

**Der Einfluss CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorischer  
T-Zellen auf die Glucose-6-Phosphat-Isomerase  
induzierte Arthritis**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Andreas Reichel

geboren am 19.05.1983 in Erfurt

Gutachter:

1. Prof. Dr. Thomas Kamradt, Jena
2. Prof. Dr. Rolf Bräuer, Jena
3. Prof. Dr. Manfred Blessing, Leipzig

Tag der öffentlichen Verteidigung: 05.06.2009

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AIA	<i>Antigen-Induced-Arthritis</i> /Antigen-induzierte Arthritis
AK	Antikörper
APC	<i>Antigenpresenting Cell</i> / Antigenpräsentierende Zelle
APC	<i>Allophycocyanin</i>
BrdU	Bromo-5`Desoxyuridin
CII	<i>Collagen III</i> /Kollagen II
CCP	<i>Cyclic Citrullinated Peptide</i> /Zyklisches Citrulliniertes Peptid
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CED	Chronisch Entzündliche Darmerkrankung
CFA	<i>Complete Freund's Adjuvant</i> / Komplettes Freund'sches Adjuvanz
CIA	<i>Collagen-Induced-Arthritis</i> /Kollagen-induzierte Arthritis
COX	Cyclooxygenase
CTLA-4	Cytotoxisches Lymphozytenantigen 4
Cy	<i>Cyanine Dye</i>
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid
DC	<i>Dendritic Cell</i> / Dendritische Zelle
DIG	Digoxigenin
DIP	Distal Interphalageal
DMARDs	<i>Disease Modifying Anti Rheumatic Drugs</i>
EAE	<i>Experimental Autoimmune Encephalomyelitis</i> Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
Ebi3	<i>Epstein-Barr Virus-induced Gene 3</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbend Assay</i>
EMA	<i>Ethidium Monoazide</i>
Fab	<i>Fragment antigen binding</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated Cell Sorting</i>
Fc	<i>Fragment crystallizable</i>
FITC	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i>
Foxp3	<i>Forkhead box protein P3</i>
FR4	Folatrezeptor 4

---

FSC	<i>Forward Scatter Channel</i>
GITR	Glucocorticoid induzierter Tumornekrosefaktor-Rezeptor
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GM-CSF	Granulozyten- Makrophagen-Koloniestimulierender Faktor
G6PI	Glucose-6-Phosphat-Isomerase
HE	Hämatoxylin und Eosin
HEV	<i>High- Endothelial Venules</i>
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
HTLV	<i>Human T-Cell-Leukemia-Virus</i>
IDO	<i>Indoleamine 2,3-dioxygenase</i>
IBD	<i>Inflammatory Bowel Disease</i>
ICOS	<i>Inducible Costimulator</i>
ICOSL	<i>Inducible Costimulatory -Ligand</i>
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IL-1Ra	Interleukin-1 Rezeptor Antagonist
Int	<i>Intermediate/Intermediär</i>
i.p.	Intraperitoneal
IPEX-Syndrom	<i>Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome</i>
IRF4	<i>Interferon-Regulatory Factor 4</i>
Iso	Isotypkontrolle
LAG	Lymphozyten Aktivierungsgen
...L	Ligand
mBSA	methyliertes Bovines Serumalbumin
MCP	Metacarpophalangeal
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MMP	Matrixmetalloproteinase
MS	Multiple Sklerose
MTP	Metatarsophalageal
MTX	Methotrexat
NFAT	<i>Nuclear Factor of Activated T cells</i>
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika

PacBlue	<i>Pacific Blue</i>
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PD-1	<i>Programmed Death 1</i>
PE	<i>R-Phycoerythrin</i>
PerCP	<i>Peridin Chlorophyll Protein</i>
PIP	Proximal Interphalageal
RA	Rheumatoide Arthritis
RF	Rheumafaktoren
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institut</i>
s.c.	Subkutan
SSC	<i>Side Scatter Channel</i>
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
Teff	Effektor-T-Zelle
Tfh	Follikuläre T-Helferzelle
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
Th	T-Helferzelle
TLR	Toll-Like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	Regulatorische T-Zellen
TZR	T-Zell Rezeptor
ZAP 70	<i>ζ associated protein 70</i>

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2. Einleitung</b>	<b>3</b>
2.1. Die Rheumatoide Arthritis	3
2.2. Tiermodelle der Rheumatoiden Arthritis	5
2.2.1. Die G6PI-induzierte Arthritis	5
2.2.2. Andere Tiermodelle der Rheumatoiden Arthritis	6
2.3. CD4 <sup>+</sup> T-Zellen in der Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis	9
2.3.1. Die Th17 Zellen	11
2.3.2. Regulatorische T-Zellen (Treg)	12
<b>3. Ziele der Arbeit</b>	<b>22</b>
<b>4. Material und Methoden</b>	<b>24</b>
4.1. Material	24
4.1.1. Versuchstiere	24
4.1.2. Chemikalien und Enzyme	24
4.1.3. Medien, Puffer und Lösungen	25
4.1.4. Verbrauchsmaterialien	27
4.1.5. Geräte, Software	28
4.1.6. Antikörper	28
4.2. Methoden	31
4.2.1. Herstellung von rekombinantem humanen G6PI (huG6PI)	31
4.2.2. Immunisierung der Mäuse	32
4.2.3. Behandlung der Mäuse mit anti-CD25-Antikörper	32
4.2.4. Beurteilung des Schweregrades der Arthritis	33
4.2.5. Histologie	34
4.2.6. Gewinnung von Zellen aus Milz und Lymphknoten	34
4.2.7. Gewinnung von Blutserum	35
4.2.8. Messung der <i>in vitro</i> Proliferation mit [ <sup>3</sup> H]-Thymidin	35
4.2.9. Messung der <i>in vivo</i> Proliferation mit BrdU	35

---

4.2.10. Durchflusszytometrie	36
4.2.11. Isotypspezifischer ELISA	41
4.2.12. IL-17 ELISA	42
4.2.13. Graphische und statistische Auswertung	43
<b>5. Ergebnisse</b>	<b>44</b>
5.1. Depletion CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> regulatorischer T-Zellen	44
5.2. Effekte der Depletion CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> regulatorischer T-Zellen auf den Verlauf der G6PI-Arthritis	47
5.3. Messung der <i>in vitro</i> Proliferation nach Treg Depletion	52
5.4. Messung der <i>in vivo</i> Proliferation nach Treg Depletion	55
5.5. Einfluss der Tregs auf die zelluläre Immunantwort	57
5.6. Einfluss der Tregs auf die humorale Immunantwort	63
5.7. Einfluss der Tregs auf die Expression kostimulatorischer Moleküle	65
<b>6. Diskussion</b>	<b>71</b>
6.1. Depletion CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> regulatorischer T-Zellen	71
6.2. Effekte der Depletion CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> regulatorischer T-Zellen auf den Verlauf der G6PI-Arthritis	73
6.3. Bedeutung der Tregs für die Proliferation in der G6PI Arthritis	77
6.4. Bedeutung der Tregs für die zelluläre Immunantwort	79
6.5. Bedeutung der Tregs für die humorale Immunantwort	82
6.6. Bedeutung der Tregs für die Expression kostimulatorischer Moleküle	83
6.6.1. Expression kostimulatorischer Moleküle auf Teffs	83
6.6.2. Expression kostimulatorischer Moleküle auf Tregs	86
<b>7. Schlussfolgerungen</b>	<b>90</b>
<b>8. Literaturverzeichnis</b>	<b>92</b>
<b>9. Anhang</b>	<b>106</b>

## 1. Zusammenfassung

Ein Einfluss von regulatorischen T-Zellen (Tregs) auf die Pathogenese der Arthritis wurde in vielen Tiermodellen beobachtet, dennoch ist das Wissen über Tregs und ihre Funktion *in vivo* lückenhaft. Die Rolle der Tregs sollte daher im Modell der G6PI-induzierten Arthritis eingehender analysiert werden.

Um den Einfluss der Tregs auf die G6PI Arthritis *in vivo* untersuchen zu können, wurden die CD25 positiven Tregs mit einem entsprechenden Antikörper (PC61) depletiert. Diese Depletion führte zu einer Exazerbation und Chronifizierung der Arthritis, während in Kontrolltieren eine spontane Remission der Erkrankung nach 30 Tagen beobachtet wurde. Nur in den depletierten Tieren waren am Ende der Untersuchungen in den betroffenen Gelenken Destruktionen und Ankylosen nachweisbar. Zur Klärung der zugrunde liegenden Mechanismen wurde in weiteren Experimenten der Treg Einfluss auf die humorale und zelluläre Immunantwort in Milz und drainierenden Lymphknoten untersucht.

Mit durchflusszytometrischen Messungen wurde der prozentuale Anteil BrdU<sup>+</sup> Zellen bestimmt, wodurch die Proliferation von T- und B-Zellen *in vivo* analysiert werden konnte. Die zusätzliche Färbung von Foxp3 ermöglichte die Unterteilung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Foxp3<sup>-</sup> Effektor-T-Zellen (Teffs) und Foxp3<sup>+</sup> Tregs. Detailliertere Analysen der zellulären Immunantwort wurden mit durchflusszytometrischen Untersuchungen der Expression von Oberflächenmolekülen und der Sekretion von Zytokinen durchgeführt. Es zeigte sich, dass passend zu den beobachteten klinischen Effekten nach Depletion deutlich mehr Teffs proliferierten als in der Kontrollgruppe. Zudem produzierten diese Effektorzellen größere Mengen IL-17, das von entscheidender Bedeutung für die Arthritisinduktion war. In Übereinstimmung damit fand sich bei Analyse der Expression kostimulatorischer Moleküle, wie beispielsweise ICOS, ein stärkerer Aktivierungszustand der Teffs in depletierten Tieren.

Bei Analyse der humoralen Immunantwort ergab sich keine deutlich verstärkte Proliferation der B-Zellen nach Depletion. Mit Hilfe von ELISA-Messungen konnte allerdings im Vergleich zu Kontrolltieren ein starker Anstieg der antigenspezifischen Immunglobulinproduktion während des Krankheitsverlaufes gefunden werden.

Die Untersuchung der Treg Population ergab einige bemerkenswerte Ergebnisse. So zeigten BrdU Experimente, dass sowohl in depletierten als auch in Kontrolltieren die Tregs bereits während der Induktionsphase der Erkrankung stark proliferierten. Diese

Proliferation trat nach Depletion verstärkt auf, so dass bereits zum Höhepunkt der Arthritis kein deutlicher Unterschied in der Frequenz Foxp3<sup>+</sup> Zellen zwischen beiden Gruppen mehr nachweisbar war. Passend zu diesen Daten ergab die Analyse der Expression von Oberflächenmolekülen einen verstärkten Aktivierungszustand der Tregs nach Depletion.

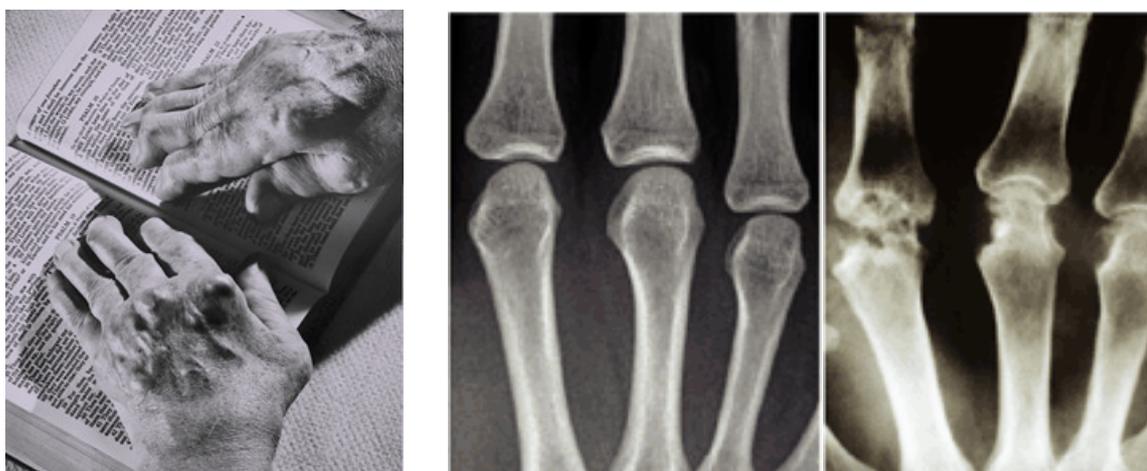
Zusammenfassend zeigte diese Arbeit, dass Tregs eine wichtige Rolle in der Limitierung der G6PI Arthritis spielen. Nach Depletion wurden bereits zu Beginn der Erkrankung massiv proliferierende und stark aktivierte Tregs nachgewiesen, die allerdings Exazerbation und Chronifizierung der Arthritis nicht verhindern konnten. Meine Ergebnisse lassen vermuten, dass Tregs bereits zum Zeitpunkt der Induktion einer Immunantwort in ausreichender Frequenz vorhanden sein müssen, um eine suppressive Wirkung zu gewährleisten. Die bloße Anwesenheit aktivierter und proliferierender Tregs würde demnach keine Schlussfolgerung auf ihre Funktionalität erlauben.

Diese Untersuchungen könnten Pathogenesevorgänge der Rheumatoiden Arthritis erklären, denn in Gelenken von RA-Patienten konnten solche scheinbar „hyperaktivierten“ Tregs nachgewiesen werden.

## 2. Einleitung

### 2.1. Die Rheumatoide Arthritis

Die Rheumatoide Arthritis (RA) ist mit einer Häufigkeit von 0,5 bis 1 % der Bevölkerung westlicher Industrienationen die häufigste entzündlich-rheumatische Erkrankung. Sie kann zwischen dem 3. und 80. Lebensjahr auftreten mit einem Gipfel in der 5. Lebensdekade. Frauen sind zwei bis dreimal häufiger betroffen als Männer (zusammengefasst in Alamanos und Drosos 2005). Typisch für die RA ist ein schubförmiger Verlauf mit symmetrischem Befall der Gelenke. Prädilektionsstellen sind dabei Handgelenke, Metacarpophalangeal (MCP)- und Metatarsophalangealgelenke (MTP), sowie die proximalen Interphalangealgelenke (PIP) an Hand und Fuß, die distalen Interphalangealgelenke (DIP) bleiben meist ausgespart. Im späteren Verlauf können auch weitere Gelenke betroffen sein (Lee und Weinblatt 2001). Erste klinische Zeichen der Erkrankung sind Schmerzen und Morgensteifigkeit der Gelenke, später kommt es aufgrund von Umbauvorgängen am Gelenk und den periartikulären Strukturen zu Deformitäten und Versteifungen bis zum kompletten Verlust der Gelenksfunktion (Abb. 1). Extraartikuläre Manifestationen, wie Rheumaknoten, Nieren- und Gefäßbeteiligungen, sind häufig bei RA zu finden (Lee und Weinblatt 2001) und gehen mit einer erhöhten Morbität und Mortalität einher (Turesson et al. 2003).



**Abb. 1: Gelenksdestruktionen bei Rheumatoider Arthritis.** Nach langjährigem chronischen Verlauf der Erkrankung können typische Veränderungen an den betroffenen Gelenken auftreten. Durch Destruktion der Handwurzelknochen und Subluxation der MCP-Gelenke kommt es zur Ulnardeviation der Hände. Schäden an Gelenkskapseln und an den Strecksehnen führen zu den sogenannten Schwanenhals- und Knopflochdeformitäten der Finger. Im Röntgenbild sind vergleichend Knochenstrukturen und Deformierungen betroffener Gelenke dargestellt (Quellen: NIH, Steiner und Smolen, 2003)

Sowohl Ursache als auch Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis sind bis heute nicht vollständig geklärt (Überblick in Firestein 2003, McInnes und Schett 2007). Histologisch findet man während der Entzündung der Synovialmembran einen aggressiven Pannus, der neben T- und B-Zellen auch neutrophile Granulozyten und Makrophagen enthält. Des Weiteren kommt es durch die Proliferation von Synoviozyten und Synovialmakrophagen, den Effektorzellen der RA, zu einer Hyperplasie der inneren Synovialmembran.

Welche Prozesse zum Beginn der entzündlichen Reaktionen im Gelenk führen, ist unklar. Diskutiert wird beispielsweise eine Aktivierung von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten durch Immunkomplexe aus Antikörpern und gelenkspezifischen Antigenen oder durch bakterielle Antigene (van der Heijden et al. 2000). Denkbar wäre auch eine Aktivierung des Komplementsystems durch Immunkomplexe (Neumann et al. 2002). Aktivierte Zellen des angeborenen Immunsystems sezernieren eine Reihe proinflammatorischer Zytokine, wie IL-1, IL-6, IL-15, IL-18, TNF- $\alpha$  und GM-CSF (McInnes und Liew 2005). Eine wichtige Rolle in den entzündlichen Prozessen spielen T-Zellen, denn die Behandlung mit einem anti-CTLA-4 Antikörper führt zur deutlichen Besserung der klinischen Symptomatik (Kremer et al. 2003, Smolen et al. 2007). Die Assoziation der Erkrankung mit einigen MHCII Haplotypen spricht ebenfalls für eine wichtige Rolle von T-Zellen (zusammengefasst in Weyand et al. 1998, Jawaheer et al. 2002). Diese autoreaktiven T-Zellen könnten im Gelenk durch die Sekretion von Zytokinen wie IFN- $\gamma$  und IL-17 (siehe 2.3.1) die entzündlichen Prozesse vorantreiben. Sie führen zur Aktivierung von Synoviozyten, die durch die Sekretion degradierender Enzyme, wie beispielsweise Matrixmetalloproteinasen (MMP), die Destruktion von Knochen und Knorpel auslösen (Huber et al. 2006). Autoantikörper gegen gelenksspezifische Antigene sind bekannt (Bugatti et al. 2007), in ungefähr 70 % aller RA-Patienten sind gegen IgG1 gerichtete IgM Antikörper, sogenannte Rheumafaktoren (RF), nachweisbar (Franklin et al. 1957). Daneben sind gegen citrullinierte Peptide gerichtete Antikörper (anti-CCP) bekannt. Der Nachweis von RF und anti-CCP Antikörpern ist ein wichtiges diagnostisches Kriterium für die RA (Rantapää-Dahlqvist et al. 2003). Für die Bedeutung von B-Zellen sprechen die deutlichen therapeutischen Effekte nach Behandlung mit dem anti-CD20 Antikörper Rituximab (Edwards et al. 2004, Cohen et al. 2006). Diskutiert werden neben der

Antikörperproduktion auch eine Reihe weiterer antikörperunabhängiger B-Zellfunktionen (Bugatti et al. 2007).

Die Therapie der Rheumatoiden Arthritis ist symptomatisch, eine Heilung ist derzeit nicht möglich. Daher sind die Ziele der Therapie eine Unterdrückung der Entzündung und der destruktiven Prozesse im Gelenk bei gleichzeitigem Erhalt der Gelenkfunktion und möglichst großer Mobilität des Patienten. Neben den Basistherapeutika (DMARDs) finden auch NSAR und Kortikosteroide in der Therapie der RA Anwendung. Neuere Therapieansätze bieten die sogenannten Biologicals, zumeist blockierende monoklonale Antikörper, die gegen verschiedene Strukturen und Mediatoren des Immunsystems gerichtet sind. Allerdings treten bei dieser extrem teuren Behandlung häufiger durch Infektionen bedingte Komplikationen auf. Gegenstand zukünftiger Forschung sollte es daher sein, die Ätiologie der RA besser zu verstehen, um eine gezieltere Therapie zu ermöglichen. Einen Überblick über derzeitige und zukünftige Therapieansätze gibt Smolen und Steiner (Smolen und Steiner 2003, Smolen et al. 2007).

## **2.2. Tiermodelle der Rheumatoiden Arthritis**

### **2.2.1. Die G6PI-induzierte Arthritis**

Es gibt eine Vielzahl von etablierten Tiermodellen, die sich mit der Entschlüsselung der Pathogenese der RA beschäftigen. Die Glukose-6-Phosphat Isomerase (G6PI) induzierte Arthritis stellt ein neueres Modell dar, bei dem ein ubiquitär vorkommendes Enzym in genetisch nicht veränderten Tieren eine organspezifische Autoimmunerkrankung auslöst (Schubert et al. 2004).

DBA/1 Mäuse werden mit G6PI in komplettem Freund'schen Adjuvanz (CFA) subkutan am Schwanzansatz immunisiert. Die Mäuse entwickeln mit einer Inzidenz von 100 % einen stets gleich bleibenden Verlauf der Arthritis. Am 9. Tag nach Immunisierung zeigen sich erste Zeichen der Entzündung in Form von Rötung und Schwellung. Das Maximum der Erkrankung liegt zwischen Tag 14 und 15 und klingt bis zum Tag 30 ab. Es sind vor allem die Sprunggelenke der Vorder- und Hinterpfoten, sowie Metacarpal- bzw. Metatarsal- und Interdigitalgelenke betroffen. Histologisch findet sich ein massiver Pannus der Synovialmembran, sowie starke Knochen- und Knorpeldestruktionen.

Untersuchungen zeigen, dass in der G6PI Arthritis T-Zellen und B-Zellen eine wichtige Rolle spielen. Im Gegensatz zu anderen etablierten Modellen, findet man einen deutlich stärkeren Einfluss von CD4<sup>+</sup> T-Zellen. So zeigen Experimente mit einem depletierenden anti-CD4 Antikörper, dass CD4<sup>+</sup> T-Zellen nicht nur in der Induktionsphase, sondern auch in der Effektorphase eine entscheidende Rolle spielen (Schubert et al. 2004). Ein Zusammenhang mit den MHCII Haplotypen H2q und H2p konnte gezeigt werden (Bockermann et al. 2005).

Bei der Untersuchung der B-Zellen findet man schon früh eine starke Produktion von Antikörpern aller Subklassen gegen G6PI. Am stärksten ist IgG1 vertreten. Es konnte bisher durch Transfer von Serum oder verschiedener Antikörperkombinationen keine Arthritis in Empfängermäusen ausgelöst werden (Schubert et al. 2004), was in einigen anderen Arthritismodellen möglich ist. Für eine Beteiligung von B-Zellen spricht jedoch, dass in  $\mu$ MT-Mäusen, die keine B-Zellen besitzen, eine Arthritis nicht ausgelöst werden kann (Bockermann et al. 2005). Auch der Verlust von Fc $\gamma$ R wirkt sich protektiv auf die G6PI Arthritis aus (Schubert et al. 2004).

Obwohl eine Publikation die Bedeutung von G6PI als RA-Autoantigen postulierte (Schaller et al. 2001), konnten detailliertere Folgestudien dies nicht bestätigen (Schubert et al. 2002, Matsumoto et al. 2003, Kamradt und Schubert 2005). Die G6PI Arthritis bietet einige Vorteile für die Untersuchung pathogenetischer Mechanismen der Rheumatoiden Arthritis: Man findet einen vergleichbaren Gelenksbefall und ein ähnliches histologisches Bild wie in der RA, zudem bietet die einfache Handhabung und der stets gleiche Verlauf der Arthritis gute Untersuchungsmöglichkeiten.

Im Gegensatz zu einigen anderen Modellen scheinen CD4<sup>+</sup> Zellen in der Pathogenese der G6PI Arthritis eine große Rolle zu spielen. Die spontane Remission der Erkrankung und erste Vorarbeiten geben Hinweise, dass regulatorische T-Zellen von Bedeutung sein könnten. Daher ist dieses Modell sehr gut für die Untersuchung von CD4<sup>+</sup> Effektorzellen und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen geeignet.

### **2.2.2. Andere Tiermodelle der Rheumatoiden Arthritis**

Es gibt eine Vielzahl weiterer Tiermodelle, in denen eine der RA ähnlichen Arthritis ausgelöst werden kann (zusammengefasst in Tabelle 1). Die Arthritis wird in den Tieren auf unterschiedliche Art induziert oder die Tiere erkranken spontan aufgrund genetischer Modifikationen.

**Tab.1:** Übersicht verschiedener Arthritismodelle

Substanzvermittelt	Modell	Referenz
G6PI	G6PI Arthritis	(Schubert et al. 2004)
CII	Kollagen-induzierte Arthritis (CIA)	(Courtenay et al. 1980)
mBSA	Antigen-induzierte Arthritis (AIA)	(Brackertz et al. 1977)
Streptokokken Zellwand	Streptokokken-Zellwand-Arthritis	(Koga et al. 1985)
Genetisch		
Kreuzung	K/BxN	(Kouskoff et al. 1996)
Mutation	SKG (ZAP 70)	(Sakaguchi et al. 2003)
	MRL-lpr	(Hang et al. 1982)
	gp130	(Atsumi et al. 2002)
Transgen	TNF- $\alpha$	(Keffer et al. 1991)
	IL-1	(Niki et al. 2001)
	HTLV-1	(Iwakura et al. 1991)
<i>Knock-out</i>	IL-1R Antagonist (IL-1Ra)	(Horai et al. 2000)

Eine Möglichkeit der Induktion besteht in der Immunisierung der Mäuse mit einem speziellen Antigen. Dies wurde zuvor bereits für die G6PI Arthritis beschrieben, das bekannteste Beispiel ist aber die Kollagen-induzierte Arthritis (CIA) (Cho et al. 2007). Nach Immunisierung suszeptibler Mausstämmen mit Kollagen II (CII) in Freund'schem Adjuvanz wird eine Arthritis induziert (Courtenay et al. 1980). Nachteile dieses Modells sind das Fehlen eines einheitlichen Protokolls für die Induktion und der variable Krankheitsbeginn. Die B-Zellen sind von entscheidender Bedeutung in der CIA, ein Transfer von Serum aus erkrankten Tieren kann in nicht-suszeptiblen Stämmen ebenfalls eine Arthritis auslösen (Stuart und Dixon 1983, Englert et al. 1986, Holmdahl et al. 1990). Allerdings kann ohne die für die „B-Zellhilfe“ wichtigen CD4<sup>+</sup> T-Zellen keine Arthritis induziert werden. Experimente zeigten, dass durch die frühzeitige Behandlung mit einem T-Zellspezifischen Antiserum (Brahm und Trentham 1984) oder einem depletierenden anti-CD4 Antikörper (Ranges et al. 1985) die Entwicklung einer Arthritis verhindert wurde. Auch das Komplementsystem (Morgan et al. 1981, Reife et al. 1991) und Fc $\gamma$ -Rezeptoren (Kleinau et al. 2000) spielen in der Pathogenese der CIA eine wichtige Rolle.

Durch verschiedene genetische Manipulationen kann eine Arthritis induziert werden, wodurch die beteiligten Mechanismen näher untersucht werden können. So kann beispielsweise durch die transgene Überexpression von humanem TNF (Keffer et al. 1991), IL-1 (Niki et al. 2001) oder durch Ausschalten des IL-1Ra (Horai et al. 2000), einem antagonistischen Rezeptor von IL-1, in Mäusen eine Arthritis induziert werden. Eine Mutation von gp130, einem transmembranen Rezeptorteil, erhöht die Sensitivität gegenüber dem proinflammatorischen Zytokin IL-6 (Atsumi et al. 2002) und löst eine Arthritis aus. Diese Modelle spiegeln die Bedeutung unterschiedlicher Zytokine für die Entwicklung der Arthritis wider. Neben diesen induzierbaren Arthritiden gibt es auch Modelle in denen sich eine Arthritis spontan entwickelt. Auf die Bedeutung von T-Zellen verweist ein Modell in SKG Mäusen. Eine Mutation von ZAP-70, einem wichtigen Molekül in der Signaltransduktion von T-Zellen, führt zur Entwicklung einer chronischen Arthritis (Sakaguchi et al. 2003). Das bekannteste Modell einer spontanen Arthritis ist das K/BxN-Modell: Mäuse mit einem transgenen T-Zellrezeptor (TZR), der kreuzreaktiv für ein G6PI Epitop ist, werden mit NOD Mäusen gekreuzt. Diese weisen ein besonderes MHCII Allel auf, in dessen Kontext das Antigen den transgenen T-Zellen präsentiert werden muss, damit die Tiere innerhalb von 4 bis 5 Wochen nach der Geburt eine schwere, chronische Arthritis entwickeln. Werden CD4<sup>+</sup> T-Zellen frühzeitig mit einem anti-CD4 Antikörper blockiert, entwickelt sich erst nach Absetzen der Behandlung eine Arthritis (Kouskoff et al. 1996). Dass B-Zellen eine zentrale Rolle in der Pathogenese spielen, zeigt das Fehlen von Arthritiszeichen in B-Zelldefizienten K/BxN/ $\mu$ MT-Mäusen (Kouskoff et al. 1996). K/BxN Mäuse entwickeln hohe Antikörpertiter gegen G6PI. Der Transfer von Serum oder Antikörperkombinationen aus erkrankten Tieren reicht aus, um eine Arthritis in Empfängermäusen zu induzieren (Korganow et al. 1999). Dies spricht für eine wichtige Rolle von Antikörpern in der Entstehung der Arthritis. Auch Fc $\gamma$ R (Corr und Crain 2002, Ji et al. 2002), Komplement (Ji et al. 2002) und neutrophile Granulozyten (Wipke et al. 2004) sind für die Pathogenese unerlässlich. An diesem Modell kann man vor allem die Rolle von B-Zellen und Antikörpern für die Arthritisentstehung näher untersuchen. Die zahlreichen Antikörper, die man beim Menschen finden kann (Rheumafaktoren, anti-CCP) und die erfolgreiche anti-CD20 Behandlung sprechen für die Rolle von B-Zellen in der RA-Pathogenese (Edwards et al. 2004, Cohen et al. 2006).

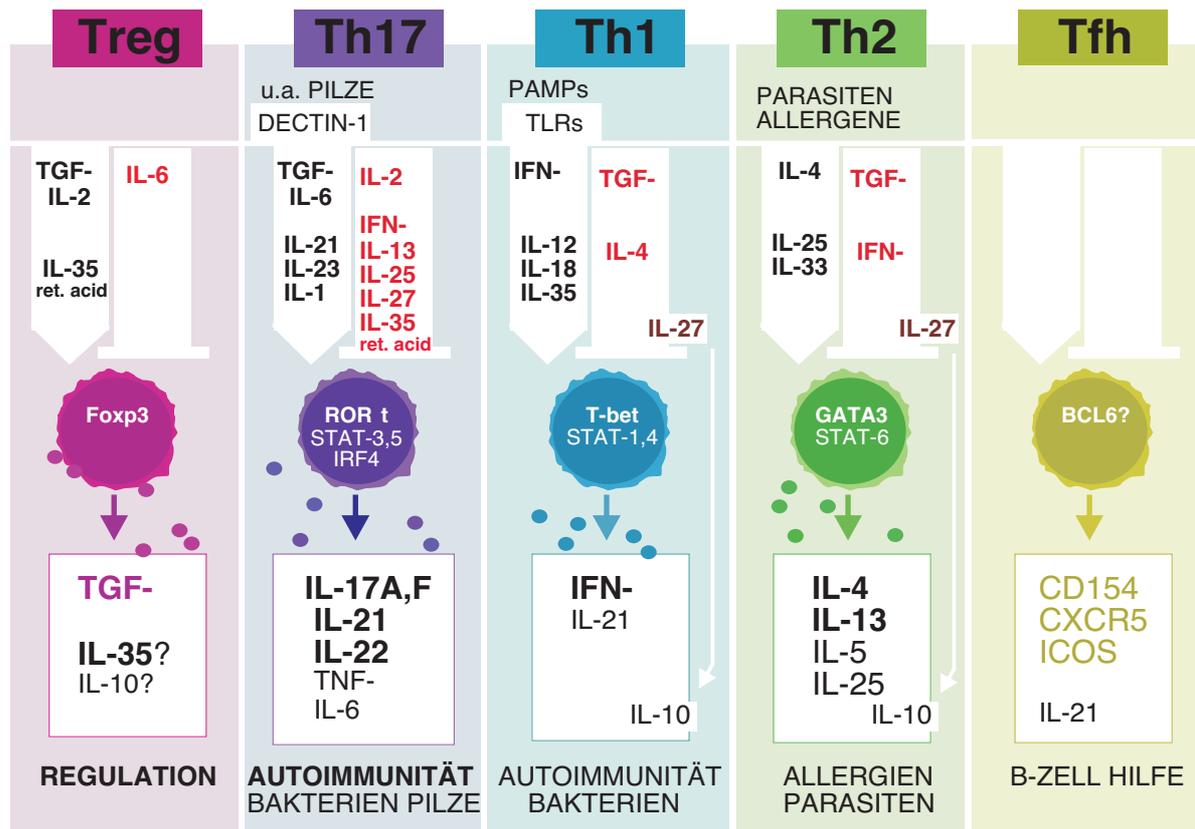
Wie in der Vielzahl von Tiermodellen gezeigt wurde, spielen unterschiedliche Mechanismen und Zellpopulationen in der Pathogenese eine Rolle. Denkbar wäre, dass bei Erkrankungen des rheumatoiden Formenkreises einzelne Mechanismen unterschiedlich stark beteiligt sind. Die Möglichkeit, in den verschiedenen Modellen Einzelaspekte der Arthritispathogenese zu untersuchen, ermöglicht eine Erweiterung des Verständnisses der RA und eine Entwicklung neuer Therapieansätze.

### **2.3. CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Pathogenese der Rheumtoiden Arthritis**

Für die Entwicklung von T-Zellvermittelten Immunantworten ist die Aktivierung und Proliferation der T-Zellen von entscheidender Bedeutung. Neben der Antigenerkennung am TZR sind zusätzlich Rezeptorbindungen von kostimulatorischen Molekülen und Zytokinen erforderlich. Durch diese Signale wird eine Reihe biochemischer Prozesse induziert, wodurch die T-Zellen proliferieren und sich in Effektorzellen (Teffs) differenzieren. Im Zuge dieser Abläufe werden zahlreiche Moleküle, welche *Homing*, Aktivierung und Überleben der Zellen vermitteln, auf der Zelloberfläche exprimiert (Frauwirth und Thompson 2002, McKinstry et al. 2007). Aufgrund ihrer spezifischen Expression können diese Moleküle für die Charakterisierung verschiedener T-Zellpopulationen genutzt werden. Einige dieser Moleküle sollen im Folgenden kurz beschrieben werden. CD62L (L-Selektin) ist ein Molekül, das überwiegend auf naiven T-Zellen exprimiert wird. Es ist verantwortlich für die Einwanderung in sekundär-lymphatische Organe über HEVs (Manolios et al. 1991). Nachdem in diesen Organen die antigenspezifische Aktivierung der T-Zellen erfolgt ist, wird CD62L von der Oberfläche abgespalten (Yang et al. 2006, Latham et al. 2005). Im Gegensatz dazu werden auf aktivierten T-Zellen andere Moleküle, beispielsweise Chemokinrezeptoren wie CCR6 exprimiert, die eine Auswanderung in das entzündete Gewebe ermöglichen (Hirota et al. 2007b). Zusätzlich können auf der Oberfläche weitere Moleküle nachgewiesen werden, die über die entsprechenden Bindungen eine Verstärkung der T-Zellaktivierung vermitteln. Dazu zählen unter anderem CD69 (Sancho et al. 2005, Latham et al. 2005) und CD134 (OX40) (Sugamura et al. 2004, Horai et al. 2004). Auch die zur B7-Rezeptorfamilie gehörenden Moleküle ICOS und PD-1 werden verstärkt auf aktivierten T-Zellen exprimiert. Durch ICOS Stimulation kann die T-Zellspezifische Zytokinproduktion verstärkt werden. In verschiedenen Tiermodellen zu Arthritis, MS

und Diabetes wurde die Rolle von ICOS in der Pathogenese untersucht (zusammengefasst in Greenwald et al. 2005). Beispielsweise kann in der CIA durch Blockade der ICOS-ICOSL Interaktion die Erkrankung deutlich gemildert werden (Iwai et al. 2002). ICOS<sup>-/-</sup> Mäuse zeigen keinerlei Zeichen einer Erkrankung (Nurieva et al. 2003). Das zur gleichen Familie gehörende Molekül PD-1 ist im Gegensatz dazu an der Abschaltung von Immunantworten beteiligt, wie aus dem autoimmunähnlichen Phänotyp von PD-1<sup>-/-</sup> Mäusen geschlossen werden konnte (Okazaki und Honjo 2006, Keir et al. 2007).

Neben der Expression von Oberflächenmolekülen können T-Zellen auch durch die Produktion von Effektorzytokinen charakterisiert werden. Schon vor über 20 Jahren wurde postuliert, dass Teffs, basierend auf ihrem Zytokinprofil, in Th1 und Th2 Zellen eingeteilt werden können (Mosmann et al. 1986). Th1 Zellen produzieren vorrangig IFN- $\gamma$  und sind an der Abwehr intrazellulärer Erreger beteiligt. Th2 Zellen sind durch die Produktion von IL-4, IL-5 und IL-13 gekennzeichnet und spielen bei der Abwehr parasitärer Infektionen eine Rolle. Allerdings kann sich die adaptive Immunabwehr auch nachteilig auf den Organismus auswirken, denn diese Zellen sind auch für die Entstehung von Autoimmunität (Th1) und Allergien (Th2) verantwortlich (Steinman 2007, Bettelli et al. 2007b). Inzwischen konnten weitere Subpopulationen mit distinkten Effektorfunktionen beschrieben werden (Übersicht in Abb. 2), dazu zählen die folliculären Th Zellen (Tfh), die für die „B-Zellhilfe“ in den Keimzentren der sekundär-lymphatischen Organe zuständig sind (Reinhardt et al. 2006), sowie die im Folgenden ausführlicher beschriebenen Th17 Zellen und Tregs.



**Abb. 2: Vereinfachtes Schema der verschiedenen CD4<sup>+</sup> T-Zellsubpopulationen.** Bislang wurden die fünf hier gezeigten T-Helferzellpopulationen *in vivo* beschrieben, Grundlage für die Inhalte dieser Abbildung ist der derzeitige Kenntnisstand. Soweit bekannt, sind auslösende *Trigger* und die entsprechenden APC-Rezeptoren aufgeführt. Aktivierte APCs sezernieren ein variables Muster unterschiedlicher Zytokine, wodurch sich aus naiven T-Zellen die verschiedenen Subpopulationen entwickeln. Die induzierenden Zytokine sind schwarz dargestellt, während hemmende Zytokine rot abgebildet sind (ret.acid = *retinoic acid*). Die charakterisierenden Transkriptionsfaktoren der T-Zellpopulationen sind jeweils im Zellkern angegeben. Die für die Funktion wichtigen Effektorzytokine sind unterhalb der unterschiedlichen Th Zellen aufgelistet. Inhalte aus: (Laurence et al. 2007, Stockinger und Veldhoen 2007, Bettelli et al. 2007b, Kleinschek et al. 2007, Collison et al. 2007, Niedbala et al. 2007, Brüstle et al. 2007, Jankovic und Trinchieri 2007, Wan und Flavell 2007, Chackerian et al. 2007, LeibundGut-Landmann et al. 2007, Mucida et al. 2007).

### 2.3.1. Die Th17 Zellen

Die Th17 Zellen werden durch die Produktion von IL-17 charakterisiert, wobei neben verschiedenen IL-17 Formen (Kolls und Linden 2004) auch TNF- $\alpha$ , GM-CSF (Infante-Duarte et al. 2000) IL-21 (Bettelli et al. 2007a) und IL-22 (Liang et al. 2006) gebildet werden. Unter *in vitro* Kulturbedingungen induziert die Kombination von TGF- $\beta$  und IL-6 die Generierung von Th17 Zellen (Veldhoen et al. 2006, Mangan et al. 2006, Bettelli et al. 2006), während der Zusatz von IL-2 zu dieser Kombination die Entstehung von Th17 Zellen blockiert (Laurence et al. 2007). Für die Stabilität der Th17 Zellen wird IL-23 benötigt (Bettelli et al. 2007a), während IL-27 die Produktion von IL-17 limitiert (Korn et al. 2007a). Auch IFN- $\gamma$  blockiert die Funktion der Th17

Zellen, was zahlreiche Beschreibungen der Exazerbation von Autoimmunerkrankungen in  $\text{IFN-}\gamma^{-/-}$  und  $\text{IFN-}\gamma\text{R}^{-/-}$  Mäusen erklärt (zusammengefasst in Steinman 2007). Jüngste Publikationen zeigen, dass Th17 Zellen eine zentrale Rolle in der Pathogenese von Autoimmunmodellen, wie beispielsweise CIA und EAE, spielen (zusammengefasst in Steinman 2007, Weaver et al. 2007). Vor allem für Arthritismodellen ist die entscheidende Effektorfunktion von IL-17 bekannt. IL-17 kann unter anderem die Expression von Wachstumsfaktoren und Chemokinen in Synoviozyten steigern und die Neubildung und Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten zum Gelenk fördern. Es führt zudem zur verstärkten Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 und IL-6, sowie von Matrixmetalloproteinasen (MMPs) in Synoviozyten, und trägt so entscheidend zur Knorpeldestruktion bei. Es hat einen positiven Einfluss auf die Osteoklastenneubildung und -aktivierung, was eine Zerstörung des Knochens zur Folge hat (zusammengefasst in Lubberts et al. 2005a, Weaver et al. 2007, Lubberts 2007).

IL-17 kann im Gelenk bei Patienten mit RA nachgewiesen werden (Chabaud et al. 1998, Kotake et al. 1999, Ziolkowska et al. 2000), wobei der bloße Nachweis von IL-17 noch keine Aussagen über die Rolle dieses Zytokins in der Pathogenese der RA zulässt. Untersuchungen in Arthritismodellen konnten in  $\text{IL-17}^{-/-}$  Mäusen (Nakae et al. 2003a) oder nach Blockade mit einem anti-IL-17 Antikörper (Lubberts et al. 2004, Koenders et al. 2005, Irmiler et al. 2007) eine deutliche Besserung des klinischen Bildes zeigen. Wegen der detaillierten tierexperimentellen Beobachtungen könnte der Einsatz gegen Th17 Zellen in Zukunft einen wichtigen therapeutischen Ansatz darstellen.

