*. J Rheumatol, 2001. **28**(4): p. 881-6.
43. Symmons DP, *Looking back: rheumatoid arthritis--aetiology, occurrence and mortality*. Rheumatology (Oxford), 2005. **44 Suppl 4**: p. iv14-iv17.
44. Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ, *The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 1987. **30**(11): p. 1205-13.
45. Carlens C, Hergens MP, Grunewald J, Ekblom A, Eklund A, Hoglund CO, Askling J, *Smoking, use of moist snuff, and risk of chronic inflammatory diseases*. Am J Respir Crit Care Med, 2010. **181**(11): p. 1217-22.
46. Choy EH and Panayi GS, *Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis*. N Engl J Med, 2001. **344**(12): p. 907-16.
47. Vital EM and Emery P, *The development of targeted therapies in rheumatoid arthritis*. J Autoimmun, 2008. **31**(3): p. 219-27.
48. Bax M, Huizinga TW, Toes RE, *The pathogenic potential of autoreactive antibodies in rheumatoid arthritis*. Semin Immunopathol, 2014. **36**(3): p. 313-25.
49. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS, et al., *The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 1988. **31**(3): p. 315-24.
50. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, 3rd, Birnbaum NS, Burmester GR, Bykerk VP, Cohen MD, Combe B, Costenbader KH, Dougados M, Emery P, Ferraccioli G, Hazes JM, Hobbs K, Huizinga TW, Kavanaugh A, Kay J, Kvien TK, Laing T, Mease P, Menard HA, Moreland LW, Naden RL, Pincus T, Smolen JS, Stanislawska-Biernat E, Symmons D, Tak PP, Upchurch KS, Vencovsky J, Wolfe F, Hawker G, *2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative*. Arthritis Rheum, 2010. **62**(9): p. 2569-81.
51. Goekoop-Ruiterman YP, de Vries-Bouwstra JK, Allaart CF, van Zeben D, Kerstens PJ, Hazes JM, Zwinderman AH, Ronday HK, Han KH, Westedt ML, Gerards AH, van Groenendaal JH, Lems WF, van Krugten MV, Breedveld FC, Dijkmans BA, *Clinical and radiographic outcomes of four different treatment strategies in patients with*

- early rheumatoid arthritis (the BeSt study): a randomized, controlled trial.* Arthritis Rheum, 2005. **52**(11): p. 3381-90.
52. Keystone EC, Smolen J, van Riel P, *Developing an effective treatment algorithm for rheumatoid arthritis.* Rheumatology (Oxford), 2012. **51 Suppl 5**: p. v48-54.
53. Prevoo ML, van 't Hof MA, Kuper HH, van Leeuwen MA, van de Putte LB, van Riel PL, *Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis.* Arthritis Rheum, 1995. **38**(1): p. 44-8.
54. Chaplin DD, *Overview of the immune response.* J Allergy Clin Immunol, 2010. **125**(2 Suppl 2): p. S3-23.
55. Murphy KP, Mowat A, Janeway C, *Janeway's immunobiology.* 8. ed2012, London u.a.: Garland Science. XIX, 868 S.
56. Bonilla FA and Oettgen HC, *Adaptive immunity.* J Allergy Clin Immunol, 2010. **125**(2 Suppl 2): p. S33-40.
57. Ohkura N, Kitagawa Y, Sakaguchi S, *Development and maintenance of regulatory T cells.* Immunity, 2013. **38**(3): p. 414-23.
58. Parkin J and Cohen B, *An overview of the immune system.* Lancet, 2001. **357**(9270): p. 1777-89.
59. Takahama Y, *Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection.* Nat Rev Immunol, 2006. **6**(2): p. 127-35.
60. den Haan JM, Arens R, van Zelm MC, *The activation of the adaptive immune system: Cross-talk between antigen-presenting cells, T cells and B cells.* Immunol Lett, 2014. **162**(2PB): p. 103-112.
61. Akbar AN, Terry L, Timms A, Beverley PC, Janossy G, *Loss of CD45R and gain of UCHL1 reactivity is a feature of primed T cells.* J Immunol, 1988. **140**(7): p. 2171-8.
62. von Andrian UH and Mempel TR, *Homing and cellular traffic in lymph nodes.* Nat Rev Immunol, 2003. **3**(11): p. 867-78.
63. Butcher EC, *Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity.* Cell, 1991. **67**(6): p. 1033-6.
64. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S, *Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated.* Nat Rev Immunol, 2007. **7**(9): p. 678-89.
65. Fuhlbrigge RC, Kieffer JD, Armerding D, Kupper TS, *Cutaneous lymphocyte antigen is a specialized form of PSGL-1 expressed on skin-homing T cells.* Nature, 1997. **389**(6654): p. 978-81.
66. Stein JV and Nombela-Arrieta C, *Chemokine control of lymphocyte trafficking: a general overview.* Immunology, 2005. **116**(1): p. 1-12.

