

**Die Rolle von antigenspezifischen Helfer-T-Zellen  
im murinen Krankheitsmodell  
der Ovalbumin-induzierten Arthritis**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

**Marko Janke**

geboren am 13.08.1976 in Wriezen

im Januar 2009

Die Arbeit wurde im Zeitraum zwischen März 2004 bis Januar 2009 am Deutschen Rheumaforschungszentrum DRFZ Berlin in der Arbeitsgruppe von Dr. Alexander Scheffold angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Andreas Radbruch
2. Gutachter: Prof. Thomas Blankenstein

Disputation am: ...01.07 2009.....

---

**Inhaltsverzeichnis**

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	3
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	6
<b>I Einleitung</b>	8
1. Das Immunsystem	8
1.1 Immunzellen und Immunreaktion	8
1.2 B-Zell-Entwicklung und B-Zell-Aktivierung	9
1.3 T-Zell-Entwicklung und T-Zell-Aktivierung	9
1.4 Helfer-T-Zell-Subpopulationen	10
1.5 Entzündung und das Entzündungsmodell der DTH	12
1.6 Toleranz und Autoimmunität	12
2. Rheumatoide Arthritis	13
2.1 Tiermodelle für die Rheumatoide Arthritis - Die Antigen-induzierte Arthritis	15
2.2 Die Rolle von T-Zellen bei der Rheumatoiden Arthritis	16
2.3 Die Rolle von B-Zellen bei der Rheumatoiden Arthritis	17
2.4 Die Rolle weiterer Immunzellen bei der Rheumatoiden Arthritis	18
2.5 Bisherige Behandlungsmethoden der RA	18
2.5.1 Glukokortikoide und DMARD's	18
2.5.2 anti-TNF- $\alpha$ Therapie	19
2.5.3 anti-B-Zell Therapie	19
2.5.4 Weitere Therapien und Versuchsstudien	19
<b>Ziele der Arbeit</b>	20
<b>II Methoden und Materialien</b>	21
1. Allgemeine Methoden und Materialien	21
1.1 Verwendete Mausstämme	21
1.2 Verwendete Puffer und Medien	21
1.3 Verwendete Chemikalien und Reagenzien	22
1.4 Verwendete Antikörperkonjugate und Sekundärreagenzien	24
1.5 Magnetische Zellsortierung (MACS) von CD4+CD62L+ naiven T-Zellen	25
1.6 Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS) von CD4+CD25+ Treg	26
1.7 Antikörperfärbung von Zellen zur FACS Analyse (Durchflusszytometrie)	28
1.8 PMA/ionomycin Restimulation in vitro	28
1.9 Intrazelluläre Antikörperfärbung zur FACS Analyse	28
1.10 Präparation von murinen Organen	28
2. Ovalbumin-induzierte Arthritis (OIA)	29
2.1 Ovalbumin-induzierte Arthritis in immunisierten Mäusen	29
2.2 Herstellung von kationisiertem Ovalbumin (catOVA)	29
2.3 Neutralisierung von IL-17 und TNF- $\alpha$ bei der OIA	30
2.4 <i>In vitro</i> Stimulation von CD4+CD25+ regulatorischen T-Zellen	31
2.5 Präparation von Kniegelenken und Herstellung von Paraffinschnitten	31
2.6 Hämatoxylin/Eosin-Färbung von Kniegelenkschnitten	31
2.7 Ermittlung des Histologiescores	31

---

2.8	Zellkultur – Generierung von Th1-, Th2- und Th17-Zellen	32
2.9	Ovalbumin-induzierte Arthritis durch adoptiven Transfer von Th-Zellen	33
2.10	Serumgewinnung und ELISA auf OVA-spezifische Antikörper	33
2.11	Protein-Restimulation <i>in vitro</i> zur Bestimmung von CD4+CD40L+ T-Zellen	34
2.12	Migrationsassay im OIA Modell	34
3.	Das Entzündungsmodell der DTH	35
3.1	Die DTH Reaktion	35
3.2	Neutralsierung von IL-17 im DTH Modell	35
3.3	Migrationsassay im DTH Modell	36
4.	Charakterisierung von Th17-Zellen	36
4.1	mRNA Isolierung	36
4.2	Reverse Transkription – Herstellung von cDNA	37
4.3	<i>Real Time PCR</i>	37
4.4	Sequenzen der für die <i>Real Time PCR</i> verwendeten Primer	38
5.	OVA-transgene tet-LPOVA Mäuse	39
5.1	Genetische Typisierung von tet-LPOVA Mäusen	39
5.2	OIA in tet-LPOVA Mäusen mit Fütterung des Antibiotikums Doxycyclin	40
5.3	Adoptiver Transfer von CD4+ T-Zellen in tet-LPOVA Mäuse	40
5.4	Generierung von Knochenmarkchimären	40
6.	Statistik	41
<b>III</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>42</b>
1.	Die Ovalbumin-induzierte Arthritis (OIA)	42
2.	Die Rolle von pro-inflammatorischen Zytokinen bei der OIA	48
2.1	Die Rolle von IFN- $\gamma$ bei der OIA	48
2.2	Die Rolle von TNF- $\alpha$ bei der OIA	49
2.3	Die Rolle von IL-17 bei der OIA	52
3.	Die Rolle von pro-inflammatorischen Helfer-T-Zellen bei der OIA	54
3.1	Die Rolle von pro-inflammatorischen Th1- und Th17-Zellen bei der OIA	54
3.2	Nähere Charakterisierung von <i>in vitro</i> generierten Th17-Zellen	60
4.	Die Rolle von B-Zellen bei der OIA	69
5.	Die Rolle von anti-inflammatorischen Treg bei der OIA	76
6.	Die induzierbare gelenkspezifische OVA-Expression in tet-LPOVA Mäusen	80
6.1	OIA in tet-LPOVA Mäusen	80
6.2	Die OIA-spezifische Toleranz in tet-LPOVA Mäusen	82
6.3	Mögliche Toleranzmechanismen in tet-LPOVA Mäusen	83
<b>IV</b>	<b>Diskussion</b>	<b>88</b>
1.	Die Ovalbumin-induzierte Arthritis	88
2.	Die Rolle von pro-inflammatorischen Zytokinen bei der OIA	90
2.1	Die Rolle von TNF- $\alpha$ bei der OIA	91
2.2	Die Rolle von IL-17 bei der OIA	93
2.3	Die Rolle von IFN- $\gamma$ bei der OIA	95
3.	Die Rolle von CD4+ T-Zellen bei der OIA	98
3.1	Die Rolle von pro-inflammatorischen Th1- und Th17-Zellen bei der OIA	98
3.1.1	Die akute Phase einer OIA	99
3.1.2	Die chronische Phase einer OIA	102

---

3.2	Nähere Charakterisierung von <i>in vitro</i> generierten Th17-Zellen	104
3.3	Die Rolle von anti-inflammatorischen CD4+CD25+ Treg bei der OIA	105
4.	Die Rolle von B-Zellen bei der OIA	107
5.	Die induzierbare gelenkspezifische OVA-Expression in tet-LPOVA Mäusen	110
5.1	Die antigen- und arthritisspezifische Toleranz in tet-LPOVA Mäusen	110
5.2	Mögliche Toleranzmechanismen in tet-LPOVA Mäusen	111
	<b>Zusammenfassung</b>	115
<b>V</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	119
<b>VI</b>	<b>Anhang</b>	133
	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	133
	<b>Tabellenverzeichnis</b>	135
	<b>Selbständigkeitserklärung</b>	136
	<b>Lebenslauf</b>	137
	<b>Publikationsliste</b>	139
	<b>Kongreßteilnahmen und Stipendien</b>	141
	<b>Danksagung</b>	142

**Abkürzungsverzeichnis**

μCi	Mikrocurie
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
AIA	Antigen-induzierte Arthritis
APC	allophycocyanin
APZ	Antigen präsentierende Zelle
Blimp1	<i>B lymphocyte induced maturation protein1</i>
BSA	bovines Serumalbumin
BZR	B-Zell-Rezeptor
catOVA	kationisiertes Ovalbumin
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CFA	<i>complete Freund's adjuvant</i>
CIA	Kollagen-induzierte Arthritis
CTL	zytotoxische CD8+ T-Zelle
Cy5	Cychrome 5
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTH Reaktion	<i>delayed type hypersensitivity</i> Reaktion
drain.	drainierend
DZ	dendritische Zelle
EAE	<i>experimental autoimmune encephalitis</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immune sorbent assay</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorter</i> , Durchflusszytometrie
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fötales Kälberserum
FITC	Fluoreszein-5-isothiocyanat
FSC	Vorwärtsstreulicht
G6PI	Glukose-6-Phosphat-Isomerase
geoMean	geometrische MFI
h	Stunde
H/E	Hämatoxilin/Eosin
hu	human
i.a.	intra-artikulär
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IFA	<i>incomplete Freund's adjuvant</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
iono	Ionomyzin
k.o.	<i>knockout</i>
LK	Lymphknoten
LPOVA	Link-Protein – Ovalbumin-Fusionsprotein
LT	Lymphotoxin
m	murin
M	molar
MACS	<i>magnetic-activated cell sorting</i> , magnetische Zellseparartion
metBSA	methyliertes BSA

---

MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min.	Minute(n)
mm	Millimeter
mM	millimolar
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MS	Multiple Sklerose
mV	Millivolt
nm	Nanometer
OIA	Ovalbumin-induzierte Arthritis
OVA	Ovalbumin (Albumin aus Hühnereiweiss)
Ova <sub>323-339</sub>	Ovalbumin-Peptid (Aminosäuren 323-339)
OVA-TZR	transgener TZR, der das Ova <sub>323-339</sub> Peptid im Kontext mit dem MHCII-Allel I-A <sup>d</sup> (genetischer Balb/c Hintergrund) erkennt
PBA	PBS/BSA/0.05% Azid
PBS	<i>phosphat buffered saline</i>
PE	<i>Phycoerythrin</i>
PI	Propidiumiodid
PMA	Phorbol-12-myastat-13-Azetat
pmol	picomol
r	recombinant
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RPMI-Medium	<i>Rosewell Park Memorial Institute</i> Medium
RT	Raumtemperatur
s.c.	subkutan
SA	Streptavidin
sec.	Sekunde(n)
spf	<i>specific pathogen free</i>
SSC	Seitwärtsstreulicht
tet	Tetrazyklin
tg	transgen
TGF	<i>tumor growth factor</i>
Th-Zelle	CD4+ Helfer-T-Zelle
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TZR	T-Zell-Rezeptor
wt	Wildtyp

## I Einleitung

### 1. Das Immunsystem

Im Lauf der Evolution bildete sich ein komplexes Netzwerk von Zellen, löslichen Proteinen und mechanischen/physikalischen Barrieren heraus, um den Körper vor Fremdstoffen, auch Antigene genannt, und somit potentiellen Pathogenen zu schützen. Dieses Netzwerk bildet die Grundlage des Immunsystems. Das Prinzip des Immunsystems beruht darauf, Antigene zu erkennen, zu neutralisieren und ein immunologisches Gedächtnis zu entwickeln, um bei wiederholtem Kontakt mit einem bestimmten Fremdstoff schneller reagieren zu können. Innerhalb des Immunsystems unterscheidet man zwischen der angeborenen Immunantwort (schnell und antigenunspezifisch) und der adaptiven Immunantwort (langsamer, antigenspezifisch, Gedächtnis ausbildend). Die Bildung sowie die Stimulation bzw. Aktivierung der Zellen des Immunsystems findet zumeist in speziellen Immunorganen, den lymphatischen Geweben, statt. Dabei zählen Knochenmark und Thymus zu den primären, Milz und Lymphknoten zu den sekundären lymphatischen Organen. Alle Immunzellen besitzen Oberflächenmoleküle, die zur Identifizierung einzelner Zellpopulationen herangezogen werden können. Diese unterliegen durch den *Cluster of Differentiation* (CD) Kodex einer einheitlichen Namensgebung.

#### 1.1 Immunzellen und Immunreaktion

Der menschliche Körper besitzt eine Vielzahl von weißen Blutkörperchen, die Leukozyten, um adäquat auf verschiedene Pathogene zu reagieren. Die im menschlichen Blut zahlenmäßig am häufigsten vertretenen Leukozyten sind die neutrophilen Granulozyten (kurz: Neutrophile). Die Aufgabe von Neutrophilen ist es, in von Fremdstoffen befallene Gewebe (Entzündungsstellen) einzuwandern und Antigene zu internalisieren und abzutöten. Daneben existieren so genannte natürliche Killerzellen (NK-Zellen), die über Zelloberflächenrezeptoren virenbefallene Zellen zuerst erkennen und anschließend lysieren können. Neutrophile und NK-Zellen zählen neben Dendritischen Zellen (DZ) und Makrophagen zu den zellulären Bestandteilen der angeborenen Immunantwort. Die adaptive Immunantwort des Körpers dagegen wird durch die Lymphozyten, die B- und T-Zellen, vermittelt. DZ und Makrophagen können jedoch durch Antigenpräsentation die T-Zellen des adaptiven Immunsystems aktivieren und bilden daher eine Brücke zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort. Dringt ein Antigen in periphere Gewebe des Körpers ein, wird es zunächst durch unreife DZ internalisiert. Die Erkennung des Pathogens kann auch über spezielle Rezeptoren, die Toll-like-Rezeptoren (TLR), erfolgen. Die DZ wandern dann in den nächstgelegenen Lymphknoten (drainierender LK) ein, werden dabei aktiviert und können daraufhin T-Zellen stimulieren.

Hierfür wird das internalisierte Antigen prozessiert und in Form von kleinen Peptiden gebunden an die Moleküle des *Major Histocompatibility Complex class II* (MHCII) präsentiert. Dieser Komplex wird von CD4<sup>+</sup> Helfer-T-Zellen (Th-Zellen) mithilfe ihres T-Zell-Rezeptors (TZR) erkannt. Zellen, die Antigene auf diese Art den Th-Zellen präsentieren können, nennt man antigenpräsentierende Zellen (APZ). Außer DZ zählen auch Makrophagen und B-Zellen zu den MHCII exprimierenden APZ. Makrophagen sind außerdem durch die Ausschüttung von Zytokinen an der Aktivierung anderer Immunzellen beteiligt. Außerdem können sie Pathogene aufnehmen und durch Ausschüttung toxischer Substanzen abtöten. B-Zellen können andere Immunzellen, wie z.B. T-Zellen, aktivieren. Darüber hinaus bilden sie, nach Differenzierung zu Plasmazellen, die einzige Quelle für die Produktion von Antikörpern.

### **1.2 B-Zell-Entwicklung und B-Zell-Aktivierung**

Die B-Zell-Entwicklung erfolgt beim Menschen im Knochenmark. Aus Vorläufer B-Zellen entwickeln sich über Zwischenstadien naive B-Zellen, welche u.a. die spezifischen Marker CD19 und CD20 exprimieren. Murine B-Zellen tragen auf ihrer Oberfläche außerdem das Molekül CD45R (B220), welches auch von einigen DZ produziert wird. Außerdem exprimiert jede B-Zelle einen B-Zell-Rezeptor (BZR), der für ein bestimmtes Antigenepitop spezifisch ist. Naive B-Zellen zirkulieren ebenfalls im Blut- und Lymphsystem. Sobald sie ihr spezifisches Antigen, das in nativer Form an den BZR binden kann, erkennen, wandern sie in ein sekundäres lymphatisches Organ ein. Dort sind die Lymphozyten in bestimmten Regionen lokalisiert, den B- bzw. T-Zell-Zonen. An der Grenze beider Zonen bildet sich ein Keimzentrum, in dem die eingewanderte B-Zelle stark proliferiert und dann in eine Gedächtnis-B-Zelle oder eine Plasmazelle differenziert. Der BZR unterliegt dabei spontanen Mutationen, die ihn affiner für sein Antigen werden lassen. Die ausdifferenzierte Plasmazelle sekretiert dann ausschließlich ihren BZR in löslicher Form als Antikörper. Man unterscheidet dabei die Antikörperunterklassen IgM, IgG, IgA, IgD und IgE, welche unterschiedliche Aufgaben erfüllen. Zirkulierende Antikörper markieren dann durch Bindung an ihr spezifisches Antigen Pathogene. Diese können nun von Neutrophilen oder Makrophagen über spezielle Antikörper-Rezeptoren aufgenommen und eliminiert werden.

### **1.3 T-Zell-Entwicklung und –Aktivierung**

Die T-Zell-Entwicklung erfolgt im Thymus. Aus dem Knochenmark wandern zunächst Vorläufer-T-Zellen in den Thymus ein, wo sie sich über Zwischenstadien entweder zu CD4<sup>+</sup> Helfer-T-Zellen (Th-Zellen) oder zu CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen (ZTL) entwickeln. Die hervorgehenden naiven CD3<sup>+</sup> T-Zellen wandern dann in die Peripherie und zirkulieren im

Blut- und Lymphsystem des Körpers. Jede T-Zelle trägt einen TZR, der für ein bestimmtes Antigenepitop spezifisch ist.

Th-Zellen erkennen mit ihrem TZR Antigene, die, an MHCII Moleküle gebunden, von APZ präsentiert werden. Für eine optimale Induktion von Effektorfunktionen benötigt die Th-Zelle 3 Signale. Diese sind: I.) Antigenerkennung über MHCII-TZR Interaktion, II.) Interaktion von Ko-Stimulationsmolekülen auf T-Zellen und ihren Liganden auf APZ sowie III.) Differenzierungssignale, vermittelt durch lösliche Botenstoffe (Zytokine) oder spezifische Rezeptor-Ligand Interaktionen. Diese T-Zell-APZ-Interaktion findet im drainierenden LK oder der Milz statt. Aktivierte Th-Zellen exprimieren u.a. die Moleküle CD40L und CD25 auf ihrer Zelloberfläche und können nun zu Effektor-T-Zellen oder Gedächtnis-T-Zellen differenzieren. ZTL erkennen mit ihrem TZR Antigene, die an ubiquitär exprimierte MHCI Moleküle gebunden sind und können dadurch u.a. die Lyse virenbefallener Körperzellen einleiten.

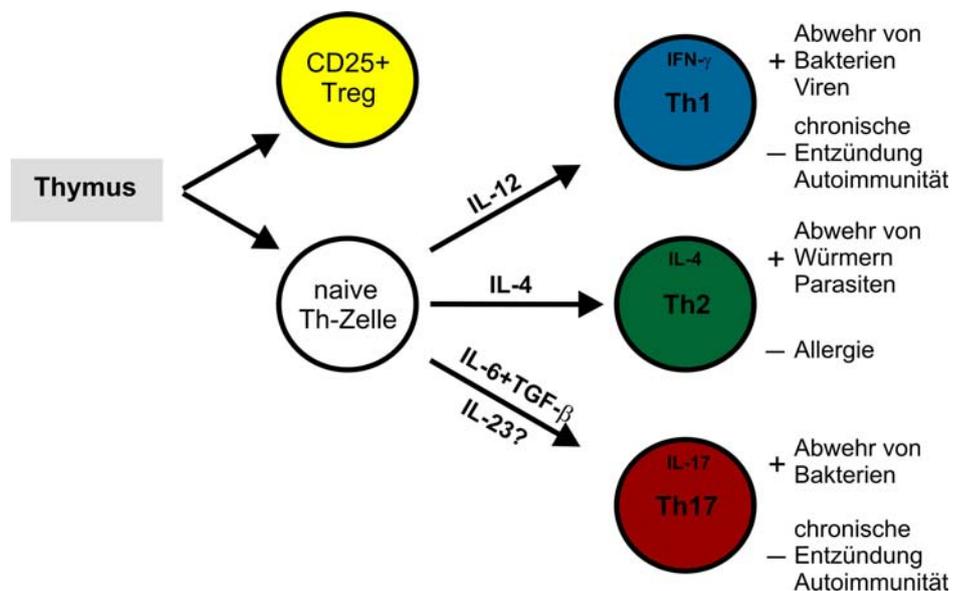
#### 1.4 Helfer-T-Zell-Subpopulationen

CD4<sup>+</sup> Effektor-T-Zellen erfüllen verschiedene Aufgaben. In den 1980-er Jahren wurde zum ersten Mal beschrieben, dass Th-Zellen entweder B-Zellen Hilfe leisten, um Antikörper zu produzieren, oder Makrophagen und andere Zellen der angeborenen Immunantwort aktivieren sowie die Migration von Zellen und den Einfluss von Wasser in eine Entzündungsstelle steuern können (1-3). Die Effektor-T-Zell-Populationen, die diese beiden Aufgaben vermitteln, unterschieden sich vor allem in der Expression von Zytokinen und produzierten entweder IL-4 oder IFN- $\gamma$ . Daraus wurde geschlossen, dass es zwei unterschiedliche CD4<sup>+</sup> Effektor-T-Zell-Populationen geben muss, die schließlich Th1 und Th2 genannt wurden (2). Die Differenzierung in Th1- oder Th2-Zellen wird dabei von den Transkriptionsfaktoren *T-box expressed in T cells* (T-bet) bzw. *GATA-binding protein 3* (GATA-3) gesteuert (4-6). Das Zytokinexpressionsmuster beider Subpopulationen kann ebenfalls in naiven Helfer-T-Zellen *in vitro* induziert werden, abhängig davon, welchem Zytokinstimulus sie unterliegen (Abb.1).

**Th1**-Zellen entstehen durch Stimulation mit IL-12 und exprimieren vor allem *Interferon* (IFN)- $\gamma$ , *Tumor-Necrosis-Factor* (TNF)- $\alpha$  und IL-2. Th1-Zellen gelten als entzündungsfördernd. TNF- $\alpha$ , ein pro-inflammatorisches Zytokin, kann Makrophagen und andere Zellen aktivieren. IL-2 gilt als T-Zell-Wachstumsfaktor. IFN- $\gamma$  kann durch Aktivierung von Makrophagen ebenfalls pro-inflammatorisch wirken. Th1-Zellen exprimieren den für sie spezifischen Transkriptionsfaktor T-bet.

**Th2**-Zellen entstehen durch Stimulation mit dem Zytokin IL-4 und sind für die Bekämpfung von extrazellulären Parasiten und Würmern wichtig, da sie die Sekretion von Antikörpern durch antigenspezifische B-Zellen stimulieren. Sie spielen außerdem bei Allergien, wie z.B. dem

Heuschnupfen, eine entscheidende Rolle. Th2-Zellen exprimieren den Th2 typischen Transkriptionsfaktor GATA-3 und sekretieren vor allem die Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13. Mit **Th17**-Zellen wurde vor kurzem ein neuer Th-Zell-Subtyp beschrieben (7-9). Diese Zellen produzieren vor allem das pro-inflammatorische Zytokin IL-17. Dieses ist für die Bekämpfung von verschiedenen Bakterien und anderen extrazellulären Pathogenen verantwortlich (10-15). Da Th17-Zellen weder T-bet noch GATA-3, sondern die spezifischen Transkriptionsfaktoren ROR $\gamma$ T und ROR $\alpha$  exprimieren, werden sie als neue, eigenständige Subpopulation angesehen (16-19). Th17-Zellen produzieren neben IL-17 auch die Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-2 und IL-22, u.a. auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt. Durch kombinierte Stimulation von naiven Th-Zellen mit IL-6 und *Tumor-Growth-Factor* (TGF)- $\beta$  kann man *in vitro* Th17-Zellen generieren. IL-23 gilt dabei als Wachstumsfaktor für Th17-Zellen (20-22). In vielen Autoimmunerkrankungen scheinen Th17-Zellen am Krankheitsverlauf beteiligt zu sein, so auch bei der Rheumatoiden Arthritis (23-26). Die Bedeutung von Th17-Zellen für den Verlauf einer Arthritis wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit mithilfe des Tiermodells der Antigen-induzierten Arthritis näher untersucht.



**Abb.1: Th-Zell Subpopulationen.** Im Thymus entstehende CD4<sup>+</sup> naive T-Zellen können in der Peripherie je nach Zytokinstimulus in Th1-, Th2- oder Th17-Zellen differenzieren. Außerdem verlassen den Thymus CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> natürliche regulatorische T-Zellen ( $n$ Treg), die Immunantworten supprimieren können.

Alle Th Subpopulationen können unter bestimmten Bedingungen das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 exprimieren und unterliegen somit einer gewissen Autoregulation (siehe Abschnitt I 1.6 Toleranz und Autoimmunität).

## 1.5 Entzündung und das Entzündungsmodell der DTH

Eine Entzündung entsteht durch das komplexe Wechselspiel zwischen Leukozyten und Endothelzellen. Ausgangspunkt bilden meist sich im Gewebe befindende Makrophagen, welche Antigene erkennen, internalisieren und prozessieren. Daraufhin sekretieren Makrophagen eine Reihe von Zytokinen und Chemokinen, die sowohl andere Leukozyten als auch Endothelzellen aktivieren bzw. zur Entzündungsstelle rekrutieren (27-30). Endothelzellen verstärken die Expression bestimmter Moleküle auf ihrer Zelloberfläche. Dies führt zu einer erhöhten Durchlässigkeit der Blutgefäße, was ein verstärktes Eindringen von Flüssigkeit in das Gewebe zur Folge hat. Außerdem wandern weitere Immunzellen in das Gewebe ein, wobei Neutrophile die erste einwandernde Zellpopulation darstellen. Dies führt zur charakteristischen Rötung und Schwellung der Entzündungsstelle sowie zu erhöhtem Schmerzempfinden. Makrophagen aktivieren dann durch Antigenpräsentation T-Zellen. Durch Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen, wie TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  und IL-17, verstärken Th-Zellen und andere Leukozyten die Entzündungsreaktion (31-36).

Ein Tiermodell für eine akute Entzündung stellt die sogenannte *delayed type hypersensitivity* (DTH) Reaktion dar. Die DTH ist als klassisches Th1-induziertes Entzündungsmodell beschrieben. Hierbei werden *in vitro* generierte, für ein bestimmtes Antigen spezifische Th1-Zellen einer Maus i.v. gespritzt und anschließend das Antigen in eine Fußsohle injiziert. In Folge bildet sich im injizierten Fuß eine Entzündung aus, die durch die Messung der Fußsohlenschwellung detektiert werden kann (1, 37, 38).

## 1.6 Toleranz und Autoimmunität

Das Abwehrsystem des Körpers muss bei einer Immunreaktion zwischen Fremdantigenen und Selbstantigenen unterscheiden können, damit es gegen körpereigene Gewebe tolerant bleibt. Hierfür gibt es die Mechanismen der zentralen und der peripheren Toleranzinduktion (39-41).

Heranreifende Th-Zellen unterliegen im Thymus einem negativen Selektionsprozess. Dabei werden von speziellen MHCII exprimierenden Zellen sämtliche Selbstantigene des Körpers präsentiert. Alle T-Zellen, die Selbstantigene binden, werden daraufhin aussortiert bzw. gehen in Apoptose (programmierter Zelltod). Diese negative Selektion, die auch bei B-Zellen stattfindet, stellt sicher, dass im Körper keine autoreaktiven Lymphozyten zirkulieren. Einige Selbstantigen erkennende Lymphozyten entgehen jedoch der negativen Selektion innerhalb der zentralen Toleranz und verlassen die primären lymphatischen Organe.

Um zu verhindern, dass diese autoreaktiven Zellen in der Peripherie aktiviert werden, existieren im Körper verschiedene Mechanismen der peripheren Toleranz. Dabei kann

beispielsweise in T-Zellen, die durch APZ nicht ausreichend stimuliert werden, z.B. durch ein fehlendes Ko-Stimulationssignal, entweder Apoptose oder Anergie induziert werden.

Außerdem können so genannte regulatorische T-Zellen (Treg), die im Regelfall den Transkriptionsfaktor Foxp3 exprimieren, über unterschiedliche Mechanismen andere T-Zellen supprimieren und dadurch eine Immunantwort unterbrechen bzw. verhindern. Treg werden zum einem direkt im Thymus als CD4+CD25+ T-Zellen gebildet (natürliche Treg, Abb.1) oder können z.B. durch Stimulation von naiven T-Zellen mit TGF- $\beta$  in der Peripherie entstehen (induzierte Treg). Durch die Sekretion von immunsuppressorisch wirkendem IL-10 verhindern Treg z.B. eine Aktivierung von APZ bzw. deaktivieren diese. Treg spielen wohl vor allem eine Rolle bei der Vermeidung von Autoimmunerkrankungen, da die TZR von Treg überwiegend für Selbstantigene spezifisch sind (39, 42-45).

Ebenfalls können ursprünglich pro-inflammatorische Th-Zellen durch Induktion von IL-10 in diesen Zellen zu anti-inflammatorischen Zellen umprogrammiert werden, wobei Notch - Notch-Ligand Interaktionen eine entscheidende Rolle spielen (46).

Ein weiterer Mechanismus der peripheren Toleranz ist die orale Toleranz. Hierbei wird sichergestellt, dass gegen Nahrungsmittelantigene keine Immunantwort entsteht (47-49).

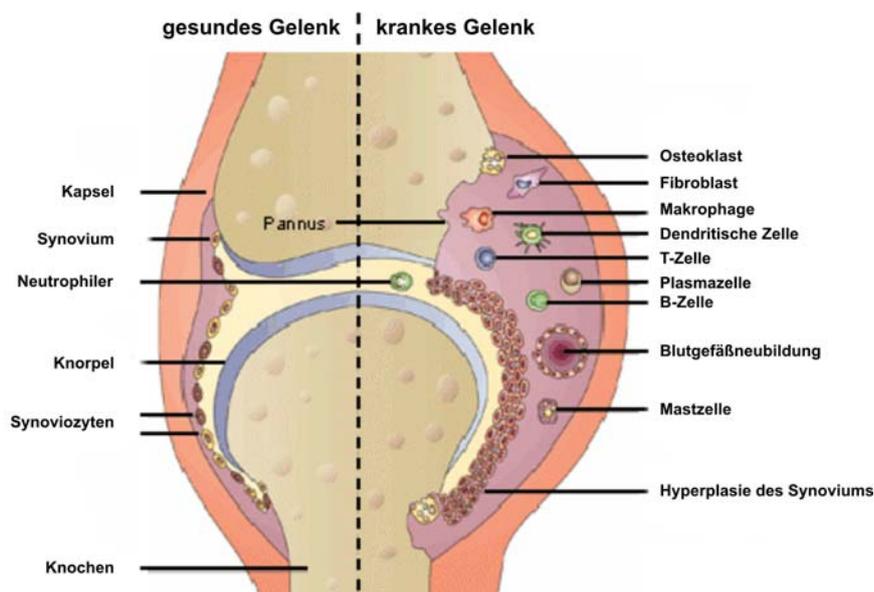
Unter bestimmten Bedingungen versagen allerdings die beschriebenen Toleranzmechanismen. Dies kann zur Ausbildung von Autoimmunerkrankungen führen. Hierbei richtet sich die Immunabwehr gegen Selbstantigene und somit gegen den eigenen Körper, was zu chronischen Entzündungen und schließlich zur Zerstörung körpereigener Gewebe führen kann (50-54). So werden beispielsweise bei Multiple Sklerose (MS) Myelinscheidenproteine des Zentralen Nervensystems angegriffen und zerstört (55, 56). Dagegen sind bei Rheumatischen Erkrankungen meist Gewebe des Stütz- und Bewegungsapparates, im besonderen Knochen- und Knorpelmatrix, Muskulatur oder Bindegewebe, betroffen. Zu den am häufigsten auftretenden Rheumatischen Erkrankungen beim Menschen zählt die Rheumatoide Arthritis (57).

## **2. Rheumatoide Arthritis**

Die Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine weit verbreitete aggressive Gelenkserkrankung mit wahrscheinlich autoimmunem Hintergrund, die ca. 1% der Weltbevölkerung betrifft. RA Patienten leiden vor allem an chronischen Gelenkentzündungen, wobei die Krankheit sich zunächst meist nur in einem Hand- oder Fingergelenk manifestiert, sich aber dann im Laufe der Jahre auf das kontralaterale Handgelenk und dann weitere Gelenke ausweitet (30, 57-60). RA Patienten klagen besonders über eine Steifheit der Gelenke und damit verbundener Schmerzen.

Die eigentlichen Ursachen der Erkrankung sind noch nicht endgültig geklärt. Eine Theorie besagt, dass Viren bzw. Bakterieninfektionen durch Kreuzreaktion von pathogenspezifischen Helfer-T-Zellen mit selbstantigenspezifischen T-Zellen eine Erkrankung verursachen bzw. fördern. Das Versagen von Toleranzmechanismen (siehe Abschnitt I 1.6) scheint ebenfalls seinen Beitrag dazu zu leisten.

Zunächst bildet sich im Gelenkbereich eine Entzündung. Diese führt zur Aktivierung von lokal residierenden Makrophagen, Fibroblasten und Synoviozyten der Synovialmembran. Die Zellen proliferieren und weitere Immunzellen, wie Neutrophile und schließlich Lymphozyten, wandern in die Entzündungsstelle ein. Dies führt zur Schwellung und Schmerzen und zur so genannten Pannus-Bildung (Abb.2). Die Intensität der Entzündungen kann dabei abwechselnd zurückgehen und wieder ansteigen. An diesen so genannten Entzündungsschüben leiden viele Patienten. Eine chronische Entzündung führt letztendlich zur Zerstörung der Knochen- und Knorpelgewebe sowie der von Chondrozyten gebildeten extrazellulären Gelenkmatrix, welche hauptsächlich aus Kollagen und dem Proteoglykan Aggrecan besteht (57, 61-63).



**Abb.2: Schematische Darstellung eines Kniegelenkes.** aus Smolen, J.S. & Steiner, G Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis, NatRevDrugDiscovery 2, 473-488 (June 2003), leicht verändert.

Bei der Diagnose einer RA kommt neben der radiologischen Beurteilung der Knochengelenksstruktur der Serologie eine besondere Bedeutung zu. Neben der Erfassung allgemeiner Entzündungsparameter, wie der Höhe der Konzentration des C-reaktiven Proteins (CRP), wird vor allem das Auftreten von Autoantikörpern bestimmt. Die meisten RA Patienten

haben Antikörper, die gegen eigene Antikörper des IgG Subtypes gerichtet sind, ausgebildet. Diese Autoantikörper nennt man auch Rheumafaktor (RF). Des Weiteren bilden ca. 70% der RA Patienten Antikörper gegen *citruillinated cyclic proteins* (anti-CCP). Allerdings sind weder RF noch anti-CCP für RA spezifisch noch scheinen sie essentiell zu sein, da sie nicht bei allen RA Patienten vorkommen (64-66). Bei einigen RA Patienten lassen sich ebenfalls autoreaktive T-Zellen, die gegen Gelenksproteine, wie Kollagen oder Proteoglykan, gerichtet sind, nachweisen. Letztendlich bleibt allerdings der genaue Beitrag am Krankheitsverlauf dieser autoreaktiven T-Zellen sowie auch der Autoantikörper bisher unklar (67-69).

## 2.1 Tiermodelle für die Rheumatoide Arthritis – die Antigen-induzierte Arthritis

Um *in vivo* Experimente durchführen zu können, wurden zahlreiche vorklinische Tiermodelle für RA etabliert. Die am besten untersuchten Tiermodelle sind die Kollagen-induzierte Arthritis, die Proteoglykan-induzierte Arthritis und die Antigen-induzierte Arthritis (70-73). Im murinen Model der **Kollagen-induzierten Arthritis (CIA)** werden DBA/1 oder C57Bl/6 Mäuse subkutan mit bovinem Kollagen2 in *Complete Friends Adjuvant* (CFA) immunisiert. Durch Kreuzreaktion mit murinem Kollagen entwickeln die Mäuse eine RA-ähnliche Entzündung aller Gelenke, einhergehend mit der Zerstörung von Knorpelschichten.

Ähnlich hierzu wird im Model der **Proteoglykan-induzierten Arthritis (PGAI)** mit einem artfremden Protein der extrazellulären Matrix immunisiert, vornehmlich Aggrekan, welches durch Kreuzreaktion mit dem körpereigenen Proteoglykan zu einer Polyarthritits der Gelenke führt, ähnlich wie bei der CIA.

Das Modell der **Antigen-induzierten Arthritis (AIA)** wurde erstmals im Jahr 1977 beschrieben (74-76). Im Gegensatz zu den anderen beiden Tiermodellen wird bei einer AIA mit dem gelenkfremden Antigen Bovines Serum Albumin (BSA) gearbeitet. Nach wiederholter s.c. Immunisierung mit einer Emulsion aus BSA und CFA, wird lediglich eine lokale Arthritis durch intra-artikuläre (i.a.) Knieinjektion mit BSA ausgelöst, die in ihrer Pathologie der Erkrankung der humanen RA gleicht, einschließlich der Knorpel- und Knochendestruktion. Um das Antigen BSA möglichst lokal in der stark negativ geladenen Gelenksmatrix zu halten, wird es vorher mit positiv geladenen Methylresten beladen und so als methyliertes BSA (metBSA) eingesetzt. Nach der Induktion der Arthritis entsteht zunächst in der akuten Phase eine durch granulozytäre Infiltrate gekennzeichnete Entzündung im betroffenen Kniegelenk, wobei das Gelenk anschwillt. Mit dem Rückgang der Gelenkschwellung entwickelt sich nach 7 bis 21 Tagen die chronische Phase der AIA, die durch eine hyperplastische Synovialmembran, Aktivierung von Fibroblasten und mononukleare Zellinfiltrate gekennzeichnet ist. Letztendlich führt die chronische Entzündung zu einer Zerstörung von Knorpel- und Knochenschichten. Es

wurde bereits beschrieben, dass B-Zellen und CD8<sup>+</sup> T-Zellen für die Ausbildung einer AIA nicht von Bedeutung sind, jedoch CD4<sup>+</sup> T-Zellen zur Entstehung der Krankheit beitragen (77). Bisher bleibt aber unklar, in welchem Stadium der Krankheit Helfer-T-Zellen für den Krankheitsverlauf wichtig sind und welche Subpopulation von Th-Zellen daran beteiligt ist. Im Verlauf dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das pro-inflammatorische Zytokin TNF- $\alpha$  zwar für die Ausbildung der akuten Krankheitsphase verantwortlich ist, jedoch für die Entwicklung einer chronischen AIA nicht TNF- $\alpha$ , sondern das inflammatorische Zytokin IL-17 wichtig ist. Aus diesem Grund sollte die Bedeutung von Th17-Zellen, die sowohl TNF- $\alpha$  als auch IL-17 produzieren, für die Entstehung einer Arthritis analysiert werden. Für die Experimente der vorliegenden Arbeit wurde dafür das Tiermodell der Antigen-induzierten Arthritis gewählt, weil durch einfache Modifikation des Protokolls, durch die Ersetzung des Antigens BSA mit OVA, die Rolle von Th-Zellen mithilfe von antigenspezifischen T-Zellen untersucht werden konnte. Da die Arbeit mit antigenspezifischen Helfer-T-Zellen auch für eine spätere zelluläre Therapie der RA von Vorteil ist, wurde mithilfe des adoptiven Transfers von Ovalbumin-spezifischen T-Zellen gearbeitet (78). Die Antigen-induzierte Arthritis war aus diesem Grund das bevorzugte Tiermodell.

## 2.2 Die Rolle von T-Zellen bei der Rheumatoiden Arthritis

Bereits in den 1970-er Jahren wurden T-Zellen als die dominante Lymphozytenpopulation im Synovialgewebe von RA Patienten beschrieben (79). Ebenfalls legt die genetische Prädisposition durch das HLA-DR4 Allel eine Beteiligung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen an der Krankheitsentstehung bzw. -aufrechterhaltung nahe (68, 80, 81). Bei einigen vorklinischen Mausmodellen für RA lässt sich eine genetische Komponente bezüglich des MHCII Haplotypes ebenso feststellen. So lässt sich nur in Mäusen mit den Haplotypen H-2<sup>q</sup>, H-2<sup>b</sup> und H-2<sup>s</sup>, wie z.B. DBA/1 und C57Bl/6 Mäusen, eine CIA auslösen, jedoch z.B. nicht in Balb/c Mäusen mit dem Haplotyp H-2<sup>d</sup>. Im K/BxN Arthritismodell wird der MHCII Haplotyp I-A<sup>g7</sup> benötigt, damit sich die Krankheit manifestiert. Hier entwickelt die F1 Generation der Kreuzung aus KRN TZR transgenen Mäusen mit NOD Mäusen spontan Arthritis in den Gelenken. Der KRN TZR kreuzreagiert hierbei mit dem ubiquitär exprimierten Protein Glukose-6-Phosphat-Isomerase (G6PI), welches allerdings auf dem MHCII Haplotyp der NOD-Mäuse präsentiert werden muss. Transgener TZR und der MHCII Haplotyp I-A<sup>g7</sup> sind also ausreichend, um eine Arthritis in Mäusen auszulösen (70, 82, 83).

T-Zell-Depletionen in CIA und AIA mit anti-CD4 Antikörpern brachten deutliche Verbesserungen des Krankheitsverlaufes. Jedoch ließen sich diese positiven Ergebnisse nicht auf den Menschen übertragen, da Studien mit CD4 depletierenden Antikörpern unterschiedliche und unklare Ergebnisse hervorbrachten (84-90). Letztendlich ist es die

Anwesenheit der pro-inflammatorischen Zytokine IL-17, TNF- $\alpha$ , IL-6 und IFN- $\gamma$ , welche teilweise oder überwiegend von Helfer-T-Zellen sekretiert werden, die auf eine wichtige Rolle von CD4+ T-Zellen bei der RA hindeuten. TNF- $\alpha$  und IL-6 stehen zusammen mit IL-1 $\beta$  im Zentrum der pro-inflammatorischen Zytokinkaskade und können sich auch gegenseitig induzieren (25, 30, 34, 35, 91). Alle drei Zytokine sind in erhöhter Konzentration sowohl im Serum von an Arthritis erkrankten Mäusen als auch in der Synovialflüssigkeit von RA Patienten vorhanden und können in ihren Zielzellen Chemokinausschüttungen induzieren, die zur Rekrutierung von Neutrophilen und anderen Zellen in den Entzündungsherd führen. Gleichzeitig können lokale Zielzellen, wie Endothelzellen, Fibroblasten oder Synovialzellen aktiviert werden und somit zur Proliferation sowie Zytokinausschüttung angeregt werden (23, 57, 92). IL-17 und TNF- $\alpha$  können zusätzlich direkt zur Knochendestruktion beitragen, in dem sie die Expression von *Receptor Activator of NF $\kappa$ B Ligand* (RANKL) auf unterschiedlichen Zelltypen induzieren. Die Interaktion von RANK auf Monozyten-Vorläuferzellen und RANKL führt zur vermehrten Bildung von Osteoklasten, welche für den Knochenabbau zuständig sind (33, 93-96).

Da für eine Therapie der RA eine Depletion aller CD4+ T-Zellen nicht praktikabel ist, sollte eine differenziertere Analyse der Bedeutung von Th-Zellen erfolgen. Dabei sollten in der vorliegenden Arbeit die Fragen analysiert werden, welche Th-Subpopulationen für den Verlauf einer Arthritis von Bedeutung sind und für welche Phasen einer Arthritis Th-Zellen wichtig sind.

### **2.3 Die Rolle von B-Zellen bei der Rheumatoiden Arthritis**

Die Rolle von B-Zellen bei der RA ist weit weniger klar. Hauptsächlich rückt hier die Produktion von Autoantikörper in den Fokus. Das Vorhandensein von RF und anti-CCP Antikörpern ist ein deutlicher, jedoch kein eindeutiger Beleg für eine Erkrankung (64, 66). Zwar wurde sowohl eine direkte Korrelation der Konzentration von Autoantikörpern mit der Schwere des Krankheitsverlaufes als auch eine Vorhersagemöglichkeit des Auftretens von RA durch vorhandene anti-CCP Antikörper beschrieben (64, 65). Jedoch besteht weiterhin Unklarheit darüber, ob Autoantikörper direkt an der Krankheitsentstehung beteiligt sind oder lediglich als Sekundäreffekt des Krankheitsverlaufes auftreten. Im K/BxN Arthritismausmodell jedoch lässt sich eine Arthritis einzig durch Gabe von anti-G6PI Antikörpern auf naive Mäuse übertragen. Hier reichen also Antikörper aus, um die Krankheit zu induzieren (59, 97).

Ob andere Funktionen von B-Zellen, wie z.B. die Antigenpräsentation für T-Zellen, ebenfalls eine Rolle spielen, bleibt bisher unklar. Jedoch können B-Zellen ebenfalls pro-inflammatorische Zytokine, wie TNF- $\alpha$ , sekretieren und somit zur Entzündungsreaktion beitragen (62, 64). Dies kann auch dann z.B. der Fall sein, wenn B-Zellen antigenunspezifisch

über TLR aktiviert werden. In jedem Fall lässt sich durch *in vivo* Depletion der B-Zellen durch einen monoklonalen Antikörper bei vielen RA Patienten eine deutliche Verbesserung der Erkrankung erreichen (siehe Abschnitt I 2.5.3). Dies deutet auf eine entscheidende Rolle von B-Zellen, zumindest bei der Aufrechterhaltung der Krankheit hin (98, 99).

## 2.4 Die Rolle weiterer Immunzellen bei der Rheumatoiden Arthritis

Granulozyten und Makrophagen sind in großem Maße an zellulären Infiltraten in der akuten bzw. in der chronischen Phase der Arthritis beteiligt. Sie können sich durch Zytokinproduktion oder auch Antigenpräsentation aktiv am Entzündungsprozess beteiligen (61, 100). Ihre Mobilisierung bzw. Homeostase hängt zu großen Teilen von den *Colony-Stimulating Factors* (CSF) ab, im Besonderen von *Granulocyte-Macrophage-CSF* (GM-CSF) und *Macrophage-CSF* (M-CSF).  $Csf1^{op}/Csf1^{op}$  Mäusen, welche kein M-CSF produzieren können, fehlen die meisten Makrophagenpopulationen, einschließlich der Osteoklasten. GM-CSF<sup>-/-</sup> Mäuse besitzen zwar eine fast normale Anzahl an Granulozyten, jedoch wurde berichtet, dass inflammatorische Granulozyten und Makrophagen in Entzündungsstellen in erhöhtem Maße von CSF abhängen. Dementsprechend sind beide *knockout* (k.o.) Mäuse resistent gegen die Ausbildung von CIA und AIA, bzw. zeigen deutlich abgemilderte Symptome, einhergehend mit einer verminderten Anzahl an Granulozyten- bzw. Makrophageninfiltraten (101). Die Neutralisierung beider CSF in Wildtypmäusen zeigte ebenfalls einen stark abgeschwächten Krankheitsverlauf, wohingegen die systemische Gabe von GM-CSF sowohl beim Menschen als auch im Mausmodell eine Verschlechterung der Arthritis hervorruft. Folglich spielen Granulozyten und Makrophagen eine bedeutende Rolle im Krankheitsverlauf. Die Neutralisierung von CSF beim Menschen befindet sich derzeit in der klinischen Erprobungsphase (101).

## 2.5 Bisherige Behandlungsmethoden der RA

### 2.5.1 Glukokortikoide und DMARD's

**Glukokortikoide** zählen zu den ersten immunsuppressiven Medikamenten, die bei RA Patienten zur Anwendung kamen. Die allgemeine entzündungshemmende Wirkung von Substanzen wie Prednisolon oder Kortison ist allerdings von zahlreichen Nebenwirkungen begleitet. Hierzu zählt vor allem die Gefahr der Knochenentmineralisierung (102, 103).

Basistherapeutika oder *disease modifying antirheumatic drugs* (**DMARD's**) sind langsam wirkende anti-rheumatische Medikamente, die krankheitsbegleitende Symptome, wie Knochen- und Knorpelzerstörung, aufhalten können. Da sie meist in den Zellzyklus oder direkt in den Stoffwechsel eingreifen, sind dadurch vor allem Zellen mit erhöhtem Zellstoffwechsel,

wie aktivierte T-Zellen u.a. Immunzellen, betroffen. Die geläufigsten DMARD's sind Methotrexat, Cyclosporin, Cyclophosphamid und Sulfasalazin (104, 105).

### **2.5.2 anti-TNF- $\alpha$ Therapie**

Die häufige Therapieform bei der Behandlung der RA ist die Neutralisation des pro-inflammatorischen Zytokins TNF- $\alpha$ . Mit Infliximab (ein Mensch/Maus chimärer anti-TNF- $\alpha$  Antikörper), Etanercept (ein Fusionsprotein aus löslichem TNF-Rezeptor II und humanem IgG-Fc-Teil) sowie Adalimumab (humanisierter anti-TNF- $\alpha$  Antikörper) stehen wirksame Medikamente zur Verfügung. Meist in Kombination mit DMARD's, wie Methotrexat, gegeben, lassen sich bei vielen Patienten Krankheitssymptome lindern oder Krankheitsschübe sogar verhindern. Jedoch sprechen ca. 40% aller RA Patienten nicht auf eine solche Therapie an. Des Weiteren lässt die Wirkung einiger anti-TNF- $\alpha$  Medikamente bei vielen Patienten nach langjähriger Behandlung nach, was die Entwicklung neuer Medikamente unabdingbar macht (106-111).

### **2.5.3 anti-B-Zell Therapie**

Bei vielen Patienten, die unempfindlich für eine anti-TNF- $\alpha$  Therapie sind, steht die ebenfalls sehr wirksame und nebenwirkungsarme Behandlung mit Rituximab (ein Mensch/Maus chimärer anti-CD20 Antikörper) im Vordergrund. Mit dieser Methode lassen sich sehr spezifisch B-Zellen depletieren, jedoch bleiben CD20- Plasmazellen unbeeinflusst. Andere anti-CD20 Antikörper, wie Ocrelizumab und Ofatumumab, befinden sich in der klinischen Testphase, genau wie der B-Zell-spezifische Antikörper Epratuzimab (humanisierter anti-CD22 Antikörper) (99, 104, 112).

Die Aktivität und das Überleben von B-Zellen versucht man durch Neutralisierung der TNF-Familien Proteine BAFF und APRIL zu beeinflussen. Belimumab (ein humanisierter anti-BAFF Antikörper) und Atacicept (ein Fusionsprotein aus löslichem BAFF/APRIL-Rezeptor und humanem IgG-Fc-Teil) werden zurzeit in klinischen Studien getestet (98, 113).

In vorklinischen Studien wird ebenfalls eine Blockade der T-Zell-B-Zell-Interaktion durch Antikörper, die gegen CD40 und CD40L gerichtet sind, untersucht (113, 114).

### **2.5.4 Weitere Therapien und Versuchsstudien**

Zurzeit werden in klinischen Studien weitere Substanzen auf ihre Wirksamkeit hin untersucht. Bisher erfolgreich getestet wurden Abatacept, ein CTLA4-IgG Fusionsprotein, das CD28 bindet und somit das für die T-Zell-Aktivierung wichtige Kostimulationssignal CD28-B7 unterbindet und Tocilizumab, ein humanisierter anti-IL-6 Antikörper (92, 104, 115).

**Ziele der Arbeit**

Die Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine weit verbreitete schwere Erkrankung mit autoimmunem Charakter, die zu chronischen Entzündungen und ausgeprägten Destruktionen in den Gelenkbereichen führt. Bisherige Therapien beschränken sich auf die allgemeine Suppression des Immunsystems sowie Neutralisation oder Depletion von Zytokinen oder ganzen Zellpopulationen. Dies kann schwere Nebenwirkungen haben. Außerdem zeigen die vorhandenen Therapiemöglichkeiten bei einem Teil der RA Patienten keine Auswirkung auf die Krankheitsentwicklung. Aus diesem Grund muss eine differenziertere Betrachtung der Krankheitspathologie erfolgen. Um mögliche neue Therapieformen zu entwickeln, ist ein genaues Verständnis der Rolle einzelner Zellpopulationen unerlässlich, damit potentielle pathogene Populationen gezielt „bekämpft“ werden können, ohne unbeteiligte oder sogar protektive Populationen negativ zu beeinflussen.

CD4+ Helfer-T-Zellen (Th-Zellen) stellen ein gutes Ziel für eine mögliche zelluläre Therapie dar, da in vielen Krankheitsmodellen sowohl pathogene/pro-inflammatorische als auch protektive/anti-inflammatorische Helfer-T-Zell-Subpopulationen eine wichtige Rolle spielen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es daher, den genauen Beitrag von unterschiedlichen Th-Zell-Subpopulationen an der Pathologie einer Arthritis im Tiermodell zu analysieren. Dazu soll zunächst ein murines Arthritismodell etabliert werden, mit dessen Hilfe sich der Einfluss von Helfer-T-Zellen auf die einzelnen Phasen einer Arthritis näher charakterisieren lässt. Das Tiermodell der Antigen-induzierten Arthritis (AIA) wurde dazu gewählt, da die Pathologie einer AIA der Pathologie einer RA sehr ähnlich ist. Außerdem kann durch eine geeignete Wahl des induzierenden Antigens mithilfe von antigenspezifischen T-Zellen die Auswirkung eines adoptiven Transfers von Th-Zellen auf die Induktion und den Verlauf einer AIA ermittelt werden. Im speziellen soll im Mittelpunkt der Arbeit eine Charakterisierung der pro-inflammatorischen Fähigkeiten von Th1- und Th17-Zellen im Modell der AIA stehen. Es soll untersucht werden, ob und unter welchen Umständen sich Th-Zellen pathogen verhalten sowie zu welchen Phasen einer AIA Th-Zellen beitragen. Hierfür soll die akute und die chronische Phase einer AIA näher analysiert werden.

Durch diese Arbeit soll ein besseres Verständnis der pathogenen Eigenschaften von Th-Zell-Subpopulationen bei einer Arthritis erzielt werden, um in Zukunft gezielt therapeutisch auf pathogene wirkende pro-inflammatorische Zellen einzuwirken.

## II Methoden und Materialien

### 1. Allgemeine Methoden und Materialien

#### 1.1 Verwendete Mausstämme

Für die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden folgende Mausstämme verwendet: Balb/c Wildtyp (BFR Berlin) (116), C57Bl/6 Wildtyp (BFR Berlin) (117), DO11.10 (OVA-TZR transgen, Balb/c Hintergrund, eigene Zucht) (78), OT-II (OVA-TZR transgen, C57Bl/6 Hintergrund, eigene Zucht) (118), T-bet<sup>-/-</sup> (Balb/c Hintergrund, eigene Zucht) (119), TNF- $\alpha$ <sup>-/-</sup> (freundliche Gabe von S. Nedospasov, DRFZ Berlin, C57Bl/6 Hintergrund) (120), Blimp1<sup>-/-</sup> (freundliche Gabe von K. Calame, New York, USA, C57Bl/6 Hintergrund) (121), JHT<sup>-/-</sup> Mäuse (C57Bl/6 Hintergrund, eigene Zucht) (122) und tet-LPOVA Mäuse (generiert von Katharina Hein und Sven Kracker am DRFZ Berlin, eigene Zucht, C57Bl/6 Hintergrund) (123). Alle Mäuse wurden in der Tierversuchsanstalt des Bundesinstitutes für Risikobewertung (BfR) in Berlin-Marienfelde unter *specific pathogen free* (spf) Bedingungen gehalten und im Alter von 6-10 Wochen verwendet. Alle Experimente waren durch das Landesinstitut für Gesundheit und Soziales (LaGeSo) genehmigt und wurden unter Beachtung der Tierschutzrichtlinien durchgeführt.