### **2.3.2. Regulatorische T-Zellen (Treg)**

Eine der größten Leistungen des Immunsystems ist es, die Vielfalt pathogener Antigene zu erkennen und gleichzeitig Autoimmunreaktionen zu verhindern, also zwischen körperfremden und körpereigenen Antigenen zu unterscheiden. Es gibt eine Reihe wichtiger Mechanismen, die für die Entstehung dieser Selbsttoleranz von Bedeutung sind. Einer dieser Mechanismen ist die aktive Suppression autoreaktiver T-Zellen durch regulatorische T-Zellen. Erstmals postuliert wurde dies vor über 30 Jahren, nachdem man zeigen konnte, dass eine Thymusentfernung bei Mäusen 3

Tage nach Geburt zu schweren Autoimmunerkrankungen führte (Überblick in Bonomo et al. 1995). Erst Mitte der 90'er Jahre wurden die regulatorischen T-Zellen durch Shimon Sakaguchi detaillierter untersucht. Dieser zeigte, dass CD4<sup>+</sup> Zellen mit supprimierenden Eigenschaften die  $\alpha$ -Kette des IL-2 Rezeptors (CD25) exprimierten (Sakaguchi et al. 1995).

In den letzten Jahren hat das Interesse und die Kenntnis um regulatorische T-Zellen stark zugenommen. Man unterteilt diese Zellen in natürlich vorkommende und adaptive regulatorische T-Zellen (Bluestone und Abbas 2003). Unter den adaptiven regulatorischen Zellen werden verschiedene T-Zellpopulationen zusammengefasst, die durch unterschiedlichste Stimulationen generiert werden können (Wan und Flavell 2007, Shevach 2006). Inwieweit diese regulatorischen Zellpopulationen *in vivo* eine Rolle spielen, bleibt jedoch fraglich.

Die natürlich vorkommenden CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen (im Folgenden als Tregs bezeichnet) werden im Thymus als eigenständige Subpopulation generiert (Bluestone und Abbas 2003, Itoh et al. 1999). Es wurde postuliert, dass das TZR-Repertoire der Tregs wesentlich stärker auf Autoantigene ausgerichtet ist als das von Teffs (Jordan et al. 2001, Hsieh et al. 2006, Hsieh et al. 2004). Neuere Untersuchungen konnten unter den Tregs jedoch nicht mehr autoreaktive Zellen nachweisen als in anderen Zellpopulationen (Pacholczyk et al. 2007).

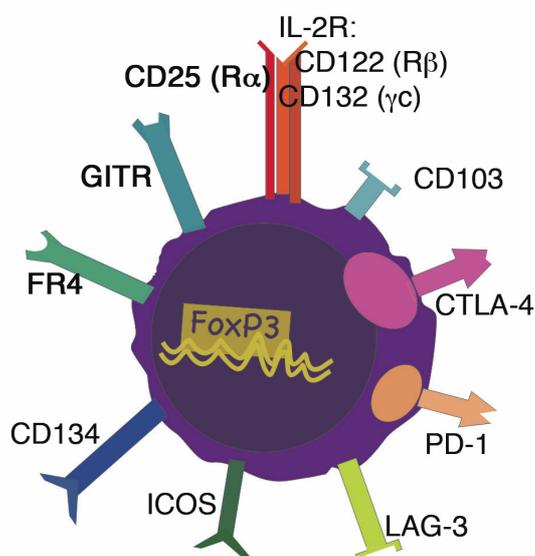
### **Charakterisierung von Tregs**

Lange Zeit war die Detektion der Tregs nur über die Expression von CD25 möglich. Dieses Molekül ist aber nicht spezifisch für Tregs, da es auch auf aktivierten Teffs vorkommt (Knoechel et al. 2005). Die Suche nach weiteren Markern zur spezifischen Charakterisierung der Tregs ist daher von großem Interesse. Einen großen Fortschritt brachte die Entdeckung des Transkriptionsfaktors Foxp3 (*forkhead family transcription factor*), welcher im Moment als Goldstandard in der Detektion regulatorischer T-Zellen gilt (Hori et al. 2003, Fontenot et al. 2003, Khattri et al. 2003). Eine Mutation im Foxp3 Gen konnte bereits 2001 für *scurfy*-Mäuse nachgewiesen werden (Brunkow et al. 2001). Diese Tiere entwickeln Autoimmunreaktionen mit massiven Lymphozytenproliferationen, Entzündungen in Haut und Leber (Godfrey et al. 1991) und zeigen eine erhöhte Produktion proinflammatorischer Zytokine (Kanangat et al. 1996). Mehrere Arbeitsgruppen

konnten zeigen, dass Foxp3 vorrangig von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen gebildet wird und eine entscheidende Bedeutung für die Stabilität und Funktion der Tregs hat (Hori et al. 2003, Fontenot et al. 2003, Khattri et al. 2003). Beispielsweise kann die Expression von CD25 durch retrovirale Transduktion von Foxp3 in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen induziert werden, zudem zeigen diese Zellen suppressive Eigenschaften (Hori et al. 2003, Fontenot et al. 2003). In Foxp3<sup>-/-</sup> Mäusen zeigt sich ein *scurfy* ähnlicher Phänotyp (Fontenot et al. 2003, Khattri et al. 2003). Auch in späteren Arbeiten konnte durch die induzierbare Depletion von Foxp3 ein vergleichbares Bild mit massiven autoimmunen Reaktionen ausgelöst werden (Lahl et al. 2007, Kim et al. 2007, Scott-Browne et al. 2007).

Prinzipiell ist Foxp3 zur Detektion regulatorischer T-Zellen gut geeignet, da aber der Transkriptionsfaktor im Zellkern vorkommt und die Zellen zur Anfärbung permeabilisiert werden müssen, stehen sie für vitale Untersuchungen anschließend nicht mehr zur Verfügung. Einen neueren Ansatz zur Untersuchung von vitalen Tregs bieten Foxp3-*Knock-in* Mäuse, bei denen die Foxp3 Expression mit der Synthese von GFP (*green fluorescent protein*) gekoppelt wird. Folglich kann man in diesen Tieren die Tregs jederzeit *in vivo* sichtbar machen (Fontenot et al. 2005b).

Die Funktion von Foxp3 ist Gegenstand derzeitiger Untersuchungen. Bereits bekannt ist, dass Foxp3 durch die Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor NFAT, einem zentralen Regulator in der Aktivierung von T-Zellen, die Produktion von IL-2, IFN- $\gamma$  und IL-4 unterdrückt (Bettelli et al. 2005) und die Expression von CD25 und CTLA-4 auf den Tregs hochregulieren kann (Wu et al. 2006).



**Abb. 3: Darstellung der Moleküle zur Charakterisierung von aktivierten Tregs.** Gezeigt sind einige Moleküle die zur Charakterisierung der Tregs verwendet werden können. Das wichtigste Oberflächenmolekül ist CD25, die  $\alpha$ -Kette des IL-2 Rezeptors. Die Kombination von CD25 und dem Folatrezeptor 4 (FR4) ist eine Möglichkeit Tregs selektiv darzustellen. Die GITR Expression scheint sehr spezifisch für Foxp3<sup>+</sup> Tregs zu sein. Für die Identifizierung von Tregs ist der Transkriptionsfaktor Foxp3 derzeit der Goldstandard. Eine Reihe weiterer Moleküle werden nach Aktivierung in unterschiedlichem Ausmaß auf der Oberfläche von Tregs gefunden. Inhalte aus: (Yi et al. 2006, Raimondi et al. 2006, Yamaguchi et al. 2007, Fontenot et al. 2005a).

Neben CD25 werden eine Reihe weiterer Oberflächenmoleküle wie CTLA-4, GITR und FR4, vorrangig auf Tregs exprimiert (Abb. 3).

Für CTLA-4 wird eine wichtige Rolle in den Zellkontakt abhängigen, supprimierenden Mechanismen der Tregs vermutet. In CTLA-4-defizienten Mäusen, sowie nach Blockade von CTLA-4 *in vivo*, kommt es zur Entwicklung organspezifischer Autoimmunerkrankungen (Read et al. 2006, Liu et al. 2001). Ein denkbarer Effektormechanismus wäre die direkte Hemmung von Teffs durch die Konkurrenz von CTLA-4 und CD28 mit den Bindungspartnern CD80/86 (Paust et al. 2004). Zusätzlich könnte diese Bindung auch einen direkten modulierenden Einfluss auf den Aktivierungszustand der APCs vermitteln (Misra et al. 2004). Eine weitere Funktion von CTLA-4 ist die Beeinflussung des Tryptophanstoffwechsels in APCs durch die Induktion des Enzyms IDO sein, was zur Deaktivierung von Teffs führen könnte (Fallarino et al. 2006).

Im Gegensatz zu CTLA-4 hat GITR einen hemmenden Einfluss auf die Funktion der Tregs. Die Applikation eines agonistischen anti-GITR Antikörpers führt *in vitro* zu stärkeren Immunantworten (McHugh et al. 2002) und *in vivo* zur Unterdrückung der Suppressionsfähigkeit von Tregs (Shimizu et al. 2002). Es konnte gezeigt werden, dass GITR selektiv auf CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> und CD25<sup>-</sup>Foxp3<sup>+</sup> Zellen exprimiert wird. Die Depletion von GITR<sup>high</sup> Zellen führte zu schwereren autoimmunen Reaktionen als die Depletion mit CD25 (Ono et al. 2006). Die Expression von GITR korreliert mit der von Foxp3, allerdings ist GITR allein für die Identifizierung von Tregs nicht geeignet, da es sich bislang auf den Zellen nur schwach anfärben lässt. Eine aktuelle Arbeit zeigt, dass neben GITR auch die Koexpression von CD25 und FR4 auf der Zelloberfläche sehr charakteristisch für Tregs ist. Einen funktionell wichtigen Aspekt von FR4 zeigten Experimente, in denen die *in vivo* Applikation eines depletierenden anti-FR4 Antikörpers zu einer deutlichen Reduzierung Foxp3<sup>+</sup> Zellen führt. Bei einer frühen Behandlung 10 und 20 Tage nach Geburt kommt es zu einer Gastritis und Zystitis (Yamaguchi et al. 2007).

Auch weitere Moleküle werden auf der Oberfläche der Tregs gefunden, wobei die Expression aktivierungsabhängig verstärkt wird. Das Integrin CD103 wird auf einer Subpopulation Foxp3<sup>+</sup> Tregs exprimiert, die ins periphere, mukosale Gewebe auswandern können. Eine Theorie besagt, dass diese Zellen stärkere supprimierende Eigenschaften besitzen als CD103<sup>-</sup> Tregs (Lehmann et al. 2002, Huehn et al. 2004).

In 90 % aller Foxp3<sup>+</sup> T-Zellen wird PD-1 ebenso wie CTLA-4 im Zytoplasma gefunden, nach Aktivierung ist die Expression von PD-1 auf der Zelloberfläche von Tregs nachweisbar (Raimondi et al. 2006). Als Marker zur Detektion vitaler Tregs ist PD-1 aufgrund der intrazellulären Lokalisation ähnlich problembehaftet wie Foxp3. Das zur gleichen Rezeptorfamilie gehörende Molekül ICOS kann ebenfalls auf Tregs gefunden werden (Fontenot et al. 2005a).

CD134 wird im Ruhezustand auf Tregs exprimiert, nach Aktivierung wird es auf Tregs wie auch Tregs hoch reguliert (Vu et al. 2007). Neuere Untersuchungen konnten zeigen, dass die Bindung des CD134 Liganden zu gegensätzlichen Effekten in Tregs und Tregs führt (Vu et al. 2007, Kroemer et al. 2007, Takeda et al. 2004).

Ebenfalls nach Aktivierung ist das Lymphozyten-Aktivierungsgen 3 (LAG-3) auf Tregs zu finden (Huang et al. 2004), das MHCII Moleküle bindet. In LAG-3<sup>-/-</sup> Mäuse mit einer eingeschränkten MHCII Bindungsfähigkeit, ebenso wie in Wildtypmäuse nach Blockade mit einem anti-LAG-3 Antikörper ist die Treg Funktion stark eingeschränkt (Huang et al. 2004).

### **Die Bedeutung von IL-2 und TGF- $\beta$ für Tregs**

Untersuchung von *in vitro* Kulturen zur Entstehung von Tregs zeigen einen wichtigen Einfluss des Zytokinmilieus: Die Rolle von IL-2 wurde lang Zeit kontrovers diskutiert, denn erste Arbeiten postulierten, dass IL-2 nach antigenspezifischer Stimulation zur Proliferation von Tregs führte, aber gleichzeitig ihre supprimierenden Fähigkeiten unterdrückte (Takahashi et al. 1998, Thornton und Shevach 1998). Andererseits gibt es Hinweise aus weiteren *in vitro* Experimenten, dass die supprimierende Funktion der Tregs nach Zusatz eines neutralisierenden anti-IL-2 Antikörpers gestört werden konnte (Thornton et al. 2004). Es ist bereits seit längerem bekannt, dass IL-2<sup>-/-</sup> (Sadlack et al. 1993) oder IL-2R<sup>-/-</sup> Mäuse (Suzuki et al. 1995, Willerford et al. 1995) Autoimmunphänomene entwickeln. Durch eine Reihe von *in vivo* Experimenten wurde die Rolle von IL-2 präziser charakterisiert. Denkbar wäre ein Einfluss von IL-2 auf die Entwicklung regulatorischer T-Zellen im Thymus, auf das Überleben der Tregs in der Peripherie oder auch eine Bedeutung für die suppressiven Eigenschaften der Tregs. Elegante Experimente konnten mit Hilfe von IL-2 oder IL-2R defizienten Mäusen, sowie durch Applikation eines blockierenden anti-IL-2 Antikörpers zeigen, dass dieses Zytokin einen deutlichen Einfluss auf die Anzahl der Tregs in den sekundär-lymphatischen Organen hatte. Man fand eine massive

Reduktion der Zellzahl Foxp3<sup>+</sup> Zellen bei gleichbleibender Teff Anzahl. Die Bildung der Tregs im Thymus war kaum verändert und auch ihre supprimierende Funktion *in vitro* war nicht eingeschränkt. Es fand sich aber eine deutlich verminderte Proliferation der Tregs in der Peripherie (Fontenot und Rudensky 2005, Setoguchi et al. 2005, D'Cruz und Klein 2005). Da Tregs selber kein IL-2 produzieren können, stellt sich die Frage, welche Zellen für die Produktion von IL-2 verantwortlich sind. Zum größten Teil handelt es sich hierbei um CD4<sup>+</sup>CD25<sup>low</sup> Teffs (Setoguchi et al. 2005). Nach Aktivierung von Teffs wäre somit sichergestellt, dass eine ausreichende Treg Antwort ebenfalls induziert wird. Im Sinne eines negativen Feedback-Mechanismus würde dabei die Expansion der Teffs limitiert werden. Diskutiert wird, ob Tregs dies durch den Verbrauch von IL-2 ermöglichen können (de la Rosa et al. 2004, Pandiyan et al. 2007).

Für das antiinflammatorische Zytokin TGF- $\beta$  wird vermutet, dass es einen Einfluss auf die Proliferation und Funktion der Tregs hat. So zeigten TGF- $\beta$ <sup>-/-</sup> Mäuse ähnliche Autoimmunreaktion wie Foxp3<sup>-/-</sup> Tiere, zudem war die Zellzahl Foxp3<sup>+</sup> Zellen in der Peripherie, nicht aber im Thymus, deutlich reduziert (Marie et al. 2005). Einige *in vitro* Arbeiten zeigten, dass TGF- $\beta$  in nicht-regulatorischen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen die Expression von Foxp3 induziert, diese Zellen zeigten dann suppressive Eigenschaften (Chen et al. 2003, Fu et al. 2004, Park et al. 2004). Denkbar wäre, dass TGF- $\beta$  an der Homeostase der Tregs unter anderem durch Induktion von Zellen mit regulatorischen Eigenschaften in der Peripherie beteiligt ist.

Bemerkenswerterweise blockierte TGF- $\beta$  in Kombination mit proinflammatorischen Zytokinen, wie IL-6 und IL-1 die Entstehung von Tregs und führte stattdessen zur Generierung von Th17-Effektorzellen (Stockinger und Veldhoen 2007, Bettelli et al. 2007a).

### **Suppressionsmechanismen der Tregs**

Über die Effektorfunktion von Tregs ist bislang wenig bekannt. Zahlreiche *in vitro* Untersuchungen zeigten, dass Tregs unter Kulturbedingungen anerg sind und die Proliferation von aktivierten Teffs effizient unterdrücken konnten (Thornton und Shevach 1998, Takahashi et al. 1998, Kuniyasu et al. 2000, Itoh et al. 1999, Apostolou et al. 2002). In neueren Untersuchungen stellte sich jedoch heraus, dass diese Versuche die *in vivo* Situation nicht widerspiegeln, denn mit Hilfe von BrdU

Färbungen konnte gezeigt werden, dass Tregs *in vivo* stark proliferierten (Korn et al. 2007b, O'Connor et al. 2007). Dies könnte für die Aufrechterhaltung eines funktionsfähigen, homeostatischen Treg-Pools nötig sein (Gavin et al. 2002, Fisson et al. 2003). Weitere Untersuchungen zeigten, dass die Tregs zur Proliferation Antigenkontakt benötigen (Walker et al. 2003, Klein et al. 2003) und die Erkennung von MHC-Antigenkomplexen für das Überleben der Tregs wichtig war. In MHCII<sup>-/-</sup> Mäusen kam es zu einer deutlichen Reduzierung Foxp3<sup>+</sup> Zellen im Thymus und der Peripherie (Shimoda et al. 2006, Bochtler et al. 2006), transferierte CD25<sup>+</sup> Zellen konnten in diesen Mäusen nicht proliferieren (Gavin et al. 2002). Die verbliebenen Foxp3<sup>+</sup> Zellen in MHC<sup>-/-</sup> Mäusen besaßen suppressive Eigenschaften (Shimoda et al. 2006, Bochtler et al. 2006). Untersuchungen mit LAG-3 zeigten zusätzlich einen Einfluss der Erkennung von MHC-Antigenkomplexen auf die Treg-Funktion (siehe oben (Huang et al. 2004).

Weitere Untersuchungen zeigten, dass antigenspezifische Tregs stärker supprimierende Eigenschaften hatten als naive Tregs (Tarbell et al. 2004), so konnte der frühzeitige Transfer von antigenspezifischen Tregs die Entstehung einer Erkrankung unterdrücken, während Tregs mit einem polyklonalen TZR-Repertoire dazu nicht oder nur in geringerem Umfang in der Lage waren (Tang et al. 2004, Hori et al. 2002, Jaeckel et al. 2005, Ohata et al. 2007). Nach der initialen antigenspezifischen Aktivierung konnten Tregs zudem auch Tregs anderer Spezifität supprimieren (Mahnke et al. 2003, Thornton und Shevach 1998, Takahashi et al. 1998).

Ungeklärt bleibt die Frage, an welchem Ort Tregs im Verlauf einer Erkrankung wirken. In vielen Autoimmunmodellen konnten Tregs in den entzündeten Organen gefunden werden (Nguyen et al. 2007, Morgan et al. 2005, Frey et al. 2005), wobei im gut zu untersuchenden EAE Modell ein deutlicher Anstieg während der Remissionsphase zu verzeichnen war (McGeachy et al. 2005, Korn et al. 2007b, O'Connor et al. 2007). Diese Ergebnisse ließen die Schlussfolgerung zu, dass Tregs primär während der Remissionsphase im entzündeten Gewebe von Bedeutung waren, möglicherweise könnten sie aber bereits während der Induktionsphase in sekundär-lymphatischen Organen wirken.

Auch wie die Suppression durch Tregs vermittelt wird, ist noch weitgehend unbekannt. Es werden Zell-Zellkontakte, Zytokinproduktion in Tregs und Zytotoxizität als mögliche Effektormechanismen unterschieden (zusammengefasst in Miyara und Sakaguchi 2007). In ersten *in vitro* Suppressionsversuchen war die Unterdrückung der Teff Proliferation durch Tregs Zellkontakt abhängig, nach Trennung der Zellen durch eine semipermeable Membran war keine Suppression mehr möglich (Thornton und Shevach 1998, Takahashi et al. 1998). Für Tregs wurden vor allem Zellkontakt abhängige Mechanismen postuliert. Eine Möglichkeit stellte membrangebundenes TGF- $\beta$  dar, dass man auf Tregs beim Menschen und auch auf natürlich vorkommenden Tregs in der Maus fand (Nakamura et al. 2001, Oida et al. 2006). Auch die Untersuchungen von CTLA-4 und LAG-3 haben zur Möglichkeit zellkontaktabhängiger Suppressionsmechanismen von Tregs beigetragen (siehe oben). Neuere Untersuchungen ließen die Sekretion des Zytokins IL-35 als Effektormechanismus in Foxp3<sup>+</sup> Tregs vermuten. IL-35 ist ein Heterodimer aus Ebi3 und IL-12 $\alpha$ . Tregs aus Ebi3<sup>-/-</sup> oder IL-12 $\alpha$ <sup>-/-</sup> Mäusen zeigten *in vitro* reduzierte suppressive Eigenschaften und konnten *in vivo* die Entstehung einer Transfer-Colitis im Gegensatz zu Wildtyp-Tregs nicht verhindern (Collison et al. 2007). Für die CIA konnte gezeigt werden, dass die *in vivo* Applikation von rekombinantem IL-35 die IL-17 Produktion unterdrückte und zur Besserung der Erkrankung führte (Niedbala et al. 2007). Die Transskription von Ebi3 wird durch Foxp3 reguliert (Collison et al. 2007). Für einen Einfluss von Zytokinen als Effektormechanismus sprechen die antiinflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF- $\beta$ , welche von induzierbaren T-Zellpopulationen mit supprimierenden Eigenschaften sezerniert werden können (Bluestone und Abbas 2003, Paust und Cantor 2005). In der Heilungsphase von Infektions- und Autoimmunmodellen konnte die Existenz IL-10 produzierender Zellen nachgewiesen werden (McGeachy et al. 2005, Korn et al. 2007b, Jankovic et al. 2007, Taylor et al. 2006, Anderson et al. 2007), detaillierte Untersuchungen zeigten, dass in Infektionsmodellen IL-10 von Foxp3<sup>+</sup> Zellen produziert wurde (Jankovic et al. 2007, Taylor et al. 2006, Anderson et al. 2007, Baumgart et al. 2006, Scott-Browne et al. 2007).

Ein weiterer Effektormechanismus könnte sein, dass Tregs Effektorzellen direkt töten können. Humane Tregs setzten Perforin und Granzym A frei und könnten dadurch die Apoptose in Zielzellen auslösen (Grossman et al. 2004). Auch andere Arbeiten

konnten zeigen, dass Tregs über Granzym B perforin-abhängig oder unabhängig T- und B-Zellen töten konnten (Zhao et al. 2006, Gondek et al. 2005). Letztendlich können zum heutigen Zeitpunkt die Effektormechanismen der Tregs weder durch direkte Zell-Zellkontakte, Zytokinproduktion oder Zytotoxizität alleine erklärt werden. Inwieweit diese Mechanismen *in vivo* von Bedeutung sind ist ebenfalls noch unklar. Denkbar wäre, dass *in vivo* verschiedene Treg Subpopulationen existieren, welche unterschiedliche Effektormechanismen nutzen könnten.

### **Tregs im Menschen**

Die Charakterisierung von Tregs im Menschen ist wesentlich komplizierter als in der Maus. Eine klare Trennung zwischen FOXP3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs und FOXP3<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup> Teffs, ist schwierig, denn ein großer Anteil CD4<sup>+</sup> T-Zellen ist CD25<sup>int</sup>, aber nur CD25<sup>high</sup> Zellen zeigen regulatorische Eigenschaften. Die Expression von FOXP3 im Menschen ist nicht so stabil wie in der Maus (Ziegler 2006). Daher ist die Suche nach weiteren Markern zur genaueren Charakterisierung von Tregs beim Menschen sehr wichtig. Neuere Arbeiten postulierten, dass CD27 und CD127 zur Trennung von Tregs und Teffs genutzt werden könnten. So soll CD27 selektiv auf Tregs exprimiert werden (Ruprecht et al. 2005), während CD127 nur auf Teffs vorkommt (Seddiki et al. 2006). Allerdings wurde nach Aktivierung auch auf den Effektoren CD127 herunterreguliert, so dass dieser Marker nicht uneingeschränkt zur Trennung von Teffs und Tregs genutzt werden kann (Shevach 2006).

Trotz des Problems der genauen Charakterisierung von Tregs im Menschen lieferte gerade FOXP3 einen wichtigen Hinweis für ihre Bedeutung, denn beim seltenen X-chromosomal vererbten IPEX-Syndrom liegt eine Mutation im FOXP3-Gen vor. Es entwickelt sich eine Erkrankung, ähnlich der murinen *scurfy*-Mutation, so fand man unter anderem Diabetes, Thyroiditis, CED, Dermatitis, Nahrungsmittelallergien und schwere Infektionen (zusammengefasst in Torgerson und Ochs 2007). Bei vielen humanen Autoimmunerkrankungen konnten Defekte von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> Tregs gefunden werden, so zum Beispiel bei Patienten mit Multipler Sklerose (Viglietta et al. 2004), Diabetes mellitus Typ I (Lindley et al. 2005), Psoriasis (Sugiyama et al. 2005), und Myasthenia gravis (Balandina et al. 2005). Bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis fand man Tregs in der Synovialschleimhaut (Cao et al. 2003, de Kleer et al. 2004, Ruprecht et al. 2005, Möttönen et al. 2005, van Amelsfort et al. 2004), was daraufhin deuten könnte, dass sie für die Regulation der Entzündungsprozesse im

Gelenk eine wichtige Rolle spielen. Eine Vermehrung der FOXP3<sup>+</sup> Treg-Population innerhalb der PBMC wurde nach anti-TNF- $\alpha$  Antikörpertherapie bei Patienten mit RA gefunden (Nadkarni et al. 2007). Dennoch ist das Wissen um humane Tregs derzeit gering, zumal die Untersuchungsmöglichkeiten im Menschen sehr begrenzt sind. Ein möglicher therapeutischer Ansatz könnte in der Expansion von Tregs bestehen, um Selbsttoleranz eventuell wieder herzustellen. Eine Expansion von humanen Tregs *in vitro* und *in vivo* ist möglich (Levings et al. 2001, Battaglia et al. 2005). Erste Versuche mit *in vitro* antigenspezifisch expandierten Tregs wurden nach Transplantationen durchgeführt, um Abstoßungsreaktionen zu unterdrücken (Nishimura et al. 2004, Battaglia und Roncarolo 2006). Eine Bedeutung für die Behandlung von Autoimmunerkrankungen ist allerdings unklar. Eine weitere Erforschung der Funktion von Tregs in Tiermodellen ist daher unerlässlich.

### 3. Ziele der Arbeit

Regulatorische T-Zellen stellen einen wichtigen Mechanismus zur Aufrechterhaltung der Toleranz gegenüber Autoantigenen dar. Ihre große Bedeutung konnte in vielen Tiermodellen für Autoimmunerkrankungen unter anderem durch Depletionsexperimente gezeigt werden.

Ziel dieser Arbeit war, den Einfluss der Tregs auf die Pathogenese der G6PI Arthritis zu untersuchen. Vorteile dieses Modells gegenüber anderen Arthritismodellen waren die einfache Handhabung, der stets gleiche Verlauf der Arthritis, sowie die spontane Remission der Erkrankung.

Um die Rolle der Tregs zu untersuchen, sollten in DBA/1 Mäuse  $CD4^+CD25^+$  Tregs mit einem anti-CD25 Antikörper depletiert werden. Die klinischen Effekte dieser Depletion sollten durch die tägliche Beurteilung des Schweregrades der Arthritis und Gewichtsmessungen dokumentiert werden. Zusätzlich sollten im Verlauf der Arthritis histologische Untersuchungen von Vorder- und Hinterpfoten erkrankter Tiere durchgeführt werden.

Neben den klinischen Auswirkungen sollte der Einfluss der Depletion auf die zelluläre und humorale Immunantwort nach G6PI Immunisierung untersucht werden.

Zur Beurteilung der zellulären Immunantwort sollte die Proliferation von Lymphozyten gemessen werden, da dies ein wichtiger Maßstab für ihren Aktivierungszustand ist. Mögliche Unterschiede nach Depletion sollten festgestellt werden. Zunächst sollte die Proliferation *in vitro* durch den Einbau von [ $^3H$ ]-Thymidin untersucht werden. Im Folgenden sollte durch Applikation von BrdU die *in vivo* Proliferation verschiedener Lymphozytenpopulationen analysiert werden. Zusätzlich sollten durchflusszytometrische Analysen der Expression von Oberflächenmolekülen und der Zytokinproduktion in Effektorzellen durchgeführt werden, da es nach antigenspezifischer Aktivierung der Zellen zu charakteristischen Veränderungen im Expressionsmuster der Zellen kommt. Die Produktion von Zytokinen in Effektorzellen ist ein wichtiger Maßstab zur Beurteilung der Stärke einer zellulären Immunantwort und ihr Nachweis ermöglicht die Unterscheidung verschiedenen Zellpopulationen anhand ihres spezifisches Zytokinmusters.

Zur Beurteilung des Einflusses der Depletion auf die humorale Immunantwort sollte die antigenspezifische Antikörperproduktion gemessen werden. Hierfür sollte zu

verschiedenen Zeitpunkten Serum von erkrankten Tieren gewonnen und im ELISA auf die Produktion unterschiedlicher Immunglobulinsubtypen untersucht werden.

Über das Verhalten von Tregs *in vivo* ist bisher wenig bekannt, daher sollte in weiteren Untersuchungen der Effekt der Depletion auf die Tregpopulation untersucht werden. Hierzu sollten Dauer und Stärke der Depletion durch durchflusszytometrische Messung der Expression von CD25 und Foxp3 analysiert werden. Weiterhin sollte die Proliferation der Tregs *in vivo* durch den Nachweis der BrdU-Inkorporation gemessen werden, sowie die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle auf Foxp3<sup>+</sup> Zellen, um den Aktivierungszustand dieser Zellen besser charakterisieren zu können.

## 4. Material und Methoden

### 4.1. Material

#### 4.1.1. Versuchstiere

Für alle Tierexperimente wurden DBA/1-Mäuse im Alter von 6 bis 10 Wochen verwendet. Die Tiere stammten aus dem Institut für Versuchstierkunde der FSU Jena. Die Haltung erfolgte unter standardisierten Bedingungen (Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 Stunden; Fütterung mit Altromin-Pellets # 1326, Wasser *ad libitum*) unter SPF (Spezifiziert Pathogen Frei) Bedingungen.

Die Manipulationen an den Versuchstieren wurden durch dafür qualifizierte Personen durchgeführt. Alle Tierversuche waren vom Thüringer Landesverwaltungsamt genehmigt (Reg-Nr.: 02-005/06).

#### 4.1.2. Chemikalien und Enzyme

Ampicillin	Roth, Karlsruhe
2 $\beta$ -Mercaptoethanol	Invitrogen, Karlsruhe
BCA Assay™	Pierce, Rockford
Bovines Serum Albumin (BSA)	Roth, Karlsruhe
Bromo-5`Desoxyuridin (BrdU)	Sigma, Taufkirchen
BrdU Kit™	BD, Heidelberg
Brefeldin A	Sigma, Taufkirchen
4`,6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid	Molecular Probes, Karlsruhe
Diethylether	Fischer, Wiesbaden
Ethanol (70 %)	Serva, Heidelberg
Ethidium Monoazide (EMA)	Molecular Probes, Karlsruhe Fetales
Kälberserum (FCS)	Sigma, Taufkirchen
Foxp3 Kit™	eBioscience, San Diego
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt
HEPES	PAA, Coelbe
IL-17 ELISA Kit™	R&D, Wiesbaden
Imidazol	Sigma, Taufkirchen
Komplettes Freund'sches Adjuvanz (CFA)	Sigma, Taufkirchen

Nickel–Nitritotetraacetat Superflow	Qiagen, Hilden
<i>o</i> -Phenylendiamin	Sigma, Taufkirchen
Paraformaldehyd	Sigma, Taufkirchen
Penicillin/Streptomycin Lösung	PAA, Coelbe
RPMI 1640 mit L-Glutamin	PAA, Coelbe
Esel anti-Ziege IgG Peroxidase	Santa Cruz Biotech, Santa Cruz
Streptavidin-Peroxidase	Roche, Grenzach-Wyhlen
Saponin	Sigma, Taufkirchen
Trypanblau	Sigma, Taufkirchen
Tween 20	Fluka, Neu-Ulm
[ <sup>3</sup> H]-Thymidin	GE Healthcare, Freiburg

### 4.1.3. Medien, Puffer und Lösungen

#### Zellkulturmedien

Kulturmedium (KM)	RPMI-1640	
	10 % FCS	
	100 mM HEPES	
	50 µM 2-Mercaptoethanol	
	100 U/ml Penicillin	
	100 µg/ml Streptomycin	
Waschmedium (WM)	RPMI-1640	
	1 % FCS	
	100 mM HEPES	
LB-Medium	1 % Pepton /Trypton	10,0 g
	0,5 % Hefeextrakt	5,0 g
	1 % Natriumchlorid	10,0 g
	in 1 l H <sub>2</sub> O lösen und autoklavieren	

**Puffer und Lösungen für FACS-Analysen**

PBS 10x (1l)	36,9 mM NaCl	80,0 g
	2,7 mM KCl	2,0 g
	1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,0 g
	7,9 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	14,2 g
PBA (1l)	PBS / 0,5% BSA / 0,02% Azid	
	10 % BSA	50 ml
	10 % Azidlösung	2 ml
	mit 1x PBS auf 1l auffüllen.	
Erylysepuffer (1l)	0,01 M KHCO <sub>3</sub>	1,0 g
	0,15 M NH <sub>4</sub> Cl	8,3 g
	0,1 mM EDTA	200 µl
2 % PFA	2 g Paraformaldehyd in 100 ml PBS	
5 % Saponin-Stock	5 g Saponin in 100 ml 1x PBS lösen.	
0,5% Saponin/PBA	100 ml 5 % Saponin-Stock mit PBA auf 1l auffüllen	

**Puffer für ELISA**

Coating-Buffer, pH 9,6	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1,6 g
	NaHCO <sub>3</sub>	2,4 g
	mit ddH <sub>2</sub> O auf 1l auffüllen	
Blocking-Buffer (1l)	BSA	20 g
	mit 1x PBS auf 1l auffüllen	
Washing-Buffer (1l)	Tween 20	0,5 ml
	mit 1x PBS auf 1l auffüllen	
Phosphat-Citrat-Puffer, pH 5,0	0,2 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>3</sub>	25,7 ml
	0,1 M Zitronensäure	24,3 ml
	mit ddH <sub>2</sub> O auf 50 ml auffüllen	

3 N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	konz. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> in 80 ml ddH <sub>2</sub> O geben und auf 100 ml auffüllen	8,45 ml
------------------------------------	---	---------

### **Puffer für die Herstellung von rekombinate humanen G6PI**

Lysispuffer (1 l):	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	6,9 g
	300 mM NaCl	14,54 g
	10 mM Imidazol	0,68 g
Waschpuffer (1 l):	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	6,9 g
	300 mM NaCl	14,54 g
	20 mM Imidazol	1,36 g
Elutionspuffer (1 l):	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	6,9 g
	300 mM NaCl	14,54 g
	150 mM Imidazol	10,2 g

#### **4.1.4. Verbrauchsmaterialien**

Zellsieb 70 µm	BD Falcon, Heidelberg
Schraubdeckelgefäße	Greiner, Solingen
	Sarstedt, Nümbrecht
FACS <sup>®</sup> -Röhrchen;	BD Falcon, Heidelberg
Vivaspin	Vivascience, Göttingen
Szintillationsflüssigkeit	Perkin-Elmer, Rodgau-Jügesheim
Filterplatten	Perkin-Elmer, Rodgau-Jügesheim
Versiegelungsfolie	Perkin-Elmer, Rodgau-Jügesheim
Acrylküvetten	Roth, Karlsruhe
ELISA Platten, Maxisorp	Nunc, Wiesbaden
Kulturplatten	Greiner, Solingen
Objekträger und Deckgläser	Roth, Karlsruhe

#### 4.1.5. Geräte, Software

β-Szintillationszähler	Perkin-Elmer, Rodgau-Jügesheim
Durchflußzytometer, LSR II	BD Biosciences, Heidelberg
<i>DiVa Software</i>	BD Biosciences, Heidelberg
FlowJo Version 8	Tree Star, Ashland, Oregon
ELISA Messgerät, SLT Spectra	Tecan, Berlin
ELISA Waschgerät	Tecan, Berlin
GraphPad Prism	GraphPad, San Diego
Megafuge 1.0R, Heraeus (Rotor #2704)	Heraeus, Hanau
Heraeus Biofuge	Heraeus, Hanau
CO <sub>2</sub> -Inkubator	Heraeus, Hanau
Mikroskop	Zeiss, Jena
Neubauer-Zählkammer	Roth, Karlsruhe
Pipetten in verschiedenen Größen	Eppendorf, Hamburg
Präparationsbesteck	Aeskulap, Tuttlingen
Sterilbank HeraSafe	Heraeus, Hanau
Ultraschallgerät	Bandelin Electronics, Berlin

#### 4.1.6. Antikörper

##### Antikörper für durchflusszytometrische Analysen

**Tab 2:** Verwendete Antikörper für die Oberflächenfärbung

Antikörper	Markierung	Klon	Isotyp	Herkunft
anti-CD4	APC- Alexa750	RM4-5	rat IgG2a	eBiosciences
anti-CD4	PacBlue	GK1.5	rat IgG2b	Labor
anti-CD3	PE	145-2C11	ham IgG	eBiosciences
anti-CD8α	PerCP	53-6.7	rat IgG2a	BD Pharmingen
anti-B220	Dy495	RA3-6B2	rat IgG2a	Labor
anti-CD25	bio	7D4	rat IgM	BD Pharmingen
anti-CD69	FITC	H1.2F3	ham IgG1	BD Pharmingen
anti-PD1	PE	J43	ham IgG	BD Pharmingen
anti-CD62L	PE-Cy7	MEL-14	rat IgG2a	eBioscience
anti-CD134	bio	OX-86	rat IgG1	BD Pharmingen

anti-GITR	bio	(BAF524)	goat IgG	R&D Systems
anti-CD103	FITC	2E7	ham IgG	BD Pharmingen
Streptavidin	APC			BD Pharmingen
Streptavidin	PerCP			BD Pharmingen
Streptavidin	PE-Cy7			eBioscience

**Tab 3:** Verwendete Antikörper für die intrazelluläre Färbung

Antikörper	Markierung	Klon	Isotyp	Herkunft
anti-ICOS	dig	12A7	rat IgG1	RKI
anti-IFN- $\gamma$	FITC	XMG1.2	rat IgG1	eBioscience
anti-IL-17	PE	TC11- 18H10.1	rat IgG1	BD Pharmingen
anti-TNF- $\alpha$	FITC	MP6-XT22	rat IgG1	eBioscience
anti-IL-6	FITC	MP5-20F3	rat IgG1	R&D Systems
anti-IL-13	PE	38213	ratIgG2b	RKI,R&D Systems
anti-FoxP3	APC	FJK-16	rat IgG2a	eBioscience
anti-FoxP3	PacBlue	FJK-16	rat IgG2a	eBioscience
anti-BrdU	FITC	3D4	m IgG1	BD Pharmingen
anti-dig	FITC		she IgFab	Roche

**Tab 4:** Antikörper für die Blockierung und die Isotypenkontrollen

Antikörper	Markierung	Klon	Isotyp	Herkunft
anti-Fc-Rezeptor		2.4G2/75	rat IgG2b	DRFZ
rat IgG				Jackson Immunoresearch
Isotyp	PE	na	rat IgG1	ebioscience
Isotyp	FITC	na	rat IgG1	ebioscience
Isotyp	APC	A95-1	rat IgG2b	BD Pharmingen

### Antikörper für isotypspezifischen ELISA

**Tab 5:** Verwendete Antikörper für den Isotypspezifischen ELISA (Konzentrationen sind als Verdünnung der Stock-Konzentration des ELISA-Kits angegeben)

Antikörper	Konzentration	(Klon)	Herkunft
goat anti-m IgM	1:1000	M6157	Sigma
goat anti-m IgG1	1:1000	M5532	Sigma
goat anti-m IgG2a	1:1000	M5657	Sigma
goat anti-m IgG2b	1:1000	M5782	Sigma
goat anti-m IgG3	1:1000	M5907	Sigma
don anti goat IgG POD	1:3000	K2706	Santa Cruz

### Antikörper für IL-17 ELISA

**Tab 6:** Verwendete Antikörper für den IL-17 ELISA

Antikörper	Konzentration	Klon	Isotyp	Herkunft
anti-IL-17 (Capture)	2 µg/ml	50101	rat IgG2a	R&D Systems
anti-IL-17-bio (Detection)	200 ng/ml	(BAF421)	goat IgG	R&D Systems

### Antikörper für Zellkultur

**Tab 7:** Verwendete Antikörper für die Zellkultur

Antikörper	Klon	Isotyp	Herkunft
anti-CD3	145-2C11	hamIgG	Labor
anti-CD28	37.51	hamIgG	Labor

### Antikörper für *in vivo* Behandlungen

**Tab 8:** Verwendete Antikörper für die *in vivo* Behandlung

Antikörper	Klon	Isotyp	Herkunft
anti-CD25	PC61	rat IgG1	Labor, RKI

(RKI: Robert-Koch-Institut Berlin, Labor: Im eigenen Labor hergestellt, DRFZ: Deutsches Rheumaforschungszentrum Berlin, na: nicht angegeben, m: Maus, rat: Ratte, ham: Hamster, goat: Ziege, don: Esel, she: Schaf)

## 4.2. Methoden

### 4.2.1. Herstellung von rekombinantem humanen G6PI (huG6PI)

Für die Produktion von G6PI wurde der *E.coli* Stamm BL21, welcher mit humanem G6PI in den Vektor pQE100 transformiert worden war, verwendet. Dieser Vektor wurde von David Schubert kloniert und zur Verfügung gestellt. Für die Vorkultur wurden 100ml LB-Medium mit 100µg/ml Ampicillin und dem *E.coli* Stamm angeimpft und über Nacht bei 37°C und 200 rpm im Schüttler kultiviert. Am nächsten Tag wurde ein Liter LB-Medium, welches zuvor mit Ampicillin versetzt wurde, mit der Vorkultur angeimpft. Vor Zugabe von Ampicillin zum Medium wurden 2ml für die spätere Messung am Photometer zur Tarierung abgenommen. Die Kultur wurde nun weiterhin im Schüttler bei 37°C und 200rpm inkubiert und gelegentlich 2ml entnommen und am Photometer bei 600 nm gemessen, bis die Optische Dichte (OD) 0,6 bis 0,7 betrug. Die Induktion zur G6PI-Synthese erfolgte durch die Zugabe von 2mM Isopropyl-Thio-β-D-Galactopyranosid (IPTG), wodurch die Transskription des G6PI-Gens ermöglicht wurde. Zur Proteinexpression verblieb die Kultur für weitere 3 Stunden im Schüttler bei 37°C und 200rpm, anschließend wurde die Bakteriensuspension bei 4°C und 5000rpm (GS-3 Rotor) für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet bei – 20°C eingefroren. Alle weiteren Schritte der G6PI-Aufreinigung erfolgten auf Eis. Das Pellet wurde zunächst in 20ml Lysispuffer resuspendiert und die Zellen anschließend durch Ultraschall aufgeschlossen. Das Lysat wurde bei 4°C und 12000rpm (SS-34 Rotor) für 45 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgenommen und mit Lysispuffer auf ein Volumen von 140ml verdünnt. Als nächstes erfolgte die Aufreinigung auf einer Ni-NTA-Säule (Säulenvolumen: 5ml). Diese wurde zunächst mit 150ml Lysispuffer äquilibriert. Die Proteinlösung wurde auf die Säule gegeben, dabei bildeten die Histidinreste des His<sub>6</sub>-tag, die am N-Terminus des G6PI überexprimiert werden, Chelatkomplexe mit den Ni<sup>2+</sup> und blieben in der Matrix gebunden. Anschließend wurde die Säule mit 150ml Waschpuffer gewaschen und das Protein mit 40ml Elutionspuffer von der Säule getrennt, da der hohe Anteil an Imidazol im Elutionspuffer das Protein aus seiner Bindung verdrängt. Das Eluat wurde in einen Dialyseschlauch überführt, der zuvor mit ddH<sub>2</sub>O aufgeköcht wurde, und über Nacht bei 4°C gegen PBS dialysiert. Zur Aufkonzentration wurde die dialysierte Proteinlösung in Vivaspin-Röhrchen überführt und zentrifugiert. Die Bestimmung der

Konzentration erfolgte mit dem *BCA Protein Assay Kit*. Die G6PI-Lösung wurde mit PBS auf eine Konzentration von 5mg/ml eingestellt, anschließend sterilfiltriert und bei -20 °C eingefroren.