67. Berlin C, Bargatze RF, Campbell JJ, von Andrian UH, Szabo MC, Hasslen SR, Nelson RD, Berg EL, Erlandsen SL, Butcher EC, *alpha 4 integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow*. Cell, 1995. **80**(3): p. 413-22.
68. Sigal A, Bleijs DA, Grabovsky V, van Vliet SJ, Dwir O, Figdor CG, van Kooyk Y, Alon R, *The LFA-1 integrin supports rolling adhesions on ICAM-1 under physiological shear flow in a permissive cellular environment*. J Immunol, 2000. **165**(1): p. 442-52.
69. Marelli-Berg FM, Cannella L, Dazzi F, Mirenda V, *The highway code of T cell trafficking*. J Pathol, 2008. **214**(2): p. 179-89.
70. Marelli-Berg FM, Fu H, Vianello F, Tokoyoda K, Hamann A, *Memory T-cell trafficking: new directions for busy commuters*. Immunology, 2010. **130**(2): p. 158-65.
71. Hamann A, *How T cells find their way around*. Methods Mol Biol, 2010. **616**: p. 3-13.
72. Wagner N, Lohler J, Kunkel EJ, Ley K, Leung E, Krissansen G, Rajewsky K, Muller W, *Critical role for beta7 integrins in formation of the gut-associated lymphoid tissue*. Nature, 1996. **382**(6589): p. 366-70.
73. Picker LJ, Kishimoto TK, Smith CW, Warnock RA, Butcher EC, *ELAM-1 is an adhesion molecule for skin-homing T cells*. Nature, 1991. **349**(6312): p. 796-9.
74. Campbell JJ, Haraldsen G, Pan J, Rottman J, Qin S, Ponath P, Andrew DP, Warnke R, Ruffing N, Kassam N, Wu L, Butcher EC, *The chemokine receptor CCR4 in vascular recognition by cutaneous but not intestinal memory T cells*. Nature, 1999. **400**(6746): p. 776-80.
75. Reiss Y, Proudfoot AE, Power CA, Campbell JJ, Butcher EC, *CC chemokine receptor (CCR)4 and the CCR10 ligand cutaneous T cell-attracting chemokine (CTACK) in lymphocyte trafficking to inflamed skin*. J Exp Med, 2001. **194**(10): p. 1541-7.
76. Nakache M, Berg EL, Streeter PR, Butcher EC, *The mucosal vascular addressin is a tissue-specific endothelial cell adhesion molecule for circulating lymphocytes*. Nature, 1989. **337**(6203): p. 179-81.
77. Zabel BA, Agace WW, Campbell JJ, Heath HM, Parent D, Roberts AI, Ebert EC, Kassam N, Qin S, Zovko M, LaRosa GJ, Yang LL, Soler D, Butcher EC, Ponath PD, Parker CM, Andrew DP, *Human G protein-coupled receptor GPR-9-6/CC chemokine receptor 9 is selectively expressed on intestinal homing T lymphocytes, mucosal lymphocytes, and thymocytes and is required for thymus-expressed chemokine-mediated chemotaxis*. J Exp Med, 1999. **190**(9): p. 1241-56.
78. Lefrancois L, Parker CM, Olson S, Muller W, Wagner N, Schon MP, Puddington L, *The role of beta7 integrins in CD8 T cell trafficking during an antiviral immune response*. J Exp Med, 1999. **189**(10): p. 1631-8.
79. Svensson M, Marsal J, Ericsson A, Carramolino L, Broden T, Marquez G, Agace WW, *CCL25 mediates the localization of recently activated CD8alpha beta(+) lymphocytes to the small-intestinal mucosa*. J Clin Invest, 2002. **110**(8): p. 1113-21.

80. Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A, *Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions*. Nature, 1999. **401**(6754): p. 708-12.
81. Lanzavecchia A and Sallusto F, *Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors, and memory cells*. Science, 2000. **290**(5489): p. 92-7.
82. Weninger W, Crowley MA, Manjunath N, von Andrian UH, *Migratory properties of naive, effector, and memory CD8(+) T cells*. J Exp Med, 2001. **194**(7): p. 953-66.
83. Campbell JJ, Murphy KE, Kunkel EJ, Brightling CE, Soler D, Shen Z, Boisvert J, Greenberg HB, Vierra MA, Goodman SB, Genovese MC, Wardlaw AJ, Butcher EC, Wu L, *CCR7 expression and memory T cell diversity in humans*. J Immunol, 2001. **166**(2): p. 877-84.
84. Masopust D, Vezys V, Marzo AL, Lefrancois L, *Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue*. Science, 2001. **291**(5512): p. 2413-7.
85. Sigmundsdottir H and Butcher EC, *Environmental cues, dendritic cells and the programming of tissue-selective lymphocyte trafficking*. Nat Immunol, 2008. **9**(9): p. 981-7.
86. Iwata M, Hirakiyama A, Eshima Y, Kagechika H, Kato C, Song SY, *Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells*. Immunity, 2004. **21**(4): p. 527-38.
87. Sigmundsdottir H, Pan J, Debes GF, Alt C, Habtezion A, Soler D, Butcher EC, *DCs metabolize sunlight-induced vitamin D3 to 'program' T cell attraction to the epidermal chemokine CCL27*. Nat Immunol, 2007. **8**(3): p. 285-93.
88. Jennrich S, Ratsch BA, Hamann A, Syrbe U, *Long-term commitment to inflammation-seeking homing in CD4+ effector cells*. J Immunol, 2007. **178**(12): p. 8073-80.
89. Mosmann TR and Coffman RL, *TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties*. Annu Rev Immunol, 1989. **7**: p. 145-73.
90. Geginat J, Paroni M, Facciotti F, Gruarin P, Kastirr I, Caprioli F, Pagani M, Abrignani S, *The CD4-centered universe of human T cell subsets*. Semin Immunol, 2013. **25**(4): p. 252-62.
91. Jager A and Kuchroo VK, *Effector and regulatory T-cell subsets in autoimmunity and tissue inflammation*. Scand J Immunol, 2010. **72**(3): p. 173-84.
92. Maniati E, Soper R, Hagemann T, *Up for Mischief? IL-17/Th17 in the tumour microenvironment*. Oncogene, 2010. **29**(42): p. 5653-62.
93. Werlen G, Hausmann B, Naeher D, Palmer E, *Signaling life and death in the thymus: timing is everything*. Science, 2003. **299**(5614): p. 1859-63.
94. Danke NA, Koelle DM, Yee C, Beheray S, Kwok WW, *Autoreactive T cells in healthy individuals*. J Immunol, 2004. **172**(10): p. 5967-72.

95. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M, *Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases*. J Immunol, 1995. **155**(3): p. 1151-64.
96. Shevach EM, *From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells*. Immunity, 2006. **25**(2): p. 195-201.
97. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M, *Regulatory T cells and immune tolerance*. Cell, 2008. **133**(5): p. 775-87.
98. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S, *Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3*. Science, 2003. **299**(5609): p. 1057-61.
99. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY, *Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells*. Nat Immunol, 2003. **4**(4): p. 330-6.
100. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM, *Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3*. J Exp Med, 2003. **198**(12): p. 1875-86.
101. Ohkura N, Hamaguchi M, Morikawa H, Sugimura K, Tanaka A, Ito Y, Osaki M, Tanaka Y, Yamashita R, Nakano N, Huehn J, Fehling HJ, Sparwasser T, Nakai K, Sakaguchi S, *T cell receptor stimulation-induced epigenetic changes and Foxp3 expression are independent and complementary events required for Treg cell development*. Immunity, 2012. **37**(5): p. 785-99.
102. Polansky JK, Schreiber L, Thelemann C, Ludwig L, Kruger M, Baumgrass R, Cording S, Floess S, Hamann A, Huehn J, *Methylation matters: binding of Ets-1 to the demethylated Foxp3 gene contributes to the stabilization of Foxp3 expression in regulatory T cells*. J Mol Med (Berl), 2010. **88**(10): p. 1029-40.
103. Polansky JK, Kretschmer K, Freyer J, Floess S, Garbe A, Baron U, Olek S, Hamann A, von Boehmer H, Huehn J, *DNA methylation controls Foxp3 gene expression*. Eur J Immunol, 2008. **38**(6): p. 1654-63.
104. Cools N, Ponsaerts P, Van Tendeloo VF, Berneman ZN, *Regulatory T cells and human disease*. Clin Dev Immunol, 2007. **2007**: p. 89195.
105. Suci-Foca N, Manavalan JS, Cortesini R, *Generation and function of antigen-specific suppressor and regulatory T cells*. Transpl Immunol, 2003. **11**(3-4): p. 235-44.
106. Battaglia M, Gregori S, Bacchetta R, Roncarolo MG, *Tr1 cells: from discovery to their clinical application*. Semin Immunol, 2006. **18**(2): p. 120-7.
107. Miller A, Lider O, Roberts AB, Sporn MB, Weiner HL, *Suppressor T cells generated by oral tolerization to myelin basic protein suppress both in vitro and in vivo immune responses by the release of transforming growth factor beta after antigen-specific triggering*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(1): p. 421-5.
108. Weiner HL, da Cunha AP, Quintana F, Wu H, *Oral tolerance*. Immunol Rev, 2011. **241**(1): p. 241-59.

109. Thornton AM, Korty PE, Tran DQ, Wohlfert EA, Murray PE, Belkaid Y, Shevach EM, *Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells*. J Immunol, 2010. **184**(7): p. 3433-41.
110. de la Rosa M, Rutz S, Dorninger H, Scheffold A, *Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function*. Eur J Immunol, 2004. **34**(9): p. 2480-8.
111. Annunziato F, Cosmi L, Liotta F, Lazzeri E, Manetti R, Vanini V, Romagnani P, Maggi E, Romagnani S, *Phenotype, localization, and mechanism of suppression of CD4(+)CD25(+) human thymocytes*. J Exp Med, 2002. **196**(3): p. 379-87.
112. Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T, Miyara M, Fehervari Z, Nomura T, Sakaguchi S, *CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function*. Science, 2008. **322**(5899): p. 271-5.
113. Sansom DM and Walker LS, *The role of CD28 and cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) in regulatory T-cell biology*. Immunol Rev, 2006. **212**: p. 131-48.
114. Anderson AE and Isaacs JD, *Tregs and rheumatoid arthritis*. Acta Reumatol Port, 2008. **33**(1): p. 17-33.
115. van Amelsfort JM, Jacobs KM, Bijlsma JW, Lafeber FP, Taams LS, *CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in rheumatoid arthritis: differences in the presence, phenotype, and function between peripheral blood and synovial fluid*. Arthritis Rheum, 2004. **50**(9): p. 2775-85.
116. Munroe ME, *Functional roles for T cell CD40 in infection and autoimmune disease: the role of CD40 in lymphocyte homeostasis*. Semin Immunol, 2009. **21**(5): p. 283-8.
117. Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, Yagi H, Hori S, Fehervari Z, Shimizu J, Takahashi T, Nomura T, *Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease*. Immunol Rev, 2006. **212**: p. 8-27.
118. Vinay DS, Cha K, Kwon BS, *Dual immunoregulatory pathways of 4-1BB signaling*. J Mol Med (Berl), 2006. **84**(9): p. 726-36.
119. Croft M, *The TNF family in T cell differentiation and function--unanswered questions and future directions*. Semin Immunol, 2014. **26**(3): p. 183-90.
120. Schoenbrunn A, Frentsch M, Kohler S, Keye J, Doms 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*. J Immunol, 2012. **189**(12): p. 5985-94.
121. Fife BT and Pauken KE, *The role of the PD-1 pathway in autoimmunity and peripheral tolerance*. Ann N Y Acad Sci, 2011. **1217**: p. 45-59.
122. Francisco LM, Sage PT, Sharpe AH, *The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity*. Immunol Rev, 2010. **236**: p. 219-42.

123. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T, *Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death*. EMBO J, 1992. **11**(11): p. 3887-95.
124. Keir ME, Liang SC, Guleria I, Latchman YE, Qipo A, Albacker LA, Koulmanda M, Freeman GJ, Sayegh MH, Sharpe AH, *Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance*. J Exp Med, 2006. **203**(4): p. 883-95.
125. Grabie N, Gotsman I, DaCosta R, Pang H, Stavrakis G, Butte MJ, Keir ME, Freeman GJ, Sharpe AH, Lichtman AH, *Endothelial programmed death-1 ligand 1 (PD-L1) regulates CD8+ T-cell mediated injury in the heart*. Circulation, 2007. **116**(18): p. 2062-71.
126. Francisco LM, Salinas VH, Brown KE, Vanguri VK, Freeman GJ, Kuchroo VK, Sharpe AH, *PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells*. J Exp Med, 2009. **206**(13): p. 3015-29.
127. Nishimura H, Nose M, Hiai H, Minato N, Honjo T, *Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor*. Immunity, 1999. **11**(2): p. 141-51.
128. Salama AD, Chitnis T, Imitola J, Ansari MJ, Akiba H, Tushima F, Azuma M, Yagita H, Sayegh MH, Khoury SJ, *Critical role of the programmed death-1 (PD-1) pathway in regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Exp Med, 2003. **198**(1): p. 71-8.
129. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH, *PD-1 and its ligands in tolerance and immunity*. Annu Rev Immunol, 2008. **26**: p. 677-704.
130. Waase I, Kayser C, Carlson PJ, Goronzy JJ, Weyand CM, *Oligoclonal T cell proliferation in patients with rheumatoid arthritis and their unaffected sibilings*. Arthritis Rheum, 1996. **39**(6): p. 904-13.
131. Linton PJ and Dorshkind K, *Age-related changes in lymphocyte development and function*. Nat Immunol, 2004. **5**(2): p. 133-9.
132. Nussey DH, Watt K, Pilkington JG, Zamoyska R, McNeilly TN, *Age-related variation in immunity in a wild mammal population*. Aging Cell, 2012. **11**(1): p. 178-80.
133. Mauro C, Fu H, Marelli-Berg FM, *T cell trafficking and metabolism: novel mechanisms and targets for immunomodulation*. Curr Opin Pharmacol, 2012. **12**(4): p. 452-7.
134. Humby F, Bombardieri M, Manzo A, Kelly S, Blades MC, Kirkham B, Spencer J, Pitzalis C, *Ectopic lymphoid structures support ongoing production of class-switched autoantibodies in rheumatoid synovium*. PLoS Med, 2009. **6**(1): p. e1.
135. Salmi M and Jalkanen S, *Human leukocyte subpopulations from inflamed gut bind to joint vasculature using distinct sets of adhesion molecules*. J Immunol, 2001. **166**(7): p. 4650-7.