#### 1.2 Verwendete Puffer und Medien

- Boratpuffer pH 8.5 für ELISA:
  - 100 mM Borsäure
  - 25 mM di-Natrium-Tetraborat
  - 75 mM Natriumchlorid
- Eosinlösung für H/E-Färbung:
  - 1.25% (w/v) Eosin
  - 70% absoluter Ethanol
- Gel-Ladepuffer für Agarosegele:
  - 50% Glycerin
  - 100 mM Tris/HCL pH 7.5
  - 1% (w/v) Orange G
- Hämatoxilinlösung für H/E-Färbung:
  - 0.2% (w/v) Hämatoxilin
  - 1.26 mM Natriumiodat
  - 131.75 mM Aluminiumkalisulphat
  - 377.87 mM Chloralhydrat
  - 6.5 mM Zitronensäure

- Lysepuffer für Erythrozyten: 10 mM Kaliumhydrogencarbonat  
155 mM Ammoniumchlorid  
0.1 mM EDTA
- Lysepuffer für Genotypisierung: 50 mM Tris/HCl pH 8.0  
100 mM EDTA  
100 mM Natriumchlorid  
1% (w/v) Natriumdodecylsulphat (SDS)
- PBA: PBS/BSA + 0.02% (w/v) Natriumazid
- PBS pH 7.2: 136.89 mM Natriumchlorid  
2.68 mM Kaliumchlorid  
1.47 mM Kaliumdihydrogenphosphat  
8 mM di-Natriumhydrogenphosphat
- PBS/BSA: PBS + 0.2% (w/v) BSA
- TMB-Substratpuffer pH 5.5: 0.051 mM di-Natriumhydrogenphosphat  
0.025 mM Zitronensäure

### 1.3 Verwendete Chemikalien und Reagenzien

10xPCR Puffer	Rapidozym, Berlin
2-Mercaptoethanol	SIGMA-Aldrich, St. Louis, USA
Agarose	Cambrex Bio Science, Rockland, USA
Aluminiumkalisulphat	Merck, Darmstadt
Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl)	SIGMA
Ampholytlösung pH 3-10	SIGMA
Ampholytlösung pH 9-11	SERVA, Heidelberg
Borsäure	Merck
Bovines Serumalbumin (BSA)	SIGMA
BrefeldinA	SIGMA
Chloralhydrat	Roth, Karlsruhe
Coomassie	SIGMA
Croceinscarlett	SIGMA

di-Natriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	Roth
di-Natrium-Tetraborat ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ )	SIGMA
3-Dimethylamino-1-propylamin (DMPA)	SIGMA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
Doxycyclin	SIGMA
1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC)	Pierce, Rockford, USA
EDTA-Entkalkungslösung	Herbeta-Arzneimittel, Berlin
EDTA	Merck
Eosin	Merck
Essigsäure	Merck
Ethanol	Roth
Faststart <i>Real Time</i> -PCR Reaktionsmix	Roche, Mannheim
Formaldehyd	Roth
Fötale Kälberserum (FCS)	SIGMA
Gelatine	SIGMA
Glycerin	Roth
Hämatoxilin	Merck
Histopaque <sup>®</sup>	SIGMA
Ionomycin	SIGMA
Isofluran-Baxter	Baxter, Unterschleißheim
Isopropanol	Roth
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Kaliumhydrogencarbonat ( $\text{KHCO}_3$ )	SIGMA
Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	Roth
Kanadabalsam	Roth
Kupfersulphat ( $\text{CuSO}_4$ )	Merck
Magnesiumchlorid ( $\text{MgCl}_2$ , PCR)	Rapidozym
mRNA-Isolierungskit	Qiagen, Hildesheim
Natriumazid	SIGMA
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Natriumiodat ( $\text{NaIO}_3$ )	Merck
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth
Orange G	SIGMA

Ova <sub>323-339</sub> Peptid	AG Mol. Bibliotheken, Charité Berlin
Ovalbumin (OVA)	SIGMA
Paraffin	Roth
PMA	SIGMA
Proteinase K	Roche
Reverse Transkriptionskit	Roche
rhuTGF- $\beta$	R&D Systems, Minneapolis, USA
rmIL-12	R&D Systems
rmIL-2	R&D Systems
rmIL-23	R&D Systems
rmIL-6	R&D Systems
Saponin	SIGMA
Sodiumdodecylsulphat (SDS)	SIGMA
Sulfosalicylsäure	SIGMA
Taq-Polymerase	Rapidozym
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidinedihydrochloride (TMB)	SIGMA
Trichloressigsäure	Merck
Tris/HCl	Roth
Tween	SIGMA
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Merck
Xylol	Roth
Zitronensäure	SIGMA

Tabelle1: Verwendete Chemikalien und Reagenzien.

#### 1.4 Verwendete Antikörperkonjugate und Sekundärreagenzien

anti-CD25-Biotin/-APC (PC61)	BD Pharmingen <sup>TM</sup> , Franklin Lakes, USA
anti-CD28 NA/LE (37.51)	BD Pharmingen <sup>TM</sup>
anti-CD3 NA/LE (145-2C11)	BD Pharmingen <sup>TM</sup>
anti-CD4-FITC (L3T4)	BD Pharmingen <sup>TM</sup>
anti-CD4 Microbeads (L3T4)	Miltenyi-Biotec, Bergisch-Gladbach
anti-CD4-PerCP (RM4-5)	BD Pharmingen <sup>TM</sup>
anti-CD45.1-APC (A20)	BD Pharmingen <sup>TM</sup>

anti-CD45.2-FITC (104)	BD Pharmingen <sup>TM</sup>
anti-CD62L-PE (MEL-14)	BD Pharmingen <sup>TM</sup>
anti-CD62L Microbeads (MEL14-H2.100)	Miltenyi-Biotec
Anti-CD90 Microbeads (30-H12)	Miltenyi-Biotec
anti-FITC Multisort-Beads	Miltenyi-Biotec
anti-IFN- $\gamma$ (AN18.24.17)	eigenes Hybridom
anti-IFN- $\gamma$ -APC (XMG1.2)	BD Pharmingen <sup>TM</sup>
anti-IL-2-FITC (JES6-5H4)	BD Pharmingen <sup>TM</sup>
anti-IL-4 (11B11)	eigenes Hybridom
anti-IL-4-PE (BVD4-1D11)	BD Pharmingen <sup>TM</sup>
anti-IL-5-PE (TRFK5)	BD Pharmingen <sup>TM</sup>
anti-IL-6-PE (MP5-20F3)	BD Pharmingen <sup>TM</sup>
anti-IL-10-APC (JES5-16E3)	BD Pharmingen <sup>TM</sup>
anti-IL-12 (C17.8)	eigenes Hybridom
anti-IL-13-PE (38213.11)	eigenes Hybridom
anti-IL-17 (TC11-18H10.1)	Miltenyi-Biotec
anti-IL-17-FITC/-APC (TC11-18H10.1)	Biozol, Eching
anti-MHCII Microbeads (M5/114.15.2)	Miltenyi-Biotec
anti-MHCII-FITC/-Cy5 (M5/114)	eigenes Hybridom
anti-TNF- $\alpha$ -PE (MP6-XT22)	BD Pharmingen <sup>TM</sup>
ELISA Detektionsantikörper anti-murine Ig	SouthernBiotech, Birmingham, USA
Enbrel <sup>®</sup>	freundliche Gabe von AG Nedospasov, DRFZ
Isotypkontrolle Ratten IgG1-FITC/-PE/-APC (R3-34)	BD Pharmingen <sup>TM</sup>
Streptavidin-PE/-APC	BD Pharmingen <sup>TM</sup>

Tabelle2: Verwendete Antikörperkonjugate und Sekundärreagenzien.

### 1.5 Magnetische Zellsortierung (MACS) von CD4+CD62L+ naiven T-Zellen

Das **Prinzip** der MACS-Technik besteht darin, ausgesuchte Zellen mit paramagnetischen Beads zu markieren und von der restlichen Zellsuspension zu trennen (124). Dazu wird die Zellsuspension über eine Säule, die sich in einem Magnetfeld befindet, gegeben. Die mit paramagnetischen Beads markierten Zellen bleiben in der Säulenmatrix hängen, während nicht markierte Zellen durch die Säule laufen. Die paramagnetischen Beads können sowohl direkt an Primärantikörper als auch an Sekundärreagenzien, z.B. Streptavidin, gekoppelt

werden. Mit dieser Methode lassen sich durch Parallelsortierung schnell und kostengünstig Zellpopulationen anreichern oder rein sortieren. Die Sortierung kann dabei auch automatisch mithilfe des AutoMACS Gerätes erfolgen.

Bei den folgenden beschriebenen Experimenten bestand ein Waschschrift immer darin, das Falcongefäß mit PBS/BSA aufzufüllen, bei 350xg für 8 min. bei 4°C abzuzentrifugieren und das Pellet in PBS/BSA zu resuspendieren. Die Färbung und Sortierung erfolgte in PBS/BSA.

Für eine **MACS-Sortierung auf CD4+CD62L+ naive T-Zellen** wurde eine Zellsuspension aus Milz- und Lymphknotenzellen zunächst mit anti-CD4-FITC für 10 min. auf Eis gefärbt. Nach dem Waschen wurden die Zellen mit 1:10 verdünnten anti-FITC Multisort-Beads 15 min. im Kühlschrank inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde die Zellsuspension über eine LS MACS-Säule gegeben, die negative Fraktion aufgefangen und die positive Fraktion mit 5 ml PBS/BSA von der Säule eluiert. Danach wurden mithilfe des Multisort-Release-Reagenz' (1:10) die anti-FITC Beads in der CD4 Positivfraktion für 30 min. bei 4°C abgelöst. Die CD4+ Zellen wurden nach dem Waschen mit anti-CD62L Beads (1:10) für 15 min. bei 4°C inkubiert und die positiven Zellen auf einer LS MACS-Säule sortiert. Die erhaltenen CD4+CD62L+ Zellen, die eine routinemäßige Reinheit von 99.5% aufwiesen, wurden für *in vitro* Kulturen eingesetzt. Aus der CD4 Negativfraktion wurden mithilfe von anti-MHCII Beads (1:10) ähnlich der CD62L Sortierung APZ mit einer Reinheit von 99% sortiert und ebenfalls für Zellkulturen genutzt.

## 1.6 Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS) von CD4+CD25+ Treg

Das **Prinzip** der Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung (FACS) beruht auf der Markierung von Immunzellen mit Fluoreszenzfarbstoffen, die dann durch Laser angeregt werden. Die emittierenden Strahlen können dann detektiert und jeder einzelnen Zelle zugeordnet werden und, wenn gewünscht, auch nach diesen sortiert werden (125).

Zunächst werden Zellen in einer Zellsuspension mit an Fluorochrome gekoppelten Antikörpern markiert. Dabei kann die Markierung auch über Sekundärkonjugate (z.B. Streptavidin) erfolgen, wenn der Primärantikörper an ein Hapten, wie z.B. Biotin, gekoppelt ist. Beim Messen an einem FACS-Calibur Gerät (BD Bioscience) passieren die markierten Zellen in einem konstanten Flüssigkeitsstrom liegend zwei nacheinander angeordnete Laser, einen Argon- und einen Diodenlaser mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm bzw. 635 nm. Die Emission des Fluoreszenzlichtes kann nun von einem Detektor erfasst werden. Zusätzlich wird das dabei in einem Winkel von 3° bis 10° gestreute Licht als Vorwärtsstreulicht (FSC) sowie das in einem Winkel von 90° reflektierte Licht als Seitwärtsstreulicht (SSC)

aufgenommen. FSC und SSC korrelieren dabei mit der Zellgröße bzw. mit der Granularität der Zellen. Durch verschiedene Detektionsfilter lässt sich in vier verschiedenen Kanälen emittiertes Fluoreszenzlicht aufnehmen, 530 nm (FL1), 585 nm (FL2), 650 nm (FL3) und 661 nm (FL4), wobei die Anregung bei FL1-FL3 durch den 488 nm und bei FL4 durch den 635 nm Laser erfolgt. Folgende Fluorochrome wurden verwendet:

<b>Fluorochrom</b>	<b>Anregung</b>	<b>Emission</b>
FITC	488 nm	530 nm
PE	488 nm	585 nm
PI	488 nm	650 nm
PerCP	488 nm	678 nm
APC/Cy5	635 nm	661 nm

Jeder einzelnen Zelle kann nun für jeden Kanal eine Emissionsintensität zugeordnet werden. Insgesamt lassen sich damit an einem FACS-Calibur sechs Parameter (FL1-4, FSC, SSC) gleichzeitig messen. Sollen die Zellen schließlich nach einem bestimmten Kriterium, z.B. CD25+, sortiert werden, wird jede Zelle, die für dieses Kriterium ein positives Signal zeigt, durch eine kurze elektrische Aufladung abgelenkt und dann in ein separates Röhrchen sortiert. Die Sortierung von Treg erfolgte bei dieser Arbeit mit einem ARIA II Sorter (BD).

Die Auswertung der Daten erfolgte mit der FlowJo Software, wobei die Darstellung entweder durch Dot Plots (zwei Parameter für jede Zelle dargestellt) oder durch Histogramme (ein Parameter gegen die Zellzahl aufgetragen) erfolgte. FSC und SSC werden dabei in einer linearen Skala gezeigt, die Fluoreszenzkanäle dagegen in einer logarithmischen Skala. Durch das Setzen von Regionen und Gates um die interessanten Zellpopulationen (eingaten) und die Analyse dieser eingegateten Zellen hinsichtlich weiterer Parameter, lassen sich einzelne Zellpopulationen detailliert betrachten. In der vorliegenden Arbeit wurde routinemäßig zunächst im FSC/SSC Dot Plot auf die Lymphozytenpopulation gegatet. Anschließend wurden bei allen Analysen außer bei intrazellulären Messungen mithilfe der PI-Färbung die toten Zellen ausgeschlossen.

Für eine **Isolierung von CD4+CD25+ Treg** wurde eine Zellsuspension aus Milz- und Lymphknotenzellen in PBS/BSA zunächst mit anti-CD4-FITC und anti-CD25-APC Antikörpern für 10 min. auf Eis gefärbt. Nach dem Waschen wurden die Zellen mit anti-FITC Microbeads (1:10 verdünnt) für 15 min. bei 4°C markiert und nach erneutem Waschen mit dem AutoMACS auf CD4+ Zellen angereichert. Die auf CD4+ Zellen angereicherte Fraktion wurde dann am ARIA II FACS-Sorter auf CD4+CD25+ sortiert, mit einer Reinheit von 99.9%.

### **1.7 Antikörperfärbung von Zellen zur FACS-Analyse (Durchflusszytometrie)**

Bei den folgenden beschriebenen Experimenten bestand ein Waschschrift immer darin, das Eppendorfggefäß mit PBA aufzufüllen, bei 2300 rpm für 6 min. bei 4°C abzuzentrifugieren und das Pellet in PBA zu resuspendieren. Die Färbung erfolgte in PBA.

Eine Zellsuspension wurde zunächst mit Primärantikörpern für 10 min. auf Eis inkubiert und anschließend gewaschen. War ein zweiter Färbeschrift mit Sekundärkonjugaten nötig, erfolgte dieser ebenfalls für 10 min. auf Eis.

Bei der Analyse der Zellen an einem FACS-Calibur wurden außer bei intrazellulären Färbungen routinemäßig die toten Zellen mit Propidiumiodid (0.33 µg/ml) angefärbt und von der Auswertung ausgeschlossen.

### **1.8 PMA/ionomycin Restimulation *in vitro***

Bei einer PMA/iono *in vitro* Restimulation wurden 2-5x10<sup>6</sup> Zellen aus der Milz oder den relevanten Lymphknoten in 1 ml RPMI Medium in einer 48-Loch Zellkulturplatte für 6 Stunden und mit 10 ng/ml PMA und 1 µg/ml Ionomycin inkubiert. Zwei Stunden nach Stimulationsbeginn wurde für den Rest der Zeit 5 µg/ml BrefeldinA dazugegeben, um die Proteinsekretion zu unterbinden und translatierte Proteine im Zytosol zurückzuhalten.

### **1.9 Intrazelluläre Antikörperfärbung zur FACS-Analyse**

Bei den folgenden beschriebenen Experimenten bestand ein Waschschrift immer darin, das Eppendorfggefäß mit PBA/0.5% Saponin aufzufüllen, bei 2300 rpm für 6 min. bei 4°C abzuzentrifugieren und das Pellet in PBA/0.5% Saponin zu resuspendieren. Die Färbung erfolgte in PBA/0.5% Saponin.

Für eine intrazelluläre Färbung wurden restimierte Zellen zunächst fixiert, da bei der Färbung durch das Detergenz Saponin die Zellmembran durchlässig wird, um die Färbeantikörper zu den intrazellulären Proteinen zu bringen. Die Fixierung erfolgte in 2% Formaldehydlösung in PBS für 20 min. bei RT. Nach dem Waschen wurden die Zellen mit den relevanten Antikörpern für 10 min. auf Eis inkubiert, gewaschen und am FACS Calibur analysiert.

### **1.10 Präparation von murinen Organen**

Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet und relevante Organe präpariert. Die Organe wurden unter sterilen Bedingungen in PBS/BSA durch ein 70 µM Zellsieb (BD Falcon) gedrückt. Die erhaltene Zellsuspension wurde mit PBA/BSA gewaschen (Zentrifugation:

400xg, 8 min. 4°C) und in PBS/BSA aufgenommen. In einer Suspension aus Milzzellen wurden durch Inkubation der Suspension mit Erylysepuffer für 3 min. auf Eis (1 ml Erylysepuffer je  $5 \times 10^7$  Zellen) die Erythrozyten lysiert und durch Waschen der Suspension mit PBS/BSA entfernt.

## **2. Ovalbumin-induzierte Arthritis**

### **2.1 Ovalbumin-induzierte Arthritis in immunisierten Mäusen**

Eine graphische Darstellung des Modells der OIA ist in Abb.3 illustriert (Kapitel III Ergebnisse Teil 1). Zunächst wurden die Mäuse am Tag-21 und am Tag-14 mit 100 µg catOVA in 100 µl Lösung subkutan (s.c.) am Schwanzansatz immunisiert. Das catOVA (Herstellung catOVA, siehe Abschnitt II 2.2) wurde dabei 1:1 mit *complete Freund's adjuvant* (CFA) gemischt und durch Ultraschall eine Emulsion hergestellt. Wenn angegeben, wurde den Mäusen am Tag-7 Blut zur Gewinnung von Serum aus der Schwanzvene entnommen (siehe Abschnitt II 2.10). Am Tag 0 wurde die Arthritis durch die i.a. Injektion von 60 µg catOVA in 20 µl PBS in ein Kniegelenk induziert.

Als Krankheitsparameter wurde zunächst die akute Knieschwellung während der ersten 7-14 Tage mit einem Gelenkmessgerät (Mitutoyo, Neuss) erfasst. Für die histologische Auswertung (siehe Abschnitt II 2.7) wurden dann zu den angegebenen Zeitpunkten die Kniegelenke präpariert. Für eine Bewertung einer chronischen Arthritis wurden die Kniegelenke routinemäßig an den Tagen 19-23 nach Induktion präpariert.

Sämtliche graphischen Auswertungen erfolgten mit der Prism Software.

### **2.2 Herstellung von kationisiertem Ovalbumin (catOVA)**

Damit das in das Kniegelenk injizierte Ovalbumin auch in der negativ geladenen Gelenkmatrix verbleibt, wurde es mit positiv geladenen Seitenketten besetzt. Dazu wurden eine 20 mg/ml OVA-Lösung in PBS, eine 1 M 3-Dimethylamino-1-propylamin (DMPA) -Lösung in PBS und eine 100 mg/ml 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) -Lösung in PBS hergestellt. Bei allen drei Lösungen wurde mit Salzsäure ein pH-Wert von 5 eingestellt. Eine Mischung aus 10 ml OVA-Lösung, 10 ml DMPA-Lösung und 4 ml EDC-Lösung wurde über Nacht bei RT unter rühren inkubiert. Die erhaltene catOVA-Lösung wurde in Dialyseschläuche (Porengröße 32, SIGMA) gefüllt und einmal für 6 Stunden und dann zweimal für 24 Stunden gegen PBS, pH 7.2 dialysiert. Das catOVA wurde dann mithilfe eines 0.22 µm Filters (Sarstedt, Nürnberg) steril filtriert. Anschließend wurde an einem Photometer die Konzentration des Proteines durch Messung der Optischen Dichte (OD) bei 280 nm bestimmt.

Die Reinheit des catOVA wurde mithilfe einer **Iso-elektrischen Fokussierung** (IEF) ermittelt. Durch die Kationisierung wird die Ladung und somit der isoelektrische Punkt des Ovalbumins verändert. Dies kann mithilfe einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese überprüft werden. In dem Gel befindet sich ein pH-Gradient in dem Proteine gemäß ihrem isoelektrischen Punkt aufgetrennt werden können. Der isoelektrische Punkt bezeichnet den pH-Wert, bei dem sich ein Gleichgewicht zwischen positiv und negativ geladenen Seitengruppen am Protein einstellt und somit das Protein die Nettoladung 0 erhält. Erreicht das Protein diesen Punkt, beendet es seine Wanderung im Gel.

Für das Gel mit einem pH-Bereich von 3-11 wurden Ampholytlösungen mit dem pH-Bereich von 3-10 und 9-11 verwendet. Das Gel setzte sich wie folgt zusammen: 2.75 ml Milliporewasser, 1 ml Acrylamid/Bisacrylamid (24.25%/0.75%), 1 ml Glycerin (25%), 170 µl Ampholytlösung pH 3-10, 80 µl Ampholytlösung pH 9-11, 7.5 µl Ammoniumpersulfat (APS, 10%), 25 µl Flavinmononukleotid (FMN, 1%), 1.5 µl TEMED. Das Gel wurde in einer horizontalen Gelkammer des Bio-Rad Mini-Protean II Gel Systems (Biorad, München) gegossen und für 75 min. unter einer UV-Lampe polymerisiert. Jeweils ca. 2-5 µg des Proteins gelöst in 2-5 µl PBS wurden auf das Gel aufgetragen. Das Gel wurde nacheinander für 15 min. bei 100 V, für 15 min. bei 200 V und für 60 min. bei 450 V laufen gelassen.

Das Gel wurde dann für 30 min. in 4% Sulfosalicylsäure/12.5% Trichloressigsäure/30% Methanol bei RT fixiert und anschließend für 1 h in 0.04% Coomassie/0.5% Kupfersulphat/0.05% Croceinscarlet/10% Essigsäure angefärbt. Danach erfolgte das Entfärben des Gels zunächst in 0.5% Kupfersulphat/12% Ethanol/7% Essigsäure, wobei mehrere Male die Entfärbelösung gewechselt wurde. Anschließend erfolgte eine Entfärbung in 25% Ethanol/7% Essigsäure über Nacht, solange bis nur noch die Proteinbanden erkennbar waren. Das Gel wurde dann bei RT getrocknet. Die zu erwartenden Banden befanden sich für Ovalbumin (OVA) bei pH 4.5, für kationisiertes Ovalbumin (catOVA) bei pH 10.5.

### 2.3 Neutralisierung von IL-17 und TNF- $\alpha$ bei der OIA

Um die Rolle von IL-17 bei einer OIA näher zu untersuchen, wurde dieses Zytokin durch einen anti-IL-17 Antikörper (Klon: TC11-18H10, freundliche Gabe von A. Richter, Miltenyi-Biotec, Bergisch-Gladbach) *in vivo* neutralisiert. Dazu wurden pro Maus am Tag+2 und am Tag+5 nach Induktion der OIA jeweils 200 µg des neutralisierenden Antikörpers i.p. injiziert.

Um die Rolle von TNF- $\alpha$  bei einer OIA näher zu untersuchen, wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Sergeij Nedospasov (DRFZ) dieses Zytokin durch Enbrel<sup>®</sup>, einem Fusionsprotein aus löslichem TNF- $\alpha$  Rezeptor II und humanem Fc-Teil, *in vivo* neutralisiert. Dazu wurde am Tag-1 pro Maus 1 mg Enbrel<sup>®</sup> i.p. appliziert.

## 2.4 *In vitro* Stimulation von CD4+CD25+ regulatorischen T-Zellen

Für die CD4+CD25+ Treg *in vitro* Voraktivierung wurden zunächst 24-Loch Zellkulturplatten mit 10 µg/ml anti-CD3 NA/LE Antikörper in 250 µl PBS über Nacht bei 4°C beschichtet. Danach wurden die Platten dreimal mit RPMI Medium gewaschen.  $2 \times 10^6$  Treg/ml wurden in den beschichteten Platten mit 50 ng/ml rmlL-2 für 20-24 Stunden inkubiert, anschließend mit PBS gewaschen und transferiert.

## 2.5 Präparation von Kniegelenken und Herstellung von Paraffinschnitten

Für eine histologische Analyse wurden die Kniegelenke an den angegebenen Zeitpunkten zunächst präpariert und für 24 Stunden in 10% Formalinlösung in PBS fixiert. Anschließend wurden die Gelenke für 14 Tage bei 56°C in gesättigter EDTA-Lösung entkalkt, in einem Entwässerungsautomaten entwässert und dann an einem Einbettungsautomaten (Shandon/Thermo Electron Corporation) in Paraffin eingebettet. An einem Mikrotom CP60 (Microm) wurden 2-4 µm dicke Paraffinschnitte hergestellt. Diese wurden zuerst in kaltem dann in warmem Wasser gestreckt, auf Objektträger gebracht und getrocknet.

## 2.6 Hämatoxilin/Eosin-Färbung von Kniegelenksschnitten

Zur Beurteilung der Krankheitsstärke wurden in den auf Objektträger getrockneten Gelenkschnitten alle Zellkerne mit Hämatoxilin und alle Proteine mit Eosin angefärbt. Für diese Hämatoxilin/Eosin Färbung (**H/E-Färbung**) wurden die auf Objektträgern fixierten Paraffinschnitte zunächst für 10-15 min. bei 70°C in einem Wärmeinkubator erhitzt und das geschmolzene Paraffin anschließend durch Inkubation in Xylol für 5 min. entfernt. Danach wurden die Gelenkschnitte für 30 sec. in Xylol gewaschen und dann in einer absteigenden Ethanolreihe (100%, 95%, 70%, Milliporewasser) rehydriert. Anschließend wurden die Schnitte für 4 min. in Mayer's Hämatoxilinlösung inkubiert und danach der Farbstoff für 4 min. in warmem Leitungswasser entwickelt. Es folgte die Färbung in alkoholischer Eosinlösung für 4 min. und das Waschen der Objektträger in warmem Leitungswasser und Milliporewasser. In einer anschließenden aufsteigenden Ethanolreihe (70%, 90%, 100%) wurde die Gelenkschnitte entwässert, schließlich in Xylol für 2x 30 sec. inkubiert und mit Kanadabalsam eingebettet.

## 2.7 Ermittlung des Histologiescores

Die H/E gefärbten Gelenkschnitte wurden nach mehreren Kriterien bewertet und daraus der **Histologiescore** gebildet. Dieser setzt sich aus drei Komponenten zusammen: die akuten Symptome, die chronischen Symptome und die Knochen- und Knorpelzerstörung. Die einzelnen Kriterien wurden wie folgt bewertet:

**akut**

Infiltration von Granulozyten	0-3 Punkte
Exsudate von Granulozyten	0-3 Punkte
Fibrinablagerung in der Gelenksspalte	0-1 Punkt
peri-artikuläre Infiltration von Granulozyten	0-1 Punkt

**chronisch**

Hyperplasie der Synovialmembran	0-3 Punkte
Infiltration von mononuklearen Zellen/ Fibroblastenproliferation	0-3 Punkte
peri-artikuläre Infiltration von mononuklearen Zellen	0-3 Punkt

**Knochen/Knorpel**

Knochen- und Knorpelzerstörung	0-4 Punkte
--------------------------------	------------

Die Punkte aller Symptome wurden addiert und damit ein Gesamthistologiescore errechnet. Der maximale Histologiescore lag bei 21.

Sämtliche graphischen Auswertungen erfolgten mit der Prism Software.

**2.8 Zellkultur – Generierung von Th1-, Th2- und Th17-Zellen**

Zur Generierung von Th1-, Th2- bzw. Th17-Zellen wurden CD4+CD62L+ sortierte T-Zellen mit MHCII+ APZ im Verhältnis 1:5 zusammengesetzt. Die APZ wurden vorher mit 3000 rad bestrahlt, um Proliferation und Proteinsekretion zu unterbinden. Die Kulturen wurden in 6 ml RPMI Medium in 6-Loch Zellkulturplatten mit  $2.5 \times 10^6$  Gesamtzellen je einem ml Medium und 0.5 µg/ml Ova<sub>323-339</sub> Peptid angesetzt. Für eine Polarisierung in Th1 Zellen wurden 10 ng/ml rmlL-12 und 10 µg/ml anti-IL-4 Antikörper (Klon: 11B11) hinzugegeben. Th2 Zellen wurden mit 100 µg/ml IL-4 Zellkulturüberstand, 10 µg/ml anti-IFN-γ (Klon: AN18.17.24) und 10 µg/ml anti-IL-12 (Klon: C17.8) generiert. Für die Th17 Kultur wurden 20 ng/ml rmlL-6, 1 ng/ml rhuTGF-β, 10 ng/ml rmlL-23, 10 µg/ml anti-IL-4 Antikörper (Klon: 11B11) und 10 µg/ml anti-IFN-γ (Klon: AN18.17.24) zur Kultur gegeben. Nach zwei bis drei Tagen und nach drei bis vier Tagen wurden die Kulturen jeweils im Verhältnis 1:2 bzw. 1:3 gesplittet ohne neue Zytokine oder Antikörper dazugeben. Am Tag 6 der Kultur wurde die Zellsuspension auf Histopaque<sup>®</sup> überschichtet und bei 800xg für 20 min. bei RT zentrifugiert, um die toten von den lebenden Zellen zu trennen. Die erhaltenen lebenden Th-Zellen wurden mit PBS gewaschen und für den *in vivo* Transfer oder die *in vitro* Restimulation verwendet. Wurden die Th-Zellen eine weitere Woche kultiviert, erfolgte eine Restimulation der T-Zellen mit neu magnetisch isolierten MHCII+ APZ unter den gleichen Stimulationsbedingungen wie oben. Zusätzlich wurde 10 ng/ml rmlL-2 in die Kulturen gegeben.

## 2.9 Ovalbumin-induzierte Arthritis durch adoptiven Transfer von Th-Zellen

Um die Rolle von CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei einer OIA zu analysieren, wurde das Krankheitspotenzial von Th1- und Th17-Zellen nach adoptivem Transfer getestet. Am Tag-1 wurden dafür  $2 \cdot 5 \cdot 10^6$  *in vitro* generierte Th1- oder Th17-Zellen i.v. in die Schwanzvene von naiven, nicht immunisierten Mäusen injiziert. Am Tag 0 wurde dann die Arthritis durch eine i.a. Injektion von 60 µg catOVA in 20 µl PBS in ein Kniegelenk induziert. Die Aufnahme und Bewertung der Krankheitsparameter (Knieschwellung, Histologie) erfolgte wie bei der OIA in immunisierten Tieren (Abschnitte II 2.5 – 2.7). Eine graphische Darstellung der durch Th1-/Th17-Zellen induzierten OIA zeigt Abb.15 (Kapitel III Ergebnisse Abschnitt 3.1).

## 2.10 Serumgewinnung und ELISA auf OVA-spezifische Antikörper

Zur **Serumgewinnung** wurden die Mäuse zwecks Weitung der Blutgefäße zunächst kurz unter einer Rotlichtlampe erwärmt. Anschließend wurde mit einem scharfen Skalpell (Rüttgers, Solingen) die Schwanzvene angeritzt und daraus 5-7 Tropfen Blut entnommen. Damit das Blut aggregieren konnte, wurde es dann für ca. 30 min. bei 4°C in einem Eppendorfgefäß inkubiert. Der Überstand (Serum) wurde anschließend bei 2300 rpm bzw. 13000 rpm zweimal abzentrifugiert und schließlich bei -80°C weggefroren.

Für den *enzyme linked immuno sorbent assay* (**ELISA**) (126, 127) **auf OVA-spezifische Antikörper** wurden zunächst 96-Loch costar<sup>®</sup> ELISA Flachbodenplatten (*high binding*, Corning, New York, USA) mit 5 µg/ml catOVA in 0.1 M Boratpuffer über Nacht bei 4°C beschichtet. Die Platten wurden dann dreimal gewaschen. Das Waschen der Platten erfolgte mithilfe eines ELISA-Waschgerätes (ELx50, BIO-TEK, Winooski, USA) jeweils durch dreimaliges Auffüllen (250 µl) mit PBS/0.05% Tween und anschließendem Absaugen. Nach dem Blocken unspezifischer Bindungen durch eine 30-minütige Inkubation mit 250 µl/Loch 0.1% Gelatine (w/v)/0.02% (w/v) Azid bei RT wurde erneut gewaschen. Die Platten wurden anschließend mit 50 µl/Loch Serum für drei Stunden bei 37°C in einer Feuchtkammer inkubiert und wieder gewaschen. Danach erfolgte eine Inkubation mit anti-murine Ig Antikörpern, die an das Enzym Peroxidase gekoppelt waren, für eine Stunde bei 37°C in der Feuchtkammer. Nach erneutem Waschen wurde 50 µl/Loch des Substrates TMB für das Enzym auf die Platte gegeben. Für die Substratlösung wurde eine Tablette 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidinedihydrochloride (TMB) in 10 ml Substratpuffer aufgelöst und 2 µl 30%-iges Wasserstoffperoxid hinzugegeben. Bei positiver Reaktion erfolgte eine Blaufärbung des Substrates. Die enzymatische Reaktion wurde nach Augenmaß (ca. 2-20 min.) durch die Zugabe von 50 µl/Loch 12.5%-ige Schwefelsäure gestoppt. Die Optische Dichte der Färbung

wurde an einem ELISA-Lesegerät (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) bei einer Wellenlänge von 450 nm mit der Referenzwellenlänge von 650 nm bestimmt.

Die Aufnahme der OD und die Auswertung der Daten erfolgte mit der SoftMax Pro v5 Software. Der relative Antikörpertiter wurde jeweils in Relation zu einem Vergleichsserum einer mit Ovalbumin immunisierten Maus ermittelt.

### **2.11 Protein-Restimulation *in vitro* zur Bestimmung von CD4+CD40L+ T-Zellen**

Bei einer antigenspezifischen Restimulation von OVA-spezifischen CD4+ T-Zellen *in vitro* wurden  $5 \times 10^6$  bis  $2 \times 10^7$  Milz- oder Lymphknotenzellen in 1 ml RPMI Medium in einer 48-Loch Zellkulturplatte für 8-12 Stunden mit 100 µg/ml OVA Protein inkubiert. In die Kontrollansätze wurde 100 µg/ml BSA Protein gegeben. Zwei Stunden nach Stimulationsbeginn wurde für den Rest der Zeit 5 µg/ml BrefeldinA hinzugegeben, um die Proteinsekretion zu unterbinden und translatierte Proteine im Zytosol zurückzuhalten. Antigenspezifische T-Zellen wurden anschließend mit einem anti-CD40L Antikörper gefärbt (128, 129).

### **2.12 Migrationsassay im OIA Modell**

Für die Durchführung eines Migrationsassays im OIA Modell wurden  $2 \times 10^6$  *in vitro* generierte und radioaktiv markierte Ova-TZR transgene Th1- oder Th17-Zellen i.v. in naive Rezipientenmäuse transferiert.

Die Zellen wurden dabei wie folgt radioaktiv markiert: Die über Histopaque® von toten Zellen befreiten, *in vitro* generierten Th-Zellen (Histopaque® Aufreinigung, siehe Abschnitt II 2.8) wurden in einer Konzentration von  $2 \times 10^7$ /ml in einer  $^{51}\text{Chrom}$ -Lösung (PerkinElmer, Waltham, USA) mit einer Endkonzentration von 4 µCi/ml für 1 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden die markierten Zellen in RPMI-Medium gewaschen und die toten Zellen durch Histopaque® entfernt, siehe oben.

24 h nach dem Transfer der radioaktiv markierten Th-Zellen wurde in den transferierten Mäusen eine OIA durch i.a. Injektion von 60 µg catOVA in 20 µl PBS induziert (für das allgemeine Protokoll einer durch Th-Zellen induzierten OIA siehe Abschnitt II 2.9).

24 h nach der OIA Induktion wurden die Mäuse getötet und die angegebenen Organe präpariert, dabei wurde eine Mischung aus popletalen und inguinalen LK als drainierende LK und eine Mischung aus axillaren, mandibulären, zervikalen und brachialen LK als periphere LK analysiert. Die Radioaktivität jedes Organs wurde mit einem  $\gamma$ -Radioaktivitätsmessgerät (PerkinElmer) bestimmt. Ein Aliquot von  $2 \times 10^6$  *in vitro* generierten und radioaktiv markierten Ova-TZR transgenen Th-Zellen wurde als Ausgangswert vermessen und bei der Auswertung als 100% Wert gesetzt.

Die Auswertung erfolgte mit der Excel und der Prism Software.

### 3. Das Entzündungsmodell der DTH

#### 3.1 Die DTH Reaktion

Ein Modell für eine akute Entzündung stellt die *delayed type hypersensitivity* (DTH) Reaktion dar (1). Dabei werden Versuchstiere zunächst entweder durch Immunisierung oder durch Transfer von antigenspezifischen, aktivierten Th-Zellen für ein Antigen sensibilisiert. Anschließend wird mit einer erneuten Antigengabe eine akute Entzündung hervorgerufen, die durch eine Schwellung der betroffenen Region, in die das Antigen erneut appliziert wird, gekennzeichnet ist. In der vorliegenden Arbeit wurde eine DTH Reaktion in der Fußsohle von Mäusen induziert.

Bei der **DTH in immunisierten Tieren** wurden die betroffenen Mäuse zunächst mit 100 µg OVA/CFA oder 100 µg BSA/CFA in 100 µl am Tag-14 und am Tag-7 s.c. am Schwanzansatz immunisiert. Dafür wurde eine 1:1 Emulsion aus Protein/PBS und CFA mithilfe eines Ultraschallgerätes hergestellt. Am Tag 0 wurde eine DTH Reaktion durch subkutane Injektion von 50 µg OVA/IFA oder BSA/IFA in die Fußsohle der Mäuse induziert. Dafür wurde ebenfalls eine 1:1 Emulsion aus Protein/PBS und IFA mithilfe eines Ultraschallgerätes hergestellt. Der kontralaterale Kontrollfuß erhielt eine Injektion von PBS/IFA. Beginnend am Tag+1 wurde die Fußsohlenschwellung täglich mit einem Gelenkmessgerät (Kroeplin, Schlüchtern) erfasst.

Für eine **DTH durch Th-Zell-Transfer** wurden, wenn nicht anders angegeben, routinemäßig zunächst  $5 \times 10^5$  *in vitro* generierte Ova-TZR transgene Th1- und/oder Th17-Zellen am Tag-1 i.v. in naive Mäuse transferiert. Einen Tag später am Tag 0 erhielten die Mäuse eine Injektion von 250 ng Ova<sub>323-339</sub> Peptid/IFA in 10 µl Lösung s.c. in die Fußsohle. Dafür wurde eine 1:1 Emulsion aus Peptid/PBS und IFA mithilfe eines Ultraschallgerätes hergestellt. Der kontralaterale Kontrollfuß erhielt eine Injektion von PBS/IFA. Beginnend am Tag+1 wurde die Fußsohlenschwellung täglich mit einem Gelenkmessgerät (Kroeplin, Schlüchtern) erfasst. Alle Auswertungen der Daten erfolgten mit der Prism Software.

#### 3.2 Neutralisierung von IL-17 im DTH Modell

Um die Rolle von IL-17 bei einer DTH Reaktion näher zu untersuchen, wurde dieses Zytokin durch einen anti-IL-17 Antikörper (Klon: TC11-18H10, freundliche Gabe von A. Richter, Miltenyi-Biotec, Bergisch-Gladbach) *in vivo* neutralisiert. Dazu wurden zunächst Mäuse mit OVA/CFA wie oben beschrieben immunisiert (siehe Abschnitt II 3.1, DTH in immunisierten Tieren). Jeweils 24 Stunden vor der DTH Induktion (Tag-1) und 48 Stunden nach der DTH Induktion (Tag+2) wurden pro Maus 200 µg des neutralisierenden Antikörpers i.p. injiziert.

### 3.3 Migrationsassay im DTH Modell

Für die Durchführung eines Migrationsassays im DTH Modell wurde zunächst eine DTH Reaktion durch Transfer von  $5 \times 10^5$  *in vitro* generierten Ova-TZR transgenen Th1-Zellen induziert (siehe Abschnitt II 3.1, DTH durch Th-Zell-Transfer). Am Tag+1 nach Induktion wurden den Mäusen  $3 \times 10^6$  *in vitro* generierte und radioaktiv markierte Ova-TZR transgene Th1- oder Th17-Zellen i.v. transferiert.

Die Zellen wurden dabei wie folgt radioaktiv markiert: Die über Histopaque® von toten Zellen befreiten *in vitro* generierten Th-Zellen (Histopaque® Aufreinigung, siehe Abschnitt II 2.8) wurden in einer Konzentration von  $2 \times 10^7$ /ml in einer  $^{51}\text{Chrom}$ -Lösung (PerkinElmer, Waltham, USA) mit einer Endkonzentration von 4  $\mu\text{Ci/ml}$  für 1 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden die markierten Zellen in RPMI-Medium gewaschen und die toten Zellen durch Histopaque® entfernt, siehe oben.

24 h nach dem Transfer der radioaktiv markierten Th-Zellen wurden die Mäuse getötet und die angegebenen Organe präpariert, dabei wurden popletale LK als drainierende LK und eine Mischung aus inguinalen, axillaren, mandibulären, zervikalen und brachialen LK als periphere LK analysiert. Die Radioaktivität jedes Organs wurde mit einem  $\gamma$ -Radioaktivitätsmessgerät (PerkinElmer) bestimmt. Ein Aliquot von  $3 \times 10^6$  *in vitro* generierten und radioaktiv markierten Ova-TZR transgenen Th-Zellen wurde als Ausgangswert vermessen und bei der Auswertung als 100% Wert gesetzt.

Die Auswertung erfolgte mit der Excel und der Prism Software.

## 4. Charakterisierung von Th17-Zellen

### 4.1 mRNA-Isolierung

Die mRNA-Isolierung aus Th-Zellen erfolgte mit dem Qiagen mRNA-Isolierungskit nach den Angaben im Herstellerprotokoll. In Kürze beschrieben verlief die Isolierung wie folgt: Es wurden je  $5 \times 10^6$  Th1-, Th2- und Th17-Zellen in 350  $\mu\text{l}$  RLT-Puffer lysiert und geschüttelt. Daraufhin wurden 350  $\mu\text{l}$  70% Ethanol hinzugegeben und die Lösungen gemischt. Anschließend wurde die Mischung auf eine Qiagen-Säule gegeben und in einer Eppendorf-Zentrifuge bei 10000 rpm für 30 sec. zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule mit 350  $\mu\text{l}$  RW1-Puffer gewaschen und bei 10000 rpm für 30 sec. zentrifugiert. Jetzt wurden 75  $\mu\text{l}$  DNase/RDD auf die Säule gegeben und diese für 15 min. bei RT inkubiert. Danach wurden 350  $\mu\text{l}$  RW1-Puffer auf die Säule gegeben und bei 10000 rpm für 30 sec. zentrifugiert. Der Durchfluss wurde erneut verworfen und die Säule zweimal mit 500  $\mu\text{l}$  RPE-Puffer gewaschen und bei 10000 rpm für 30 sec. bzw. 2 min. zentrifugiert. Die mRNA wurde schließlich mit 30  $\mu\text{l}$  RNase-freiem Wasser eluiert indem die Säule nach einminütiger

Inkubation bei 10000 rpm für 1 min. zentrifugiert wurde. Die eluierte RNA wurde bei -80°C eingefroren.

#### 4.2 Reverse Transkription – Herstellung von cDNA

Die mithilfe des Qiagen mRNA-Isolierungskits isolierte RNA aus den Th-Zell-Populationen wurde wie folgt mithilfe des Roche Reverse Transkriptionskits durch Reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Dafür wurde folgender Reaktionsmix mit einem Endvolumen von 20 µl zusammengegeben:

Reagenz	Volumen	finale Konzentration
TaqMan 10xPuffer	2.0 µl	1x
MgCl <sub>2</sub>	4.4 µl	5.5 mM
dNTP's	4.0 µl	2.0 mM
Random Hexamers	0.5 µl	1.25 mM
Oligo (dT)16	0.5 µl	1.25 mM
RNase Inhibitor	0.4 µl	0.4 U/µl
Reverse Transkriptase	0.5 µl	1.25 U/µl
mRNA	7.7 µl	20 ng/µl

Die Reverse Transkription lief im Thermocycler (Biometra®, Göttingen) bei folgendem Programm: 10 min. 25°C; 40 min. 48°C, 5 min. 95°C, 4°C. Die cDNA wurde bei -20°C eingefroren.

#### 4.3 Real-Time PCR

Für eine *Real Time*-PCR wurde folgender Reaktionsmix in einem Endvolumen von 5 µl zusammengegeben:

Reagenz	Volumen	finale Konzentration
Faststart Reaktionsmix	0.5 µl	
MgCl <sub>2</sub>	0.4-1.0 µl	2-5 mM
Milliporewasser	0.5-1.1 µl	
Primer 1	0.25 µl	0.25 mM
Primer 2	0.25 µl	0.25 mM
cDNA	2.5 µl	12 ng/µl

Die *Real Time*-PCR lief im Lightcycler (Roche, Basel, Schweiz). Als Vergleichsstandard diente das konstitutiv exprimierte für Ubiquitin codierende *UBC* Gen.

#### 4.4 Sequenzen der für die *Real-Time PCR* verwendeten Primer

Primer	Sequenz	Magnesiumkonzentration	Annealing-Temperatur
IL-17 for	TCCAgAAggCCCTCAgACTA	3 mM	65°C
IL-17 rev	AgCATCTTCTCgACCCTgAA		
IL-22 for	ggTggTgCCTTTCCTgACCAC	2 mM	69°C
IL-22 rev	AgCTTCTTCTCgCTCAgACg		
CCR5 se	CAAgACAATCCTgATCgTgCAA	2 mM	65°C
CCR5 anti	TCCTACTCCCAAgCTgCATAgAA		
CXCR3 for	TgCTAgATgCCTCggACTTT	2 mM	65°C
CXCR3 rev	CgCTgACTCAgTAgCACAgC		
CCR7 f	CATCAgCATTgACCgCTACgT	2 mM	65°C
CCR7 r	ggTACggATgATAATgAggTAgCA		
T-bet for	TCCTGCAGTCTCTCCACAAGT	3 mM	65°C
T-bet rev	CAGCTGAGTGATCTCTGCGT		
GATA-3 for	CCTACCgggTTCggATgTAAgT	3 mM	65°C
GATA-3 rev	AgTTCgCgCAggATgTCC		
ROR $\gamma$ T for	TgCAAgACTCATCgACAAgg	3 mM	65°C
ROR $\gamma$ T rev	AggggATTCAACATCAgTgC		
UBC for	TCTTGACAATTCATTTCCCAACAG	3 mM	65°C
UBC rev	TCAGGCACTAAAGGATCATCTGG		

Tabelle3: Verwendete Primersequenzen für die *Real-Time-PCR*.

## 5. OVA-transgene tet-LPOVA Mäuse

### 5.1 Genetische Typisierung von tet-LPOVA Mäusen

Die tet-LPOVA Mäuse mussten regelmäßig typisiert werden, um die Anwesenheit des LPOVA-Konstrukts sowie des Tetracyclinaktivator-Konstrukts nachzuweisen.

Zunächst erfolgte eine **DNA-Isolation**. Dazu wurde ein ca. 1 mm langes Stück der Schwanzspitze abgeschnitten und über Nacht in 550 µl Typisierungslysepuffer und 30 µl (1.5 Units) rProteinaseK bei 56°C verdaut. Anschließend wurden 200 µl einer 5 M NaCl-Lösung dazugegeben und die Proben für 5 min. geschüttelt. Die Proben wurden nun in der Eppendorf-Zentrifuge bei 13000 rpm abzentrifugiert und 700 µl Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Durch Zugabe von 500 µl Isopropanol wurde die DNA gefällt und nach erneutem Abzentrifugieren mit 700 µl 70% Ethanol gewaschen. Die getrocknete DNA wurde in 100 µl Millipore-Wasser aufgenommen und die Konzentration am Photometer durch Bestimmung der Optischen Dichte bei 230 nm gemessen.

Für die **Typisierungs-PCR** wurden 20-50 ng DNA als Template eingesetzt. Bei der PCR auf das LPOVA-Konstrukt wurde ein 50 µl Mix aus 1x PCR-Puffer, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.25 mM dNTP-Mix, 0.05 U/µl Taq Polymerase (alle Rapidozym), 1xBSA-Lösung, 0.02% DMSO, Milliporewasser und je 0.5 pmol der Primer OVA-rev und bru3-p1 (beide Tibmolbiol, Berlin) sowie der DNA hergestellt. Bei der PCR auf das Tetracyclinaktivator-Konstrukt wurde ein 50 µl Mix aus 1x PCR-Puffer, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.25 mM dNTP-Mix, 0.05 U/µl Taq Polymerase (alle Rapidozym), 1xBSA-Lösung, 0.02% DMSO, Milliporewasser und je 0.5 pmol der Primer tet AKT-SE und tet AKT-AS (beide Tibmolbiol) sowie der DNA hergestellt.

Temperaturprofil der PCR:

94°C	5 min.
94°C	30 sec.
54°C	60 sec.
72°C	2 min.
72°C	10 min.
4°C	∞

Die PCR-Proben wurden mit Gelladepuffer versetzt und auf ein 1.8%-iges Agarosegel aufgetragen. Das Gel lief bei 100 mV für ca. 30 min. Die erwarteten Banden der PCR-Produkte lagen bei 604 bp (LPOVA-Konstrukt) und 533 bp (Tetracyclinaktivator-Konstrukt).

Für die Typisierungs-PCR wurden die folgenden Primer verwendet:

LPOVA-Konstrukt

Primer1: OVA-rev TTCATCAggCAACAgCAC

Primer2: bru3-p1 gCATAAgCTgTATggTgT

Tetracyclinaktivator-Konstrukt

Primer1: tet AKT-SE AATCCgCATATgATCAATTC

Primer2: tet AKT-AS gTCggAATCgAAggTTTAAC

**5.2 OIA in tet-LPOVA Mäusen mit Fütterung des Antibiotikums Doxycyclin**

Um eine Expression des Link-Protein – Ovalbumin-Fusionsproteins in tet-LPOVA Mäusen zu induzieren, wurde den Mäusen das Tetrazyklin-Antibiotikum Doxycyclin über das Trinkwasser zugeführt. Doxycyclin wurde hierfür in einer autoklavierten 5%-igen Sacharoselösung mit einer Endkonzentration von 200 µg/ml gelöst. Immunisierte tet-LPOVA Mäuse wurden beginnend am Tag-7 fortlaufend und während des gesamten Experimentes mit der Doxycyclinlösung gefüttert, wobei die Lösung jeden dritten Tag gewechselt wurde.

**5.3 Adoptiver Transfer von CD4+ T-Zellen in tet-LPOVA Mäuse**

Um den Mechanismus der Toleranz gegen eine OIA in den OVA-transgenen tet-LPOVA Mäusen näher zu untersuchen, wurde analysiert, ob die Toleranz durch CD4+ T-Zellen auf Wildtypmäuse übertragen werden kann bzw. die Toleranz in tet-LPOVA Mäusen durch den Transfer von Th-Zellen aus Wildtypmäusen gebrochen werden kann.

Dazu wurden mit der MACS-Technologie (siehe Abschnitt II 1.5) CD4+T-Zellen aus der Milz und den Lymphknoten von tet-LPOVA oder C57Bl/6 Wildtypmäusen isoliert. Zwei Tage vor der ersten s.c. Immunisierung (Tag-23) wurden entweder  $6 \times 10^6$  gereinigte Wildtyp-Th-Zellen in tet-LPOVA Mäuse oder  $6 \times 10^6$  gereinigte tet-LPOVA-Th-Zellen in Wildtypmäuse i.v. transferiert. Anschließend wurde in den transferierten Tieren wie oben beschrieben eine OIA durch s.c. Immunisierung und i.a. Injektion von catOVA induziert (siehe Abschnitt II 2.1 OIA in immunisierten Mäusen).

**5.4 Generierung von Knochenmarkchimären**

Um den Einfluss von Zellen mit hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Ursprung auf die Toleranzentwicklung in tet-LPOVA Mäusen zu untersuchen, wurden Knochenmarkchimären analysiert. Dazu wurden zunächst OVA-transgene tet-LPOVA und C57Bl/6 Wildtyp-Rezipientenmäuse subletal mit 10.5 Gy bestrahlt, um das hämatopoetische Zellkompartiment zu eliminieren. Im Zeitraum zwischen einer Woche vor der Bestrahlung und 8 Wochen nach der Bestrahlung wurden die Versuchstiere profilaktisch mit dem Antibiotikum Baytril in einer Konzentration von 0.1 mg/ml gefüttert. 24 Stunden nach der Bestrahlung

wurden  $1.25 \times 10^7$  T-Zell-depletierte Knochenmarkzellen aus C57Bl/6 Wildtyp- bzw. tet-LPOVA Spendertieren in die bestrahlten Rezipientenmäuse i.v. transferiert, um das hämatopoetische Zellkompartiment wieder zu rekonstituieren. Zur Gewinnung der Knochenmarkszellen wurden die Knochen von Ober- und Unterschenkel aus Spendertieren mit einer 26G Kanüle (Braun, Emmenbrücke, Schweiz) ausgewaschen, die erhaltenen Knochenmarkszellen mithilfe der MACS-Technologie (siehe Abschnitt II 1.5) von CD90+ T-Zellen depletiert und anschließend in die Rezipiententiere transferiert. Die Effizienz der Bestrahlung und der anschließenden Rekonstitution des hämatopoetischen Zellkompartiments konnte durch Verwendung von kongenen C57Bl/6 Wildtypmäusen als Spendertiere überprüft werden. Alle hämatopoetischen Zellen der kongenen Spendertiere exprimieren die genetische Variante CD45.1 des CD45 Moleküls, während die Rezipiententiere die genetische Variante CD45.2 des CD45 Moleküls exprimieren. Durch Verwendung von anti-CD45.1 bzw. anti-CD45.2 Antikörpern kann man zwischen eventuell durch die Bestrahlung nicht eliminierten Zellen von Rezipientenmäusen und den sich aus den Knochenmarkszellen der Spendertiere neu rekonstituierenden Zellen unterscheiden. 8 Wochen nach dem Knochenmarktransfer hatte sich das hämatopoetische Zellkompartiment in Form von T- und B-Zellen rekonstituiert. In diesen Mäusen wurde nun der Verlauf einer Ovalbumin-induzierten Arthritis untersucht (für das Protokoll einer OIA in immunisierten Mäusen siehe Abschnitt II 2.1).