#### 4.2.2. Immunisierung der Mäuse

Für die Immunisierung wurde eine Emulsion aus komplettem Freundschens Adjuvans (CFA) und der Proteinlösung mit G6PI hergestellt, mit der Endkonzentration von 2mg/ml G6PI. Hierfür wurde die Proteinlösung je nach Stockkonzentration mit PBS verdünnt und mit dem gleichen Volumen CFA gemischt. Das Gemisch wurde für einige Sekunden mit Ultraschall behandelt, bis eine weiße, feste Emulsion entstand. Diese Emulsion wurde luftblasenfrei in eine Spritze aufgezogen. Je 100µl der Emulsion wurden nach gründlicher Desinfektion links und rechts an der Schwanzbasis subkutan injiziert. Die Mäuse wurden somit mit 400µg G6PI immunisiert. Anschließend wurden die Mäuse in die Käfige zurückgesetzt und einige Zeit auf Veränderungen der Vitalitätszeichen beobachtet. Am Tag 9 nach der Immunisierung traten erste klinische Zeichen der Arthritis auf.

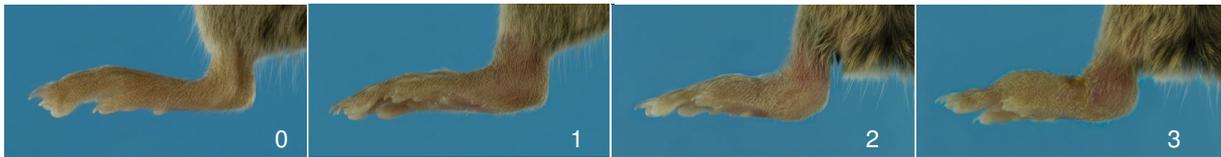
#### 4.2.3. Behandlung der Mäuse mit anti-CD25 Antikörper

Die verwendeten Antikörper vom Klon PC61 wurden auf eine Konzentration von 2mg/ml eingestellt, und hierfür gegebenenfalls mit PBS verdünnt. Den Mäusen wurde am Tag 11 und 8 vor der Immunisierung jeweils 200µl der Antikörperlösung intraperitoneal injiziert, so dass eine Maus mit insgesamt 800µg des Antikörpers behandelt wurde. Den Kontrolltieren wurde PBS appliziert (Im Folgenden als unbehandelt bezeichnet).

Der erstmals 1985 beschriebene anti-CD25 Antikörper PC61 (Lowenthal et al. 1985) ist vom IgG1 Subtyp, erkennt ein Epitop im Bereich der Antigenbindungsstellen des IL-2R und verhindert die Bindung von IL-2. Ein weiterer anti-CD25 Antikörper, der Klon 7D4, ist vom IgM Subtyp. *In vitro* Versuche konnten zeigen, dass dieser ein Epitop außerhalb der Antigenbindungsstelle erkennt (Malek et al. 1983) und sich besser für den durchflusszytometrischen Nachweis der IL-2R $\alpha$  Expression eignet (Couper et al. 2007). Der zumeist für *in vivo* Behandlungen verwendete PC61 hat eine deutlich depletierende Eigenschaft, während die *in vivo* Effekte von 7D4 strittig

sind (Couper et al. 2007, Kohm et al. 2006). Wegen der depletierenden Wirkung von PC61 habe ich diesen Antikörper für die *in vivo* Behandlung verwendet. Da 7D4 ein anderes Epitop erkennt, eignet er sich zur Überprüfung des Depletionserfolges.

#### 4.2.4. Beurteilung des Schweregrades der Arthritis



**Abb. 4: Schweregrad der entzündlichen Veränderungen in der G6PI Arthritis.** Beispielhaft für den verwendeten Index sind Hinterpfoten mit den unterschiedlichen Schweregraden der entzündlichen Veränderungen dargestellt. 0: keine entzündlichen Erscheinungen, 1: leichte Rötung und Schwellung, 2: ausgeprägte Schwellung und Rötung, 3: massive Schwellung und starke Rötung mit Rhagaden.

Im Verlauf der Arthritis kam es zur Ausbildung typischer Entzündungszeichen mit Rötung und Schwellung im Bereich der distalen Gelenke von Vorder- und Hinterpfoten. Betroffen waren vor allem die Hand- und Fußwurzelgelenke, die Sprunggelenke, sowie die distalen Finger- bzw. Zehengelenke. Die makroskopisch sichtbaren Zeichen der Entzündung wurden in einem einfachen Index zur Beurteilung der Arthritisschwere herangezogen (Abb. 4). Jede Pfote wurde einzeln beurteilt und je nach Ausprägung der Entzündungszeichen ergab sich hierbei ein Punktwert von 0 bis 3. Bei einem Wert von 0 traten keine sichtbaren Entzündungszeichen auf, eine 1 entsprach einer leichten Schwellung und Rötung, die 2 einer deutlich ausgeprägten Schwellung und starken Rötung und ein Punktwert von 3 wurde bei massiver Schwellung und Rötung vergeben, wobei ein zusätzliches Kriterium das Auftreten von Rhagaden sein konnte. Die Punktwerte jeder einzelnen Pfote wurden addiert, so dass sich für jede Maus ein maximaler Score von 12 ergeben konnte. Zur ursprünglichen Beschreibung des Scores (Schubert et al. 2004) wurde aufgrund der schwereren Erkrankung nach Depletion ein Punktwert von 3 eingeführt.

Zusätzlich wurde der Gewichtsverlust jeder Maus im Verlauf der Erkrankung gemessen. Die Mäuse wurden hierfür individualisiert und das Ausgangsgewicht am Tag 0 vor der Immunisierung gemessen. Danach wurden die Mäuse täglich gewogen. Der Gewichtsverlust ergab sich dabei als prozentualer Anteil vom Ausgangsgewicht.

#### **4.2.5. Histologie**

Für die histologische Untersuchung wurden die Mäuse an den entsprechenden Tagen durch zervikale Dislokation getötet. Die Tiere wurden mit 70%igem Ethanol eingesprüht und anschließend wurden die Vorder- und Hinterpfoten präpariert. Hierbei wurde das Fell soweit wie möglich entfernt. Die Pfoten wurden in eine 4%ige Formalinlösung überführt und für mindestens eine Woche fixiert. Die gesamte weitere Aufarbeitung wurde von Frau Gabriele Fernahl am Institut für Pathologie der Charité in Berlin durchgeführt. Dort wurden auch die Hämatoxylin und Eosin gefärbten Gewebeschnitte von Dr. Lars Morawietz verblindet begutachtet und bewertet.

Für die histologische Bewertung der Arthritis wurde der zuvor verwendete Score (Schubert et al. 2004) modifiziert: für jede Pfote wurde ein Punktwert von 0 bis 4 vergeben, je nach Stärke der entzündlichen Reaktion. Eine 0 wurde bei einem Gelenk ohne entzündliche Veränderungen vergeben, eine 4 entsprechend für massivste entzündliche Infiltrationen. Insgesamt konnte ein Tier durch Addition der Punkte aller 4 Pfoten einen Wert von maximal 16 erreichen.

#### **4.2.6. Gewinnung von Zellen aus Milz und Lymphknoten**

Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet und der Körper mit 70%igem Ethanol besprüht. Anschließend wurden die Mäuse seziiert, so dass die Milz und inguinalen Lymphknoten entnommen werden konnten. Die Organe wurden in ein 70µm Zellsieb überführt, mit Hilfe eines Stempels zerrieben und in Kulturmedium (KM) aufgenommen. Die Suspension wurde bei 1300rpm (Haereus Megafuge) und 4°C für 6 Minuten zentrifugiert, das Pellet resuspendiert und mit Kulturmedium (KM) aufgefüllt. Nach anschließender Zellzahlbestimmung in der Neubauer-Zählkammer wurde die Suspension auf die gewünschte Konzentration eingestellt. Nach der Resuspension erfolgte die Lyse der Erythrozyten durch Zugabe von 2ml Lysispuffer, die nach ca 30 Sekunden durch Zugabe von 30ml Kulturmedium gestoppt wurde. Nach erneuter Zentrifugation der Zellsuspension wurde das Zellpellet mit Kulturmedium resuspendiert und nach Bestimmung der Zellzahl auf die gewünschte Konzentration eingestellt.

#### 4.2.7. Gewinnung von Blutserum

Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet, der Körper mit 70%igem Ethanol besprüht und auf einer Unterlage fixiert. Anschließend wurden die Mäuse sezziert und das Herz freipräpariert. Eine Spritze mit einer 20 G Kanüle wurde in den Ventrikel oder das Atrium eingeführt, das Blut abgesaugt und in ein Eppendorfgefäß überführt. Anschließend wurde bei 1500rpm (Biofuge) und 4°C für 15 Minuten zentrifugiert. Das Serum wurde vorsichtig abpipettiert und konnte bei -70°C gelagert werden.

#### 4.2.8. Messung der *in vitro* Proliferation mit [<sup>3</sup>H]-Thymidin

Das Prinzip des [<sup>3</sup>H]-Thymidinproliferationsassays ist die Messung der Proliferation von Zellen nach Stimulation mit einem bestimmten Antigen durch die Aufnahme des radioaktiv markierten Nukleotids [<sup>3</sup>H]-Thymidin. Je stärker die Proliferation war, umso größer war auch der [<sup>3</sup>H]-Thymidineinbau. Nach Herstellung der Einzelzellsuspension, wie unter 4.2.5. beschrieben, wurden jeweils  $4 \times 10^5$  Milzzellen in 100 µl Kulturmedium in einer 96-Well-Platte als Triplikate ausgesät. Zur Stimulation wurde eine Endkonzentration von 10µg/ml G6PI verwendet. Jeweils 100µl der G6PI-Lösungen wurden zu den Zellen pipettiert, als Kontrolle diente Kulturmedium. Die Zellen wurden für 72 Stunden bei 37°C im Inkubator stimuliert. Für die letzten 18 Stunden wurde der Kultur zusätzlich 1µCi [<sup>3</sup>H]-Thymidin zugefügt und bis zum Ende bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Zellerntegerätes auf Szintillationsfilterplatten transferiert. Den bei 65°C für 20 Minuten getrocknet Filterplatten wurde Szintillationsflüssigkeit zugegeben. Die Filterplatten wurden versiegelt und im β-Szintillationszähler für 1 Minute pro Filter gemessen. Die Proliferation wurde in *counts per minute* (cpm) angegeben. Die *in vivo* Proliferation jeder Maus ergab sich aus den Mittelwerten der Triplikate. Angegeben wurde der Mittelwert der Zellproliferation in depletierten- und Kontrolltieren. Die Fehlerbalken wurden als Standardfehler vom Mittelwert angegeben.

#### 4.2.9. Messung der *in vivo* Proliferation mit BrdU

Das Nukleotid Bromo-5'-Desoxyuridin (BrdU) ermöglicht die Untersuchung der Proliferation von Zellen *in vivo* durch den Einbau in die DNA sich teilender Zellen.

BrdU kann durch fluorochromgekoppelte Antikörper nachgewiesen und durchflusszytometrisch detektiert werden. Je größer dabei der Anteil der Zellen ist, die positiv für BrdU sind, umso stärker ist die Proliferation dieser Zellpopulation.

Die Behandlung der Mäuse wurde am ersten Tag nach der Immunisierung (s. 4.2.2) begonnen. Den Mäusen wurde 1mg BrdU intraperitoneal injiziert, anschließend erfolgte die Verabreichung von BrdU mit dem Trinkwasser. Hierbei wurden 0,8mg/ml BrdU in Wasser gelöst und mit 1% Glucose versetzt. Für 6 Tiere wurde dabei eine Wassermenge von 100ml veranschlagt. Zum Lichtschutz wurden die Trinkflaschen mit Aluminiumfolie umwickelt. Das Wasser wurde jeden 3. Tag gewechselt, am Tag 9 nach Immunisierung wurden die Mäuse getötet und die Proliferation gemessen. Die Färbung mit fluorochromgekoppelten Antikörpern und die Analyse im Durchflusszytometer ist unter 4.2.10 näher beschrieben.

## 4.2.10. Durchflusszytometrie

### Grundlagen

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie konnten einzelne Zellen aufgrund der Expression von Oberflächenmolekülen oder der Produktion von Zytokinen unterschieden und charakterisiert werden. Hierzu wurden fluorochromgekoppelte monoklonale Antikörper für die Markierung der Zellen bzw. Zytokine verwendet. Umgeben von einem dünnen Flüssigkeitsstrom, passierten die Zellen dabei fokussierte Laserstrahlen unterschiedlicher Anregungswellenlängen. Die Analyse erfolgte anhand der Lichtstreuungseigenschaften der Zellen und den Fluoreszenzemissionen der gebundenen Antikörper. Die Streuung des Lichtes durch die Zellen ermöglichte die Trennung der Zellen nach Größe im *Forward Scatter* (FCS) und Granularität im *Side Scatter* (SSC). Nach Anregung mit dem Laser, absorbierte und emittierte jedes Fluorochrom das Licht bei einer bestimmten Wellenlänge besonders stark (Tabelle 9). Dies ermöglichte die genaue Trennung der Zellen durch Bindung der gekoppelten Antikörper an die Oberflächenmoleküle oder Zytokine. Das gestreute und emittierte Licht wurde gefiltert und von Fotoverstärkerröhren verstärkt. Für einige Fluorochrome, die durch das gleiche Laserlicht angeregt wurden, lagen die Wellenlängen des emittierten Lichtes nahe beieinander, eine Trennung der Signale war durch den Einsatz geeigneter Lang- und Bandpassfilter möglich. Zusätzlich

wurden die emittierten Signale der Laser zeitversetzt abgerufen. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der FloJo® Software von TreeStar.

**Tab 9:** Absorptions- und Emissionsmaximum einiger Fluorochrome

Fluorochrom	Absorptionsmaximum	Emissionsmaximum
Pacific Blue	410 nm	455 nm
FITC	495 nm	519 nm
PE	480 nm	578 nm
APC	650 nm	660 nm
PerCP	482 nm	678 nm
PE-Cy5	480 nm	667 nm
APC-Cy7	650 nm	785 nm
Alexa-750	650 nm	775 nm

### Oberflächenfärbung

Für die Oberflächenfärbung wurden  $1 \times 10^6$  Zellen aus der Milz- oder Lymphknotensuspension verwendet und in FACS-Röhrchen überführt. Die gesamte Färbung fand auf Eis und im Dunkeln statt. Die Zellen wurden zunächst mit PBA gewaschen und bei 1300rpm (Haeresus Megafuge) und 4 °C für 6 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet resuspendiert. Zum Blockieren unspezifischer Bindungen von Antikörpern an Fc-Rezeptoren, wurden die Zellen mit Ratten IgG und anti-CD16/CD32 in PBA für 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die fluorochrommarkierten Antikörper in PBA für weitere 10 Minuten zugefügt. Die Konzentration der eingesetzten Antikörper wurde zuvor austitriert. Danach wurden die Zellen erneut mit PBA gewaschen und zentrifugiert. Bei Verwendung biotinylierter oder digoxygierter Antikörper, wurden streptavidingekoppelte Farbstoffe bzw. gegen Digoxigenin gerichtet. Sekundärantikörper für 8 Minuten inkubiert und dann erneut mit PBA gewaschen. Isotypspezifische Antikörper wurden als Kontrolle verwendet, um die Stärke eventueller unspezifischer Bindungen der verwendeten Antikörper aufzuzeigen. Anschließend wurden die Zellen in 300µl PBA aufgenommen und am Durchflusszytometer (BD LSR II) analysiert.

### Intrazelluläre Färbung

Für die intrazelluläre Färbung wurden Zellen aus Milz- und Lymphknoten zunächst für 6 Stunden stimuliert. Hierzu wurden  $2 \times 10^6$  Zellen in 1ml in eine 48 Well-Platte überführt und mit 10µg/ml G6PI stimuliert. Als Positivkontrolle wurde den Zellen jeweils 1µg/ml anti-CD3 bzw anti-CD28 Antikörper zugesetzt, als Negativkontrolle

wurde den Zellen nichts zugefügt. Die Stimulation erfolgte für 6 Stunden im Inkubator bei 37°C. Nach 1 Stunde wurden 5µg/ml Berfeldin A zu den Zellen gegeben, um die Sekretion von Zytokinen aus dem Golgi-Apparat zu unterbinden. Nach der Stimulation wurden die Zellen in FACS-Röhrchen überführt, mit PBA gewaschen und die Oberflächenfärbung wie zuvor beschrieben durchgeführt. Die gesamte Färbung wurde auch auf Eis und in Dunkelheit durchgeführt. Vor der intrazellulären Färbung mussten die Zellen zunächst fixiert werden. Dazu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und nach Resuspension des Zellpellets mit 1ml 2%igem Paraformaldehyd für 30 Minuten fixiert. Anschließend wurden die Zellen erneut mit PBS und dann mit einem saponinhaltigem Puffer (0,05% Saponin in PBA) gewaschen, um die Zellmembran zu permeabilisieren. Nach der Resuspension wurden die Zellen zur Blockade unspezifischer Bindungen mit Ratten IgG und anti-CD16/CD32 in Saponinpuffer für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden die fluorchrommarkierten Antikörper für 10 Minuten zugefügt und anschließend mit Saponinpuffer gewaschen. Bei Bedarf erfolgte eine Inkubation mit Sekundärantikörpern für weitere 8 Minuten. Abschließend wurden die Zellen mit Saponinpuffer und danach mit PBA gewaschen. Nach Aufnahme der Zellen in 300µl PBA konnte die Messung am Durchflusszytometer (BD LSR II) erfolgen.

### **Foxp3-Färbung**

Die Foxp3- und BrdU-Färbungen unterscheiden sich von den bisher beschriebenen intrazellulären Färbungen, da hierfür zusätzlich eine Permeabilisierung der Zellkernwand nötig war. Für die Foxp3-Färbung wurden 1 bis 2 x 10<sup>6</sup> Zellen verwendet. Die benötigten Puffer und Foxp3-Antikörper wurden von eBioscience bezogen. Die Oberflächenfärbung wurde wie bereits beschrieben durchgeführt. Die Zellen wurden mit 1ml der frisch angesetzten Fixations/Permeabilisierungs-Lösung von eBioscience für 30 Minuten auf Eis fixiert, anschließend mit PBS und dann mit 1ml des Permeabilisierungspuffers von eBioscience gewaschen. Nach der Resuspension wurden die Zellen zur Blockade unspezifischer Bindungen mit Ratten IgG und anti-CD16/CD32 in Permeabilisierungspuffer für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden die fluorchrommarkierten Antikörper für Foxp3, sowie bei Bedarf für Zytokine, dazugegeben und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit 1ml Permeabilisierungspuffer gewaschen und in 300µl PBA für die Messung aufgenommen.

### **BrdU-Färbung**

Puffer und Antikörper für die BrdU-Färbungen wurden von BD bezogen. Da BrdU und Foxp3 in Kombination gefärbt wurden, entwickelten wir ein eigenes Protokoll für diese Färbung. Es wurden  $2 \times 10^6$  Milzzellen für die Färbung verwendet. Die Oberflächenfärbung wurde wie bereits beschrieben durchgeführt. Die Zellen wurden mit 1ml der Fixations/Permeabilisierungslösung des Foxp3-Kits von eBioscience für 30 Minuten auf Eis fixiert, und mit 1ml des Permeabilisierungspuffers von eBioscience gewaschen. Anschließend wurde zu jeder Probe 100µl der CytopermPlus-Lösung von BD gegeben, für 10 Minuten auf Eis inkubiert, gewaschen und nochmals für 5 Minuten mit 1ml der Fixations/Permeabilisierungslösung von eBioscience behandelt. Zu jeder Probe wurde 100µl DNase gegeben und für mindestens 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Wie bereits für die Foxp3-Färbung beschrieben, wurden die Zellen nach Resuspension zur Blockade unspezifischer Bindungen mit Ratten IgG und anti-CD16/CD32 für 10 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend die Antikörper für BrdU und Foxp3 für 30 Minuten hinzugefügt. Die Zellen wurden zweimal mit 1ml Permeabilisierungspuffer gewaschen und in 300µl PBA für die Messung aufgenommen.

### **Lebend-Tot-Exklusion**

Membranen toter Zellen können unspezifisch Antikörper binden, was zu einer Verfälschung der Messdaten führen würde. Für alle durchgeführten Färbungen sollten daher bereits tote Zellen mit Hilfe einer Lebend-Tot-Exklusion von den Messungen ausgeschlossen werden. Für die Oberflächenfärbungen wurde hierfür der Farbstoff DAPI verwendet. Dieser Farbstoff passiert die Membranen toter Zellen, und interkaliert mit der DNA dieser Zellen. Die intakte Membran lebender Zellen kann DAPI nicht durchdringen. Der Farbstoff wurde den Proben in einer Konzentration von 10µM kurz vor der Messung am Durchflusszytometer hinzugefügt.

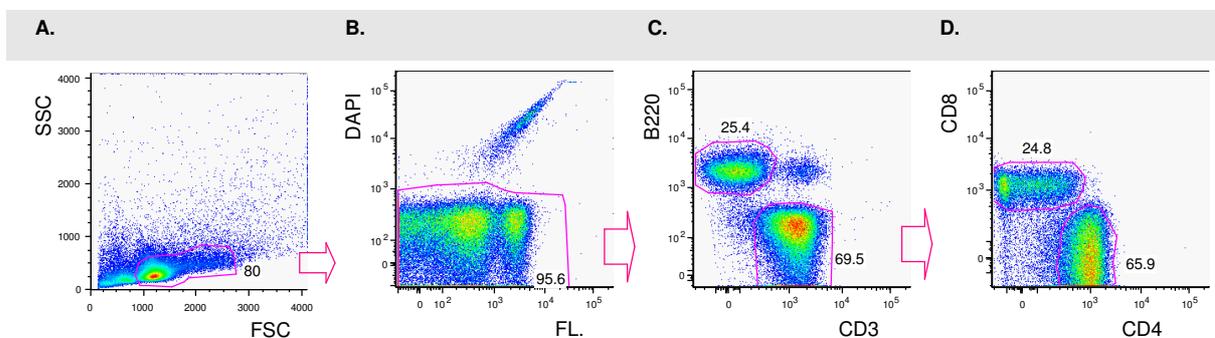
Für die intrazellulären Färbungen wurde der Farbstoff EMA verwendet. DAPI war für diese Färbungen nicht geeignet, da die Zellen permeabilisiert werden mussten (siehe oben). DAPI würde somit alle Zellen anfärben, was eine Identifizierung bereits vor Fixierung toter Zellen unmöglich machen würde.

Während der Oberflächenfärbung wurde EMA den Proben in einer Konzentration von 1µg/ml zugefügt und für 10 Minuten auf Eis unter Lichtexposition inkubiert. Durch den

Einfluss des Lichtes kam es zu stabilen kovalenten Bindungen zwischen EMA und der DNA bereits permeabilisierter, also toter Zellen. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und die Färbung wie oben beschrieben weiter durchgeführt. Bei Auswertung zeigte sich, dass nach *in vitro* Stimulation ungefähr 3 % der CD4<sup>+</sup> Zellen EMA<sup>+</sup> waren und dass mit oder ohne EMA keine Unterschiede in den Frequenzen der Zytokinproduktion messbar waren. Daher wurde in den hier gezeigten Experimenten auf eine Lebend-Tot-Exklusion mit EMA verzichtet.

### Auswertung der Daten mit der FlowJo Software

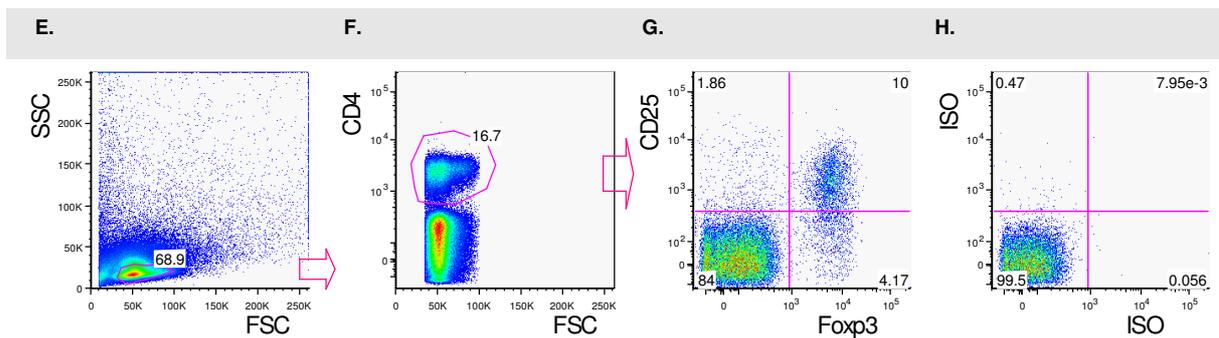
Zunächst wurde im Forward Scatter und Side Scatter die Lymphozytenpopulation markiert (Abb. **A**). Als Viabilitätstest für die Oberflächenfärbung erfolgte während der Messung eine Lebend-Tot-Exklusion mit DAPI. Die toten Zellen wurden bei der Auswertung aus der zuvor markierten Lymphozytenpopulation für die weitere Untersuchung ausgeschlossen (Abb. **B**). Anschließend konnten verschiedene Lymphozytensubpopulationen durch die Expression von Oberflächenmolekülen mit Hilfe monoklonaler Antikörper dargestellt und ihr prozentualer Anteil quantifiziert werden (Abb. **C+D**). Diese markierten Populationen konnten eingegrenzt werden, so dass eine detaillierte Analyse ausschließlich dieser Zellen möglich war.



**Abb. 5a: Vorgehen bei der Auswertung von Oberflächenfärbungen.** Abb. **A** zeigt den *Forward* und *Side Scatter*, indem zunächst die Lymphozytenpopulation isoliert wurden. Von den markierten Lymphozyten wurden mit Hilfe von DAPI bereits tote Zellen ausgeschlossen (Abb. **B**). Die Lymphozyten wurden anschließend in B220<sup>+</sup> und CD3<sup>+</sup> Zellen unterteilt (Abb. **C**). Im Folgenden konnten die CD3<sup>+</sup> Zellen in CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> Zellen getrennt werden (Abb. **D**).

Für die intrazellulären Färbungen wurde zunächst die Lymphozytenpopulation markiert (Abb. **E**). Bei den weiteren Untersuchungen waren nur die CD4<sup>+</sup> T-Zellen von Interesse (Abb. **F**). Für die intrazellulär untersuchten Moleküle zeigte sich oftmals keine klare Trennung der angefärbten Zellen von der nicht gefärbten Zellpopulation. Daher wurden Isotypkontrollen verwendet, mit deren Hilfe eine Einteilung der Dot-

Plots in Quadranten möglich war (Abb. H). Somit konnten die Zielpopulationen von den restlichen Zellen abgegrenzt werden. Anhand der Abb. G soll beispielhaft erklärt werden, wie diese Daten ausgewertet wurden. Im oberen linken Quadranten eines Dot-Plots sind dabei die CD25<sup>+</sup>, im oberen rechten Quadranten die CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> (doppelpositiven) und im unteren rechten Quadranten die Foxp3<sup>+</sup> Zellen dargestellt. Die Gesamtzahl der CD25<sup>+</sup> Zellen ergibt sich aus der Addition der beiden oberen Quadranten, die Gesamtzahl der Foxp3<sup>+</sup> Zellen aus der Addition der beiden rechten Quadranten.



**Abb. 5b: Vorgehen bei der Auswertung von intrazellulären Färbungen.** Im *Forward* und *Side Scatter* wurde zunächst die Lymphozytenpopulation isoliert (Abb. E). Da die Zytokinproduktion in CD4<sup>+</sup> Zellen untersucht werden sollte, wurden nur diese Zellen berücksichtigt (Abb. F). Abb. G zeigt beispielhaft eine Färbung von CD25 gegen Foxp3 in den CD4<sup>+</sup> Zellen. Abb. H zeigt die dazugehörige Isotypkontrolle.

#### 4.2.11. Isotypspezifischer ELISA

Der ELISA wurde verwendet, um die G6PI-spezifischen Immunglobulin-Subklassen zu bestimmen. Für die Bestimmung wurden 96-Well-ELISA Mikrotiter-Platten mit 5µg/ml G6PI in *Coating-Buffer* beladen. Pro *Well* wurden 50µl der G6PI-Lösung pipettiert und in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Platten dreimal mit dem ELISA-Washer mit *Washing-Buffer* (0,05% Tween 20/PBS) gewaschen. Um freie Proteinbindungsplätze zu besetzen, wurden 200µl/*Well* *Blocking-Buffer* (2% BSA/PBS) pipettiert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach erneutem Waschen, wurden 50µl/*Well* der Serumverdünnungen (Tabelle 10) als Duplikate aufgetragen und für 1 Stunde bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubiert.

Nach dem Waschen der Platten wurden die isotypspezifischen *goat-anti-mouse* Antikörper (Tabelle 3) in *Washing-Buffer* 1:1000 verdünnt und 50µl wurden jeweils in die entsprechenden *Wells* pipettiert und erneut für 1 Stunde in einer feuchten Kammer inkubiert

**Tab 10:** Schema der Serumverdünnungen (WB=*Washing-Buffer*)

Nr	Verdünnung	
V1	1:100	20µl Serum+1980µl WB
V2	1:400	500µl V1 + 1500µl WB
V3	1:1600	500µl V2 + 1500µl WB
V4	1:6400	500µl V3 + 1500µl WB
V5	1:25600	500µl V4 + 1500µl WB
V6	1:102400	500µl V5 + 1500µl WB
V7	1:409600	500µl V6 + 1500µl WB

Nach dem Waschen wurde zur Detektion der mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelte *donkey-anti-goat* Antikörper verwendet. Dieser wurde 1:3000 in *Washing-Buffer* verdünnt, 50µl wurden zu jedem *Well* gegeben und anschließend 15 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift, wurden *o*-Phenylendiamin und Wasserstoffperoxid in Phosphat-Citrat-Puffer gelöst. 50µl dieser Lösung wurden zu jedem *Well* gegeben. *o*-Phenylendiamin diente dabei als Substrat für die Peroxidase, Wasserstoffperoxid zur Auslösung der Farbreaktion. Die Reaktion musste in Dunkelheit stattfinden und wurde nach Bedarf mit 50µl/*Well* Schwefelsäure abgestoppt. Die Extinktion wurde in einem ELISA-*Reader* bei 492 nm gemessen.

#### 4.2.12. IL-17 ELISA

Für die Bestimmung wurden 96-*Well*-ELISA Platten mit 50µl/*Well* des IL-17 *Capture*-Antikörpers (2µg/ml in PBS) beladen. Die Platten wurden über Nacht bei 4°C inkubiert. Für alle weiteren Schritte wurden die Platten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurden die Platten dreimal mit *Washing-Buffer* (0,05% Tween20/PBS) gewaschen. Zur Besetzung freier Proteinbindungsstellen wurden 200µl/*Well* *Blocking-Buffer* (1% BSA/PBS) pipettiert und für 1 Stunde inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Verdünnungen der Standards mit 50µl/*Well* pipettiert. Die höchste Standardkonzentration betrug 1000pg/ml, danach wurde in 8 Verdünnungsschritten mit PBS jeweils 1:2 verdünnt. Für die Proben wurden  $6 \times 10^5$  Zellen aus einer Milzsuspension entnommen, für 2 Tage mit 10µg/ml G6PI oder 2µg/ml CD3 und 2,5µg/ml CD28 bei 37°C restimuliert oder unstimuliert belassen. Die Überstände wurden abgenommen, entsprechend den

Angaben in Tabelle 11 verdünnt und nach Auftragen der Proben auf die Platten für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

**Tab 11:** Verdünnung der Proben

Proben	Verdünnungsfaktor
Medium	1:1
G6PI	1:4
CD3/28	1:10

Für die Detektion wurde der entsprechende IL-17 Antikörper mit *Blocking-Buffer* auf 200ng/ml verdünnt. Die Platten wurden dreimal gewaschen und 50µl/*Well* des Detektions-Antikörpers pipettiert. Die Inkubation erfolgte für 2 Stunden. Nach einem erneuten Waschschrift wurde zur Detektion Streptavidin-Peroxidase mit *Blocking-Buffer* im Verhältnis 1:200 verdünnt. Anschließend wurden 50µl/*Well* der Peroxidase-Lösung pipettiert und für 20 Minuten inkubiert. Die Platten wurden erneut gewaschen und die Farbreaktion wie für den Isotypspezifischen ELISA beschrieben (4.2.10) ausgelöst. Die Extinktion wurde ebenfalls bei 492 nm im Photometer gemessen.

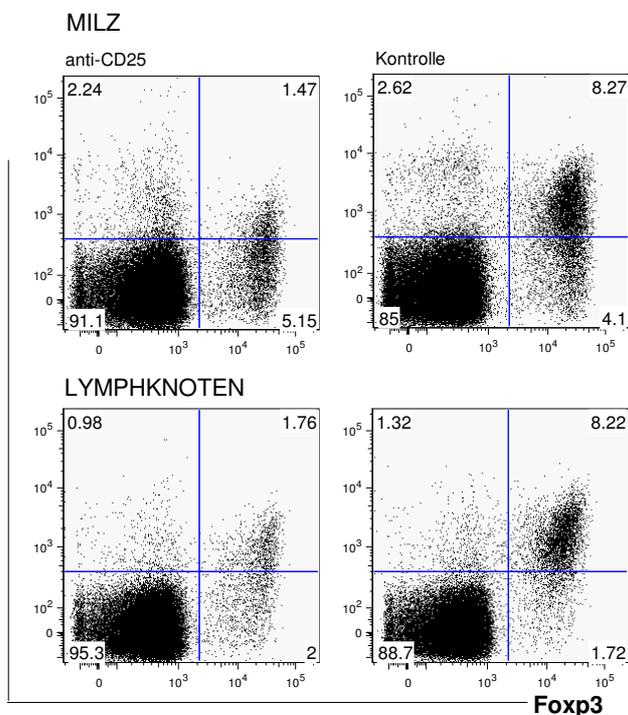
#### 4.2.13. Graphische und statistische Auswertung

Die graphische Auswertung erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism. Für die statistische Berechnung wurde das Mann-Whitney Testverfahren verwendet, wobei jeder p-Wert < 0,05 signifikant war (\*: p= 0,01-0,05, \*\*: 0,001-0,01, \*\*\*: < 0,001), alle p-Werte > 0,05 galten als nicht signifikant (ns).

## 5. Ergebnisse

### 5.1. Depletion CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorischer T-Zellen

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen (Tregs) sind von großer Bedeutung in der Limitierung von Entzündungsreaktionen bzw. bei der Entstehung von Toleranz gegenüber Autoantigenen. Aus diesem Grund spielt die Erforschung des Einflusses von Tregs auf Autoimmunkrankheiten eine große Rolle. Um die Bedeutung von Tregs am Modell der G6PI Arthritis näher charakterisieren zu können, wurde die Mehrzahl dieser Zellen mit Hilfe des anti-CD25 Antikörpers PC61 depletiert. Für die Behandlung wurde jeweils 400 µg des depletierenden Antikörpers intraperitoneal am Tag 11 und 8 vor der Immunisierung mit G6PI injiziert.

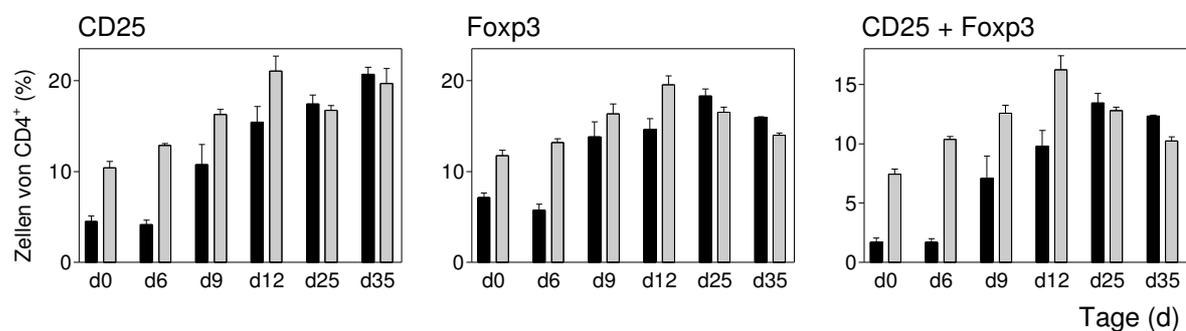


**Abb. 6a: Depletionseffekt nach Behandlung mit einem anti-CD25 Antikörper.** Die Mäuse wurden am Tag -11 und -8 vor der Immunisierung mit jeweils 400 µg anti-CD25 Antikörper (PC61) behandelt oder unbehandelt belassen. Zur Kontrolle der Depletion wurden aus den Mäusen am Tag 0, dem Tag der Immunisierung, Milz und inguinale Lymphknoten präpariert. Die daraus gewonnenen Zellen wurden mit Antikörpern gegen CD4 und CD25 (7D4) gefärbt, fixiert und nach Kernpermeabilisierung gegen Foxp3 gefärbt. Die Analyse wurde im FACS durchgeführt. Gezeigt ist die Färbung von CD25 (y-Achse) gegen Foxp3 (x-Achse) in den CD4<sup>+</sup> Zellen für jeweils eine depletierte Maus (linke Dot-Plots) und eine Kontrollmaus (rechte Dot-Plots) in Milz (oben) und inguinalen Lymphknoten (unten).

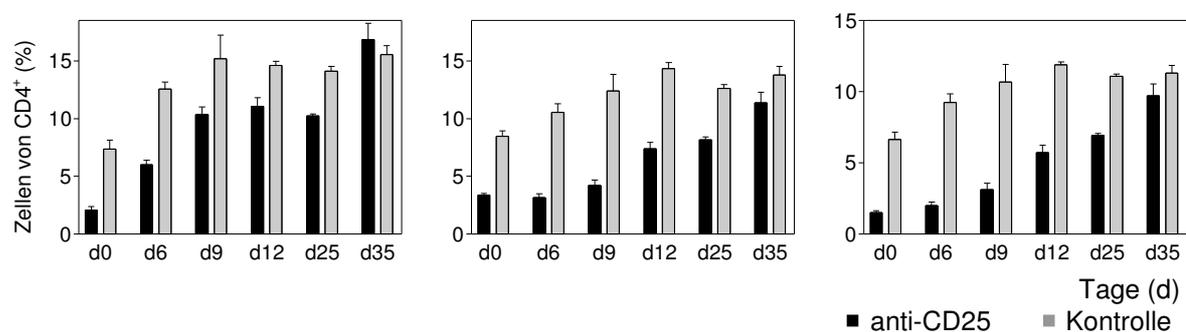
Der Erfolg der Depletion wurde für Tag 0, dem Tag der Immunisierung, beispielhaft dargestellt (Abb. 6a). Gezeigt sind Dot-Plots von Zellen aus Milz (oben) und drainierenden, inguinalen Lymphknoten (unten). Die linken Plots zeigen Milzzellen aus Mäusen, die mit anti-CD25 Antikörper behandelt wurden, die rechten stellen Zellen aus unbehandelten Kontrollen dar. Gezeigt ist die Expression von CD25 und Foxp3 in CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Der Depletionseffekt war im gezeigten Beispiel deutlich zu erkennen, so betrug in der Milz die Zahl CD25<sup>+</sup> Zellen 3,7 % in der depletierten Maus im Vergleich zu 10,9 % in der Kontrollmaus. Die Zahl der Foxp3<sup>+</sup> Zellen in dem

behandelten Tier lag bei 6,6 %, in der Kontrollmaus bei 12,4 %. Den größten Anteil der Tregs machen  $CD25^+Foxp3^+$  doppelpositive regulatorische T-Zellen aus. Deutlich sichtbar zeigten die Plots die Reduktion dieser Zellen auf 1,5 % nach Depletion im Vergleich zur Kontrolle (8,3 %). Der kleinere Teil CD25 oder Foxp3 einfachpositiver Zellen änderte sich hingegen kaum. In den drainierenden Lymphknoten war dieser Effekt in vergleichbarer Weise sichtbar. Auch hier fand man eine deutliche Reduktion der doppelpositiven Treg Zellen auf 1,8 % nach Depletion im Vergleich zu dem Kontrollwert von 8,2 %.