136. Elewaut D, De Keyser F, Van Den Bosch F, Lazarovits AI, De Vos M, Cuvelier C, Verbruggen G, Mielants H, Veys EM, *Enrichment of T cells carrying beta7 integrins in inflamed synovial tissue from patients with early spondyloarthritis, compared to rheumatoid arthritis*. J Rheumatol, 1998. **25**(10): p. 1932-7.
137. Tietz W, Allemand Y, Borges E, von Laer D, Hallmann R, Vestweber D, Hamann A, *CD4+ T cells migrate into inflamed skin only if they express ligands for E- and P-selectin*. J Immunol, 1998. **161**(2): p. 963-70.
138. Berg EL, Yoshino T, Rott LS, Robinson MK, Warnock RA, Kishimoto TK, Picker LJ, Butcher EC, *The cutaneous lymphocyte antigen is a skin lymphocyte homing receptor for the vascular lectin endothelial cell-leukocyte adhesion molecule 1*. J Exp Med, 1991. **174**(6): p. 1461-6.
139. Ferran M, Romeu ER, Rincon C, Sagrista M, Gimenez Arnau AM, Celada A, Pujol RM, Hollo P, Jokai H, Santamaria-Babi LF, *Circulating CLA+ T lymphocytes as peripheral cell biomarkers in T-cell-mediated skin diseases*. Exp Dermatol, 2013. **22**(7): p. 439-42.
140. Reinhardt RL, Bullard DC, Weaver CT, Jenkins MK, *Preferential accumulation of antigen-specific effector CD4 T cells at an antigen injection site involves CD62E-dependent migration but not local proliferation*. J Exp Med, 2003. **197**(6): p. 751-62.
141. Bonecchi R, Bianchi G, Bordignon PP, D'Ambrosio D, Lang R, Borsatti A, Sozzani S, Allavena P, Gray PA, Mantovani A, Sinigaglia F, *Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s*. J Exp Med, 1998. **187**(1): p. 129-34.
142. Baggiolini M, *Chemokines in pathology and medicine*. J Intern Med, 2001. **250**(2): p. 91-104.
143. Sallusto F, Lanzavecchia A, Mackay CR, *Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses*. Immunol Today, 1998. **19**(12): p. 568-74.
144. Mack M, Bruhl H, Gruber R, Jaeger C, Cihak J, Eiter V, Plachy J, Stangassinger M, Uhlig K, Schattenkirchner M, Schlondorff D, *Predominance of mononuclear cells expressing the chemokine receptor CCR5 in synovial effusions of patients with different forms of arthritis*. Arthritis Rheum, 1999. **42**(5): p. 981-8.
145. Suzuki N, Nakajima A, Yoshino S, Matsushima K, Yagita H, Okumura K, *Selective accumulation of CCR5+ T lymphocytes into inflamed joints of rheumatoid arthritis*. Int Immunol, 1999. **11**(4): p. 553-9.
146. Balashov KE, Rottman JB, Weiner HL, Hancock WW, *CCR5(+) and CXCR3(+) T cells are increased in multiple sclerosis and their ligands MIP-1alpha and IP-10 are expressed in demyelinating brain lesions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(12): p. 6873-8.
147. Panina-Bordignon P, Papi A, Mariani M, Di Lucia P, Casoni G, Bellettato C, Buonsanti C, Miotto D, Mapp C, Villa A, Arrigoni G, Fabbri LM, Sinigaglia F, *The C-C*

chemokine receptors CCR4 and CCR8 identify airway T cells of allergen-challenged atopic asthmatics. J Clin Invest, 2001. **107**(11): p. 1357-64.

148. Iellem A, Mariani M, Lang R, Recalde H, Panina-Bordignon P, Sinigaglia F, D'Ambrosio D, *Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells.* J Exp Med, 2001. **194**(6): p. 847-53.

149. Kunkel EJ, Boisvert J, Murphy K, Vierra MA, Genovese MC, Wardlaw AJ, Greenberg HB, Hodge MR, Wu L, Butcher EC, Campbell JJ, *Expression of the chemokine receptors CCR4, CCR5, and CXCR3 by human tissue-infiltrating lymphocytes.* Am J Pathol, 2002. **160**(1): p. 347-55.

150. Yuan Q, Bromley SK, Means TK, Jones KJ, Hayashi F, Bhan AK, Luster AD, *CCR4-dependent regulatory T cell function in inflammatory bowel disease.* J Exp Med, 2007. **204**(6): p. 1327-34.

151. Miller SA and Weinmann AS, *Common themes emerge in the transcriptional control of T helper and developmental cell fate decisions regulated by the T-box, GATA and ROR families.* Immunology, 2009. **126**(3): p. 306-15.

152. Williams LM and Rudensky AY, *Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3.* Nat Immunol, 2007. **8**(3): p. 277-84.

153. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, Kelly TE, Saulsbury FT, Chance PF, Ochs HD, *The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3.* Nat Genet, 2001. **27**(1): p. 20-1.

154. Wei S, Kryczek I, Zou W, *Regulatory T-cell compartmentalization and trafficking.* Blood, 2006. **108**(2): p. 426-31.

155. Jiao Z, Wang W, Jia R, Li J, You H, Chen L, Wang Y, *Accumulation of FoxP3-expressing CD4+CD25+ T cells with distinct chemokine receptors in synovial fluid of patients with active rheumatoid arthritis.* Scand J Rheumatol, 2007. **36**(6): p. 428-33.

156. Appel H, Wu P, Scheer R, Kedor C, Sawitzki B, Thiel A, Radbruch A, Sieper J, Syrbe U, *Synovial and peripheral blood CD4+FoxP3+ T cells in spondyloarthritis.* J Rheumatol, 2011. **38**(11): p. 2445-51.

157. Cannons JL, Lau P, Ghumman B, DeBenedette MA, Yagita H, Okumura K, Watts TH, *4-1BB ligand induces cell division, sustains survival, and enhances effector function of CD4 and CD8 T cells with similar efficacy.* J Immunol, 2001. **167**(3): p. 1313-24.

158. Choi BK, Bae JS, Choi EM, Kang WJ, Sakaguchi S, Vinay DS, Kwon BS, *4-1BB-dependent inhibition of immunosuppression by activated CD4+CD25+ T cells.* J Leukoc Biol, 2004. **75**(5): p. 785-91.

159. Shindo Y, Yoshimura K, Kuramasu A, Watanabe Y, Ito H, Kondo T, Oga A, Ito H, Yoshino S, Hazama S, Tamada K, Yagita H, Oka M, *Combination Immunotherapy with*

4-1BB Activation and PD-1 Blockade Enhances Antitumor Efficacy in a Mouse Model of Subcutaneous Tumor. Anticancer Res, 2015. **35**(1): p. 129-36.

160. So T, Lee SW, Croft M, *Immune regulation and control of regulatory T cells by OX40 and 4-1BB.* Cytokine Growth Factor Rev, 2008. **19**(3-4): p. 253-62.

161. Uysal H, Bockermann R, Nandakumar KS, Sehnert B, Bajtner E, Engstrom A, Serre G, Burkhardt H, Thunnissen MM, Holmdahl R, *Structure and pathogenicity of antibodies specific for citrullinated collagen type II in experimental arthritis.* J Exp Med, 2009. **206**(2): p. 449-62.

162. Cai Q, Dierich A, Oulad-Abdelghani M, Chan S, Kastner P, *Helios deficiency has minimal impact on T cell development and function.* J Immunol, 2009. **183**(4): p. 2303-11.

163. Getnet D, Grosso JF, Goldberg MV, Harris TJ, Yen HR, Bruno TC, Durham NM, Hipkiss EL, Pyle KJ, Wada S, Pan F, Pardoll DM, Drake CG, *A role for the transcription factor Helios in human CD4(+)CD25(+) regulatory T cells.* Mol Immunol, 2010. **47**(7-8): p. 1595-600.

164. Himmel ME, MacDonald KG, Garcia RV, Steiner TS, Levings MK, *Helios+ and Helios- cells coexist within the natural FOXP3+ T regulatory cell subset in humans.* J Immunol, 2013. **190**(5): p. 2001-8.

165. Gottschalk RA, Corse E, Allison JP, *Expression of Helios in peripherally induced Foxp3+ regulatory T cells.* J Immunol, 2012. **188**(3): p. 976-80.

166. Sharpe AH, Wherry EJ, Ahmed R, Freeman GJ, *The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection.* Nat Immunol, 2007. **8**(3): p. 239-45.

167. Virgin HW, Wherry EJ, Ahmed R, *Redefining chronic viral infection.* Cell, 2009. **138**(1): p. 30-50.

168. Hatachi S, Iwai Y, Kawano S, Morinobu S, Kobayashi M, Koshiba M, Saura R, Kurosaka M, Honjo T, Kumagai S, *CD4+ PD-1+ T cells accumulate as unique anergic cells in rheumatoid arthritis synovial fluid.* J Rheumatol, 2003. **30**(7): p. 1410-9.