## 6. Statistik

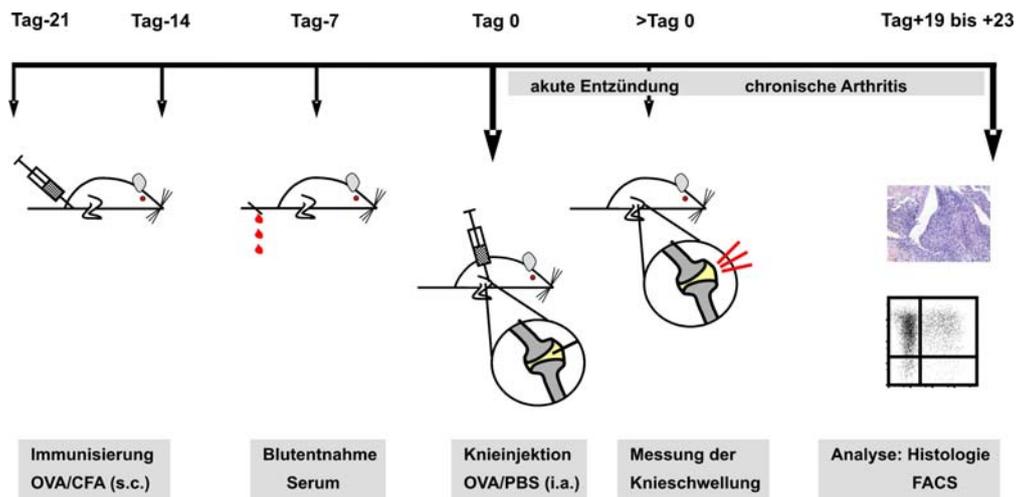
Für eine statistische Beurteilung der Unterschiede zwischen verschiedenen Tierversuchsgruppen wurde ein nicht parametrischer *two-tailed* oder wenn angezeigt *one-tailed* Mann-Whitney-Test mit einem Konfidenzintervall von 95% mithilfe der Prism Software durchgeführt. Dabei galten folgende Signifikanzen: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . Die statistische Beurteilung der Unterschiede zwischen ganzen Verlaufskurven (Kinetiken) wurde mit der SPSS Software durchgeführt, wobei hier die gleichen p-Werte angewendet wurden wie oben angegeben.

### III Ergebnisse

#### 1. Die Ovalbumin-induzierte Arthritis (OIA)

Bei der Entwicklung von neuen Therapien für die Behandlung von Autoimmunerkrankungen, wie der Rheumatoiden Arthritis (RA), könnten in Zukunft Zell-basierte Therapien eine entscheidende Rolle einnehmen. Eine solche Therapie könnte darauf beruhen, bestimmte Zellen eines Patienten zu isolieren, diese *in vitro* zu modulieren und anschließend dem Patienten wieder zu injizieren. So könnten gezielt pathogene Zellen in nicht-pathogene oder sogar protektive Zellen umgewandelt werden. CD4<sup>+</sup> T-Zellen könnten dabei wichtige Zielzellen sein, denn viele Krankheiten und Krankheitsmodelle werden durch diese Zellen vermittelt (50, 55, 67, 80, 130). Die Wirkung von pathogenen T-Zellen beruht zu einem großen Teil auf der Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen, wie TNF- $\alpha$ , IL-17 und IFN- $\gamma$ . Um eine Beeinflussung des gesamten Immunsystems zu vermeiden, ist es daher wichtig, Experimente mit antigenspezifischen Zellen durchzuführen und zu analysieren. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, in einem neu etablierten, antigenspezifischen murinen Arthritismodell die Rolle von Helfer-T-Zellen näher zu bestimmen. Dies sollte in Zukunft die Möglichkeit eröffnen, die pathogenen bzw. protektiven Fähigkeiten von antigenspezifischen *in vitro* modulierten Helfer-T-Zellen in einem murinen Arthritismodell *in vivo* zu testen. Als Tierversuchsmodell wurde das Modell der Antigen-induzierten Arthritis (AIA) gewählt (73, 74).

Das Protokoll des Modelles der AIA wurde dafür insofern modifiziert, als das statt des methylierten bovinen Serumalbumins (metBSA) kationisiertes Ovalbumin (catOVA) als Antigen eingesetzt wurde. Dies ermöglichte in späteren Experimenten die Anwendung des adoptiven T-Zell-Transfers und somit die Analyse und Detektion antigenspezifischer T-Zellen, da OVA-spezifische T-Zellen (DO11.10 Maus) sowie ein monoklonaler T-Zell-Rezeptor-spezifischer Antikörper (KJ1.26, anti-OVA-TZR) zur Verfügung standen. Um eine optimale Wirkung des Antigens zu erzielen, wurde, ähnlich wie das metBSA, das Ovalbumin mit positiv geladenen Seitenketten besetzt („kationisiert“, siehe Kapitel II Methoden und Materialien Abschnitt 2.2). Nach der intra-artikulären (i.a.) Knieinjektion konnte das nun positiv geladene Antigen besser in der negativ geladenen Gelenkmatrix gehalten werden. Da bei allen folgenden Experimenten anstelle von BSA Ovalbumin als induzierendes Antigen für eine AIA verwendet wird, wird darauf bezugnehmend im weiteren Verlauf dieser Arbeit das untersuchte Arthritismodell als Ovalbumin-induzierte Arthritis (OIA) bezeichnet.



**Abb.3: Schematische Darstellung des zeitlichen Verlaufes einer Ovalbumin-induzierten Arthritis (OIA) in immunisierten Mäusen.** s.c.= subkutan, i.a.= intra-artikulär.

Das allgemeine Protokoll einer Ovalbumin-induzierten Arthritis (OIA) ist in Abbildung 3 dargestellt. Die Versuchstiere werden zunächst zweimal mit einer Emulsion aus catOVA und *Complete Freund's Adjuvants* (CFA) immunisiert. Zwei Wochen nach der letzten Immunisierung wird die Arthritis in einem Kniegelenk durch eine i.a. Injektion mit catOVA gelöst in PBS ausgelöst. Eine induzierte Arthritis ist durch eine akute und eine chronische Phase gekennzeichnet. Zur Bewertung des Krankheitsverlaufes wird einerseits die Knieschwellung gemessen (akute Phase) sowie andererseits werden zu verschiedenen Zeitpunkten die Gelenke histologisch untersucht. Für eine Bewertung der chronischen Krankheitsphase werden die Gelenke routinemäßig drei Wochen nach der Krankheitsinduktion analysiert. Innerhalb der histologisch sichtbaren Krankheitssymptome wird dabei zwischen akuten Symptomen (Infiltrate und Exsudate von Granulozyten), chronischen Symptomen (Hyperplasie der Synovialmembran, Infiltrate von mononuklearen Zellen, Fibroblastenaktivierung) sowie Knochen- und Knorpelzerstörung unterschieden. Alle Krankheitssymptome werden mit einem Punktesystem bewertet (siehe Kapitel II Methoden und Materialien Abschnitt 2.7) und die Summe der Punkte aller Symptome als Histologiescore angegeben. Um eine erfolgte Aktivierung des Immunsystems durch die s.c. Immunisierung nachzuweisen, wird exemplarisch die Aktivierung der Lymphozyten überprüft. Die Aktivierung von B-Zellen erfolgt durch die Bestimmung des antigenspezifischen Antikörpertiters im Serum der Mäuse im Regelfall 7 Tage vor der Arthritisinduktion. Die antigenspezifische T-Zell-Reaktion wird durchflusszytometrisch untersucht, durch Analyse der CD4+CD40L+ T-Zellen nach einer antigenspezifischen Restimulation *in vitro*.

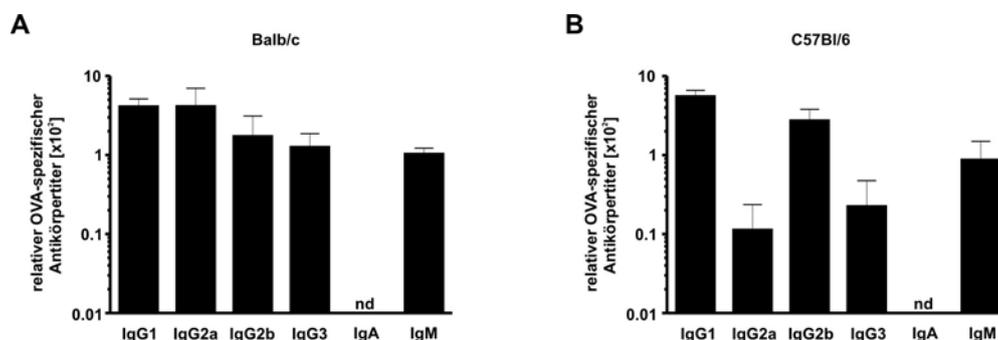


Im weiteren Verlauf der Arbeit konnte nun in diesem Modell durch den adoptiven Transfer von Ovalbumin-spezifischen Helfer-T-Zellen der Beitrag von CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu einer OIA näher betrachtet werden.

Zunächst sollte jedoch das Modell der OIA etabliert und näher untersucht werden. Dazu wurde der Verlauf einer OIA in Wildtypmäusen charakterisiert.

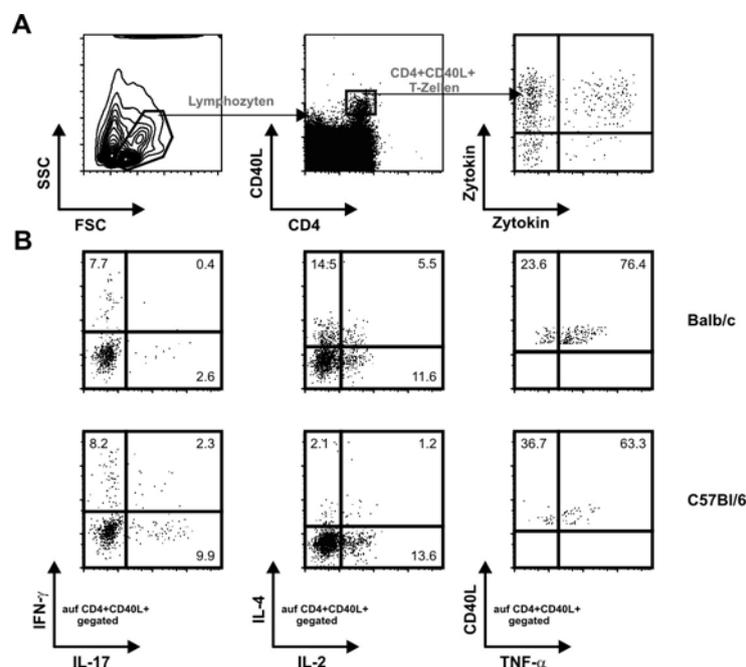
Wenn in Wildtypmäusen eine OIA induziert wurde, zeigte sich, dass die Knieschwellung der akuten Krankheitsphase am ersten Tag nach Induktion am größten war und im Laufe der nächsten Tage stetig abnahm. Dabei war die detektierte Gelenkschwellung nicht auf die Knieinjektion per se zurückzuführen, da in nicht-immunisierten Mäusen nach Knieinjektion keine Schwellung auftrat (Abb.4A). Nicht-immunisierte Tiere waren ebenfalls histopathologisch unauffällig. Bei immunisierten Mäusen hingegen ließen sich drei Wochen nach einer i.a. Injektion chronische Krankheitsanzeichen, wie Hyperplasie der Synovialmembran, Infiltrate von mononuklearen Zellen und Fibroblastenaktivierung, erkennen (Abb.4B+C). Ebenfalls wurde eine teilweise Zerstörung von Knochen und Knorpelschicht sichtbar. Bei einigen Tieren waren immer noch Anzeichen einer akuten Entzündung, wie Infiltrate von Granulozyten, erkennbar (Abb.4B+C). Weiterhin konnte festgestellt werden, dass sich eine OIA sowohl in Balb/c als auch in C57Bl/6 Mäusen induzieren lässt.

Bei Bestimmung des antigenspezifischen Antikörpertiters fiel auf, dass in C57Bl/6 Mäusen hauptsächlich Antikörper der Subtypen IgG1 und IgG2b produziert wurden. IgM Antikörper ließen sich ebenfalls detektieren. Wenig bis nicht-detektierbar dagegen waren die Subtypen IgG2a, IgG3 und IgA (Abb.5). In Balb/c Mäusen dagegen lassen sich bis auf IgA alle Subtypen sehr gut nachweisen.



**Abb.5: Immunisierte Balb/c und C57Bl/6 Wildtypmäuse bilden ein unterschiedliches Repertoire an OVA-spezifischen Antikörpersubtypen aus.** Balb/c (A) und C57Bl/6 (B) Mäuse wurden am Tag-21 und am Tag-14 s.c. immunisiert. Am Tag-7 vor der Arthritisinduktion wurde den Mäusen Serum abgenommen und der OVA-spezifische Antikörpertiter in Relation zu einem Referenzserum einer mit OVA immunisierten Balb/c bzw. C57Bl/6 Maus bestimmt, nd= nicht detektierbar, n= 6-8.

Um die antigenspezifische T-Zell-Reaktion zu analysieren, wurden Lymphknoten- bzw. Milzzellen *in vitro* restimuliert, die antigenspezifischen CD4+ T-Zellen mit einem anti-CD40L Antikörper angefärbt sowie deren Zytokinexpression bestimmt (Abb.6A). Von den antigenspezifischen CD4+ T-Zellen aus immunisierten C57Bl/6 Mäusen exprimierten ca. 10% der Zellen IFN- $\gamma$ . Ebenfalls ca. 10% der Zellen produzierten IL-17. Etwa 15% der Th-Zellen exprimierten IL-2. Eine IL-4 Expression zeigten nur ca. 3% der Zellen. In Balb/c Mäusen hingegen wurden mit 21% deutlich mehr IL-4+ Zellen aber nur 3% IL-17+ Th-Zellen gefunden. In beiden Mausstämmen jedoch exprimierte mit 65-80% die Mehrheit aller Zellen TNF- $\alpha$  (Abb.6B).



**Abb.6:** In immunisierten C57Bl/6 Wildtypmäusen entstehen mehr Th1- und Th17-, aber weniger Th2-Zellen als in immunisierten Balb/c Wildtypmäusen. Balb/c und C57Bl/6 Mäuse wurden zweimal mit OVA immunisiert und eine Woche später wurden Zellen aus dem drainierenden Lymphknoten (B, linke und mittlere Spalte) bzw. der Milz (B, rechte Spalte) *in vitro* mit OVA restimuliert, die CD4+CD40L+ antigenspezifischen Helfer-T-Zellen angefärbt und ihre Zytokinexpression durchflusszytometrisch bestimmt. In (A) ist das angewandte Auswertungsschemata gezeigt. Die Zahlen in (B) geben den prozentualen Anteil der Zytokinproduzenten an allen CD4+CD40L+ Zellen an. Es sind repräsentative Graphen jeder Versuchstiergruppe mit n= 6 dargestellt.

Die durchgeführten Experimente zeigen, dass nach einer Immunisierung sowohl in Balb/c als auch in C57Bl/6 Mäusen die pro-inflammatorischen Zytokine IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-17 von Helfer-T-Zellen produziert werden. In den nachfolgenden Experimenten wurde die Bedeutung der pro-inflammatorischen CD4+ T-Zellen für die Etablierung einer Arthritis im OIA Modell

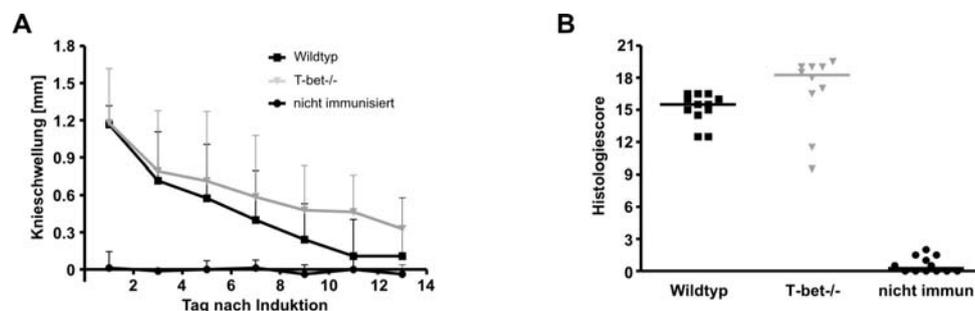
näher untersucht. Dazu sollte zunächst analysiert werden, ob die von T-Zellen exprimierten Zytokine IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-17 für die Entstehung einer OIA von Bedeutung sind.

## 2. Die Rolle von pro-inflammatorischen Zytokinen bei der OIA

### 2.1 Die Rolle von IFN- $\gamma$ bei der OIA

Das Zytokin IFN- $\gamma$ , welches u.a. von Th1-Zellen produziert wird, wurde in der Literatur zunächst als entzündungsfördernd beschrieben (1, 131, 132). Jedoch wird die Bedeutung von IFN- $\gamma$  u.a. durch die Charakterisierung der pro-inflammatorischen Wirkung von IL-17 in neueren Publikationen zunehmend erweitert. In diesem Zusammenhang wurde bereits gezeigt, dass IFN- $\gamma$  in einigen Tiermodellen ebenfalls anti-inflammatorisch wirken kann (32, 38, 131, 133). Welche Funktion IFN- $\gamma$  im OIA Modell erfüllt, sollte hier näher untersucht werden. Da für die Expression von IFN- $\gamma$  in Th1-Zellen der Transkriptionsfaktor T-bet essentiell ist, wurden T-bet defiziente Mäuse, in denen keine IFN- $\gamma$  exprimierenden Th1-Zellen gebildet werden, untersucht (134, 135).

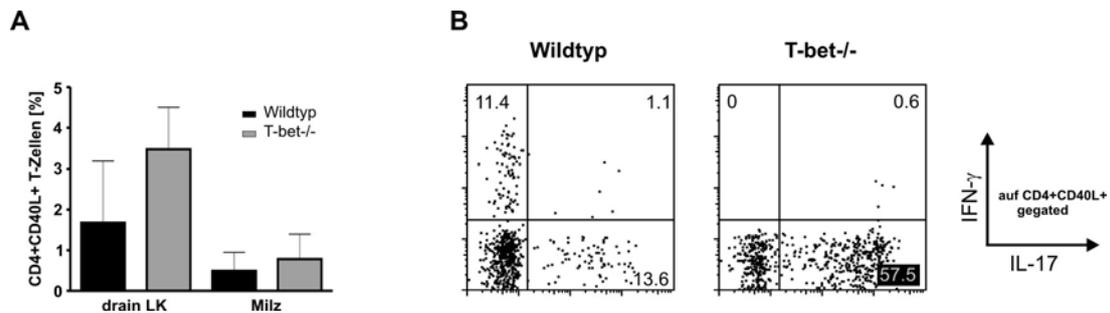
Wurde eine OIA in T-bet-/- Mäusen ausgelöst, zeigten diese Mäuse eine normale akute Knieschwellung, die allerdings ab Tag 5 nach Induktion gegenüber den Wildtypmäusen leicht erhöht war (Abb.7A). Jedoch war der Unterschied nicht signifikant. Histologisch zeigten 8 von 10 T-bet defizienten Mäusen eine sehr starke chronische Arthritis mit einem Histologiescore zwischen 16.5 und 20 Punkten. Diese war gegenüber der OIA in Wildtypmäusen (durchschnittlicher Histologiescore von 15.5) leicht stärker ausgeprägt (Abb.7B).



**Abb.7: T-bet defiziente Mäuse bilden eine schwerere OIA als Wildtypmäuse aus.** T-bet defiziente Mäuse und Balb/c Wildtypmäuse wurden zweimal immunisiert und eine OIA wurde durch i.a. Injektion von catOVA induziert. Die Kniegelenkschwellung wurde an den angegebenen Tagen gemessen (A). Drei Wochen nach Arthritisinduktion wurden die Kniegelenke histologisch untersucht und die Schwere der Arthritis als Histologiescore angegeben (B), nicht immun= nicht immunisiert, n= 10-12, die Daten von 2 gleich verlaufenden Experimenten wurden in einer Graphik zusammengefasst.

Um die IFN- $\gamma$  Defizienz in T-bet-/- Mäusen zu überprüfen, wurden die antigenspezifischen Helfer-T-Zellen untersucht. Bei der Analyse der antigenspezifischen T-Zell-Antwort zeigte sich, dass T-bet defiziente Tiere mit 3.4% einen doppelt so hohen prozentualen Anteil an

antigenspezifischen T-Zellen im drainierenden Lymphknoten aufwies wie Wildtypiere. Der Anteil an antigenspezifischen T-Zellen in der Milz war ebenfalls erhöht. Fast 60% der T-Zellen in T-bet defizienten Mäusen produzierten IL-17, wohingegen IFN- $\gamma$  wie erwartet nicht exprimiert wurde (Abb.8). T-Zellen aus Wildtypieren dagegen exprimierten zu gleichen Anteilen IFN- $\gamma$  und IL-17 (12-14%).



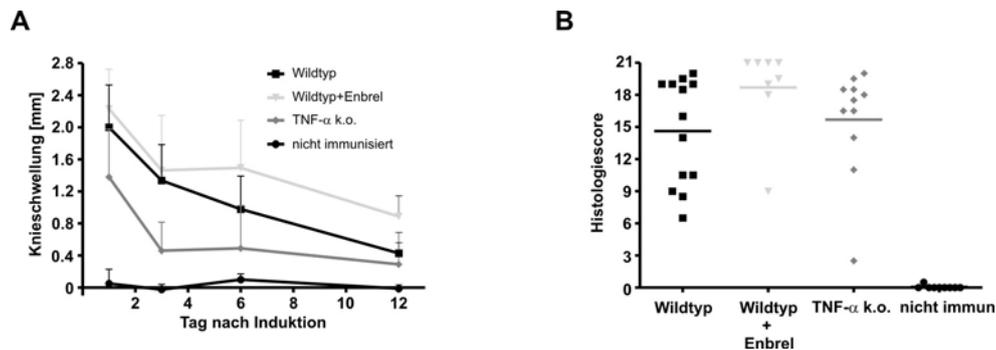
**Abb.8: OIA-krankte T-bet defiziente Mäuse bilden mehr antigenspezifische Th17-Zellen aus als Wildtypmäuse.** In T-bet defizienten Mäusen und Balb/c Wildtypmäusen wurde zunächst eine OIA ausgelöst Am Tag+21 nach Arthritisinduktion wurden Zellen aus der Milz und aus den drainierenden Lymphknoten *in vitro* mit catOVA restimuliert, die CD4+CD40L+ antigenspezifischen Helfer-T-Zellen angefärbt und ihre Zytokinexpression durchflusszytometrisch bestimmt. Die Graphik in (A) zeigt CD4+CD40L+ Zellen anteilig an allen CD4+ Zellen. Die Zahlen in (B) geben den prozentualen Anteil der Zytokinproduzenten an allen CD4+CD40L+ Zellen an, drain LK= drainierender Lymphknoten. Es sind repräsentative Graphen jeder Versuchstiergruppe mit n= 4 aus einem von zwei durchgeführten Experimenten dargestellt.

Nach den vorliegenden Ergebnissen kommt IFN- $\gamma$  eine geringe Bedeutung für den Verlauf einer OIA zu. Das Zytokin wirkt demnach eher anti-inflammatorisch, da die Arthritis in IFN- $\gamma$  defizienten T-bet-/- Mäusen etwas stärker als in Wildtypmäusen ausgeprägt ist.

## 2.2 Die Rolle von TNF- $\alpha$ bei der OIA

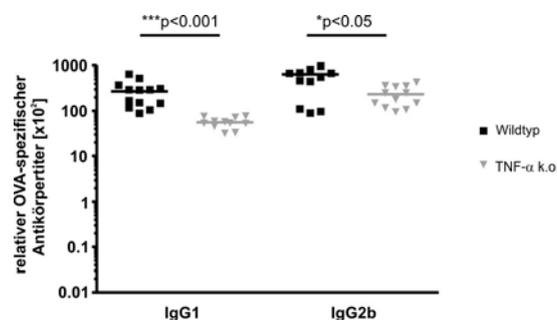
Das Zytokin TNF- $\alpha$  kann von einer Vielzahl von Zellen produziert werden und wirkt überwiegend entzündungsfördernd. TNF- $\alpha$  kann Endothelzellen, Makrophagen und andere Zellen aktivieren. Außerdem induziert es die Produktion anderer pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine (25, 27, 30-33, 91). Daher sollte die Bedeutung von TNF- $\alpha$  für die Ausbildung einer OIA näher untersucht werden. Dazu wurde in Kooperation mit der AG Sergeij Nedospasov am Deutschen Rheumaforschungszentrum in TNF- $\alpha$  defizienten Mäusen der Verlauf einer OIA analysiert. Gleichzeitig wurde in Wildtypmäusen durch Injektion von Enbrel® TNF- $\alpha$  neutralisiert. Bei Enbrel® handelt es sich um den Handelsnamen für das bei einer anti-TNF- $\alpha$  Therapie eingesetzte Medikament Etanercept, einem Fusionsprotein aus löslichem TNF Rezeptor und humanem IgG-Fc-Teil (107, 109).

TNF- $\alpha$  defiziente Mäuse zeigten verglichen mit C57Bl/6 Wildtyptieren eine verminderte akute Knieschwellung, wohingegen mit Enbrel<sup>®</sup> behandelte Mäuse eine leicht erhöhte Schwellung aufwiesen (Abb.9A). Alle drei Versuchsgruppen entwickelten jedoch mit einem durchschnittlichen Histologiescore von 14.5 bis 18.5 eine schwere chronische Arthritis, wobei der Wert der mit Enbrel<sup>®</sup> behandelten Versuchsgruppe mit 18.5 am höchsten war (Abb.9B).



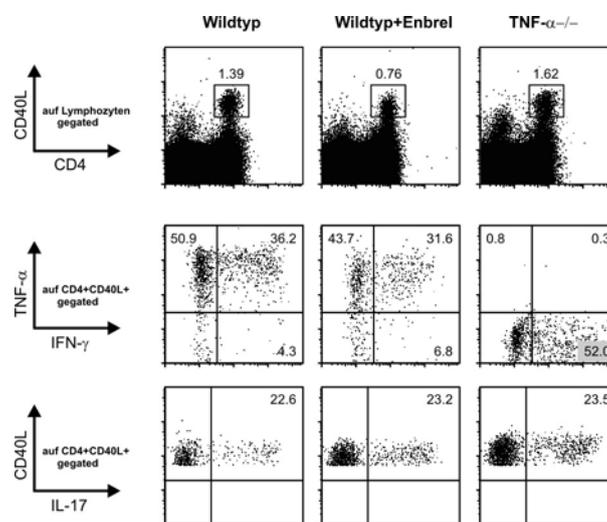
**Abb.9: Die Ausbildung einer chronischen OIA ist von TNF- $\alpha$  unabhängig.** TNF- $\alpha$  defiziente Mäuse und C57Bl/6 Wildtypmäuse wurden zweimal immunisiert und eine OIA wurde durch i.a. Injektion von catOVA induziert. Bei einigen C57Bl/6 Wildtypmäusen wurde durch Injektion von 1 mg Enbrel<sup>®</sup> am Tag-1 TNF- $\alpha$  neutralisiert. Die Kniegelenkschwellung wurde an den angegebenen Tagen gemessen (A). Drei Wochen nach Arthritisinduktion wurden die Kniegelenke histologisch untersucht und die Schwere der Arthritis als Histologiescore angegeben (B), nicht immun= nicht immunisiert, n= 8-13, die Daten von 2 gleich verlaufenden Experimenten wurden in einer Graphik zusammengefasst. (Tiergruppe mit Enbrel<sup>®</sup>-Behandlung 1 Experiment).

Bei der routinemäßigen Analyse des antigenspezifischen Antikörpertiters wurde festgestellt, dass TNF- $\alpha$ -/- Mäuse einen signifikant niedrigeren IgG1 und IgG2b Antikörpertiter als Wildtypmäuse aufwiesen (Abb.10). Demnach kommt TNF- $\alpha$  bei der Aktivierung von B-Zellen eine bedeutende Rolle zu.



**Abb.10: Immunisierte TNF- $\alpha$  defiziente Mäuse bilden signifikant niedrigere OVA-spezifische Antikörpertiter als Wildtypmäuse aus.** TNF- $\alpha$  defiziente Mäuse und C57Bl/6 Wildtypmäuse wurden am Tag-21 und am Tag-14 s.c. immunisiert. Am Tag-7 wurde den Mäusen Serum abgenommen und der OVA-spezifische Antikörpertiter in Relation zu einem Referenzserum einer mit OVA immunisierten C57Bl/6 Maus bestimmt, n= 5-8.

Bei Betrachtung der antigenspezifischen Th-Zellen fiel auf, dass TNF- $\alpha$  defiziente Mäuse im Vergleich zu Wildtypmieren mit 1.6% gegen 1.4% einen leicht erhöhten Anteil an antigenspezifischen Helfer-T-Zellen aufwiesen. Mehr als 50% dieser Th-Zellen produzierten IFN- $\gamma$ , jedoch wie erwartet kein TNF- $\alpha$  (Abb.11). In Wildtypmäusen dagegen exprimierten 86% aller T-Zellen TNF- $\alpha$  und 40% IFN- $\gamma$ . Mit Enbrel<sup>®</sup> behandelte Mäuse besaßen mit 0.8% zwar einen geringeren Anteil an CD4+CD40L+ T-Zellen, jedoch waren die Anteile an TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  exprimierenden Zellen gegenüber dem Wildtyp ähnlich. In allen drei Versuchsgruppen konnten mit ca. 23% vergleichbare Anteile an IL-17+CD4+ T-Zellen detektiert werden (Abb.11, unterste Reihe).

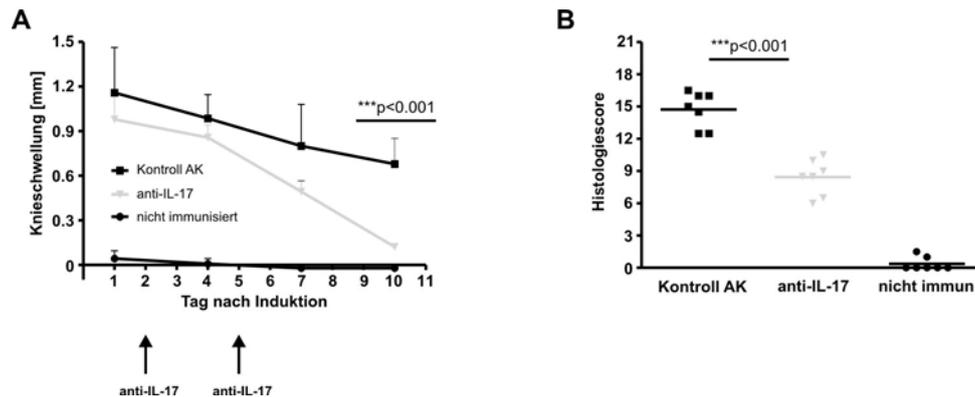


**Abb.11: OIA-krankte TNF- $\alpha$  defiziente Mäuse und Wildtypmäuse bilden eine ähnliche Anzahl an Th1- und Th17-Zellen aus.** In TNF- $\alpha$  defizienten Mäusen und C57Bl/6 Wildtypmäusen wurde zunächst eine OIA ausgelöst. In einige Wildtypmäuse wurde zusätzlich am Tag-1 1 mg Enbrel<sup>®</sup> injiziert. Am Tag+21 nach Arthritisinduktion wurden Zellen aus der Milz (untere Reihe) und aus den drainierenden Lymphknoten (obere und mittlere Reihe) *in vitro* mit catOVA restimuliert, die CD4+CD40L+ antigenspezifischen Helfer-T-Zellen angefärbt und ihre Zytokinexpression intrazellulär bestimmt. Die Zahlen in der oberen Reihe zeigen den Anteil von CD4+CD40L+ Zellen an allen CD4+ T-Zellen. Die Zahlen in der mittleren und der unteren Reihe geben den prozentualen Anteil der Zytokinproduzenten an allen CD4+CD40L+ Zellen an. Gezeigt sind repräsentative Daten aus einem von zwei durchgeführten Experimenten mit n= 5.

Die Ergebnisse dieser Versuche zeigen, dass TNF- $\alpha$  einen Teil der akuten Entzündungsreaktion bei einer OIA vermittelt. Dabei besitzen TNF- $\alpha$ -/- Mäuse eine erhöhte Anzahl an IFN- $\gamma$  exprimierenden T-Zellen. Für die Induktion einer chronischen OIA ist TNF- $\alpha$  jedoch nicht essentiell.

### 2.3 Die Rolle von IL-17 bei der OIA

In neueren Veröffentlichungen wird die Wirkung des Zytokins IL-17 als hoch proinflammatorisch beschrieben. Einige Autoimmunerkrankungen werden direkt durch IL-17 vermittelt bzw. verstärkt (7-9, 26, 136, 137). Deswegen sollte der Einfluss von IL-17 auf den Verlauf einer OIA untersucht werden. Dazu wurde in Mäusen eine OIA induziert und gleichzeitig IL-17 mit einem Antikörper *in vivo* neutralisiert.

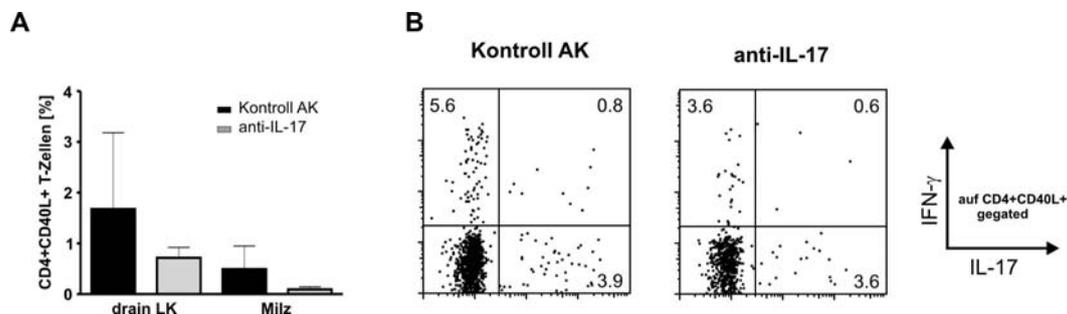


**Abb.12: Die Etablierung einer chronischen OIA ist von IL-17 abhängig.** Balb/c Wildtypmäuse wurden zweimal immunisiert und eine OIA wurde durch i.a. Injektion von catOVA induziert. Am Tag+2 und am Tag+5 nach Induktion wurden jeweils 200 µg eines anti-IL-17 Antikörpers injiziert. Die Kniegelenkschwellung wurde an den angegebenen Tagen gemessen (A). Drei Wochen nach Arthritisinduktion wurden die Kniegelenke histologisch untersucht und die Schwere der Arthritis als Histologiescore angegeben (B), Kontroll AK= Kontrollisotyp Antikörper, nicht immun= nicht immunisiert, n= 7, 1 repräsentatives Experiment von 2 ist gezeigt.

Die Neutralisation von IL-17 resultierte in einer geringeren akuten Kniegeschwellung bei mit anti-IL-17 behandelten Tieren gegenüber Kontrolltieren, die allerdings erst an Tag 10 einen statistisch signifikanten Unterschied ergab (Abb.12A). Des Weiteren führte die Neutralisation zu einer 50%-igen Verringerung der Ausprägung von chronischen Arthritissymptomen. Der durchschnittliche Histologiescore sank von 15 Punkten bei den Kontrolltieren auf 8.5 Punkte bei mit anti-IL-17 behandelten Tieren. Dieser histologische Unterschied war statistisch hoch signifikant (Abb.12B).

Weitergehend wurde der Einfluss der Neutralisation von IL-17 auf die IL-17 Sekretion von antigenspezifischen T-Zellen untersucht. Der Anteil an antigenspezifischen Helfer-T-Zellen war dabei in der Versuchsgruppe, welche mit anti-IL-17 behandelt wurde sowohl in der Milz als auch im drainierenden Lymphknoten um die Hälfte niedriger als in der Kontrollgruppe.

Jedoch produzierten die T-Zellen in beiden Versuchstiergruppen mit 4-6.5% zu etwa den gleichen Anteilen IFN- $\gamma$  und IL-17 (Abb.13).



**Abb.13: Unter IL-17 neutralisierenden Bedingungen bilden sich weniger OVA-spezifische Th-Zellen in OIA-kranken Mäusen.** In Balb/c Mäusen wurde zunächst eine OIA ausgelöst. Am Tag+2 und am Tag+5 nach Induktion wurden jeweils 200  $\mu$ g eines anti-IL-17 Antikörpers injiziert. Am Tag+21 nach Arthritisinduktion wurden Zellen aus der Milz und aus den drainierenden Lymphknoten *in vitro* mit catOVA restimuliert, die CD4+CD40L+ antigenspezifischen Helfer-T-Zellen angefärbt und ihre Zytokinexpression durchflusszytometrisch bestimmt. Die Graphik in (A) zeigt CD4+CD40L+ Zellen anteilig an allen CD4+ Zellen. Die Zahlen in (B) geben den prozentualen Anteil der Zytokinproduzenten an allen CD4+CD40L+ Zellen an, drain LK= drainierender Lymphknoten, Kontroll AK= Kontrollisotyp Antikörper. Es sind repräsentative Graphen jeder Versuchstiergruppe mit n= 4 aus einem von zwei durchgeführten Experimenten dargestellt.

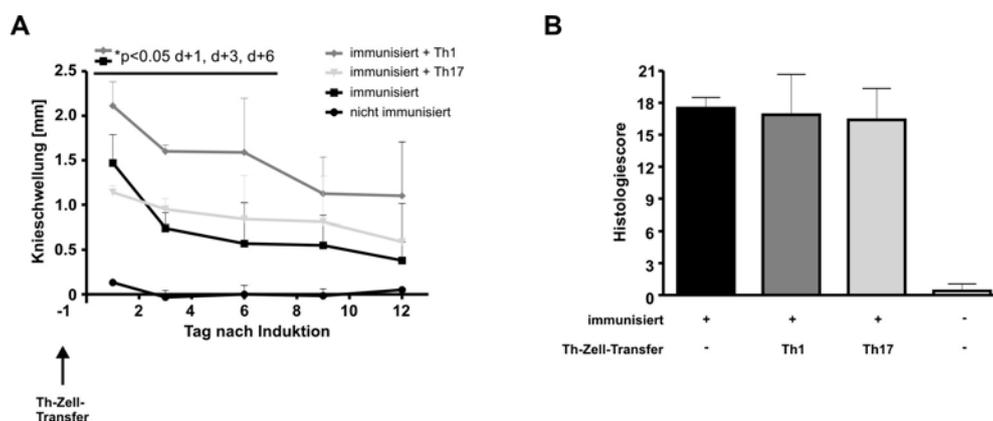
Die Ergebnisse der vorliegenden Experimente weisen IL-17 eine zentrale Bedeutung bei der Etablierung einer chronischen OIA zu. In der akuten Entzündungsphase dagegen spielt IL-17 eine weniger wichtige Rolle. Ebenso scheint es keinen autokrinen Verstärkungsmechanismus der IL-17 Sekretion zu geben, da die Neutralisation dieses Zytokins keinen Einfluss auf den Anteil an IL-17+ antigenspezifischen T-Zellen hat.

### 3. Die Rolle von pro-inflammatorischen Helfer-T-Zellen bei der OIA

#### 3.1 Die Rolle von Th1- und Th17-Zellen bei der OIA

In den vorangegangenen Experimenten dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die akute Phase einer Ovalbumin-induzierten Arthritis teilweise durch  $\text{TNF-}\alpha$  vermittelt wird, die Etablierung einer chronischen OIA aber größtenteils von  $\text{IL-17}$  abhängt.  $\text{IFN-}\gamma$  scheint dagegen eher eine anti-inflammatorische Wirkung zu haben.

Mithilfe des adoptiven Transfers von antigenspezifischen Helfer-T-Zellen sollte im Folgenden der Beitrag von  $\text{CD4}^+$  T-Zellen an den einzelnen Phasen einer OIA untersucht werden.  $\text{IL-17}$  wird überwiegend von Th17-Zellen produziert, welche ebenfalls  $\text{TNF-}\alpha$  exprimieren (6, 20, 138). Aus diesem Grund wurde der Einfluss von Th17-Zellen auf eine OIA analysiert. Als Vergleichszellen wurden Th1-Zellen genutzt, da auch sie  $\text{TNF-}\alpha$  exprimieren. Außerdem wurde berichtet, dass Th1-Zellen abhängig vom zeitlichen Verlauf einer Entzündungsreaktion sowohl pro- als auch anti-inflammatorisch wirken können (2, 3, 38, 131, 139, 140).



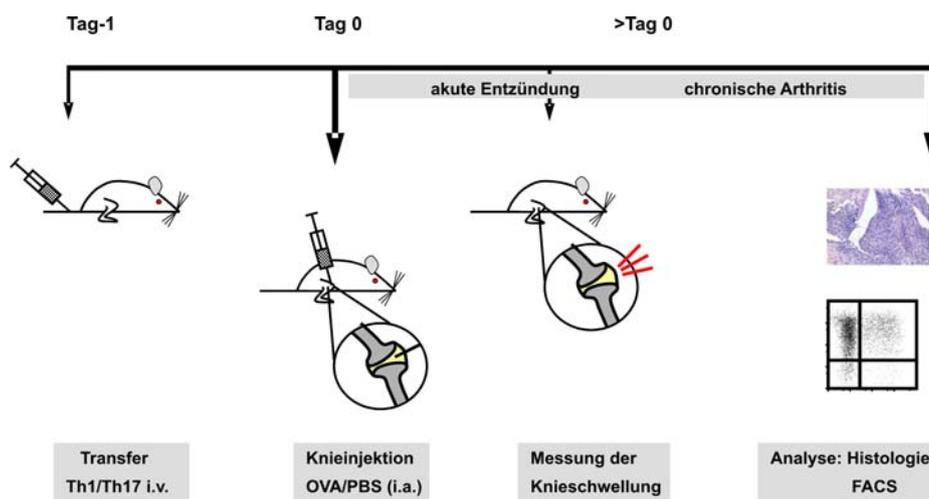
**Abb.14: Ein Transfer von OVA-spezifischen Th17-Zellen zeigt keinen Einfluss auf den Verlauf einer OIA.** Balb/c Wildtypmäuse wurden zweimal immunisiert und eine OIA wurde durch i.a. Injektion von catOVA induziert. Am Tag-1 vor Induktion wurden jeweils  $2 \times 10^6$  Th1- oder Th17-Zellen i.v. transferiert. Die Kniegelenkschwellung wurde an den angegebenen Tagen gemessen (A). Drei Wochen nach Arthritisinduktion wurden die Kniegelenke histologisch untersucht und die Schwere der Arthritis als Histologiescore angegeben (B). Am Tag+1, am Tag+3 und am Tag+6 ergab sich jeweils ein statistisch einfach signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen ohne Zelltransfer und mit Th1-Zell-Transfer,  $n = 4-6$ .

In einem ersten Schritt wurde untersucht, welchen Einfluss ein zusätzlicher adoptiver Transfer von antigenspezifischen Th1- bzw. Th17-Zellen auf den Verlauf einer OIA hat.

Auffälligerweise hatte der adoptive Transfer von OVA-spezifischen Th17-Zellen weder auf die akute Gelenkschwellung noch auf die Etablierung einer chronischen OIA Auswirkungen, so dass die Versuchstiergruppen ohne zusätzlichen Transfer und mit Th17-Zell-Transfer nahezu

identische Ergebnisse zeigten (Abb.14). Interessanterweise führte der adoptive Transfer von Th1-Zellen zu einer 1.5- bis 2.5-fachen Verstärkung der Gelenkschwellung gegenüber der Kontrollgruppe. So betrug die durchschnittliche Knieschwellung am Tag+6 bei der Kontrollgruppe 0.57 mm, bei der Gruppe, die Th1-Zellen erhalten hatte, jedoch 1.6 mm. An den ersten drei Messzeitpunkten am Tag+1, am Tag+3 und am Tag+6 war dieser Unterschied zwischen den beiden Gruppen statistisch signifikant. Jedoch hatte der Transfer von Th1-Zellen auf die chronische Arthritisphase keinen Einfluss. Die histologische Bewertung am Tag+21 nach OIA Induktion ergab für alle drei immunisierten Tierversuchsgruppen jeweils einen durchschnittlichen Krankheitsscore zwischen 16.5 und 17.5 Punkten (Abb.14B).

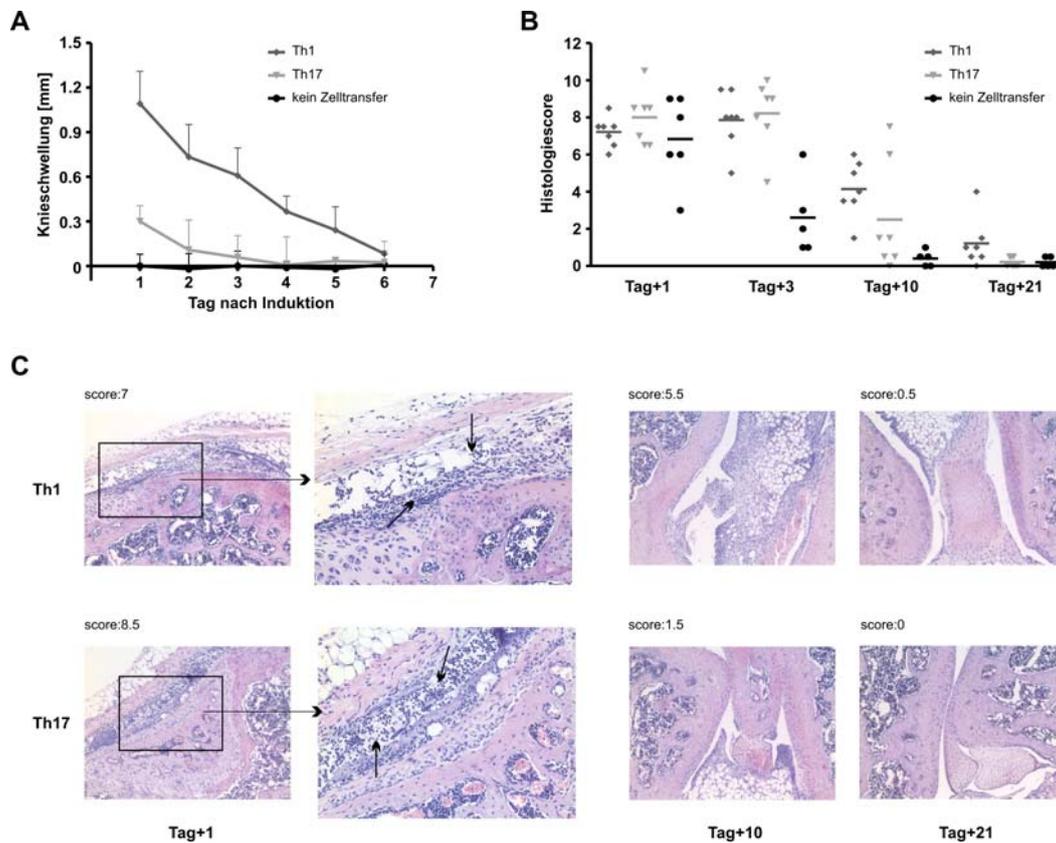
Der zusätzliche Transfer von antigenspezifischen Th17-Zellen führt demnach zu keiner Verstärkung einer OIA, obwohl IL-17 eine bedeutende Rolle bei der Etablierung einer chronischen OIA spielt. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass das von endogenen Th17-Zellen produzierte IL-17 bereits in ausreichenden Mengen vorhanden ist, so dass zusätzlich zugeführtes IL-17 keine Wirkung mehr zeigt. Deswegen wurde in einem Anschlussexperiment die Fähigkeit von Th17-Zellen, eine OIA in Abwesenheit von endogenen aktivierten T-Zellen zu induzieren, untersucht. Dafür wurde das Protokoll einer OIA modifiziert. Im modifizierten Protokoll einer durch Th-Zell-Transfer vermittelten OIA wird nicht systemisch das endogene Immunsystem aktiviert, sondern stattdessen werden *in vitro* generierte OVA-spezifische Th17-Zellen i.v. in naive Rezipiententiere transferiert. 24 h nach dem Th-Zell-Transfer wurde eine OIA mittels i.a. Injektion von catOVA ausgelöst (Abb15).



**Abb.15: Schematische Darstellung des zeitlichen Verlaufes einer durch OVA-spezifische Th-Zellen induzierten OIA.** i.v.= intravenös, i.a.= intra-artikulär.

Da der Transfer von Th1-Zellen in OIA-induzierte Mäuse im vorherigen Experiment zu einer Erhöhung der akuten Gelenkschwellung führte und damit zeigte, dass Th1-Zellen im OIA Modell pro-inflammatorisch wirken, wurden Th1-Zellen wiederum als Vergleichszellen in den folgenden Versuchen eingesetzt.

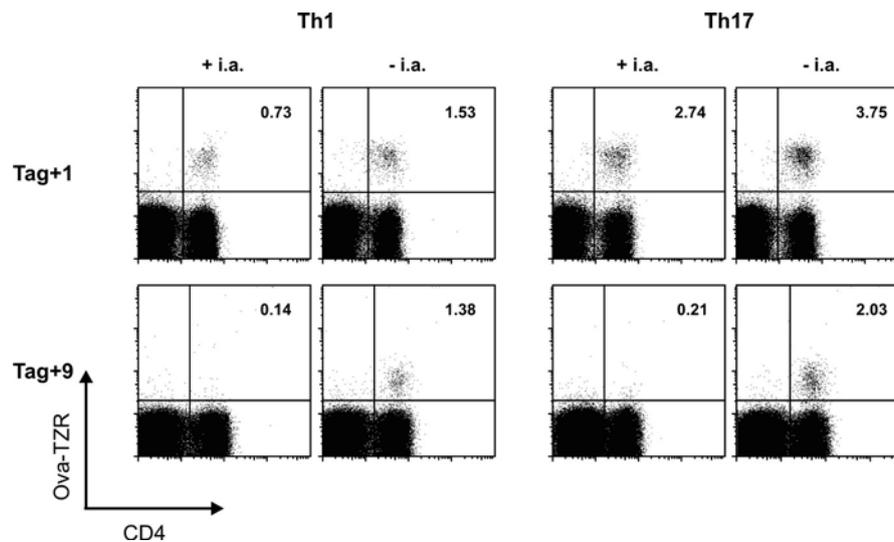
Mit Th1-Zellen transferierte Tiere zeigten eine akute Knieschwellung, die am Tag+1 nach Krankheitsinduktion am größten war und danach abnahm. Dagegen war bei Tieren, die Th17-Zellen erhalten hatten, lediglich eine äußerst geringe Gelenkschwellung am Tag+1 detektierbar (Abb.16A). Ab Tag+3 war in dieser Versuchsgruppe keine Gelenkschwellung mehr sichtbar. Tiere, in die keine OVA-spezifischen Th-Zellen transferiert wurden, zeigten ebenfalls keine Knieschwellung.



**Abb.16: Th1- und Th17-Zellen induzieren eine akute Entzündung in immunkompetenten Wildtypmäusen.**  $2 \times 10^6$  OVA-spezifische Th1- oder Th17-Zellen wurden i.v. in naive Balb/c Wildtypmäuse transferiert und eine OIA wurde anschließend durch i.a. Injektion von catOVA induziert. Die Kniegelenkschwellung wurde an den angegebenen Tagen gemessen (A). An den angegebenen Zeitpunkten wurden die Kniegelenke histologisch untersucht und die Schwere der Arthritis als Histologiescore angegeben (B). Repräsentative H/E-Färbungen von Kniegelenkschnitten sind in (C) gezeigt. Die Pfeile zeigen Infiltrate und Exsudate von Granulozyten. Die Bilder wurden mit 25-facher Vergrößerung (kleine Bilder) bzw. mit 100-facher Vergrößerung (große Bilder) aufgenommen, n = 5-7, ein repräsentatives Experiment von zwei ist gezeigt.

Bei der histologischen Analyse der Kniegelenke zeigte sich allerdings ein anderes Bild. Sowohl Th1- als auch Th17-Zellen induzierten zelluläre Infiltrate (Abb.16B). In der akuten Phase der Krankheit ließen sich am Tag+1 sowie am Tag+3 nach Induktion jeweils sowohl granulozytäre Infiltrate als auch Exsudate erkennen, die jeweils einen summierten durchschnittlichen Histologiescore von 8 Punkten ergaben (Abb.16C). Diese akuten Entzündungssymptome bildeten sich dann im Laufe der folgenden Woche zurück, so dass am Tag+10 nach Induktion in beiden Gruppen nur noch wenige Krankheitssymptome erkennbar waren. Dabei zeigten Tiere, die Th1-Zellen erhalten hatten, durchschnittlich noch stärkere, akute granulozytäre Infiltrate als Tiere der Th17-Gruppe. Schließlich waren fast alle Tiere beider Gruppen am Tag+21 nach Induktion histopathologisch unauffällig und zeigten einen Histologiescore von 0 bis 1 Punkt. Zu keinem Zeitpunkt waren in beiden Tiergruppen chronische Arthritisssymptome erkennbar (Abb.16B+C). Interessanterweise zeigten auch Kontrolltiere ohne Th-Zell-Transfer zumindest am Tag+1 mit 7 Punkten eine ähnliche Entzündung wie die anderen beiden Gruppen, so dass am ersten Analysetag die drei Gruppen nahezu nicht zu unterscheiden waren. In der Kontrollgruppe waren allerdings am Tag+3 die sichtbaren Entzündungssymptome deutlich zurückgegangen und ab Tag+10 nicht mehr detektierbar.