## MILZ



## LYMPHKNOTEN



**Abb. 6b: Verlauf der Depletion regulatorischer T-Zellen.** Die Mäuse wurden entweder mit PC61 behandelt (schwarze Balken) oder als Kontrolle unbehandelt belassen (graue Balken) und anschließend immunisiert. An den Tagen 0, 6, 9, 12, 25 und 35 nach Immunisierung wurden Milz und inguinale Lymphknoten der Mäuse isoliert und die Expression von CD25 und Foxp3 in den  $CD4^+$  Zellen gemessen. Hierfür wurden die Zellen wie unter 6a beschrieben gefärbt. Gezeigt ist der prozentuale Anteil der CD25 (links), Foxp3 (mitte) und doppelpositiven (rechts)  $CD4^+$  Zellen. Die Balken für jeden gezeigten Tag ergeben sich aus den Mittelwerten von 3 bis 5 Tieren pro Gruppe. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar.

Um Dauer und Stärke der Depletion zu untersuchen, wurde die Expression von CD25 und Foxp3 auf  $CD4^+$  T-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten im Verlauf der G6PI Arthritis gemessen. Das Balkendiagramm in Abb. 6b zeigt die  $CD25^+$ ,  $Foxp3^+$  und  $CD25^+Foxp3^+$  Zellen unter den  $CD4^+$  T-Zellen. Die oberen Diagramme zeigen die Werte für die Milz, die unteren für die inguinalen Lymphknoten. In der Milz war

die Depletion CD25<sup>+</sup> Zellen bis in die Induktionsphase (Tag 12) der G6PI Arthritis hinein erkennbar. Die Ausgangswerte am Tag 0 betragen im Mittel 10,4 % in den Kontrolltieren und 4,5 % in den behandelten Tieren. Die Expression von CD25 stieg in beiden Gruppen bis zum Ende der Untersuchung am Tag 35 an, wobei der Depletionseffekt bis zum Tag 12 deutlich erkennbar blieb. So erreichte die Expression von CD25 in den Kontrollen am Tag 12 einen gemittelten Wert von 20,1 %, während nach Depletion die Zahl CD25 exprimierender Zellen bei 15,4 % lag. Dies entsprach 20 Tage nach der letzten Behandlung mit dem anti-CD25 Antikörper einer verbleibenden Reduktion um 23 %. An den späteren Kinetiktagen hatten sich die Werte für depletierte- und Kontrolltiere bereits wieder angeglichen, am Tag 35 zeigte sich tendenziell eher eine stärkere Expression von CD25 in den behandelten Mäusen.

Für die Foxp3<sup>+</sup> Zellen war der Depletionseffekt ebenfalls bis zum Tag 12 deutlich nachweisbar. An diesem Tag wurde in den Kontrollen das Maximum der Foxp3 Expression mit 19,5 % erreicht, in den behandelten Tieren lag die Zahl Foxp3<sup>+</sup> Zellen bei 14,6 %. Die Zahl Foxp3<sup>+</sup> Zellen in den behandelten Tieren stieg bis zum Tag 25 auf 20 % an und fiel im weiteren Verlauf wie bei den Kontrollen ab auf ca 15 % ab. Am deutlichsten war der Verlauf der Depletion bei den CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Zellen zu erkennen. Am Tag 0 lag die Zahl der doppelpositiven Zellen bei 7,4 % in den Kontrollen und bei 1,7 % in den behandelten Mäusen. Die Expression blieb in den depletierten Tieren bis zum Tag 12 mit 9,8 % deutlich hinter den Kontrollen mit 16,2 % zurück. Es zeigte sich bei den Kontrolltieren eine schnelle Reduktion der Expression nach Tag 12, während die Werte der behandelten Tiere bis zum Tag 25 auf 13,4 % ansteigen, und dann langsam abfielen.

In den inguinalen Lymphknoten war ein Depletionseffekt über einen längeren Zeitraum nachweisbar. In den Kontrollen stieg die Expression von CD25 von 7,4 % am Tag 0 kontinuierlich auf 15,5 % am Tag 35 an. Nach Depletion fand man einen Anstieg von 2,1 % am Tag 0 auf 16,9 % am Tag 35, wobei der Depletionseffekt bis zum Tag 25 deutlich erkennbar blieb. Noch deutlicher war der Effekt für die Foxp3<sup>+</sup> und doppelpositiven Zellen. In den Kontrollen exprimierten 8,5 % der CD4<sup>+</sup> Zellen am Tag 0 Foxp3 und nur 3,4 % in den behandelten Tieren. Die Expression stieg in beiden Gruppen bis zum Tag 35 an, und erreichte 13,8 % in den Kontrollen und 11,4 % nach Depletion. Ein Abfall der Expression während der Remissionsphase, wie in

der Milz, war in den Lymphknoten nicht zu beobachten. Die doppelpositiven Zellen zeigten einen ähnlichen Verlauf wie für die Foxp3 Expression beschrieben.

## **5.2. Effekte der Depletion CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorischer T-Zellen auf den Verlauf der G6PI Arthritis**

Im Folgenden wurden die Auswirkungen der Treg-Depletion auf die G6PI Arthritis untersucht. Abb. **7a** zeigt den klinische Verlauf der G6PI Arthritis nach Depletion und in Kontrolltieren bis zum Tag 82 nach Immunisierung (obere Abbildung).

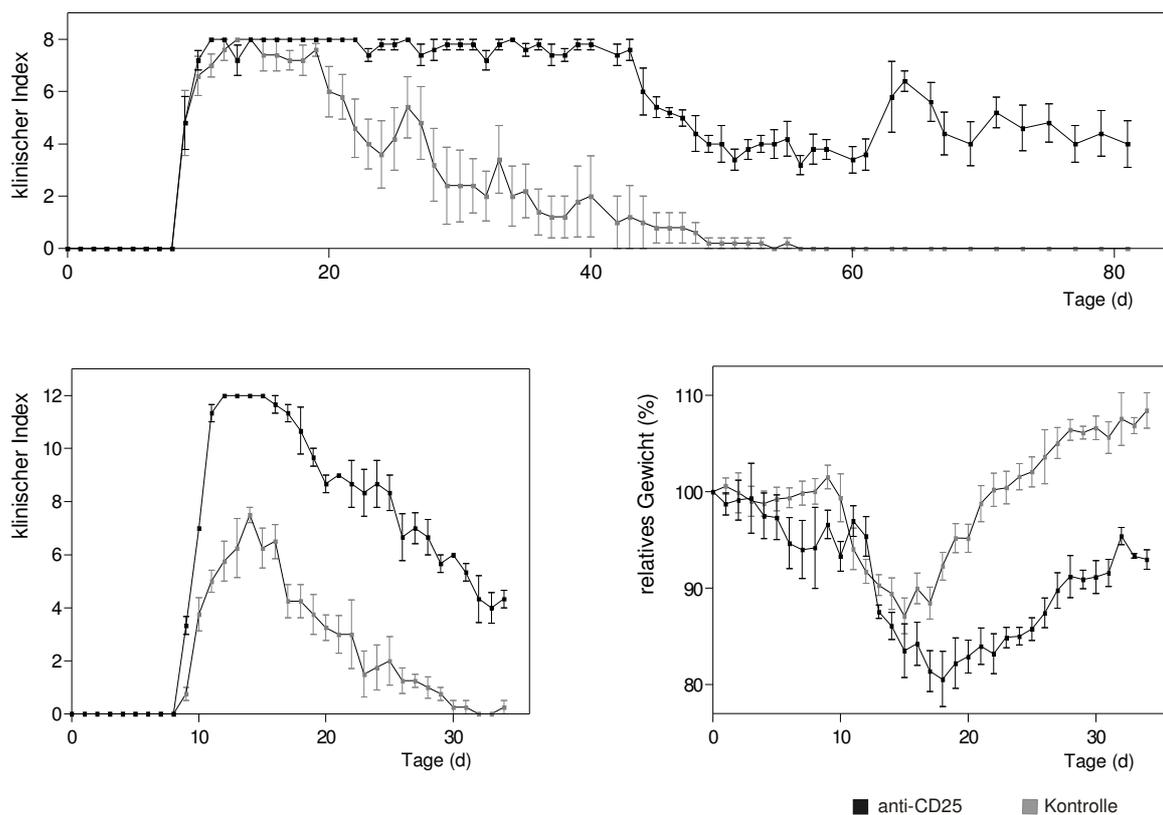
Die behandelten Mäuse wurden am Tag 11 und 8 vor Immunisierung mit jeweils 400µg anti-CD25 Antikörper behandelt (schwarze Kurve) oder unbehandelt belassen (graue Kurve), und anschließend mit 400µg G6PI subkutan immunisiert. Von jeder Maus wurden ab dem Tag der Immunisierung die klinische Zeichen der Entzündung dokumentiert.

In den Kontrolltieren waren erste Zeichen der entzündlichen Veränderungen an den Gelenken am Tag 9 nach Immunisierung zu beobachten, am Tag 13 erreichte die Entzündung das Maximum mit einem klinischen Index von 8 (siehe auch Fotos in Abb. **7b**). Anschließend waren die Entzündungszeichen wieder rückläufig, so lag der gemittelte Index am Tag 40 nur noch bei 2. Mit einigen Schwankungen fiel der Index weiterhin stetig. Ab Tag 46 waren Entzündungszeichen kaum mehr zu beobachten.

Nach Depletion der Tregs waren erste Entzündungszeichen ebenfalls am Tag 9 nach Immunisierung erkennbar. Es zeigte sich eine deutliche Chronifizierung der Arthritis, so lag der Index am Tag 40 noch bei 8. Am Tag 44 fiel der Index auf 6 und blieb anschließend unter Schwankungen bis zum Ende der Messung nahezu konstant. Am Tag 81 lag der Index immernoch bei einem Wert von 4. Es zeigte sich, dass die Arthritis nach Depletion nicht nur chronifizierte, sondern die Mäuse zudem wesentlich schwerer erkrankten. Dies wurde an einer massiveren Schwellung und Rötung, sowie teilweiser Rhagadenbildung der betroffenen Gelenk deutlich (siehe Fotos in Abb. **7b**). Für diese schwersten Entzündungszeichen wurde ein neuer Indexwert von 3 eingeführt, so dass jedes Tier ein Maximum von 12 erreichen konnte.

Ein weiteres Experiment, in dem dieser neue Index verwendet wurde, ist in Abb. **7a** (unten links) dargestellt. Die bereits vermutete Exazerbation der Arthritis nach Depletion zeigte sich deutlich. Für die Kontrollgruppe wurde ein vergleichbarer Verlauf wie zuvor beobachtet. Das Maximum der Entzündungszeichen wurde mit 7,5

am Tag 14 nach Immunisierung beobachtet, anschließend kam es zu einem kontinuierlichem Abfall auf 0,3 bis zum Ende der Messung. Nach Depletion erkrankten die Mäuse am gleichen Tag wie die Kontrollen, wurden allerdings schwerer krank. Das Maximum der Entzündung wurde am Tag 12 mit einem Index von 12 erreicht. Nachdem die Tiere für weitere 3 Tage diesen Wert beibehielten, fiel der Index anschließend langsamer als bei den Kontrollen und erreichte am Ende der Messung noch einen Wert von 4,3.



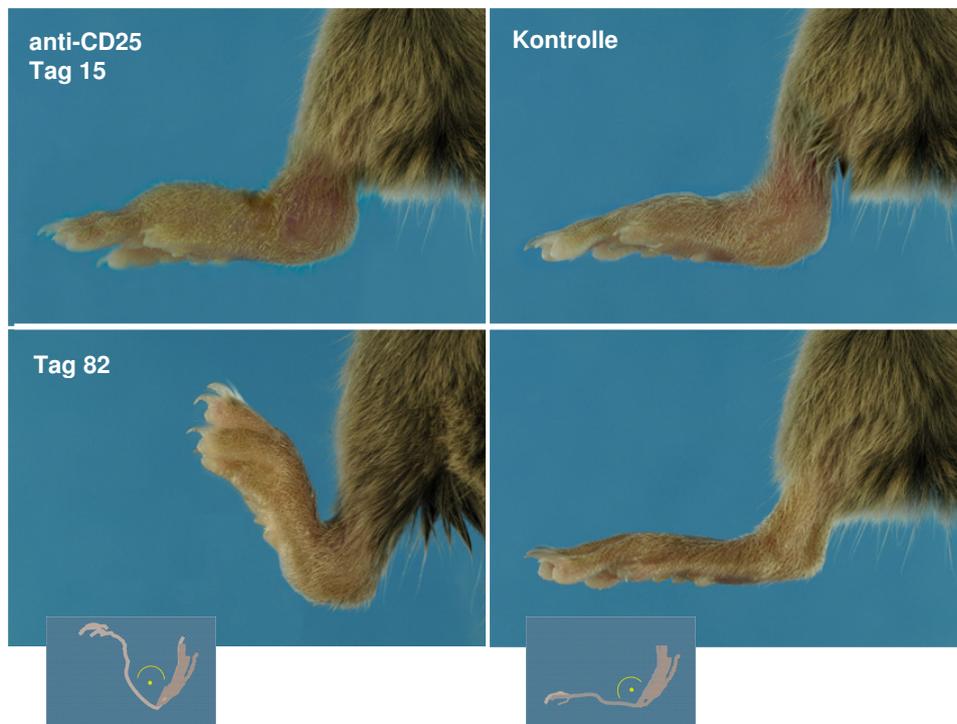
**Abb. 7a: Klinischer Verlauf der G6PI-induzierten Arthritis nach Depletion regulatorischer T-Zellen.** Die Kurven mit den schwarzen Quadraten stellen die mit PC61 behandelten Tiere, die Kurven mit den grauen Quadraten die Kontrollgruppen dar. Die obere Abbildung zeigt den klinischen Verlauf bis zum Tag 82 nach Depletion mit dem ursprünglichen Index für den Schweregrad der Arthritis. Für jede Pfote wurde ein Punktwert von 0 bis 2 vergeben, so dass ein Maximalwert von 8 pro Tier erreicht werden konnte. Auf der y-Achse ist der Mittelwert des klinischen Index für alle Tiere einer Gruppe dargestellt. Auf der x-Achse sind die Tage gezeigt. Um den schwereren Verlauf nach Depletion zu berücksichtigen, wurde ein dritter Indexpunkt pro Pfote vergeben, so dass jedes Tier einen maximalen Punktwert von 12 erreichen konnte. Die untere linke Abbildung zeigt den klinischen Verlauf mit diesem neuen Index bis Tag 34 nach Immunisierung. Zusätzlich wurden diese Tiere jeden Tag gewogen. Die untere rechte Abbildung zeigt die Gewichtskurve. Auf der y-Achse ist das Gewicht in Prozent dargestellt, auf der x-Achse die Tage. Das Gewicht am Tag 0 stellt den Ausgangswert als 100 % dar. Das Gewicht jedes weiteren Tages wurde auf diesen Ausgangswert bezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte der Kontrollmäuse (graue Kurve) und der depletierten Tiere (schwarze Kurve). In der oberen Abbildung ergeben sich die Mittelwerte aus 5 Tieren pro Gruppe. Die Mittelwerte der beiden unteren Abbildungen ergeben sich aus 3 Tieren in der depletierten Gruppe und 4 Tieren bei den Kontrollen. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar.

Als zusätzlicher Parameter zum Index wurden die Mäuse täglich gewogen (Abb. **7a** unten rechts). Die Kurve zeigt den gemittelten, prozentualen Anteil des Gewichtes vom Ausgangsgewicht der Mäuse am Tag der Immunisierung. Für die Kontrolltiere (graue Kurve) zeigte sich ein rascher Abfall des Gewichtes mit einem Tiefpunkt von 87,1 % am Tag 15 nach Immunisierung. Anschließend stieg das Gewicht entsprechend dem Rückgang der Entzündungszeichen an und erreichte am Tag 30 106,6 % des Ausgangsgewichtes. Nach Depletion der Tregs zeigte sich im Vergleich ein stärkerer Abfall des Gewichtes. Die größte Gewichtsreduktion auf 80,6 % des Ausgangsgewicht wurde am Tag 18 nach Immunisierung gemessen. In der Kontrollgruppe betrug das Gewicht an diesem Tag bereits wieder 92,3 %. Bis zum Ende der Messung erreichten die Tiere nach Depletion das Ausgangsgewicht nicht mehr. Die Mäuse nahmen langsamer als in der Kontrollgruppe wieder zu und erreichten am Tag 30 im Mittel nur 91,1 % des Ausgangsgewichtes, was einer Gewichts Differenz von 15,5 % zwischen Kontrollgruppe und behandelter Gruppe entsprach. Das Gewichtsverhalten spiegelte somit den klinischen Verlauf der Arthritis in beiden Gruppen sehr gut wieder.

Zur Verdeutlichung des klinischen Verlaufes sind in Abb. **7b** beispielhaft Fotos von Mäusebeinen am Tag 15, zum Höhepunkt der Arthritis (oben) und am Tag 82 (unten) gezeigt. Die Fotos zeigen jeweils die Hinterpfoten einer depletierten Maus (links) und einer Kontrolle (rechts). Die Kontrollmaus am Tag 15 zeigte eine starke Schwellung, vor allem im Bereich des Sprunggelenkes und des Mittelfußes. Die Stärke der Schwellung entsprach im verwendeten Indexsystem einem Punktwert von 2 (siehe auch Material und Methoden 4.2.4).

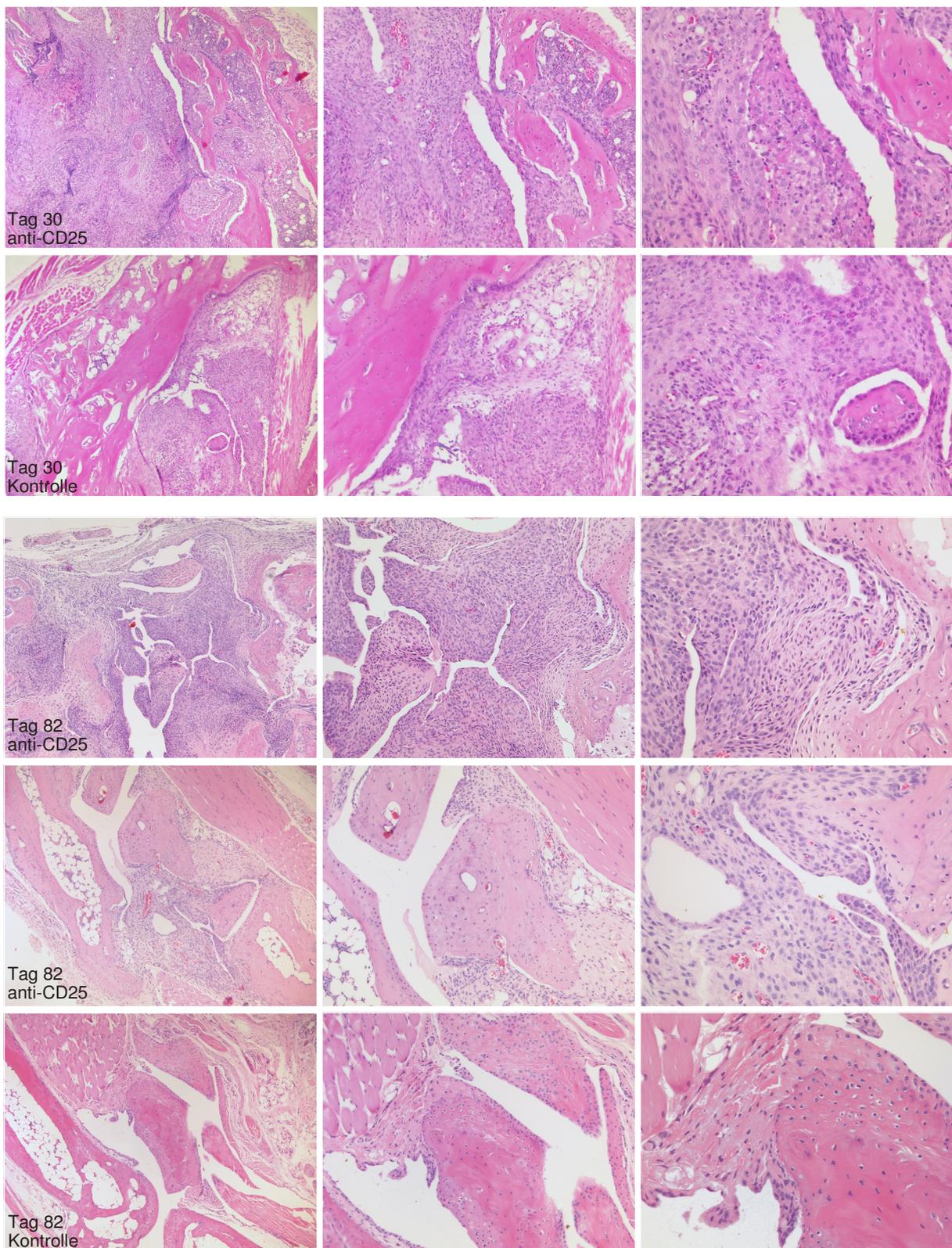
Die Pfote der depletierten Maus war deutlich stärker geschwollen und gerötet, zusätzlich fanden sich, wie im Bereich des Sprunggelenkes erkennbar, tiefe Rhagaden. Diese Pfote entsprach einem Punktwert von 3 im Index. Die unteren Bilder zeigen die Hinterpfoten einer depletierten- und einer Kontrollmaus am Tag 80 nach Immunisierung. An der Pfote des Kontrolltieres waren keinerlei Entzündungszeichen mehr erkennbar, auch zeigten sich keine Einschränkungen in der Beweglichkeit der Pfote. Im Gegensatz dazu war die Pfote der depletierten Maus am Tag 80 noch leicht geschwollen. Bemerkenswert war die massive Funktionseinschränkung der Pfote, die in dem gezeigten Winkel völlig versteift war.

Diese starke Deformierung der Pfoten war nur nach Depletion und der daraus folgenden Chronifizierung der Arthritis erkennbar.



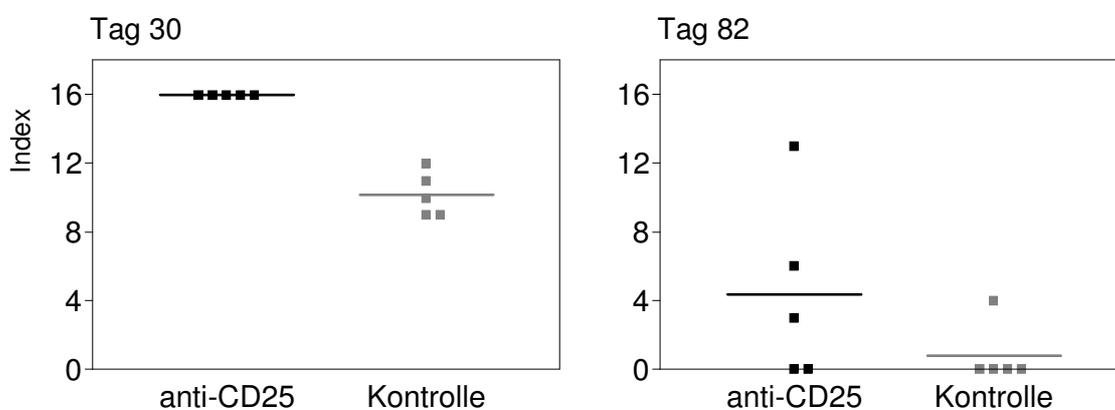
**Abb. 7b: Beurteilung der Arthritisschwere.** Gezeigt sind repräsentative Beispiele von Hinterpfoten erkrankter Mäuse am Tag 15 (oben) und 82 (unten) nach Immunisierung mit 400 $\mu$ g G6PI. Zum Höhepunkt der Erkrankung zeigten sich nach Behandlung mit PC61 neben massiven Schwellungen und Rötungen auch Rhagaden an den entzündeten Pfoten (links oben), die Rötung und Schwellung der Pfoten von Kontrolltieren waren schwächer ausgeprägt (rechts oben). Nach Depletion endete der chronische Verlauf der Erkrankung in einer Versteifung der betroffenen Gelenke (links unten, Einsteifung des Gelenks im gezeigten Winkel). Die Gelenke der Kontrolltiere blieben nach Abheilung frei beweglich (rechts unten).

In den histologischen Untersuchungen fanden sich ebenfalls deutliche Unterschiede zwischen den behandelten Tieren und den Kontrollen. Abb. 7c zeigt repräsentative HE gefärbte Gelenkschnitte unterschiedlicher Vergrößerungen einer depletierten Maus und einer Kontrollmaus am Tag 30 (oben) und 82 (unten) nach Immunisierung. In beiden Tieren waren am Tag 30 entzündliche Infiltrate erkennbar, wobei sich nach Depletion eine massivere Entzündung im Gelenk nachweisen ließ. Für Tag 82 sind repräsentative Schnitte aus zwei Mäusen nach Depletion gezeigt. Im Kontrolltier ließen sich kaum mehr Entzündungszeichen nachweisen, während nach Depletion, je nach Schwere der beobachteten Entzündungszeichen, histologisch noch leichte bis starke entzündliche Infiltrate erkennbar waren.



**Abb. 7c: Histologische Darstellung.** Gezeigt sind repräsentative HE gefärbte Gelenkschnitte in 50x, 100x und 200x Vergrößerung (von links nach rechts) von behandelten- oder Kontrolltieren am Tag 30 und 82 nach Immunisierung. Nach Behandlung mit PC61 fand sich an Tag 30 ein stärkeres entzündliches Infiltrat (1. Reihe) als in den Kontrollen (2.Reihe). Für Tag 82 sind zwei Beispiele nach Depletion und eine Kontrolle gezeigt. In den behandelten Tieren fanden sich noch deutliche (3. Reihe) bis leichte (4.Reihe) entzündliche Infiltrate, während im Kontrollbeispiel keine Zeichen von Entzündung nachweisbar waren (5.Reihe).

Die verblindete, histologische Beurteilung wurde von Dr. Morawietz in Berlin durchgeführt und in Abb. 7d dargestellt. Der erreichte Index jeder einzelnen Maus, sowie der Mittelwert für die depletierten- und die Kontrollgruppen wurde angegeben. Gezeigt sind Abbildungen für Tag 30 (links) und Tag 82 (rechts). Nach Depletion erreichten die Mäuse den maximal möglichen Wert von 16, die Kontrollgruppe erreichte im Mittel einen Index von 10,2. Am Tag 82 fanden sich in der depletierten Gruppe stärkere Schwankungen in den beobachteten Infiltraten, wobei der Mittelwert bei 4,4 lag, während in der Kontrollgruppe mit einem gemittelten Index von 0,8 kaum Entzündung nachweisbar war.



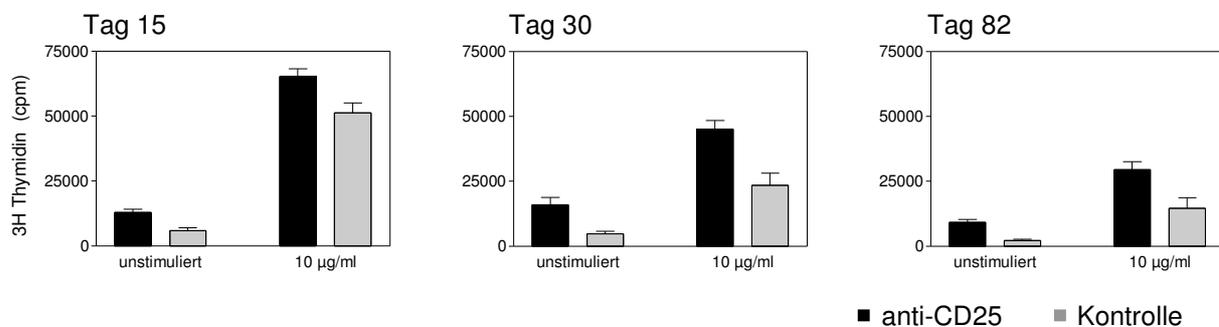
**Abb. 7 d: Histologische Bewertung der Arthritis Schwere.** Gezeigt ist der histologische Index in depletierten- (schwarze Quadrate) und Kontrolltieren (graue Quadrate) am Tag 30 (links) und Tag 82 (rechts). Je nach Stärke des entzündlichen Infiltrates wurde für jede Pfote ein Punktwert von 0 bis 4 vergeben, nach Addition konnte jede Maus einen Punktwert von maximal 16 erreichen. Dargestellt sind der Index für jede einzelne Maus sowie der Mittelwert beider Gruppen.

### 5.3. Messung der *in vitro* Proliferation nach Treg Depletion

Nach den beobachteten deutlichen klinischen Effekten der Treg Depletion sollten die genaueren immunologischen Mechanismen untersucht werden, die zur Exazerbation und Chronifizierung der Arthritis führten. Hierzu wurde die *in vitro* Proliferation von Milzzellen gemessen, da Tregs zumindest *in vitro* die Proliferation von Zellen supprimieren können. Abb. 8 zeigt die Proliferation isolierter Milzzellen am Tag 15, 30 und 82 nach Immunisierung. Für die Messung wurden die Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten mit 10µg/ml G6PI stimuliert oder unstimuliert belassen. Angegeben sind die *counts per minute (cpm) ± SEM*. Bereits die unstimulierten Zellen zeigten eine annähernd doppelt so starke Proliferation nach Depletion der Tregs, so zum Beispiel am Tag 15 mit 12911 ± 1264 im Vergleich zu den Kontrollen

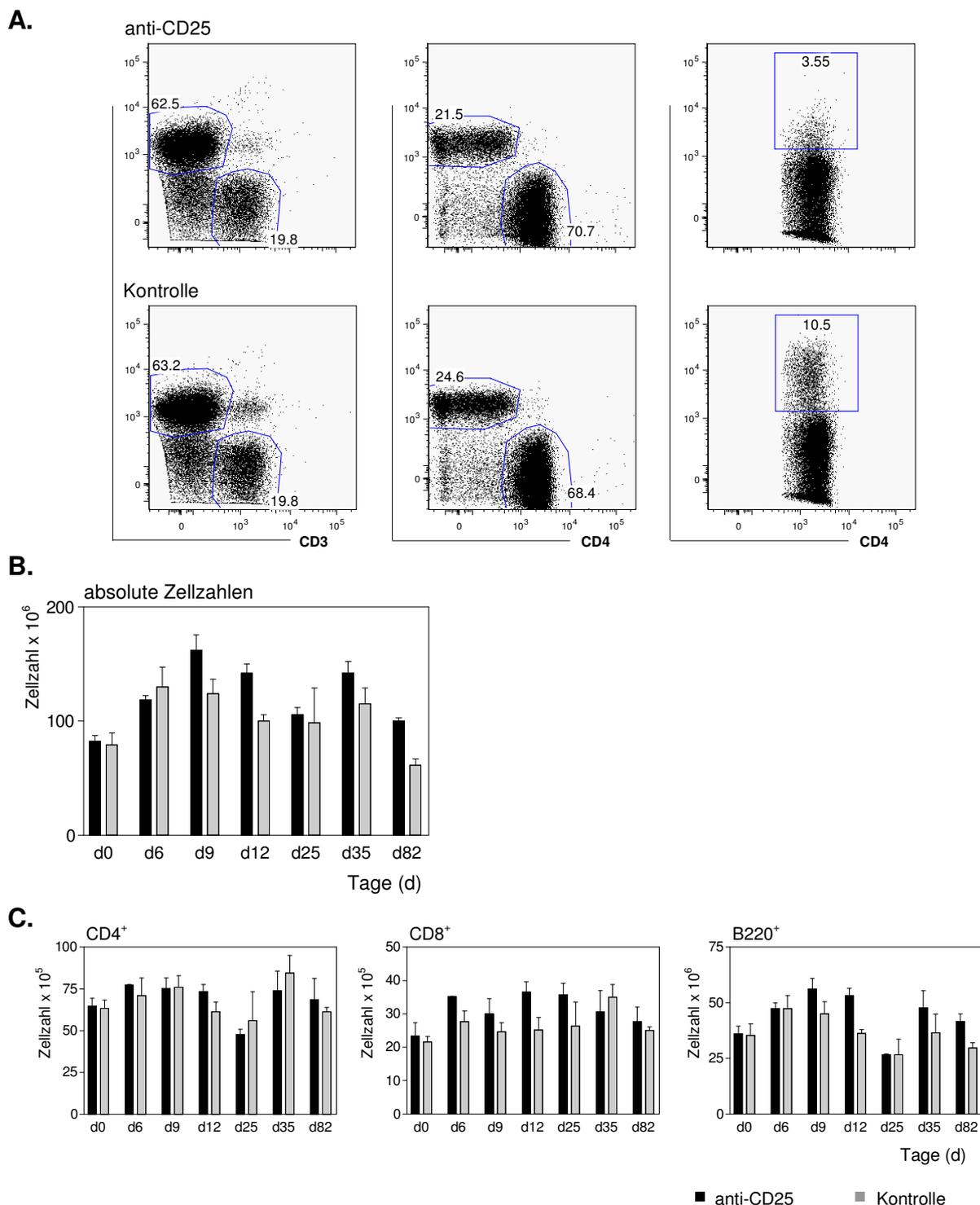
mit  $5924 \pm 1021$ . Diese erhöhte Aktivierung nach Depletion konnte auch noch am Tag 82 gefunden werden.

Nach Restimulierung mit G6PI nahm die Proliferation in beiden Gruppen stark zu. Am Tag 15 war die Proliferation in beiden Gruppen am stärksten, mit  $65371 \pm 2897$  proliferierten die Zellen nach Depletion deutlicher als die Kontrollen mit  $51314 \pm 3761$ . Passend zur Chronifizierung der Arthritis fand man Zellen aus depletierten Tieren am Tag 35 noch eine doppelt so starke Proliferation mit  $45193 \pm 3255$  im Vergleich zu den Kontrollen mit  $23614 \pm 4533$ . Anschließend fand sich ein deutlicher Rückgang der Depletion, aber nach Depletion proliferierten am Tag 82 mit  $9337 \pm 987$  noch viermal mehr Zellen als in der Kontrollgruppe mit  $2219 \pm 531$ .



**Abb. 8: In Vitro Proliferation von Milzzellen nach Depletion der Tregs.** Die Mäuse wurden entweder behandelt (schwarze Balken) oder unbehandelt (graue Balken) belassen. Jede Maus wurde mit  $400 \mu\text{g}$  G6PI subkutan immunisiert. Am Tag 15, 30 und 82 nach Immunisierung wurden Milzzellen isoliert, für drei Tage mit  $10 \mu\text{g/ml}$  G6PI stimuliert oder unstimuliert belassen. Für die letzten 18 Stunden wurde  $[^3\text{H}]$ -Thymidin zugesetzt. Gezeigt ist die Proliferation der Milzzellen in *counts per minute* (cpm) am Tag 15 (links), 30 (mitte) und 82 (rechts) nach Immunisierung. Die Balken für jeden Tag ergeben sich aus den Mittelwerten von 5 Tieren pro Gruppe. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar.

Diese Untersuchungen konnten zeigen, dass die Depletion der Tregs zu einer stärkeren Proliferation von Zellen führte. Allerdings konnte mit dieser Methode nicht geklärt werden, um welchen Zelltyp es sich dabei handelte. Um dies näher zu untersuchen, wurden durchflusszytometrisch Oberflächenfärbungen durchgeführt, um verschiedene Lymphozytenpopulationen näher zu charakterisieren. Anhand der mittels Neubauer-Zählkammer zuvor bestimmten absoluten Zellzahlen konnten so die Werte für  $\text{CD4}^+$ ,  $\text{CD8}^+$  und B-Zellen näherungsweise berechnet werden. Abb. 9a zeigt beispielhaft eine Oberflächenfärbung für jeweils eine behandelte Maus und ein Kontrolltier am Tag der Immunisierung. Das Oberflächenmolekül CD25 wurde zur Kontrolle des Depletionseffektes bei jeder Färbung mitgemessen.



**Abb. 9: Berechnung der absoluten Zellzahlen der Lymphozytenpopulationen.** Die Mäuse wurden entweder behandelt (schwarze Balken) oder unbehandelt (graue Balken) belassen. Jede Maus wurde mit 400 µg G6PI subkutan immunisiert. An den Tagen 0, 6, 9, 12, 25, 35 und 82 wurde die Mäuse getötet, die Milzzellen isoliert, anschließend gegen B220, CD3, CD4, CD8 und CD25 gefärbt und im FACS analysiert. In Abb. 9a ist ein repräsentatives Beispiel einer solchen Färbung am Tag 0 für jeweils eine depletierte (oben) und eine Kontrollmaus (unten) gezeigt. Die linken Plots zeigen die Färbung B220 gegen CD3. Die mittleren Plots zeigen die Darstellung von CD8 und CD4 auf CD3<sup>+</sup> Zellen, die rechten Plots zeigen die Expression von CD25 auf den CD4<sup>+</sup> Zellen. Abb. 9b zeigt die absoluten Zellzahlen in den Milzen der depletierten Tiere (schwarze Balken) und der Kontrolltiere (graue Balken), die mit einer Neubauer-Zählkammer berechnet wurden. Mit Hilfe der FACS-Analysen konnten die Zellzahlen für die CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> und B220<sup>+</sup> Zellen näherungsweise berechnet werden (Abb. 9c). Die Balken in allen Diagrammen ergeben sich aus mindestens 3 Tieren pro Zeitpunkt, die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

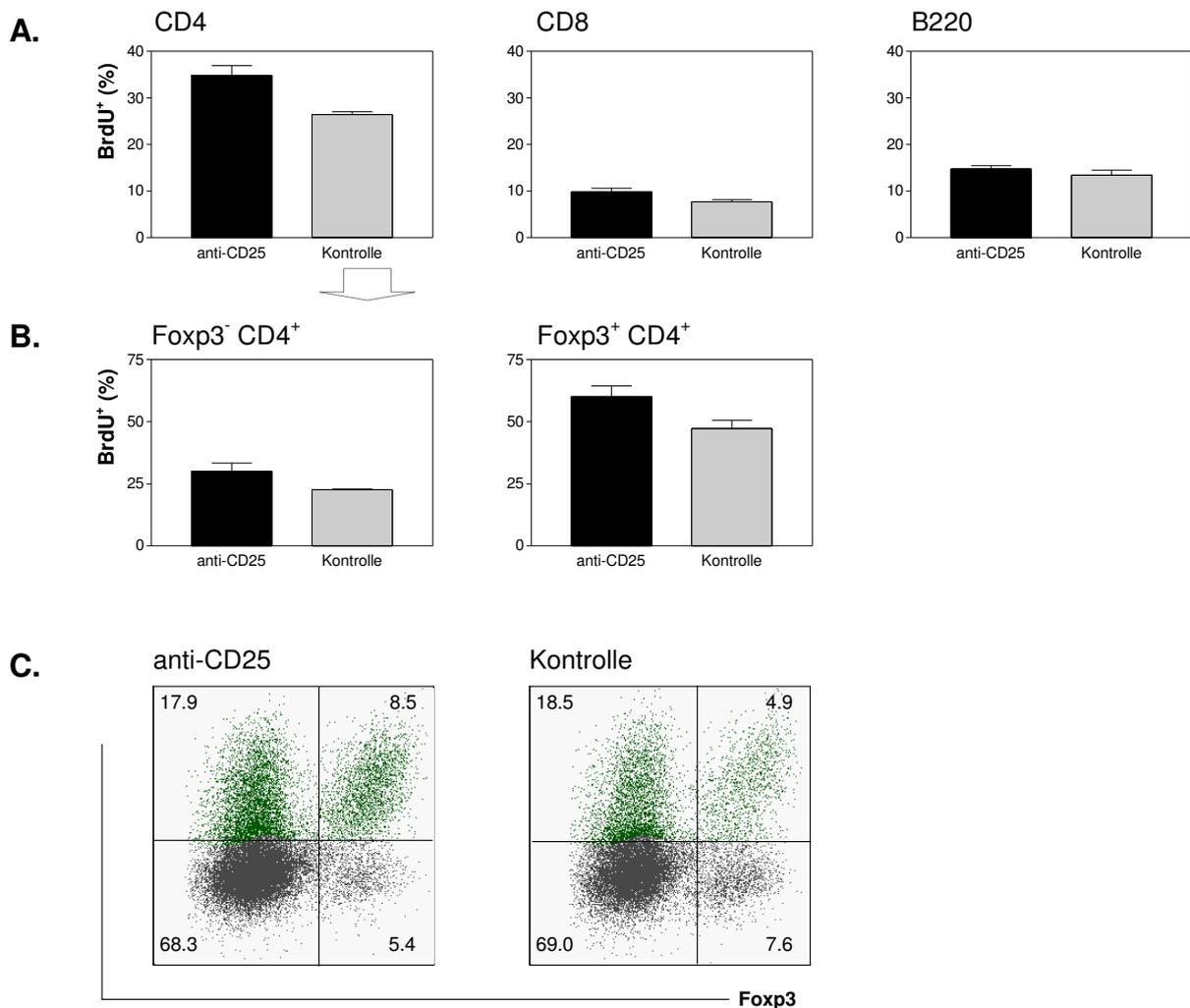
Die linken Dot-Plots zeigen die Färbungen für B220, einen B-Zellmarker und CD3, ein Oberflächenmolekül, das auf T-Zellen exprimiert wird. In den mittleren Plots sind die CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> und CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Zellen dargestellt. Die rechten Plots zeigen die Expression von CD25 auf den CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Erkennbar ist die erfolgreiche Depletion mit 3,9 % CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Zellen im Vergleich zu 10,3 % zum Kontrolltier.