169. Peled M, Strazza M, Azoulay-Alfaguter I, Mor A, *Analysis of Programmed Death-1 in Patients with Psoriatic Arthritis.* Inflammation, 2015.

170. Agata Y, Kawasaki A, Nishimura H, Ishida Y, Tsubata T, Yagita H, Honjo T, *Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes.* Int Immunol, 1996. **8**(5): p. 765-72.

171. Kinter AL, Godbout EJ, McNally JP, Sereti I, Roby GA, O'Shea MA, Fauci AS, *The common gamma-chain cytokines IL-2, IL-7, IL-15, and IL-21 induce the expression of programmed death-1 and its ligands.* J Immunol, 2008. **181**(10): p. 6738-46.

172. Riley JL, *PD-1 signaling in primary T cells.* Immunol Rev, 2009. **229**(1): p. 114-25.

173. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, Fitz LJ, Malenkovich N, Okazaki T, Byrne MC, Horton HF, Fouser L, Carter L, Ling V, Bowman MR, Carreno BM, Collins M, Wood CR, Honjo T, *Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation*. J Exp Med, 2000. **192**(7): p. 1027-34.
174. Carter L, Fouser LA, Jussif J, Fitz L, Deng B, Wood CR, Collins M, Honjo T, Freeman GJ, Carreno BM, *PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4(+) and CD8(+) T cells and is overcome by IL-2*. Eur J Immunol, 2002. **32**(3): p. 634-43.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Christopher Sichau, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Phänotyp und Aktivierungsstatus von CD4⁺ T-Zellen im Blut und entzündeten Gelenk rheumatischer Patienten“ 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, Grafiken 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/der Betreuer/in, 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

Lebenslauf

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

Ever tried. Ever failed. No matter.

Try again. Fail again. Fail better.

Samuel Beckett

Danksagung

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Sieper danken, der es mir nicht nur ermöglichte, im Labor des Tibor-Diamantstein-Haus wissenschaftlich zu arbeiten, sondern auch diese Dissertation zu verfassen. So konnte ich vor Beginn meiner klinischen Tätigkeit wichtige und nützliche Erfahrungen machen.

Mein besonderer Dank gilt darüber hinaus Frau PD Dr. Uta Syrbe, die diese Arbeit von Anfang an bis zum heutigen Tag mit vielen Ideen, Erfahrung, Kritik und ihrem Optimismus von Anfang an begleitet, mit mir weitergedacht und hinterfragt hat.

Für die Einführung in die immunologische Laborwelt mit ihren Techniken, Herausforderungen und ihrer Eleganz bin ich Frau Peihua Wu und Rebecca Noster sowie Herrn René Philipp Maier zu großem Dank verpflichtet. Kein Experiment hätte ohne ihre Kompetenz und Hilfsbereitschaft zu einem Ergebnis geführt.

Bei meinen Mitstreiterinnen Janine Bleil, Kristina Conrad und Diana Bösel möchte ich mich nicht nur für die wissenschaftliche Unterstützung – auch als ich später meine Tage und Nächte im Klinikum verbrachte – danken, sondern auch für die gemeinsamen Umzüge und Ausflüge und das freundschaftliche Miteinander.

Danken möchte ich aber auch den Organisatoren und Studierenden des IMMUCO-Graduiertenkolleg. Die in diesem Rahmen geführten Gespräche und Fortbildungen haben unsere wissenschaftliche Ausbildung stark befördert und fruchtbar gemacht. Auch sei den Menschen gedankt, die ich im DRFZ, im BCRT oder einfach am FACS getroffen habe, und die mir stets ihre Hilfe anboten. Genannt seien hier besonders Arne Sattler und Tim Meyer.

Zum Schluss seien all die Menschen im Ruhrgebiet, Ostwestfalen, Berlin und an vielen anderen schönen Orte hervorgehoben, die – wie meine Familie und Freunde – durch ihre Unterstützung stets dazu beigetragen haben, dass ich heute diese Zeilen schreiben darf.