Bei der Re-Analyse der transferierten Zellen konnten in den beiden Versuchstiergruppen mit Th-Zell-Transfer in Lymphknoten und Milz ab Tag+9 nach Arthritisinduktion keine transferierten Zellen mehr detektiert werden (Abb.17, Daten nicht gezeigt). Lag der Anteil an OVA-spezifischen T-Zellen in den drainierenden Lymphknoten am Tag+1 nach Induktion noch bei 0.73% bzw. 2.74%, sank er am Tag+9 nach Induktion auf 0.14% bzw. 0.21% für Th1- bzw. Th17-Zellen. Dies war kein Kompatibilitätsproblem zwischen aus DO11.10 Mäusen generierten Th1- bzw. Th17-Zellen und Balb/c Wildtypmäusen, da in nicht-induzierten Tieren, die keine i.a. Injektion und somit kein Antigen erhalten hatten, transferierte Zellen nachgewiesen werden konnten (Abb.17).

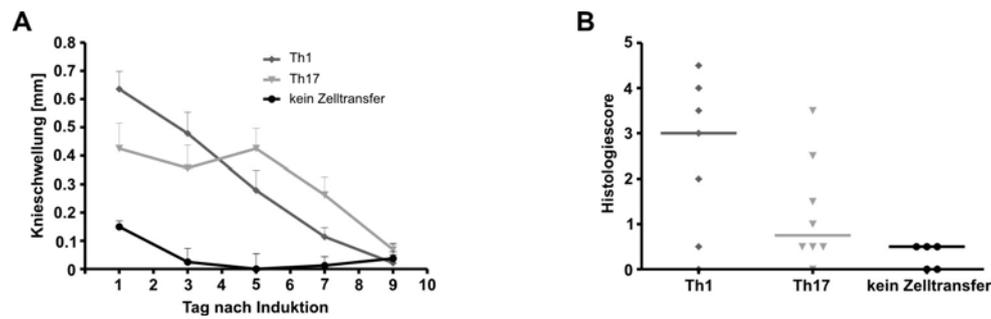


**Abb.17:** In mit Th-Zellen transferierten Mäusen lassen sich ab Tag+9 nach einer OIA Induktion keine transferierten Th-Zellen mehr detektieren. Zellen aus den drainierenden Lymphknoten von Balb/c Mäusen mit Th1- oder Th17-Zell-Transfer wurden am Tag+1 bzw. am Tag+9 nach OIA Induktion mittels Durchflusszytometrie auf die Anwesenheit der transferierten OVA-spezifischen Th-Zellen untersucht. Die repräsentativen Graphen einer Versuchstiergruppe mit n= 7 zeigen alle lebenden Lymphozyten. Die Zahlen geben den prozentualen Anteil von OVA-spezifischen T-Zellen an allen Lymphozyten an, i.a.= intra-artikuläre Injektion, TZR= T-Zell-Rezeptor.

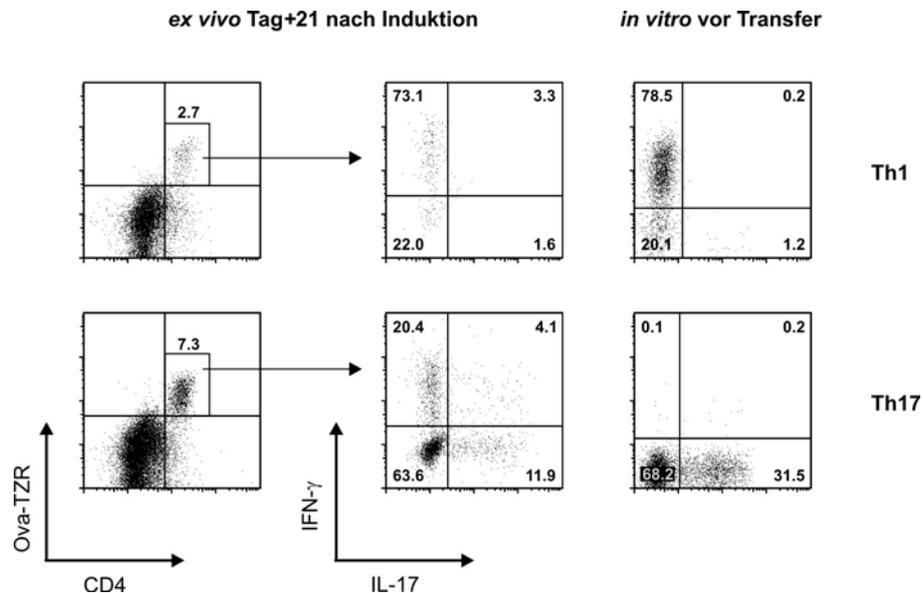
Ob die transferierten Th-Zellen nach Antigenstimulation *in vivo* sterben oder in andere Organe migrieren, blieb zunächst unklar. Um auszuschließen, dass das Ausbleiben einer chronischen Arthritis in T-Zell-transferierten Mäusen auf das Sterben der transferierten Th-Zellen *in vivo* zurückzuführen ist, wurde das Experiment mit lymphopenischen SCID Mäusen als Rezipiententiere wiederholt, denn durch die erwartete homeostatische Proliferation der transferierten Th-Zellen sollte ein Überleben der Zellen sichergestellt sein.

Sowohl SCID Mäuse, die Th1-Zellen als auch Mäuse, die Th17-Zellen erhalten hatten, zeigten eine akute Gelenkschwellung, jedoch konnten auch hier in beiden Gruppen keine chronischen Arthritis-symptome nachgewiesen werden, so dass die Versuchstiere drei Wochen nach Krankheitsinduktion nur marginale Anzeichen einer Entzündung zeigten (Abb.18A+B).

Bei der Re-Analyse der transferierten Zellen zeigte sich, dass sowohl Th1- als auch Th17-Zellen drei Wochen nach i.a. Induktion in den Tieren nachgewiesen werden konnten, wobei mit 7.3% 2.5 mal mehr Th17-Zellen als Th1-Zellen detektiert werden konnten (Abb.19). Über 70% der Th1-Zellen exprimierten immer noch IFN- $\gamma$ . Der Anteil von IL-17+ Zellen innerhalb der Th17-Zellen ging allerdings von ca. 32% (vor dem Transfer) auf ca. 15% (*ex vivo* am Tag+21 nach Induktion) zurück. Außerdem exprimierten jetzt ca. 24% der Th17-Zellen IFN- $\gamma$  (Abb.19).



**Abb.18: Th1- und Th17-Zellen induzieren eine akute Entzündung nach Transfer in lymphopenische Mäuse.**  $2 \times 10^6$  OVA-spezifische Th1- oder Th17-Zellen wurden i.v. in naive SCID Mäuse transferiert und eine OIA wurde anschließend durch i.a. Injektion von catOVA induziert. Die Kniegelenkschwellung wurde an den angegebenen Tagen gemessen (A). Drei Wochen nach Arthritisinduktion wurden die Kniegelenke histologisch untersucht und die Schwere der Arthritis als Histologiescore angegeben (B),  $n = 7-8$ , ein repräsentatives Experiment von zwei ist gezeigt.



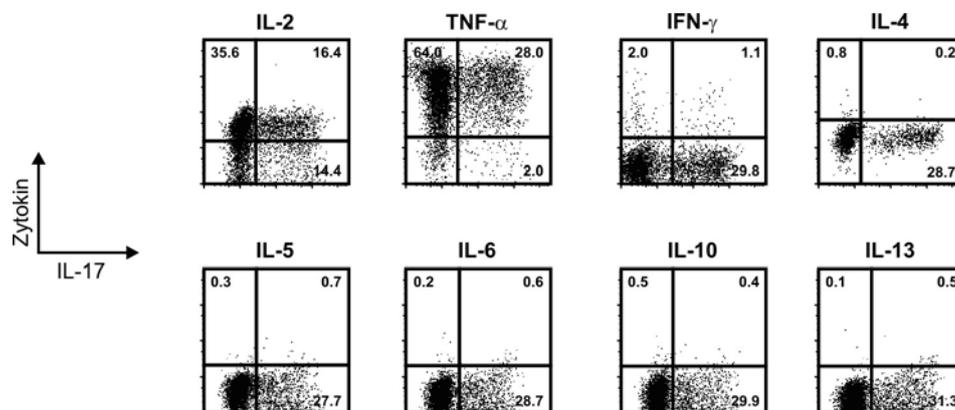
**Abb.19: Transferierte Th-Zellen lassen sich in lymphopenischen SCID Mäusen noch drei Wochen nach OIA Induktion detektieren.** Zellen aus den drainierenden Lymphknoten von SCID Mäusen mit Th1-oder Th17-Zell-Transfer wurden am Tag+21 nach OIA Induktion mittels Durchflusszytometrie nach PMA/iono Restimulation auf die Anwesenheit der transferierten OVA-spezifischen Th-Zellen sowie auf deren Zytokinproduktion hin untersucht. Die repräsentativen Graphen einer Versuchstiergruppe mit  $n = 6$  zeigen alle lebenden Lymphknotenzellen (linke Spalte) bzw. alle CD4<sup>+</sup> OVA-spezifischen T-Zellen (mittlere und rechte Spalte). Die Zahlen geben den prozentualen Anteil von OVA-spezifischen T-Zellen an allen Lymphknotenzellen (linke Spalte) bzw. den prozentualen Anteil der Zytokinproduzenten an allen OVA-spezifischen CD4<sup>+</sup> Zellen (mittlere und rechte Spalte) an.

Die bisher durchgeführten Experimente haben gezeigt, dass *in vitro* generierte Th17-Zellen nicht in der Lage sind, eine chronische OIA zu verstärken oder sogar zu induzieren, obwohl die Etablierung einer chronischen OIA zu großen Teilen durch IL-17 vermittelt wird. Des

Weiteren verursachen Th17-Zellen zwar eine akute Entzündung, jedoch induzieren sie zumindest in immunkompetenten Wildtypmäusen keine akute Gelenkschwellung. Dagegen erwiesen sich Th1-Zellen als potentere pro-inflammatorische Zellen, da sie sowohl eine akute Gelenkschwellung verstärken und verursachen können als auch eine akute Entzündung induzieren können. Allerdings sind auch Th1-Zellen nicht in der Lage, eine chronische OIA hervorzurufen.

### 3.2 Nähere Charakterisierung von Th17-Zellen

Unter der Annahme, dass IL-17 hauptsächlich von Th17-Zellen produziert wird, ergibt sich somit ein Widerspruch zwischen dem Befund, dass die chronische OIA durch IL-17 vermittelt wird sowie den festgestellten limitierten pro-inflammatorischen Fähigkeiten von *in vitro* generierten Th17-Zellen. Um auszuschließen, dass das angewandte Protokoll zur *in vitro* Generierung von Th17-Zellen unzureichend ist oder *in vitro* generierte Th17-Zellen generell geringere pro-inflammatorische Fähigkeiten als Th1-Zellen oder *in vivo* generierte Th17-Zellen besitzen, wurden *in vitro* generierte Th17-Zellen *in vitro* und *in vivo* näher charakterisiert und die Ergebnisse mit bereits veröffentlichten Daten verglichen.

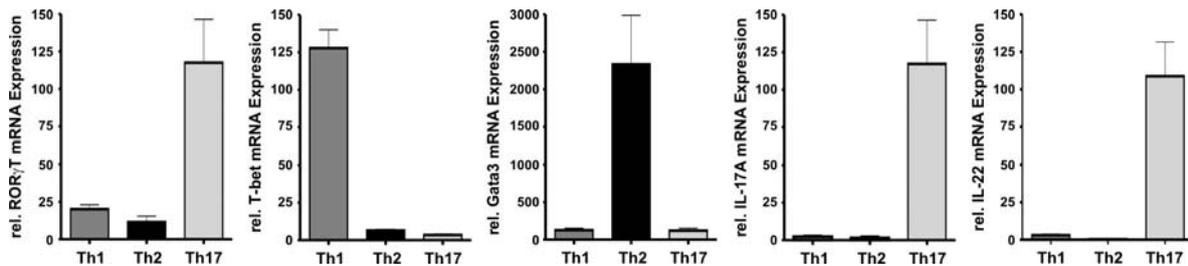


**Abb.20: *In vitro* generierte Th17-Zellen exprimieren außer IL-17 auch die Zytokine IL-2 und TNF- $\alpha$ .** Th17-Zellen wurden am Tag 6 der *in vitro* Kultur mit PMA/iono restimuliert und durchflusszytometrisch ihre Zytokinexpression bestimmt. Die repräsentativen Graphen zeigen alle CD4+ Lymphozyten. Die Zahlen geben den prozentualen Anteil der Zytokinproduzenten an allen CD4+ Zellen an.

Dazu wurden *in vitro* generierte Th17-Zellen zunächst auf ihre Zytokinexpression und die Expression von subpopulationsspezifischen Transkriptionsfaktoren untersucht.

Th17-Zellen exprimierten neben IL-17 auch IL-2 und TNF- $\alpha$ , jedoch keine anderen Th1- oder Th2-spezifischen Zytokine (Abb.20). Ferner konnte die mRNA des Zytokins IL-22 in Th17-

Zellen nachgewiesen werden (Abb.21). Für eine Färbung des IL-22 Proteins stand während der Arbeit noch kein geeigneter Antikörper zur Verfügung. Außerdem waren Th17-Zellen durch die spezifische Expression des Transkriptionsfaktors ROR $\gamma$ T charakterisiert. Gleichzeitig konnten nur vergleichsmäßig geringe Mengen der mRNA des Th1-typischen Transkriptionsfaktors T-bet und der mRNA des Th2-typischen Transkriptionsfaktors Gata-3 in Th17-Zellen nachgewiesen werden (Abb.21).

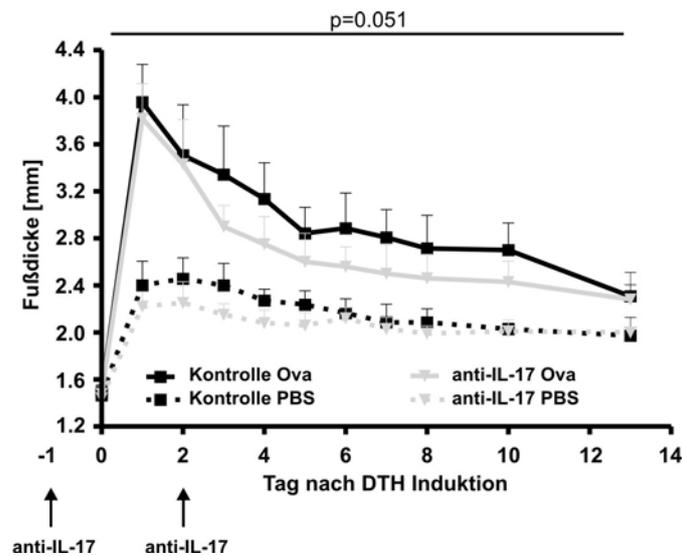


**Abb.21: *In vitro* generierte Th17-Zellen exprimieren die mRNA für ROR $\gamma$ T, IL-17A und IL-22.** Th1-, Th2- und Th17-Zellen wurden am Tag 6 der *in vitro* Kultur mit PMA/iono restimuliert und die mRNA der Th-Zellen wurde isoliert. Die relative Expression der mRNA wurde mittels *Real-Time PCR* in Relation zum *UBC Housekeeping* Gen ermittelt. Die Mittelwerte der Expressionsdaten von je drei unabhängigen Experimenten sind gezeigt.

Da OVA-spezifische Th17-Zellen im Modell der OIA keine akute Gelenkschwellung und keine chronische Entzündung induzieren, sollten *in vitro* generierte Th17-Zellen in einem weiteren Entzündungsmodell, auf ihre pro-inflammatorische Wirkung *in vivo* getestet werden. Im Modell der *delayed type hypersensitivity* (DTH) Reaktion werden Mäuse zunächst für ein Antigen sensibilisiert. Dies geschieht entweder durch s.c. Immunisierung mit einer Emulsion aus dem Antigen und CFA oder durch Transfer von antigenspezifischen Th1-Zellen. Danach wird eine Entzündung in der Fußsohle durch s.c. Injektion einer Antigen-IFA-Emulsion ausgelöst. Als Entzündungsparameter wird die Schwellung der Fußsohle bestimmt (1).

Zunächst sollte analysiert werden, ob das Zytokin IL-17 im Modell der DTH für die Entstehung einer Entzündung wichtig ist. Dazu wurde IL-17 mithilfe eines anti-IL-17 Antikörpers *in vivo* neutralisiert.

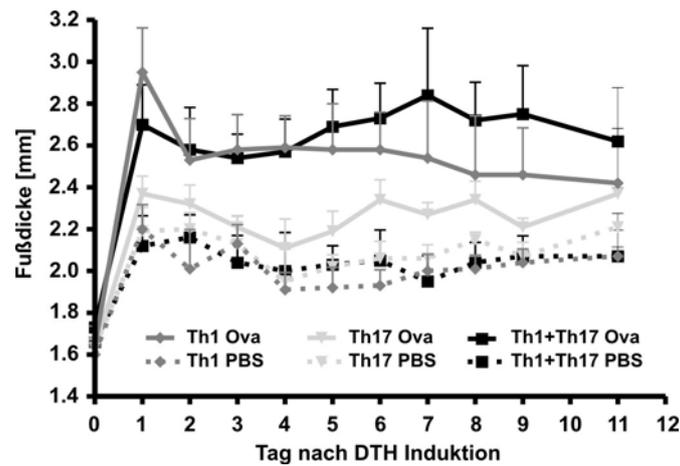
Die Neutralisation von IL-17 im DTH Modell ergab über den gesamten Versuchsverlauf betrachtet eine tendenziell leicht geringere Schwellung der Fußsohlen als in Kontrollmäusen mit einer statistischen Signifikanz von  $p=0.051$  (Tag+1 bis Tag+14 zusammengefasst, Abb.22). Demnach ist IL-17 an einer durch Ovalbumin induzierten DTH beteiligt, wenn auch in geringem Ausmaß.



**Abb.22: Eine akute DTH Reaktion wird teilweise durch IL-17 vermittelt.** C57Bl/6 Mäuse wurden zweimal immunisiert und eine DTH Reaktion wurde durch s.c. Injektion von OVA/IFA in der Fußsohle induziert. Am Tag-1 und am Tag+2 wurden je 200 µg eines anti-IL-17 Antikörper injiziert. Für den gesamten gemessenen Zeitraum ergab sich für die statistische Signifikanz des Unterschiedes der beiden Gruppen im OVA-induzierten Fuß ein p-Wert von  $p=0.051$ , Ova= Ova-induzierter ipsilateraler Fuß, PBS= kontralateraler mit PBS injizierter Fuß,  $n=5-7$ .

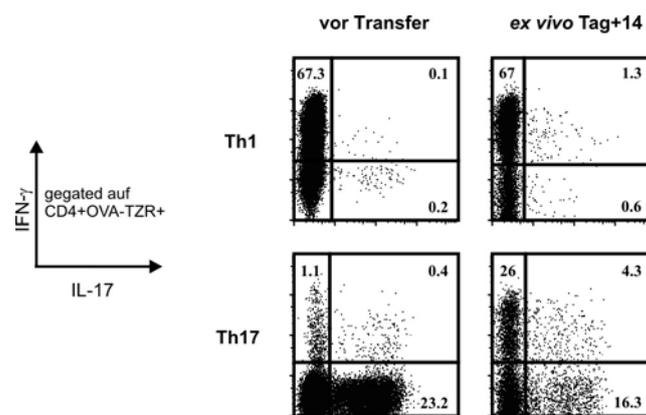
Anschließend wurde untersucht, ob *in vitro* generierte OVA-spezifische Th17-Zellen eine DTH Reaktion vermitteln können. Hierfür wurden  $5 \times 10^5$  Th17-Zellen i.v. in Balb/c Mäuse transferiert und 24 h später eine DTH Reaktion im Fußballen ausgelöst. Th1-Zellen dienten als Kontrolle. Da  $5 \times 10^5$  Th1-Zellen ausreichen, um eine Th1-induzierte DTH Reaktion auszulösen, wurde diese Zellzahl auch für das Protokoll der Th17-vermittelten DTH Reaktion übernommen.

Im Vergleich zu Th1-Zellen konnten jedoch Th17-Zellen in den ersten fünf Tagen nach DTH Induktion nur eine sehr geringe Fußschwellung induzieren. Ebenso gab es keinen Unterschied zwischen den Gruppen, die nur Th1-Zellen oder ein Gemisch aus Th1- und Th17-Zellen erhalten hatten (Abb.23). Jedoch stieg die Fußschwellung in beiden Tierversuchsgruppen, die Th17-Zellen erhalten hatten, ab Tag+4 leicht an. Ähnliche Ergebnisse zeigten Experimente, in denen eine höhere Anzahl von bis zu  $2 \times 10^7$  Th17-Zellen in die Versuchsmäuse transferiert wurde (Daten nicht gezeigt).



**Abb.23: Th17-Zellen induzieren nur eine schwache DTH Reaktion in immunkompetenten Wildtypmäusen.**  $5 \times 10^5$  OVA-spezifische Th1- oder/und Th17-Zellen wurden i.v. in Balb/c Mäuse transferiert und 24 h später eine DTH Reaktion durch s.c. Injektion von OVA/IFA in der Fußsohle induziert, Ova= Ova-induzierter ipsilateraler Fuß, PBS= kontralateraler PBS Kontrollfuß. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von vier durchgeführten Experimenten (Th1/Th17 Ko-Transfer - 1 Experiment).

Um auszuschließen, dass das Ausbleiben einer robusten DTH Reaktion durch das Sterben der Th17-Zellen *in vivo* verursacht wurde, sollten die transferierten Th-Zellen re-analysiert werden. Es zeigte sich, dass sowohl Th1- als auch Th17-Zellen aus den Versuchstieren re-isoliert werden konnten. Die Re-Analyse der transferierten Th-Zellen ergab, dass Th1-Zellen weiterhin zu über 60% IFN- $\gamma$  produzierten. Auch ca. 30% der Th17-Zellen exprimierten jetzt IFN- $\gamma$  und nur 20% exprimierten IL-17 (Abb.24).

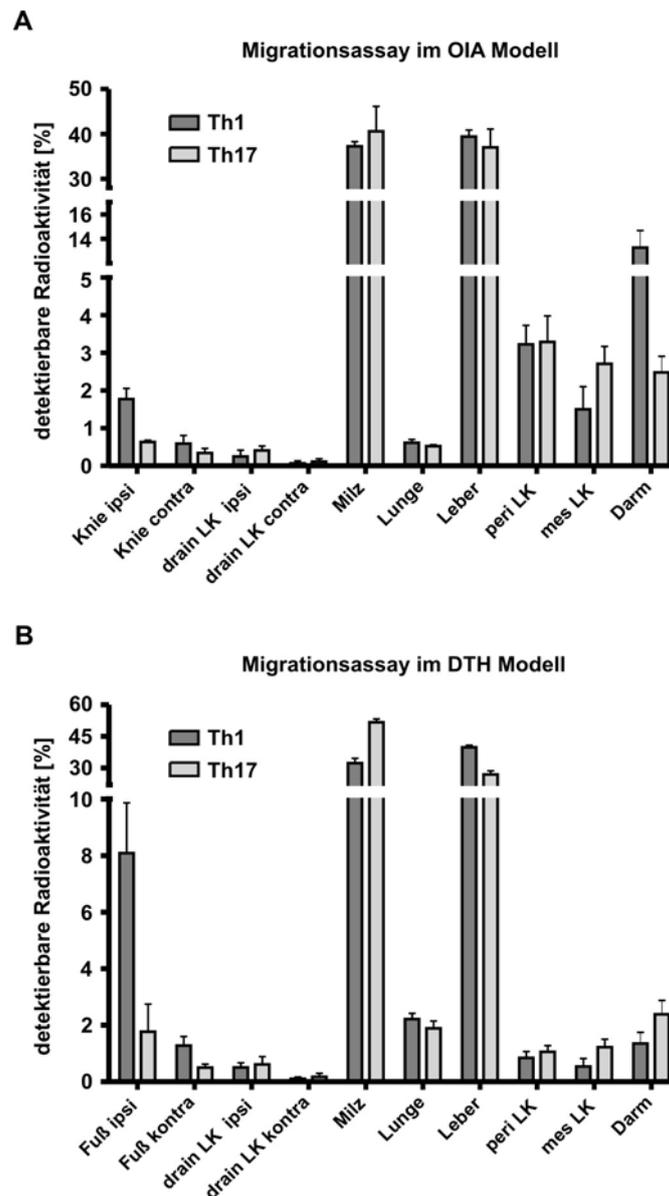


**Abb.24: Re-Isolierte Th17-Zellen aus DTH induzierten Mäusen exprimieren weniger IL-17 aber mehr IFN- $\gamma$  als vor dem Transfer.** Am Tag+14 einer durch Th1- oder Th17-Zellen ausgelösten DTH Reaktion wurden Milzzellen mit PMA/iono *in vitro* restimuliert und die Zytokinexpression der transferierten Th1- und Th17-Zellen gemessen. Die repräsentativen Graphen zeigen alle CD4+ OVA-TZR+ Zellen. Die Zahlen geben den prozentualen Anteil der Zytokinproduzenten an allen transferierten OVA-spezifischen T-Zellen an.

Auch im Modell der DTH können demnach *in vitro* generierte antigenspezifische Th17-Zellen keine akute Schwellung des entzündeten Gewebes induzieren, obwohl eine DTH Reaktion im Fuß teilweise von IL-17 abhängt, wenn auch im geringeren Umfang als eine chronische OIA. Die bisherigen Experimente belegen außerdem, dass *in vitro* generierte Th17-Zellen weder eine Gelenkschwellung noch eine chronische OIA induzieren können, obwohl die Zellen in den einzelnen Immunorganen nachgewiesen werden können, die Zellen vital sind und pro-inflammatorisches IL-17 und TNF- $\alpha$  sezernieren können. Eine mögliche Erklärung ist, dass die transferierten Th17-Zellen nicht an den Ort der Entzündung gelangen.

Da die Einwanderung von Immunzellen in entzündete Gewebe die Voraussetzung für eine effektive Immunantwort ist, wurde im Folgenden das Migrationsverhalten der Th17-Zellen im Vergleich zu Th1-Zellen in einem Migrationsassay untersucht. Hierfür wurden die OVA-spezifischen Th-Zellen vor dem adoptiven Transfer radioaktiv markiert. Anschließend wurde 24 h nach dem Transfer bzw. nach der Induktion einer Entzündung die Radioaktivität einzelner relevanter Organe gemessen. Um das Migrationsverhalten in verschiedenen Entzündungssituationen zu testen, wurde sowohl ein Assay im Modell der OIA (Einwanderung der Th-Zellen in das entzündete Kniegelenk) als auch ein Assay im DTH Modell (Einwanderung der Zellen in das entzündete Fußgelenk) durchgeführt.

Im Modell der OIA zeigte sich, dass Th1-Zellen dreimal besser in das entzündete Knie einwanderten als Th17-Zellen, welche dagegen in größerer Anzahl in der Milz zu finden waren (Abb.25A). Generell wurde die meiste detektierte Radioaktivität mit 35-45% in der Milz und in der Leber gefunden, was zeigt, dass der überwiegende Teil der transferierten Zellen im Blut- und Lymphsystem zirkulierte und nur ein äußerst geringer Teil der antigenspezifischen Th-Zellen von 0.5-2% in das entzündete Kniegelenk einwanderte. Th1-Zellen waren ebenso vermehrt im Darm zu finden (14%), während nur 2% der Th17-Zellen im Darm nachgewiesen werden konnten. Die Migration in alle anderen untersuchten Organe war dagegen bei Th1- und Th17-Zellen annähernd gleich stark ausgeprägt (Abb.25A).



**Abb.25: Th17-Zellen migrieren schlechter in entzündete Gewebe als Th1-Zellen.** Radioaktiv markierte OVA-spezifische Th1- oder Th17-Zellen wurden i.v. entweder (A) in naive Balb/c Mäuse transferiert in denen 24 h später durch i.a. Injektion eine OIA ausgelöst wurde oder (B) in Balb/c Mäuse transferiert in denen 20 h vorher eine DTH durch Th1-Zellen ausgelöst worden war. 24 h nach der OIA Induktion (A) bzw. 24 h nach dem Th-Zell-Transfer (B) wurde die Radioaktivität in den angegebenen Organen gemessen, ipsi= ipsilaterales/r Ova-induziertes/r Knie/Fuß, kontra= kontralaterales/r Kontrollknie/fuß, (drain) LK= (drainierender) Lymphknoten, peri LK= periphere LK, mes LK= mesenteriale LK, n= 6-7 Mäuse, gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von drei Experimenten (B) bzw. ein Experiment (A).

Im DTH Modell zeigte sich eine ähnliche Migration wie im OIA Modell. Mit 8% gegenüber 2% detektierter Radioaktivität migrierten Th1-Zellen viermal besser in den entzündeten Fuß als Th17-Zellen. Auch hier konnte die meiste Radioaktivität in der Milz (30% Th1, 50% Th17) und in der Leber (40% Th1, 28% Th17) gemessen werden. Jedoch wanderten im DTH Modell im Vergleich zum Migrationsassay im OIA Modell mit 1.5% weitaus weniger Th1-Zellen in den

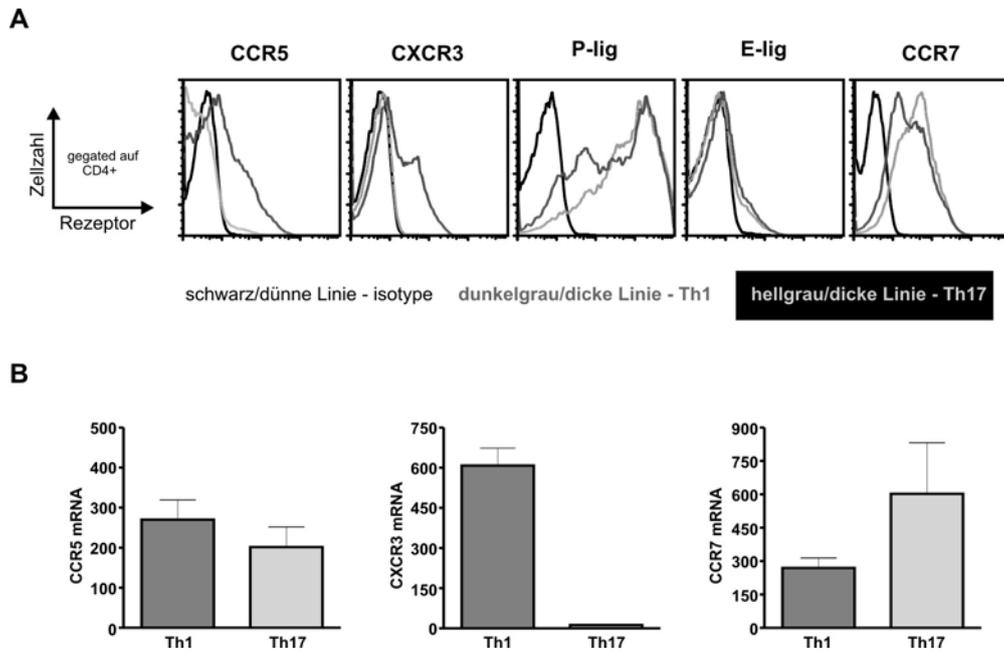
Darm ein. Die Migration der OVA-spezifischen Th-Zellen in die anderen analysierten Organe war ungefähr gleich stark ausgeprägt (Abb.25B).

Eine Voraussetzung für die Einwanderung von Immunzellen in definierte Gewebe ist u.a. die Expression spezifischer Chemokinrezeptoren und Selektinliganden. Selektine sind auf verschiedenen Endothel- und Epithelzellen exprimiert. Trägt eine im Blut- und Lymphsystem zirkulierende Zelle die entsprechenden Selektinliganden, führt die Bindung der Selektine zu einer Verringerung der Zirkulationsgeschwindigkeit. Die Zelle wird praktisch „abgebremst“ und kann dann durch die Epithelschicht in das Gewebe migrieren. In welches Gewebe Zellen migrieren, hängt u.a. von der Chemokinrezeptorexpression ab. Die Zellen wandern dann entlang eines Chemokingradienten, sofern sie die entsprechenden Rezeptoren auf der Zelloberfläche exprimieren (141-144).

Für die Migration in entzündetes Gewebe sind u.a. die Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR3, sowie P-Selektin-Ligand (P-Lig) und E-Selektin-Ligand (E-Lig) wichtig (145-148). Da Th17-Zellen schlechter in entzündete Gewebe einwanderten als Th1-Zellen, wurde die Expression dieser vier Moleküle innerhalb beider Th-Subpopulationen untersucht.

Bei der durchflusszytometrischen Analyse zeigte sich, dass nahezu 100% der Th1- als auch der Th17-Zellen P-Selektin-Ligand exprimierten. Eine Expression von E-Selektin-Ligand konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (Abb.26A). Nur Th1-Zellen exprimierten CCR5 und CXCR3 auf ihrer Zelloberfläche. In Th17-Zellen war lediglich die mRNA für CCR5 nachzuweisen, aber nicht das CCR5 Protein (Abb.26A+B).

Die Expression bestimmter Chemokinrezeptoren ist aktivierungsabhängig. Um auszuschließen, dass Th17-Zellen in der *in vitro* Kultur schlechter aktiviert wurden als Th1-Zellen, wurde die Expression von CCR7, welcher ein Marker für naive T-Zellen und sogenannte *central memory T cells* ( $T_{cm}$ ) ist, bestimmt (144, 149, 150). Th17-Zellen exprimierten mehr mRNA für das Molekül CCR7, jedoch war die Oberflächenexpression des Proteins CCR7 auf Th1- und Th17-Zellen vergleichbar stark. Das deutet auf einen ähnlichen Aktivierungsstatus der Zellen hin (Abb.26A+B).



**Abb.26: Th17-Zellen exprimieren kein CXCR3 und CCR5 auf der Zelloberfläche.** OVA-spezifische Th1- und Th17-Zellen wurden an Tag 6 der *in vitro* Kultur sowohl auf die Expression des Proteins (**A**) als auch auf die relative Expression der mRNA (**B**) von verschiedenen für die Migration in entzündete Gewebe wichtige Rezeptoren untersucht. Die Histogramme in (**A**) zeigen alle CD4<sup>+</sup> Zellen. Die relative Expression der mRNA wurde mittels *Real-Time PCR* in Relation zum *UBC Housekeeping* Gen ermittelt, P-Lig= P-Selektin-Ligand, E-Lig= E-Selektin-Ligand, die Daten von einem repräsentativen Experiment von zwei bis drei Experimenten sind gezeigt.

Bei der Untersuchung des Einflusses von antigenspezifischen Th-Zellen auf eine Ovalbumin-induzierte Arthritis konnte in den bisherigen Experimenten gezeigt werden, dass OVA-spezifische *in vitro* generierte Th17-Zellen eine akute Entzündung, vermittelt durch granulozytäre Infiltrate, hervorrufen können. Jedoch wurde in diesen Experimenten durch Th17-Zellen keine chronische OIA etabliert, obwohl dieser Schritt zumindest teilweise durch IL-17 vermittelt wird. Außerdem konnten Th17-Zellen weder im OIA Modell noch im Entzündungsmodell der DTH in immunkompetenten Mäusen eine Schwellung der entzündeten Knie- oder Fußgelenke induzieren. Im Vergleich mit Th1-Zellen erwiesen sich Th17-Zellen sogar als weniger pro-inflammatorisch, da Th1-Zellen in jedem Fall eine Gelenkschwellung induzierten oder diese verstärkten. Die Induktion einer Gelenkschwellung ist vermutlich von der Anwesenheit vieler antigenspezifischer Th-Zellen in der Entzündungsstelle abhängig, da Th17-Zellen schlechter als Th1-Zellen in entzündetes Gewebe migrieren, wahrscheinlich aufgrund der fehlenden Expression von CXCR3 und CCR5. Interessanterweise konnte bei der Re-Analyse der transferierten antigenspezifischen Th17-Zellen gezeigt werden, dass viele der re-isolierten Th17-Zellen IFN- $\gamma$  exprimieren, wobei gleichzeitig weniger Zellen IL-17 produzieren.

Damit stellt sich die Frage, warum *in vitro* generierte antigenspezifische Th17-Zellen keine Gelenkschwellung und keine chronische OIA induzieren können und somit lediglich einen limitierten pro-inflammatorischen Charakter besitzen. Leider war im Verlauf der vorliegenden Arbeit noch kein direkter Vergleich zwischen *in vitro* und *in vivo* generierten Th17-Zellen möglich, da ein Sekretionsassay, mit dessen Hilfe sich Zellpopulationen, die ein spezifisches Zytokin produzieren, *ex vivo* isolieren lassen, nicht zur Verfügung stand. Aus diesem Grund wurden zwei andere Gesichtspunkte näher untersucht.

Einerseits könnte für die Etablierung einer chronischen OIA die Hilfe anderer Zellpopulationen nötig sein. Hierzu sollte die Frage beantwortet werden, ob und in welcher Form, der zweite Arm der adaptiven Immunantwort, die B-Zellen, bei der Etablierung einer chronischen OIA benötigt wird. Dies wird im folgenden Kapitel 4 „Die Rolle der B-Zellen bei der OIA“ näher untersucht.

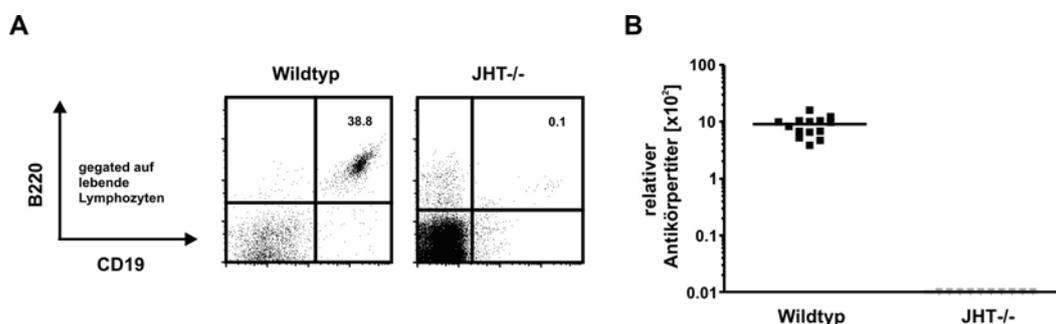
Andererseits könnte die Aktivität der Th-Zellen durch andere Zellen, wie den regulatorischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Treg), beeinflusst werden. Erste Ergebnisse zum Einfluss von Treg auf die Ausbildung einer OIA folgen im Kapitel 5 „Die Rolle von anti-inflammatorischen regulatorischen T-Zellen bei der OIA“.

#### 4. Die Rolle von B-Zellen bei der OIA

In den vorhergehenden Experimenten zur Rolle von pro-inflammatorischen Helfer-T-Zellen im Modell der Ovalbumin-induzierten Arthritis (OIA) zeigte sich, dass die Etablierung einer chronischen OIA durch IL-17 vermittelt wird. OVA-spezifische *in vitro* generierte Th17-Zellen konnten eine akute Entzündung, jedoch keine chronische OIA induzieren, obwohl die Zellen nachweislich den adoptiven Transfer überlebten und in der Lage waren, IL-17 zu produzieren. In diesem T-Zell-Transfermodell der OIA wurden die Th-Zellen in naive Mäuse transferiert, d.h. vor der Arthritisinduktion durch die i.a. Injektion von catOVA waren alle endogenen Immunzellen noch nicht mit dem Antigen Ovalbumin in Kontakt gekommen. Es gab zu diesem Zeitpunkt folglich noch keine reaktiven antigenspezifischen B-Zellen oder endogenen antigenspezifischen T-Zellen. Es stellte sich daher die Frage, ob für die Etablierung einer chronischen OIA die Hilfe anderer Zellen notwendig ist, insbesondere ob die Anwesenheit von aktivierten antigenspezifischen B-Zellen dafür essentiell ist.

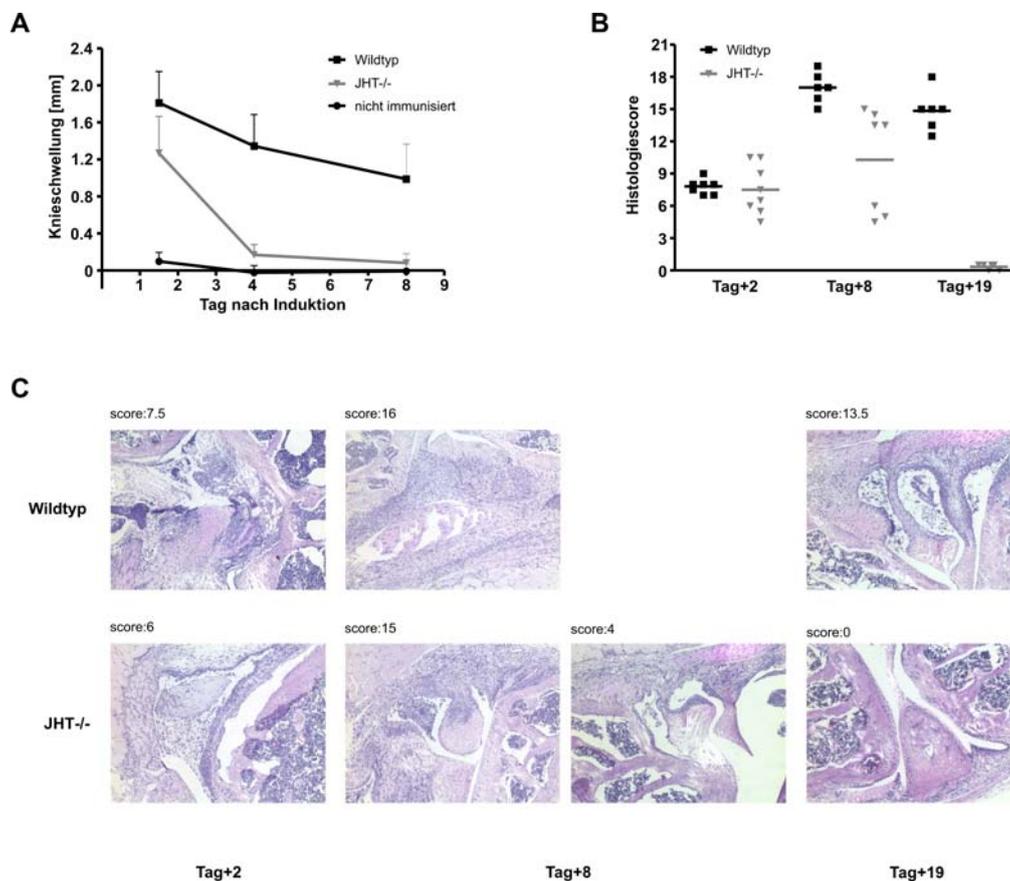
Im Folgenden wurde daher der Beitrag von B-Zellen bei der Etablierung einer OIA näher untersucht. Zunächst wurde analysiert, ob B-Zellen im Allgemeinen für den Verlauf einer OIA wichtig sind.

Hierfür wurde eine OIA in B-Zell-defizienten JHT<sup>-/-</sup> Mäusen ausgelöst. Durch eine Deletion des JH-Segmentes und des Intron-Enhancers im IgH-Lokus können diese Mäuse keine Rearrangierung des BCR vornehmen. Resultierend daraus, können sich keine funktionsfähigen B-Zellen ausbilden (122). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit dadurch bestätigt werden, als dass JHT<sup>-/-</sup> Mäuse nach einer erfolgten Immunisierung in der Milz keine CD19+B220+ Zellen und im Serum keine Antikörper ausbilden (Abb. 27).



**Abb.27: JHT<sup>-/-</sup> Mäuse entwickeln keine B-Zellen und keine Antikörper.** B-Zell-defiziente JHT<sup>-/-</sup> und C57Bl/6 Wildtypmäuse wurden an Tag-21 und Tag-14 s.c. immunisiert. An Tag-7 wurden **(A)** Milzzellen durchflusszytometrisch auf die Anwesenheit von CD19+B220+ B-Zellen untersucht bzw. **(B)** wurde den Mäusen Serum abgenommen und der generelle Antikörpertiter in Relation zu einem Referenzserum einer mit OVA immunisierten C57Bl/6 Maus bestimmt, n= 5-10.

JHT<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten im Vergleich zu Wildtyptieren am Tag+1 nach Arthritisinduktion eine geringere akute Knieschwellung. Drei Tage später war bei B-Zell-defizienten Mäusen keine Gelenkschwellung mehr sichtbar im Gegensatz zu der Kontrollgruppe der C57Bl/6 Wildtypiere, deren akute Schwellung langsam abnahm (Abb.28A). Trotz einer weniger stark ausgeprägten Schwellung besaßen die Kniegelenke der JHT<sup>-/-</sup> Mäuse und die Gelenke der Kontrollgruppe in der akuten Phase jeweils im Durchschnitt einen Histologiescore von 7.5. Das ergab die histologische Auswertung am Tag+2 nach Induktion (Abb.28B+C). Drei Wochen nach der erfolgten Arthritisinduktion waren allerdings bei JHT<sup>-/-</sup> Mäusen im Kniegelenk keine Arthritisymptome mehr sichtbar und die Tiere erschienen nahezu gesund. Im Gegensatz dazu zeigte die Kontrollgruppe von C57Bl/6 Tieren eine starke chronische Arthritis.



**Abb.28: B-Zell-defiziente JHT<sup>-/-</sup> Mäuse entwickeln keine chronische OIA.** B-Zell-defiziente JHT<sup>-/-</sup> oder C57Bl/6 Wildtypmäuse wurden zweimal immunisiert und eine OIA wurde durch i.a. Injektion von catOVA induziert. Die Kniegelenkschwellung wurde an den angegebenen Tagen gemessen (A). An den angegebenen Zeitpunkten wurden die Kniegelenke histologisch untersucht und die Schwere der Arthritis als Histologiescore angegeben (B). Repräsentative H/E-Färbungen von Kniegelenkschnitten an den angegebenen Tagen sind in (C) gezeigt. Die Bilder sind mit 25-facher Vergrößerung aufgenommen, n= 6-8, ein repräsentatives Experiment von zwei ist gezeigt.

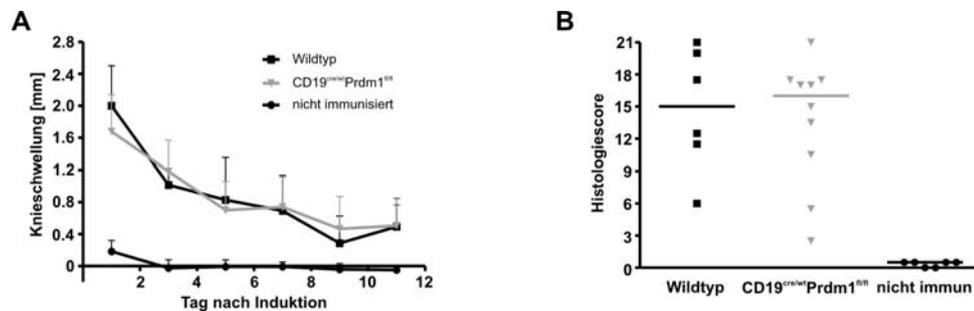
Um den Einfluss von B-Zellen auf die späte Phase der akuten Entzündung zu analysieren, wurde die Ausprägung von Arthritissymptomen am Tag+8 untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Tiere der Kontrollgruppe zu diesem Zeitpunkt schon stark ausgeprägte chronische Arthritissymptome ausgebildet hatten. Der durchschnittliche Histologiescore der Kontrollmäuse betrug 17.5 Punkte. Für die histologische Bewertung der Kniegelenke von JHT-/- Mäusen am Tag+8 ergab sich interessanterweise ein heterogenes Bild. Bei 4 von 7 Tieren konnten eindeutig chronische Krankheitssymptome, wie Hyperplasie der Synovialmembran und Aktivierung von Fibroblasten, nachgewiesen werden. Diese Mäuse besaßen einen Histologiescore von 14 bis 15.5 Punkten. Die anderen Tiere dieser Versuchsgruppe zeigten keine chronischen Arthritissymptome sondern lediglich granulozytäre Infiltrate, die in einem Histologiescore von 4 bis 6 Punkten resultierten (Abb.28B+C). Diesen Ergebnissen zufolge wurden in einigen B-Zell-defizienten Mäusen neben akuten Krankheitssymptomen auch chronische Arthritissymptome induziert, die sich dann aber wieder zurückbildeten. Es kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden, dass zunächst alle JHT-/- Mäuse klassische chronische Arthritissymptome entwickelten, sich diese allerdings bei einigen Tieren am analysierten Zeitpunkt (Tag+8) bereits wieder zurückgebildet hatten.

Da B-Zellen offensichtlich für die Aufrechterhaltung einer chronischer OIA benötigt werden, sollte nun untersucht werden, welche Funktion der B-Zellen hierfür essentiell ist. Einerseits ist es möglich, dass sekretierte Antikörper die Pathologie einer OIA verstärken. Durch die Bildung von Antigen-Antikörper-Komplement-Komplexen (Immunkomplexe) könnten Antikörper zu einer Aktivierung von Zellen und zur Rekrutierung von weiteren Immunzellen in die Entzündungsstelle beitragen. Antikörper, die an das native Antigen binden, können wiederum von Proteinen des Komplementsystems gebunden werden. Die gebildeten Immunkomplexe können dann von unterschiedlichen Immunzellen mithilfe von Komplementrezeptoren oder Antikörperrezeptoren (Fc-Rezeptoren) erkannt und internalisiert werden. Dies kann zu einer verstärkten Einwanderung dieser Zellen in das entzündete Gewebe sowie deren Aktivierung führen, wodurch es zu einer Verstärkung der Entzündungsreaktion kommen kann. Zellen, die Komplement- oder Fc-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche exprimieren sind z.B. Granulozyten, Makrophagen und B-Zellen (98, 151-156).

Andererseits könnten B-Zellen direkt T-Zellen aktivieren oder stimulieren. Durch die Expression von MHCII Molekülen können B-Zellen als APZ fungieren und beispielsweise über die Interaktion von CD40 mit CD40L Aktivierungs- oder Überlebenssignale in T-Zellen induzieren (64, 112, 157-159).

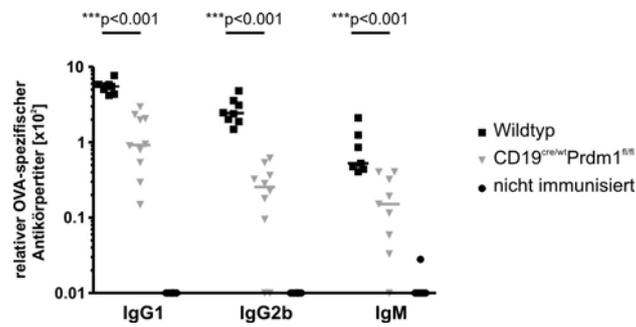
Zunächst sollte der Beitrag von Antikörpern zur Pathologie der OIA untersucht werden. Für die Antikörperproduktion von B-Zellen bzw. Plasmazellen ist das Protein *B lymphocyte induced maturation protein1* (Blimp1) essentiell. Mäuse, in denen das für Blimp1 kodierende Gen *Prdm1*, ausgeschaltet wurde, können keine Antikörper mehr sekretieren (121, 160). Mithilfe des cre-lox Systems sollte ein B-Zell-spezifischer knockout von Blimp1 erreicht werden. Dafür wurden  $CD19^{cre/wt}$  Mäuse mit  $Prdm1^{fl/fl}$  Mäusen verpaart. In den Mäusen der F1 Generation ( $CD19^{cre/wt}Prdm1^{fl/fl}$ ) wurde der Verlauf einer OIA untersucht.

Dabei zeigte sich, dass sowohl die akute Knieschwellung als auch die histologische Bewertung der chronischen OIA in Blimp1 defizienten Mäusen und Wildtypmäusen in etwa gleich stark ausgeprägt war (Abb.29A+B).



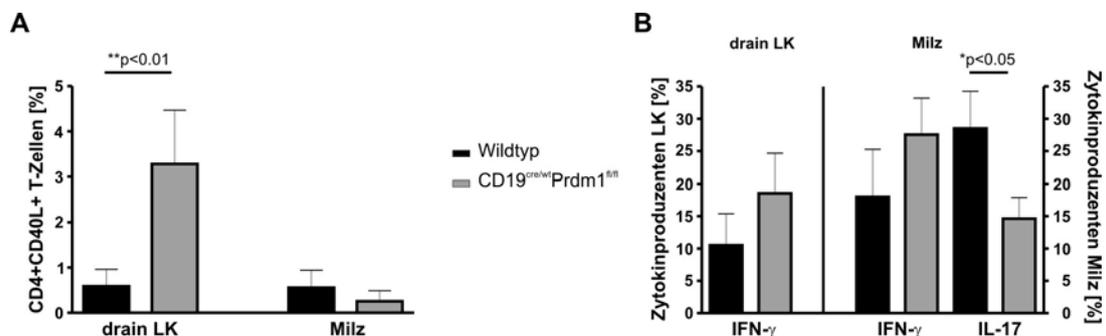
**Abb.29: Blimp1 defiziente  $CD19^{cre/wt}Prdm1^{fl/fl}$  Mäuse entwickeln eine normale OIA.** Blimp1 defiziente  $CD19^{cre/wt}Prdm1^{fl/fl}$  oder C57Bl/6 Wildtypmäuse wurden zweimal immunisiert und eine OIA wurde durch i.a. Injektion von catOVA induziert. Die Kniegelenkschwellung wurde an den angegebenen Tagen gemessen (A). Drei Wochen nach Arthritisinduktion wurden die Kniegelenke histologisch untersucht und die Schwere der Arthritis als Histologiescore angegeben (B), nicht immun= nicht immunisiert, n= 6-10.

Als Kontrolle für eine erfolgreiche Deletion des *Prdm1* Genes wurde der Antikörpertiter bestimmt.  $CD19^{cre/wt}Prdm1^{fl/fl}$  Mäuse besaßen im Vergleich zu Wildtyptieren einen 5-10-fach niedrigeren, aber deutlich detektierbaren OVA-spezifischen Antikörpertiter (Abb.30). Dies zeigte, dass die Deletion des Zielgenes nicht in allen Zellen gleichermaßen erfolgreich war. Da sowohl der Histologiescore der Arthritis als auch die Höhe des Antikörpertiters innerhalb der Versuchsgruppen stark variierten, sollte beide Punkte miteinander korreliert werden. Es konnte dabei jedoch in keiner Gruppe eine signifikante Korrelation zwischen der Höhe des Antikörpertiters und der Krankheitsstärke gefunden werden (Daten nicht gezeigt).



**Abb.30:** In immunisierten Blimp1 defizienten CD19<sup>cre/wt</sup>Prdm1<sup>fl/fl</sup> Mäusen lassen sich geringe antigenspezifische Antikörpertiter detektieren. C57Bl/6 Wildtypmäuse oder Blimp1-defiziente CD19<sup>cre/wt</sup>Prdm1<sup>fl/fl</sup> wurden an den Tagen -21 und -14 s.c. immunisiert. Am Tag-7 wurde den Mäusen Serum abgenommen und der OVA-spezifische Antikörpertiter in Relation zu einem Referenzserum einer mit OVA immunisierten C57Bl/6 Maus bestimmt, n= 6-10.