In Abb. **9b** sind die absoluten Zellzahlen zu verschiedenen Zeitpunkten der G6PI Arthritis dargestellt. Es zeigte sich, dass eine deutliche Proliferation der Zellen schon am Tag 6 zu beobachten war und die höchsten Zellzahlen in der Milz mit den ersten klinischen Zeichen der Arthritis am Tag 9 erreicht wurden. Zudem konnte man nach Depletion der Tregs mehr Zellen finden, mit einem Maximum von  $1,6 \times 10^8$  Zellen am Tag 9, im Vergleich zu  $1,2 \times 10^8$  Zellen bei den Kontrollen. Zu Zeitpunkten starker klinischer Aktivität der Arthritis waren die Zellzahlen in beiden Gruppen bereits wieder rückläufig, wobei nach Depletion die Zellzahlen bis zum Ende der Messung tendenziell höher waren als in Kontrolltieren.

Um zu untersuchen, ob es sich bei den proliferierenden Zellen um Lymphozyten handeln könnte, wurden die durchflusszytometrischen Messungen durchgeführt. Abb. **9c** zeigt die untersuchten Subpopulationen. Dargestellt sind die CD4<sup>+</sup> T-Zellen (links), CD8<sup>+</sup> T-Zellen (mitte) und B-Zellen (rechts). Für die CD4<sup>+</sup> T-Zellen zeigte sich keine Zunahme der absoluten Zellzahl, auch nicht nach Depletion der Tregs. Für die CD8<sup>+</sup> T-Zellen konnte ebenfalls keine Zunahme im Verlauf der Arthritis gezeigt werden, jedoch ergaben sich leicht erhöhte Zellzahlen nach Depletion. Für die B-Zellen konnte ein Anstieg der Zellzahlen bis zum Tag 9 und ein langsamer Abfall bis zum Ende der Messung am Tag 82 beobachtet werden. Auch zeigte sich eine tendenziell stärkere Zunahme der Zellen nach Depletion.

#### **5.4. Messung der *in vivo* Proliferation nach Treg Depletion**

Mit Hilfe des [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Proliferationsassays bzw. der Berechnung der absoluten Zellzahlen konnte nicht genau gezeigt werden, welche Zellpopulationen am stärksten proliferierten. Daher wurde die Proliferation der Lymphozytenpopulationen *in vivo* untersucht. Dies hatte den Vorteil, dass die Zielzellen in der lebenden Maus markiert wurden, und somit das Verhalten dieser Zellen unter natürlichen Bedingungen untersucht werden konnte. Zur Markierung der Zellen wurde Bromo-5-Desoxyuridin (BrdU) verwendet, welches den Mäusen über das Trinkwasser verabreicht wurde.



**Abb. 10: In Vivo Proliferation der Lymphozytenpopulationen bis Tag 9 nach Immunisierung.** Eine Gruppe von Mäusen wurde mit PC61 behandelt (schwarze Balken), die andere unbehandelt (graue Balken) belassen und anschließend immunisiert. Am ersten Tag nach Immunisierung wurde den Mäusen 1mg BrdU intraperitoneal injiziert. Ab Tag zwei bekamen die Mäuse 0,8mg/ml BrdU über das Trinkwasser verabreicht, das Wasser wurde jeden dritten Tag gewechselt. Am Tag 9 wurden die Mäuse getötet und die Milzen entnommen. Die Milzzellen wurden gegen B220, CD8 und CD4 gefärbt und fixiert, nach Kernpermeabilisierung erfolgte die Färbung gegen BrdU und Foxp3. Abb. 10a zeigt den Anteil in Prozent der BrdU<sup>+</sup> Zellen unter den CD4<sup>+</sup> (links), CD8<sup>+</sup> (mitte) und B220<sup>+</sup> Zellen (rechts). Die Diagramme in 10b zeigen den Anteil der BrdU<sup>+</sup> Zellen in Foxp3<sup>-</sup> (links) und Foxp3<sup>+</sup> (rechts) CD4<sup>+</sup> Zellen. Die Balken in allen Diagrammen ergeben sich aus den Mittelwerten von 3 Tieren pro Gruppe, die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler. Die Dot-Plots in Abb. 10c stellen ein repräsentatives Beispiel für die Färbung BrdU gegen Foxp3 in den CD4<sup>+</sup> Zellen dar, der linke Plot zeigt ein Beispiel nach Depletion, der rechte ein Kontrolltier. Zur besseren Darstellung wurden die BrdU<sup>+</sup> Zellen grün eingefärbt, die Zahlen entsprechen den Prozenten der einzelnen Quadranten.

Am Tag 9 nach Immunisierung wurde die BrdU-Inkorporation in Zellen der Milz durchflusszytometrisch gemessen. Unter Verwendung geeigneter Antikörper gegen spezifische Oberflächenmoleküle der Lymphozytenpopulationen konnte somit der

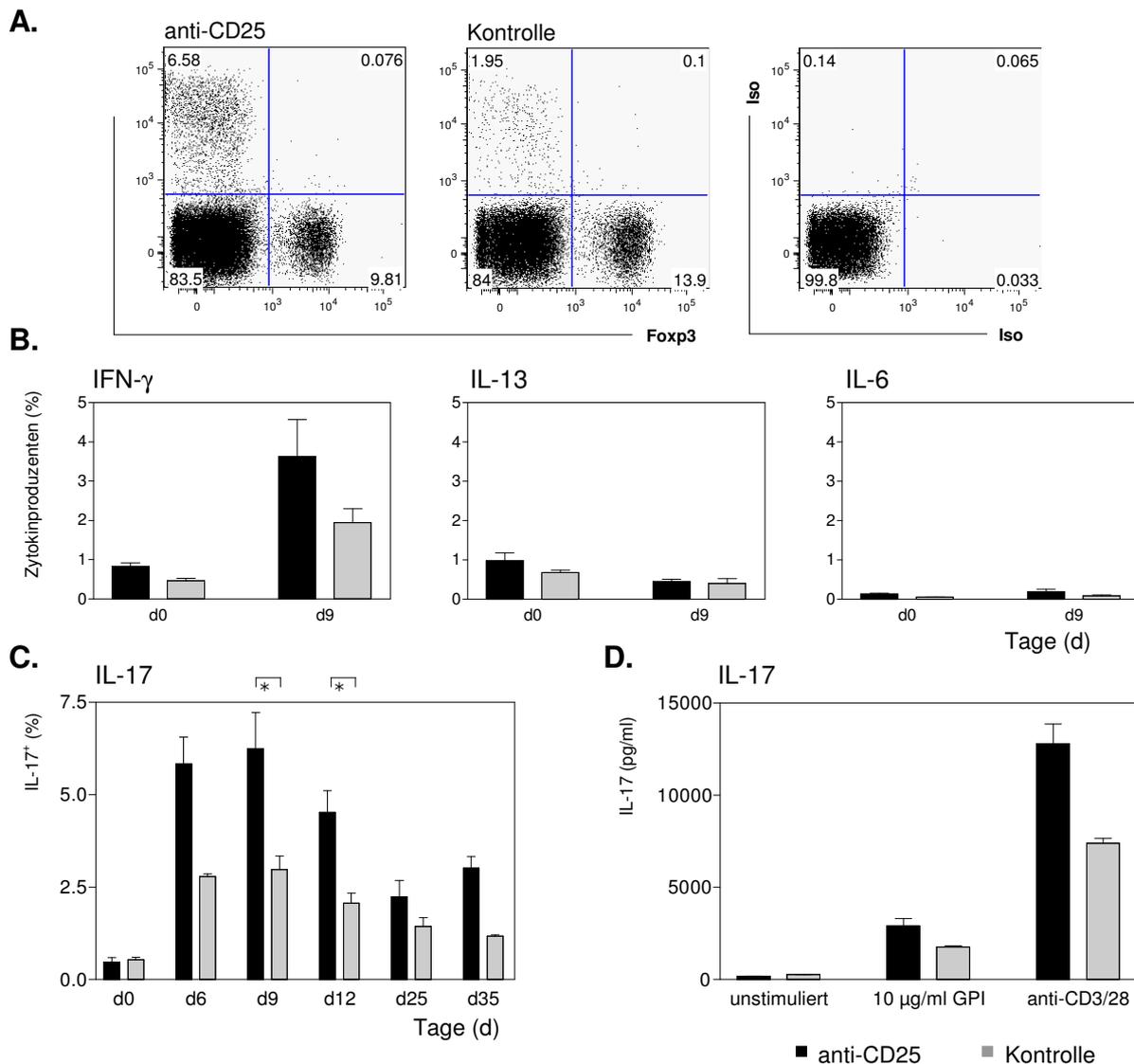
BrdU-Einbau und damit die Proliferation dieser Zellpopulationen *in vivo* analysiert werden.

Die Graphiken in Abb. **10a** zeigen die BrdU-Inkorporation in CD4<sup>+</sup> T-Zellen (links), CD8<sup>+</sup> T-Zellen (mitte) und B-Zellen (rechts) am Tag 9 nach Immunisierung. Bei den BrdU<sup>+</sup> Zellen handelt es sich um die Zellen, die sich bis zu diesem Zeitpunkt in der Maus geteilt hatten. Die B-Zellproliferation nach Depletion unterschied sich mit 14,7 % im Mittel kaum von der Proliferation in den Kontrollen mit 13,4 %. Bei den CD8<sup>+</sup> T-Zellen teilten sich 9,8 % der Zellen nach Depletion und 7,7 % in der Kontrollgruppe. Nach Immunisierung mit G6PI war die *in vivo* Proliferation in den CD4<sup>+</sup> T-Zellen am stärksten. Mit 34,9 % geteilter Zellen nach Depletion fand sich in dieser Gruppe zudem eine deutlich stärkere Proliferation als in der Kontrollgruppe mit 26,5 %.

Die Proliferation CD4<sup>+</sup> Teffs und Tregs sollte daher genauer analysiert werden. Es wurde eine Kofärbung von BrdU und Foxp3 durchgeführt, um beide Zellpopulationen voneinander trennen zu können. Die beiden Graphiken in Abb. **10b** stellen den Anteil der Foxp3<sup>-</sup> (links) bzw. Foxp3<sup>+</sup> (rechts) CD4<sup>+</sup> T-Zellen dar, die sich bis zum Tag 9 geteilt hatten (BrdU<sup>+</sup> Zellen). Hierbei zeigte sich, dass die Tregs schon während der Induktionsphase der G6PI Arthritis sehr stark proliferierten. Fast die Hälfte der Tregs teilte sich in der Kontrollgruppe (47,3 %), in der depletierten Gruppe fand sich interessanterweise sogar eine stärkere Proliferation mit 60,1 %. Auch in den Foxp3<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die zum größten Teil die Effektorzellen darstellen, fand sich nach Depletion eine stärkere Proliferation mit 30,1 % im Vergleich zur Kontrollgruppe mit 22,7 %. Abb. **10c** zeigt zwei repräsentative Dot-Plots einer Kofärbungen von Foxp3 und BrdU in einer depletierten Maus (links) und einem Kontrolltier (rechts).

## 5.5. Einfluss der Tregs auf die zelluläre Immunantwort

In den BrdU-Experimenten konnte eine starke Proliferation CD4<sup>+</sup> T-Zellen gezeigt werden. Daher wurde im Folgenden eine detailliertere Analyse dieser Zellpopulation durchgeführt. Für die Charakterisierung der CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation eignete sich die Messung der Zytokinproduktion dieser Zellen. Anhand der Analyse ihres spezifischen Zytokinemilieus war es möglich die Beteiligung unterschiedlicher CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu untersuchen. Im Folgenden wurde die Produktion der Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-13, IL-6, TNF- $\alpha$  und IL-17 durchflusszytometrisch gemessen.



**Abb. 11: Zytokinproduktion in CD4<sup>+</sup> Milzzellen nach Depletion der Tregs.** Die Mäuse wurden mit PC61 Antikörper behandelt oder unbehandelt gelassen und anschließend immunisiert. Nach Isolation wurden die Milzzellen mit anti-CD3 und anti-CD28 für 6 Stunden restimuliert, wobei nach 1 Stunde Brefeldin A zu der Kultur gegeben wurde, um die Zytokinsekretion zu stoppen. Anschließend wurden die Zellen gegen CD4 und CD25 gefärbt, fixiert und intrazellulär gegen IL-17, IFN- $\gamma$ , IL-13, IL-6 und Foxp3 gefärbt. Abb. 11a zeigt ein repräsentatives Beispiel der IL-17 Produktion am Tag 9 nach Immunisierung in den depletierten Tieren (linker Dot-Plot) und den Kontrolltieren (mittlerer Dot-Plot). Der rechte Plot zeigt eine Isotypkontrolle. Abb. 11b zeigt die gemittelte Produktion von IFN- $\gamma$  (links), IL-13 (mitte) und IL-6 (rechts) nach Depletion (schwarze Balken) und in den Kontrolltieren (graue Balken). Dargestellt sind nur die CD4<sup>+</sup> Zellen am Tag 0 und 9 nach Immunisierung. Die Balken für jeden Tag ergeben sich dabei aus den Mittelwerten von 3 Tieren pro Gruppe, die Fehlerbalken geben den Standardfehler an. Abb. 11c zeigt die IL-17 Produktion im Verlauf der G6PI Arthritis. Die y-Achse zeigt die IL-17 produzierenden CD4<sup>+</sup> Zellen, die x-Achse die Tage, an denen die IL-17 Produktion gemessen wurde. Die Analyse wurde nach Depletion (schwarze Balken) und in Kontrolltieren (graue Balken) durchgeführt. Die statistische Berechnung für Tag 9 und 12 ergab einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ) zwischen der depletierten und Kontrollgruppe. Die Balken für jeden Tag ergeben sich aus den Mittelwerten von 3-5 Tieren pro Gruppe, der Fehler ist als Standardfehler dargestellt. Zur Quantifizierung der IL-17 Produktion wurde der in Abb. 11d gezeigte IL-17 ELISA am Tag 9 nach Immunisierung durchgeführt.  $6 \times 10^5$  Zellen wurden aus einer Milzsuspension entnommen und für zwei Tage mit G6PI oder anti-CD3/28 restimuliert oder unstimuliert gelassen. Die Überstände wurden abgenommen und die IL-17 Produktion in depletierten- (schwarze Balken) und Kontrolltieren (graue Balken) gemessen. Die Mittelwerte ergeben sich aus 3-5 Tieren pro Gruppe, die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar.

Abb. **11a** zeigt beispielhaft Dot-Plots der Färbung von IL-17 gegen Foxp3 in CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus der Milz am Tag 9 nach Immunisierung. Der linke Plot zeigt ein Beispiel aus einem depletierten Tier, der mittlere aus einem Kontrolltier, der rechte Plot zeigt eine Isotypkontrolle. Zur Messung der Zytokinproduktion wurden die Zellen vor der Färbung mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern für 6 Stunden restimuliert.

Die Dot-Plots zeigten die deutliche Trennung der IL-17 Produktion von der Foxp3 Expression, alle IL-17<sup>+</sup> Zellen waren Foxp3<sup>-</sup>. Nach Depletion der Tregs wurde am Tag 9 mit 6,6 % dreimal mehr IL-17 gebildet als in dem Kontrolltier mit 1,9 %. Die Plots zeigten zudem, dass nach Depletion am Tag 9 der G6PI Arthritis mit 10 % Foxp3<sup>+</sup> Zellen bereits 75 % dieser Zellen wieder vorhanden waren (14 % Foxp3<sup>+</sup> Zellen im Kontrolltier). Die Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-13 und IL-6 wurden weniger bzw. gar nicht gebildet. Abb. **11b** zeigt die Produktion dieser Zytokine im Mittel für die depletierten- und die Kontrolltiere am Tag 9 und zum Vergleich am Tag 0, dem Tag der Immunisierung. Die linke Graphik zeigt die IFN- $\gamma$  Produktion. Es konnte ein Anstieg von IFN- $\gamma$  am Tag 9 gefunden werden, auch war die Produktion von IFN- $\gamma$  mit 3,6 % nach Depletion doppelt so hoch wie bei den Kontrollen mit 1,9 %. Für IL-13 konnte nur eine geringfügige Produktion gemessen werden. Es zeigte sich in beiden Gruppen tendenziell eher ein Abfall der IL-13 Bildung von Tag 0 zu Tag 9 nach Immunisierung. So fiel die Produktion in der depletierten Gruppe von ca. 1 % an Tag 0 auf 0,7 % am Tag 9. In der Kontrollgruppe blieben die Werte konstant. IL-6 wurde an den gezeigten Tagen in beiden Gruppen nicht von CD4<sup>+</sup> T-Zellen, wie für Tag 0 und 9 gezeigt, produziert. (Abb. 11b, rechte Graphik).

Es konnte eine deutliche Produktion von IL-17 gefunden werden, was eine Beteiligung von Th17 Zellen als Effektorzellen in der G6PI Arthritis vermuten lassen könnte. Zwar fand sich auch ein Anstieg von IFN- $\gamma$ , dem Leitzytokin der Th1 Zellen, allerdings war die Produktion zu den gemessenen Zeitpunkten gering. Die kaum messbaren IL-13 Frequenzen lassen vermuten, dass das von T-Zellen produzierte IL-13 für die Pathogenese der G6PI Arthritis nicht von vorrangiger Bedeutung ist.

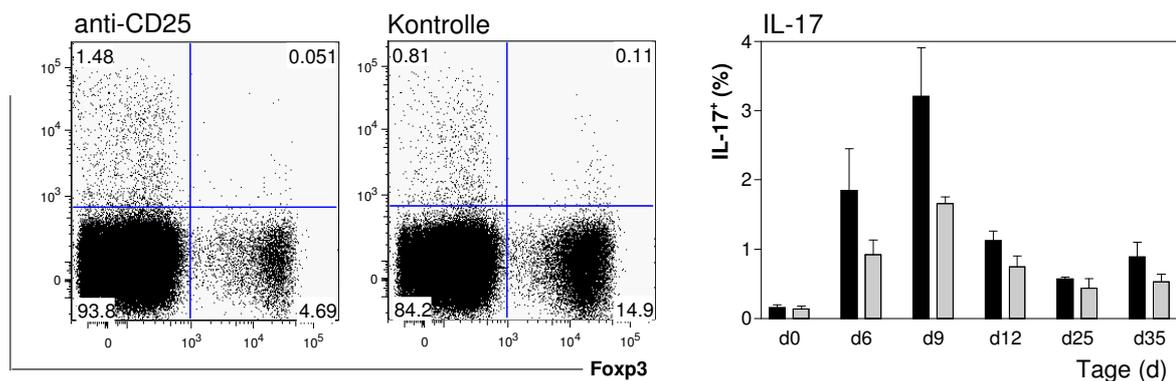
Aufgrund der hohen IL-17 Frequenzen sollte in weiteren Experimenten dieses Zytokin näher untersucht werden. Die IL-17 Produktion wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion der G6PI Arthritis gemessen. In Abb. **11c** ist der Zeitverlauf der IL-17 Produktion von Milzzellen dargestellt, wobei die Zellen *in vitro* 6 Stunden mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern restimuliert wurden. Gezeigt ist die

Produktion in CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Am Tag 0, bevor die Mäuse mit G6PI immunisiert wurden, fand man in beiden Gruppen mit 0,5 % IL-17<sup>+</sup> Zellen keine nennenswerte IL-17 Produktion in den CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Nach der Immunisierung stiegen die Frequenzen an den folgenden Tagen und erreichten ihren Höhepunkt am Tag 9 mit 6,3 % in den depletierten Tieren und 3 % in den Kontrollen. Danach fiel der Anteil IL-17<sup>+</sup> Zellen in beiden Gruppen kontinuierlich ab, blieb aber nach Depletion deutlich länger erhöht. So lag am Tag 35 die Zahl IL-17<sup>+</sup> Zellen bei 3 % in den behandelten Mäusen und in den Kontrolltieren bei 1,2 %.

Zur Quantifizierung der IL-17 Produktion wurde zudem die Konzentration von IL-17 mit Hilfe eines Zytokin-ELISA gemessen (Abb. **11d**). Hierfür wurden am Tag 9 nach Immunisierung ca.  $6 \times 10^5$  Zellen aus einer Milzsuspension für 2 Tage mit 10µg/ml G6PI oder mit anti-CD3/28 Antikörpern stimuliert. Ein Teil der Zellen wurde unstimuliert belassen. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und im ELISA gemessen. Die Abbildung zeigt die IL-17 Konzentration in pg/ml ohne Stimulation, sowie nach G6PI und anti-CD3/28 Stimulation. Ohne Stimulation konnte in beiden Gruppen kaum eine Produktion von IL-17 beobachtet werden. Nach Depletion wurde eine Konzentration von  $155 \pm 27$ pg/ml erreicht, bei den Kontrollen von  $269 \pm 15$ pg/ml. Unter antigenspezifischer Stimulation mit 10µg/ml G6PI wurde deutlich mehr IL-17 produziert. Die Konzentration in den depletierten Tieren war mit  $2910 \pm 388$  pg/ml höher als in den Kontrollen, die  $1900 \pm 83$ pg/ml erreichten. Den deutlichsten Effekt erzielte die Stimulation mit anti-CD3/28. In der depletierten Gruppe war die IL-17 Konzentration mit  $12775 \pm 1069$ pg/ml fast doppelt so hoch wie in der Kontrollgruppe mit  $7380 \pm 275$ pg/ml. Somit reflektierte der ELISA die durchflusszytometrisch am Tag 9 erhaltenen Daten für IL-17 sehr genau.

Die IL-17 Produktion wurde ebenfalls in den drainierenden, inguinalen Lymphknoten gemessen. Die Dot-Plots in Abb. **12** zeigen beispielhaft die Färbung von IL-17 gegen Foxp3 in CD4<sup>+</sup> Zellen am Tag 9 für eine anti-CD25 behandelte Maus (links) und eine Kontrolle (rechts). Die Produktion von IL-17 nach Depletion war mit 1,5 % fast doppelt so hoch wie im Kontrolltier mit 0,9 %. Der Unterschied in der Foxp3 Expression war im Lymphknoten nach Depletion noch deutlicher zu erkennen als in der Milz (4,7 %) verglichen mit 15 % Foxp3<sup>+</sup> Zellen im Kontrolltier. Das Balkendiagramm zeigt den Verlauf der IL-17 Produktion in den CD4<sup>+</sup> T-Zellen der

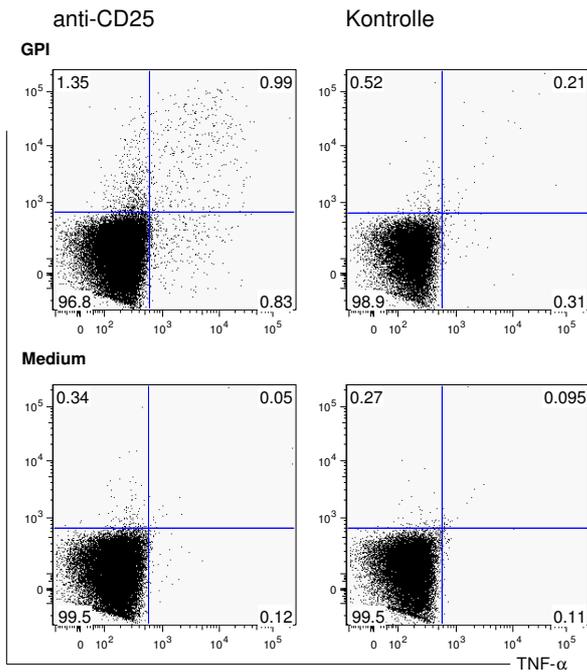
inguinalen Lymphknoten. Wie schon für die Milz beobachtet, fand man in den Lymphknoten einen raschen Anstieg der IL-17 Produktion, die am Tag 9 nach Immunisierung ihren Höhepunkt erreichte. In den behandelten Tieren lag die Produktion im Mittel bei 3,2 % und in den Kontrolltieren bei 1,7 %. Danach war in beiden Gruppen ein Abfall der IL-17 Produktion zu beobachten. Am Tag 35 lag die Zahl IL-17<sup>+</sup> Zellen in den depletierten Tieren bei 0,9 %, in den Kontrollen bei 0,5 %.



**Abb. 12: Produktion von IL-17 in den inguinalen Lymphknoten.** Die Mäuse wurden behandelt oder unbehandelt belassen und anschließend immunisiert. An den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten wurden die inguinalen Lymphknoten präpariert. Die Restimulation und Färbung der Zellen erfolgte wie zuvor unter Abb. 11a für die Milz beschrieben. Gezeigt ist ein repräsentativer Dot-Plot der Produktion von IL-17 am Tag 9 für eine depletierte Maus (links) und ein Kontrolltier (mitte). Das Balkendiagramm zeigt auf der y-Achse die IL-17 Produktion in den CD4<sup>+</sup> Zellen nach Depletion (schwarze Balken) und in Kontrollen (Graue Balken). Die x-Achse zeigt die Tage, an denen die Zytokininmessung erfolgte. Die Balken für jeden Tag ergeben sich aus den Mittelwerten von 3 bis 5 Tieren pro Gruppe, der Fehler ist als Standardfehler dargestellt.

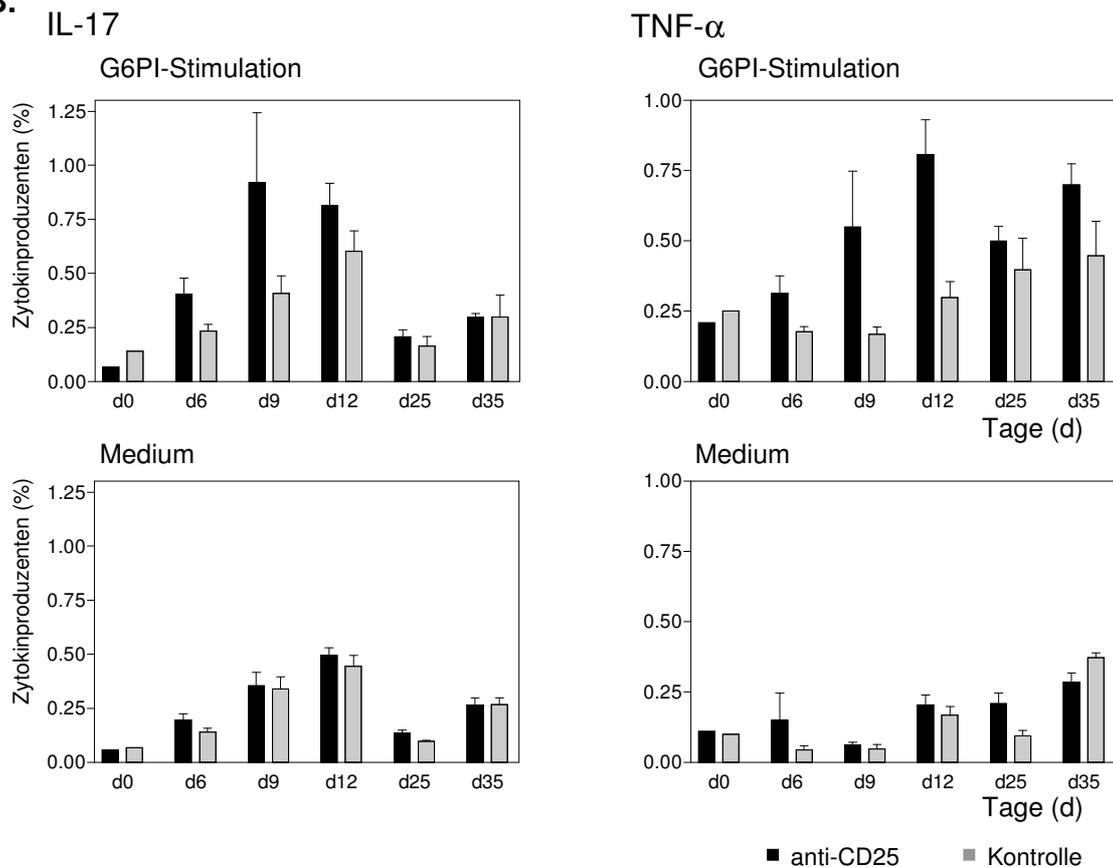
In den bisher gezeigten durchflusszytometrischen Experimenten wurden zur maximalen Induktion der Zytokinproduktion die Zellen mit einem anti-CD3 und anti-CD28 Antikörper stimuliert. Zusätzlich wurden die Zellen mit dem Autoantigen G6PI restimuliert. Der Anteil hierdurch aktivierbaren CD4<sup>+</sup> T-Zellen ist gering, daher wurden Zellen als Negativkontrolle unstimuliert belassen, um eine Abgrenzung zu ermöglichen. Für die Stimulation wurden Milzzellen isoliert und mit 10µg/ml G6PI für 6 Stunden stimuliert. Abb. 13a zeigt die Produktion von IL-17 und TNF-α in CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Stimulation mit G6PI (obere Reihe) und als Mediumkontrolle ohne Zusätze (untere Reihe). Die Dot-Plots zeigen die Produktion am Tag 9 nach Immunisierung. Die linken Plots zeigen jeweils ein repräsentatives Beispiel für eine behandelte Maus, die rechten Plots stellen die unbehandelte Kontrolle dar.

**A.**



**Abb. 13: Zytokinproduktion nach Restimulation mit G6PI und Mediumkontrollen.** Die Mäuse wurden behandelt oder unbehandelt belassen und anschließend immunisiert. Die Milz wurde präpariert und für 6 Stunden mit 10 $\mu$ g/ml G6PI restimuliert oder unstimuliert belassen. Nach 1 Stunde wurde Brefeldin A hinzugegeben, um die Zytokinproduktion zu stoppen. Für die Färbung wurden die Zellen zunächst gegen CD4 gefärbt, fixiert und anschließend intrazellulär gegen IL-17 und TNF- $\alpha$  gefärbt. Abb. 13a zeigt ein Beispiel der Zytokinproduktion in CD4<sup>+</sup> Zellen nach antigenspezifischer Stimulation mit G6PI (obere Reihe) und die Mediumkontrolle (untere Reihe). Die beiden linken Dot-Plots zeigen die Produktion nach Depletion, rechts ist die Produktion in einer Kontrollmaus dargestellt.

**B.**



Die Balkendiagramme in Abb. 13b zeigen die Produktion von IL-17 (links) und TNF- $\alpha$  (rechts) nach Depletion (schwarze Balken) und in Kontrolltieren (graue Balken). Die oberen Balkendiagramme zeigen die Zytokinproduktion nach Restimulation mit 10 $\mu$ g/ml G6PI. Die unteren Diagramme zeigen die dazugehörigen Mediumkontrollen. Die Balken für jeden Tag ergeben sich aus den Mittelwerten von 3 Tieren pro Gruppe. Die Fehlerbalken sind als Standardfehler dargestellt.

Nach Stimulation mit G6PI produzierten 2,4 % aller CD4<sup>+</sup> Zellen in der behandelten Maus IL-17, in der Kontrolle immerhin 0,7. Im gezeigten Beispiel produzierten nach Depletion 0,4 % der CD4<sup>+</sup> Zellen TNF- $\alpha$ , in der Kontrollmaus 0,3 %. Die Balkendiagramme der Abb. **13b** zeigen den Verlauf der IL-17 (links) und TNF- $\alpha$  Produktion (rechts). Die oberen Diagramme stellen dabei den Verlauf nach Stimulation mit G6PI dar, die unteren die Mediumkontrollen.

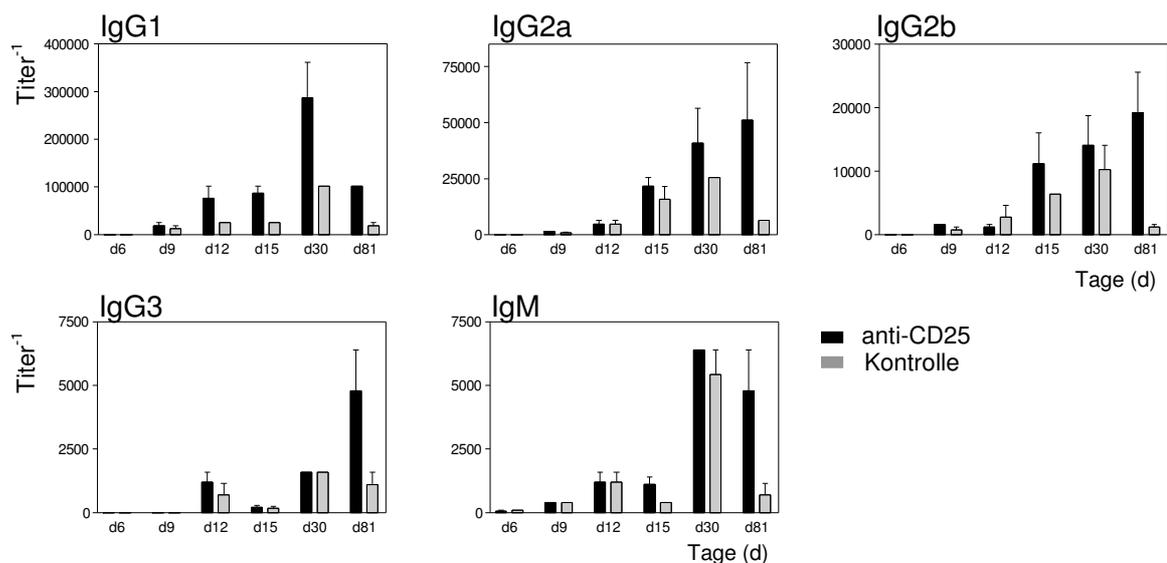
Wie schon nach anti-CD3/28 Stimulation beobachtet, zeigte die IL-17 Produktion einen vergleichbaren Verlauf nach G6PI Stimulation. Da hier deutlich weniger Zellen aktiviert wurden, waren die Werte allerdings geringer. In den depletierten Tieren fand man das Maximum am Tag 9 mit ca. 1 % IL-17<sup>+</sup> Zellen, in den Kontrollen am Tag 12 mit 0,8 %. Anschließend war ein Abfall der Zytokinproduktion zu beobachten. Am Tag 35 lag die IL-17 Produktion in beiden Gruppen bei 0,3 %.

Die TNF- $\alpha$  Produktion nach G6PI Stimulation stieg in Treg depletierten Tieren schnell an. Der Höhepunkt wurde am Tag 12 mit 0,8 % erreicht, danach fiel die Zahl TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> Zellen bis zum Tag 35 langsam auf 0,7 % ab. In den Kontrolltieren hingegen fand man nur einen langsamen Anstieg der TNF- $\alpha$  Produktion bis zum Tag 35 nach Immunisierung.

## 5.6. Einfluss der Tregs auf die humorale Immunantwort

Nachdem zuvor der Einfluss der Treg Depletion auf die Zytokinproduktion dargestellt wurde, soll im Folgenden die humorale Immunantwort untersucht werden. Aus Vorarbeiten am Modell der G6PI Arthritis ist bekannt, dass auch B-Zellen eine wichtige Rolle für die Entstehung der Erkrankung haben. Aus diesem Grund wurde der Einfluss regulatorischer T-Zellen auf die Bildung von antigenspezifischen Antikörpern im ELISA untersucht. Für die Untersuchung wurden mehrere Zeitpunkte gewählt. Die Mäuse wurden zunächst entweder mit einem anti-CD25 Antikörper behandelt, oder unbehandelt belassen und mit 400 $\mu$ g G6PI immunisiert. Die Produktion der Immunglobuline wurde zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht, wobei zu jedem Messzeitpunkt Serum aus den Mäusen gewonnen wurde. Anschließend wurden mittels ELISA die Titer der fünf Immunglobulinsubtypen IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b und IgG3 bestimmt. Abb. **14** zeigt den Verlauf der Antikörperbildung für die verschiedenen Immunglobulinklassen. Das vorrangig gebildetete Immunglobulin war IgG1, sowohl in der behandelten Gruppe, als auch in

den Kontrolltieren. Nach Depletion wurden höhere Titer gemessen, so lag der Titer am Tag 12 in den behandelten Mäusen bereits bei 1:76800, während die Kontrolltiere nur einen Titer von 1:25600 erreichten. Der maximal messbare IgG1 Titer wurde in den Kontrollen am Tag 30 nach Immunisierung gemessen und lag bei 1:102400, in den behandelten Mäusen wurde am Tag 30 ein Titer von 1:286720 gemessen. Bis zum Tag 82 fielen in beiden Gruppen die Titer für IgG1 ab. Dennoch blieb dieser in den depletierten Tieren mit 1:102400 weit über dem der Kontrolltiere mit 1:19200. Auch der Titer für IgG2a erreichte höhere Werte in den depletierten Mäusen als in den Kontrollen. Am Tag 12 nach Immunisierung waren die Titer in beiden Gruppen mit 1:4800 zunächst gleich. An den folgenden Tagen stieg der Titer in der behandelten Gruppe bis zum Ende der Messung am Tag 81 auf 1:51200 an. In der Kontrollgruppe wurde am Tag 30 mit 1:25600 bereits der höchste Titer erreicht und fiel anschließend bis zum Tag 81 auf 1:6400 ab.



**Abb. 14: Antikörperproduktion nach Treg Depletion:** Ein Teil der Mäuse wurde mit PC61 behandelt, der Rest wurde unbehandelt belassen. Nach Immunisierung der Mäuse wurde an den Tagen 6, 9, 12, 15, 30 und 81 Serum gewonnen. Nach serieller Verdünnung des Serums wurden im ELISA die G6PI spezifischen Antikörpertiter für die Subtypen IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 und IgM bestimmt. Gezeigt ist die höchste messbare Serumverdünnung für IgG1 (links oben), IgG2a (mitte oben), IgG2b (rechts oben), IgG3 (links unten) und IgM (rechts unten) zu den verschiedenen Messzeitpunkten nach Depletion (schwarze Balken) und in den Kontrolltieren (graue Balken). Die Balken pro Tag ergeben sich aus den Mittelwerten von 3 bis 5 Tieren pro Gruppe  $\pm$  SEM.

Auch für die restlichen Immunglobulinisotypen IgM, IgG2b und IgG3 konnte ein vergleichbarer Verlauf festgestellt werden, allerdings fiel die Bildung dieser Isotypen

deutlich geringer aus. Bei allen drei Isotypen stieg der Titer zunächst langsam an. In den Kontrolltieren wurde der maximal messbare Wert am Tag 30 nach Immunisierung gemessen. Für IgM lag dieser Wert bei 1:6400, für Ig2b bei 1:10240 und für IgG3 bei 1:1600. Nach Treg Depletion stiegen die Titer von IgG2b und IgG3 weiter an und erreichte den höchsten Wert am Tag 81 mit 1:19200 für IgG2b und mit 1:4800 für IgG3. Das Immunglobulin IgM erreichte bereits am Tag 30 das Maximum und fiel bis zum Tag 81 leicht.

Im Gegensatz zur zellulären Immunantwort, die bereits am Tag 9 nach Immunisierung mit der Produktion des in der Pathogenese wichtigen Zytokins IL-17 ihren Höhepunkt erreichte, wurden die höchsten Antikörpertiter in beiden Gruppen erst zu einem späten Zeitpunkt gemessen. Nach Depletion zeigte sich ein kontinuierlicher Anstieg der Immunglobuline IgG2a, IgG2b und IgG3 bis zum Ende der Analyse am Tag 81. Deutlich war, wie schon bei der Produktion der Zytokine beobachtet, dass die humorale Immunantwort mit einer verstärkten und länger andauernden Antikörperbildung nach Depletion der Tregs reagierte.

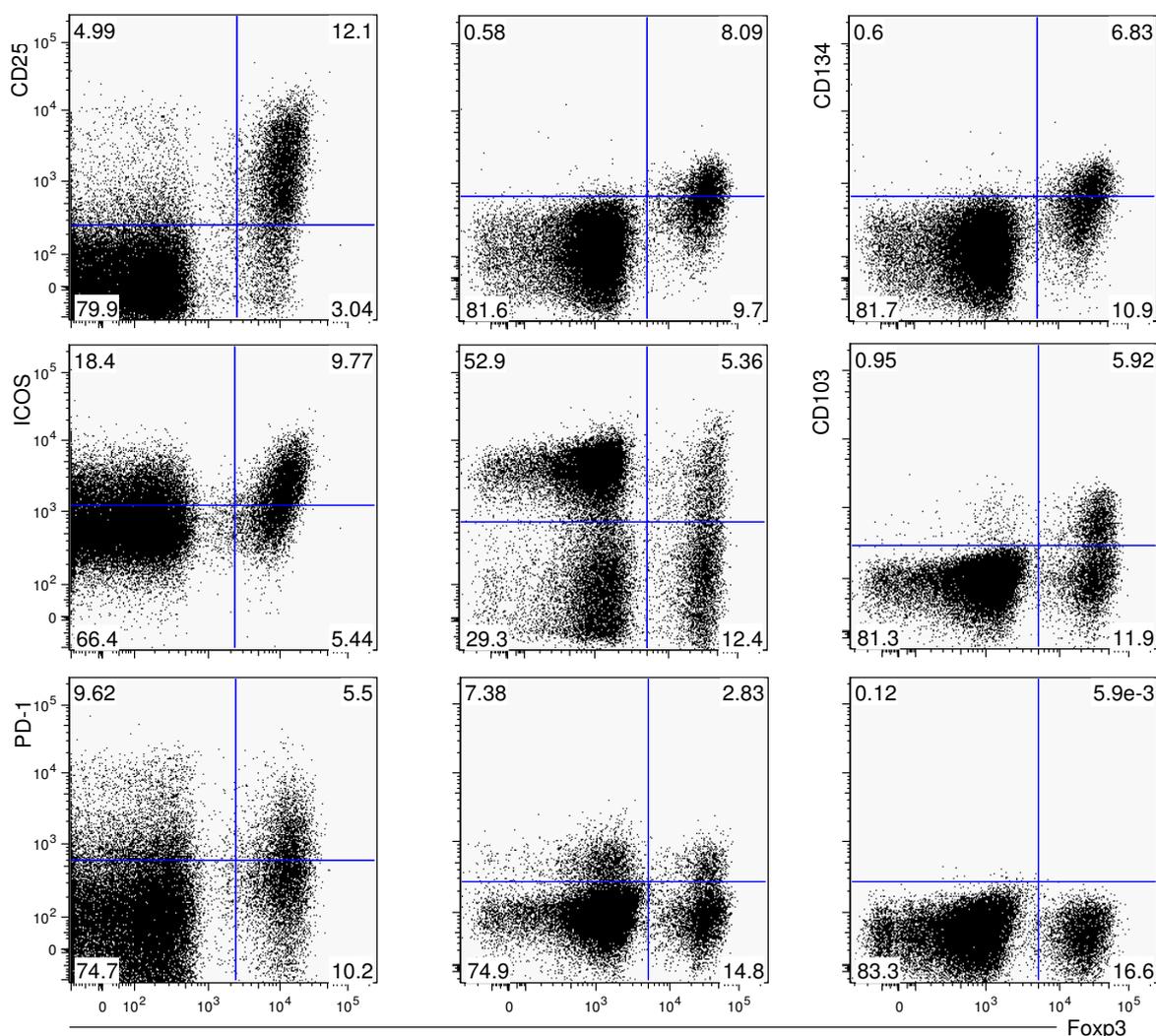
## **5.7. Einfluss der Tregs auf die Expression kostimulatorischer Moleküle**

Im Folgenden soll der Einfluss der Treg-Depletion auf die Expression kostimulatorischer Moleküle untersucht werden. Da die Depletion der Tregs im Vergleich zu den Kontrollen zu einer stärkeren Aktivierung CD4<sup>+</sup> T-Zellen führte, sollte mit Hilfe der kostimulatorischen Moleküle eine genauere phänotypische Charakterisierung CD4<sup>+</sup> Tregs und Tregs durchgeführt werden. Für diese Untersuchungen wurden die folgenden Moleküle ausgewählt: CD103, GITR, CD25, CD134, CD62L, CD69, PD-1 und ICOS. Die Moleküle CD103, GITR und CD25 sind in der Milz vorrangig auf Tregs zu finden. CD62L wird sehr stark auf naiven Zellen exprimiert und nach Aktivierung der Zellen herunterreguliert. Bei den restlichen genannten Molekülen kommt es im Gegensatz dazu nach Aktivierung zu einem Anstieg der Expression. Vor allem ICOS ist hier von großem Interesse, da andere Arbeiten unserer Gruppe (Juliane Meisel, persönliche Kommunikation) einen Einfluss dieses Moleküls auf die G6PI Arthritis zeigen konnten.