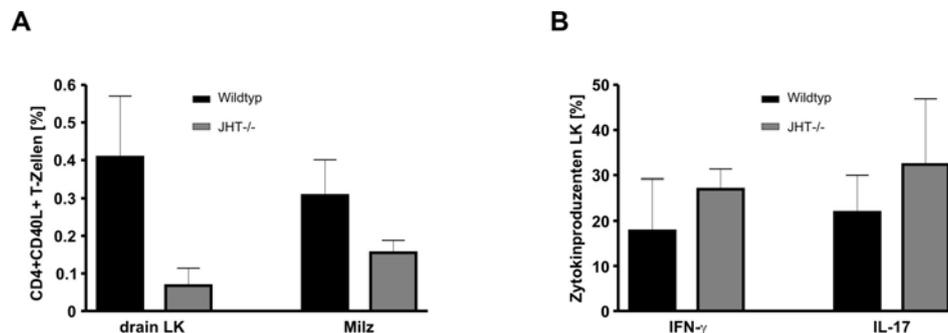
Weiterhin stellte sich heraus, dass die Deletion des *Prdm1* Genes in B-Zellen auch einen Einfluss auf die Ausbildung der antigenspezifischen T-Zellen hat. Während in den drainierenden Lymphknoten von Blimp1 defizienten CD19<sup>cre/wt</sup>Prdm1<sup>fl/fl</sup> Mäusen signifikant mehr antigenspezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen gefunden wurden, konnten in der Milz prozentual weniger T-Zellen als in Wildtypmäuern detektiert werden. Außerdem produzierten T-Zellen aus Blimp1 defizienten Mäusen tendenziell mehr IFN- $\gamma$ , aber signifikant weniger IL-17 als T-Zellen aus Wildtypmäuern (Abb.31).



**Abb.31:** In OIA-kranken Blimp1 defizienten CD19<sup>cre/wt</sup>Prdm1<sup>fl/fl</sup> Mäusen ist sowohl die Qualität als auch die Quantität der OVA-spezifischen Th-Zellen im Vergleich zu Wildtypmäusen verändert. In CD19<sup>cre/wt</sup>Prdm1<sup>fl/fl</sup> oder C57Bl/6 Wildtypmäusen wurde zunächst eine OIA ausgelöst. An Tag+21 nach Arthritisinduktion wurden Zellen aus der Milz und aus den drainierenden Lymphknoten *in vitro* mit catOVA restimuliert, die CD4+CD40L+ antigenspezifischen Helfer-T-Zellen angefärbt und ihre Zytokinexpression intrazellulär bestimmt. Die Graphik in (A) zeigt CD4+CD40L+ Zellen anteilig an allen CD4+ Zellen. Die Graphik in (B) gibt den prozentualen Anteil der Zytokinproduzenten an allen CD4+CD40L+ Zellen an, drain LK= drainierender Lymphknoten, n= 5.

Die fehlende positive Korrelation zwischen der Höhe des Antikörpertiters und dem Histologiescore sowie der Befund, dass trotz des drastisch erniedrigten OVA-spezifischen Antikörpertiters, Blimp1 defiziente Mäuse eine mit Wildtymäusen vergleichbar starke OIA entwickeln, legt den Schluss nahe, dass antigenspezifische Antikörper für die Etablierung einer OIA eher von geringerer Bedeutung sind. In einem weiteren Anschlussexperiment sollte nun untersucht werden, ob B-Zellen zur Generierung von antigenspezifischen T-Zellen beitragen.

Dafür wurden die antigenspezifischen T-Zellen in immunisierten B-Zell-defizienten JHT<sup>-/-</sup> Mäusen analysiert. Hier zeigte sich, dass JHT<sup>-/-</sup> Mäuse im Vergleich zu Wildtypmäußen weniger antigenspezifische CD4<sup>+</sup>CD40L<sup>+</sup> T-Zellen ausbilden (Abb.32A). Im drainierenden Lymphknoten war der Unterschied des prozentualen Anteils von CD4<sup>+</sup>CD40L<sup>+</sup> T-Zellen dabei mit 0.4% zu 0.07% größer als in der Milz (0.3% zu 0.17%). Allerdings exprimierten mit 28% bzw. 31% ein höherer Prozentsatz an T-Zellen aus B-Zell-defizienten JHT<sup>-/-</sup> Mäusen die Zytokine IFN- $\gamma$  bzw. IL-17. In Wildtypmäußen produzierten lediglich 18% der antigenspezifischen Th-Zellen IFN- $\gamma$  und nur 22% IL-17 (Abb.32B).



**Abb.32: Immunisierte B-Zell-defiziente JHT<sup>-/-</sup> Mäuse entwickeln weniger antigenspezifische Th-Zellen als Wildtypmäuse.**

In B-Zell-defizienten JHT<sup>-/-</sup> bzw. C57Bl/6 Wildtypmäusen wurde zunächst eine OIA ausgelöst. An Tag+21 nach Arthritisinduktion wurden Zellen aus der Milz und aus den drainierenden Lymphknoten *in vitro* mit catOVA restimuliert, die CD4<sup>+</sup>CD40L<sup>+</sup> antigenspezifischen Helfer-T-Zellen angefärbt und ihre Zytokinexpression durchflusszytometrisch bestimmt. Die Graphik in (A) zeigt CD4<sup>+</sup>CD40L<sup>+</sup> Zellen anteilig an allen CD4<sup>+</sup> Zellen. Die Graphik in (B) gibt den prozentualen Anteil der Zytokinproduzenten an allen CD4<sup>+</sup>CD40L<sup>+</sup> Zellen an, drain LK= drainierender Lymphknoten, n= 4, ein repräsentatives Experiment von zwei ist gezeigt

Die vorliegenden Experimente machen deutlich, dass B-Zellen für die Etablierung bzw. Aufrechterhaltung von chronischen Arthritisssymptomen, wie Hyperplasie der Synovialmembran oder Aktivierung von Fibroblasten, essentiell sind. Ob von B-Zellen bzw. Plasmazellen sekretierte Antikörper dafür von Bedeutung sind, konnte nicht restlos geklärt werden. Zumindest hat ein 10-fach verringerter OVA-spezifischer Antikörpertiter keinen

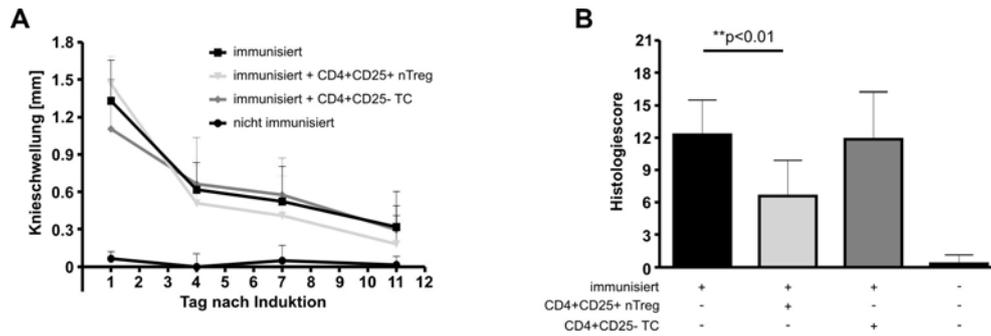
Einfluss auf den Verlauf einer OIA. Wahrscheinlicher ist, dass B-Zellen an der Aktivierung oder Stimulation von T-Zellen beteiligt sind. Dass Th17-Zellen im untersuchten Arthritismodell keine chronische OIA induzieren, ist demzufolge vermutlich auf das Fehlen von aktivierten antigenspezifischen B-Zellen zurückzuführen.

## 5. Die Rolle von anti-inflammatorischen Treg bei der OIA

Um eindringende Pathogene zu eliminieren, soll im Verlauf einer lokalen Entzündung nicht nur eine möglichst effektive Immunantwort erfolgen, es muss auch gleichzeitig sichergestellt werden, dass die lokale Entzündung nicht auf gesunde, benachbarte Gewebe übergreift oder sogar systemisch wirkt. Ebenso muss sichergestellt werden, dass es zu keiner gezielten, gegen körpereigene Gewebe gerichtete Immunreaktion durch die Wirkung von autoreaktiven T-Zellen oder B-Zellen kommt. Dies kann zur Entwicklung von Autoimmunerkrankungen führen. In beiden Fällen ist die Zerstörung von körpereigenem Gewebe die Folge. Um dies zu verhindern, hat das Immunsystem des Körpers eine Vielzahl von Regulationsmechanismen entwickelt. Einer dieser Mechanismen wird durch sogenannte regulatorische T-Zellen (Treg) vermittelt. Diese Zellen können andere T-Zellen in ihrer Immunantwort supprimieren und somit z.B. eine pro-inflammatorische Wirkung von Th17- oder Th1-Zellen neutralisieren (42, 43, 161-163). Treg können bereits als natürliche CD4+CD25+ Treg im Thymus entstehen (nTreg). Im Folgenden sollte untersucht werden, welchen Einfluss nTreg auf den Verlauf einer OIA haben.

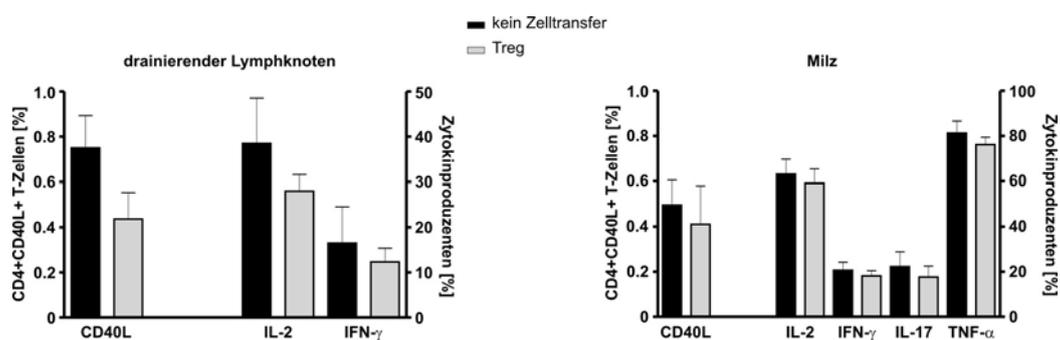
Es wurden für 24 h voraktivierte antigenspezifische CD4+CD25+ nTreg in immunisierte Mäuse transferiert und anschließend durch i.a. Injektion von catOVA eine OIA ausgelöst. In Kontrolltiere wurden voraktivierte antigenspezifische CD4+CD25- T-Zellen transferiert. Die transferierten T-Zellen wurden *in vitro* durch anti-CD3 Antikörper voraktiviert, da sich in vorherigen Experimenten in der Arbeitsgruppe gezeigt hatte, dass *ex vivo* isolierte nTreg lediglich eingeschränkte suppressorische Aktivität besitzen, diese jedoch durch eine vorangegangene *in vitro* Stimulation erhöht wird.

Der Transfer von nTreg führte jedoch zu keiner Veränderung des Verlaufes der akuten Knieschwellung (Abb.33A). Sowohl die Kontrolltiere, die CD4+CD25- T-Zellen erhalten hatten, als auch Tiere ohne Zelltransfer wiesen die gleiche akute Gelenkschwellung auf wie die Versuchsgruppe, die Treg erhalten hatte. Allerdings ergab die histologische Analyse der Kniegelenke dieser Gruppe in der chronischen Phase der OIA eine ca. 50%-ige Verbesserung der Ausprägung von Arthritissymptomen. Während Kontrolltiere und Tiere ohne Zelltransfer einen durchschnittlichen Histologiescore von 12 bzw. 11.5 Punkten zeigten, wurde für die Tiere der Gruppe, die Treg erhalten hatte, lediglich ein Score von 6 Punkten ermittelt (Abb.33B).



**Abb.33: OVA-spezifische CD4+CD25+ Treg können eine chronische OIA supprimieren.** Balb/c Mäuse wurden zweimal immunisiert und eine OIA wurde durch i.a. Injektion von catOVA induziert. Am Tag-1 vor Induktion wurden jeweils  $3 \times 10^5$  voraktivierte OVA-spezifische Treg oder CD4+CD25- Kontroll-T-Zellen in die Mäuse transferiert. Die Kniegelenkschwellung wurde an den angegebenen Tagen gemessen (A). Drei Wochen nach Arthritisinduktion wurden die Kniegelenke histologisch untersucht und die Schwere der Arthritis als Histologiescore angegeben (B), n= 7-9, ein repräsentatives Experiment von zwei ist gezeigt.

Um die Wirkungsweise der transferierten nTreg näher zu analysieren, wurden die endogenen antigenspezifischen T-Zellen in Mäusen, in die nTreg transferiert wurden, näher untersucht. Dabei ließ sich in den drainierenden Lymphknoten von Mäusen, die nTreg erhalten hatten, gegenüber der Kontrollversuchsgruppe ohne T-Zell-Transfer eine verringerte Anzahl von CD4+CD40L+ T-Zellen sowie auch eine tendenzielle Verringerung in der Expression von IL-2 und IFN- $\gamma$  nachweisen. Während in der Kontrollgruppe ca. 0.75% CD40L+ Th-Zellen, die zu 40% IL-2 und zu 17% IFN- $\gamma$  exprimierten, detektiert wurden, waren es in der Treg-Gruppe nur 0.4% CD40L+ Zellen. Davon produzierten ca. 28% IL-2 und 12% IFN- $\gamma$ . Bei der Analyse der Milzzellen zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen (Abb.34).

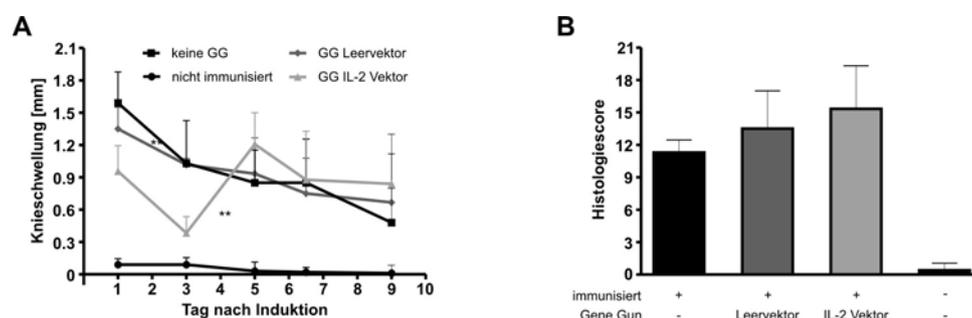


**Abb.34: CD4+CD25+ Treg haben nur einen geringen Einfluss auf die antigenspezifische Helfer-T-Zell-Antwort in OIA-kranken Mäusen.** In Balb/c Mäusen wurde zunächst eine OIA ausgelöst. Am Tag-1 vor Induktion wurden jeweils  $3 \times 10^5$  voraktivierte OVA-spezifische Treg oder CD4+CD25- Kontroll-T-Zellen in die Mäuse transferiert. Am Tag+21 nach Arthritisinduktion wurden Zellen aus der Milz und dem drainierenden Lymphknoten *in vitro* mit catOVA restimuliert, die CD4+CD40L+ antigenspezifischen Helfer-T-Zellen angefärbt und ihre Zytokinexpression durchflusszytometrisch bestimmt. Die Graphiken zeigen jeweils CD4+CD40L+ Zellen anteilig an allen CD4+ Zellen (linke Seite der Graphik) sowie den prozentualen Anteil der Zytokinproduzenten an allen CD4+CD40L+ Zellen (rechte Seite der Graphik) im drainierenden Lymphknoten (linke Graphik) und in der Milz (rechte Graphik), n= 4.

Das durchgeführte Experiment hat gezeigt, dass antigenspezifische nTreg eine chronische OIA supprimieren können. In vorangegangenen Pilotexperimenten wurde bereits festgestellt, dass nTreg *in vitro* voraktiviert werden müssen, um suppressiv wirken zu können. Für eine therapeutische Anwendung wäre es allerdings von Vorteil, diesen Schritt der *in vitro* Voraktivierung zu umgehen. Dazu wurde in einem anderen Projekt der Arbeitsgruppe ein Protokoll entwickelt, um endogene Treg *in vivo* zu aktivieren. Im Rahmen dieses Projektes konnte bereits gezeigt werden, dass eine Immunisierung von Balb/c Mäusen mit einem IL-2-Expressionsplasmid mittels einer GeneGun zu einer erhöhten Anzahl von endogenen Treg führt. Dabei wurden die regulatorischen T-Zellen antigenunspezifisch aktiviert und konnten daraufhin andere T-Zellen supprimieren (164). Bei einer GeneGun Immunisierung wird ein DNA-Expressionsplasmid zunächst auf Goldpartikel aufgetragen. Diese werden dann unter Druck in den Unterbauch von Versuchstieren „geschossen“. Das Expressionsplasmid wird dann von Zellen, die sich in der Haut befinden, aufgenommen und schließlich in der Zelle transkribiert. Im vorliegenden Fall wird dann das Zytokin IL-2 von dieser Zelle sekretiert. Der genaue Mechanismus dieser Immunisierungsmethode mittels GeneGun ist allerdings noch ungeklärt (165).

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob eine GeneGun Behandlung bei einer OIA zu einer Linderung von Krankheitssymptomen durch die Aktivierung endogener antigenunspezifischer Treg führen kann.

Dazu wurden Mäuse während einer induzierten OIA mit einem IL-2-Expressionsvektor immunisiert. Dieses Experiment wurde in Kooperation mit Dipl. Biol. Susan Brandenburg durchgeführt.



**Abb.35: Eine IL-2 Immunisierung mittels GeneGun verringert die akuten aber verstärkt die chronischen Arthritissymptome einer OIA.** Balb/c Mäuse wurden zweimal immunisiert und eine OIA wurde durch i.a. Injektion von catOVA induziert. An Tag-3, Tag-2, Tag+2 und Tag+6 erhielten einzelne Gruppen eine Immunisierung mit jeweils 6 µg OVA-Expressionsvektor oder Leervektor mittels GeneGun. Die Kniegelenkschwellung wurde an den angegebenen Tagen gemessen (A). Drei Wochen nach Arthritisinduktion wurden die Kniegelenke histologisch untersucht und die Schwere der Arthritis als Histologiescore angegeben (B). GG= GeneGun, n= 5-9.

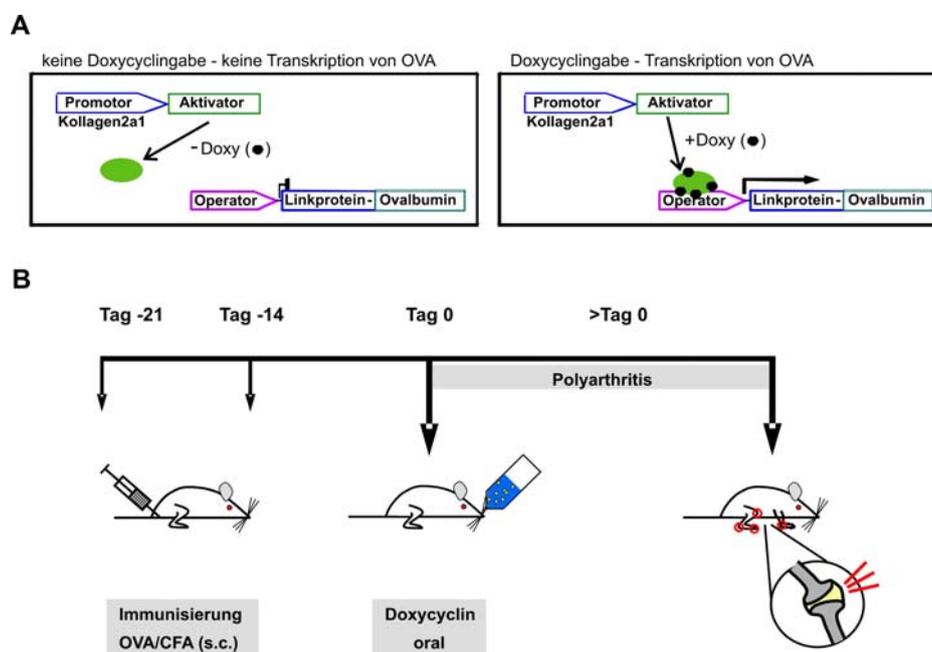
Tiere, die eine Immunisierung mit dem IL-2-Vektor erhalten hatten, zeigten dabei am Tag+1 und am Tag+3 nach Arthritisinduktion eine signifikant verringerte Knieschwellung im Vergleich zu Kontrolltieren, die lediglich den Leervektor erhalten hatten (Abb.35A). Jedoch nahm die Schwellung bei den mit IL-2 behandelten Mäusen ab Tag+5 wieder zu, so dass alle immunisierten Tiere ab diesem Zeitpunkt vergleichbare Gelenkschwellungen aufwiesen. Bei der histologischen Auswertung an Tag+21 nach Induktion konnte festgestellt werden, dass die Tiere, die mit dem IL-2-Vektor immunisiert wurden, mit durchschnittlich 15 Punkten eine tendenziell stärkere Arthritis zeigten als Tiere ohne GeneGun Immunisierung, die einen durchschnittlichen Histologiescore von 11.5 Punkten besaßen. Allerdings führte auch die GeneGun Immunisierung mit dem Leervektor verglichen mit der unbehandelten Gruppe zu einer leicht stärker ausgeprägten Arthritis mit einem Histologiescore von 13.5 Punkten (Abb.35B).

In den vorliegenden Experimenten konnte gezeigt werden, dass antigenspezifische regulatorische T-Zellen prinzipiell die chronische Phase einer Ovalbumin-induzierten Arthritis supprimieren können. Dagegen können antigenunspezifische endogene Treg nach erfolgter Aktivierung durch ein IL-2-Expressionsplasmid den Verlauf einer chronischen OIA nicht beeinflussen. Dass Th17-Zellen im untersuchten Arthritismodell keine chronische OIA induzieren können, ist demnach nicht die Folge einer Suppression der Th17-Zellen durch endogene Treg, da aufgrund einer fehlenden Immunisierung mit OVA keine antigenspezifischen Treg aktiviert werden.

## 6. Die induzierbare gelenkspezifische OVA-Expression in tet-LPOVA Mäusen

### 6.1 OIA in tet-LPOVA Mäusen

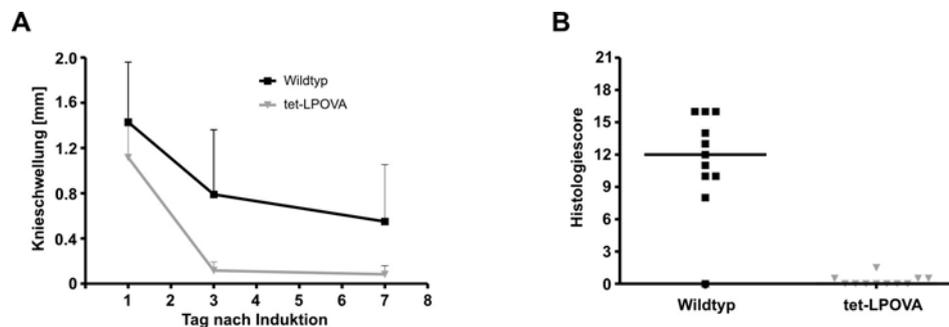
Das Protokoll der untersuchten Ovalbumin-induzierten Arthritis (OIA) basiert auf einer Induktion der Krankheit mit catOVA, welches in das Kniegelenk injiziert werden muss. Diese intra-artikuläre Injektion stellt insofern einen kritischen Punkt dar, als dass es bei der Injektion zu Verletzungen des Kniegelenkes kommen kann. Außerdem ist die Gelenkspalte, in die das Antigen injiziert wird, sehr klein und demzufolge muss sehr genau darauf geachtet werden, dass das Antigen nicht in andere peri-artikuläre Gewebe injiziert wird und somit eine Entzündung der Muskelbereiche und nicht des Gelenkes induziert wird. Um diesen Schritt der intra-artikulären Injektion zu umgehen, aber trotzdem mit antigenspezifischen T-Zellen arbeiten zu können, wurde von Katherina Hein und Sven Kracker am Deutschen Rheumaforschungszentrum eine OVA-transgene Maus generiert (tet-LPOVA) (123). Diese Maus trägt ein OVA-Expressionskonstrukt unter der Kontrolle des Kollagen2 Promotors (Abb. 36A). Die OVA Expression wird dabei durch die Einführung eines Tetracyclin-abhängigen Aktivators in das Expressionskonstrukt induzierbar gestaltet. In Abwesenheit des Antibiotikums Doxycyclin findet keine Transkription von OVA statt. Wird die Maus allerdings mit Doxycyclin gefüttert, wird OVA Protein in Chondrozyten, die Kollagen2 exprimieren, synthetisiert (Abb.36A).



**Abb.36: Das Modell der Doxycyclin-induzierten, gelenkspezifischen Ovalbuminexpression in tet-LPOVA Mäusen.** Eine schematische Darstellung des transgenen Konstrukts für eine Doxycyclin-abhängige Expression des Link-Protein-Ovalbumin-Fusionsproteins unter dem Kollagen2 Promotor ist in (A) gezeigt. Das Protokoll für eine Doxycyclin-induzierte OIA in tet-LPOVA Mäusen ist in (B) dargestellt.

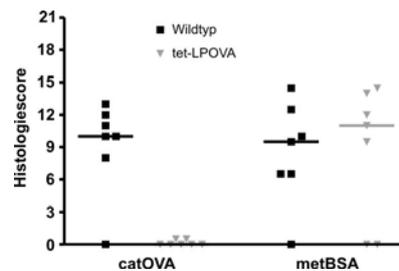
Um sicherzustellen, dass das synthetisierte OVA Protein auch in der extrazellulären Matrix der Gelenke verbleibt, ist es an das Link-Protein fusioniert, welches an extrazelluläre Matrixproteine bindet. Immunisierte Mäuse können nun anstelle der i.a. Injektion von catOVA mit Doxycyclin gefüttert werden, woraufhin OVA Protein in der Gelenkmatrix exprimiert wird. Dies sollte theoretisch zu einer Polyarthritits führen (Abb.36B).

In früheren Arbeiten in unserer Arbeitsgruppe konnte jedoch gezeigt werden, dass immunisierte tet-LPOVA Mäuse nach Doxycyclin Fütterung keine Polyarthritits entwickeln. Selbst wenn das induzierende Antigen catOVA durch eine i.a. Injektion direkt in das Knie injiziert wird, entwickeln die transgenen Mäuse keine Ovalbumin-induzierte Arthritis (166) und Abb.37B. Die transgenen Mäuse sind demnach resistent gegen die Entwicklung einer OIA.



**Abb.37: Tet-LPOVA-Mäuse sind tolerant gegen eine OIA.** C57Bl/6 Wildtypmäuse und tet-LPOVA-Mäuse wurden zweimal immunisiert und eine OIA wurde durch i.a. Injektion von catOVA induziert. Die Kniegelenkschwellung wurde an den angegebenen Tagen gemessen (A). Drei Wochen nach Arthritisinduktion wurden die Kniegelenke histologisch untersucht und die Schwere der Arthritis als Histologiescore angegeben (B), n= 10-11, dabei wurden die Ergebnisse von zwei gleichverlaufenden Experimenten in einer Graphik zusammengefasst.

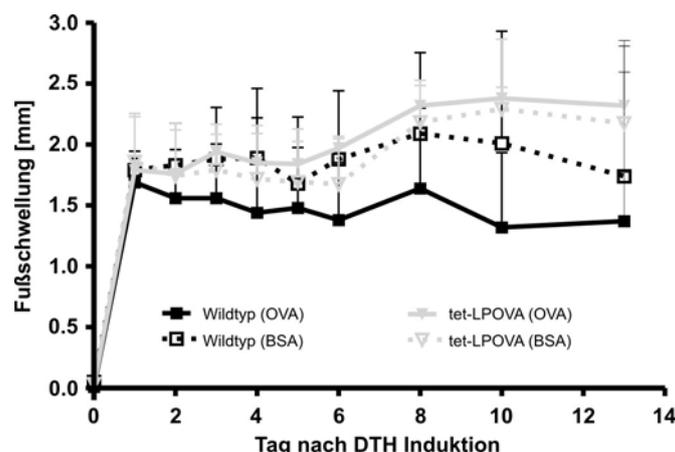
Des Weiteren konnte in früheren Arbeiten gezeigt werden, dass es sich dabei um eine antigenspezifische Toleranz gegen Ovalbumin handelt, da tet-LPOVA Mäuse eine chronische AIA gegen metBSA entwickeln (166) und Abb.38. Bei der weiteren Analyse der akuten Krankheitsphase einer OIA zeigte sich, dass tet-LPOVA Mäuse ebenfalls eine stark verringerte akute Kniegeschwellung ausbilden (Abb. 37A).



**Abb.38: Die Toleranz gegen eine gelenkspezifische Arthritis in tet-LPOVA-Mäusen ist antigenspezifisch.** C57Bl/6 Wildtypmäuse und OVA-transgene tet-LPOVA-Mäuse wurden zweimal mit catOVA oder metBSA immunisiert und eine AIA wurde durch i.a. Injektion von catOVA oder metBSA induziert. Drei Wochen nach Arthritisinduktion wurden die Kniegelenke histologisch untersucht und die Schwere der Arthritis als Histologiescore angegeben n= 7.

## 6.2 OIA-spezifische Toleranz in tet-LPOVA Mäusen

Da tet-LPOVA Mäuse eine OVA-spezifische Toleranz im OIA Modell entwickeln, sollte geklärt werden, ob diese Toleranz für das Arthritis Modell spezifisch ist. Aus diesem Grund wurden die transgenen Mäuse in einem weiteren Entzündungsmodell, dem Modell der DTH, getestet. In diesem Modell wird nach einer s.c. Immunisierung mit dem induzierenden Antigen durch eine erneute s.c. Immunisierung mit dem Antigen in den Fußballen eine Entzündung im Fuß des Tieres induziert, die durch Messung der Fußschwellung verfolgt werden kann. Abb.39 zeigt deutlich, dass tet-LPOVA Mäuse nicht nur eine DTH Reaktion gegen BSA, sondern auch gegen Ovalbumin entwickelten. Die OVA-induzierte DTH Reaktion in den OVA-transgenen Mäusen war sogar leicht höher als die entsprechende Reaktion in Wildtypmäusen.



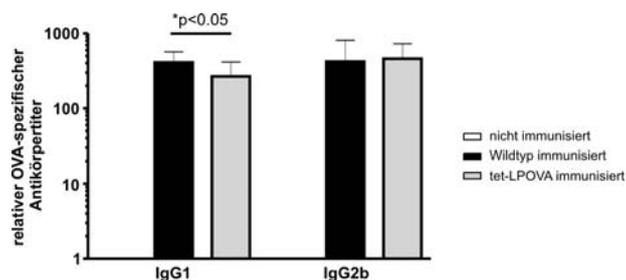
**Abb.39: Tet-LPOVA-Mäuse entwickeln eine normale Ovalbumin-induzierte DTH Reaktion.** C57Bl/6 Wildtypmäuse und OVA-transgene tet-LPOVA Mäuse wurden zweimal mit OVA oder BSA immunisiert und eine DTH Reaktion wurde durch s.c. Injektion von OVA bzw. BSA in der Fußsohle induziert. Aufgetragen ist die Differenz zwischen ipsilateralem OVA/BSA-induziertem Fuß und kontralateralem PBS-behandeltem Fuß, n= 7.

Damit tritt die Toleranz gegen OVA spezifisch bei einer Entzündung im Kniegelenk auf.

### 6.3 Mögliche Toleranzmechanismen in tet-LPOVA Mäusen

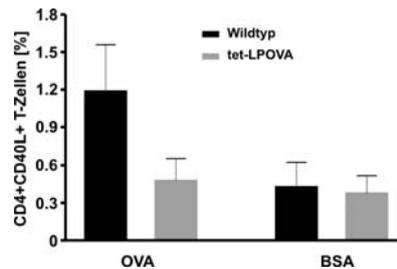
Im Folgenden sollte der Mechanismus, welcher der Toleranz gegen eine OIA in tet-LPOVA Mäusen zugrunde liegt, näher untersucht werden. Da für die Etablierung einer chronischen OIA neben antigenspezifischen T-Zellen auch B-Zellen benötigt werden (siehe Abschnitt III 4) wurde zunächst analysiert, ob antigenspezifische Helfer-T-Zellen und B-Zellen in den transgenen Mäusen nach einer Immunisierung ausreichend aktiviert werden, um eine Erkrankung vermitteln zu können.

Um zu zeigen, dass eine Aktivierung von B-Zellen stattfindet, wurde der OVA-spezifische Antikörpertiter in den transgenen Mäusen bestimmt. Dabei konnte in immunisierten tet-LPOVA Mäusen ein gleich hoher OVA-spezifischer IgG2b Antikörpertiter wie in Wildtypmäusen detektiert werden (Abb.40). Der OVA-spezifische IgG1 Titer war in transgenen Mäusen allerdings um die Hälfte niedriger als in Wildtypmäusen.



**Abb.40:** Der OVA-spezifische Antikörpertiter ist in tet-LPOVA Mäusen nur leicht niedriger als in Wildtypmäusen. OVA-transgene tet-LPOVA Mäuse und C57Bl/6 Wildtypmäuse wurden am Tag-21 und am Tag-14 s.c. immunisiert. Am Tag-7 vor der Arthritisinduktion wurde den Mäusen Serum abgenommen und der OVA-spezifische Antikörpertiter in Relation zu einem Referenzserum einer mit OVA immunisierten C57Bl/6 Maus bestimmt, n= 6.

Bei der Analyse der antigenspezifischen Helfer-T-Zellen in tet-LPOVA Mäusen zeigte sich, dass transgene Mäuse zwar OVA-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen ausbilden, jedoch war der prozentuale Anteil von CD4<sup>+</sup>CD40L<sup>+</sup> T-Zellen nur halb so hoch wie in Wildtypmäusen (Abb.41). Dies scheint kein genereller Defekt bei der Generierung von aktivierten Th-Zellen zu sein, da beide Mausstämme vergleichbare Anteile an BSA-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen ausbildeten.



**Abb.41: In tet-LPOVA Mäusen entstehen nur halb soviel OVA-spezifische Th-Zellen wie in Wildtypmäusen.** Am Tag+15 nach DHT Induktion mit OVA oder BSA wurden Zellen aus den drainierenden Lymphknoten von OVA-transgenen tet-LPOVA Mäusen oder C57Bl/6 Wildtypmäusen *in vitro* mit OVA bzw. BSA restimuliert und die CD4+CD40L+ antigenspezifischen Th-Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Die Graphik zeigt CD4+CD40L+ Zellen anteilig an allen CD4+ Zellen, n= 3.

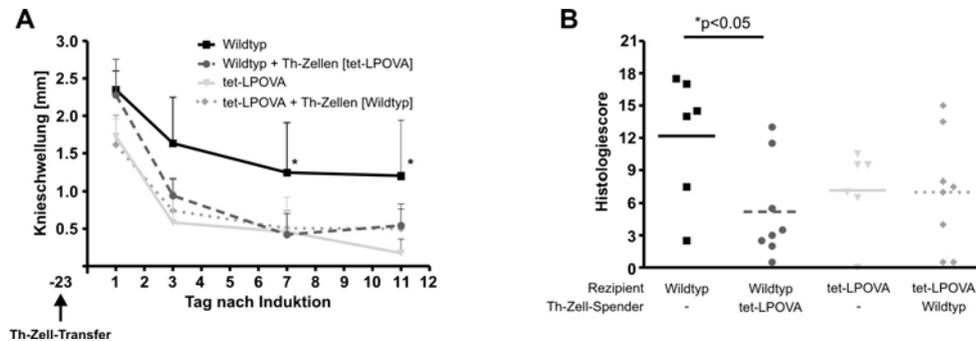
Die bisher erzielten Ergebnisse zeigen deutlich, dass in tet-LPOVA Mäusen zwar eine Immunreaktion gegen Ovalbumin erfolgt, diese allerdings leicht schwächer ausgeprägt ist als die Reaktion in Wildtyptieren. Trotz einer nachgewiesenen T- und B-Zell-Reaktion bilden tet-LPOVA Mäuse jedoch keine Anzeichen einer chronischen Arthritis sondern eine Toleranz gegen eine OIA aus. Dieses Phänomen sollte im Weiteren eingehender untersucht werden.

Da die Toleranz gegen eine OIA in tet-LPOVA Mäusen nicht auf eine limitierte Aktivierung der Lymphozyten zurückzuführen ist, wurde im Folgenden untersucht, durch welche Zellen die Toleranz eventuell aktiv vermittelt wird.

Sollte die Expression des Ovalbumin-Link-Protein-Konstruktes in Chondrozyten in geringer Menge bereits ohne die Gabe des induzierenden Antibiotikums erfolgen, wäre es möglich, dass dadurch ovalbuminspezifische regulatorische T-Zellen generiert werden. Aus diesem Grund wurde zunächst analysiert, ob mögliche regulatorische T-Zellen innerhalb der Helfer-T-Zell-Population aus tet-LPOVA Mäusen eine Toleranz auf Wildtyptiere übertragen können.

Dazu wurden  $6 \times 10^6$  aus tet-LPOVA Mäusen mithilfe der magnetischen Zellsortierung isolierte Th-Zellen in unbehandelte C57Bl/6 Mäuse i.v. transferiert. Die transferierten Mäuse wurden darauf zweimal immunisiert und drei Wochen später eine OIA durch i.a. Injektion von catOVA induziert. Der Transfer von CD4+ T-Zellen aus tet-LPOVA Mäusen in C57Bl/6 Wildtypiere am Tag-23 vor der Induktion einer OIA führte zu einer weniger stark ausgeprägten akuten Knieschwellung bei den transferierten Wildtypmäusen (Abb.42A). Ab Tag+7 nach Arthritisinduktion war dieser Unterschied zwischen den Gruppen von Wildtyptieren und transferierten Wildtyptieren signifikant. Der Transfer von Helfer-T-Zellen aus tet-LPOVA Mäusen in Wildtypmäuse führte ebenfalls zu einer signifikant verringerten Ausprägung der chronischen OIA, wenngleich die Streuung innerhalb der Gruppen bei diesem Experiment relativ groß war (Abb.42B). Der Histologiescore nahm dabei von durchschnittlich 12 auf 6

Punkte ab. Dahingegen hatte der Transfer von Helfer-T-Zellen aus C57Bl/6 Wildtypmäusen in tet-LPOVA Mäuse weder Einfluss auf die akute Knieschwellung noch auf die Etablierung einer chronischen Arthritis (Abb.42A+B).



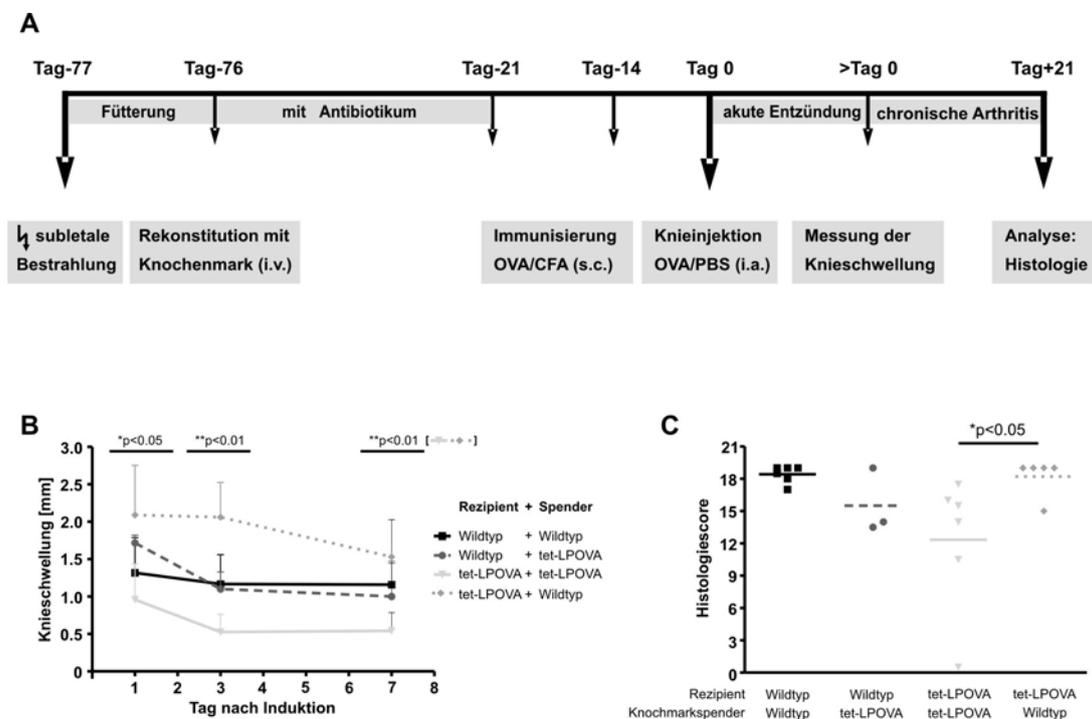
**Abb.42: Die OIA-spezifische Suppression in tet-LPOVA Mäusen wird durch Th-Zellen vermittelt.** C57Bl/6 Wildtypmäuse und tet-LPOVA-Mäuse wurden zweimal immunisiert und eine OIA wurde durch i.a. Injektion von catOVA induziert. Zwei Tage vor der ersten s.c. Immunisierung wurden  $6 \times 10^6$  CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus tet-LPOVA Spendertieren in C57Bl/6 Rezipiententiere bzw.  $6 \times 10^6$  CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus C57Bl/6 Wildtypmäusen in tet-LPOVA Mäuse i.v. transferiert. Die Kniegelenkschwellung wurde an den angegebenen Tagen gemessen (A). Drei Wochen nach Arthritisinduktion wurden die Kniegelenke histologisch untersucht und die Schwere der Arthritis als Histologiescore angegeben (B), n= 6-8.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass zumindest ein großer Teil der Toleranz gegen eine OIA in tet-LPOVA Mäusen durch Helfer-T-Zellen vermittelt wird.

In einem weiteren Experiment sollte geklärt werden, ob das nicht-hämatopoetische Zellkompartiment, welches u.a. aus Fibroblastenzellen und mesenchymalen Zellen besteht, ebenfalls an der Toleranzentwicklung beteiligt ist. Sollte die Promotorregion des tet-LPOVA Konstruktes auch in Abwesenheit des Antibiotikums eine geringe Expression von Ovalbumin in Chondrozyten zulassen, könnte dieses von nicht-professionellen APZ, wie Endothelzellen des Gelenkes, über MHCII Moleküle T-Zellen präsentiert werden und in diesen durch eine unvollständige Stimulation, z.B. durch fehlende Ko-Stimulationssignale, Apoptose oder Anergie induziert werden. Dies könnte zu einer verminderten T-Zell-Reaktion beitragen.

Um dies zu analysieren, wurden zunächst Rezipientenmäuse subletal radioaktiv bestrahlt, um alle hämatopoetischen Zellen zu eliminieren. Anschließend wurde das Immunsystem der bestrahlten Mäuse durch den Transfer von Knochenmarkszellen aus Spendertieren rekonstituiert. In den chimären Mäusen wurde darauffolgend eine OIA induziert und der Verlauf der Erkrankung analysiert (Abb.43A).

Wurde das Immunsystem von C57Bl/6 Wildtypmäusen mit dem Knochenmark aus tet-LPOVA Mäusen rekonstituiert, zeigte dies keinen Einfluss auf die akute Knieschwellung im Vergleich zur Kontrollgruppe, bei der das Immunsystem von C57Bl/6 Wildtypmäusen mit dem Knochenmark aus C57Bl/6 Wildtypmäusen wieder rekonstituiert wurde (Abb.43B). Jedoch waren in der zuerst erwähnten Gruppe verglichen mit der Kontrollgruppe die chronischen Arthritissymptome tendenziell etwas schwächer ausgeprägt, jedoch blieb der Histologiescore mit durchschnittlichen 15.5 Punkten höher als der Histologiescore von mit transgenem Knochenmark rekonstituierten OVA-transgenen tet-LPOVA Mäusen (12 Punkte, Abb.43C). Da jedoch in einer Versuchstiergruppe einige Tiere während des Experimentes starben, konnte darüber keine statistische Aussage getroffen werden.



**Abb.43: Die OIA-spezifische Suppression in tet-LPOVA Mäusen wird teilweise durch nicht-hämatopoetische Zellen vermittelt.** C57Bl/6 Wildtyp- und OVA-transgene tet-LPOVA Rezipientenmäuse wurden subletal bestrahlt und mit Knochenmarkszellen aus Spendertieren rekonstituiert. 8 Wochen nach der Bestrahlung wurden die rekonstituierten Mäuse zweimal immunisiert und eine OIA wurde durch i.a. Injektion von catOVA induziert (A). Die Kniegelenkschwellung wurde an den angegebenen Tagen gemessen (B). Drei Wochen nach Arthritisinduktion wurden die Kniegelenke histologisch untersucht und die Schwere der Arthritis als Histologiescore angegeben (C), n= 3-6.

Anders verhielt es sich in den Versuchsgruppen, in denen tet-LPOVA Mäuse als Rezipiententiere verwendet wurden. Im Vergleich zur Kontrollgruppe (Rekonstitution mit tet-LPOVA Knochenmark) wies die mit Wildtypknochenmark rekonstituierte Versuchsgruppe

sowohl eine signifikant höhere Gelenkschwellung als auch einen erhöhten Histologiescore einer chronischen OIA auf (Abb.43B+C). Die akute Knieschwellung war dabei zwei-bis dreimal so hoch wie in der Kontrollgruppe. So betrug die Gelenkschwellung am Tag+3 nach Arthritisinduktion in der mit tet-LPOVA Knochenmark rekonstituierten Kontrollgruppe lediglich 0.52 mm jedoch in der mit Wildtypknochenmark rekonstituierten Versuchsgruppe 2.06 mm. Der Histologiescore war mit durchschnittlich 12 Punkten in der Kontrollgruppe gegenüber 18 Punkten in der mit Wildtypknochenmark rekonstituierten Gruppe ebenfalls signifikant erhöht.

Die Ergebnisse dieser Experimente verdeutlichen, dass die OIA-spezifische Toleranz in tet-LPOVA Mäusen vermutlich hauptsächlich durch das hämatopoetische System vermittelt wird, wobei eine Beteiligung von nicht-hämatopoetischen Zellen an der Toleranzentwicklung nicht ausgeschlossen werden kann.

Mit der Generierung von tet-LPOVA Mäusen, in denen eine Ovalbuminexpression in Chondrozyten durch ein Antibiotikum induziert werden kann, sollte die innerhalb des OIA Protokolls schwierige Knieinjektion vermieden werden (Abb.3, Abb.36B). OVA-transgene Mäuse erwiesen sich jedoch als tolerant gegenüber der Induktion einer OIA, selbst wenn OVA in das Kniegelenk appliziert wurde. Diese Toleranz ist sowohl antigenspezifisch als auch gelenkspezifisch für eine Entzündung im Kniegelenk. Dabei wird die Toleranz mehrheitlich durch das hämatopoetische Zellkompartiment vermittelt. Allerdings ist die ovalbuminspezifische Aktivierung von T- und B-Zellen in tet-LPOVA Mäusen bezüglich der Anzahl antigenspezifischer T-Zellen bzw. der Höhe des Antikörpertiters nur minimal verändert. In weiterführenden Experimenten soll geklärt werden, ob bisher nicht untersuchte Effektorfunktionen von Lymphozyten beeinträchtigt sind. Dazu soll der Aktivierungsstatus der Zellen in Form der Oberflächenexpression von Aktivierungsmarkern, wie CD25 oder CD69, der intrazellulären Expression von Differenzierungsmarkern, wie den Transkriptionsfaktoren T-bet, GATA-3 bzw. ROR $\gamma$ T, sowie die Produktion von Effektorzytokinen, wie IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-10 oder IL-4, analysiert werden. Außerdem sollen weitere Experimente mit Knochenmarkchimären die genaue Beteiligung einzelner Zellpopulationen an der Toleranzvermittlung klären.

## IV Diskussion

### 1. Die Ovalbumin-induzierte Arthritis

Um Ursachen und Verlauf der Rheumatoiden Arthritis (RA) sowie potentielle Medikamente *in vivo* zu untersuchen, wurden im Laufe der letzten 40 Jahre verschiedene Tiermodelle etabliert. Die Antigen-induzierte Arthritis (AIA) wurde zuerst 1977 im Tiermodell der Maus beschrieben (74-76). In diesem Modell werden die Tiere zunächst zweimal mit einer Emulsion aus methyliertem bovines Serumalbumin (metBSA) und *Complete Freund's Adjuvants* (CFA) immunisiert. Die Krankheit wird anschließend durch eine intra-artikuläre (i.a.) Injektion von metBSA in ein Kniegelenk induziert. Im induzierten Gelenk bildet sich daraufhin eine Entzündung, die sich zu einer chronischen Arthritis entwickelt. Da in diesem Modell, im Unterschied zu den Tiermodellen der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA) oder der Proteoglykan-induzierten Arthritis (PGIA), die Krankheit mit einem gelenkfremden Protein ausgelöst wird, etabliert sich keine Polyarthritis, sondern eine lokale, auf das induzierte Kniegelenk beschränkte Arthritis (71-73). Das pathologische Bild einer AIA ähnelt dem Bild der humanen RA in vielen Gesichtspunkten. Die Aktivierung der Synovialmembran, die zur Hyperplasie führt, die Aktivierung von Fibroblastenzellen sowie die letztendliche Zerstörung von Knorpel- und Knochenschichten sind Krankheitssymptome, die sowohl beim Menschen als auch im Tiermodell beobachtet werden (30, 57, 58, 73, 167). Da sowohl Infiltrate von neutrophilen Granulozyten als auch von mononuklearen Zellen im entzündeten Gewebe sichtbar sind, liegt die Vermutung nahe, dass viele Zelltypen zur Pathogenese der Arthritis beitragen. In der Tat konnte schon gezeigt werden, dass Neutrophile, Makrophagen aber auch B-Zellen wahrscheinlich an der Krankheitsetablierung der RA beteiligt sind (100, 101, 168-171). Jedoch ist der genaue Beitrag, den diese Zellen an der Krankheitsentwicklung haben, noch größtenteils unklar.

Bisherige Therapien zur Behandlung einer RA konzentrieren sich im Wesentlichen auf eine allgemeine Suppression des Immunsystems oder auf die Depletion von relevanten Zytokinen bzw. ganzen Zellpopulationen, was häufig mit erheblichen Nebenwirkungen verbunden ist (92, 98, 107, 109, 111, 112, 172). Die Entwicklung von neuen Therapieformen, z.B. einer zellulären Therapie, könnte spezifischer und damit nebenwirkungsärmer auf die Krankheit einwirken. Eine zelluläre Therapie könnte aus den drei Schritten 1.) Isolation von relevanten Zellen aus dem Patienten, 2.) *in vitro* Modulation dieser Zellen, 3.) Re-Transfer der modulierten Zellen in den Patienten, bestehen. Dass prinzipiell eine zelluläre Therapie durch Isolation und Re-Transfer von körpereigenen Zellen möglich ist, wurde schon beschrieben (173, 174). In unserem Labor konnte zudem gezeigt werden, dass pathogene Th1-Zellen

durch Modulation *in vitro* in protektive Th-Zellen konvertiert werden können (46). Daher bleibt die Schlüsselfrage in diesem Konzept, welche Zellen sich für eine zelluläre Therapie am besten eignen.

T-Zellen und insbesondere Helfer-T-Zellen (Th-Zellen) könnten für eine zelluläre Therapie der RA von großer Bedeutung sein. Dass Th-Zellen eine große Bedeutung für den Verlauf einer RA haben, wird vermutet, da diese Krankheit eine genetische Prädisposition für das MHC Klasse II Allel HLA-DR4 zeigt. Darüber hinaus sind CD4<sup>+</sup> T-Zellen nicht nur in der Lage, entzündungsfördernde Zytokine, wie TNF- $\alpha$ , IL-17, IL-6 und IFN- $\gamma$ , zu exprimieren, sie sind auch als T-Zell-Infiltrate in der entzündeten Synovialmembran von RA Patienten präsent (67, 79, 80, 130). In den Tiermodellen der AIA und der CIA führt eine Depletion von CD4<sup>+</sup> Zellen zu einer schwächer ausgeprägten Arthritis. Diese Ergebnisse ließen sich allerdings nicht auf den Menschen übertragen (85-87, 89, 90, 175). Aus diesem Grund ist ein differenzierteres Wissen über den Einfluss von Th-Zellen auf eine Arthritis erforderlich. Ein gezieltes Eingreifen in den Wirkungsmechanismus von entweder pathogenen pro-inflammatorischen oder protektiven anti-inflammatorischen Th-Zellen würde die Wirkungseffizienz einer Therapie gegenüber herkömmlichen Therapien erhöhen und unerwünschte Nebenwirkungen minimieren.

Um die genaue Bedeutung der Th-Zellen für den Verlauf einer Arthritis eingehender zu analysieren, wurde in der vorliegenden Arbeit ein neues vorklinisches Arthritismodell etabliert und untersucht, mit dessen Hilfe es möglich ist, antigenspezifisch den Einfluss der Th-Zellen auf eine murine Antigen-induzierte Arthritis (AIA) zu bestimmen. Durch das Arbeiten in einem antigenspezifischen System wird nicht das gesamte Immunsystem beeinflusst und mögliche Nebenwirkungen können minimiert werden. Eine Minimierung der Nebenwirkungen ist auch bei einer Therapie von humanen Erkrankungen wünschenswert.

Um mit antigenspezifischen T-Zellen arbeiten zu können, wurde das Protokoll für die AIA in der vorliegenden Arbeit insofern modifiziert, als dass anstelle von metBSA kationisiertes Ovalbumin (catOVA) als induzierendes Antigen verwendet wurde. Dieses Protokoll einer Ovalbumin-induzierten Arthritis (OIA, siehe Abb.3) hat den Vorteil, dass Ovalbumin-spezifische T-Zellen zur Verfügung stehen, die nach adoptivem Transfer mit dem Arthritis-auslösendem Antigen stimuliert werden können und anschließend wieder re-isoliert und re-analysiert werden können (78).