Abb. **15a** zeigt exemplarisch die durchflusszytometrischen Färbungen für eine Kontrollmaus am Tag 9 nach Immunisierung. Die Dot-Plots zeigen die Expression

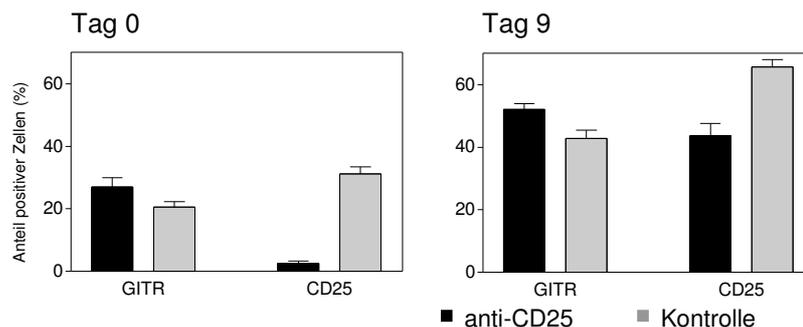
der kostimulatorischen Moleküle auf den Foxp3<sup>-</sup> und Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Bei den Analysen war zu erkennen, dass fast ausschließlich Foxp3<sup>+</sup> T-Zellen CD103, GITR und CD25 exprimierten. CD134 wurde auf Tregs exprimiert, während es auf den Effektorzellen nicht gemessen werden konnte. Die übrigen Moleküle wurden sowohl auf den Foxp3<sup>-</sup> T-Zellen als auch auf den Foxp3<sup>+</sup> T-Zellen gefunden.

Um Aussagen über die Veränderung der Moleküle nach Aktivierung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch G6PI treffen zu können wurde Tag 9 gewählt, da hier die Zytokinantwort am höchsten war. Zum Vergleich wurde die Expression der Moleküle am Tag 0 gemessen.



**Abb. 15a: Expression kostimulatorischer Moleküle auf Tregs.** Die Mäuse wurden behandelt oder unbehandelt belassen und anschließend immunisiert. Die Milzen der Mäuse wurden isoliert und die Zellen gegen die Moleküle CD4, CD25, CD103, GITR, CD62L, CD69, PD-1 und CD134 gefärbt und fixiert. Anschließend wurden die Zellen permeabilisiert und intrazellulär gegen ICOS und Foxp3 gefärbt. Die Dot-Plots zeigen ein repräsentatives Beispiel für diese Färbung aus Zellen einer depletierten Maus. Gezeigt ist die Färbung für CD25, GITR, CD134, ICOS, CD62L, CD103, PD-1 und CD69 gegen Foxp3, sowie eine Isotypkontrolle. Dargestellt sind nur die CD4<sup>+</sup> Zellen.

Die Diagramme in Abb. **15b** zeigen die Expression von GITR und CD25 auf den  $\text{Foxp3}^+\text{CD4}^+$  T-Zellen am Tag 0 (links) und Tag 9 (rechts) nach Immunisierung. Am Tag 0 fand man eine stärkere Expression von GITR nach Depletion (27 %), als auf den Kontrollzellen mit 20,5 %. Gut zu erkennen war der Depletionseffekt, da nur 2,7 % der  $\text{Foxp3}^+$  Zellen nach Depletion CD25 exprimierten, während es bei den Kontrollen 31 % waren. Bis zum Tag 9 verdoppelte sich die Expression von GITR in beiden Gruppen. So exprimierten in der depletierten Gruppe fast 52 % der  $\text{Foxp3}^+$  Zellen und in der Kontrollgruppe 42,7 % GITR. Die Expression von CD25 in der behandelten Gruppe stieg um mehr als das zehnfache auf 43,6 % der Zellen an, während sich die Expression in der Kontrollgruppe auf 65,6 % der Zellen verdoppelte. Die Expression von GITR und CD25 zeigte die starke Aktivierung der Tregs, was gut mit den in Abb. 10b gezeigten Proliferationsdaten der Tregs am Tag 9 übereinstimmte.



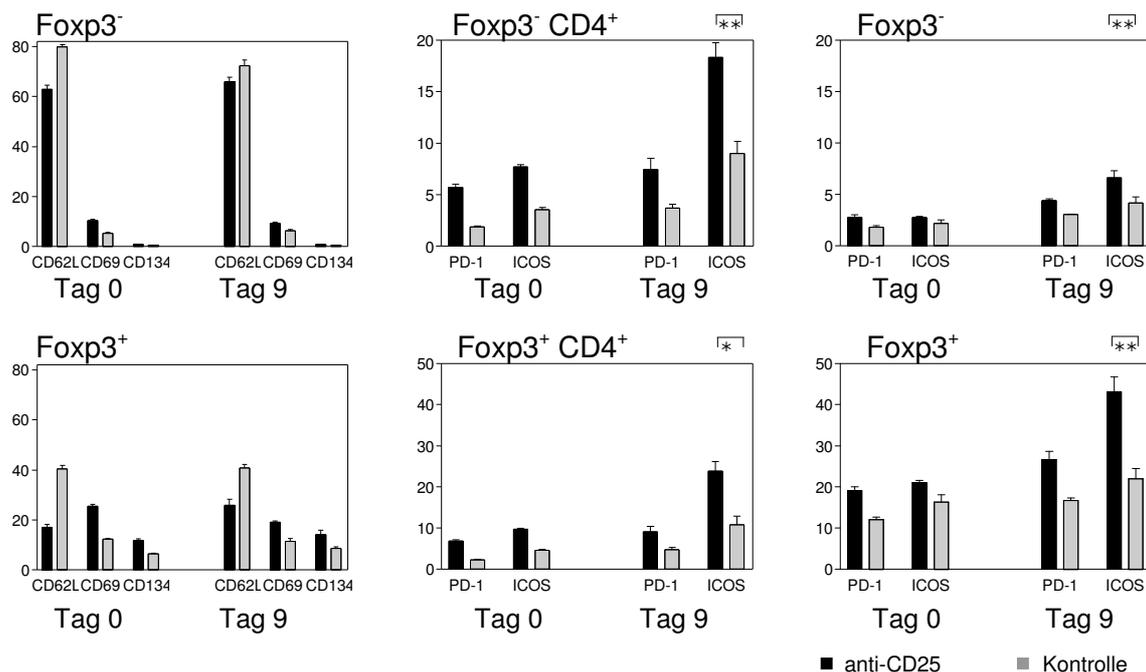
**Abb. 15b: CD25 und GITR Expression auf Tregs.** Die Isolation der Milzzellen und die Färbungen wurden wie unter 15a beschrieben durchgeführt. Gezeigt ist die Expression von GITR und CD25 in  $\text{CD4}^+\text{Foxp3}^+$  Zellen nach Depletion (schwarze Balken) und in den Kontrollen (graue Balken) am Tag 0 (links) und Tag 9 (rechts) nach Immunisierung. Die Mittelwerte ergeben sich am Tag 0 aus 3, am Tag 9 aus 5 Tieren pro Gruppe, die Fehlerbalken sind als Standardfehler angegeben.

Abb. **15c** zeigt die Expression weiterer kostimulatorischer Moleküle. In den beiden linken Diagrammen ist die Expression von CD134, CD62L und CD69 auf den  $\text{Foxp3}^-$  T-Zellen (oben) und den  $\text{Foxp3}^+$  T-Zellen (unten) am Tag 0 und 9 gezeigt. Die gezeigten Werte für die Expression beziehen sich auf einen Ausgangswert von 100 %  $\text{Foxp3}^+$  oder  $\text{Foxp3}^-$  Zellen. Für die  $\text{Foxp3}^-$  Tregs ließ sich bereits vor der Immunisierung am Tag 0 ein aktivierterer Zustand der Zellen nach Depletion feststellen als bei den Kontrollen. Dies zeigte sich dadurch, dass nach Depletion nur 62,8 % aller  $\text{Foxp3}^-$  T-Zellen CD62L exprimierten, während es bei 80 % der Kontrollen zu finden war. CD69 wurde mit 10,4 % nach Depletion doppelt so stark

exprimiert, wie in den Kontrollen (5,4 %). Nach Immunisierung mit G6PI zeigte sich am Tag 9 bei den Teffs keine Veränderung in der Expression von CD62L (65,9 %) und CD69 (9,4 %) nach Depletion. In der Kontrollgruppe gab es einen leichten Abfall von CD62L auf 72,4 % am Tag 9, sowie einen Anstieg von CD69 auf 6,5 % im Vergleich zu Tag 0. CD134 wurde an keinen der beiden untersuchten Tage auf den Foxp3<sup>-</sup> T-Zellen gefunden. Es war aber auf einigen Foxp3<sup>+</sup> Tregs nachweisbar. Am Tag 0 wurde nach Depletion mit 12 % doppelt so viel CD134 auf den Foxp3<sup>+</sup> Zellen exprimiert, wie auf den Kontrollen mit 6,5 %. Ein deutlicher Anstieg am Tag 9 war nicht zu verzeichnen (14 % nach Depletion und 8,7 % in den Kontrollen). Auf einem Teil der Tregs konnte CD62L und CD69 gefunden werden. Dies ermöglichte, neben den bekannten Markern GITR und CD25, eine genauere Charakterisierung des Aktivierungszustandes von Tregs. Wie zuvor bei den Foxp3<sup>-</sup> T-Zellen zeigte sich auch auf den Foxp3<sup>+</sup> Zellen bereits am Tag 0 ein aktivierterer Zustand der Treg Zellen nach Depletion. Erkennbar war dies durch den großen Unterschied in der CD62L Expression von 17 % in der depletierten Gruppe und 40,5 % bei den Kontrollen. Auch konnte mit 25,5 % nach Depletion doppelt soviel CD69 gefunden werden wie in der Kontrollgruppe mit 12,3 %. Vergleichbar mit den Daten der Foxp3<sup>-</sup> T-Zellen konnte auch bei den Tregs keine Veränderung der Expression von CD62L und CD69 am Tag 9 im Vergleich zu Tag 0 gefunden werden. Die Analyse der gemessenen kostimulatorischen Daten zeigte zudem, dass die Tregs generell einen wesentlich aktivierteren Zustand als die Teffs aufwiesen. Dies steht in Übereinstimmung mit der fast doppelt so starken Proliferation der Tregs am Tag 9 (Abb. 10b) im Vergleich zu den Teffs.

Die mittleren und rechten Diagramme der Abb. **15c** zeigen die Expression von PD-1 und ICOS. Es wurden zwei verschiedene Darstellungen der Expression beider Moleküle gewählt. Die Diagramme in der Mitte zeigten die Expression der Moleküle auf Foxp3<sup>-</sup> und Foxp3<sup>+</sup> Zellen bezogen auf die Gesamtzahl CD4<sup>+</sup> T-Zellen am Tag 0 und 9 nach Immunisierung. Nachdem die Tiere mit G6PI immunisiert worden waren, zeigte sich ein Anstieg der ICOS Expression am Tag 9 in beiden Gruppen. So waren fast 20 % der CD4<sup>+</sup> Zellen nach Depletion ICOS<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>, während am Tag 0 ungefähr 7 % dieser Zellen nachweisbar waren. Bemerkenswert war zudem, dass nach Depletion die ICOS Expression fast doppelt so hoch war wie in den Kontrollen. Dies unterschied sich von den zuvor untersuchten kostimulatorischen Molekülen, für die

keine Veränderung der Expression zwischen Tag 0 und 9 gezeigt werden konnte. Für PD-1 fand sich nur ein leichter Anstieg von Tag 0 zu Tag 9, dennoch bleibt die Expression in den depletierten Tieren stärker als in den Kontrollen. Auf Foxp3<sup>+</sup> Zellen waren die Veränderungen bezogen auf die Gesamtzahl CD4<sup>+</sup> Zellen geringfügig ausgeprägt. Die rechten Diagramme der Abb. 15c zeigen hingegen die Expression von ICOS und PD-1 bezogen auf die Gesamtzahl Foxp3<sup>-</sup> oder Foxp3<sup>+</sup> Zellen.



**Abb. 15c: Expression kostimulatorischer Moleküle nach Treg Depletion.** Die Isolation der Milzzellen und die Färbungen wurden wie unter 15a beschrieben durchgeführt. Die beiden linken Abbildungen zeigen die Expression von CD62L, CD69 und CD134 in Foxp3<sup>-</sup> (oben) bzw. Foxp3<sup>+</sup> (unten) CD4<sup>+</sup> Zellen am Tag 0 und Tag 9 nach Immunisierung. Diese Berechnungen beziehen sich auf 100 % Gesamtzahl Foxp3<sup>-</sup> bzw. Foxp3<sup>+</sup> Zellen. Die beiden mittleren und rechten Abbildungen zeigen die Expression von PD-1 und ICOS in den Foxp3<sup>-</sup> (oben mitte und oben rechts) und Foxp3<sup>+</sup> (unten mitte und unten links) Zellen am Tag 0 und 9 nach Immunisierung. Die Prozentwerte der Expression in den mittleren Diagrammen beziehen sich auf die Gesamtzahl aller CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die Werte der rechten Diagramme beziehen sich hingegen ausschließlich auf die Gesamtzahl Foxp3<sup>-</sup> bzw. Foxp3<sup>+</sup> Zellen. Die Balken (schwarz - nach Depletion, grau - Kontrolltiere) ergeben sich aus den Mittelwerten von 3 Tieren pro Gruppe am Tag 0 und 5 Tieren am Tag 9. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler. Die statistische Berechnung ergab für die ICOS Expression am Tag 9 einen signifikanten Unterschied (p mindestens < 0,05) zwischen depletierten- und Kontrolltieren.

Für die Foxp3<sup>-</sup> Zellen zeigte sich am Tag 0 eine stärkere Expression beider Moleküle nach Depletion. Mit einer Frequenz von 6,9 % fand sich für PD-1 eine fast dreifach stärkere Expression im Vergleich zu den Kontrollen, auch ICOS wurde mit 9,8 % auf doppelt so vielen Foxp3<sup>-</sup> Zellen gefunden wie auf den Kontrollen (4,6 %). Zum Tag 9

zeigte sich ein Anstieg in der Expression von ICOS. Nach Depletion exprimierten 23,9 % der Foxp3<sup>-</sup> Zellen ICOS und 10,9 % der Zellen in den Kontrollen. Die Expression von PD-1 stieg dagegen nur leicht, in den depletierten Tieren auf 9,2 % und in den Kontrollen auf 4,8 %.

21 % der Foxp3<sup>+</sup> Zellen exprimierte nach Depletion am Tag 0 ICOS und 19,2 % PD-1. Verglichen mit den Kontrolltieren (16,4% ICOS und 12 % PD-1) handelte es sich um eine geringfügig stärkere Expression. Nach Immunisierung der Tiere fand sich am Tag 9 nur ein leichter Anstieg der Expression beider Moleküle auf den Kontrollen. Am auffälligsten war allerdings der starke Anstieg der ICOS Expression in den depletierten Tieren am Tag 9. Fast die Hälfte aller Foxp3<sup>+</sup> Zellen (43 %) exprimierten ICOS, also doppelt so viel Zellen, wie in den Kontrolltieren. Der Anstieg von PD-1 war mit 26,7 % aller Foxp3<sup>+</sup> Zellen weniger deutlich. Bezogen auf die Gesamtzahl CD4<sup>+</sup> Zellen fanden sich die deutlichsten Veränderungen bei den Teffs, was im Zusammenhang mit der insgesamt höheren Zellzahl von Effektorzellen steht. Betrachtet man allerdings selektiv die Teffs beziehungsweise Tregs, so zeigten sich innerhalb der Foxp3<sup>+</sup> Populationen die deutlicheren Veränderungen in der Expression von ICOS und PD-1.

Diese Untersuchungen ermöglichten eine genauere Darstellung des Aktivierungszustandes, nicht nur der CD4<sup>+</sup> Effektorzellen, sondern auch der regulatorischen T-Zellen. Die Tregs zeigten einen generell aktivierteren Phänotyp als die Foxp3<sup>-</sup> Zellen. Zudem zeigte sich, dass durch Treg Depletion eine stärkere Aktivierung aller CD4<sup>+</sup> T-Zellen induziert wurde.

Auf Teffs und Tregs fand sich für alle kostimulatorischen Moleküle ein stärkere Expression nach Depletion, interessant war die Beobachtung des massiven Anstieges der ICOS Expression bis Tag 9.

## 6. Diskussion

Die Prozesse, die zur Manifestation der RA führen, sind weitgehend unbekannt. Daher stellt die genaue Untersuchung der pathogenetischen Abläufe eine wesentliche Voraussetzung für das Verständnis und die Entwicklung gezielter therapeutischer Strategien zur Behandlung dieses Krankheitsbildes dar. Das Versagen der Toleranz gegenüber Autoantigenen spielt in der Pathogenese zahlreicher Autoimmunerkrankungen, wie der RA, eine wichtige Rolle. Regulatorische T-Zellen könnten in diesem Zusammenhang von entscheidender Bedeutung sein. Daher habe ich diese Zellen am Tiermodell der G6PI-induzierten Arthritis näher untersucht. Da die Erkrankung stets 9 Tage nach Immunisierung beginnt und eine spontane Remission bis zum Tag 30 aufweist, ist dieses Modell hervorragend für die Untersuchung regulatorischer T-Zellen geeignet.

### 6.1. Depletion CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorischer T-Zellen

Der Transkriptionsfaktor Foxp3 ist derzeit das am besten geeignete Molekül zur Charakterisierung regulatorischer T-Zellen. In *scurfy*-Mäusen kommt es zu massiven Autoimmunreaktionen, welche zu deutlich entzündlichen Veränderungen zahlreicher Organe führen (Godfrey et al. 1991). Ursache dafür ist eine spontane Mutation im Foxp3-Gen, was ein Fehlen regulatorischer T-Zellen zur Folge hat (Brunkow et al. 2001). Gentechnisch veränderte Foxp3<sup>-/-</sup> Mäuse zeigen einen vergleichbaren Phänotyp wie die *scurfy*-Mäuse (Fontenot et al. 2003, Khattri et al. 2003). Durch gentechnische Modifikation ist neuerdings ein zeitlich definiertes Ausschalten des Foxp3-Gens möglich. Die Depletion Foxp3<sup>+</sup> Tregs zeigte bei neugeborenen DEREK Mäusen (Lahl et al. 2007) und in Foxp3<sup>DTR</sup> Mäusen (Kim et al. 2007) vergleichbare Effekte wie bei der *scurfy*-Mutation. Auch wenn die Depletion erst in adulten Tieren induziert wurde, zeigten sich in den Foxp3<sup>DTR</sup> Mäusen heftige Effekte, welche innerhalb eines Monats zum Tod der Tiere führten (Kim et al. 2007). Diese Modelle zeigen deutlich die Bedeutung von Foxp3 für die Funktion der Tregs, aufgrund der massiven Entzündungsreaktionen wäre allerdings eine detaillierte Analyse des Einflusses von Tregs auf den Verlauf der Arthritis, wie in meiner Fragestellung vorgesehen, eher schwierig.

Eine der seit langem etablierten Methoden für die Untersuchung von Tregs bei unterschiedlichen Autoimmunkrankheiten oder auch Infektionen nutzt die Expression

von CD25, der  $\alpha$ -Kette des IL-2 Rezeptors (beispielsweise in (McHugh und Shevach 2002, Couper et al. 2007, McNeill et al. 2007)). CD25 wird vorrangig auf Tregs exprimiert, allerdings kommt es nach Aktivierung auch temporär auf Teffs vor (Knoechel et al. 2005). Zur Analyse der Funktion CD25<sup>+</sup> T-Zellen werden zwei unterschiedliche Protokolle verwendet: Entweder werden aufgereinigte CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Zellen transferiert oder CD25<sup>+</sup> Zellen werden durch Applikation eines depletierenden anti-CD25 Antikörpers *in vivo* eliminiert (Haribhai et al. 2007).

Für meine Untersuchungen habe ich den depletierenden anti-CD25 Antikörper PC61 verwendet, um gezielt den Einfluss regulatorischer T-Zellen auf die G6PI Arthritis zu untersuchen. Die Mäuse wurden am Tag 11 und 8 vor Immunisierung mit G6PI jeweils mit 400 $\mu$ g PC61 Antikörper behandelt. Der Zeitabstand zwischen Behandlung und Immunisierung wurde gewählt, um eine gleichzeitige Depletion aktivierter CD4<sup>+</sup> Effektorzellen zu verhindern. Abb. **6a** zeigt den Depletionseffekt am Tag der Immunisierung. Für die Detektion wurde der CD25 Antikörper 7D4 verwendet, welcher ein anderes Epitop erkennt als PC61 (Kohm et al. 2006). Dadurch wurde sichergestellt, dass ein eventuell *in vivo* vorhandener PC61 Überschuss den Nachweis der Depletion maskiert. Wie in Abb. **6b** gezeigt, waren die Auswirkungen der Depletion ungefähr einen Monat lang nachweisbar.

Die Depletion und der Nachweis von Tregs mit Hilfe von CD25 ist eine seit langem bekannte Methode, aber erst der Einsatz von Foxp3<sup>GFP</sup> Mäusen (Fontenot et al. 2005a) oder von fluoreszierenden Antikörpern zur intranukleären Foxp3 Detektion ermöglicht seit ungefähr drei Jahren einen sicheren Nachweis der Tregs. Erst mit der Identifikation von Foxp3<sup>+</sup> Zellen konnten die Effekte der Depletion mit anti-CD25 Antikörpern im Detail untersucht werden. Kontrovers diskutiert wurde eine Arbeit von Kohm et al, in der beschrieben wurde, dass die Behandlung mit dem ratten-IgM Antikörper 7D4 zur funktionellen Inaktivierung, nicht aber zur Depletion der Tregs führte (Kohm et al. 2006). Kommentare zu dieser Arbeit merkten jedoch an, dass der zur Depletion gebräuchlichere anti-CD25 Antikörper PC61 den Anteil Foxp3<sup>+</sup> Zellen deutlich reduzieren konnte (Stephens und Anderton 2006). Im direkten Vergleich der beiden Antikörper reduzierte 7D4 zwar die CD25 Expression, nicht aber die Frequenz Foxp3<sup>+</sup> Zellen (Zelenay und Demengeot 2006). Detaillierte *in vivo* Studien der Rekonstitution nach Antikörperapplikation führten Couper et al. kürzlich durch. Sie konnten zeigen, dass die CD25 Expression für mindestens zwei Wochen nach Antikörpergabe deutlich reduziert war, wobei nur der PC61 Antikörper auch einen

depletierenden Einfluss auf die Foxp3<sup>+</sup> Zellen hatte. Erfolgte während dieser Zeit eine Aktivierung des Immunsystems, kam es zu einem raschen Anstieg der Frequenz Foxp3<sup>+</sup> Zellen. Zusätzlich zeigte sich während dieser Analysen, dass 7D4 zum Anfärben der CD25<sup>+</sup> Zellen generell besser geeignet war als PC61 (Couper et al. 2007).

Die intranukleäre Detektion von Foxp3 bietet die Möglichkeit Tregs sicher zu identifizieren, allerdings benötigt man für die Depletion oder Isolation von lebenden Zellen charakteristische Oberflächenmarker, für deren Anfärbung keine Permeabilisierung der Zellen nötig ist. Hierfür geeignete Antikörper sind CD25, GITR oder der Folatrezeptor FR4. Die Expression von CD25 ist jedoch nicht vollständig deckungsgleich mit der Expression von Foxp3, auch der Folatrezeptor FR4 (Yamaguchi et al. 2007) oder GITR (Ono et al. 2006) werden nicht ausschließlich von Tregs exprimiert. Durch eine Kombination mehrerer Detektionsantikörper gegen die genannten Moleküle wäre eine präzisere Identifikation der Tregs möglich, da diese Moleküle allerdings auch funktionell relevant sind, könnten diese massiven Antikörperbindungen ein größeres Risiko für Artefakte bergen. Eine 100 %ige Depletion der Tregs wird bei Behandlung mit einem anti-CD25 Antikörper nicht erreicht und scheint für die funktionelle Untersuchung der Tregs nicht nötig zu sein. Denkbar wäre, dass bei kompletter Depletion aller Tregs die Mäuse ein klinisches Bild entsprechend dem der oben vorgestellten *knock-out* Tiere zeigen, was für differenzierte Analysen einzelner Krankheitsbilder ungeeignet erscheint. Somit ist für die funktionelle Untersuchung eine CD25 Depletion bis heute eine sehr geeignete Methode.

## **6.2. Effekte der Depletion CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorischer T-Zellen auf den Verlauf der G6PI Arthritis**

Die Depletion der Tregs führte zu einer Chronifizierung und signifikant stärkeren Exazerbation der Arthritis. Abb. **7a** zeigt den klinischen Verlauf der Arthritis und die Gewichtskurve der Mäuse.

Es gibt einige Untersuchungen zur Rolle regulatorischer T-Zellen in anderen Arthritis modellen. Am Modell der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA) konnte durch wiederholte Depletion mit PC61 vor Immunisierung mit Kollagen II ein früherer Krankheitsbeginn beobachtet werden. Zudem zeigte sich im Vergleich zur

Kontrollgruppe ein schwererer Verlauf (Morgan et al. 2003, Morgan et al. 2004). Wurde mit der Depletion erst zwei Wochen nach Immunisierung mit Kollagen II begonnen, zeigte sich ein früherer Krankheitsbeginn und schwererer Verlauf der CIA (Kelchtermans et al. 2005), was für eine Bedeutung der Tregs zu späteren Zeitpunkten im Krankheitsverlauf spricht. Im K/BxN-Modell wurden für die Untersuchung der Funktion von Tregs  $\text{Foxp3}^{-/-}$  Mäuse eingekreuzt. In diesen Mäusen zeigte sich ein schnellerer Beginn der Arthritis, eine stärkere Gelenksdestruktion und eine Beteiligung von Gelenken, die im K/BxN-Modell regulär nicht entzündlich verändert sind (Nguyen et al. 2007). Ein weiteres Arthritismodell ist die Antigen-induzierte Arthritis (AIA). Hierbei wird eine Arthritis durch intraartikuläre Antigeninjektion von vorimmunisierten Mäusen ausgelöst. Auch in diesem Modell konnte gezeigt werden, dass die Depletion von Tregs zu einer Exazerbation der Arthritis führte (Frey et al. 2005).

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen konnte durch Applikation einer hohen Dosis von 3 x 1mg PC61 zeitgleich mit der Immunisierung oder zwei Wochen später keine Veränderung des Krankheitsverlaufes induziert werden (Loughry et al. 2005). Weitergehende Untersuchungen zeigten, dass erst durch Thymektomie adulter Tiere und anschließender Depletion mit PC61 einige Tiere spontan eine stärkere Arthritis und Dermatitis entwickelten als die thymektomierten Kontrolltiere (Loughry et al. 2005). Diese Arbeit ist insofern schwierig mit den zuvor besprochenen Untersuchungen zu vergleichen, da hier sehr hohe Dosen von insgesamt 3mg des depletierenden Antikörpers verwendet wurden. Zudem gab es keinen Zeitabstand zwischen Depletion und Immunisierung. Ungewöhnlich erscheint, dass erst nach Thymektomie eine Depletion zu einem schwereren Krankheitsverlauf führte. In einer älteren Arbeit fand man nach Behandlung mit einem anti-CD25 Antikörper im CIA-Modell einen deutlich milderen Verlauf der Arthritis und eine geringere Inzidenz (Banerjee et al. 1988). Im Gegensatz zu den zuvor diskutierten Arbeiten wurde hier für die Depletion der Antikörper 7D4 verwendet, was die gegenteiligen Effekte erklären könnte (siehe 6.1). Insgesamt zeigen diese Daten in verschiedenen Arthritismodellen bei vergleichbaren Protokollen einen ähnlichen Effekt der CD25 Depletion.

Neben der Depletion ist der Transfer  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$  T-Zellen eine weitere Möglichkeit zur Untersuchung regulatorischer T-Zellen. In einigen Arthritismodellen konnte

gezeigt werden, dass der protektive Transfer dieser Zellen einen günstigen Verlauf auf die Erkrankung hatte. So konnte im CIA Modell durch den Transfer präaktivierter CD25<sup>+</sup> T-Zellen am Tag der Immunisierung eine vorausgegangene Depletion CD25<sup>+</sup> T-Zellen in ihrer Wirksamkeit aufgehoben werden (Morgan et al. 2003). In der AIA konnte durch den Transfer naiver oder auch präaktivierter CD25<sup>+</sup> T-Zellen am Tag der Arthritisinduktion eine leichte Milderung des Krankheitsverlaufes erreicht werden (Frey et al. 2005).

Auch Untersuchungen zur therapeutischen Wirksamkeit zeigten einen protektiven Effekt regulatorischer T-Zellen. Im CIA-Modell sind diese Analysen wegen des inhomogenen Krankheitsverlaufes schwierig. In einer Arbeit wurde wegen der großen individuellen Schwankungen als Transferzeitpunkt der Tag definiert, an dem 50 % der Versuchsgruppe erkrankt waren. Einem Teil der Versuchsgruppe wurden nach subletaler Bestrahlung *in vitro* aktivierte CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen appliziert, was zu einem milderen Krankheitsverlauf der CIA in diesen Tieren führte. Auch in nicht bestrahlten Tieren konnte dieser Effekt erzielt werden, sofern doppelt so viele CD25<sup>+</sup> T-Zellen transferiert wurden (Morgan et al. 2005). Die Wirksamkeit des Treg Transfers in Abhängigkeit von der Zellzahl konnte auch eine spätere Arbeit zeigen. Der Transfer von zuvor mit CII aktivierten, Foxp3 transduzierten Zellen milderte den Verlauf der CIA, sogar wenn der Transfer erst nach Manifestation der Arthritis erfolgte. Mit dem Kontrollantigen OVA aktivierte Zellen zeigten diese supprimierenden Effekte nicht (Ohata et al. 2007). Eine Arbeitsgruppe induzierte in BALB/c Mäusen durch Applikation von Proteoglykanen eine andere Arthritisform, welche durch Zelltransfer auf SCID Mäuse übertragen wurde. In diesem Modell hatte die Depletion von CD25<sup>+</sup> Zellen aus dem transferierten Zellpool jedoch keinen Einfluss auf den Arthritisverlauf (Bardos et al. 2003).

Zusammenfassend kann man sagen, dass in der deutlichen Mehrzahl der hier beschriebenen Depletions- und Transferexperimenten ein protektiver Effekt der Tregs nachgewiesen werden konnte. Offensichtlich sind bei Depletion Zeitfenster und Konzentration der Antikörperapplikation für den Behandlungserfolg entscheidend. Es wäre denkbar, dass bei den Modellen, in denen der Nachweis der Protektion durch Tregs nicht glückte, methodische Unzulänglichkeiten eine Rolle gespielt haben könnten. Die G6PI-induzierte Arthritis bietet im Vergleich zu den von anderen Arbeitsgruppen verwendeten Modellen durch die einfache Induktion, den

raschen, gleichförmigen Verlauf und die spontane Remission der Arthritis entscheidende Vorteile für weitere Analysen der regulatorischen T-Zellen.

Zusätzlich zu den auch in anderen Modellen beschriebenen Exazerbationen und Chronifizierungen nach Depletion der Tregs zeigten meine Untersuchungen an Tag 80 nicht nur eine anhaltenden Gewichtsreduktion sondern auch massive Ankylosen der betroffenen Gelenke. Dieses klinische Endbild einer ausgebrannten Arthritis konnte bisher in keinem anderen Tiermodell so deutlich beschrieben werden. Zudem korrelierten die gezeigten histologischen Veränderungen (Abb. 7) gut dem klinischen Bild. Es wäre denkbar, dass der Rückgang akuter Entzündungszeichen nach Depletion im G6PI Modell kein Effekt regulativer Prozesse sondern Ausdruck einer kompletten Destruktion im Gelenk sein könnte.

Bei ausbleibendem Therapieerfolg sind Ankylosen das klinische Endbild der RA. Bei Patienten mit RA wurde das Exsudat entzündeter Gelenke auf das Vorhandensein regulatorischer T-Zellen untersucht. Es zeigte sich eine deutliche Anreicherung der Tregs in der Synovialis entzündeter Gelenke (van Amelsfort et al. 2004, Cao et al. 2003, de Kleer et al. 2004, Ruprecht et al. 2005, Möttönen et al. 2005), wobei sich keine Unterschiede der Zellzahl in Abhängigkeit vom Schweregrad oder der Dauer der Erkrankung nachweisen ließen (Cao et al. 2003). Die isolierten Tregs zeigten bei *in vitro* Versuchen keine funktionellen Einschränkungen, wobei der Aussagewert dieser Untersuchungen wegen fehlender Vergleichsmöglichkeiten mit Tregs aus gesunden Probanden eher begrenzt ist.

Der supprimierende Einfluss von Tregs konnte für eine Reihe weiterer Modelle von Autoimmunerkrankungen, wie beispielsweise EAE (Korn et al. 2007b, O'Connor et al. 2007), IBD oder Diabetes gezeigt werden (zusammengefasst in Suri-Payer und Fritzsching 2006). Neben Autoimmunerkrankungen fand man auch bei einer Vielzahl von parasitären (Schistosoma mansoni Baumgart et al. 2006, Taylor et al. 2006), Leishmania major (Suffia et al. 2006, Anderson et al. 2007), Plasmodium yoelii (Couper et al. 2007), bakteriellen und viralen Infektionen (zusammengefasst in Belkaid 2007) eine immunregulatorische Wirkung von Tregs. Diese zahlreichen Analysen unterstreichen die große Bedeutung regulatorischer T-Zellen für die Modulation von Immunantworten und zeigen die Wichtigkeit detaillierterer Untersuchungen.

### 6.3. Bedeutung der Tregs für die Proliferation in der G6PI Arthritis

Die Analyse der Proliferation ist ein guter Maßstab zur funktionellen Charakterisierung des Aktivierungszustandes der Zellpopulationen. Daher habe ich die Prolifertion nach G6PI Immunisierung analysiert. *Ex vivo* zeigte sich eine deutlich stärkere Proliferation der Milzzellen nach Depletion der regulatorischen T-Zellen (Abb. 8). Diese Beobachtung wurde auch für andere Arthritismodelle gefunden (Morgan et al. 2003, Frey et al. 2005). Eine Identifikation der proliferierenden Zellpopulationen ist bei diesen [<sup>3</sup>H]-Thymidin Assays allerdings nicht möglich.

Aus diesem Grund wurde *in vivo* die Proliferation mit Hilfe der Inkorporation von BrdU analysiert, wobei durch Kofärbung von Foxp3 eine Unterscheidung zwischen Teffs und Tregs ermöglicht wurde. Im Gegensatz zu den B-Zellen und CD8<sup>+</sup> T-Zellen zeigte sich eine deutliche Proliferation der Teffs, die nach Depletion der Tregs stärker war als im Vergleich zu den Kontrollen (Abb. 10). Da Proliferation immer ein Hinweis für Aktivierung ist, passen diese Daten gut zu der schon aus Vorarbeiten bekannten Bedeutung CD4<sup>+</sup> T-Zellen für die Pathogenese der G6PI Arthritis (Schubert et al. 2004).

Tregs zeigten in meinen BrdU Analysen eine starke Proliferation, die in der depletierten Gruppe sogar deutlicher war. Gestützt wird diese Beobachtung durch kürzlich durchgeführte Arbeiten, die zeigten, dass die bisher *in vitro* beschriebene Anergie der Tregs das Verhalten *in vivo* keinesfalls widerspiegelt. Stattdessen konnte durch Visualisierung der regulatorischen T-Zellen (Foxp3 Antikörper: eBioscience, Foxp3<sup>GFP</sup>:Fontenot et al. 2005a) gezeigt werden, dass Tregs *in vivo* homöostatisch proliferieren und die Proliferation nach Aktivierung deutlich stärker wird (Haribhai et al. 2007, Taylor et al. 2006). Da die absoluten CD4<sup>+</sup> T-Zellzahlen trotzdem relativ konstant blieben (Abb. 9), ist denkbar, dass diese aktivierten Zellen die Milz zu einem erheblichen Anteil in Richtung des entzündeten Gewebes verlassen (Tang und Bluestone 2006, Hirota et al. 2007b). Zahlreichen Arthritismodellen geben Hinweise dafür, dass neben Teffs auch Tregs in entzündete Gelenke einwandern. So konnte im K/BxN-Modell aus der Synovialflüssigkeit erkrankter Mäuse CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Zellen gewonnen werden (Nguyen et al. 2007). In der CIA konnten nach Transfer aufgereinigter CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen diese Zellen in Gelenken erkrankter Tiere mit immunhistochemischen Methoden nachgewiesen werden (Morgan et al. 2005). Auch in der AIA gibt es Anhaltspunkte für die Einwanderung von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen in

die Gelenke (Frey et al. 2005). Es ist allerdings methodisch extrem kompliziert, eine größere Menge von Zellen aus entzündeten Gelenken zu isolieren. Quantitative Vergleiche der Frequenz von Tregs aus sekundär-lymphatischen und entzündeten Gewebe sind daher nur in anderen Modellen erfolgreich durchgeführt worden. Denkbar wäre jedoch, dass Folgende Verhalten von Tregs: Nach Aktivierung proliferieren Tregs zunächst in den sekundär-lymphatischen Organen synchron zu den Teffs, im Zeitverlauf allerdings stärker (Haribhai et al. 2007, Taylor et al. 2006) und länger (Haribhai et al. 2007, O'Connor et al. 2007). Sie können wie Teffs in das periphere Gewebe auswandern, um dort zu wirken. Untersuchungen im ZNS von an passiver EAE erkrankten Mäusen zeigten die höchste Frequenz der Tregs in der Remission, während das Maximum der Teffs früher erreicht wurde und mit dem Höhepunkt der Erkrankung zusammenfiel. Durch 24 stündige BrdU-Inkorporation konnte gezeigt werden, dass Tregs während der Remission primär im ZNS proliferierten (O'Connor et al. 2007). Es wäre somit wahrscheinlich, dass die große Anzahl der Tregs im ZNS nicht nur durch Einwanderung, sondern auch durch lokale Proliferation verursacht wird. Unterstützt wird diese Theorie durch Publikationen der Arbeitsgruppe um Y. Belkaid, die durch *ex vivo* Analysen aus entzündeten Ohren nach Leishmanieninfektion ein stark proliferatives Potenzial der Tregs nachweisen konnte (Suffia et al. 2006).

Untersuchungen, die sich mit der Induktion der Proliferation von Tregs beschäftigten, zeigten, dass Tregs in RIP-OVA Mäusen antigenspezifisch proliferierten (Walker et al. 2003). Eine weitere Publikation konnte zeigen, dass nach Antigenkontakt ein Teil der Tregpopulation in den drainierenden Lymphknoten stark proliferierte (Fisson et al. 2003). Aus Mäusen nach Leishmanieninfektion isolierte Tregs konnten durch antigenspezifische Stimulation zur Proliferation angeregt werden (Suffia et al. 2006).

Zusammenfassend konnte für die Tregs gezeigt werden, dass sie bis zum Tag 9 massiver proliferierten als Teffs. Die stärkere Proliferation der Tregs nach Depletion könnte als Versuch gedeutet werden, das Defizit der Tregs zu kompensieren. Obwohl die Frequenz der Tregs nach Depletion bis zum Höhepunkt der Erkrankung wieder 75 % des Treg Anteils in Kontrolltieren erreichte, zeigten der schwerere Verlauf und die Chronifizierung der Arthritis, dass durch alleinige Proliferation keine ausreichende supprimierende Funktion erreicht werden konnte. Hypothetisch denkbar wäre, dass die Tregs einen initialen Antigenkontakt für eine wirksame

Suppression benötigen. Fehlen die Tregs zum Zeitpunkt der Immunisierung können sie zwar zu späteren Zeitpunkten nach Antigenkontakt proliferieren, sind allerdings nicht ausreichend funktionsfähig. Unter Umständen benötigt man eine ausreichende Menge Tregs zum Supprimieren, während den Teffs durch APCs ihr Antigen präsentiert wird. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass durch das Fehlen einer ausreichenden Menge regulatorischer T-Zellen zum Zeitpunkt der Immunisierung IL-2 vermittelt verstärkt Th17 Zellen induziert werden. Welche dieser Mechanismen wirklich relevant für die Treg Funktion sind, kann zur Zeit nicht abschließend geklärt werden.

#### **6.4. Bedeutung der Tregs für die zelluläre Immunantwort**

Eine exzellente Möglichkeit zur Charakterisierung von Teffs ist die Untersuchung ihrer Zytokinproduktion, wobei sich die T-Zellpopulationen durch unterschiedliche Zytokinmuster auszeichnen. Neben den „etablierten“ Th1 und Th2 Zellen, gewinnt zunehmend eine weitere, kürzlich beschriebene Population an Bedeutung, die Th17 Zellen. Von großem Interesse war daher der Einfluss der Tregs auf die Zytokinproduktion der Teffs. Untersucht wurden die Zytokine IL-17, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-13.

Nach Depletion fand sich ein stärkerer Anstieg der IFN- $\gamma$  Produktion im Vergleich zur Kontrollgruppe, wobei die Frequenzen der IFN- $\gamma$  produzierenden Zellen generell sehr niedrig waren. Wie in einem Autoimmunmodell zu erwarten, war eine detektierbare Produktion von IL-13 nicht nachweisbar. Die hier untersuchten CD4<sup>+</sup> T-Zellen produzierten kein IL-6, jedoch konnte nach Immunisierung mit G6PI eine IL-6 Produktion im ELISA nachgewiesen werden (J. Meisel, persönliche Kommunikation), was die Vermutung zulässt, dass in der G6PI Arthritis die Quelle der IL-6 Produktion Nicht-CD4<sup>+</sup> Zellen sind. In zahlreichen Publikationen konnte gezeigt werden, dass IL-6 für die Entwicklung einer Arthritis von Bedeutung ist. So konnte in IL-6<sup>-/-</sup> Mäusen eine CIA nicht (Alonzi et al. 1998) oder nur schwach induziert werden (Sasai et al. 1999). Eine Arbeit von Hirota et al konnte zeigen, dass die Hauptquelle der IL-6 Produktion auch im SKG-Arthritismodell Nicht-CD4<sup>+</sup> Zellen sind (Hirota et al. 2007a). In meinen Daten zeigte sich nach antigenspezifischer *in vitro* Stimulation ein Anstieg in der Produktion von TNF- $\alpha$  zu Beginn der Arthritis. Hier waren die Frequenzen nach Treg-Depletion höher als bei den Kontrolltieren. Der Einfluss von TNF- $\alpha$  auf die

Pathogenese der Arthritis konnte in einer Vielzahl von Tiermodellen gezeigt werden, (Übersicht in Li und Schwarz 2003), auch beim Menschen sind große Behandlungserfolge mit TNF- $\alpha$  Antikörpern bei Patienten mit RA zu verzeichnen (Smolen et al. 2007). Neben T-Zellen wird TNF- $\alpha$  auch in großen Mengen von antigenpräsentierenden Zellen produziert (Hirota et al. 2007a). Diese APC könnten somit die entscheidende TNF- $\alpha$  Quelle in der Arthritispathogenese sein. Derzeit ist eine Analyse des TNF- $\alpha$  Ursprungs in den entzündeten Gelenken in unserer Arbeitsgruppe nicht möglich. Zudem produzieren naive T-Zellen bereits nach kurzer, unspezifischer Stimulation TNF- $\alpha$ , was eine Identifikation der für die Pathogenese entscheidenden TNF- $\alpha$

Produzenten erschwert. Insgesamt bleibt daher der Aussagenwert der TNF- $\alpha$  Analysen begrenzt.

Spezifischer für die Analyse von CD4<sup>+</sup> T-Zellen ist IL-17, da dieses Zytokin vorrangig von Teffs nach Antigenkontakt produziert wird. Kürzlich wurde für IL-17 produzierende Zellen der Begriff Th17 Zellen eingeführt (Harrington et al. 2005). Solche IL-17 produzierenden Zellen konnten in entzündeten Gelenken von RA Patienten nachgewiesen werden (Chabaud et al. 1998, Kotake et al. 1999, Ziolkowska et al. 2000). Für die Arthritisinduktion im Tiermodell sind diese Zellen ebenfalls von großer Bedeutung (Lubberts et al. 2005a), daher habe ich die Produktion von IL-17 in der G6PI Arthritis genauer untersucht.

Meine Daten zeigten eine deutliche IL-17 Produktion, wobei das Maximum während der Induktionsphase der Erkrankung gemessen werden konnte. In den depletierten Tieren waren fast doppelt soviel IL-17 produzierende Zellen nachweisbar (Abb. 11). Die Bedeutung von IL-17 für die Arthritispathogenese konnte in anderen Tiermodellen ebenfalls gezeigt werden. Wurden beispielsweise spontan an Arthritis erkrankende IL-1Ra<sup>-/-</sup> Mäusen mit IL-17<sup>-/-</sup> Mäuse gekreuzt, entwickelten diese Tiere keine Arthritis (Nakae et al. 2003b). Ein milderer Verlauf der CIA entwickelte sich nach CII-Immunisierung in IL-17<sup>-/-</sup> Mäusen (Nakae et al. 2003a). Wurden Streptokokken Zellwandbestandteile intraartikulär injiziert, war die daraus resultierende destruktive Synovitis in IL-17<sup>-/-</sup> Mäusen schwächer ausgeprägt (Lubberts et al. 2005b). Diese Daten zeigten, dass IL-17 eines der zentralen Zytokine in der Pathogenese der Arthritis ist, wobei CD4<sup>+</sup> T-Zellen die Hauptproduzenten sind (Hirota et al. 2007a). Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass die IL-17

Produktion durch IFN- $\gamma$  gehemmt werden kann. So zeigten IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup> Mäuse einen deutlich schwereren Verlauf der CIA (Vermeire et al. 1997, Manoury-Schwartz et al. 1997) Dies könnte durch die Aufhebung der IFN- $\gamma$ -vermittelten Blockade der Th17 Zellen erklärbar sein, wie von Irmeler et al im AIA Modell durch Verwendung eines blockierenden anti-IL-17 Antikörpers gezeigt wurde (Irmeler et al. 2007). Applikation von rekombinant hergestelltem IL-35 im CIA-Modell führte zu einer deutlich verminderten IL-17 Produktion und einem milderem Verlauf der Arthritis (Niedbala et al. 2007). Als mögliche Quelle von IL-35 *in vivo* kommen Foxp3<sup>+</sup> Tregs in Frage (Collison et al. 2007), ein Fehlen von IL-35 könnte auch in der G6PI Arthritis eine Erklärungsmöglichkeit für die stärkere IL-17 Produktion nach Depletion sein.

Betrachtet man den Verlauf der IL-17 Produktion in der G6PI Arthritis, zeigte sich ein Maximum IL-17 produzierender CD4<sup>+</sup> Milzzellen bereits während der Induktionsphase. Möglicherweise spielen diese Zellen schon zu diesem frühen Zeitpunkt der Erkrankung eine wichtige Rolle, oder aber ein erheblicher Anteil dieser Effektorzellen migriert im weiteren Krankheitsverlauf in die entzündeten Gelenke. Im SKG Arthritismodell konnte für solche migrierenden Th17 Zellen ein spezieller Phänotyp durch die Expression des Chemokinrezeptores CCR6 beschrieben werden. Durch Applikation eines blockierenden anti-CCR6 Antikörpers konnte ein verzögerter und milderer Verlauf der Arthritis erreicht werden, was für die große pathogenetische Bedeutung der intraartikulären Th17 Zellen spricht (Hirota et al. 2007b). Aus dem EAE Modell gibt es Untersuchungen, die diese Theorie unterstützen. So konnte hier gezeigt werden, dass die höchste Konzentration IL-17 produzierender Zellen in der Milz schon vor dem Maximum der Erkrankung nachweisbar war. Zusätzliche Untersuchungen im entzündeten Gewebe zeigten, dass der höchste Anteil IL-17 produzierender Zellen bereits bei Krankheitsbeginn im Gehirn nachweisbar war (Korn et al. 2007b)

Das frühzeitige Maximum der IL-17 Produktion wäre wegen der bekannten Funktion von IL-17 nachvollziehbar, da dieses Zytokin die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten ins Gelenk induziert. Zusätzlich führt IL-17 intraartikulär zur Aktivierung von Synoviozyten, die durch die Sekretion von IL-1, RANKL, TNF- $\alpha$ , Chemokinen und MMPs zur lokalen Entzündungsreaktion und Knorpeldestruktion beitragen. IL-17 ist, teilweise durch RANKL vermittelt, ein Osteoklastenaktivator und trägt somit auch zur Knochendestruktion bei (zusammengefasst in (Lubberts et al. 2005a, Lubberts

2007). Diese Prozesse sind zum Teil für die initiale Schädigung der Gelenk verantwortlich, IL-17 hätte somit erheblichen Anteil an den frühen destruktiven Ereignissen im Gelenk.

Zusammenfassend zeigten meine Daten, dass die Treg depletierten Tiere unabhängig von der Art der *in vitro* Stimulation annähernd doppelt soviel IL-17 produzierten wie die Kontrolltiere. Denkbar wäre, dass die Anzahl der IL-17 produzierenden Zellen als Maß für den Schweregrad der Arthritis dienen könnte, berücksichtigt man die Rolle von IL-17 in der Arthritispathogenese. Die im gesamten Verlauf der Arthritis erhöhten IL-17 Spiegel nach Depletion könnten darauf hinweisen, dass nur durch das Vorhandensein funktionsfähiger Tregs die Produktion von IL-17 limitiert wird. Zwar proliferierten die Tregs nach Depletion stärker im Vergleich zu den Kontrolltieren (siehe auch 6.3), aber offensichtlich war dies allein nicht ausreichend für die Regulation der IL-17 Produktion und der Limitierung entzündlicher Prozesse im Gelenk.

## **6.5. Bedeutung der Tregs für die humorale Immunantwort**

In der Pathogenese der G6PI Arthritis spielen CD4<sup>+</sup> T-Zellen eine entscheidende Rolle, wie durch Depletionsexperimente mit einem gegen CD4 gerichteten Antikörper gezeigt werden konnte (Schubert et al. 2004). Aber auch B-Zellen sind für die Arthritisinduktion relevant, denn in  $\mu$ MT<sup>-/-</sup> Mäusen, welche aufgrund eines Gendefektes keine Antikörper produzieren können, kann die G6PI Arthritis nicht induziert werden (Bockermann et al. 2005). Untersuchungen der Immunglobulinproduktion in der G6PI-induzierten Arthritis zeigten, dass hohe Antikörpertiter aller Immunglobulinsubtypen gebildet wurden (Schubert et al. 2004). Ein Serumtransfer, wie er für die CIA (Stuart und Dixon 1983) und das K/BxN-Modell gezeigt werden konnte (Korganow et al. 1999), ist in der G6PI Arthritis allerdings bislang nicht erfolgreich gewesen (Schubert et al. 2004, Kamradt persönliche Kommunikation). Für das G6PI Modell wäre denkbar, dass neben der Antikörperproduktion eine weitere für die Pathogenese relevante Funktion der B-Zellen existiert. Eine Möglichkeit wäre eine Fc $\gamma$  abhängige Zellaktivierung. Für einige Fc $\gamma$ -Rezeptoren konnte ein Einfluss, nicht nur auf die Schwere der Arthritis im G6PI

Modell nachgewiesen werden (Schubert et al. 2004, Yuasa et al. 1999, Ji et al. 2002).

Aufgrund der gezeigten Bedeutung der B-Zellen sollte auch der Einfluss der Tregs auf die humorale Immunantwort untersucht werden. Es zeigte sich, dass nach Depletion der Tregs die Antikörpertiter für alle analysierten Subtypen wesentlich höher waren als bei den Kontrolltieren. Die höchste positive Titerverdünnung wurde für den IgG1 Subtyp nachgewiesen, wobei die für die Kontrollen gemessenen Titer mit dem Ergebnissen aus Vorarbeiten gut übereinstimmten (Schubert et al. 2004). Auch andere Arthritismodelle zeigten einen Einfluss der Tregs auf B-Zellen. Wurden  $\text{Foxp3}^{-/-}$  Mäuse in das K/BxN-Modell eingekreuzt, war ein schnellerer Anstieg der relevanten Subtypen IgG1 und IgG2a nachweisbar (Nguyen et al. 2007). Für die CIA konnte nach Depletion der Tregs mit einem anti-CD25 Antikörper, ebenfalls ein Anstieg der antigenspezifischen Antikörpertiter beobachtet werden (Morgan et al. 2003, Morgan et al. 2004), ähnliches gilt auch für die AIA (Frey et al. 2005).

Diese Daten zeigen einen starken Einfluss der Tregs auf die Antikörperproduktion in B-Zellen. Über die möglichen Mechanismen der Treg Wirkung ist wenig bekannt und könnte ein Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein. Denkbar wäre ein direkter Einfluss auf die B-Zellen, wobei histologisch allerdings keine  $\text{Foxp3}^{+}$  T-Zellen innerhalb von Keimzentren nachgewiesen werden konnten (Haribhai et al. 2007). Eine andere Möglichkeit wäre eine verstärkte T-Zellhilfe durch den Wegfall des limitierenden Einflusses der Tregs auf die übrigen  $\text{CD4}^{+}$  T-Zellpopulationen (Vinuesa et al. 2005). Aufgrund des deutlichen Einflusses der Tregs auf die Antikörperproduktion würde sich für weiterführende Experimente die G6PI-induzierte Arthritis gut eignen, wobei der direkte Vergleich mit den oben genannten Arthritismodellen, in denen Antikörper pathogeneserelevanter sind, wichtig wäre.

## **6.6. Bedeutung der Tregs für die Expression kostimulatorischer Moleküle**

### **6.6.1. Expression kostimulatorischer Moleküle auf Teffs**

Für die Aktivierung von T-Zellen sind neben dem Antigenkontakt und einem speziellen Zytokinmilieu zusätzlich kostimulatorische Signale von großer Bedeutung (Frauwirth und Thompson 2002). Für die Kommunikation aktivierter T-Zellen ist neben der Zytokinproduktion auch die Expression spezifischer Oberflächenmoleküle

von Bedeutung. Deren Analyse kann zur Charakterisierung des Aktivierungszustandes der T-Zellen genutzt werden (McKinstry et al. 2007).

Ich habe neben der BrdU Proliferation und der Zytokinproduktion mit Hilfe einiger Oberflächenfärbungen den Aktivierungszustand der Teffs näher charakterisiert. Die Expression dieser Moleküle wurde am Tag 0, vor Antigenkontakt, und Tag 9 nach Immunisierung gemessen, da am Tag 9 die stärkste IL-17 Produktion gefunden werden konnte. Diese IL-17 produzierenden Zellen sollten durch die Expression der Oberflächenmoleküle CD62L, CD69, CD134, PD-1 und ICOS näher charakterisiert werden. CD62L wird auf naiven T-Zellen exprimiert und nach Antigenkontakt abgespalten (Yang et al. 2006, Latham et al. 2005). CD69 (Latham et al. 2005, Sancho et al. 2005) und CD134 (Sugamura et al. 2004, Horai et al. 2004) sind Oberflächenmoleküle, die auf aktivierten T-Zellen zu finden sind.

Sowohl in der Kontrollgruppe als auch nach Depletion der Tregs gab es keinen deutlichen Unterschied in der Expression dieser Moleküle zwischen Tag 0 und 9. Es konnte an beiden Tagen keine CD134 Expression auf den Effektorzellen gefunden werden (siehe unten), obwohl das kostimulatorisch wirkende Molekül ursprünglich als T-Zellaktivierungsmarker beschrieben wurde (Sugamura et al. 2004). So konnten funktionelle Analysen zeigen, dass die Kostimulation durch CD134 zur Aktivierung von Teffs führte. In IL-1R<sup>-/-</sup> Mäusen konnte durch die Gabe von anti-CD134L der Beginn der Arthritis um mehr als zwei Wochen verzögert werden (Horai et al. 2004). Neuere Daten lassen vermuten, dass CD134 für die Differenzierung von Th17 Zellen eine wichtige Rolle spielen könnte (Williams et al. 2007). Es ist denkbar, dass für einen Nachweis der Expression von CD134 eine *in vitro* Restimulation der Zellen, wie es auch für das Moleküle CD154, nötig ist (Nakae et al. 2003b, Vu et al. 2007). Möglicherweise könnte eine stärkere Modulation der Expression aller genannten Moleküle unmittelbar nach Antigenkontakt gefunden werden, die am Tag 9 bereits nicht mehr nachweisbar war (Yang et al. 2006). Eine Untersuchung des Aktivierungszustandes der Teffs intraartikulär nach G6PI Immunisierung wäre von Interesse, denn Analysen der sekundär-lymphatischen Organe zeigen nur einen Ausschnitt der ablaufenden Immunreaktionen, viele der Effektormechanismen spielen erst im entzündeten Gelenke eine Rolle (Manolios et al. 1991, Latham et al. 2005). Möglicherweise würde man bei diesen Analysen deutlichere Unterschiede des Aktivierungszustandes der Teffs zwischen den depletierten- und den Kontrolltieren finden.

Im Gegensatz zu den zuvor untersuchten Oberflächenmolekülen zeigte sich ein Unterschied für die Expression von ICOS und in geringem Umfang von PD-1 zwischen Tag 0 und 9. Beide Moleküle gehören zur B7-Rezeptorfamilie, zu der unter anderem das konstitutiv exprimierte CD28 gehört. ICOS und PD-1 lassen sich dagegen nur nach T-Zellaktivierung auf der Zelloberfläche nachweisen (Greenwald et al. 2005). In meinen Untersuchungen zeigte sich, dass die Expression von ICOS und PD-1 nach Depletion ungefähr doppelt so hoch war wie in den Kontrolltieren. Am Tag 9 verdoppelte sich die Frequenz der ICOS<sup>+</sup> Zellen, wobei fast 25 % aller CD4<sup>+</sup> Zellen in den depletierten Tieren ICOS exprimierten, während bei PD-1 kein wesentlicher Anstieg zu beobachten war.

PD-1 spielt eine wichtige Rolle in der Regulation von Immunreaktion. So konnte in Modellen von Autoimmunerkrankungen gezeigt werden, dass Teffs durch die Expression von PD-1 empfänglich für eine Deaktivierung waren (Übersicht in (Sharpe et al. 2007). Da eine PD-1 vermittelte Ligandbindung die T-Zellantwort supprimiert (Sharpe et al. 2007, Keir et al. 2007), ist eine Expression dieses Moleküls erst zu einem späten Zeitpunkt der Immunantwort funktionell sinnvoll. Daher ist eine Analyse am Tag 9, also vor Beginn der klinischen Manifestation, nur von begrenztem Aussagewert.

Eine funktionelle Bedeutung des kostimulatorischen Moleküls ICOS konnte in vielen Arthritismodellen gezeigt werden: Aus Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe ist bekannt, dass nach Behandlung mit einem blockierenden anti-ICOSL Antikörper die G6PI Arthritis deutlich milder verlief (J. Meisel, persönliche Kommunikation). Ähnliche Ergebnisse konnten auch in der CIA Arthritis publiziert werden (Nurieva et al. 2003, Iwai et al. 2002). Untersuchungen der zugrunde liegenden Funktion von ICOS ergaben eine deutlich geringere IL-17 Produktion in den CIA resistenten ICOS<sup>-/-</sup> Mäusen, bei *in vitro* Stimulation konnte durch Zugabe eines agonistischen anti-ICOS Antikörpers die IL-17 Produktion nahezu verdoppelt werden (Nurieva et al. 2003). Eine genauere Analyse der Zytokinproduktion in ICOS<sup>-/-</sup> Mäusen zeigte sich, dass nach Stimulation mit KLH und MOG Antigen deutlich weniger IL-17 und erheblich mehr IFN- $\gamma$  produziert wurde als in den Kontrolltieren (Park et al. 2005). Diese Ergebnisse stehen in guter Übereinstimmung mit meinen Beobachtungen, dass neben der stärkeren ICOS Expression in den depletierten Tieren auch eine höhere IL-17 Produktion gefunden werden konnte. Es konnte gezeigt werden, dass die IL-17 produzierenden Zellen ausschließlich innerhalb der ICOS<sup>+</sup> Zellpopulation

nachzuweisen waren (Meisel, persönliche Kommunikation). Dieses Ergebnis passt gut zum klinisch exazerbierten Arthritisverlauf nach Depletion, in weiterführenden Untersuchungen könnte überprüft werden, ob ein kausaler Zusammenhang besteht.

### 6.6.2. Expression kostimulatorischer Moleküle auf Tregs

Von den Molekülen, die vorrangig auf Tregs exprimiert werden (McHugh und Shevach 2002, Shimizu et al. 2002, Ono et al. 2006, Yi et al. 2006), wurden beispielhaft GITR und CD25 angefärbt. Für diese Moleküle zeigte sich, sowohl für die Kontrollgruppe als auch nach Depletion der Tregs, ein deutlicher Anstieg in der Expression von Tag 0 zu 9, wobei die geringere Expression von CD25 in den depletierten Tieren am Tag 0 durch die Behandlung mit PC61 bedingt ist. Die Rolle von CD25 ist bereits im Zusammenhang mit der Kontrolle des Depletionserfolges unter 6.1 näher diskutiert worden. Wie im G6PI Modell, konnte auch in anderen Modellen gezeigt werden, dass GITR nach Antigenkontakt auf Tregs verstärkt exprimiert wird (McHugh et al. 2002, Stephens et al. 2004). GITR hat eine inhibitorische Wirkung auf die Funktion der Tregs, wie mit Hilfe eines aktivierenden anti-GITR Antikörpers *in vitro* (McHugh et al. 2002) und *in vivo* (Shimizu et al. 2002) gezeigt werden konnte. Aus dem Fehlen von GITR würde daher eine stärker supprimierende Wirkung der Tregs folgen, wie dies in GITR<sup>-/-</sup> Mäuse für die CIA gezeigt werden konnte (Cuzzocrea et al. 2005). Es ist bekannt, dass der GITR Ligand auf APCs nach Aktivierung verstärkt exprimiert wird. Initial stark aktivierte APCs könnten somit über die GITR-GITRL Interaktionen die Suppression durch Tregs verhindern (zusammengefasst in Shevach und Stephens 2006).

Eine Kofärbung von Foxp3 mit CD62L, CD69 und CD134 am Tag 0 und 9 nach Immunisierung ermöglichte eine genauere Charakterisierung der Tregs. Schon am Tag 0 zeigte sich eine deutlich stärkere Aktivierung der Tregs im Vergleich zu den Teffs. Da Tregs generell einen aktivierteren Phänotyp aufweisen, zeigte schon 2002 eine Arbeit von McHugh et al. (McHugh et al. 2002), wobei bei diesen Untersuchung nur CD25 zur Charakterisierung der Tregs zur Verfügung stand.

Bei dem Vergleich der Treg Populationen der depletierten Gruppe mit der Kontrollgruppe zeigte sich, dass die Tregs nach Depletion deutlich aktivierter waren. Auch von anderen Arbeitsgruppen wurde eine stärkere Expression von

Oberflächenmolekülen nach Depletion gefunden (Haribhai et al. 2007, Fisson et al. 2003, Fontenot et al. 2005a).

Die Expression von CD134 wurde im G6PI Arthritismodell nur auf Tregs gefunden. Auch andere Arbeiten zeigten, dass bei *ex vivo* Analysen CD134 im Gegensatz zu Teffs nur auf Tregs nachweisbar war (Nakae et al. 2003b, Vu et al. 2007). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass CD134 auf aktivierten, proliferierenden Tregs verstärkt exprimiert wird (Fisson et al. 2003, McHugh et al. 2002). In einem Adjuvanz-Arthritismodell in Ratten konnte durch Koexpression von CD134 mit CD25 die aktivierte Treg Population präziser identifiziert werden (Nolte-'t Hoen et al. 2007). Zahlreiche Arbeiten bestätigen die wichtige kostimulatorische Funktion von CD134 für Teffs. Es konnte gezeigt werden, dass durch Inhibition von CD134 ein protektiver Effekt erzielt wurde (Übersicht in Sugamura et al. 2004). Andere Arbeiten wiederum zeigten, dass die Stimulation durch CD134 auf Treg zur Reduktion der Foxp3 Expression und zur Einschränkung der suppressiven Eigenschaften dieser Zellen führte (Vu et al. 2007, Kroemer et al. 2007, Takeda et al. 2004). Eine Erklärung für diese zunächst widersprüchlichen Ergebnisse der CD134 Funktion auf Treg und Teff könnte sein, dass dieses Molekül auf beiden Zellpopulationen gegensätzliche Wirkung besitzt. Das könnte erklären, dass eine CD134 Blockade immer protektiv wirkt.

Auch die Tregs zeigten, wie bei den Teffs zuvor beschrieben, einen deutlichen Anstieg in der Expression von ICOS und einen geringfügigen für PD-1 bis zum Tag 9 nach Immunisierung. Welche Bedeutung die Expression von ICOS und PD-1 auf den Tregs hat, ist jedoch noch ungeklärt. Zwar ist bekannt, dass PD-1 auf Tregs exprimiert wird, allerdings ist die Bedeutung der Expression für die Funktionalität bisher unklar (Keir et al. 2007). Wie bereits unter 6.6.1. beschrieben, könnte die Messung von PD-1 am Tag 9 zu früh sein. In einem Infektionsmodell mit *Mykobakterium tuberculosis* konnte gezeigt werden, dass zu frühen Messzeitpunkten kein Unterschied in der Expression von PD-1 auf Tregs im Vergleich zu nicht infizierten Tieren gefunden werden konnte. Erst nach fortgeschrittener Infektion fand sich eine verstärkte PD-1 Expression (Scott-Browne et al. 2007).

Ein aktivierungsabhängiger Anstieg der ICOS Expression, so wie in meinen Untersuchungen nach G6PI Immunisierung nachweisbar, konnte auch nach Infektion mit *Mykobakterium tuberculosis* gefunden werden. Detaillierte Analysen in diesem

Modell zeigten, dass die verstärkte ICOS Expression auf Foxp3<sup>+</sup> Tregs im infizierten Lungengewebe und den drainierenden Lymphknoten, nicht aber in irrelevanten Lymphknoten auftrat (Scott-Browne et al. 2007).

Nach Depletion exprimierten nahezu 50 % der Tregs am Tag 9 ICOS, was im Vergleich zu ca. 20 % auf den Tregs aus Kontrolltieren ein erheblicher Unterschied war. Ein vergleichbarer Anstieg von ICOS auf Tregs konnte auch von Fontenot et al. in IL-2<sup>-/-</sup> und IL-2R $\alpha$ <sup>-/-</sup> Mäusen gezeigt werden (Fontenot et al. 2005a).

In der Literatur gibt es Beschreibungen ICOS<sup>+</sup> IL-10 Produzenten mit immunsuppressiver Funktion (Kohyama et al. 2004, Löhning et al. 2003, Stock et al. 2004, Herman et al. 2004), wobei durch Blockade von ICOS die IL-10 Produktion vermindert werden konnte (Löhning et al. 2003, Kohyama et al. 2004). Ungünstigerweise stand den Arbeitsgruppen während ihrer Analysen noch keine eindeutige Identifikationsmöglichkeit für Treg Zellen zur Verfügung. Allerdings wurden IL-10 produzierende, immunsuppressive Zellen in aktuellen Arbeiten als induzierbare regulatorische T-Zellen beschrieben (Jankovic et al. 2007, Baumgart et al. 2006, Stock et al. 2004, Scott-Browne et al. 2007), so dass die Funktion der ICOS Expression auf natürlich vorkommenden Tregs unklar bleibt. In einem Atherosklerosemodell konnte ein Anstieg in der Frequenz Foxp3<sup>+</sup> Zellen gefunden werden, in ICOS<sup>-/-</sup> Mäusen war dieser Anstieg weniger stark ausgeprägt und es fanden sich prominentere atherosklerotische Veränderungen (Gotsman et al. 2006). Auch in der EAE zeigten ICOS<sup>-/-</sup> Mäuse einen schwereren Verlauf der Erkrankung als Wildtypiere (Dong et al. 2001, Usui et al. 2006), im Gegensatz dazu erkrankten Mäuse an CIA (Nurieva et al. 2003) und in einem Uveitismodell (Usui et al. 2006) weniger stark. Versuche, die Funktion von ICOS in Autoimmunmodellen über Blockade mit einem anti-ICOS oder anti-ICOSL Antikörper zu klären, ergaben kein einheitliches Bild (Iwai et al. 2002, Sporic et al. 2001, Rottman et al. 2001, Ansari et al. 2007), so dass momentan die Rolle der ICOS Expression auf Tregs im Zusammenspiel mit ICOS<sup>+</sup> Teffs unklar bleibt. Eine mögliche Erklärung für die uneinheitliche Datenlage könnte sein, dass die Funktion von ICOS auf Tregs und Teffs gegensätzlicher Natur ist, wie zuvor für CD134 beschrieben.

Zusammenfassend bestätigen meine Daten die große Bedeutung CD4<sup>+</sup> Effektorzellen für die G6PI Arthritis und zeigen den starken Einfluss von Tregs auf deren Funktion. Deutlich wurde dies anhand der starken Aktivierung der Teffs nach

Depletion der Tregs, was durch die höhere Expression von ICOS und anderen Aktivierungsmarkern, sowie die verstärkte IL-17 Produktion zum Ausdruck kam. ICOS<sup>+</sup> Th17 Zellen scheinen nicht nur eine zentrale Rolle in der Pathogenese der G6PI Arthritis zu spielen, sondern auch in vielen anderen Autoimmunmodellen.

Die Tregs nach Depletion zeigten im Vergleich mit der Kontrollgruppe eine verstärkte Expression kostimulatorischer Moleküle und Aktivierungsmarker. Dies stand in guter Übereinstimmung mit den BrdU-Daten, die eine starke Proliferation der Tregs nach Depletion zeigten. Obwohl sie dadurch eine mit der Kontrollgruppe vergleichbare Treg Anzahl schnell erreichten, gelang es diesen Tregs jedoch nicht, den chronischen Verlauf der Arthritis zu verhindern. Auch in anderen Tiermodellen konnten in depletierten oder mit CD25<sup>+</sup> Zellen transferierten Tieren stark proliferierende oder aktivierte Tregs gefunden werden (Fontenot et al. 2005a, Haribhai et al. 2007, Fisson et al. 2003). Es gibt zunehmend Hinweise, dass Tregs nach Antigenkontakt proliferieren und anschließend ins entzündete Gewebe auswandern (Hirota et al. 2007b, Scott-Browne et al. 2007, Suffia et al. 2006, Sather et al. 2007, O'Connor et al. 2007). Auch in den Gelenken von RA Patienten konnten Tregs mit einem eindeutig aktivierten Phänotyp nachgewiesen werden (van Amelsfort et al. 2004, Cao et al. 2003, de Kleer et al. 2004, Ruprecht et al. 2005, Möttönen et al. 2005). Denkbar wäre, dass sie wie Tregs einen initialen Antigenkontakt benötigen, um funktionsfähig zu sein. Die verstärkte Aktivierung und Proliferation der Tregs nach Depletion könnte den Versuch darstellen, die Zahl der regulatorischen Zellen wieder zu normalisieren. Sie stellen aber kein Maß für die Funktionalität der Tregs dar. Es gibt somit derzeit keine Möglichkeit die Funktionsfähigkeit dieser Zellen zu überprüfen, da für natürlich vorkommende regulatorische T-Zellen bislang kein Effektormechanismus nachgewiesen werden konnte. Vielleicht könnte das kürzlich beschriebene Zytokin IL-35 in dieser Hinsicht eine Bedeutung bekommen. Die Vermutung liegt nahe, dass IL-35 in Tregs produziert wird und für ihre suppressive Funktion wichtig ist (Collison et al. 2007). Möglicherweise hätte man zukünftig die Chance, die Funktionsfähigkeit von Tregs anhand eines Effektormechanismus wie der IL-35 Sekretion zu überprüfen.

## 7. Schlussfolgerungen

Die Ergebnisse meiner Arbeit zeigen einen starken Einfluss CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Tregs auf den Verlauf der G6PI-induzierten Arthritis. Nach *in vivo* Depletion der Tregs mit einem anti-CD25 Antikörper kam es zur Exazerbation und Chronifizierung der Arthritis, die in Destruktionen und Ankylosen der betroffenen Gelenke mündete. Die Kontrolltiere zeigten hingegen eine Arthritis mit spontaner Remission ohne bleibende Funktionseinschränkungen der Gelenke. Nach Depletion fand sich eine deutlich verstärkte zelluläre und humorale Immunantwort gegen das Autoantigen G6PI.

Interessant war, dass in den sekundär-lymphatischen Organen schon während der Induktionsphase der Erkrankung große Mengen IL-17 produziert wurden, dem eine zentrale Rolle in der Pathogenese einer Arthritis zugesprochen wird. Nach Depletion fand sich ein deutlicher Anstieg der IL-17 Produktion und dies könnte ursächlich für den schwereren Verlauf der Arthritis sein. Um die Bedeutung von IL-17 für die Pathogenese der G6PI Arthritis näher untersuchen zu können, wäre eine vergleichende Analyse der IL-17 Produktion nach Depletion im Gelenk wichtig. Bei RA Patienten konnte eine Anreicherung von IL-17 im Gelenk nachgewiesen werden (van Roon et al. 2006). Aufgrund der bereits bekannten funktionellen Bedeutung von IL-17 in Arthritismodellen könnte es ein mögliches Ziel zukünftiger Therapiestrategien sein.

Untersuchungen der Tregs in sekundär-lymphatischen Organen zeigten, dass nach Depletion bereits während der Induktionsphase der Arthritis ein großer Teil des Treg *Pools* wieder aufgefüllt war. Diese Tregs waren aktiver und proliferierten stärker als Tregs aus Kontrolltieren. Da Tregs in depletierten Tieren keinen limitierenden Einfluss auf den Verlauf der G6PI Arthritis hatten, liegt die Vermutung nahe, dass Proliferation und Aktivierung der Tregs keine Rückschlüsse auf die *in vivo* Funktion zulassen. Eine „Hyperaktivierung“ könnte sogar Ausdruck einer gestörten Treg Funktionalität sein. Es wäre denkbar, dass für die supprimierende Wirkung der Tregs ein initialer Antigenkontakt erforderlich ist und dass Tregs anschließend für die Limitierung der Entzündung in die Gelenke auswandern. Hinweise für das Vorhandensein von Tregs im Gelenk gibt es aus einigen Arthritismodellen (Morgan et al. 2005, Nguyen et al. 2007). Weiterführende Untersuchungen betroffener Gelenke

in der G6PI Arthritis könnten im Nachweis Foxp3<sup>+</sup> Zellen durch Färbungen von Gelenkschnitten oder Präparaten der Synovialmembran bestehen.

Funktionelle Analysen der Tregs *in vivo* sind in sekundär-lymphatischen Organen und ebenso in Gelenken bisher schwierig gewesen, da es keinen gesicherten Effektormechanismus für natürlich vorkommende Tregs gab. Die Suche nach einem geeigneten Parameter ist daher von großem Interesse. Das kürzlich entdeckte Zytokin IL-35, ein Heterodimer aus Ebi3 und der IL-12 $\alpha$  Kette, könnte hierfür von entscheidender Bedeutung sein. Untersuchungen zeigten, dass dieses Zytokin von Foxp3<sup>+</sup> T-Zellen sezerniert werden kann (Collison et al. 2007). In der CIA führte eine Behandlung mit rekombinantem IL-35 zu einem deutlich milderem Krankheitsverlauf und zu einer Reduzierung der IL-17 Produktion (Niedbala et al. 2007).

Es könnte daher Ziel zukünftiger Untersuchungen sein, eine funktionelle Bedeutung von IL-35 in der G6PI Arthritis aufzuklären. Momentan könnte für diese Untersuchung der mRNA Nachweis von Ebi3 und IL-12 $\alpha$  genutzt werden, weiterführende Experimente könnten mit derzeit noch nicht verfügbarem rekombinatem IL-35, anti-IL-35 Antikörpern oder in IL-35<sup>-/-</sup> Mäusen durchgeführt werden.

Funktionelle Analysen von Tregs im Menschen sind schwer zu realisieren. Bei RA Patienten konnten Tregs mit einem stark aktivierten Phänotyp im Gelenk nachgewiesen werden, allerdings ist ungeklärt, ob diese Tregs einen funktionellen Defekt aufweisen oder ob ihre Anzahl für die Suppression stark aktivierter Teffs nicht ausreichend ist (van Roon et al. 2006). Meine Daten könnten einen Erklärungsansatz für die Diskrepanz zwischen Aktivierungszustand und Funktionalität der Tregs geben und lassen den Schluss zu, dass initiale Ereignisse für eine ausreichende Treg Funktion von entscheidender Bedeutung sind. Weiterführende Untersuchungen im Tiermodell können helfen, die Rolle der Tregs in der RA-Pathogenese besser zu verstehen und eröffnen Möglichkeiten für neue therapeutische Interventionen.

## 8. Literaturverzeichnis

- Alamanos Y, Drosos AA. 2005. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev*, 4 (3):130-136.
- Alonzi T, Fattori E, Lazzaro D, Costa P, Probert L, Kollias G, De Benedetti F, Poli V, Ciliberto G. 1998. Interleukin 6 is required for the development of collagen-induced arthritis. *J Exp Med*, 187 (4):461-468.
- Anderson CF, Oukka M, Kuchroo VJ, Sacks D. 2007. CD4(+)CD25(-)Foxp3(-) Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. *J Exp Med*, 204 (2):285-297.
- Ansari MJ, Fiorina P, Dada S, Guleria I, Ueno T, Yuan X, Trikudanathan S, Smith RN, Freeman G, Sayegh MH. 2007. Role of ICOS pathway in autoimmune and alloimmune responses in NOD mice. *Clin Immunol*.
- Apostolou I, Sarukhan A, Klein L, von Boehmer H. 2002. Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen. *Nat Immunol*, 3 (8):756-763.
- Atsumi T, Ishihara K, Kamimura D, Ikushima H, Ohtani T, Hirota S, Kobayashi H, Park SJ, Saeki Y, Kitamura Y, Hirano T. 2002. A point mutation of Tyr-759 in interleukin 6 family cytokine receptor subunit gp130 causes autoimmune arthritis. *J Exp Med*, 196 (7):979-990.
- Balandina A, Lecart S, Darteville P, Saoudi A, Berrih-Aknin S. 2005. Functional defect of regulatory CD4(+)CD25+ T cells in the thymus of patients with autoimmune myasthenia gravis. *Blood*, 105 (2):735-741.
- Banerjee S, Wei BY, Hillman K, Luthra HS, David CS. 1988. Immunosuppression of collagen-induced arthritis in mice with an anti-IL-2 receptor antibody. *J Immunol*, 141 (4):1150-1154.
- Bardos T, Czipri M, Vermes C, Finnegan A, Mikecz K, Zhang J. 2003. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells may not be involved in controlling autoimmune arthritis. *Arthritis Res Ther*, 5 (2):R106-113.
- Battaglia M, Roncarolo MG. 2006. Induction of transplantation tolerance via regulatory T cells. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 5 (3):157-165.
- Battaglia M, Stabilini A, Roncarolo MG. 2005. Rapamycin selectively expands CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells. *Blood*, 105 (12):4743-4748.
- Baumgart M, Tompkins F, Leng J, Hesse M. 2006. Naturally occurring CD4+Foxp3+ regulatory T cells are an essential, IL-10-independent part of the immunoregulatory network in *Schistosoma mansoni* egg-induced inflammation. *J Immunol*, 176 (9):5374-5387.
- Belkaid Y. 2007. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nat Rev Immunol*, 7 (11):875-888.
- Bettelli E, Dastrange M, Oukka M. 2005. Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 (14):5138-5143.
- Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK. 2006. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*, 441:235-238.
- Bettelli E, Korn T, Kuchroo VK. 2007a. Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Curr Opin Immunol*.
- Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. 2007b. T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat Immunol*, 8 (4):345-350.
- Bluestone JA, Abbas AK. 2003. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol*, 3 (3):253-257.
- Bochtler P, Wahl C, Schirmbeck R, Reimann J. 2006. Functional adaptive CD4 Foxp3 T cells develop in MHC class II-deficient mice. *J Immunol*, 177 (12):8307-8314.
- Bockermann R, Schubert D, Kamradt T, Holmdahl R. 2005. Induction of a B-cell-dependent chronic arthritis with glucose-6-phosphate isomerase. *Arthritis Res Ther*, 7 (6):R1316-1324.