Um die Rolle unterschiedlicher Moleküle oder Zellen bei einer Arthritis-erkrankung *in vivo* mithilfe von verschiedenen, genetisch veränderten transgenen Mäusen analysieren zu

können, wurde zunächst untersucht, in welchen Mausstämmen sich eine OIA auslösen lässt, da die relevanten Mäuse einen unterschiedlichen genetischen Hintergrund aufweisen können. Gleichzeitig wurde das Modell einer OIA näher beschrieben.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass sowohl in Mäusen mit dem MHCII Haplotyp H-2<sup>b</sup> als auch in Mäusen mit dem Haplotyp H-2<sup>d</sup> eine OIA induziert werden kann, obwohl sich die Tierstämme in ihrer Immunantwort unterscheiden (siehe Abb.4-6). In C57Bl/6 Wildtypmäusen (H-2<sup>b</sup>) produzieren antigenspezifische Helfer-T-Zellen mehr IFN- $\gamma$  als IL-4. Außerdem werden vermehrt Antikörper des Subtypes IgG2b gebildet. Zusätzlich konnte festgestellt werden, dass neben IFN- $\gamma$  auch IL-17 von CD4+ T-Zellen produziert wird. Im Gegensatz dazu lassen sich in Balb/c Wildtyptieren (H-2<sup>d</sup>) mehr Antikörper der Subtypen IgG2a und IgG3 detektieren sowie mehr IL-4+ antigenspezifische Helfer-T-Zellen und wenig IL-17+ T-Zellen. Dieser ermittelte Unterschied in einer Immunantwort wurde zuerst von Lohoff et al im Infektionsmodell mit *Leishmania major* (LM) beschrieben (176). C57Bl/6 Mäuse, die mehr IFN- $\gamma$  produzieren und somit eher eine Th1-Antwort ausbilden, sind für eine Infektion mit LM weniger anfällig als Balb/c Mäuse, die mehr IL-4 exprimieren und somit mehr Th2-Zellen ausbilden. In weiteren Infektionsmodellen wurde die detektierte Präferenz für Th1- bzw. Th2-Zellen in C57Bl/6 bzw. Balb/c Mäusen später bestätigt (177-180). Jedoch sind in beiden Mausstämmen die Titer an IgG1 Antikörpern vergleichbar hoch (siehe Abb.5), obwohl IgG1 durch IFN- $\gamma$  induziert wird und somit eher als Teil einer Th1-Antwort gilt. Vermutlich reicht die geringere Menge an IFN- $\gamma$  in Balb/c Mäusen aus, um effizient IgG1 Antikörper zu induzieren. Auf die Entwicklung einer OIA jedoch haben die beschriebenen Unterschiede in der Immunantwort der beiden Mausstämme keinen Einfluss.

## 2. Die Rolle von pro-inflammatorischen Zytokinen bei der OIA

Helfer-T-Zellen könnten im Verlauf einer Arthritis durch verschiedene Mechanismen an der Pathogenese der Erkrankung beteiligt sein. Die Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen scheint wesentlich dazu beizutragen, was nicht zuletzt durch die jüngeren Beschreibungen von pro-inflammatorischen Th17-Zellen unterstützt wird (7-9). Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst untersucht, welche von Helfer-T-Zellen produzierten pro-inflammatorischen Zytokine für die Etablierung einer OIA essentiell sind. Da antigenspezifische Th-Zellen aus Mäusen mit dem genetischen Balb/c als auch C57Bl/6 Hintergrund prinzipiell die pro-inflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-17 und IFN- $\gamma$  sekretieren können (siehe Abb.6), sollte die Rolle dieser drei pro-inflammatorischen Zytokine bei der OIA näher analysiert werden.

## 2.1 Die Rolle von TNF- $\alpha$ bei der OIA

TNF- $\alpha$  kann von einer Vielzahl von Zellen produziert werden und ist ein zentrales Zytokin der pro-inflammatorischen Kaskade. Die Abhängigkeit einer Entzündungsreaktion von TNF- $\alpha$  wurde schon in anderen Krankheitsmodellen gezeigt (27, 31, 181, 182). TNF- $\alpha$  aktiviert verschiedene Zellpopulation, wie Makrophagen und Endothelzellen, und fördert die Sekretion weiterer pro-inflammatorischer Zytokine. Gleichzeitig fördert TNF- $\alpha$  die Migration von Immunzellen in die Entzündungsstelle, indem es die Expression von Chemokinen und von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen und vaskulären Zellen induziert (27, 32, 120, 183). In verschiedenen Mausmodellen, wie der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA), konnte bereits gezeigt werden, dass TNF- $\alpha$  zur Entstehung einer Arthritis beiträgt (84, 184, 185). Allerdings sind im Tiermodell der CIA TNF- $\alpha$  defiziente Mäuse nicht resistent gegen eine Arthritis, da sie eine milde CIA entwickeln. Analog dazu lassen sich Symptome einer RA beim Menschen durch eine anti-TNF- $\alpha$  Therapie zwar lindern und sogar Krankheitsschübe verhindern, jedoch sprechen nicht alle RA Patienten auf eine solche Therapie an (108, 109, 111, 186, 187).

Die Bedeutung von TNF- $\alpha$  für die Entstehung einer OIA wurde in der vorliegenden Arbeit in Mäusen mit einem konditionellen TNF- $\alpha$  *knockout* untersucht. Dafür wurden Tiere, die das Enzym Cre-Rekombinase in allen hämatopoetischen Immunzellen exprimieren, mit Tieren, deren TNF- $\alpha$ -Lokus durch eine *Lox-P-Site* flankiert ist, verpaart. In den Nachkommen schneidet die Rekombinase an der *Lox-P-Site* die DNA ein und deletiert dadurch das flankierte Gen oder Teile dessen, im vorliegenden Fall das Gen *TNF- $\alpha$* . Diese Deletion des von *Lox-P-Sites* flankierten Genes erfolgt idealerweise in allen Zellen, in denen die Cre-Rekombinase exprimiert wird. Im Unterschied zu einem konventionalen genetischen *knockout*, bei dem das relevante Gen meist in allen Zellen bereits in den Elterntieren nicht mehr exprimiert wird, wird die genetische Deletion durch konditionalen *knockout* erst in den Nachwuchstieren induziert. Außerdem kann durch gesteuerte Expression der Cre-Rekombinase mithilfe eines konditionalen *knockouts* eine Deletion des relevanten Gens in unterschiedlichen definierten Zellpopulationen erreicht werden (120, 188).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass in der akuten Entzündungsphase einer OIA eine geringere akute Knieschwellung in den untersuchten TNF- $\alpha$  defizienten Mäusen als in Wildtyptieren ausgebildet wird. Dies stimmt mit bereits veröffentlichten Daten zur Rolle von TNF- $\alpha$  bei einer Entzündungsreaktion überein (27, 184). TNF- $\alpha$  vermittelt demnach auch im Modell der OIA eine akute Entzündung.

Auf die Ausbildung einer chronischen OIA jedoch hat die Abwesenheit von TNF- $\alpha$  ebenso wie der erniedrigte antigenspezifische Antikörpertiter in immunisierten TNF- $\alpha$  defizienten Mäusen keine Auswirkungen (siehe Abb.9+10). Überraschenderweise erweist sich damit die Entstehung einer chronischen OIA als unabhängig von TNF- $\alpha$ . In Übereinstimmung mit den vorliegenden Ergebnissen dieser Arbeit konnte von Wong et al im Modell der AIA bereits gezeigt werden, dass in Mäusen mit konventionalem TNF- $\alpha$  *knockout* die Krankheit ähnlich wie in Wildtypmäusen verläuft (77). Allerdings haben die Autoren dieser Studie eine histologische Bewertung der Kniegelenke bereits 7 Tage nach Krankheitsinduktion vorgenommen, zu einem Zeitpunkt, an dem sich noch keine volle chronische Arthritis entwickelt hat (74). TNF- $\alpha$  kann zwar zur Osteoklastogenese und damit zur Knochendestruktion in der chronischen Phase einer Arthritis beitragen, jedoch spielt dieser Effekt bei einer OIA keine Rolle oder er wird von anderen pro-inflammatorischen Zytokinen, wie z.B. IL-17, substituiert (93, 94).

Die Neutralisation von TNF- $\alpha$  mittels Enbrel<sup>®</sup> (107) lieferte interessanterweise gegenteilige Resultate (siehe Abb.9). In diesen Mäusen ist die akute Gelenkschwellung stärker als in Kontrollmäusen und somit auch viel stärker als in TNF- $\alpha$  defizienten Mäusen. Außerdem besitzen mit Enbrel<sup>®</sup> behandelte Mäuse einen höheren prozentualen Anteil an antigenspezifischen T-Zellen in Milz und Lymphknoten als die Mäuse der Kontrollgruppe und die chronische Arthritis ist tendenziell ebenfalls stärker ausgeprägt. Dieses Ergebnis der vorliegenden Arbeit steht nicht nur im Widerspruch zu den Ergebnissen in TNF- $\alpha$  defizienten Mäusen, sondern ebenfalls zur Situation beim Menschen. Die Behandlung der humanen RA mit Enbrel<sup>®</sup> stellt neben der Gabe von Infliximab und Adalimumab die häufigste Therapieform der anti-TNF- $\alpha$  Therapie dar (105, 106, 109, 110). Während viele RA Patienten durch die Gabe von Etanercept (= Enbrel<sup>®</sup>) eine Linderung ihrer Beschwerden erfahren, scheint dies dagegen bei der Maus negative Folgen zu haben. Etanercept ist ein Fusionsprotein aus dem löslichen TNF Rezeptor II sowie dem Fc-Teil eines humanen IgG Antikörpers. Sowohl der menschliche als auch der murine TNF Rezeptor II kann neben TNF- $\alpha$  auch das lösliche Homotrimer des Zytokins Lymphotoxin- $\alpha$  (LT $\alpha_3$ ) binden. Während humanes LT $\alpha_3$  vermutlich eine ähnliche Wirkung wie TNF- $\alpha$  zeigt, ist die Rolle von murinem LT $\alpha_3$  völlig unklar (189-191). Den vorliegenden Ergebnissen nach muss dieses Zytokin in der Maus eindeutig eine suppressive Rolle bei einer OIA einnehmen. Der durch Enbrel<sup>®</sup> neutralisierte pro-inflammatorische Einfluss von TNF- $\alpha$  auf die Ausbildung einer akuten Knieschwellung wird durch die gleichzeitige Neutralisierung eines anti-inflammatorischen Effektes von LT $\alpha_3$  ausgeglichen. Neben dem LT $\alpha_3$  Homotrimer werden auch Lymphotoxin- $\alpha$ /Lymphotoxin- $\beta$

Heterotrimere gebildet, die vor allem bei der Entstehung von primären, sekundären und tertiären Lymphorganen bzw. Lymphgewebestrukturen von Bedeutung sind. Lymphotoxin Heterotrimere binden jedoch nicht an den TNF Rezeptor II und bleiben somit von Enbrel® unbeeinflusst (191, 192). Um die genaue Rolle von  $LT\alpha_3$  bei einer OIA zu analysieren, kann in zukünftigen Experimenten der Verlauf einer OIA in  $LT\alpha$  k.o.Mäusen untersucht werden.

Unter Einbeziehung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit scheint  $TNF-\alpha$  bei einer Arthritis entweder pro-inflammatorisch zu wirken oder keinen Einfluss auf den Krankheitsverlauf zu haben. Dabei könnten genetische Komponenten darüber entscheiden, ob ein Patient auf eine anti- $TNF-\alpha$  Therapie anspricht oder nicht. So wurde von Ebert et al berichtet, dass RA Patienten, die nicht für eine anti- $TNF-\alpha$  Therapie zugänglich sind, höher affine anti- $TNF-\alpha$  Autoantikörper besitzen als Patienten, deren Erkrankung durch anti- $TNF-\alpha$  Medikamente gelindert werden kann (193). Die Autoren dieser Studie beschreiben, dass dadurch in den medikamentös nicht-zugänglichen Patienten weniger  $TNF-\alpha$  zur Verfügung steht, da es vermehrt durch die hoch affinen Autoantikörper neutralisiert wird. Aus diesem Grund kann vermutet werden, dass die Erkrankung in diesen Patienten eher durch andere pro-inflammatorische Zytokine als  $TNF-\alpha$  vermittelt wird.

Daher ist der geringe Einfluss, den  $TNF-\alpha$  auf die Etablierung einer chronischen OIA hat, kein Nachteil oder Widerspruch zum Bild der RA, denn hiermit steht ein wirkungsvolles Tiermodell zur Verfügung, in dem neue Medikamente bzw. Therapieformen abseits der Wirkung von  $TNF-\alpha$  getestet werden können. Dies erscheint notwendig, da nicht auszuschließen ist, dass die Wirkung neuerer Medikamente, die im murinen CIA-Modell getestet wurden, lediglich auf den Sekundäreffekt einer Senkung des  $TNF-\alpha$  Spiegels zurückzuführen ist. Da dieses Zytokin akute Entzündungen vermittelt und außerdem sehr leicht induzierbar ist, lässt sich eine Beteiligung von  $TNF-\alpha$  an der Wirksamkeit neuer Medikamente nur in einem Modell, bei dem die Ausbildung einer chronischen Arthritis von  $TNF-\alpha$  unabhängig ist, ausschließen.

## **2.2 Die Rolle von IL-17 bei der OIA**

Die natürliche Funktion des Zytokins IL-17 beinhaltet u.a. den Schutz vor bestimmten Bakterieninfektionen. So erscheint IL-17 essentiell für die Immunantwort gegen Mycobakterien und andere Pathogene zu sein (10, 12, 14, 194). In den letzten 5 Jahren wurde mithilfe verschiedener Tiermodelle jedoch gezeigt, dass dem Zytokin IL-17 ebenfalls eine große Bedeutung bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen zukommt (137, 195-198).

Analog dazu spielt IL-17 im Gegensatz zu  $TNF-\alpha$  eine entscheidende Rolle bei der Etablierung einer chronischen OIA, was durch die Neutralisierung dieses Zytokins in der

vorliegenden Arbeit belegt wird. Die Krankheitszeichen einer OIA sind in der chronischen Phase um ca. 50% reduziert. Jedoch scheint IL-17 im Verlauf einer OIA eher in der späteren Phase wichtig zu werden. Die akute Gelenkschwellung ist in Mäusen, in denen IL-17 neutralisiert wurde, erst ab Tag 10 nach Krankheitsinduktion signifikant erniedrigt (siehe Abb.12). Eine bedeutende Rolle für IL-17 bei der Entstehung einer Arthritis wurde bereits in anderen Modellen beschrieben. Interessanterweise kann man auch hier Unterschiede zwischen verschiedenen Tiermodellen beobachten. So entsteht eine Proteoglykan-induzierte Arthritis (PGIA) unabhängig von IL-17, während eine AIA und eine CIA unter IL-17 defizienten Bedingungen weniger stark ausgeprägt sind als in Kontrolltieren (199-202). Da mit anti-IL-17 behandelte Tiere normale Frequenzen an Th17-Zellen besitzen, scheint die Expression von IL-17 keinem autokrinen Verstärkungsmechanismus zu unterliegen, (siehe Abb.13). Im Gegensatz dazu wurde von Smith et al berichtet, dass IL-17 die eigene Expression inhibiert (203). Jedoch stützen sich die Ergebnisse dieser Studie entweder auf *in vitro* erzielte Daten oder auf *ex vivo* Resultate aus IL-17RA defizienten Mäusen unter nicht-inflammatorischen Bedingungen und sind deswegen nur bedingt mit den hier diskutierten Daten vergleichbar.

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, führt die Neutralisation von IL-17 zu einer Verbesserung nahezu aller sichtbaren Krankheitssymptome in der chronischen Phase einer OIA, inklusive der Knochen- und Knorpelzerstörung. IL-17 scheint also nicht nur, wie schon in der Literatur beschrieben, einen direkten positiven Einfluss auf die Osteoklastogenese auszuüben, sondern ist durch die generelle Verstärkung der Entzündung in der Lage, alle Krankheitssymptome zu induzieren oder zumindest zu verstärken (95, 204).

Th17-Zellen stellen zwar vermutlich die Hauptquelle von IL-17 dar, jedoch kann dieses Zytokin auch von neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und CD8<sup>+</sup> T-Zellen exprimiert werden (205-210). Da in vielen vorklinischen Krankheitsmodellen die Neutralisation von IL-17 zu einer Verbesserung der Erkrankung führte, wird zurzeit in ersten klinischen Studien getestet, ob die Neutralisierung von IL-17 auch bei menschlichen Autoimmunerkrankungen zu einer Verbesserung der Krankheitspathologie führt. Dabei muss jedoch beachtet werden, dass bisherige neutralisierende Antikörper ausschließlich gegen das Protein IL-17A (allgemein als IL-17 bezeichnet) gerichtet sind. Das dem IL-17A strukturell ähnelnde IL-17F wird davon nicht betroffen. IL-17A und IL-17F weisen eine ca. 50-ige Sequenzhomologie auf und können zum Teil ähnliche Wirkungen induzieren, da sie sowohl als Homodimere als auch als Heterodimer auftreten und an die gleichen Rezeptoren binden können (7, 211-214). Eine größere Bedeutung von IL-17F oder eine Substitution der Wirkung von IL-17A durch die Wirkung von IL-17F ist eine mögliche Erklärung, warum eine Neutralisation von IL-17(A) nur eine limitierte

Wirkung nach sich zieht bzw. die Analyse einer Arthritis in IL-17A *knockout* Mäusen in verschiedenen Tiermodellen unterschiedliche Ergebnisse zeigt.

### 2.3 Die Rolle von IFN- $\gamma$ bei der OIA

Die pro-inflammatorische Wirkung des Zytokines IFN- $\gamma$  beruht u.a. auf der Stimulation von Makrophagen, welche in Folge verstärkt toxische anti-mikrobielle Moleküle, wie Stickstoffmonoxid (NO) oder Sauerstoffradikale ( $O_2^{2-}$ ) produzieren (28, 140, 215, 216). Ebenso aktiviert IFN- $\gamma$  Endothelzellen und vaskuläre Zellen und fördert in Synergie mit TNF- $\alpha$  die Migration von mononuklearen Zellen in die Entzündungsstelle, indem es die Expression der Adhäsionsmoleküle *vascular cell adhesion molecule* (VCAM)-1 und *intercellular cell adhesion molecule* (ICAM) und die Sekretion von Chemokinen induziert (29, 132, 217, 218). Neben diesen pro-inflammatorischen Eigenschaften sind allerdings auch anti-inflammatorische Wirkungen von IFN- $\gamma$  beschrieben. Es hemmt die Proliferation von Makrophagen und kann unter Umständen sogar pro-apoptotisch wirken (131). Desweiteren supprimiert IFN- $\gamma$  die Entstehung von pro-inflammatorischen Th17-Zellen und kann außerdem abhängig vom Expressionszeitpunkt selbstlimitierend auf Th1-vermittelte Entzündungen wirken (20-22, 38, 133).

IFN- $\gamma$  wird sowohl von Th1-Zellen als auch von CD8<sup>+</sup> T-Zellen (CTL) und NK-Zellen produziert. Zumindest für die IFN- $\gamma$  Expression in Helfer-T-Zellen erscheint der Transkriptionsfaktor T-bet essentiell (132, 134, 135). Die Expression von IFN- $\gamma$  in CTL *in vivo* kann abhängig vom Pathogen entweder T-bet abhängig oder unabhängig sein (219-221). NK-Zellen produzieren IFN- $\gamma$  allerdings größtenteils unabhängig von einer T-bet Expression (220, 222, 223).

In der vorliegenden Arbeit sollte der Beitrag von CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu einer OIA später analysiert werden, daher wurde der Einfluss von IFN- $\gamma$  auf eine OIA mithilfe von T-bet defizienten Mäusen, in welchen Helfer-T-Zellen kein IFN- $\gamma$  produzieren können, untersucht. Interessanterweise zeigen T-bet defiziente Mäuse, ähnlich wie Wildtypmäuse, eine ausgeprägte, starke OIA. Tendenziell lässt sich sogar eher eine Verstärkung, sowohl der akuten Knieschwellung als auch der chronischen Histologie in den *knockout* Mäusen, feststellen. In Übereinstimmung damit resultiert die Eliminierung von IFN- $\gamma$  in den Autoimmunkrankheitsmodellen der CIA und der *experimental autoimmune encephalitis* (EAE) ebenso in einer unveränderten oder sogar verstärkten und länger anhaltenden Ausprägung der Erkrankung (224-227). Ebenfalls konnten Irmeler und Kollegen bereits zeigen, dass die Neutralisation von IFN- $\gamma$  zu einer Verschlechterung einer AIA führt (139). Jedoch beruht die

Aussage dieser Veröffentlichung auf Daten, die schon am dritten Tag nach Krankheitsinduktion gemessen wurden. Die Verschlechterung der Krankheitssymptome wird hierbei auf eine erhöhte Anzahl von Th17-Zellen zurückgeführt. In Übereinstimmung damit lässt sich in OIA kranken T-bet defizienten Mäusen eine erhöhte Menge an IL-17+ antigenspezifischen Helfer-T-Zellen detektieren (siehe Abb.8). Allerdings zeigen T-bet defiziente Mäuse keine signifikante Erhöhung der Kniegelenkschwellung, wie Mäuse, bei denen IFN- $\gamma$  neutralisiert wurde (139).

Eine erfolgreiche 100%-ige Neutralisation eines Zytokins *in vivo* ist in der Regel schwer nachzuweisen und ob ein neutralisierender Antikörper auch Zytokine, die bei direktem Zell-Zell-Kontakt innerhalb einer immunologischen Synapse sofort an eine interagierende Zelle weitergegeben werden, erreicht, ist umstritten. Der Unterschied zwischen einer Neutralisation des Zielmoleküls durch Antikörper bzw. der Analyse von *knockout* Mäusen besteht ferner in der zeitlichen Eliminierung des Zielmoleküls. Th-Zellen aus T-bet defizienten Mäusen fehlt von Beginn an die Fähigkeit, IFN- $\gamma$  zu exprimieren. Dahingegen ist das Zytokin in Neutralisierungsexperimenten in der Phase der Primärstimulation von B-Zellen und T-Zellen, also der s.c. Immunisierung, noch anwesend und wird erst bei der Krankheitsinduktion eliminiert. Dabei kann IFN- $\gamma$  durchaus schon während der Primärstimulation einen Einfluss auf die Differenzierung von Helfer-T-Zellen haben, durch z.B. die Aktivierung von als APZ fungierenden Makrophagen oder die direkte Suppression der Differenzierung von Th17-Zellen (8, 9, 131). Dies könnte den Unterschied zwischen den Ergebnissen aus T-bet *knockout* Mäusen und Mäusen, in denen das Zytokin durch blockierende Antikörper neutralisiert wird, erklären.

Da IFN- $\gamma$  von NK-Zellen zumindest teilweise unabhängig von T-bet produziert wird, kann nicht ausgeschlossen werden, dass von NK-Zellen exprimiertes IFN- $\gamma$  am Krankheitsbild der OIA in T-bet-/- Mäusen beteiligt ist und damit das von Th-Zellen produzierte IFN- $\gamma$  substituiert wird (222, 223). Jedoch ist bisher ein Beitrag von NK-Zellen am Verlauf einer AIA nicht beschrieben. Die Rolle von NK-Zellen bei Autoimmunerkrankungen wird generell zurzeit kontrovers diskutiert. Einerseits kann man NK-Zellen bei RA Patienten vermehrt im entzündeten Gelenk detektieren. Zusätzlich wurde berichtet, dass in verschiedenen Tiermodellen für Autoimmunerkrankungen NK-Zellen eine entscheidende Rolle bei der Krankheitsentstehung einnehmen, jedoch entweder pro- oder anti-inflammatorisch (228-231). So wirken NK-Zellen im Tiermodell der EAE protektiv, während sie in einem anderen Autoimmunmodell, der *Myasthenia gravis*, eine pathogene Wirkung ausüben (232, 233). Allerdings ist bisher völlig unklar, ob NK-Zellen an der Pathogenese einer Arthritis beteiligt

sind. Im Tiermodell der OIA wirkt IFN- $\gamma$  im Allgemeinen ebenfalls eher protektiv als pathogen. Da die beobachtete Verschlechterung der Krankheitssymptome einer AIA in T-bet-/- Mäusen weniger stark ausgeprägt ist, als in Wildtypmäusen, in denen IFN- $\gamma$  durch Antikörper neutralisiert wurde, lässt sich sogar vermuten, dass auch von NK-Zellen produziertes IFN- $\gamma$  protektiv wirkt. Eine genaue Analyse der Rolle von NK-Zellen und ihren produzierten Zytokinen muss jedoch erst noch erfolgen.

Ob CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Modell der OIA aktiviert werden und IFN- $\gamma$  in Abwesenheit des Transkriptionsfaktors T-bet exprimieren können, muss erst noch gezeigt werden. Die Rolle von CTL wurde im vorliegenden Arthritismodell jedoch nicht näher analysiert, da schon von Wong et al gezeigt werden konnte, dass sie für die Entstehung einer AIA nicht von Bedeutung sind (77).

Unter Berücksichtigung aller Ergebnisse dieser Arbeit lässt sich IFN- $\gamma$  im OIA Modell eher eine protektive Rolle zuordnen, vermutlich durch die Suppression der Differenzierung von Th17-Zellen. Dabei spielt die pro-inflammatorische Wirkung von IFN- $\gamma$  während der akuten OIA Phase wohl keine Rolle. Alternativ könnte auch TNF- $\alpha$  eine mögliche pro-inflammatorische Funktion von IFN- $\gamma$  während der akuten Phase substituieren.

Für die Etablierung einer murinen OIA lässt sich auf Basis der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nach folgende Modellvorstellung entwickeln. Die akute Entzündungsreaktion einer OIA wird mehrheitlich durch TNF- $\alpha$  und nicht durch IL-17 oder IFN- $\gamma$  vermittelt. TNF- $\alpha$ , welches zunächst von lokal im Gelenk residierenden Makrophagen produziert wird, initiiert dabei vermutlich die Aktivierung von Endothelzellen und vaskulären Zellen, was zu einem erhöhten Einfluss von Flüssigkeit in das entzündete Kniegelenk führt. Außerdem wird durch die Induktion von Chemokinen und der Expression von Adhäsionsmolekülen vermehrt die Migration von Immunzellen in das entzündete Gelenk gefördert. Dabei wandern zunächst mehrheitlich Neutrophile in das Kniegelenk ein, später auch mononukleare Zellen. Da IL-17 in den ersten Tagen der Entzündung entweder gar nicht oder nur in geringen Mengen von den im Gelenk vorhandenen Zellen produziert wird, spielt es in der akuten Phase der OIA keine Rolle. Einige Tage später jedoch kann IL-17 von einwandernden Th17-Zellen in größeren Mengen in der Entzündungsstelle sekretiert werden und die Chronifizierung der Entzündung induzieren. Dabei nimmt vermutlich im Laufe der Zeit die Bedeutung von TNF- $\alpha$  stetig ab, wohingegen die Bedeutung von IL-17 immer mehr zunimmt, bis schließlich die Etablierung von chronischen Arthritisssymptomen nicht mehr durch TNF- $\alpha$  sondern durch IL-17 vermittelt wird.

### 3. Die Rolle von CD4+ T-Zellen bei der OIA

Eine chronische Entzündung setzt ein komplexes Zusammenspiel vieler unterschiedlicher Zelltypen voraus. Eine Schlüsselrolle können hierbei CD4+ Helfer-T-Zellen einnehmen. Nicht nur die Restriktion einiger Tiermodelle für RA auf bestimmte MHCII Allele deutet darauf hin. Eine Depletion dieser Zellen führt zwar im Tiermodell jedoch nicht bei RA Patienten zu einer Verbesserung des Krankheitsverlaufes (68, 86, 90). Aus diesem Grund ist es von großer Bedeutung, die genaue Rolle von CD4+ T-Zellen bzw. relevanter Subpopulationen zu untersuchen. Das Modell des adoptiven Zelltransfers bietet dabei den Vorteil, dass es bei einer eventuellen therapeutischen Anwendung auch bei menschlichen Erkrankungen angewendet werden kann. Hierfür können körpereigene T-Zellen oder Stammzellen eines Patienten isoliert, diese *in vitro* manipuliert und anschließend wieder dem Patienten zurückgegeben werden. Voraussetzung für einen solchen Ansatz ist allerdings das Wissen, welche Helfer-T-Zell-Subpopulationen pathogen oder protektiv wirken, wann diese Zellen wirken, d.h. welchen Beitrag sie zu den verschiedenen Stadien einer Erkrankung leisten, und wie diese Zellen wirken. Aus diesem Grund sollte die Rolle von CD4+ T-Zellen bei einer OIA näher untersucht werden.

#### 3.1 Die Rolle von pro-inflammatorischen Th1- und Th17-Zellen bei der OIA

Wie vorangegangene Experimente der vorliegenden Arbeit gezeigt haben, wird die akute Phase einer OIA durch TNF- $\alpha$ , die Etablierung einer chronischen OIA jedoch eher durch das pro-inflammatorische Zytokin IL-17 vermittelt (siehe Abschnitt IV 2.1+2.2). Aus diesem Grund lag es nahe, die Bedeutung von Th17-Zellen für den Verlauf einer Arthritis zu analysieren, denn beide Zytokine können von Th17-Zellen exprimiert werden. Überraschenderweise hat der zusätzliche Transfer von *in vitro* generierten Th17-Zellen in OIA-krankte Mäuse keine Auswirkungen auf das Krankheitsbild (für das Protokoll einer OIA in immunisierten Mäusen siehe Abb.3). Da die transferierten T-Zellen *in vivo* überleben und prinzipiell auch Zytokine produzieren können, gibt es dafür zwei mögliche Erklärungen. Einerseits könnte das pathogen wirkende IL-17 nicht von T-Zellen produziert werden, was allerdings unwahrscheinlich ist, da Th-Zellen vermutlich die Hauptquelle dieses Zytokins sind (205). Andererseits könnte die Wirkungseffizienz von IL-17 so hoch sein, dass von endogenen Zellen exprimiertes IL-17 ausreichend in der Lage ist, eine OIA zu vermitteln, so dass zusätzlich hinzugefügtes IL-17 keine Wirkung mehr zeigt.

Interessanterweise können Th1-Zellen, die als Vergleichszellen untersucht wurden, sehr wohl zumindest die akute Phase einer OIA verstärken, obwohl von Th-Zellen produziertes IFN- $\gamma$  eine geringe Bedeutung bei der Entstehung einer akuten Entzündung im OIA Modell hat. Eine mögliche Erklärung bietet das während der Arbeit untersuchte Migrationsverhalten der

analysierten T-Zellen. Th1-Zellen wandern im Gegensatz zu Th17-Zellen verstärkt in eine Entzündungsstelle ein (siehe auch Abschnitt IV 3.1.1). Da auch Th1-Zellen TNF- $\alpha$  produzieren, lässt sich die verstärkte Gelenkschwellung in OIA kranken Tieren, die zusätzlich Th1-Zellen erhalten haben, wahrscheinlich mit dem erhöhtem TNF- $\alpha$  Spiegel im entzündeten Gelenk erklären.

Um den Einfluss von endogen aktivierten T-Zellen und B-Zellen nach dem Transfer der Th17- bzw. Th1-Zellen zu minimieren, wurde die pathogene Wirkung der Th-Zellen in nicht immunisierten Mäusen getestet. Dazu wurden *in vitro* generierte Th17- bzw. Th1-Zellen in naive Rezipientenmäuse transferiert und anschließend eine OIA durch eine Knieinjektion mit catOVA ausgelöst (für das Protokoll einer OIA vermittelt durch Th-Zell-Transfer siehe Abb.15). Analysiert wurden die akute Phase der OIA, gekennzeichnet durch die akute Knieschwellung und Infiltrate von Granulozyten, sowie die chronische Phase der OIA, gekennzeichnet durch die chronischen Arthritis Symptome der hyperplastischen Synovialmembran, der Infiltrate von mononuklearen Zellen und der Zerstörung von Knochen- und Knorpelschichten.

### 3.1.1 Die akute Phase einer OIA

Werden Th17-Zellen in naive Rezipientenmäuse transferiert, können sie in Abwesenheit eines aktivierten endogenen Immunsystems eine akute Entzündung induzieren. Einige wenige bisherige Veröffentlichungen stützen dieses Ergebnis. In wenigen anderen Krankheitsmodellen können *in vitro* generierte Th17-Zellen ebenfalls eine Entzündung verursachen (234-237).

Allerdings waren Th1- und Th17-Zellen nahezu gleichermaßen in der Lage, eine akute Entzündung zu vermitteln. In Übereinstimmung dazu wurde von Klasen et al bereits gezeigt, dass im Modell der AIA ein BSA-spezifischer T-Zell-Klon nach adoptivem Transfer eine akute Knieschwellung in Mäusen induzieren kann (238, 239). Th1-Zellen verhalten sich im OIA Modell ebenfalls pro-inflammatorisch, obwohl IFN- $\gamma$  selbst über den gesamten Verlauf einer Arthritis gesehen wohl eher anti-inflammatorisch wirkt. Da durch eine systemische Injektion von blockierenden Antikörpern das gesamte sezernierte IFN- $\gamma$ , unabhängig davon, von welcher Zelle es sekretiert wurde, neutralisiert wird, ist es durchaus möglich, dass protektiv wirkendes IFN- $\gamma$  von anderen Zellen als Th1-Zellen, z.B. NK-Zellen, produziert wird. Ebenfalls könnte von Bedeutung sein, zu welchem Zeitpunkt und an welchem Ort IFN- $\gamma$  exprimiert wird. Während eine beginnende akute Entzündung von TNF- $\alpha$  und eventuell IFN- $\gamma$ , welche von Th1-Zellen produziert werden, vermittelt wird, nimmt die Bedeutung von IL-17 im Verlaufe der Immunreaktion immer weiter zu. Dies würde auch erklären, warum Th17-Zellen sowohl im OIA als auch im DTH Modell kein Ödem in Wildtyp-Tieren induzieren können, während mit Th1-

Zellen transferierte Tiere eine akute Gelenkschwellung zeigen. So ist die Erhöhung der Permeabilität von vaskulären Zellen und somit die Wassereinlagerung im entzündeten Gewebe von TNF- $\alpha$  bzw. IFN- $\gamma$  abhängig (32, 91, 131).

Die ersten akuten granulozytären Infiltrate jedoch sind unspezifisch und vermutlich auf die Verletzung des Gewebes zurückzuführen, da auch Versuchstiere ohne T-Zell-Transfer in den ersten Tagen Infiltrate aufweisen. In Verlauf der nächsten Tage wird die Entzündung durch antigenspezifische T-Zellen aufrechterhalten. Th17-Zellen sind dabei, vermutlich durch die Sekretion von TNF- $\alpha$ , genau wie Th1-Zellen durchaus in der Lage, die Entzündung zu vermitteln, obwohl IL-17 erst in einem späteren Stadium der Entzündung wirksam wird. Allerdings bilden *in vitro* generierte Th17-Zellen in bezug auf ihre Zytokinsekretion keine homogene Zellpopulation, da nach Re-Isolierung ein höherer Prozentsatz der Zellen IFN- $\gamma$  und nicht IL-17 exprimiert. Dies könnte das akute Entzündungspotential von *in vitro* generierten Th17-Zellen zu einem sehr frühen Zeitpunkt erklären. Ob dies jedoch ein Artefakt der *in vitro* Generierung ist, oder auch *in vivo* generierte Th17-Zellen IFN- $\gamma$  exprimieren können, bleibt unklar. Zwar konnte von Lexberg et al bereits gezeigt werden, dass *in vivo* entstandene IL-17+ T-Zellen in ihrer IL-17 Expression stabiler sind, als *in vitro* polarisierte Th17-Zellen, jedoch schließt das einen möglichen autokrinen Kontrollmechanismus nicht aus (240). Hierbei könnten Th17-Zellen, die im Verlaufe einer Entzündungsreaktion anfangen, IFN- $\gamma$  zu produzieren, selbst für eine Limitierung der Entzündungsreaktion sorgen. Denn in einer späteren Phase der Entzündung wird diese hauptsächlich durch die Wirkung von IL-17 getragen, wobei jetzt die suppressive Wirkung von IFN- $\gamma$  immer weiter in den Vordergrund rückt, in dem es die Anzahl der Th17-Zellen minimiert und so eine Ausbreitung der Entzündung verhindert (20, 139).

Ob dieser autokrine Kontrollmechanismus bei Th17-Zellen (Produktion von IFN- $\gamma$ ) *in vivo* existiert, muss erst noch untersucht werden. Ein autokriner Kontrollmechanismus für Th1-Zellen wurde in einigen Tiermodellen allerdings bereits beschrieben (241, 242). Im Krankheitsmodell einer Infektion mit *Toxoplasma gondii* beginnen Th1-Zellen im Verlaufe der Erkrankung IL-10 zu produzieren. Dieses Zytokin gilt allgemein als anti-inflammatorisches Zytokin und kann eine pro-inflammatorische Immunreaktion supprimieren (161, 163, 243). Somit wird die durch Th1-Zellen induzierte Entzündung durch die pro-inflammatorischen Th1-Zellen selbst begrenzt

Ob ein autokriner Kontrollmechanismus bei Th17-Zellen, entweder durch IFN- $\gamma$  oder IL-10 Produktion von Th17-Zellen vermittelt, existiert, bleibt allerdings bisher unklar. Dass immunsuppressorisches IL-10 auch von Th17-Zellen exprimiert werden kann, wurde jedoch bereits beschrieben (244). Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Th17-Zellen zeigten

jedoch zu keinem Zeitpunkt eine Expression von IL-10 und konnten zusätzlich in einem Ko-Transfer mit Th1-Zellen keine Th1 vermittelte DTH Reaktion supprimieren. Dies spricht gegen eine IL-10 Expression der in der vorliegenden Arbeit untersuchten *in vitro* generierten Th17-Zellen.

### Migration von Th-Zellen

Für eine effektive Immunreaktion ist es eminent wichtig, dass die Zellen in den Entzündungsort einwandern können, um dort lokal ihre Wirkung zu entfalten. Eine effiziente Migration wird durch ein Zusammenspiel von Chemokinen, Selektinen, Integrinen und ihren jeweiligen Rezeptoren bzw. Liganden gesteuert.

Anhand eines Migrationsassays wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass *in vitro* generierte Th17-Zellen bis zu fünfmal schlechter in ein entzündetes Fußgelenk einwandern als Th1-Zellen (siehe Abb.25). Dies war ebenfalls der Fall bei einer Migration in ein entzündetes Kniegelenk. Die geringere Anzahl an Th17-Zellen im Gelenk mag ebenso die lediglich marginale Gelenkschwellung erklären. Können die transferierten Zellen jedoch in lymphopenischen Rezipientenmäusen ungehindert proliferieren, sind auch Th17-Zellen in der Lage, eine Gelenkschwellung zu induzieren. Ein in lymphopenischen SCID Mäusen durchgeführter Migrationsassay müsste hier klären können, ob auch in diesem Fall Th17-Zellen schlechter als Th1-Zellen in Entzündungsstellen einwandern. Da *in vitro* generierte Th17-Zellen weder CXCR3 noch CCR5 auf der Zelloberfläche exprimieren (siehe Abb.26), würde man dies auch erwarten, sofern die Abwesenheit der beiden Chemokinrezeptoren tatsächlich der Grund für die schwächere Migration in entzündete Gewebe ist (147, 234). Jedoch ist nicht auszuschließen, dass die transferierten Th17-Zellen *in vivo* unter bestimmten Voraussetzungen, wie z.B. homeostatischer Proliferation, beginnen, relevante Rezeptoren zu exprimieren, zumal die mRNA für CCR5 schon in *in vitro* generierten Th17-Zellen nachweislich vorhanden ist.

Jedoch lässt sich die Chemokinrezeptorexpression sowohl von *in vivo* generierten als auch von transferierten Th17-Zellen nicht bestimmen, denn um die Expressionen von Chemokinrezeptor und Zytokin miteinander korrelieren zu können, müsste man die T-Zellen *in vitro* restimulieren. Allerdings führt zumindest eine Restimulation mit PMA/ionomycin zu einer Veränderung im Expressionsmuster von migrationsrelevanten Rezeptoren. So wird die Expression von E-Selektin-Ligand herauf reguliert, die CXCR3 Expression aber herunter reguliert (eigene Daten, nicht gezeigt). Transferierte Th-Zellen könnten zwar unter Nutzung von kongenen Mauszellen von endogenen Zellen unterschieden werden. Jedoch lässt sich auch hier eine mögliche Rezeptorexpression in nicht restimulierten Zellen nicht mit einer IL-17

Expression korrelieren, da ein Teil der re-isolierten Th17-Zellen IFN- $\gamma$  exprimiert und somit wohl eher zu Th1-Zellen differenziert. Selbst eine mögliche Isolierung der IL-17 Produzenten mit einem Sekretionsassay erfordert eine *in vitro* Restimulation der Zellen und ist deswegen kein geeignetes Mittel zum Vergleich der Chemokinrezeptorexpression von *in vivo* und *in vitro* generierten Th17-Zellen. Einzig die Verwendung von GFP-IL17-Reportermausen scheint in diesem Zusammenhang erfolgversprechend zu sein. In diesen Tieren exprimieren alle Zellen, die IL-17 produzieren, simultan auch das *Green Fluorescent Protein* (GFP), welches durchflusszytometrisch detektiert werden kann. Somit könnte man eine *in vitro* Restimulation umgehen. Allerdings zeigte sich in anderen Modellen, dass die Expression von GFP sehr stabil ist, so dass selbst dann die Zellen noch durch GFP markiert sind, wenn sie kein IL-17 mehr produzieren (245, 246).

Wie im Kapitel III Ergebnisse Abschnitt 3.1 gezeigt wurde, können Th17-Zellen trotz der schwächeren Migration in entzündete Gewebe annähernd gleich stark wie Th1-Zellen die Anwesenheit von granulozytären Infiltraten in der Entzündungsstelle aufrechterhalten. Zumindest in Wildtyptieren erweisen sich demnach Th17-Zellen als weit aus potenter als Th1-Zellen, eine akute Entzündung zu induzieren, wenngleich zumindest in Th17-transferierten immunkompetenten Wildtypmäusen keine Gewebeschwellung detektiert werden kann. Die Beobachtung, dass in den untersuchten Krankheitsmodellen eine akute Entzündung ohne ausgeprägte Schwellung des entzündeten Gewebes ablaufen kann, ist bisher in der Literatur nicht beschrieben. Eine Schwellung der Entzündungsstelle wird einerseits durch die zellulären Infiltrate verursacht. Andererseits führt eine Aktivierung von Endothelzellen zu einer erhöhten Vaskularität, was eine verstärkte Einlagerung von Flüssigkeit in das entzündete Gewebe zur Folge hat. Offensichtlich kommt es nach dem Transfer von Th17-Zellen in immunkompetenten Wildtypmäusen nur zu einer schwachen Aktivierung von vaskulären Zellen, da IL-17 keine Wirkung auf diese Zellen hat (11, 26).

### 3.1.2 Die chronische Phase einer OIA

Th17- und auch Th1-Zellen können nach adoptivem Transfer zwar eine akute Entzündung innerhalb der ersten Woche vermitteln, jedoch wird anschließend keine chronische OIA in den Mäusen induziert. Weder in immunkompetenten Wildtyptieren noch in lymphopenischen SCID oder RAG1<sup>-/-</sup> Mäusen chronifiziert sich die akute Entzündung, so dass diese nach 7 bis 10 Tagen kaum noch nachweisbar ist (siehe Abb.16+18). In immunkompetenten Wildtypmäusen können von diesem Zeitpunkt an keine transferierten Th-Zellen mehr detektiert werden. Dass die transferierten Th-Zellen *in vivo* z.B. durch Kompatibilitätsprobleme depletiert werden, kann ausgeschlossen werden, da das Verschwinden der T-Zellen eindeutig mit der *in vivo*

Restimulation zusammenhängt. In Mäusen, die keine Antigenstimulation durch eine i.a. Injektion erhalten, können sowohl Th1- als auch Th17-Zellen noch drei Wochen nach Transfer nachgewiesen werden (siehe Abb.17). Da lediglich die Milz sowie die Lymphknoten der Mäuse analysiert wurden, ist es möglich, dass die transferierten Zellen in andere Organe eingewandert sind. Da in der ersten Woche nach einer Arthritisinduktion die Th-Zellen in Milz und Lymphknoten noch nachgewiesen werden können, ist es möglich, dass die T-Zellen nach erfolgter Restimulation im drainierenden Lymphknoten in das entzündete Knie oder andere Organe eingewandert sind. Von Westermann et al u.a. wurde bereits gezeigt, dass Effektor- bzw. Gedächtnis-T-Zellen in die Lunge, die Leber oder andere Organe migrieren und dort auch persistieren können (247-249). Diese Organe sollen in einem zukünftigen Experiment ebenfalls auf die Anwesenheit der transferierten Th-Zellen hin untersucht werden.

Andererseits beschreiben bereits veröffentlichte Arbeiten, dass T-Zellen, die einem verhältnismäßig starkem Aktivierungsstimulus, wie er bei der vorliegenden *in vitro* Aktivierung vermutlich erfolgt, unterliegen, nach erneutem Antigenkontakt schneller in Apoptose gehen als schwächer stimulierte T-Zellen (250, 251). Daher soll in kommenden Experimenten durch Titration der Peptidkonzentration bei der *in vitro* Generierung der Th-Zellen die Stimulationsstärke des TZR variiert werden.

In Übereinstimmung mit den Daten der vorliegenden Arbeit konnten Klasen et al im AIA Modell bereits zeigen, dass ein BSA-spezifischer Helfer-T-Zell-Klon nach adoptivem Transfer in naive Mäuse keine chronischen Arthritissymptome induzieren kann (238, 239).

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen weiterhin, dass sich, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen des Migrationsassays, tendenziell mehr Th17- als Th1-Zellen in Milz und Lymphknoten nachweisen lassen. Da mehr Th1- als Th17-Zellen in das entzündete Gewebe einwandern, zirkulieren mehr Th17-Zellen in Milz und Lymphknoten. Dieses Ergebnis kann in allen Experimenten gleichermaßen beobachtet werden, unabhängig davon, ob immunkompetente oder lymphopenische Mäuse als Rezipienten verwendet werden (siehe Abb.17+19).

Dass Th-Zellen jedoch keine chronische Arthritis auslösen können, kann nicht damit erklärt werden, dass die Zellen *in vivo* sterben, da sich ebenfalls in lymphopenischen Mäusen, trotz des Überlebens der transferierten Zellen, keine chronische OIA etabliert.

Das Überleben sowie die Effektorfunktionen von Th-Zellen werden durch eine Vielzahl von Genen reguliert. So konnte am Deutschen Rheumaforschungszentrum von Niesner und Kollegen bereits gezeigt werden, dass das Gen *Twist1* zumindest für Th1-Zellen eine entscheidende Bedeutung hat. Es beeinflusst vor allem die Zytokinexpression der Zellen

(252). Wird *Twist1* mithilfe von RNA Interferenz in Th1-Zellen ausgeschaltet, erhöht das die Pathogenität der Zellen. Dazu konnte mithilfe des OIA Modelles im Verlaufe dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Abwesenheit von *Twist1* in Th1-Zellen zu einer lang anhaltenden Entzündung führt. In Versuchstieren, in die modifizierte Th1-Zellen transferiert werden, können noch drei Wochen nach Krankheitsinduktion granulozytäre Infiltrate und Exsudate nachgewiesen werden (252). Dies bedeutet, dass T-Zellen prinzipiell eine chronische Entzündung auslösen können, dies jedoch durch *Twist1* verhindert wird. Jedoch sind auch hier weder eine nennenswerte Aktivierung der Synovialmembran noch die Zerstörung von Knochen- oder Knorpelgewebe sichtbar. Somit führt das Ausschalten von *Twist1* in Th1-Zellen eher zu einer Chronifizierung der akuten Entzündung als zur Induktion einer degenerativen OIA, gekennzeichnet durch die klassischen chronischen Arthritissymptome der Hyperplasie und Knochendestruktion. Das legt ebenfalls den Schluss nahe, dass Th-Zellen keine chronischen Arthritissymptome induzieren können, selbst wenn eine durch T-Zellen ausgelöste akute Entzündung über einen längeren Zeitraum als eine Woche andauert.

Somit ist klar, dass *in vitro* generierte Th17-Zellen keine chronische OIA auslösen können, obwohl deren Etablierung eindeutig durch IL-17 vermittelt wird. Ob das im Modell der OIA pathogen wirkende IL-17 auch von anderen Zellen produziert wird, soll in späteren Experimenten durch Anwendung eines T-Zell-spezifischen IL-17 *knockout* untersucht werden. Einerseits kann dies mithilfe des cre/lox-Systems erreicht werden, indem Mäuse, in denen das IL-17 Gen von *Lox-P-Sites* markiert ist (IL-17<sup>fl/fl</sup>), mit CD4<sup>cre/wt</sup> Mäusen verpaart werden. In den Nachkommen dieser Verpaarung wird durch die Cre-Rekombinase in allen CD4+ Zellen das *IL-17* Gen deletiert. IL-17<sup>fl/fl</sup> Mäuse müssten allerdings zunächst generiert werden. Andererseits kann in Wildtypzellen IL-17 ausgeschaltet werden und die Pathogenität der modifizierten Zellen mit der von Wildtypzellen verglichen werden. IL-17 inkompetente T-Zellen können dabei aus IL-17 *knockout* Mäusen gewonnen werden. Alternativ kann IL-17 mithilfe der u.a. in der eigenen Arbeitsgruppe neu etablierten Technik der RNA Interferenz in Wildtypzellen ausgeschaltet werden (253, 254).

### 3.2 Nähere Charakterisierung von *in vitro* generierten Th17-Zellen

In den Experimenten der vorliegenden Arbeit mit adoptivem Th-Zell-Transfer wurden antigenspezifische Th17-Zellen *in vitro* generiert. Ob *in vitro* und *in vivo* induzierte Th17-Zellen jedoch miteinander vergleichbar sind, ist den vorliegenden Daten nach zumindest fragwürdig. Da IL-17+ T-Zellen bisher als hoch pro-inflammatorisch beschrieben wurden, verwundert es, dass eine *in vitro* Differenzierung zu Th17-Zellen führt, die im Modell der OIA weniger pro-inflammatorische Eigenschaften zeigen, als erwartet (11, 26, 138). Neben einer chronischen

OIA können Th17-Zellen im Gegensatz zu Th1-Zellen auch keine *delayed type hypersensitivity* (DTH) Reaktion im Fußballen vermitteln (siehe Abb.23). Bisher zeigen auch nur wenige Studien, dass *in vitro* differenzierte Th17-Zellen Entzündungen oder sogar Krankheiten induzieren können (234, 235). Zwar konnten Langrish et al zeigen, dass Th17-Zellen nach Transfer in C57Bl/6 Mäuse eine *experimentell autoimmune encephalitis* (EAE) auslösen können, jedoch wurden auch in dieser Studie *in vivo* induzierte Th-Zellen analysiert und diese lediglich unter Th17-polarisierenden Bedingungen *in vitro* expandiert (195).

Wie in den durchgeführten Experimenten dieser Arbeit gezeigt werden konnte, unterscheiden sich *in vitro* generierte Th17-Zellen im Zytokinprofil lediglich durch die Sekretion von IL-22 und IL-17 von Th1-Zellen und zeigen bezüglich der IL-17 Sekretion keinen stabilen Phänotyp (siehe Abb.19+24). Zwar scheint eine *in vivo* Induktion von IL-17 stabiler zu sein, allerdings lässt sich auch hier nicht ausschließen, dass einige Zellen ihren Phänotyp bezüglich der Zytokinsekretion ändern und schließlich IFN- $\gamma$  sezernieren (240). Ob die durch die Analyse von *in vitro* generierten Th17-Zellen gewonnenen Informationen tatsächlich auf *in vivo* induzierte Th17-Zellen übertragbar sind, muss erst noch gezeigt werden. Th17-Zellen sind u.a. an der Bekämpfung von Mycobakterien beteiligt und müssen dementsprechend an den Ort der Entzündung migrieren können (10). *In vitro* differenzierte Zellen können das nur unzureichend, vermutlich aufgrund der fehlenden Expression von wichtigen Chemokinrezeptoren, wie CXCR3 und CCR5 (siehe Abb.26). Auch aus diesem Grund erscheint es fragwürdig, ob die bisher veröffentlichten Protokolle zur Differenzierung von Th17-Zellen ausreichend sind, um potente, entzündungsfördernde T-Zellen zu generieren. Ein direkter Vergleich zwischen *in vitro* und *in vivo* induzierten IL-17+CD4+ T-Zellen, der aus technischen Gründen bisher nicht möglich war, soll in Zukunft darüber Klarheit schaffen.

### 3.3 Die Rolle von anti-inflammatorischen CD4+CD25+ Treg bei der OIA

Bei der Betrachtung der Effekte von Helfer-T-Zellen auf eine OIA sollten neben pathogenen auch potentiell protektive Zellpopulationen untersucht werden. In diesem Zusammenhang sind in den letzten 10 Jahren zunehmend regulatorische Helfer-T-Zellen (Treg) in den Vordergrund getreten. Bezugnehmend auf eine mögliche zukünftige klinische Zelltherapie war es wichtig zu analysieren, welchen Einfluss Treg auf eine OIA haben. Da Treg aus Wildtypmäusen nur eingeschränkt Immunreaktionen supprimieren können, sollte die Wirkung von antigenspezifischen T-Zellen nach adoptiven Zelltransfer analysiert werden (162, 255, 256).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass CD4+CD25+ Treg keinen Einfluss auf die Ausbildung einer akuten Gelenkschwellung nach der Induktion einer OIA haben. Im

Widerspruch dazu wurde von Frey et al bereits berichtet, dass Treg aus Balb/c Wildtypmäusen bei einer durch metBSA induzierten AIA die akute Knieschwellung teilweise unterdrücken können (257). Ovalbuminspezifische regulatorische T-Zellen vermitteln jedoch mit einer 40-50%-igen Reduktion der chronischen Arthritissymptome bei einer OIA (siehe Abb.33) eine bessere Suppression einer chronischen Arthritis als polyklonale Treg aus Balb/c Wildtypmäusen bei einer metBSA induzierten AIA (257). Von der Suppression sind alle chronischen Krankheitsparameter gleichermaßen betroffen.

Im OIA Modell führt die polyklonale Aktivierung von endogenen Treg durch die Applikation eines IL-2 Expressionsplasmides mithilfe einer GeneGun allerdings zumindest innerhalb der ersten vier Tage nach OIA Induktion zu einer Verringerung der akuten Gelenkschwellung. Die chronische OIA Phase ist davon kaum betroffen (siehe Abb.35). Der genaue Mechanismus dieser TZR-unabhängigen unspezifischen Aktivierung der Treg durch IL-2 bleibt zunächst unklar. Durch die Immunisierung von Balb/c Wildtypmäusen mit einem IL-2-Expresionsplasmid erhöht sich die Anzahl der Treg *in vivo*. Diese können nach Isolation und Transfer in Rezipientenmäuse ovalbuminspezifische naive T-Zellen supprimieren, wie von Brandenburg und Kollegen berichtet wurde (164). Aus den T-Zell-Transfer-Experimenten der vorliegenden Arbeit ist bekannt, dass die akute Entzündung während der ersten Stunden und Tage unspezifisch abläuft, die Antigenpezifität dann aber eine immer größere Rolle spielt. Polyklonale Treg aus Wildtypmäusen können demnach den unspezifischen ersten Teil einer Entzündung nach erfolgter Aktivierung durch IL-2 unterdrücken. Diese Suppression kann vermutlich nicht lange aufrechterhalten werden, da die Treg entweder sterben oder erneut aktiviert werden müssen. Außerdem könnte der Suppression von antigenspezifischen T-Zellen, welche die Entzündung weiter vermitteln, ein anderer Mechanismus zugrunde liegen, welcher dann nur durch antigenspezifisch aktivierte Treg erfolgen kann.

Eine weitere Beobachtung stützt diese Argumente. Im Verlauf dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass pro-inflammatorische Th1-Zellen, die *in vitro* durch eine Überexpression des Notch-Moleküles in IFN- $\gamma$ +/IL-10+ Doppelproduzenten umgewandelt wurden, einen anti-inflammatorischen Charakter annahmen und eine akute DTH Reaktion sowie auch eine akute Knieschwellung bei einer OIA supprimieren konnten (46). Jedoch haben auch diese Zellen keinen Einfluss auf die chronische Phase einer OIA. Der Suppressionmechanismus wurde dabei hauptsächlich durch IL-10 vermittelt. Die Suppression durch endogene Treg, die mit der GeneGun durch ein IL-2 Plasmid aktiviert wurden, wird ebenfalls durch IL-10 vermittelt. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass antigenspezifische, für 24h mit anti-CD3 Antikörpern voraktivierte Treg wenig IL-10 produzieren, lässt sich folgendes Suppressionsschema annehmen.

Untersuchte anti-inflammatorische T-Zell-Populationen:

- antigenspezifische für 24h mit anti-CD3 voraktivierte CD4+CD25+ Treg (nTreg)
- Notch-modifizierte antigenspezifische IFN-g+/IL-10+ Th1-Zellen (Notch-Treg)
- endogene, antigenunspezifisch mit IL-2 Plasmid mittels GeneGun aktivierte Treg (endogene Treg)

Phase einer OIA	Spezifität der Suppression	Mechanismus der Suppression	Suppression durch:
frühe akute Phase (d+1-d+3)	antigenunspezifisch	IL-10	Endogene Treg Notch-Treg
späte akute Phase (d+4-d+9)	antigenspezifisch	IL-10	Notch-Treg
chronische Phase (>d+9)	antigenspezifisch	?	nTreg

Tabelle4: Mögliche Suppressionsmechanismen durch Treg bei der OIA in Wildtypmäusen.

Die einzelnen Phasen einer OIA gehen dabei fließend ineinander über. Außerdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass neben IL-10 noch andere Suppressionsmechanismen während der akuten Phase eine Rolle spielen.

Antigenspezifische Treg können somit besser als polyklonale Treg aus Wildtypmäusen die Etablierung der chronischen Arthritisphase supprimieren, wohingegen die akute Arthritisphase von beiden Treg Populationen nur wenig oder gar nicht beeinflusst wird.

Die akute Phase einer OIA wird vorrangig durch TNF- $\alpha$  und Th1-Zellen, die chronische Phase dagegen durch IL-17 vermittelt. Stummvoll et al konnten bereits zeigen, dass Treg prinzipiell sowohl Th1- als auch Th17-Zellen supprimieren können (237). Aus diesem Grund soll in weitergehenden Experimenten untersucht werden, ob und in welchem Ausmaß Treg eine Th1- oder eine Th17-vermittelte Entzündung im OIA Modell unterdrücken können.

#### 4. Die Rolle von B-Zellen bei der OIA

Da, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, weder Th1- noch Th17-Zellen nach adoptivem Transfer eine chronische OIA induzieren können, stellte sich die Frage, ob die Anwesenheit anderer Zellpopulationen für diesen Prozess essentiell ist. Wie sich zeigte, sind B-Zellen für die Etablierung der chronischen OIA Phase essentiell. B-Zell-defiziente JHT-/- zeigen drei Wochen nach Arthritisinduktion keine Anzeichen einer chronischen Entzündung

(siehe Abb.28). Im Widerspruch dazu, wurde von Wong et al berichtet, dass B-Zellen bei der Induktion einer AIA keine Rolle spielen (77). Jedoch analysierten die Autoren dieser Studie die Kniegelenke vom B-Zell-defizienten  $\mu$ MT Mäusen bereits an Tag+7 nach Arthritisinduktion. Dieser Befund stimmt mit den Daten der vorgelegten Arbeit überein. Denn B-Zell-defiziente JHT-/- Mäuse bilden innerhalb der ersten Woche durchaus Symptome, die für die chronische Phase einer OIA typisch sind, aus, die an Tag+8 nach Induktion in 50% der Mäuse nachzuweisen sind. Jedoch entwickeln sich diese Symptome in Abwesenheit von B-Zellen innerhalb der nächsten zwei Wochen wieder zurück. Eine genauere kinetische Analyse des Arthritisverlaufes soll in Zukunft zeigen, ob alle B-Zell-defizienten Mäuse diese für die chronische Arthritisphase typischen Symptome ausbilden, denn am Analysetag+8 könnten in einem Teil der Mäuse die Symptome schon wieder zurückgegangen sein. Dass B-Zellen für die Ausbildung einer Arthritis in anderen murinen Arthritismodellen wichtig sind, wird durch verschiedene Berichte gestützt (154, 258).

In Übereinstimmung mit den Daten der T-Zell-Transfer-Experimente können T-Zellen auch in Abwesenheit von B-Zellen in jedem Fall eine akute Entzündung induzieren. Diese ist in allen JHT-/- Mäusen an Tag+8 noch detektierbar, einem Zeitpunkt, an dem die akute Entzündung schon antigenspezifisch vermittelt wird (siehe Abschnitt IV 3.1.1). In Abwesenheit von aktivierten B-Zellen können sogar für eine chronische Arthritisphase typische Symptome ausgebildet werden. Transferierte Th1- bzw. Th17-Zellen können jedoch keine chronischen Symptome induzieren (siehe Abschnitt IV 3.1.2). Dies lässt sich einerseits damit erklären, dass die Th-Zellen *in vitro* anders aktiviert wurden als *in vivo* und somit ihr pathogenes Potential nicht voll ausschöpfen können. Andererseits könnte auch noch eine dritte Zellpopulation, wie z.B. Makrophagen oder mesenchymale Zellen, an der Entstehung chronischer Symptome beteiligt sein. Diese dritte Zellpopulation könnte in JHT-/- Mäusen vorhanden sein, jedoch nicht oder nur unzureichend in den mit Th-Zellen transferierten Mäusen.

Auf welche Weise B-Zellen am Krankheitsgeschehen beteiligt sind, bleibt vorerst ungeklärt. Antikörper sind wahrscheinlich nur in geringem Maße an der Arthritisentwicklung im OIA Modell beteiligt, denn eine drastische Reduktion des antigenspezifischen Antikörpertiters hat weder in TNF- $\alpha$  defizienten Mäusen noch in Blimp1 defizienten CD19<sup>cre/wt</sup>Prdm1<sup>fl/fl</sup> Mäusen Auswirkungen auf die Entstehung einer chronischen OIA (siehe Abb.10+30). Van Lent et al konnten bereits zeigen, dass im AIA Modell Fc $\gamma$ -Rezeptoren für die Etablierung einer AIA wichtig sind, was Antikörpern eine bedeutende Rolle bei der Krankheitsentwicklung zuweist (259, 260). Denn über Fc $\gamma$ -Rezeptoren können aus Antigenen und Antikörpern bestehende

Immunkomplexe gebunden und internalisiert werden. Dies führt zur Aktivierung und Rekrutierung weiterer Zellen und somit zur Verstärkung der Entzündung (153). Jedoch waren die Unterschiede in der Ausprägung einer AIA zwischen Fc $\gamma$ -Rezeptor defizienten Mäusen und Wildtypmäusen äußerst gering. Lediglich die Arthritis in Mäusen, bei denen der inhibierende Fc $\gamma$ -RezeptorII ausgeschaltet wurde, war leicht stärker ausgeprägt als in Kontrollmäusen (259). In einer anderen Publikation wurden Mäuse, die eine Defizienz in der von allen Fc $\gamma$ -Rezeptoren gemeinsam genutzten Fc $\gamma$ -Kette aufweisen, untersucht. In diesen Mäusen wurden die AIA Symptome allerdings schon am Tag+7 nach AIA Induktion analysiert. Diese waren gegenüber den Symptomen in Kontrollmäusen etwas weniger stark ausgeprägt (260). Die Fc $\gamma$ -Kette ist allerdings auch für die Signalgebung anderer Moleküle, wie z.B. des CD3 Moleküls im TZR-Komplex wichtig. Deswegen kann man nicht ausschließen, dass die sichtbare weniger stark ausgeprägte Arthritis in Mäusen, die keine Fc $\gamma$ -Kette exprimieren, auf die Wirkung anderer Zellen zurückzuführen ist und nicht auf die Wirkung von Antikörpern.

Um auszuschließen, dass ein niedriger Titer von Antikörpern, die gegen gelenkspezifische Proteine gerichtet sind, für die Etablierung einer OIA von Bedeutung ist, sollen in zukünftigen Experimenten im Serum von OIA-kranken Mäusen kollagen- und proteoglykanspezifische Antikörpertiter bestimmt werden. Ebenfalls könnte eine Depletion von Plasmazellen darüber Aufschluss geben, ob Antikörper für die OIA Induktion eine Rolle spielen, denn im Modell der CIA sind zumindest IgM Moleküle für die Ausbildung einer Arthritis essentiell (261). Für eine geringere Bedeutung von Antikörpern bei der Vermittlung einer Arthritis spricht auch, dass viele Patienten durch eine Behandlung mit dem anti-CD20 Antikörper Rituximab eine deutliche Verbesserung der Krankheitssymptome einer Arthritis verspüren, denn hierbei werden alle B-Zellen, aber keine zu diesem Zeitpunkt bereits ausdifferenzierten antikörperproduzierenden Plasmazellen, die kein CD20 Molekül auf der Zelloberfläche tragen, depletiert (99, 112).

Von größerer Bedeutung für den Krankheitsverlauf einer Arthritis ist wohl eher die Funktion von B-Zellen, T-Zellen aktivieren und stimulieren zu können (64, 157, 262). Einige Veröffentlichungen zeugen deutlich, dass in anderen Krankheitsmodellen explizit die Fähigkeit der Antigenpräsentation von B-Zellen notwendig ist, um eine Krankheit zu induzieren (157, 263). Im Modell der OIA ist sowohl die Quantität der aktivierten T-Zellen als auch die Qualität der Stimulation von T-Zellen B-Zell-abhängig, denn der verringerte Anteil von antigenspezifischen Helfer-T-Zellen in B-Zell-defizienten Mäusen zeigt ebenfalls ein leicht verändertes Zytokinexpressionsmuster (siehe Abb.32). Joao et al haben bereits berichtet, dass JHT-/- Mäuse ein eingeschränktes T-Zell-Repertoire besitzen, zumindest was die  $\beta$ -Kette

des TZR betrifft (264, 265). Ob dieser Umstand Einfluss auf die Generierung von ovalbuminspezifischen T-Zellen hat, ist unklar.

Insgesamt erweisen sich B-Zellen, wahrscheinlich durch die Aktivierung bzw. Stimulation von T-Zellen, demnach als essentiell für die Aufrechterhaltung von chronischen OIA Symptomen, Sie sind aber an der Phase der akuten Entzündung nicht beteiligt.

## **5. Die induzierbare gelenkspezifische OVA-Expression in tet-LPOVA Mäusen**

### **5.1 Die antigen- und arthritisspezifische Toleranz in tet-LPOVA Mäusen**

Im Verlauf einer Ovalbumin-induzierten Arthritis erweist sich die Induktion der Krankheit in Form der intra-artikulären (i.a.) Injektion in das Kniegelenk der Mäuse als kritischer Schritt. Die Kniegelenkspalte einer Maus ist äußerst klein. Deshalb ist nicht auszuschließen, dass umliegendes Gewebe durch die i.a. Injektion verletzt wird. Außerdem führt alleine die Knieinjektion zu einer Entzündung des Gelenkbereiches, die allerdings nur ein bis drei Tage anhält und insofern schnell wieder zurückgeht. In der Tat ist die erste Entzündungsreaktion antigenunspezifisch und somit T-Zell-unabhängig (siehe Abschnitt IV 3.1.1). Um diese unspezifische Reaktion und den Schritt der i.a. Injektion zu umgehen, wurden am DRFZ genetisch veränderte Mäuse generiert, in denen durch Fütterung von Doxycyclin eine Expression von Ovalbumin in den Gelenkregionen induziert werden kann (123).

Überraschenderweise erwiesen sich tet-LPOVA Mäuse als resistent gegen die Ausbildung einer OIA, selbst für den Fall, dass das Antigen catOVA in das Kniegelenk der Mäuse injiziert wird (166). Die in den transgenen Mäusen induzierte Toleranz gegenüber der Ausbildung einer Arthritis ist antigenspezifisch, da tet-LPOVA Mäuse eine mBSA-vermittelte AIA entwickeln. Interessanterweise tritt die ausgebildete Toleranz allerdings nur bei einer induzierten Gelenkentzündung auf, da tet-LPOVA Mäuse eine robuste, durch Ovalbumin vermittelte DTH Reaktion im Fußgelenk ausbilden (siehe Abb.39). Eine vergleichbare organspezifische Toleranz wurde in der Literatur bisher noch nicht beschrieben.

Allerdings konnte von Eggena et al in einem anderen Tiermodell für Diabetes bereits gezeigt werden, dass sich bei einer ektopischen Expression von Ovalbumin eine Toleranz gegen eine OVA-induzierte Autoimmunreaktion entwickeln kann (266). Allerdings zeigt sich die Toleranz gegen eine Diabetesentwicklung in diesem Modell nur bei einem Transfer von OVA-spezifischen T-Zellen. Im Gegensatz zu tet-LPOVA Mäusen kann hier die Toleranz durch eine periphere Immunisierung mit OVA/CFA umgangen werden. Der Toleranzmechanismus beruht auf der Wirkung von endogenen Treg und wird durch das CTLA4 Molekül vermittelt, denn sowohl die Depletion von endogenen Th-Zellen des Wirtes als auch der Transfer von OVA-spezifischen Th-Zellen aus CTLA4 defizienten Mäusen kann die Toleranz aufheben (266).

Bisher konnte die Expression von Ovalbumin weder direkt noch indirekt in Chondrozyten bzw. umliegenden Geweben nachgewiesen werden. Eine Expression von Ovalbumin im Thymus konnte ausgeschlossen werden (166). Ebenso konnte von Dr. F. Hardung bereits gezeigt werden, dass in tet-LPOVA Mäuse transferierte OVA-spezifische Th-Zellen nicht proliferieren und somit nicht aktiviert werden (166). Dies deutet darauf hin, dass OVA nicht konstitutiv exprimiert wird und dadurch von APZ internalisiert und präsentiert werden kann.

Weder durch histologische Färbungen *in situ* noch durch Analyse der mRNA von Gelenkpräparationen mittels *Real-Time* PCR konnte im Verlauf dieser Arbeit eine Expression von Ovalbumin nachgewiesen werden, selbst wenn durch eine Fütterung mit dem Antibiotikum Doxycyclin eine Expression des Proteins direkt induziert wurde. Trotz dieses fehlenden Nachweises einer Ovalbuminexpression zeigen tet-LPOVA Mäuse gegen die Ausbildung einer OIA eine robuste reproduzierbare Toleranz, die völlig unabhängig von einer Fütterung mit Doxycyclin und somit unabhängig von einer induzierten Expression von OVA ist. Diese Toleranz bleibt somit vorerst der einzige indirekte Hinweis auf eine Expression von Ovalbumin in tet-LPOVA Mäusen. Allerdings bleiben der Zeitpunkt und der Ort der OVA Expression vorerst unbekannt.

## 5.2 Mögliche Toleranzmechanismen in tet-LPOVA Mäusen

### Die Rolle von Th-Zellen

Es stellte sich im weiteren Verlauf der Arbeit die Frage, wie die antigenspezifische und gelenkspezifische Toleranz in tet-LPOVA Mäusen vermittelt wird.

In einigen Veröffentlichungen wurde berichtet, dass von Chondrozyten ektoptisch exprimierte Proteine prinzipiell im Thymus präsentiert werden können (267). Dies kann zu einer Depletion der proteinspezifischen T-Zellen führen. Jedoch wurde in vorherigen Experimenten bereits gezeigt, dass in tet-LPOVA Mäusen ovalbuminspezifische Th-Zellen nicht depletiert werden (166). Tet-LPOVA Mäuse bilden nach einer Immunisierung mit OVA/CFA zwar eine gegenüber Wildtypmäusen reduzierte, aber dennoch eindeutig detektierbare Anzahl an OVA-spezifischen Th-Zellen aus. Die Toleranz ist also nicht auf einen generellen Defekt bei der Aktivierung von antigenspezifischen Th-Zellen zurückzuführen. Da die Zahl an OVA-spezifischen Th-Zellen in tet-LPOVA Mäusen jedoch reduziert ist, wäre es möglich, dass die vorhandene Menge an spezifischen Zellen zwar ausreicht, um eine DTH Reaktion im Fuß zu vermitteln, jedoch für eine Gelenkschwellung im Kniebereich eine größere Anzahl an spezifischen T-Zellen benötigt wird. Deshalb soll in weitergehenden Experimenten untersucht werden, ob nicht nur die akute Gelenkschwellung in OIA induzierten transgenen Tieren gegenüber Wildtyptieren verringert ist, sondern ob ebenfalls weniger akute granulozytäre Infiltrate innerhalb der ersten 7 Tage nach OIA Induktion nachgewiesen werden können. Da

die akute Entzündung einer OIA hauptsächlich durch Th-Zellen vermittelt wird (siehe Abschnitt IV 3.1.1), könnte dies einen wichtigen Hinweis darauf liefern, ob die verminderte Zahl an ovalbuminspezifischen Th-Zellen in den transgenen Mäusen zur Toleranzentwicklung beiträgt.

#### Die Rolle von B-Zellen

Da sich in tet-LPOVA Mäusen keine chronische Arthritis ausbildet, wäre auch ein Defekt bei der Aktivierung von OVA-spezifischen B-Zellen denkbar, da die Etablierung einer chronischen OIA eindeutig von der Anwesenheit von aktivierten B-Zellen abhängt, siehe Abschnitt IV 4. Jedoch konnten in den transgenen Tieren verglichen mit Wildtypmäuern normale oder lediglich leicht geringere OVA-spezifische Antikörpertiter detektiert werden. Dies zeigt, dass die Aktivierung von B-Zellen in den transgenen Mäusen ebenfalls kaum beeinträchtigt ist und zumindest die Anzahl an OVA-spezifischen Plasmazellen in transgenen Tieren und Wildtypmäuern vergleichbar ist. Allerdings können die leicht geringeren Antikörpertiter in tet-LPOVA Mäusen nicht zu der Toleranzinduktion beitragen, da Antikörper für die Ausbildung einer OIA kaum von Bedeutung sind, denn *Blimp1* defiziente *CD19<sup>cre/wt</sup>Prdm1<sup>fl/fl</sup>* Mäuse mit drastisch reduzierten Antikörpertitern und Wildtypmäuse mit hohen Titern entwickeln eine vergleichbar starke OIA (siehe Abschnitt IV 4). Allerdings kann bisher keine Aussage über die Anzahl an ovalbuminspezifischen B-Zellen in tet-LPOVA Mäusen getroffen werden. Dazu soll in zukünftigen Experimenten mithilfe eines an Fluorochrome gekoppelten Ovalbuminproteins die Frequenz an OVA-spezifischen B-Zellen in den Mäusen bestimmt werden.

Den vorliegenden Ergebnissen nach ist die OIA-spezifische Toleranz in den tet-LPOVA Mäusen nicht darin begründet, dass antigenspezifische T- und B-Zellen unzureichend aktiviert oder sogar depletiert werden bzw. in ungenügender Anzahl gebildet werden. Daher lässt sich vermuten, dass die Toleranz aktiv durch eine oder mehrere Zellpopulationen vermittelt wird. Der Ort der Suppression scheint essentiell wichtig zu sein, da die Toleranz spezifisch bei einer Entzündung im Kniegelenk jedoch nicht im Fußgelenk auftritt (siehe Abb.38+39). Möglich wäre, dass ein bestimmter Schwellenwert an suppressorischen Zellen erreicht werden muss, um die Toleranz zu vermitteln und dieser Schwellenwert für die einzelnen Entzündungsorte unterschiedlich hoch ist. Dabei könnte eine Rolle spielen, ob die die Toleranz vermittelnden Zellen vor Ort induziert werden oder in das entzündete Gewebe einwandern müssen.

#### Die Rolle von regulatorischen T-Zellen

Wie in Abb. 42 gezeigt, wird zumindest ein Teil der Toleranz durch CD4<sup>+</sup> T-Zellen vermittelt, da der Transfer von Th-Zellen aus tet-LPOVA Mäusen ausreicht, um sowohl die akute als auch die chronische Phase einer OIA in Wildtypmäusen abzumildern. Ob induzierte

regulatorische T-Zellen die Toleranz vermitteln bleibt vorerst unklar. Ein separater Transfer von CD4+CD25+ Th-Zellen soll in zukünftigen Experimenten die Rolle von natürlichen Treg näher bestimmen. Zusätzlich können die Expression von für eine Suppression wichtige Oberflächenmoleküle bzw. Zytokine, wie CTLA4, IL-10 und TGF- $\beta$ , in OVA-spezifischen Th-Zellen aus tet-LPOVA Mäusen bestimmt werden (39, 43). Dies könnte einen Hinweis darauf geben, ob OVA-spezifische T-Zellen während ihrer Entwicklung anders als andere T-Zellen stimuliert oder aktiviert werden.

Sollte die beobachtete Toleranz tatsächlich zumindest teilweise von regulatorischen T-Zellen vermittelt werden, stellt sich die Frage, warum diese Treg keine OVA-induzierte DTH Reaktion in tet-LPOVA Mäusen unterdrücken können. Dazu soll in zukünftigen Experimenten die Migrationsfähigkeit von T-Zellen aus tet-LPOVA Mäusen sowie deren Expression von migrationsrelevanten Oberflächenmolekülen näher untersucht werden, da eine Einwanderung in die Entzündungsstelle bzw. in den relevanten drainierenden Lymphknoten eine Voraussetzung für eine effektive Suppression sind (268, 269). Gleichzeitig soll die Frage beantwortet werden, ob CD4+ T-Zellen aus tet-LPOVA Mäusen nach adoptivem Transfer auch eine DTH Reaktion im Fuß von Wildtypmäusen supprimieren können.

Eine weitere Beobachtung spricht für eine Toleranzvermittlung durch Treg. Wie in den Abschnitten IV 3.1.1 und IV 4 diskutiert, wird die akute Phase einer OIA durch Th-Zellen vermittelt, die chronische Phase erfordert jedoch zusätzlich die Anwesenheit von B-Zellen. Weiterhin ist bekannt, dass Helfer-T-Zellen direkt oder indirekt das Hauptziel einer Suppression durch Treg sind (43). Da Th-Zellen aus transgenen Mäusen die akute Knieschwellung einer OIA in Wildtypmäusen vollständig unterdrücken können, jedoch die chronische OIA-Phase nur teilweise supprimieren, kann von einer Beteiligung von Treg an der Toleranzinduktion in tet-LPOVA Mäusen ausgegangen werden.

#### Die Rolle von Zellen mit hämatopoetischen Ursprung bei der Toleranzentwicklung

Überraschenderweise zeigte auch die Analyse einer OIA in Knochenmarkchimären, dass die Toleranz hauptsächlich durch das hämatopoetische Zellkompartiment vermittelt wird, denn durch Transfer von Knochenmark aus Wildtypmäusen in bestrahlte tet-LPOVA Rezipientenmäuse kann die Toleranz vollständig aufgehoben werden, wohingegen der Transfer von Knochenmark aus tet-LPOVA Mäusen in bestrahlte Wildtypmäuse zu einer weniger stark ausgeprägten Arthritis führt (siehe Abb.42). Dieses Ergebnis ist in so fern überraschend, als dass Ovalbumin nicht von hämatopoetischen Zellen exprimiert werden sollte, sondern, unter transkriptioneller Regulation des Kollagen2-Promotors stehend, ausschließlich von Chondrozyten, die einen nicht-hämatopoetischen Ursprung haben.

### Die Rolle von Zellen mit nicht-hämatopoetischen Ursprung bei der Toleranzentwicklung

Es kann allerdings auch ein Beitrag von nicht-hämatopoetischen Zellen zur Toleranzvermittlung nicht ausgeschlossen werden. Zum einen können Th-Zellen aus tet-LPOVA Mäusen eine chronische OIA in Wildtypmäusen nur teilweise unterdrücken. Andererseits führt auch der Transfer von Knochenmark aus tet-LPOVA Mäusen in bestrahlte Wildtypmäuse nur zu einer teilweisen Verringerung der OIA Symptome, die immer noch stärker ausgeprägt sind als in tet-LPOVA Mäusen, die mit Knochenmark aus tet-LPOVA Mäusen rekonstituiert wurden (siehe Abb.43). Dies deutet darauf hin, dass sowohl hämatopoetische Zellen als auch Zellen mit nicht-hämatopoetischen Ursprung an der Toleranzvermittlung in tet-LPOVA Mäusen beteiligt sind. Von mesenchymalen Zellen ist bekannt, dass sie unter bestimmten Stimulationsbedingungen, wie z.B. einer Stimulation mit IFN- $\gamma$ , MHCII Moleküle exprimieren können (270, 271). Da sie gleichzeitig nur wenige Kostimulationsmoleküle auf ihrer Oberfläche tragen, könnten nicht-hämatopoetische Zellen durch Präsentation von Ovalbumin in T-Zellen Anergie oder Apoptose induzieren.

Um allerdings statistisch abgesicherte Aussagen über den Beitrag der einzelnen Zellpopulationen zur Toleranzvermittlung treffen zu können, soll das Experiment mit Knochenmarkchimären wiederholt werden.

Die Toleranz in den OVA-transgenen Tieren wird den vorliegenden Ergebnissen zufolge hauptsächlich von Treg vermutlich aber auch von nicht-hämatopoetischen Zellen vermittelt. Um den genauen Mechanismus der antigen- und arthritisspezifischen Toleranz in tet-LPOVA Mäusen aufzuklären, müssen allerdings noch weitere Experimente durchgeführt werden. Dies ist auch im Hinblick auf eine mögliche Therapie bei der humanen RA wünschenswert, sollte sich dieser sehr spezifische Suppressionsmechanismus bei der Bekämpfung von pathogenen Th-Zellen bei der RA nutzen lassen.

## Zusammenfassung

Die Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine häufig auftretende schwere Erkrankung mit autoimmunem Charakter, die durch eine chronische Entzündung von Gelenken zur irreparablen Zerstörung von Knochen- und Knorpelschichten führt. Trotz bereits erfolgreich angewandter Immuntherapien sind die genaue Ursache der Erkrankung und der Beitrag einzelner Zellpopulationen an der Krankheitsentstehung weiterhin unklar. Außerdem sind nicht alle RA Patienten für die vorhandenen Therapieformen gleichermaßen zugänglich. Um neue Therapien mit möglichst wenigen Nebenwirkungen und größerer Effizienz zu entwickeln, erfolgte in der vorliegenden Arbeit eine differenzierte Analyse des Beitrages einzelner Zellpopulationen an der Ausbildung einer Arthritis.

Dazu wurde ein neues vorklinisches murines Modell, die Ovalbumin-induzierte Arthritis (OIA), etabliert. Eine OIA wird nach zweimaliger Immunisierung durch eine Injektion von Ovalbumin (OVA) in ein Kniegelenk einer Maus induziert. Zunächst bildet sich eine akute Entzündung im induzierten Kniegelenk, die durch eine Schwellung des Gelenkes und durch Infiltrate von neutrophilen Granulozyten gekennzeichnet ist. Die Chronifizierung der Gelenkentzündung zeichnet sich dann durch Infiltrate von mononuklearen Zellen, die Aktivierung von Fibroblastenzellen und schließlich durch Knochen- und Knorpeldestruktionen aus. Dieses Modell bietet den Vorteil, durch adoptiven Transfer von potentiell pathogenen oder protektiven ovalbuminspezifischen Helfer-T-(Th)-Zellen den Beitrag von verschiedenen Th-Zell-Populationen an der Entstehung einer Arthritis zu bestimmen.

Im Verlauf der Arbeit konnte festgestellt werden, dass die akute Phase einer OIA wesentlich durch das pro-inflammatorische Zytokin TNF- $\alpha$ , die chronische Phase einer OIA jedoch unabhängig von TNF- $\alpha$  durch pro-inflammatorisches IL-17 vermittelt wird. Das Th1-Zytokin IFN- $\gamma$  spielt im OIA Modell nur eine geringe anti-inflammatorische Rolle.

*In vitro* generierte Th17-Zellen, die TNF- $\alpha$  und IL-17 produzieren, können nach adoptivem Transfer allerdings weder eine induzierte OIA verschlimmern noch selbst eine chronische OIA verursachen. Ähnlich wie vergleichsweise untersuchte IFN- $\gamma$ + / TNF- $\alpha$ + Th1-Zellen können Th17-Zellen allerdings die akute Phase einer OIA in Form von granulozytären Infiltraten induzieren. Jedoch im Gegensatz zu Th1-Zellen können Th17-Zellen weder im OIA Modell noch im Entzündungsmodell der DTH eine akute Schwellung der Entzündungsstelle verursachen. Damit in Zusammenhang stehend konnte gezeigt werden, dass die migrationsrelevanten Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR3 von Th1- aber nicht von *in vitro* generierten Th17-Zellen exprimiert werden, welche damit übereinstimmend 2-3-mal schlechter in entzündete Gewebe einwandern als Th1-Zellen.

Für die Etablierung einer chronischen OIA benötigen Th-Zellen die Hilfe von B-Zellen, denn in B-Zell-defizienten Mäusen kann sich zwar eine akute jedoch keine chronische OIA entwickeln.

Dabei scheint die Fähigkeit von B-Zellen, T-Zellen zu aktivieren, wichtig zu sein, wohingegen die Produktion von Antikörpern entbehrlich ist, denn selbst wenn die Antikörpertiter drastisch erniedrigt sind, entwickelt sich eine schwere OIA.

Um den kritischen Schritt der Knieinjektion bei der OIA-Induktion zu umgehen, wurden am DRFZ transgene Mäuse generiert, bei denen eine Ovalbuminexpression in den Gelenken induziert werden kann (tet-LPOVA Mäuse). Diese Mäuse entwickeln jedoch eine antigen- und gelenkspezifische Toleranz gegen eine OIA. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass sich die Toleranz entwickelt, obwohl sowohl ovalbuminspezifische T-Zellen als auch B-Zellen in tet-LPOVA Mäusen aktiviert werden, wenn auch in geringerer Zahl verglichen mit Wildtypmäusen. An der Toleranzausbildung sind hauptsächlich Th-Zellen, aber auch nicht-hämatopoetische mesenchymale Zellen beteiligt, wie Versuche mit Knochenmarkchimären zeigen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bieten einerseits ein neues vorklinisches Tiermodell für RA an, indem die Wirksamkeit zukünftiger Medikamente innerhalb einer chronischen Entzündung ohne Beeinflussung des zentralen pro-inflammatorischen Zytokins TNF- $\alpha$  überprüft werden kann. Außerdem zeigen die Ergebnisse deutlich, dass Th-Zellen im Tiermodell der Ovalbumin-induzierten Arthritis zwar eine akute Entzündung vermitteln können. Für die Etablierung einer durch IL-17 vermittelten chronischen Arthritis dagegen benötigen sie die Hilfe von B-Zellen, die durch Antigenpräsentation bzw. Aktivierung von Th-Zellen, jedoch nicht durch die Produktion von Antikörpern, für eine Chronifizierung der Arthritis essentiell sind.

## Summary

Rheumatoid Arthritis (RA) is a frequent severe autoimmune disease which is characterised by chronic joint inflammations resulting in irreparable bone and cartilage destructions. Despite different current effective therapies, the origin of RA and the input of diverse cell types to the disease development are still unknown. Moreover, many RA patients do not respond to current therapeutic approaches. To develop new possible therapies with fewer side effects and high efficacy, the present thesis answered the question of the input of different T cell populations to arthritis onset and progression.

For this purpose, a new pre-clinical murine arthritis model, the Ovalbumin-induced Arthritis (OIA), was established. Here, after two subcutaneous immunisations, the OIA is induced by an intra-articular (i.a.) OVA injection in one particular knee joint. First, an acute inflammation of the affected joint characterised by infiltrations of granulocytes and swelling of the joint is rising. Afterwards, a chronic arthritis which is characterised by infiltration of mononuclear cells, activation of fibroblasts, hyperplasia of the synovial membrane and finally destruction of bone and cartilage is developing. By using the OIA model it was possible to analyse the input of Helper T cells (Th cells) to arthritis progression by adoptive transfer of OVA specific Th cells. The data of the present thesis clearly show that the acute and the chronic OIA phase are mainly mediated by the pro-inflammatory cytokine TNF- $\alpha$  and IL-17, respectively. The Th1 associated cytokine IFN- $\gamma$  do not contribute to disease development but rather act anti-inflammatory.

Surprisingly, *in vitro* differentiated Th17 cells, which express IL-17 as well as TNF- $\alpha$ , can neither exacerbate an established disease nor induce a chronic OIA by themselves after adoptive transfer. However, similar to IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  expressing Th1 cells, Th17 cells are able to induce acute granulocyte infiltrations. But in contrast to Th1 cells, Th17 cells cannot induce a swelling of the inflamed site neither in the OIA nor in the DTH model, which is a model for acute inflammation. Supporting this, the data show that Th1 cells express the important migratory chemokine receptors CCR5 and CXCR3 but Th17 cells do not, resulting in a two to three times weaker migratory behaviour of Th17 cells into inflamed sites in comparison to Th1 cells.

For inducing a chronic OIA, Th cells need the help of B cells which appear to be essential for establishing chronic arthritis symptoms. Antibody production by B cells is of minor importance for disease progression, because even in mice with drastically reduced antibody titers a severe OIA develops. Possibly, B cells are necessary to stimulate T cells e.g. via MHC class II, for Th cell activation is clearly hampered in B cell deficient mice.

To circumvent the most critical step of the OIA protocol, namely the i.a. OVA injection, transgenic mice (tet-LPOVA) were generated at the DRFZ by our cooperation partners. OVA

expression in joints can be induced in these mice by simply feeding the antibiotics doxycyclin, which should make the i.a. injection dispensable. Surprisingly, tet-LPOVA mice are protected from OIA development showing an antigen and joint specific tolerance for the induction of arthritis, even if OVA is injected i.a. in one knee joint. Tet-LPOVA mice are resistant to OIA development in spite of slightly reduced but clearly detectable numbers of activated OVA specific Th cells and B cells. The data of this thesis suggest that the tolerance in tet-LPOVA mice is mainly mediated by Th cells but an influence of non-hematopoietic cells cannot be excluded.

The results of the present thesis first suggest a new pre-clinical animal model for human RA which can be used for analysing the efficacy of new anti-arthritis drugs without any influence of TNF- $\alpha$  mediated pro-inflammatory functions. Also, the data suggest that Th cells can induce acute inflammations mediated by TNF- $\alpha$ . But, to induce IL-17 mediated chronic arthritis B cells are necessary, rather for antigen presentation than for antibody production.

## V Literaturverzeichnis

1. Cher, D. J., and T. R. Mosmann. 1987. Two types of murine helper T cell clone. II. Delayed-type hypersensitivity is mediated by TH1 clones. *J Immunol* 138:3688-3694.
2. Cherwinski, H. M., J. H. Schumacher, K. D. Brown, and T. R. Mosmann. 1987. Two types of mouse helper T cell clone. III. Further differences in lymphokine synthesis between Th1 and Th2 clones revealed by RNA hybridization, functionally monospecific bioassays, and monoclonal antibodies. *J Exp Med* 166:1229-1244.
3. Mosmann, T. R., H. Cherwinski, M. W. Bond, M. A. Giedlin, and R. L. Coffman. 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136:2348-2357.
4. Dong, C., and R. A. Flavell. 2001. Th1 and Th2 cells. *Curr Opin Hematol* 8:47-51.
5. Glimcher, L. H., and K. M. Murphy. 2000. Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up. *Genes Dev* 14:1693-1711.
6. Dong, C. 2008. TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. *Nat Rev Immunol* 8:337-348.
7. Veldhoen, M., R. J. Hocking, C. J. Atkins, R. M. Locksley, and B. Stockinger. 2006. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 24:179-189.
8. Bettelli, E., Y. Carrier, W. Gao, T. Korn, T. B. Strom, M. Oukka, H. L. Weiner, and V. K. Kuchroo. 2006. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441:235-238.
9. Mangan, P. R., L. E. Harrington, D. B. O'Quinn, W. S. Helms, D. C. Bullard, C. O. Elson, R. D. Hatton, S. M. Wahl, T. R. Schoeb, and C. T. Weaver. 2006. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 441:231-234.
10. Lockhart, E., A. M. Green, and J. L. Flynn. 2006. IL-17 production is dominated by gamma delta T cells rather than CD4 T cells during Mycobacterium tuberculosis infection. *J Immunol* 177:4662-4669.
11. Bettelli, E., T. Korn, M. Oukka, and V. K. Kuchroo. 2008. Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature* 453:1051-1057.
12. Happel, K. I., P. J. Dubin, M. Zheng, N. Ghilardi, C. Lockhart, L. J. Quinton, A. R. Odden, J. E. Shellito, G. J. Bagby, S. Nelson, and J. K. Kolls. 2005. Divergent roles of IL-23 and IL-12 in host defense against Klebsiella pneumoniae. *J Exp Med* 202:761-769.
13. Rudner, X. L., K. I. Happel, E. A. Young, and J. E. Shellito. 2007. Interleukin-23 (IL-23)-IL-17 cytokine axis in murine Pneumocystis carinii infection. *Infect Immun* 75:3055-3061.
14. Huang, W., L. Na, P. L. Fidel, and P. Schwarzenberger. 2004. Requirement of interleukin-17A for systemic anti-Candida albicans host defense in mice. *J Infect Dis* 190:624-631.
15. Caruso, R., F. Pallone, and G. Monteleone. 2007. Emerging role of IL-23/IL-17 axis in H pylori-associated pathology. *World J Gastroenterol* 13:5547-5551.
16. Harrington, L. E., R. D. Hatton, P. R. Mangan, H. Turner, T. L. Murphy, K. M. Murphy, and C. T. Weaver. 2005. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 6:1123-1132.
17. Park, H., Z. Li, X. O. Yang, S. H. Chang, R. Nurieva, Y. H. Wang, Y. Wang, L. Hood, Z. Zhu, Q. Tian, and C. Dong. 2005. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 6:1133-1141.
18. Ivanov, I., B. S. McKenzie, L. Zhou, C. E. Tadokoro, A. Lepelletier, J. J. Lafaille, D. J. Cua, and D. R. Littman. 2006. The orphan nuclear receptor RORgamma directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 126:1121-1133.
19. Yang, X. O., B. P. Pappu, R. Nurieva, A. Akimzhanov, H. S. Kang, Y. Chung, L. Ma, B. Shah, A. D. Panopoulos, K. S. Schluns, S. S. Watowich, Q. Tian, A. M. Jetten, and C.

- Dong. 2008. T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma. *Immunity* 28:29-39.
20. Stockinger, B., and M. Veldhoen. 2007. Differentiation and function of Th17 T cells. *Curr Opin Immunol* 19:281-286.
  21. Harrington, L. E., P. R. Mangan, and C. T. Weaver. 2006. Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage. *Curr Opin Immunol* 18:349-356.
  22. Weaver, C. T., L. E. Harrington, P. R. Mangan, M. Gavrieli, and K. M. Murphy. 2006. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity* 24:677-688.
  23. Brennan, F., and J. Beech. 2007. Update on cytokines in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 19:296-301.
  24. Ouyang, W., J. K. Kolls, and Y. Zheng. 2008. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity* 28:454-467.
  25. McInnes, I. B., and G. Schett. 2007. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol* 7:429-442.
  26. Furuzawa-Carballeda, J., M. I. Vargas-Rojas, and A. R. Cabral. 2007. Autoimmune inflammation from the Th17 perspective. *Autoimmun Rev* 6:169-175.
  27. Pfeffer, K. 2003. Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 14:185-191.
  28. Schroder, K., M. J. Sweet, and D. A. Hume. 2006. Signal integration between IFN-gamma and TLR signalling pathways in macrophages. *Immunobiology* 211:511-524.
  29. Tellides, G., D. A. Tereb, N. C. Kirkiles-Smith, R. W. Kim, J. H. Wilson, J. S. Schechner, M. I. Lorber, and J. S. Pober. 2000. Interferon-gamma elicits arteriosclerosis in the absence of leukocytes. *Nature* 403:207-211.
  30. Choy, E. H., and G. S. Panayi. 2001. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 344:907-916.
  31. Horai, R., A. Nakajima, K. Habiro, M. Kotani, S. Nakae, T. Matsuki, A. Nambu, S. Saijo, H. Kotaki, K. Sudo, A. Okahara, H. Tanioka, T. Ikuse, N. Ishii, P. L. Schwartzberg, R. Abe, and Y. Iwakura. 2004. TNF-alpha is crucial for the development of autoimmune arthritis in IL-1 receptor antagonist-deficient mice. *J Clin Invest* 114:1603-1611.
  32. Kofler, S., T. Nickel, and M. Weis. 2005. Role of cytokines in cardiovascular diseases: a focus on endothelial responses to inflammation. *Clin Sci (Lond)* 108:205-213.
  33. Schett, G. 2008. Review: Immune cells and mediators of inflammatory arthritis. *Autoimmunity* 41:224-229.
  34. Sutton, C., C. Brereton, B. Keogh, K. H. Mills, and E. C. Lavelle. 2006. A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 203:1685-1691.
  35. Nishimoto, N. 2006. Interleukin-6 in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 18:277-281.
  36. Ishihara, K., and T. Hirano. 2002. IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 13:357-368.
  37. Fong, T. A., and T. R. Mosmann. 1989. The role of IFN-gamma in delayed-type hypersensitivity mediated by Th1 clones. *J Immunol* 143:2887-2893.
  38. Feuerer, M., K. Eulenburg, C. Loddenkemper, A. Hamann, and J. Huehn. 2006. Self-limitation of Th1-mediated inflammation by IFN-gamma. *J Immunol* 176:2857-2863.
  39. Gupta, S., W. Shang, and Z. Sun. 2008. Mechanisms regulating the development and function of natural regulatory T cells. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 56:85-102.
  40. Pasquali, L., N. Giannoukakis, and M. Trucco. 2008. Induction of immune tolerance to facilitate beta cell regeneration in type 1 diabetes. *Adv Drug Deliv Rev* 60:106-113.
  41. Miao, C. H. 2007. Recent advances in immune modulation. *Curr Gene Ther* 7:391-402.
  42. Ito, T., S. Hanabuchi, Y. H. Wang, W. R. Park, K. Arima, L. Bover, F. X. Qin, M. Gilliet, and Y. J. Liu. 2008. Two functional subsets of FOXP3+ regulatory T cells in human thymus and periphery. *Immunity* 28:870-880.

43. Vignali, D. A., L. W. Collison, and C. J. Workman. 2008. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* 8:523-532.
44. Nguyen, L. T., J. Jacobs, D. Mathis, and C. Benoist. 2007. Where FoxP3-dependent regulatory T cells impinge on the development of inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* 56:509-520.
45. Sarkar, S., and D. A. Fox. 2008. Regulatory T cells in rheumatoid arthritis. *Curr Rheumatol Rep* 10:405-412.
46. Rutz, S., M. Janke, N. Kassner, T. Hohnstein, M. Krueger, and A. Scheffold. 2008. Notch regulates IL-10 production by T helper 1 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:3497-3502.
47. Choy, E. H. 2000. Oral toleragens in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Investig Drugs* 1:58-62.
48. Lack, G. 2007. The concept of oral tolerance induction to foods. *Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program* 59:63-68; discussion 68-72.
49. Burks, A. W., S. Laubach, and S. M. Jones. 2008. Oral tolerance, food allergy, and immunotherapy: implications for future treatment. *J Allergy Clin Immunol* 121:1344-1350.
50. Santamaria, P. 2001. Effector lymphocytes in autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 13:663-669.
51. Falcone, M., and N. Sarvetnick. 1999. Cytokines that regulate autoimmune responses. *Curr Opin Immunol* 11:670-676.
52. Dighiero, G., and N. R. Rose. 1999. Critical self-epitopes are key to the understanding of self-tolerance and autoimmunity. *Immunol Today* 20:423-428.
53. Yung, R. L., and A. Julius. 2008. Epigenetics, aging, and autoimmunity. *Autoimmunity* 41:329-335.
54. Nikoopour, E., J. A. Schwartz, and B. Singh. 2008. Therapeutic benefits of regulating inflammation in autoimmunity. *Inflamm Allergy Drug Targets* 7:203-210.
55. Martin, R., N. H. Ruddle, S. Reingold, and D. A. Hafler. 1998. T helper cell differentiation in multiple sclerosis and autoimmunity. *Immunol Today* 19:495-498.
56. Lopez-Diego, R. S., and H. L. Weiner. 2008. Novel therapeutic strategies for multiple sclerosis--a multifaceted adversary. *Nat Rev Drug Discov* 7:909-925.
57. Goronzy, J. J., and C. M. Weyand. 2005. Rheumatoid arthritis. *Immunol Rev* 204:55-73.
58. Feldmann, M. 2001. Pathogenesis of arthritis: recent research progress. *Nat Immunol* 2:771-773.
59. Wu, X., F. Shih, and J. P. Atkinson. 2007. Systemic humoral autoimmunity but joint-specific inflammation: the syndrome of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 56:2823-2828.
60. Sanchez-Pernaute, O., C. Ospelt, M. Neidhart, and S. Gay. 2008. Epigenetic clues to rheumatoid arthritis. *J Autoimmun* 30:12-20.
61. Pope, R. M. 1996. Rheumatoid arthritis: pathogenesis and early recognition. *Am J Med* 100:3S-9S.
62. Benoist, C., and D. Mathis. 2000. A revival of the B cell paradigm for rheumatoid arthritis pathogenesis? *Arthritis Res* 2:90-94.
63. Grassi, W., R. De Angelis, G. Lamanna, and C. Cervini. 1998. The clinical features of rheumatoid arthritis. *Eur J Radiol* 27 Suppl 1:S18-24.
64. Panayi, G. S. 2005. B cells: a fundamental role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis? *Rheumatology (Oxford)* 44 Suppl 2:ii3-ii7.
65. Holers, V. M. 2007. Antibodies to citrullinated proteins: pathogenic and diagnostic significance. *Curr Rheumatol Rep* 9:396-400.
66. Klareskog, L., M. Widhe, M. Hermansson, and J. Ronnelid. 2008. Antibodies to citrullinated proteins in arthritis: pathology and promise. *Curr Opin Rheumatol* 20:300-305.

67. Bennett, J. C. 2008. The role of T lymphocytes in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Arthritis Rheum* 58:S53-57.
68. Bennett, S. R., M. T. Falta, J. Bill, and B. L. Kotzin. 2003. Antigen-specific T cells in rheumatoid arthritis. *Curr Rheumatol Rep* 5:255-263.
69. Sekine, T., T. Kato, K. Masuko-Hongo, H. Nakamura, S. Yoshino, K. Nishioka, and K. Yamamoto. 1999. Type II collagen is a target antigen of clonally expanded T cells in the synovium of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 58:446-450.
70. Sakaguchi, S., and N. Sakaguchi. 2005. Animal models of arthritis caused by systemic alteration of the immune system. *Curr Opin Immunol* 17:589-594.
71. Cho, Y. G., M. L. Cho, S. Y. Min, and H. Y. Kim. 2007. Type II collagen autoimmunity in a mouse model of human rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* 7:65-70.
72. Mikecz, K., T. T. Glant, E. Buzas, and A. R. Poole. 1990. Proteoglycan-induced polyarthritis and spondylitis adoptively transferred to naive (nonimmunized) BALB/c mice. *Arthritis Rheum* 33:866-876.
73. Howson, P., N. Shepard, and N. Mitchell. 1986. The antigen induced arthritis model: the relevance of the method of induction to its use as a model of human disease. *J Rheumatol* 13:379-390.
74. Brackertz, D., G. F. Mitchell, and I. R. Mackay. 1977. Antigen-induced arthritis in mice. I. Induction of arthritis in various strains of mice. *Arthritis Rheum* 20:841-850.
75. Brackertz, D., G. F. Mitchell, M. A. Vadas, and I. R. Mackay. 1977. Studies on antigen-induced arthritis in mice. III. Cell and serum transfer experiments. *J Immunol* 118:1645-1648.
76. Brackertz, D., G. F. Mitchell, M. A. Vadas, I. R. Mackay, and J. F. Miller. 1977. Studies on antigen-induced arthritis in mice. II. Immunologic correlates of arthritis susceptibility in mice. *J Immunol* 118:1639-1644.
77. Wong, P. K., J. M. Quinn, N. A. Sims, A. van Nieuwenhuijze, I. K. Campbell, and I. P. Wicks. 2006. Interleukin-6 modulates production of T lymphocyte-derived cytokines in antigen-induced arthritis and drives inflammation-induced osteoclastogenesis. *Arthritis Rheum* 54:158-168.
78. Murphy, K. M., A. B. Heimberger, and D. Y. Loh. 1990. Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4+CD8+TCR $\alpha$  thymocytes in vivo. *Science* 250:1720-1723.
79. Bankhurst, A. D., G. Husby, and R. C. Williams, Jr. 1976. Predominance of T cells in the lymphocytic infiltrates of synovial tissues in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 19:555-562.
80. Toh, M. L., and P. Miossec. 2007. The role of T cells in rheumatoid arthritis: new subsets and new targets. *Curr Opin Rheumatol* 19:284-288.
81. Aarvak, T., and J. B. Natvig. 2001. Cell-cell interactions in synovitis: antigen presenting cells and T cell interaction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 3:13-17.
82. Brand, D. D., A. H. Kang, and E. F. Rosloniec. 2003. Immunopathogenesis of collagen arthritis. *Springer Semin Immunopathol* 25:3-18.
83. Schubert, D., B. Maier, L. Morawietz, V. Krenn, and T. Kamradt. 2004. Immunization with glucose-6-phosphate isomerase induces T cell-dependent peripheral polyarthritis in genetically unaltered mice. *J Immunol* 172:4503-4509.
84. Williams, R. O., L. Marinova-Mutafchieva, M. Feldmann, and R. N. Maini. 2000. Evaluation of TNF-alpha and IL-1 blockade in collagen-induced arthritis and comparison with combined anti-TNF-alpha/anti-CD4 therapy. *J Immunol* 165:7240-7245.
85. Ranges, G. E., S. Sriram, and S. M. Cooper. 1985. Prevention of type II collagen-induced arthritis by in vivo treatment with anti-L3T4. *J Exp Med* 162:1105-1110.
86. Nissler, K., D. Pohlers, M. Huckel, J. Simon, R. Brauer, and R. W. Kinne. 2004. Anti-CD4 monoclonal antibody treatment in acute and early chronic antigen induced arthritis: influence on macrophage activation. *Ann Rheum Dis* 63:1470-1477.

87. Pohlers, D., K. Nissler, O. Frey, J. Simon, P. K. Petrow, R. W. Kinne, and R. Brauer. 2004. Anti-CD4 monoclonal antibody treatment in acute and early chronic antigen-induced arthritis: influence on T helper cell activation. *Clin Exp Immunol* 135:409-415.
88. Wendling, D., E. Racadot, J. Wijdenes, J. Sibia, R. M. Flipo, A. Cantagrel, P. Miossec, J. P. Eschard, M. Macro, P. Bertin, F. Liote, F. Debiais, R. Juvin, P. Le Goff, and C. Masson. 1998. A randomized, double blind, placebo controlled multicenter trial of murine anti-CD4 monoclonal antibody therapy in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 25:1457-1461.
89. Choy, E. H., G. S. Panayi, P. Emery, S. Madden, F. C. Breedveld, M. C. Kraan, J. R. Kalden, A. Rascu, J. C. Brown, N. Rapson, and J. M. Johnston. 2002. Repeat-cycle study of high-dose intravenous 4162W94 anti-CD4 humanized monoclonal antibody in rheumatoid arthritis. A randomized placebo-controlled trial. *Rheumatology (Oxford)* 41:1142-1148.
90. Hasler, P. 2006. Biological therapies directed against cells in autoimmune disease. *Springer Semin Immunopathol* 27:443-456.
91. Feldmann, M., F. M. Brennan, and R. N. Maini. 1996. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol* 14:397-440.
92. Asquith, D. L., and I. B. McInnes. 2007. Emerging cytokine targets in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 19:246-251.
93. Teitelbaum, S. L., and F. P. Ross. 2003. Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet* 4:638-649.
94. Ritchlin, C. T., S. A. Haas-Smith, P. Li, D. G. Hicks, and E. M. Schwarz. 2003. Mechanisms of TNF-alpha- and RANKL-mediated osteoclastogenesis and bone resorption in psoriatic arthritis. *J Clin Invest* 111:821-831.
95. Sato, K., A. Suematsu, K. Okamoto, A. Yamaguchi, Y. Morishita, Y. Kadono, S. Tanaka, T. Kodama, S. Akira, Y. Iwakura, D. J. Cua, and H. Takayanagi. 2006. Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J Exp Med* 203:2673-2682.
96. Loeser, R. F. 2006. Molecular mechanisms of cartilage destruction: mechanics, inflammatory mediators, and aging collide. *Arthritis Rheum* 54:1357-1360.
97. Kamradt, T., and D. Schubert. 2005. The role and clinical implications of G6PI in experimental models of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 7:20-28.
98. Looney, R. J., J. Anolik, and I. Sanz. 2004. B cells as therapeutic targets for rheumatic diseases. *Curr Opin Rheumatol* 16:180-185.
99. Keystone, E. C. 2005. B cells in rheumatoid arthritis: from hypothesis to the clinic. *Rheumatology (Oxford)* 44 Suppl 2:ii8-ii12.
100. Szekanecz, Z., and A. E. Koch. 2007. Macrophages and their products in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 19:289-295.
101. Hamilton, J. A. 2008. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 8:533-544.
102. Morand, E. F. 2007. Effects of glucocorticoids on inflammation and arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 19:302-307.
103. Kirwan, J. R. 2001. Systemic low-dose glucocorticoid treatment in rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 27:389-403, ix-x.
104. Siddiqui, M. A. 2007. The efficacy and tolerability of newer biologics in rheumatoid arthritis: best current evidence. *Curr Opin Rheumatol* 19:308-313.
105. Schett, G., C. Stach, J. Zwerina, R. Voll, and B. Manger. 2008. How antirheumatic drugs protect joints from damage in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 58:2936-2948.
106. Valesini, G., C. Iannuccelli, E. Marocchi, L. Pascoli, V. Scalzi, and M. Di Franco. 2007. Biological and clinical effects of anti-TNFalpha treatment. *Autoimmun Rev* 7:35-41.
107. Chang, J., and L. Girgis. 2007. Clinical use of anti-TNF-alpha biological agents--a guide for GPs. *Aust Fam Physician* 36:1035-1038.

108. Erickson, A. R., and T. R. Mikuls. 2007. Switching anti-TNF-alpha agents: what is the evidence? *Curr Rheumatol Rep* 9:416-420.
109. Alonso-Ruiz, A., J. I. Pijoan, E. Ansuategui, A. Urkaregi, M. Calabozo, and A. Quintana. 2008. Tumor necrosis factor alpha drugs in rheumatoid arthritis: systematic review and metaanalysis of efficacy and safety. *BMC Musculoskelet Disord* 9:52.
110. Kristensen, L. E., R. Christensen, H. Bliddal, P. Geborek, B. Danneskiold-Samsøe, and T. Saxne. 2007. The number needed to treat for adalimumab, etanercept, and infliximab based on ACR50 response in three randomized controlled trials on established rheumatoid arthritis: a systematic literature review. *Scand J Rheumatol* 36:411-417.
111. Lin, J., D. Ziring, S. Desai, S. Kim, M. Wong, Y. Korin, J. Braun, E. Reed, D. Gjertson, and R. R. Singh. 2008. TNFalpha blockade in human diseases: an overview of efficacy and safety. *Clin Immunol* 126:13-30.
112. Silverman, G. J. 2006. Therapeutic B cell depletion and regeneration in rheumatoid arthritis: emerging patterns and paradigms. *Arthritis Rheum* 54:2356-2367.
113. Dorner, T., and G. R. Burmester. 2008. New approaches of B-cell-directed therapy: beyond rituximab. *Curr Opin Rheumatol* 20:263-268.
114. Shanahan, J. C., L. W. Moreland, and R. H. Carter. 2003. Upcoming biologic agents for the treatment of rheumatic diseases. *Curr Opin Rheumatol* 15:226-236.
115. Finckh, A., and C. Gabay. 2008. At the horizon of innovative therapy in rheumatology: new biologic agents. *Curr Opin Rheumatol* 20:269-275.
116. Fink, M. A., G. D. Snell, and D. Kelton. 1953. Demonstration of antibody in strain BALB/c mice to homologous tumor S621 by the use of two technics; anaphylaxis and tumor regression. *Cancer Res* 13:666-671.
117. Snell, G. D., and P. R. Borges. 1953. Determination of the histocompatibility locus involved in the resistance of mice of strains C57BL/10-x, C57BL/6-x, and C57BL/6Ks to C57BL tumors. *J Natl Cancer Inst* 14:481-484.
118. Blanas, E., and W. R. Heath. 1999. Oral administration of antigen can lead to the onset of autoimmune disease. *Int Rev Immunol* 18:217-228.
119. Finotto, S., M. F. Neurath, J. N. Glickman, S. Qin, H. A. Lehr, F. H. Green, K. Ackerman, K. Haley, P. R. Galle, S. J. Szabo, J. M. Drazen, G. T. De Sanctis, and L. H. Glimcher. 2002. Development of spontaneous airway changes consistent with human asthma in mice lacking T-bet. *Science* 295:336-338.
120. Grivennikov, S. I., A. V. Tumanov, D. J. Liepinsh, A. A. Kruglov, B. I. Marakusha, A. N. Shakhov, T. Murakami, L. N. Drutskaya, I. Forster, B. E. Clausen, L. Tessarollo, B. Ryffel, D. V. Kuprash, and S. A. Nedospasov. 2005. Distinct and nonredundant in vivo functions of TNF produced by t cells and macrophages/neutrophils: protective and deleterious effects. *Immunity* 22:93-104.
121. Calame, K. 2008. Activation-dependent induction of Blimp-1. *Curr Opin Immunol* 20:259-264.
122. Gu, H., Y. R. Zou, and K. Rajewsky. 1993. Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP-mediated gene targeting. *Cell* 73:1155-1164.
123. Hein, K. 2000. Gezielte Mausmutagenese zur Analyse der Antikörper-Klassenwechsel-Rekombination und der gelenkspezifischen Autoimmunität. Universität Köln, Köln.
124. Miltenyi, S., W. Muller, W. Weichel, and A. Radbruch. 1990. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 11:231-238.
125. Assenmacher, M., R. Manz, S. Miltenyi, A. Scheffold, and A. Radbruch. 1995. Fluorescence-activated cytometry cell sorting based on immunological recognition. *Clin Biochem* 28:39-40.
126. Engvall, E., K. Jonsson, and P. Perlmann. 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay. II. Quantitative assay of protein antigen, immunoglobulin G, by means of enzyme-labelled antigen and antibody-coated tubes. *Biochim Biophys Acta* 251:427-434.

127. Engvall, E., and P. Perlmann. 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8:871-874.
128. Frentsch, M., O. Arbach, D. Kirchhoff, B. Moewes, M. Worm, M. Rothe, A. Scheffold, and A. Thiel. 2005. Direct access to CD4+ T cells specific for defined antigens according to CD154 expression. *Nat Med* 11:1118-1124.
129. Kirchhoff, D., M. Frentsch, P. Leclerk, D. Bumann, S. Rausch, S. Hartmann, A. Thiel, and A. Scheffold. 2007. Identification and isolation of murine antigen-reactive T cells according to CD154 expression. *Eur J Immunol* 37:2370-2377.
130. Firestein, G. S., and N. J. Zvaifler. 2002. How important are T cells in chronic rheumatoid synovitis?: II. T cell-independent mechanisms from beginning to end. *Arthritis Rheum* 46:298-308.
131. Schroder, K., P. J. Hertzog, T. Ravasi, and D. A. Hume. 2004. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 75:163-189.
132. Leon, M. L., and S. H. Zuckerman. 2005. Gamma interferon: a central mediator in atherosclerosis. *Inflamm Res* 54:395-411.
133. Cruz, A., S. A. Khader, E. Torrado, A. Fraga, J. E. Pearl, J. Pedrosa, A. M. Cooper, and A. G. Castro. 2006. Cutting edge: IFN-gamma regulates the induction and expansion of IL-17-producing CD4 T cells during mycobacterial infection. *J Immunol* 177:1416-1420.
134. Szabo, S. J., S. T. Kim, G. L. Costa, X. Zhang, C. G. Fathman, and L. H. Glimcher. 2000. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 100:655-669.
135. Gocke, A. R., P. D. Cravens, L. H. Ben, R. Z. Hussain, S. C. Northrop, M. K. Racke, and A. E. Lovett-Racke. 2007. T-bet regulates the fate of Th1 and Th17 lymphocytes in autoimmunity. *J Immunol* 178:1341-1348.
136. McGeachy, M. J., and D. J. Cua. 2008. Th17 cell differentiation: the long and winding road. *Immunity* 28:445-453.
137. Ogura, H., M. Murakami, Y. Okuyama, M. Tsuruoka, C. Kitabayashi, M. Kanamoto, M. Nishihara, Y. Iwakura, and T. Hirano. 2008. Interleukin-17 promotes autoimmunity by triggering a positive-feedback loop via interleukin-6 induction. *Immunity* 29:628-636.
138. Bettelli, E., T. Korn, and V. K. Kuchroo. 2007. Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Curr Opin Immunol* 19:652-657.
139. Irmeler, I. M., M. Gajda, and R. Brauer. 2007. Exacerbation of antigen-induced arthritis in IFN-gamma-deficient mice as a result of unrestricted IL-17 response. *J Immunol* 179:6228-6236.
140. Schroecksadel, K., B. Frick, C. Winkler, and D. Fuchs. 2006. Crucial role of interferon-gamma and stimulated macrophages in cardiovascular disease. *Curr Vasc Pharmacol* 4:205-213.
141. Burastero, S. E., G. A. Rossi, and E. Crimi. 1998. Selective differences in the expression of the homing receptors of helper lymphocyte subsets. *Clin Immunol Immunopathol* 89:110-116.
142. Mackay, C. R. 1993. Homing of naive, memory and effector lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 5:423-427.
143. Patel, D. D., and B. F. Haynes. 2001. Leukocyte homing to synovium. *Curr Dir Autoimmun* 3:133-167.
144. Ebert, L. M., P. Schaerli, and B. Moser. 2005. Chemokine-mediated control of T cell traffic in lymphoid and peripheral tissues. *Mol Immunol* 42:799-809.
145. Austrup, F., D. Vestweber, E. Borges, M. Lohning, R. Brauer, U. Herz, H. Renz, R. Hallmann, A. Scheffold, A. Radbruch, and A. Hamann. 1997. P- and E-selectin mediate recruitment of T-helper-1 but not T-helper-2 cells into inflamed tissues. *Nature* 385:81-83.
146. Catalina, M. D., P. Estess, and M. H. Siegelman. 1999. Selective requirements for leukocyte adhesion molecules in models of acute and chronic cutaneous inflammation: participation of E- and P- but not L-selectin. *Blood* 93:580-589.

147. Sallusto, F., and C. R. Mackay. 2004. Chemoattractants and their receptors in homeostasis and inflammation. *Curr Opin Immunol* 16:724-731.
148. Ley, K., C. Laudanna, M. I. Cybulsky, and S. Nourshargh. 2007. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 7:678-689.
149. Randolph, D. A., G. Huang, C. J. Carruthers, L. E. Bromley, and D. D. Chaplin. 1999. The role of CCR7 in TH1 and TH2 cell localization and delivery of B cell help in vivo. *Science* 286:2159-2162.
150. Menning, A., U. E. Hopken, K. Siegmund, M. Lipp, A. Hamann, and J. Huehn. 2007. Distinctive role of CCR7 in migration and functional activity of naive- and effector/memory-like Treg subsets. *Eur J Immunol* 37:1575-1583.
151. Katschke, K. J., Jr., K. Y. Helmy, M. Steffek, H. Xi, J. Yin, W. P. Lee, P. Gribling, K. H. Barck, R. A. Carano, R. E. Taylor, L. Rangell, L. Diehl, P. E. Hass, C. Wiesmann, and M. van Lookeren Campagne. 2007. A novel inhibitor of the alternative pathway of complement reverses inflammation and bone destruction in experimental arthritis. *J Exp Med* 204:1319-1325.
152. Petkova, S. B., K. N. Konstantinov, T. J. Sproule, B. L. Lyons, M. A. Awwami, and D. C. Roopenian. 2006. Human antibodies induce arthritis in mice deficient in the low-affinity inhibitory IgG receptor Fc gamma RIIB. *J Exp Med* 203:275-280.
153. Nakamura, A., K. Akiyama, and T. Takai. 2005. Fc receptor targeting in the treatment of allergy, autoimmune diseases and cancer. *Expert Opin Ther Targets* 9:169-190.
154. Hamel, K., P. Doodes, Y. Cao, Y. Wang, J. Martinson, R. Dunn, M. R. Kehry, B. Farkas, and A. Finnegan. 2008. Suppression of proteoglycan-induced arthritis by anti-CD20 B Cell depletion therapy is mediated by reduction in autoantibodies and CD4+ T cell reactivity. *J Immunol* 180:4994-5003.
155. Grant, E. P., D. Picarella, T. Burwell, T. Delaney, A. Croci, N. Avitahl, A. A. Humbles, J. C. Gutierrez-Ramos, M. Briskin, C. Gerard, and A. J. Coyle. 2002. Essential role for the C5a receptor in regulating the effector phase of synovial infiltration and joint destruction in experimental arthritis. *J Exp Med* 196:1461-1471.
156. Hietala, M. A., I. M. Jonsson, A. Tarkowski, S. Kleinau, and M. Pekna. 2002. Complement deficiency ameliorates collagen-induced arthritis in mice. *J Immunol* 169:454-459.
157. O'Neill, S. K., M. J. Shlomchik, T. T. Glant, Y. Cao, P. D. Doodes, and A. Finnegan. 2005. Antigen-specific B cells are required as APCs and autoantibody-producing cells for induction of severe autoimmune arthritis. *J Immunol* 174:3781-3788.
158. Grewal, I. S., and R. A. Flavell. 1996. The role of CD40 ligand in costimulation and T-cell activation. *Immunol Rev* 153:85-106.
159. van Kooten, C., and J. Banchereau. 1997. Functions of CD40 on B cells, dendritic cells and other cells. *Curr Opin Immunol* 9:330-337.
160. Nutt, S. L., K. A. Fairfax, and A. Kallies. 2007. BLIMP1 guides the fate of effector B and T cells. *Nat Rev Immunol* 7:923-927.
161. Couper, K. N., D. G. Blount, and E. M. Riley. 2008. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol* 180:5771-5777.
162. Verbsky, J. W. 2007. Therapeutic use of T regulatory cells. *Curr Opin Rheumatol* 19:252-258.
163. Li, M. O., and R. A. Flavell. 2008. Contextual regulation of inflammation: a duet by transforming growth factor-beta and interleukin-10. *Immunity* 28:468-476.
164. Brandenburg, S., T. Takahashi, M. de la Rosa, M. Janke, G. Karsten, T. Muzzolini, Z. Orinska, S. Bulfone-Paus, and A. Scheffold. 2008. IL-2 induces in vivo suppression by CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells. *Eur J Immunol* 38:1643-1653.
165. Johnston, S. A., and D. C. Tang. 1994. Gene gun transfection of animal cells and genetic immunization. *Methods Cell Biol* 43 Pt A:353-365.
166. Hardung, F. 2005. Der Einfluss Antigen-spezifischer T-Helfer-Zell-Populationen auf die Induktion chronischer Gelenksentzündungen. Humboldt-Universität Berlin, Berlin.

167. Hasunuma, T., T. Kato, T. Kobata, and K. Nishioka. 1998. Molecular mechanism of immune response, synovial proliferation and apoptosis in rheumatoid arthritis. *Springer Semin Immunopathol* 20:41-52.
168. Jonsson, H., P. Allen, and S. L. Peng. 2005. Inflammatory arthritis requires Foxo3a to prevent Fas ligand-induced neutrophil apoptosis. *Nat Med* 11:666-671.
169. Nigrovic, P. A., and D. M. Lee. 2007. Synovial mast cells: role in acute and chronic arthritis. *Immunol Rev* 217:19-37.
170. Kwan-Morley, J., and D. Albert. 2007. B-cell inhibitors as therapy for rheumatoid arthritis: an update. *Curr Rheumatol Rep* 9:401-406.
171. Horwood, N. 2008. Lymphocyte-derived cytokines in inflammatory arthritis. *Autoimmunity* 41:230-238.
172. Looney, R. J. 2005. B cells as a therapeutic target in autoimmune diseases other than rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 44 Suppl 2:ii13-ii17.
173. Passweg, J., and A. Tyndall. 2007. Autologous stem cell transplantation in autoimmune diseases. *Semin Hematol* 44:278-285.
174. Weissman, I. L., and J. A. Shizuru. 2008. The origins of the identification and isolation of hematopoietic stem cells, and their capability to induce donor-specific transplantation tolerance and treat autoimmune diseases. *Blood* 112:3543-3553.
175. Choy, E. H., A. Schantz, C. Pitzalis, G. H. Kingsley, and G. S. Panayi. 1998. The pharmacokinetics and human anti-mouse antibody response in rheumatoid arthritis patients treated with a chimeric anti-CD4 monoclonal antibody. *Br J Rheumatol* 37:801-802.
176. Lohoff, M., A. Gessner, C. Bogdan, and M. Rollinghoff. 1998. The Th1/Th2 paradigm and experimental murine leishmaniasis. *Int Arch Allergy Immunol* 115:191-202.
177. Karupiah, G. 1998. Type 1 and type 2 cytokines in antiviral defense. *Vet Immunol Immunopathol* 63:105-109.
178. Cheers, C., and I. F. McKenzie. 1978. Resistance and susceptibility of mice to bacterial infection: genetics of listeriosis. *Infect Immun* 19:755-762.
179. Kamath, A. B., and S. M. Behar. 2005. Anamnestic responses of mice following *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Infect Immun* 73:6110-6118.
180. Autenrieth, I. B., M. Beer, E. Bohn, S. H. Kaufmann, and J. Heesemann. 1994. Immune responses to *Yersinia enterocolitica* in susceptible BALB/c and resistant C57BL/6 mice: an essential role for gamma interferon. *Infect Immun* 62:2590-2599.
181. Joosten, L. A., S. Abdollahi-Roodsaz, M. Heuvelmans-Jacobs, M. M. Helsen, L. A. van den Bersselaar, B. Oppers-Walgreen, M. I. Koenders, and W. B. van den Berg. 2008. T cell dependence of chronic destructive murine arthritis induced by repeated local activation of Toll-like receptor-driven pathways: crucial role of both interleukin-1beta and interleukin-17. *Arthritis Rheum* 58:98-108.
182. Klareskog, L., and H. McDevitt. 1999. Rheumatoid arthritis and its animal models: the role of TNF-alpha and the possible absence of specific immune reactions. *Curr Opin Immunol* 11:657-662.
183. Pasparakis, M., L. Alexopoulou, V. Episkopou, and G. Kollias. 1996. Immune and inflammatory responses in TNF alpha-deficient mice: a critical requirement for TNF alpha in the formation of primary B cell follicles, follicular dendritic cell networks and germinal centers, and in the maturation of the humoral immune response. *J Exp Med* 184:1397-1411.
184. Williams, R. O., M. Feldmann, and R. N. Maini. 1992. Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:9784-9788.
185. Mori, L., S. Iselin, G. De Libero, and W. Lesslauer. 1996. Attenuation of collagen-induced arthritis in 55-kDa TNF receptor type 1 (TNFR1)-IgG1-treated and TNFR1-deficient mice. *J Immunol* 157:3178-3182.
186. Campbell, I. K., K. O'Donnell, K. E. Lawlor, and I. P. Wicks. 2001. Severe inflammatory arthritis and lymphadenopathy in the absence of TNF. *J Clin Invest* 107:1519-1527.

187. Tada, Y., A. Ho, S. Koarada, F. Morito, O. Ushiyama, N. Suzuki, Y. Kikuchi, A. Ohta, T. W. Mak, and K. Nagasawa. 2001. Collagen-induced arthritis in TNF receptor-1-deficient mice: TNF receptor-2 can modulate arthritis in the absence of TNF receptor-1. *Clin Immunol* 99:325-333.
188. Kuprash, D. V., A. V. Tumanov, D. J. Liepinsh, E. P. Koroleva, M. S. Drutskaya, A. A. Kruglov, A. N. Shakhov, E. Southon, W. J. Murphy, L. Tessarollo, S. I. Grivennikov, and S. A. Nedospasov. 2005. Novel tumor necrosis factor-knockout mice that lack Peyer's patches. *Eur J Immunol* 35:1592-1600.
189. Ware, C. F. 2005. Network communications: lymphotoxins, LIGHT, and TNF. *Annu Rev Immunol* 23:787-819.
190. Gommerman, J. L., and J. L. Browning. 2003. Lymphotoxin/light, lymphoid microenvironments and autoimmune disease. *Nat Rev Immunol* 3:642-655.
191. Tumanov, A. V., D. V. Kuprash, and S. A. Nedospasov. 2003. The role of lymphotoxin in development and maintenance of secondary lymphoid tissues. *Cytokine Growth Factor Rev* 14:275-288.
192. Kim, H. J., T. Kammertoens, M. Janke, O. Schmetzer, Z. Qin, C. Berek, and T. Blankenstein. 2004. Establishment of early lymphoid organ infrastructure in transplanted tumors mediated by local production of lymphotoxin alpha and in the combined absence of functional B and T cells. *J Immunol* 172:4037-4047.
193. Ebert, E. C., K. M. Das, V. Mehta, and C. Rezac. 2008. Non-response to infliximab may be due to innate neutralizing anti-tumour necrosis factor-alpha antibodies. *Clin Exp Immunol*.
194. Scriba, T. J., B. Kalsdorf, D. A. Abrahams, F. Isaacs, J. Hofmeister, G. Black, H. Y. Hassan, R. J. Wilkinson, G. Walzl, S. J. Gelderbloem, H. Mahomed, G. D. Hussey, and W. A. Hanekom. 2008. Distinct, specific IL-17- and IL-22-producing CD4+ T cell subsets contribute to the human anti-mycobacterial immune response. *J Immunol* 180:1962-1970.
195. Langrish, C. L., Y. Chen, W. M. Blumenschein, J. Mattson, B. Basham, J. D. Sedgwick, T. McClanahan, R. A. Kastelein, and D. J. Cua. 2005. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 201:233-240.
196. Kikly, K., L. Liu, S. Na, and J. D. Sedgwick. 2006. The IL-23/Th(17) axis: therapeutic targets for autoimmune inflammation. *Curr Opin Immunol* 18:670-675.
197. Koenders, M. I., L. A. Joosten, and W. B. van den Berg. 2006. Potential new targets in arthritis therapy: interleukin (IL)-17 and its relation to tumour necrosis factor and IL-1 in experimental arthritis. *Ann Rheum Dis* 65 Suppl 3:iii29-33.
198. Pene, J., S. Chevalier, L. Preisser, E. Venereau, M. H. Guilleux, S. Ghannam, J. P. Moles, Y. Danger, E. Ravon, S. Lesaux, H. Yssel, and H. Gascan. 2008. Chronically inflamed human tissues are infiltrated by highly differentiated Th17 lymphocytes. *J Immunol* 180:7423-7430.
199. Doodes, P. D., Y. Cao, K. M. Hamel, Y. Wang, B. Farkas, Y. Iwakura, and A. Finnegan. 2008. Development of proteoglycan-induced arthritis is independent of IL-17. *J Immunol* 181:329-337.
200. Nakae, S., A. Nambu, K. Sudo, and Y. Iwakura. 2003. Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *J Immunol* 171:6173-6177.
201. Koenders, M. I., J. K. Kolls, B. Oppers-Walgreen, L. van den Bersselaar, L. A. Joosten, J. R. Schurr, P. Schwarzenberger, W. B. van den Berg, and E. Lubberts. 2005. Interleukin-17 receptor deficiency results in impaired synovial expression of interleukin-1 and matrix metalloproteinases 3, 9, and 13 and prevents cartilage destruction during chronic reactivated streptococcal cell wall-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 52:3239-3247.
202. Koenders, M. I., E. Lubberts, B. Oppers-Walgreen, L. van den Bersselaar, M. M. Helsen, F. E. Di Padova, A. M. Boots, H. Gram, L. A. Joosten, and W. B. van den Berg. 2005. Blocking of interleukin-17 during reactivation of experimental arthritis

- prevents joint inflammation and bone erosion by decreasing RANKL and interleukin-1. *Am J Pathol* 167:141-149.
203. Smith, E., M. A. Stark, A. Zarbock, T. L. Burcin, A. C. Bruce, D. Vaswani, P. Foley, and K. Ley. 2008. IL-17A inhibits the expansion of IL-17A-producing T cells in mice through "short-loop" inhibition via IL-17 receptor. *J Immunol* 181:1357-1364.
204. Yu, J. J., M. J. Ruddy, G. C. Wong, C. Sfintescu, P. J. Baker, J. B. Smith, R. T. Evans, and S. L. Gaffen. 2007. An essential role for IL-17 in preventing pathogen-initiated bone destruction: recruitment of neutrophils to inflamed bone requires IL-17 receptor-dependent signals. *Blood* 109:3794-3802.
205. Dong, C. 2006. Diversification of T-helper-cell lineages: finding the family root of IL-17-producing cells. *Nat Rev Immunol* 6:329-333.
206. He, D., L. Wu, H. K. Kim, H. Li, C. A. Elmets, and H. Xu. 2006. CD8+ IL-17-producing T cells are important in effector functions for the elicitation of contact hypersensitivity responses. *J Immunol* 177:6852-6858.
207. Kryczek, I., S. Wei, L. Vatan, J. Escara-Wilke, W. Szeliga, E. T. Keller, and W. Zou. 2007. Cutting edge: opposite effects of IL-1 and IL-2 on the regulation of IL-17+ T cell pool IL-1 subverts IL-2-mediated suppression. *J Immunol* 179:1423-1426.
208. Ferretti, S., O. Bonneau, G. R. Dubois, C. E. Jones, and A. Trifilieff. 2003. IL-17, produced by lymphocytes and neutrophils, is necessary for lipopolysaccharide-induced airway neutrophilia: IL-15 as a possible trigger. *J Immunol* 170:2106-2112.
209. Zhu, X., L. A. Mulcahy, R. A. Mohammed, A. H. Lee, H. A. Franks, L. Kilpatrick, A. Yilmazer, E. C. Paish, I. O. Ellis, P. M. Patel, and A. M. Jackson. 2008. Interleukin-17 expression by breast cancer associated macrophages: IL-17 promotes invasiveness of breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res* 10:R95.
210. Song, C., L. Luo, Z. Lei, B. Li, Z. Liang, G. Liu, D. Li, G. Zhang, B. Huang, and Z. H. Feng. 2008. IL-17-producing alveolar macrophages mediate allergic lung inflammation related to asthma. *J Immunol* 181:6117-6124.
211. Chang, S. H., and C. Dong. 2007. A novel heterodimeric cytokine consisting of IL-17 and IL-17F regulates inflammatory responses. *Cell Res* 17:435-440.
212. Yang, X. O., S. H. Chang, H. Park, R. Nurieva, B. Shah, L. Acero, Y. H. Wang, K. S. Schluns, R. R. Broaddus, Z. Zhu, and C. Dong. 2008. Regulation of inflammatory responses by IL-17F. *J Exp Med* 205:1063-1075.
213. Moseley, T. A., D. R. Haudenschild, L. Rose, and A. H. Reddi. 2003. Interleukin-17 family and IL-17 receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 14:155-174.
214. Wright, J. F., Y. Guo, A. Quazi, D. P. Luxenberg, F. Bennett, J. F. Ross, Y. Qiu, M. J. Whitters, K. N. Tomkinson, K. Dunussi-Joannopoulos, B. M. Carreno, M. Collins, and N. M. Wolfman. 2007. Identification of an interleukin 17F/17A heterodimer in activated human CD4+ T cells. *J Biol Chem* 282:13447-13455.
215. Boehm, U., T. Klamp, M. Groot, and J. C. Howard. 1997. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol* 15:749-795.
216. Cassatella, M. A., F. Bazzoni, R. M. Flynn, S. Dusi, G. Trinchieri, and F. Rossi. 1990. Molecular basis of interferon-gamma and lipopolysaccharide enhancement of phagocyte respiratory burst capability. Studies on the gene expression of several NADPH oxidase components. *J Biol Chem* 265:20241-20246.
217. Pober, J. S., and R. S. Cotran. 1990. Cytokines and endothelial cell biology. *Physiol Rev* 70:427-451.
218. Mombouli, J. V., and P. M. Vanhoutte. 1999. Endothelial dysfunction: from physiology to therapy. *J Mol Cell Cardiol* 31:61-74.
219. Yang, Y., J. C. Ochando, J. S. Bromberg, and Y. Ding. 2007. Identification of a distant T-bet enhancer responsive to IL-12/Stat4 and IFN-gamma/Stat1 signals. *Blood* 110:2494-2500.
220. Way, S. S., and C. B. Wilson. 2004. Cutting edge: immunity and IFN-gamma production during *Listeria monocytogenes* infection in the absence of T-bet. *J Immunol* 173:5918-5922.

221. Mayer, K. D., K. Mohrs, W. Reiley, S. Wittmer, J. E. Kohlmeier, J. E. Pearl, A. M. Cooper, L. L. Johnson, D. L. Woodland, and M. Mohrs. 2008. Cutting edge: T-bet and IL-27R are critical for in vivo IFN-gamma production by CD8 T cells during infection. *J Immunol* 180:693-697.
222. Townsend, M. J., A. S. Weinmann, J. L. Matsuda, R. Salomon, P. J. Farnham, C. A. Biron, L. Gapin, and L. H. Glimcher. 2004. T-bet regulates the terminal maturation and homeostasis of NK and Valpha14i NKT cells. *Immunity* 20:477-494.
223. Werneck, M. B., G. Lugo-Villarino, E. S. Hwang, H. Cantor, and L. H. Glimcher. 2008. T-bet plays a key role in NK-mediated control of melanoma metastatic disease. *J Immunol* 180:8004-8010.
224. Vermeire, K., H. Heremans, M. Vandeputte, S. Huang, A. Billiau, and P. Matthys. 1997. Accelerated collagen-induced arthritis in IFN-gamma receptor-deficient mice. *J Immunol* 158:5507-5513.
225. Manoury-Schwartz, B., G. Chiochia, N. Bessis, O. Abehsira-Amar, F. Batteux, S. Muller, S. Huang, M. C. Boissier, and C. Fournier. 1997. High susceptibility to collagen-induced arthritis in mice lacking IFN-gamma receptors. *J Immunol* 158:5501-5506.
226. Komiyama, Y., S. Nakae, T. Matsuki, A. Nambu, H. Ishigame, S. Kakuta, K. Sudo, and Y. Iwakura. 2006. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 177:566-573.
227. Ferber, I. A., S. Brocke, C. Taylor-Edwards, W. Ridgway, C. Dinisco, L. Steinman, D. Dalton, and C. G. Fathman. 1996. Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J Immunol* 156:5-7.
228. Chan, A., A. Filer, G. Parsonage, S. Kollnberger, R. Gundle, C. D. Buckley, and P. Bowness. 2008. Mediation of the proinflammatory cytokine response in rheumatoid arthritis and spondylarthritis by interactions between fibroblast-like synoviocytes and natural killer cells. *Arthritis Rheum* 58:707-717.
229. Perricone, R., C. Perricone, C. De Carolis, and Y. Shoenfeld. 2008. NK cells in autoimmunity: a two-edged weapon of the immune system. *Autoimmun Rev* 7:384-390.
230. Johansson, S., L. Berg, H. Hall, and P. Hoglund. 2005. NK cells: elusive players in autoimmunity. *Trends Immunol* 26:613-618.
231. Wu, H. J., H. Sawaya, B. Binstadt, M. Brickelmaier, A. Blasius, L. Gorelik, U. Mahmood, R. Weissleder, J. Carulli, C. Benoist, and D. Mathis. 2007. Inflammatory arthritis can be reined in by CpG-induced DC-NK cell cross talk. *J Exp Med* 204:1911-1922.
232. Zhang, B., T. Yamamura, T. Kondo, M. Fujiwara, and T. Tabira. 1997. Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by natural killer (NK) cells. *J Exp Med* 186:1677-1687.
233. Shi, F. D., H. B. Wang, H. Li, S. Hong, M. Taniguchi, H. Link, L. Van Kaer, and H. G. Ljunggren. 2000. Natural killer cells determine the outcome of B cell-mediated autoimmunity. *Nat Immunol* 1:245-251.
234. Cox, C. A., G. Shi, H. Yin, B. P. Vistica, E. F. Wawrousek, C. C. Chan, and I. Gery. 2008. Both Th1 and Th17 are immunopathogenic but differ in other key biological activities. *J Immunol* 180:7414-7422.
235. Luger, D., P. B. Silver, J. Tang, D. Cua, Z. Chen, Y. Iwakura, E. P. Bowman, N. M. Sgambellone, C. C. Chan, and R. R. Caspi. 2008. Either a Th17 or a Th1 effector response can drive autoimmunity: conditions of disease induction affect dominant effector category. *J Exp Med* 205:799-810.
236. Liang, S. C., A. J. Long, F. Bennett, M. J. Whitters, R. Karim, M. Collins, S. J. Goldman, K. Dunussi-Joannopoulos, C. M. Williams, J. F. Wright, and L. A. Fouser. 2007. An IL-17F/A heterodimer protein is produced by mouse Th17 cells and induces airway neutrophil recruitment. *J Immunol* 179:7791-7799.

237. Stummvoll, G. H., R. J. DiPaolo, E. N. Huter, T. S. Davidson, D. Glass, J. M. Ward, and E. M. Shevach. 2008. Th1, Th2, and Th17 effector T cell-induced autoimmune gastritis differs in pathological pattern and in susceptibility to suppression by regulatory T cells. *J Immunol* 181:1908-1916.
238. Klasen, I. S., I. G. Donselaar, R. M. Ladestein, W. B. van den Berg, and R. Benner. 1986. Joint inflammations and flare-up reactions in mice induced by a helper T cell clone. *Agents Actions* 19:331-334.
239. Klasen, I. S., R. M. Ladestein, I. G. Donselaar, W. B. van den Berg, R. Tees, and R. Benner. 1987. Joint inflammation in mice induced by a MT4+ Lyt-2- T cell clone. Characteristics and the induction of flare-up reactions. *J Immunol* 139:3275-3280.
240. Lexberg, M. H., A. Taubner, A. Forster, I. Albrecht, A. Richter, T. Kamradt, A. Radbruch, and H. D. Chang. 2008. Th memory for interleukin-17 expression is stable in vivo. *Eur J Immunol*.
241. Jankovic, D., M. C. Kullberg, C. G. Feng, R. S. Goldszmid, C. M. Collazo, M. Wilson, T. A. Wynn, M. Kamanaka, R. A. Flavell, and A. Sher. 2007. Conventional Tbet(+)Foxp3(-) Th1 cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection. *J Exp Med* 204:273-283.
242. Anderson, C. F., M. Oukka, V. J. Kuchroo, and D. Sacks. 2007. CD4(+)CD25(-)Foxp3(-) Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. *J Exp Med* 204:285-297.
243. Groux, H., and F. Cottrez. 2003. The complex role of interleukin-10 in autoimmunity. *J Autoimmun* 20:281-285.
244. Stumhofer, J. S., J. S. Silver, A. Laurence, P. M. Porrett, T. H. Harris, L. A. Turka, M. Ernst, C. J. Saris, J. J. O'Shea, and C. A. Hunter. 2007. Interleukins 27 and 6 induce STAT3-mediated T cell production of interleukin 10. *Nat Immunol* 8:1363-1371.
245. Mohrs, K., A. E. Wakil, N. Killeen, R. M. Locksley, and M. Mohrs. 2005. A two-step process for cytokine production revealed by IL-4 dual-reporter mice. *Immunity* 23:419-429.
246. Mohrs, M., K. Shinkai, K. Mohrs, and R. M. Locksley. 2001. Analysis of type 2 immunity in vivo with a bicistronic IL-4 reporter. *Immunity* 15:303-311.
247. Westermann, J., E. M. Ehlers, M. S. Exton, M. Kaiser, and U. Bode. 2001. Migration of naive, effector and memory T cells: implications for the regulation of immune responses. *Immunol Rev* 184:20-37.
248. Marelli-Berg, F. M., L. Cannella, F. Dazzi, and V. Mirenda. 2008. The highway code of T cell trafficking. *J Pathol* 214:179-189.
249. Mora, J. R., and U. H. von Andrian. 2006. T-cell homing specificity and plasticity: new concepts and future challenges. *Trends Immunol* 27:235-243.
250. Green, D. R., N. Droin, and M. Pinkoski. 2003. Activation-induced cell death in T cells. *Immunol Rev* 193:70-81.
251. Hayashi, N., D. Liu, B. Min, S. Z. Ben-Sasson, and W. E. Paul. 2002. Antigen challenge leads to in vivo activation and elimination of highly polarized TH1 memory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:6187-6191.
252. Niesner, U., I. Albrecht, M. Janke, C. Doebis, C. Loddenkemper, M. H. Lexberg, K. Eulenburg, S. Kreher, J. Koeck, R. Baumgrass, K. Bonhagen, T. Kamradt, P. Enghard, J. Y. Humrich, S. Rutz, U. Schulze-Topphoff, O. Aktas, S. Bartfeld, H. Radbruch, A. N. Hegazy, M. Lohning, D. C. Baumgart, R. Duchmann, M. Rudwaleit, T. Haupl, I. Gitelman, V. Krenn, J. Gruen, J. Sieper, M. Zeitz, B. Wiedenmann, F. Zipp, A. Hamann, M. Janitz, A. Scheffold, G. R. Burmester, H. D. Chang, and A. Radbruch. 2008. Autoregulation of Th1-mediated inflammation by twist1. *J Exp Med* 205:1889-1901.
253. Mantei, A., S. Rutz, M. Janke, D. Kirchhoff, U. Jung, V. Patzel, U. Vogel, T. Rudel, I. Andreou, M. Weber, and A. Scheffold. 2008. siRNA stabilization prolongs gene knockdown in primary T lymphocytes. *Eur J Immunol* 38:2616-2625.

254. Rutz, S., and A. Scheffold. 2004. Towards in vivo application of RNA interference - new toys, old problems. *Arthritis Res Ther* 6:78-85.
255. Gonzalez-Rey, E., A. Fernandez-Martin, A. Chorny, and M. Delgado. 2006. Vasoactive intestinal peptide induces CD4<sup>+</sup>,CD25<sup>+</sup> T regulatory cells with therapeutic effect in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 54:864-876.
256. Flores-Borja, F., C. Mauri, and M. R. Ehrenstein. 2008. Restoring the balance: harnessing regulatory T cells for therapy in rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol* 38:934-937.
257. Frey, O., P. K. Petrow, M. Gajda, K. Siegmund, J. Huehn, A. Scheffold, A. Hamann, A. Radbruch, and R. Brauer. 2005. The role of regulatory T cells in antigen-induced arthritis: aggravation of arthritis after depletion and amelioration after transfer of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells. *Arthritis Res Ther* 7:R291-301.
258. Svensson, L., J. Jirholt, R. Holmdahl, and L. Jansson. 1998. B cell-deficient mice do not develop type II collagen-induced arthritis (CIA). *Clin Exp Immunol* 111:521-526.
259. van Lent, P. L., K. Nabbe, A. B. Blom, A. E. Holthuysen, A. Sloetjes, L. B. van de Putte, S. Verbeek, and W. B. van den Berg. 2001. Role of activatory Fc gamma RI and Fc gamma RIII and inhibitory Fc gamma RII in inflammation and cartilage destruction during experimental antigen-induced arthritis. *Am J Pathol* 159:2309-2320.
260. van Lent, P. L., A. J. van Vuuren, A. B. Blom, A. E. Holthuysen, L. B. van de Putte, J. G. van de Winkel, and W. B. van den Berg. 2000. Role of Fc receptor gamma chain in inflammation and cartilage damage during experimental antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 43:740-752.
261. Zheng, B., X. Zhang, L. Guo, and S. Han. 2007. IgM plays an important role in induction of collagen-induced arthritis. *Clin Exp Immunol* 149:579-585.
262. Crawford, A., M. Macleod, T. Schumacher, L. Corlett, and D. Gray. 2006. Primary T cell expansion and differentiation in vivo requires antigen presentation by B cells. *J Immunol* 176:3498-3506.
263. Taneja, V., C. J. Krco, M. D. Behrens, H. S. Luthra, M. M. Griffiths, and C. S. David. 2007. B cells are important as antigen presenting cells for induction of MHC-restricted arthritis in transgenic mice. *Mol Immunol* 44:2988-2996.
264. Joao, C., B. M. Ogle, C. Gay-Rabinstein, J. L. Platt, and M. Cascalho. 2004. B cell-dependent TCR diversification. *J Immunol* 172:4709-4716.
265. Joao, C., B. M. Ogle, and S. Geyer. 2006. Immunoglobulin promotes the diversity and the function of T cells. *Eur J Immunol* 36:1718-1728.
266. Eggena, M. P., L. S. Walker, V. Nagabhushanam, L. Barron, A. Chodos, and A. K. Abbas. 2004. Cooperative roles of CTLA-4 and regulatory T cells in tolerance to an islet cell antigen. *J Exp Med* 199:1725-1730.
267. Derbinski, J., A. Schulte, B. Kyewski, and L. Klein. 2001. Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nat Immunol* 2:1032-1039.
268. Siegmund, K., M. Feuerer, C. Siewert, S. Ghani, U. Haubold, A. Dankof, V. Krenn, M. P. Schon, A. Scheffold, J. B. Lowe, A. Hamann, U. Syrbe, and J. Huehn. 2005. Migration matters: regulatory T-cell compartmentalization determines suppressive activity in vivo. *Blood* 106:3097-3104.
269. Palmer, G., C. Gabay, and B. A. Imhof. 2006. Leukocyte migration to rheumatoid joints: Enzymes take over. *Arthritis Rheum* 54:2707-2710.
270. Zimmet, J. M., and J. M. Hare. 2005. Emerging role for bone marrow derived mesenchymal stem cells in myocardial regenerative therapy. *Basic Res Cardiol* 100:471-481.
271. Cho, P. S., D. J. Messina, E. L. Hirsh, N. Chi, S. N. Goldman, D. P. Lo, I. R. Harris, S. H. Popma, D. H. Sachs, and C. A. Huang. 2008. Immunogenicity of umbilical cord tissue derived cells. *Blood* 111:430-438.

## VI Anhang

### Abbildungsverzeichnis

Abb.1:	Th-Zell Subpopulationen	11
Abb.2:	Schematische Darstellung eines Kniegelenkes	14
Abb.3:	Schematische Darstellung des zeitlichen Verlaufes einer Ovalbumin-induzierten Arthritis (OIA) in immunisierten Mäusen	43
Abb.4:	OIA-induzierte Wildtypmäuse zeigen akute und chronische Arthritis Symptome	44
Abb.5:	Immunisierte Balb/c und C57Bl/6 Wildtypmäuse bilden ein unterschiedliches Repertoire an OVA-spezifischen Antikörpersubtypen aus	45
Abb.6:	In immunisierten C57Bl/6 Wildtypmäusen entstehen mehr Th1- und Th17-, aber weniger Th2-Zellen als in immunisierten Balb/c Wildtypmäusen	46
Abb.7:	T-bet defiziente Mäuse bilden eine schwerere OIA als Wildtypmäuse aus	48
Abb.8:	OIA-krank T-bet defiziente Mäuse bilden mehr antigenspezifische Th17-Zellen aus als Wildtypmäuse	49
Abb.9:	Die Ausbildung einer chronischen OIA ist von TNF- $\alpha$ unabhängig	50
Abb.10:	Immunisierte TNF- $\alpha$ defiziente Mäuse bilden signifikant niedrigere OVA-spezifische Antikörpertiter als Wildtypmäuse aus	50
Abb.11:	OIA-krank TNF- $\alpha$ defiziente Mäuse und Wildtypmäuse bilden eine ähnliche Anzahl an Th1- und Th17-Zellen aus	51
Abb.12:	Die Etablierung einer chronischen OIA ist von IL-17 abhängig	52
Abb.13:	Unter IL-17 neutralisierenden Bedingungen bilden sich weniger OVA-spezifische Th-Zellen in OIA-kranken Mäusen	53
Abb.14:	Ein Transfer von OVA-spezifischen Th17-Zellen zeigt keinen Einfluss auf den Verlauf einer OIA	54
Abb.15:	Schematische Darstellung des zeitlichen Verlaufes einer durch OVA-spezifische Th-Zellen induzierten OIA	55
Abb.16:	Th1- und Th17-Zellen induzieren eine akute Entzündung in immunkompetenten Wildtypmäusen	56
Abb.17:	In mit Th-Zellen transferierten Mäusen lassen sich ab Tag+9 nach einer OIA Induktion keine transferierten Th-Zellen mehr detektieren	58
Abb.18:	Th1- und Th17-Zellen induzieren eine akute Entzündung nach Transfer in lymphopenische Mäuse	59
Abb.19:	Transferierte Th-Zellen lassen sich in lymphopenischen SCID Mäusen noch drei Wochen nach OIA Induktion detektieren	59
Abb.20:	<i>In vitro</i> generierte Th17-Zellen exprimieren außer IL-17 auch die Zytokine IL-2 und TNF- $\alpha$	60
Abb.21:	<i>In vitro</i> generierte Th17-Zellen exprimieren die mRNA für ROR $\gamma$ T, IL-17A und IL-22	61
Abb.22:	Eine akute DTH Reaktion wird teilweise durch IL-17 vermittelt	62

---

Abb.23: Th17-Zellen induzieren nur eine schwache DTH Reaktion in immunkompetenten Wildtypmäusen	63
Abb.24: Re-Isolierte Th17-Zellen aus DTH induzierten Mäusen exprimieren weniger IL-17 aber mehr IFN- $\gamma$ als vor dem Transfer	63
Abb.25: Th17-Zellen migrieren schlechter in entzündetes Gewebe als Th1-Zellen	65
Abb.26: Th17-Zellen exprimieren kein CXCR3 und CCR5 auf der Zelloberfläche	67
Abb.27: JHT-/- Mäuse entwickeln keine B-Zellen und keine Antikörper	69
Abb.28: B-Zell-defiziente JHT-/- Mäuse entwickeln keine chronische OIA	70
Abb.29: Blimp1 defiziente CD19 <sup>cre/wt</sup> Prdm1 <sup>fl/fl</sup> Mäuse entwickeln eine normale OIA	72
Abb.30: In immunisierten Blimp1 defizienten CD19 <sup>cre/wt</sup> Prdm1 <sup>fl/fl</sup> Mäusen lassen sich geringe antigenspezifische Antikörpertiter detektieren	73
Abb.31: In OIA-kranken Blimp1 defizienten CD19 <sup>cre/wt</sup> Prdm1 <sup>fl/fl</sup> Mäusen ist sowohl die Qualität als auch die Quantität der OVA-spezifischen Th-Zellen im Vergleich zu Wildtypmäusen verändert	73
Abb.32: Immunisierte B-Zell-defiziente JHT-/- Mäuse entwickeln weniger antigenspezifische Th-Zellen als Wildtypmäuse	74
Abb.33: OVA-spezifische CD4+CD25+ Treg können eine chronische OIA supprimieren	77
Abb.34: CD4+CD25+ Treg haben nur einen geringen Einfluss auf die antigenspezifische Helfer-T-Zell-Antwort in OIA-kranken Mäusen	77
Abb.35: Eine IL-2 Immunisierung mittels GeneGun verringert die akuten aber verstärkt die chronischen Arthritissymptome einer OIA	78
Abb.36: Das Modell der Doxycyclin-induzierten, gelenkspezifischen Ovalbuminexpression in tet-LPOVA Mäusen	80
Abb.37: Tet-LPOVA-Mäuse sind tolerant gegen eine OIA	81
Abb.38: Die Toleranz gegen eine gelenkspezifische Arthritis in tet-LPOVA-Mäusen ist antigenspezifisch	82
Abb.39: Tet-LPOVA-Mäuse entwickeln eine normale Ovalbumin-induzierte DTH Reaktion	82
Abb.40: Der OVA-spezifischer Antikörpertiter ist in tet-LPOVA Mäusen nur leicht niedriger als in Wildtypmäusen	83
Abb.41: In tet-LPOVA Mäusen entstehen nur halb soviel OVA-spezifische Th-Zellen wie in Wildtypmäusen	84
Abb.42: Die OIA-spezifische Suppression in tet-LPOVA Mäusen wird durch Th-Zellen vermittelt	85
Abb.43: Die OIA-spezifische Suppression in tet-LPOVA Mäusen wird teilweise durch nicht-hämatopoetische Zellen vermittelt	86

---

**Tabellenverzeichnis**

Tabelle1: Verwendete Chemikalien und Reagenzien	22ff
Tabelle2: Verwendete Antikörperkonjugate und Sekundärreagenzien	24f
Tabelle3: Verwendete Primersequenzen für die <i>Real-Time-PCR</i>	38
Tabelle4: Mögliche Suppressionsmechanismen durch Treg bei der OIA in Wildtypmäusen	107

**Erklärung**

Hiermit versichere ich, Marko Janke, geboren am 13.08.1976 in Wriezen, dass ich meine Dissertation mit dem Titel „Die Rolle von antigenspezifischen Helfer-T-Zellen im murinen Krankheitsmodell der Ovalbumin-induzierten Arthritis“ selbständig und ohne erlaubte Hilfe angefertigt habe.

.....

Datum

.....

Unterschrift

## Lebenslauf

Der Lebenslauf ist der Online-Version  
aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.



## Publikationsliste

### Aus der Doktorarbeit hervorgegangene Publikationen

**Janke M**, Hardung F, Hohnstein T, Peine M, Kruglov A, Morawietz L, Loddenkemper C, Nedospasov S, Scheffold A,

Antigen-specific Helper T cells induce acute inflammation but B cells are necessary for establishing chronic antigen-induced arthritis

in preparation

**Janke M**, Peine M, Nass A, Morawietz L, Hamann A, Scheffold A,

In vitro induced Th17 cells do not contribute to experimental arthritis due to impaired migration into inflamed sites

J Immunol 2008 submitted

Albrecht I, Niesner U, **Janke M**, Radbruch A, Chang H.

[The pro-inflammatory immunological memory: Twist1 as a marker for chronically activated T lymphocytes.]

Z Rheumatol 2008 Dec;67(8):684-8. German

Niesner U, Albrecht I, **Janke M**, Doebis C, Loddenkemper C, Lexberg MH, Eulenburg K, Kreher S, Koeck J, Baumgrass R, Bonhagen K, Kamradt T, Enghard P, Humrich JY, Rutz S, Schulze-Topphoff U, Aktas O, Bartfeld S, Radbruch H, Baumgart DC, Duchmann R, Rudwaleit M, Haeupl T, Gitelman I, Krenn V, Gruen J, Sieper J, Zeitz M, Wiedenmann B, Zipp F, Hamann A, Janitz M, Scheffold A, Burmester GR, Chang HD, Radbruch A,

Autoregulation of Th1-mediated inflammation by *twist1*

J Exp Med. 2008 Aug 4;205(8):1889-901.

Rutz S, **Janke M**, Kassner N, Hohnstein T, Krueger M, Scheffold A,

Notch regulates interleukin-10 production by T helper 1 cells.

Proc Natl Acad Sci USA 2008 Mar 4; 105(9):3497-502

### Weitere Publikationen im Rahmen der Doktorarbeit

Mantei A, Rutz S, **Janke M**, Kirchhoff D, Patzel V, Andreou I, Weber M, Scheffold A,

siRNA stabilization prolongs gene knockdown in primary T lymphocytes

Eur J Immunol. 2008. Sept;38(9):2616-25.

Brandenburg S, Takahashi T, de la Rosa M, **Janke M**, Karsten G, Muzzulini T, Orinska Z, Bulfone-Paus S, Scheffold A,

IL-2 induces *in vivo* suppression by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg

Eur J Immunol. 2008 Jun;38(6):1643-53.

**Weitere Publikationen**

**Janke M**, Witsch EJ, Mages HW, Hutloff A, KroczeK RA,  
Eminent role of ICOS co-stimulation for T cells interacting with plasmacytoid dendritic cells.  
Immunology 2006 Jul;118(3):353-60

Kim HJ, Kammertoens T, **Janke M**, Schmetzer O, Qin Z, Berek C, Blankenstein T,  
Establishment of early lymphoid organ infrastructure in transplanted tumors mediated by local  
production of lymphotoxin alpha and in the combined absence of functional B and T cells  
J Immunol. 2004 Apr 1;172(7):4037-47

## Kongressteilnahmen und Stipendien

- 25.-26. November 2006 Meeting des **Nationalen GenomForschungsNetzes** (NGFN) in Heidelberg. Posterpräsentation: *“In vivo functional gene analysis to identify protective genes in animal models of arthritis”*
- 22.-24. Februar 2007 Meeting des *European Workshop for Rheumatology Research* (EWRR) in Florenz, Italien. Posterpräsentation: *“Analysis of pathogenic and protective T cell subpopulations in a murine arthritis model”*  
Reisestipendium der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie
- 05.-08. September 2007 Meeting der **Deutschen Gesellschaft Für Immunologie** (DGFI) in Heidelberg. Vortrag/Posterpräsentation: *„The role of Th1 and Th17 cells in inflammatory reactions in vivo”*
- 11.-14. Juni 2008 Meeting der *European League Against Rheumatism (EULAR)* in Paris, Frankreich. Posterpräsentation: *“The role of Th1 and Th17 cells in inflammatory reactions in vivo”*  
Reisestipendium der Glaxo-Smith-Kline-Stiftung
- 03.-06. September 2008 Gemeinsames Meeting der **Deutschen Gesellschaft Für Immunologie** (DGFI) und der **Österreichischen Gesellschaft für Allergologie und Immunologie** (ÖGAI) in Wien, Österreich. Vortrag: *„Helper T cells induce acute inflammation but B cells are necessary for chronic AIA”*

## Danksagung

Hiermit möchte ich mich in erster Linie bei allen Freunden und Bekannten bedanken, die nicht nur innerhalb der letzten Wochen und Monate nachsichtig mit mir waren, sondern gleichzeitig mich auch „im Ausnahmezustand“ toleriert haben.

Ein besonderer Dank gilt Dieter Hartenberger, dem ich besonders in den letzten Wochen des Schreibens mit dem permanenten Stresssyndrom des „Ich hab keine Zeit, ich muss schreiben“ ziemlich viel zugemutet habe. Danke für deine Unterstützung.

Ich möchte mich ferner bei so ziemlich jedem aktuellen und ehemaligen Arbeitskollegen der AG Scheffold bedanken. Dank euch wäre ich fast in der Betty-Ford-Klinik gelandet und genieße mein Leben nun in vollen Zügen ☺. Buchstäblich bin ich herzlich in die Gruppe aufgenommen worden und bin stolz darauf, so ziemlich jede Kneipe im Prenzlauer Berg und jede zweite Kneipe in Mitte kennengelernt zu haben. Ihr seid spitze Mädels! Ich werde die Doku-, Tapas- und Scheffold-Abende und die Tischtennisstunden vermissen ☹.

Bei meinen Eltern und meiner Familie möchte ich mich für die Unterstützung während meines Biochemie-Studiums bedanken.

Ein besonderes Dankeschön möchte ich Petra Starke aussprechen, die mich als Häufchen Elend aufgesammelt hat und mich auf den direkten Weg (in Andreas Radbruch's Büro) gebracht hat. Vielen Dank. Gleichzeitig geht ein Dankeschön an Andreas Radbruch, der mir bei der finalen (richtigen) Wahl des Dissertationsthemas unterstützt hat und ebenfalls ein Dank geht an Alex Scheffold für die Aufnahme in seinem „Verein“ und für viele hilfreiche und lehrreiche Diskussionen rund um das Thema „Die T-Zelle – eine Geschichte voller Missverständnisse“.

Vielen Dank auch an alle Kollegen aus dem DRFZ, mit denen ich so manche wilde Party, aber auch viele Diskussionen über meine Arbeit haben durfte. Ihr werdet mir fehlen.

Letztendlich gilt Prof. Radbruch und Prof. Blankenstein mein Dank dafür, dass sie sich als Gutachter für meine Arbeit zur Verfügung gestellt haben.