- Bonomo A, Kehn PJ, Shevach EM. 1995. Post-thymectomy autoimmunity: abnormal T-cell homeostasis. *Immunol Today*, 16 (2):61-67.
- Brackertz D, Mitchell GF, Mackay IR. 1977. Antigen-induced arthritis in mice. I. Induction of arthritis in various strains of mice. *Arthritis Rheum*, 20 (3):841-850.
- Brahn E, Trentham DE. 1984. Effect of antithymocyte serum on collagen arthritis in rats: evidence that T cells are involved in its pathogenesis. *Cell Immunol*, 86 (2):421-428.
- Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paepfer B, Clark LB, Yasayko SA, Wilkinson JE, Galas D, Ziegler SF, Ramsdell F. 2001. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet*, 27 (1):68-73.
- Brüstle A, Heink S, Huber M, Rosenplänter C, Stadelmann C, Yu P, Arpaia E, Mak TW, Kamradt T, Lohoff M. 2007. The development of TH-17 cells requires interferon-regulatory factor 4. *Nat Immunol*, 8:958-966.
- Bugatti S, Codullo V, Caporali R, Montecucco C. 2007. B cells in rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev*, 7 (2):137-142.
- Cao D, Malmstrom V, Baecher-Allan C, Hafler D, Klareskog L, Trollmo C. 2003. Isolation and functional characterization of regulatory CD25<sup>bright</sup>CD4<sup>+</sup> T cells from the target organ of patients with rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol*, 33 (1):215-223.
- Chabaud M, Fossiez F, Taupin JL, Miossec P. 1998. Enhancing effect of IL-17 on IL-1-induced IL-6 and leukemia inhibitory factor production by rheumatoid arthritis synoviocytes and its regulation by Th2 cytokines. *J Immunol*, 161 (1):409-414.
- Chackerian AA, Oldham ER, Murphy EE, Schmitz J, Pflanz S, Kastelein RA. 2007. IL-1 receptor accessory protein and ST2 comprise the IL-33 receptor complex. *J Immunol*, 179 (4):2551-2555.
- Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM. 2003. Conversion of peripheral CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> naive T cells to CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med*, 198 (12):1875-1886.
- Cho YG, Cho ML, Min SY, Kim HY. 2007. Type II collagen autoimmunity in a mouse model of human rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev*, 7 (1):65-70.
- Cohen SB, Emery P, Greenwald MW, Dougados M, Furie RA, Genovese MC, Keystone EC, Loveless JE, Burmester GR, Cravets MW, Hessey EW, Shaw T, Totoritis MC. 2006. Rituximab for rheumatoid arthritis refractory to anti-tumor necrosis factor therapy: Results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial evaluating primary efficacy and safety at twenty-four weeks. *Arthritis Rheum*, 54 (9):2793-2806.
- Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, Boyd K, Wang Y, Vignali KM, Cross R, Sehy D, Blumberg RS, Vignali DA. 2007. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature*, 450 (7169):566-569.
- Corr M, Crain B. 2002. The role of FcgammaR signaling in the K/B x N serum transfer model of arthritis. *J Immunol*, 169 (11):6604-6609.
- Couper KN, Blount DG, de Souza JB, Suffia I, Belkaid Y, Riley EM. 2007. Incomplete depletion and rapid regeneration of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells following anti-CD25 treatment in malaria-infected mice. *J Immunol*, 178 (7):4136-4146.
- Courtenay JS, Dallman MJ, Dayan AD, Martin A, Mosedale B. 1980. Immunisation against heterologous type II collagen induces arthritis in mice. *Nature*, 283 (5748):666-668.
- Cuzzocrea S, Ayroldi E, Di Paola R, Agostini M, Mazzon E, Bruscoli S, Genovese T, Ronchetti S, Caputi AP, Riccardi C. 2005. Role of glucocorticoid-induced TNF receptor family gene (GITR) in collagen-induced arthritis. *Faseb J*, 19 (10):1253-1265.
- D'Cruz LM, Klein L. 2005. Development and function of agonist-induced CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells in the absence of interleukin 2 signaling. *Nat Immunol*, 6 (11):1152-1159.

- de Kleer IM, Wedderburn LR, Taams LS, Patel A, Varsani H, Klein M, de Jager W, Pugayung G, Giannoni F, Rijkers G, Albani S, Kuis W, Prakken B. 2004. CD4+CD25bright regulatory T cells actively regulate inflammation in the joints of patients with the remitting form of juvenile idiopathic arthritis. *J Immunol*, 172 (10):6435-6443.
- de la Rosa M, Rutz S, Dorninger H, Scheffold A. 2004. Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur J Immunol*, 34 (9):2480-2488.
- Dong C, Juedes AE, Temann UA, Shresta S, Allison JP, Ruddle NH, Flavell RA. 2001. ICOS co-stimulatory receptor is essential for T-cell activation and function. *Nature*, 409 (6816):97-101.
- Edwards JC, Szczepanski L, Szechinski J, Filipowicz-Sosnowska A, Emery P, Close DR, Stevens RM, Shaw T. 2004. Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*, 350 (25):2572-2581.
- Englert ME, Ferguson KM, Suarez CR, Oronsky AL, Kerwar SS. 1986. Passive transfer of collagen arthritis: heterogeneity of anti-collagen IgG. *Cell Immunol*, 101 (2):373-379.
- Fallarino F, Grohmann U, You S, McGrath BC, Cavener DR, Vacca C, Orabona C, Bianchi R, Belladonna ML, Volpi C, Santamaria P, Fioretti MC, Puccetti P. 2006. The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. *J Immunol*, 176 (11):6752-6761.
- Firestein GS. 2003. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature*, 423 (6937):356-361.
- Fisson S, Darrasse-Jeze G, Litvinova E, Septier F, Klatzmann D, Liblau R, Salomon BL. 2003. Continuous activation of autoreactive CD4+ CD25+ regulatory T cells in the steady state. *J Exp Med*, 198 (5):737-746.
- Fontenot JD, Rudensky AY. 2005. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nat Immunol*, 6 (4):331-337.
- Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol*, 4 (4):330-336.
- Fontenot JD, Rasmussen JP, Gavin MA, Rudensky AY. 2005a. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol*, 6 (11):1142-1151.
- Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY. 2005b. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity*, 22 (3):329-341.
- Franklin EC, Holman HR, Muller-Eberhard HJ, Kunkel HG. 1957. An unusual protein component of high molecular weight in the serum of certain patients with rheumatoid arthritis. *J Exp Med*, 105 (5):425-438.
- Frauwirth KA, Thompson CB. 2002. Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation. *J Clin Invest*, 109 (3):295-299.
- Frey O, Petrow PK, Gajda M, Siegmund K, Huehn J, Scheffold A, Hamann A, Radbruch A, Brauer R. 2005. The role of regulatory T cells in antigen-induced arthritis: aggravation of arthritis after depletion and amelioration after transfer of CD4+CD25+ T cells. *Arthritis Res Ther*, 7 (2):R291-301.
- Fu S, Zhang N, Yopp AC, Chen D, Mao M, Chen D, Zhang H, Ding Y, Bromberg JS. 2004. TGF-beta induces Foxp3 + T-regulatory cells from CD4 + CD25 - precursors. *Am J Transplant*, 4 (10):1614-1627.
- Gavin MA, Clarke SR, Negrou E, Gallegos A, Rudensky A. 2002. Homeostasis and anergy of CD4(+)CD25(+) suppressor T cells in vivo. *Nat Immunol*, 3 (1):33-41.
- Godfrey VL, Wilkinson JE, Russell LB. 1991. X-linked lymphoreticular disease in the scurfy (sf) mutant mouse. *Am J Pathol*, 138 (6):1379-1387.
- Gondek DC, Lu LF, Quezada SA, Sakaguchi S, Noelle RJ. 2005. Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J Immunol*, 174 (4):1783-1786.

- Gotsman I, Grabie N, Gupta R, Dacosta R, MacConmara M, Lederer J, Sukhova G, Witztum JL, Sharpe AH, Lichtman AH. 2006. Impaired regulatory T-cell response and enhanced atherosclerosis in the absence of inducible costimulatory molecule. *Circulation*, 114 (19):2047-2055.
- Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. 2005. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol*, 23:515-548.
- Grossman WJ, Verbsky JW, Barchet W, Colonna M, Atkinson JP, Ley TJ. 2004. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity*, 21 (4):589-601.
- Hang L, Theofilopoulos AN, Dixon FJ. 1982. A spontaneous rheumatoid arthritis-like disease in MRL/l mice. *J Exp Med*, 155 (6):1690-1701.
- Haribhai D, Lin W, Relland LM, Truong N, Williams CB, Chatila TA. 2007. Regulatory T cells dynamically control the primary immune response to foreign antigen. *J Immunol*, 178 (5):2961-2972.
- Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT. 2005. Interleukin 17-producing CD4<sup>+</sup> effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol*, 6 (11):1123-1132.
- Herman AE, Freeman GJ, Mathis D, Benoist C. 2004. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatory cells dependent on ICOS promote regulation of effector cells in the prediabetic lesion. *J Exp Med*, 199 (11):1479-1489.
- Hirota K, Hashimoto M, Yoshitomi H, Tanaka S, Nomura T, Yamaguchi T, Iwakura Y, Sakaguchi N, Sakaguchi S. 2007a. T cell self-reactivity forms a cytokine milieu for spontaneous development of IL-17<sup>+</sup> Th cells that cause autoimmune arthritis. *J Exp Med*, 204 (1):41-47.
- Hirota K, Yoshitomi H, Hashimoto M, Maeda S, Teradaira S, Sugimoto N, Yamaguchi T, Nomura T, Ito H, Nakamura T, Sakaguchi N, Sakaguchi S. 2007b. Preferential recruitment of CCR6-expressing Th17 cells to inflamed joints via CCL20 in rheumatoid arthritis and its animal model. *J Exp Med*, 204 (12):2803-2812.
- Holmdahl R, Jansson L, Larsson A, Jonsson R. 1990. Arthritis in DBA/1 mice induced with passively transferred type II collagen immune serum. Immunohistopathology and serum levels of anti-type II collagen auto-antibodies. *Scand J Immunol*, 31 (2):147-157.
- Horai R, Saijo S, Tanioka H, Nakae S, Sudo K, Okahara A, Ikuse T, Asano M, Iwakura Y. 2000. Development of chronic inflammatory arthropathy resembling rheumatoid arthritis in interleukin 1 receptor antagonist-deficient mice. *J Exp Med*, 191 (2):313-320.
- Horai R, Nakajima A, Habiro K, Kotani M, Nakae S, Matsuki T, Nambu A, Saijo S, Kotaki H, Sudo K, Okahara A, Tanioka H, Ikuse T, Ishii N, Schwartzberg PL, Abe R, Iwakura Y. 2004. TNF-alpha is crucial for the development of autoimmune arthritis in IL-1 receptor antagonist-deficient mice. *J Clin Invest*, 114 (11):1603-1611.
- Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*, 299 (5609):1057-1061.
- Hori S, Haury M, Coutinho A, Demengeot J. 2002. Specificity requirements for selection and effector functions of CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells in anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99 (12):8213-8218.
- Hsieh CS, Zheng Y, Liang Y, Fontenot JD, Rudensky AY. 2006. An intersection between the self-reactive regulatory and nonregulatory T cell receptor repertoires. *Nat Immunol*, 7 (4):401-410.
- Hsieh CS, Liang Y, Tyznik AJ, Self SG, Liggitt D, Rudensky AY. 2004. Recognition of the peripheral self by naturally arising CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cell receptors. *Immunity*, 21 (2):267-277.
- Huang CT, Workman CJ, Flies D, Pan X, Marson AL, Zhou G, Hipkiss EL, Ravi S, Kowalski J, Levitsky HI, Powell JD, Pardoll DM, Drake CG, Vignali DA. 2004. Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity*, 21 (4):503-513.

- Huber LC, Distler O, Turner I, Gay RE, Gay S, Pap T. 2006. Synovial fibroblasts: key players in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 45 (6):669-675.
- Huehn J, Siegmund K, Lehmann JC, Siewert C, Haubold U, Feuerer M, Debes GF, Lauber J, Frey O, Przybylski GK, Niesner U, de la Rosa M, Schmidt CA, Brauer R, Buer J, Scheffold A, Hamann A. 2004. Developmental stage, phenotype, and migration distinguish naive- and effector/memory-like CD4<sup>+</sup> regulatory T cells. *J Exp Med*, 199 (3):303-313.
- Infante-Duarte C, Horton HF, Byrne MC, Kamradt T. 2000. Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. *J Immunol*, 165 (11):6107-6115.
- Irmler IM, Gajda M, Brauer R. 2007. Exacerbation of antigen-induced arthritis in IFN-gamma-deficient mice as a result of unrestricted IL-17 response. *J Immunol*, 179 (9):6228-6236.
- Itoh M, Takahashi T, Sakaguchi N, Kuniyasu Y, Shimizu J, Otsuka F, Sakaguchi S. 1999. Thymus and autoimmunity: production of CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J Immunol*, 162 (9):5317-5326.
- Iwai H, Kozono Y, Hirose S, Akiba H, Yagita H, Okumura K, Kohsaka H, Miyasaka N, Azuma M. 2002. Amelioration of collagen-induced arthritis by blockade of inducible costimulator-B7 homologous protein costimulation. *J Immunol*, 169 (8):4332-4339.
- Iwakura Y, Tosu M, Yoshida E, Takiguchi M, Sato K, Kitajima I, Nishioka K, Yamamoto K, Takeda T, Hatanaka M, et al. 1991. Induction of inflammatory arthropathy resembling rheumatoid arthritis in mice transgenic for HTLV-I. *Science*, 253 (5023):1026-1028.
- Jaekel E, von Boehmer H, Manns MP. 2005. Antigen-specific FoxP3-transduced T-cells can control established type 1 diabetes. *Diabetes*, 54 (2):306-310.
- Jankovic D, Trinchieri G. 2007. IL-10 or not IL-10: that is the question. *Nat Immunol*, 8 (12):1281-1283.
- Jankovic D, Kullberg MC, Feng CG, Goldszmid RS, Collazo CM, Wilson M, Wynn TA, Kamanaka M, Flavell RA, Sher A. 2007. Conventional T-bet(+)Foxp3(-) Th1 cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection. *J Exp Med*, 204 (2):273-283.
- Jawaheer D, Li W, Graham RR, Chen W, Damle A, Xiao X, Monteiro J, Khalili H, Lee A, Lundsten R, Begovich A, Bugawan T, Erlich H, Elder JT, Criswell LA, Seldin MF, Amos CI, Behrens TW, Gregersen PK. 2002. Dissecting the genetic complexity of the association between human leukocyte antigens and rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet*, 71 (3):585-594.
- Ji H, Ohmura K, Mahmood U, Lee DM, Hoffhuis FM, Boackle SA, Takahashi K, Holers VM, Walport M, Gerard C, Ezekowitz A, Carroll MC, Brenner M, Weissleder R, Verbeek JS, Duchatelle V, Degott C, Benoist C, Mathis D. 2002. Arthritis critically dependent on innate immune system players. *Immunity*, 16 (2):157-168.
- Jordan MS, Boesteanu A, Reed AJ, Petrone AL, Hohenbeck AE, Lerman MA, Naji A, Caton AJ. 2001. Thymic selection of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol*, 2 (4):301-306.
- Kamradt T, Schubert D. 2005. The role and clinical implications of G6PI in experimental models of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*, 7 (1):20-28.
- Kanangat S, Blair P, Reddy R, Daheshia M, Godfrey V, Rouse BT, Wilkinson E. 1996. Disease in the scurfy (sf) mouse is associated with overexpression of cytokine genes. *Eur J Immunol*, 26 (1):161-165.
- Keffer J, Probert L, Cazlaris H, Georgopoulos S, Kaslaris E, Kioussis D, Kollias G. 1991. Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *Embo J*, 10 (13):4025-4031.
- Keir ME, Francisco LM, Sharpe AH. 2007. PD-1 and its ligands in T-cell immunity. *Curr Opin Immunol*, 19 (3):309-314.

- Kelchtermans H, De Klerck B, Mitera T, Van Balen M, Bullens D, Billiau A, Leclercq G, Matthys P. 2005. Defective CD4+CD25+ regulatory T cell functioning in collagen-induced arthritis: an important factor in pathogenesis, counter-regulated by endogenous IFN-gamma. *Arthritis Res Ther*, 7 (2):R402-415.
- Khattari R, Cox T, Yasayko SA, Ramsdell F. 2003. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol*, 4 (4):337-342.
- Kim JM, Rasmussen JP, Rudensky AY. 2007. Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nat Immunol*, 8 (2):191-197.
- Klein L, Khazaie K, von Boehmer H. 2003. In vivo dynamics of antigen-specific regulatory T cells not predicted from behavior in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 (15):8886-8891.
- Kleinau S, Martinsson P, Heyman B. 2000. Induction and suppression of collagen-induced arthritis is dependent on distinct fcgamma receptors. *J Exp Med*, 191 (9):1611-1616.
- Kleinschek MA, Owyang AM, Joyce-Shaikh B, Langrish CL, Chen Y, Gorman DM, Blumenschein WM, McClanahan T, Brombacher F, Hurst SD, Kastelein RA, Cua DJ. 2007. IL-25 regulates Th17 function in autoimmune inflammation. *J Exp Med*, 204 (1):161-170.
- Knoechel B, Lohr J, Kahn E, Bluestone JA, Abbas AK. 2005. Sequential development of interleukin 2-dependent effector and regulatory T cells in response to endogenous systemic antigen. *J Exp Med*, 202 (10):1375-1386.
- Koenders MI, Lubberts E, Oppers-Walgreen B, van den Bersselaar L, Helsen MM, Di Padova FE, Boots AM, Gram H, Joosten LA, van den Berg WB. 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 (1):141-149.
- Koga T, Kakimoto K, Hirofuji T, Kotani S, Ohkuni H, Watanabe K, Okada N, Okada H, Sumiyoshi A, Saisho K. 1985. Acute joint inflammation in mice after systemic injection of the cell wall, its peptidoglycan, and chemically defined peptidoglycan subunits from various bacteria. *Infect Immun*, 50 (1):27-34.
- Kohm AP, McMahon JS, Podojil JR, Begolka WS, DeGutes M, Kasprovicz DJ, Ziegler SF, Miller SD. 2006. Cutting Edge: Anti-CD25 monoclonal antibody injection results in the functional inactivation, not depletion, of CD4+CD25+ T regulatory cells. *J Immunol*, 176 (6):3301-3305.
- Kohyama M, Sugahara D, Sugiyama S, Yagita H, Okumura K, Hozumi N. 2004. Inducible costimulator-dependent IL-10 production by regulatory T cells specific for self-antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101 (12):4192-4197.
- Kolls JK, Linden A. 2004. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity*, 21 (4):467-476.
- Korganow AS, Ji H, Mangialaio S, Duchatelle V, Pelanda R, Martin T, Degott C, Kikutani H, Rajewsky K, Pasquali JL, Benoist C, Mathis D. 1999. From systemic T cell self-reactivity to organ-specific autoimmune disease via immunoglobulins. *Immunity*, 10 (4):451-461.
- Korn T, Anderson AC, Bettelli E, Oukka M. 2007a. The dynamics of effector T cells and Foxp3(+) regulatory T cells in the promotion and regulation of autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*, 191 (1-2):51-60.
- Korn T, Reddy J, Gao W, Bettelli E, Awasthi A, Petersen TR, Backstrom BT, Sobel RA, Wucherpfennig KW, Strom TB, Oukka M, Kuchroo VK. 2007b. Myelin-specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation. *Nat Med*, 13 (4):423-431.
- Kotake S, Udagawa N, Takahashi N, Matsuzaki K, Itoh K, Ishiyama S, Saito S, Inoue K, Kamatani N, Gillespie MT, Martin TJ, Suda T. 1999. IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J Clin Invest*, 103 (9):1345-1352.
- Kouskoff V, Korganow AS, Duchatelle V, Degott C, Benoist C, Mathis D. 1996. Organ-specific disease provoked by systemic autoimmunity. *Cell*, 87 (5):811-822.

- Kremer JM, Westhovens R, Leon M, Di Giorgio E, Alten R, Steinfeld S, Russell A, Dougados M, Emery P, Nuamah IF, Williams GR, Becker JC, Hagerty DT, Moreland LW. 2003. Treatment of rheumatoid arthritis by selective inhibition of T-cell activation with fusion protein CTLA4Ig. *N Engl J Med*, 349 (20):1907-1915.
- Kroemer A, Xiao X, Vu MD, Gao W, Minamimura K, Chen M, Maki T, Li XC. 2007. OX40 controls functionally different T cell subsets and their resistance to depletion therapy. *J Immunol*, 179 (8):5584-5591.
- Kuniyasu Y, Takahashi T, Itoh M, Shimizu J, Toda G, Sakaguchi S. 2000. Naturally anergic and suppressive CD25(+)CD4(+) T cells as a functionally and phenotypically distinct immunoregulatory T cell subpopulation. *Int Immunol*, 12 (8):1145-1155.
- Lahl K, Loddenkemper C, Drouin C, Freyer J, Arnason J, Eberl G, Hamann A, Wagner H, Huehn J, Sparwasser T. 2007. Selective depletion of Foxp3+ regulatory T cells induces a scurfy-like disease. *J Exp Med*, 204 (1):57-63.
- Latham KA, Whittington KB, Zhou R, Qian Z, Rosloniec EF. 2005. Ex vivo characterization of the autoimmune T cell response in the HLA-DR1 mouse model of collagen-induced arthritis reveals long-term activation of type II collagen-specific cells and their presence in arthritic joints. *J Immunol*, 174 (7):3978-3985.
- Laurence A, Tato CM, Davidson TS, Kanno Y, Chen Z, Yao Z, Blank RB, Meylan F, Siegel R, Hennighausen L, Shevach EM, O'Shea J J. 2007. Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity*, 26 (3):371-381.
- Lee DM, Weinblatt ME. 2001. Rheumatoid arthritis. *Lancet*, 358 (9285):903-911.
- Lehmann J, Huehn J, de la Rosa M, Maszyra F, Kretschmer U, Krenn V, Brunner M, Scheffold A, Hamann A. 2002. Expression of the integrin alpha Ebeta 7 identifies unique subsets of CD25+ as well as CD25- regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99 (20):13031-13036.
- LeibundGut-Landmann S, Gross O, Robinson MJ, Osorio F, Slack EC, Tsoni SV, Schweighoffer E, Tybulewicz V, Brown GD, Ruland J, Reis e Sousa C. 2007. Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. *Nat Immunol*, 8 (6):630-638.
- Levings MK, Sangregorio R, Roncarolo MG. 2001. Human cd25(+)cd4(+) t regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. *J Exp Med*, 193 (11):1295-1302.
- Li P, Schwarz EM. 2003. The TNF-alpha transgenic mouse model of inflammatory arthritis. *Springer Semin Immunopathol*, 25 (1):19-33.
- Liang SC, Tan XY, Luxenberg DP, Karim R, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M, Fouser LA. 2006. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med*, 203 (10):2271-2279.
- Lindley S, Dayan CM, Bishop A, Roep BO, Peakman M, Tree TI. 2005. Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes*, 54 (1):92-99.
- Liu Z, Geboes K, Hellings P, Maerten P, Heremans H, Vandenberghe P, Boon L, van Kooten P, Rutgeerts P, Ceuppens JL. 2001. B7 interactions with CD28 and CTLA-4 control tolerance or induction of mucosal inflammation in chronic experimental colitis. *J Immunol*, 167 (3):1830-1838.
- Löhning M, Hutloff A, Kallinich T, Mages HW, Bonhagen K, Radbruch A, Hamelmann E, Kroczeck RA. 2003. Expression of ICOS in vivo defines CD4+ effector T cells with high inflammatory potential and a strong bias for secretion of interleukin 10. *J Exp Med*, 197 (2):181-193.
- Loughry A, Fairchild S, Athanasou N, Edwards J, Hall FC. 2005. Inflammatory arthritis and dermatitis in thymectomized, CD25+ cell-depleted adult mice. *Rheumatology (Oxford)*, 44 (3):299-308.
- Lowenthal JW, Corthesy P, Tougne C, Lees R, MacDonald HR, Nabholz M. 1985. High and low affinity IL 2 receptors: analysis by IL 2 dissociation rate and reactivity with monoclonal anti-receptor antibody PC61. *J Immunol*, 135 (6):3988-3994.

- Lubberts E. 2007. IL-17/Th17 targeting: On the road to prevent chronic destructive arthritis? Cytokine. doi:10.1016/j.cyto.2007.09.014
- Lubberts E, Koenders MI, van den Berg WB. 2005a. The role of T-cell interleukin-17 in conducting destructive arthritis: lessons from animal models. *Arthritis Res Ther*, 7 (1):29-37.
- Lubberts E, Koenders MI, Oppers-Walgreen B, van den Bersselaar L, Coenen-de Roo CJ, Joosten LA, van den Berg WB. 2004. Treatment with a neutralizing anti-murine interleukin-17 antibody after the onset of collagen-induced arthritis reduces joint inflammation, cartilage destruction, and bone erosion. *Arthritis Rheum*, 50 (2):650-659.
- Lubberts E, Schwarzenberger P, Huang W, Schurr JR, Peschon JJ, van den Berg WB, Kolls JK. 2005b. Requirement of IL-17 receptor signaling in radiation-resistant cells in the joint for full progression of destructive synovitis. *J Immunol*, 175 (5):3360-3368.
- Mahnke K, Qian Y, Knop J, Enk AH. 2003. Induction of CD4+/CD25+ regulatory T cells by targeting of antigens to immature dendritic cells. *Blood*, 101 (12):4862-4869.
- Malek TR, Robb RJ, Shevach EM. 1983. Identification and initial characterization of a rat monoclonal antibody reactive with the murine interleukin 2 receptor-ligand complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80 (18):5694-5698.
- Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO, Hatton RD, Wahl SM, Schoeb TR, Weaver CT. 2006. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature*, 441 (7090):231-234.
- Manolios N, Geczy C, Schrieber L. 1991. Lymphocyte Migration in Health and Inflammatory Rheumatic Disease. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 20 (6):339-352.
- Manoury-Schwartz B, Chiochia G, Bessis N, Abehsira-Amar O, Batteux F, Muller S, Huang S, Boissier MC, Fournier C. 1997. High susceptibility to collagen-induced arthritis in mice lacking IFN-gamma receptors. *J Immunol*, 158 (11):5501-5506.
- Marie JC, Letterio JJ, Gavin M, Rudensky AY. 2005. TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Exp Med*, 201 (7):1061-1067.
- Matsumoto I, Lee DM, Goldbach-Mansky R, Sumida T, Hitchon CA, Schur PH, Anderson RJ, Coblyn JS, Weinblatt ME, Brenner M, Duclos B, Pasquali JL, El-Gabalawy H, Mathis D, Benoist C. 2003. Low prevalence of antibodies to glucose-6-phosphate isomerase in patients with rheumatoid arthritis and a spectrum of other chronic autoimmune disorders. *Arthritis Rheum*, 48 (4):944-954.
- McGeachy MJ, Stephens LA, Anderson SM. 2005. Natural recovery and protection from autoimmune encephalomyelitis: contribution of CD4+CD25+ regulatory cells within the central nervous system. *J Immunol*, 175 (5):3025-3032.
- McHugh RS, Shevach EM. 2002. Cutting edge: depletion of CD4+CD25+ regulatory T cells is necessary, but not sufficient, for induction of organ-specific autoimmune disease. *J Immunol*, 168 (12):5979-5983.
- McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA, Young DA, Shevach EM, Collins M, Byrne MC. 2002. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity*, 16 (2):311-323.
- McInnes IB, Liew FY. 2005. Cytokine networks--towards new therapies for rheumatoid arthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol*, 1 (1):31-39.
- McInnes IB, Schett G. 2007. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol*, 7 (6):429-442.
- McKinstry KK, Golech S, Lee WH, Huston G, Weng NP, Swain SL. 2007. Rapid default transition of CD4 T cell effectors to functional memory cells. *J Exp Med*, 204 (9):2199-2211.
- McNeill A, Spittle E, Backstrom BT. 2007. Partial depletion of CD69low-expressing natural regulatory T cells with the anti-CD25 monoclonal antibody PC61. *Scand J Immunol*, 65 (1):63-69.

- Misra N, Bayry J, Lacroix-Desmazes S, Kazatchkine MD, Kaveri SV. 2004. Cutting edge: human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells. *J Immunol*, 172 (8):4676-4680.
- Miyara M, Sakaguchi S. 2007. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends Mol Med*, 13 (3):108-116.
- Morgan K, Clague RB, Shaw MJ, Firth SA, Twose TM, Holt PJ. 1981. Native type II collagen-induced arthritis in the rat: the effect of complement depletion by cobra venom factor. *Arthritis Rheum*, 24 (11):1356-1362.
- Morgan ME, Witteveen HJ, Suttmuller RP, de Vries RR, Toes RE. 2004. CD25<sup>+</sup> regulatory cells from HLA-DQ8 transgenic mice are capable of modulating collagen-induced arthritis. *Hum Immunol*, 65 (11):1319-1327.
- Morgan ME, Flierman R, van Duivenvoorde LM, Witteveen HJ, van Ewijk W, van Laar JM, de Vries RR, Toes RE. 2005. Effective treatment of collagen-induced arthritis by adoptive transfer of CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Arthritis Rheum*, 52 (7):2212-2221.
- Morgan ME, Suttmuller RP, Witteveen HJ, van Duivenvoorde LM, Zanelli E, Melief CJ, Snijders A, Offringa R, de Vries RR, Toes RE. 2003. CD25<sup>+</sup> cell depletion hastens the onset of severe disease in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*, 48 (5):1452-1460.
- Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*, 136 (7):2348-2357.
- Möttönen M, Heikkinen J, Mustonen L, Isomaki P, Luukkainen R, Lassila O. 2005. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells with the phenotypic and functional characteristics of regulatory T cells are enriched in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol*, 140 (2):360-367.
- Mucida D, Park Y, Kim G, Turovskaya O, Scott I, Kronenberg M, Cheroutre H. 2007. Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science*, 317 (5835):256-260.
- Nadkarni S, Mauri C, Ehrenstein MR. 2007. Anti-TNF- $\alpha$  therapy induces a distinct regulatory T cell population in patients with rheumatoid arthritis via TGF- $\beta$ . *J Exp Med*, 204 (1):33-39.
- Nakae S, Nambu A, Sudo K, Iwakura Y. 2003a. Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *J Immunol*, 171 (11):6173-6177.
- Nakae S, Saijo S, Horai R, Sudo K, Mori S, Iwakura Y. 2003b. IL-17 production from activated T cells is required for the spontaneous development of destructive arthritis in mice deficient in IL-1 receptor antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 (10):5986-5990.
- Nakamura K, Kitani A, Strober W. 2001. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4<sup>(+)</sup>CD25<sup>(+)</sup> regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor  $\beta$ . *J Exp Med*, 194 (5):629-644.
- Neumann E, Barnum SR, Tarner IH, Echols J, Fleck M, Judex M, Kullmann F, Mountz JD, Scholmerich J, Gay S, Muller-Ladner U. 2002. Local production of complement proteins in rheumatoid arthritis synovium. *Arthritis Rheum*, 46 (4):934-945.
- Nguyen LT, Jacobs J, Mathis D, Benoist C. 2007. Where FoxP3-dependent regulatory T cells impinge on the development of inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum*, 56 (2):509-520.
- Niedbala W, Wei XQ, Cai B, Hueber AJ, Leung BP, McInnes IB, Liew FY. 2007. IL-35 is a novel cytokine with therapeutic effects against collagen-induced arthritis through the expansion of regulatory T cells and suppression of Th17 cells. *Eur J Immunol*, 37 (11):3021-3029.
- Niki Y, Yamada H, Seki S, Kikuchi T, Takaishi H, Toyama Y, Fujikawa K, Tada N. 2001. Macrophage- and neutrophil-dominant arthritis in human IL-1  $\alpha$  transgenic mice. *J Clin Invest*, 107 (9):1127-1135.

- Nishimura E, Sakihama T, Setoguchi R, Tanaka K, Sakaguchi S. 2004. Induction of antigen-specific immunologic tolerance by in vivo and in vitro antigen-specific expansion of naturally arising Foxp3+CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int Immunol*, 16 (8):1189-1201.
- Nolte-'t Hoen EN, Boot EP, Wagenaar-Hilbers JP, van Bilsen JH, Arkesteijn GJ, Storm G, Everse LA, van Eden W, Wauben MH. 2007. Identification and monitoring of effector and regulatory T cells during experimental arthritis based on differential expression of CD25 and CD134. *J Leukoc Biol*.
- Nurieva RI, Treuting P, Duong J, Flavell RA, Dong C. 2003. Inducible costimulator is essential for collagen-induced arthritis. *J Clin Invest*, 111 (5):701-706.
- O'Connor RA, Malpass KH, Anderton SM. 2007. The inflamed central nervous system drives the activation and rapid proliferation of Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol*, 179 (2):958-966.
- Ohata J, Miura T, Johnson TA, Hori S, Ziegler SF, Kohsaka H. 2007. Enhanced efficacy of regulatory T cell transfer against increasing resistance, by elevated Foxp3 expression induced in arthritic murine hosts. *Arthritis Rheum*, 56 (9):2947-2956.
- Oida T, Xu L, Weiner HL, Kitani A, Strober W. 2006. TGF-beta-mediated suppression by CD4+CD25+ T cells is facilitated by CTLA-4 signaling. *J Immunol*, 177 (4):2331-2339.
- Okazaki T, Honjo T. 2006. The PD-1-PD-L pathway in immunological tolerance. *Trends Immunol*, 27 (4):195-201.
- Ono M, Shimizu J, Miyachi Y, Sakaguchi S. 2006. Control of autoimmune myocarditis and multiorgan inflammation by glucocorticoid-induced TNF receptor family-related protein(high), Foxp3-expressing CD25+ and CD25- regulatory T cells. *J Immunol*, 176 (8):4748-4756.
- Pacholczyk R, Kern J, Singh N, Iwashima M, Kraj P, Ignatowicz L. 2007. Nonself-antigens are the cognate specificities of Foxp3+ regulatory T cells. *Immunity*, 27 (3):493-504.
- Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ. 2007. CD4(+)/CD25(+)/Foxp3(+) regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4(+) T cells. *Nat Immunol*, 8 (12):1353-1362.
- Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, Wang Y, Hood L, Zhu Z, Tian Q, Dong C. 2005. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol*, 6 (11):1133-1141.
- Park HB, Paik DJ, Jang E, Hong S, Youn J. 2004. Acquisition of anergic and suppressive activities in transforming growth factor-beta-costimulated CD4+CD25- T cells. *Int Immunol*, 16 (8):1203-1213.
- Paust S, Cantor H. 2005. Regulatory T cells and autoimmune disease. *Immunol Rev*, 204:195-207.
- Paust S, Lu L, McCarty N, Cantor H. 2004. Engagement of B7 on effector T cells by regulatory T cells prevents autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101 (28):10398-10403.
- Raimondi G, Shufesky WJ, Tokita D, Morelli AE, Thomson AW. 2006. Regulated compartmentalization of programmed cell death-1 discriminates CD4+CD25+ resting regulatory T cells from activated T cells. *J Immunol*, 176 (5):2808-2816.
- Ranges GE, Sriram S, Cooper SM. 1985. Prevention of type II collagen-induced arthritis by in vivo treatment with anti-L3T4. *J Exp Med*, 162 (3):1105-1110.
- Rantapää-Dahlqvist S, de Jong BA, Berglin E, Hallmans G, Wadell G, Stenlund H, Sundin U, van Venrooij WJ. 2003. Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 48 (10):2741-2749.
- Read S, Greenwald R, Izcue A, Robinson N, Mandelbrot D, Francisco L, Sharpe AH, Powrie F. 2006. Blockade of CTLA-4 on CD4+CD25+ regulatory T cells abrogates their function in vivo. *J Immunol*, 177 (7):4376-4383.
- Reife RA, Loutis N, Watson WC, Hasty KA, Stuart JM. 1991. SWR mice are resistant to collagen-induced arthritis but produce potentially arthritogenic antibodies. *Arthritis Rheum*, 34 (6):776-781.

- Reinhardt RL, Kang SJ, Liang HE, Locksley RM. 2006. T helper cell effector fates--who, how and where? *Curr Opin Immunol*, 18 (3):271-277.
- Rottman JB, Smith T, Tonra JR, Ganley K, Bloom T, Silva R, Pierce B, Gutierrez-Ramos JC, Ozkaynak E, Coyle AJ. 2001. The costimulatory molecule ICOS plays an important role in the immunopathogenesis of EAE. *Nat Immunol*, 2 (7):605-611.
- Ruprecht CR, Gattorno M, Ferlito F, Gregorio A, Martini A, Lanzavecchia A, Sallusto F. 2005. Coexpression of CD25 and CD27 identifies FoxP3+ regulatory T cells in inflamed synovia. *J Exp Med*, 201 (11):1793-1803.
- Sadlack B, Merz H, Schorle H, Schimpl A, Feller AC, Horak I. 1993. Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. *Cell*, 75 (2):253-261.
- Sakaguchi N, Takahashi T, Hata H, Nomura T, Tagami T, Yamazaki S, Sakihama T, Matsutani T, Negishi I, Nakatsuru S, Sakaguchi S. 2003. Altered thymic T-cell selection due to a mutation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis in mice. *Nature*, 426 (6965):454-460.
- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*, 155 (3):1151-1164.
- Sancho D, Gomez M, Sanchez-Madrid F. 2005. CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends Immunol*, 26 (3):136-140.
- Sasai M, Saeki Y, Ohshima S, Nishioka K, Mima T, Tanaka T, Katada Y, Yoshizaki K, Suemura M, Kishimoto T. 1999. Delayed onset and reduced severity of collagen-induced arthritis in interleukin-6-deficient mice. *Arthritis Rheum*, 42 (8):1635-1643.
- Sather BD, Treuting P, Perdue N, Miazgowiec M, Fontenot JD, Rudensky AY, Campbell DJ. 2007. Altering the distribution of Foxp3(+) regulatory T cells results in tissue-specific inflammatory disease. *J Exp Med*, 204 (6):1335-1347.
- Schaller M, Burton DR, Ditzel HJ. 2001. Autoantibodies to GPI in rheumatoid arthritis: linkage between an animal model and human disease. *Nat Immunol*, 2 (8):746-753.
- Schubert D, Schmidt M, Zaiss D, Jungblut PR, Kamradt T. 2002. Autoantibodies to GPI and creatine kinase in RA. *Nat Immunol*, 3 (5):411; author reply 412-413.
- Schubert D, Maier B, Morawietz L, Krenn V, Kamradt T. 2004. Immunization with glucose-6-phosphate isomerase induces T cell-dependent peripheral polyarthritis in genetically unaltered mice. *J Immunol*, 172 (7):4503-4509.
- Scott-Browne JP, Shafiani S, Tucker-Heard G, Ishida-Tsubota K, Fontenot JD, Rudensky AY, Bevan MJ, Urdahl KB. 2007. Expansion and function of Foxp3-expressing T regulatory cells during tuberculosis. *J Exp Med*, 204 (9):2159-2169.
- Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, Zaunders J, Sasson S, Landay A, Solomon M, Selby W, Alexander SI, Nanan R, Kelleher A, Fazekas de St Groth B. 2006. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med*, 203 (7):1693-1700.
- Setoguchi R, Hori S, Takahashi T, Sakaguchi S. 2005. Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *J Exp Med*, 201 (5):723-735.
- Sharpe AH, Wherry EJ, Ahmed R, Freeman GJ. 2007. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nat Immunol*, 8 (3):239-245.
- Shevach EM. 2006. From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity*, 25 (2):195-201.
- Shevach EM, Stephens GL. 2006. The GITR-GITRL interaction: co-stimulation or contrasuppression of regulatory activity? *Nat Rev Immunol*, 6 (8):613-618.
- Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y, Sakaguchi S. 2002. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol*, 3 (2):135-142.

- Shimoda M, Mmanywa F, Joshi SK, Li T, Miyake K, Pihkala J, Abbas JA, Koni PA. 2006. Conditional ablation of MHC-II suggests an indirect role for MHC-II in regulatory CD4 T cell maintenance. *J Immunol*, 176 (11):6503-6511.
- Smolen JS, Steiner G. 2003. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Drug Discov*, 2 (6):473-488.
- Smolen JS, Aletaha D, Koeller M, Weisman MH, Emery P. 2007. New therapies for treatment of rheumatoid arthritis. *Lancet*, 370 (9602):1861-1874.
- Sporici RA, Beswick RL, von Allmen C, Rumbley CA, Hayden-Ledbetter M, Ledbetter JA, Perrin PJ. 2001. ICOS ligand costimulation is required for T-cell encephalitogenicity. *Clin Immunol*, 100 (3):277-288.
- Steinman L. 2007. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med*, 13 (2):139-145.
- Stephens GL, McHugh RS, Whitters MJ, Young DA, Luxenberg D, Carreno BM, Collins M, Shevach EM. 2004. Engagement of glucocorticoid-induced TNFR family-related receptor on effector T cells by its ligand mediates resistance to suppression by CD4+CD25+ T cells. *J Immunol*, 173 (8):5008-5020.
- Stephens LA, Anderton SM. 2006. Comment on "Cutting edge: anti-CD25 monoclonal antibody injection results in the functional inactivation, not depletion, of CD4+CD25+ T regulatory cells". *J Immunol*, 177 (4):2036; author reply 2037-2038.
- Stock P, Akbari O, Berry G, Freeman GJ, Dekruyff RH, Umetsu DT. 2004. Induction of T helper type 1-like regulatory cells that express Foxp3 and protect against airway hyper-reactivity. *Nat Immunol*, 5 (11):1149-1156.
- Stockinger B, Veldhoen M. 2007. Differentiation and function of Th17 T cells. *Curr Opin Immunol*, 19 (3):281-286.
- Stuart JM, Dixon FJ. 1983. Serum transfer of collagen-induced arthritis in mice. *J Exp Med*, 158 (2):378-392.
- Suffia IJ, Reckling SK, Piccirillo CA, Goldszmid RS, Belkaid Y. 2006. Infected site-restricted Foxp3+ natural regulatory T cells are specific for microbial antigens. *J Exp Med*, 203 (3):777-788.
- Sugamura K, Ishii N, Weinberg AD. 2004. Therapeutic targeting of the effector T-cell co-stimulatory molecule OX40. *Nat Rev Immunol*, 4 (6):420-431.
- Sugiyama H, Gyulai R, Toichi E, Garaczi E, Shimada S, Stevens SR, McCormick TS, Cooper KD. 2005. Dysfunctional blood and target tissue CD4+CD25high regulatory T cells in psoriasis: mechanism underlying unrestrained pathogenic effector T cell proliferation. *J Immunol*, 174 (1):164-173.
- Suri-Payer E, Fritzsching B. 2006. Regulatory T cells in experimental autoimmune disease. *Springer Semin Immunopathol*, 28 (1):3-16.
- Suzuki H, Kundig TM, Furlonger C, Wakeham A, Timms E, Matsuyama T, Schmits R, Simard JJ, Ohashi PS, Griesser H, et al. 1995. Deregulated T cell activation and autoimmunity in mice lacking interleukin-2 receptor beta. *Science*, 268 (5216):1472-1476.
- Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, Sakaguchi N, Itoh M, Iwata M, Shimizu J, Sakaguchi S. 1998. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol*, 10 (12):1969-1980.
- Takeda I, Ine S, Killeen N, Ndhlovu LC, Murata K, Satomi S, Sugamura K, Ishii N. 2004. Distinct roles for the OX40-OX40 ligand interaction in regulatory and nonregulatory T cells. *J Immunol*, 172 (6):3580-3589.
- Tang Q, Bluestone JA. 2006. Regulatory T-cell physiology and application to treat autoimmunity. *Immunol Rev*, 212:217-237.
- Tang Q, Henriksen KJ, Bi M, Finger EB, Szot G, Ye J, Masteller EL, McDevitt H, Bonyhadi M, Bluestone JA. 2004. In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes. *J Exp Med*, 199 (11):1455-1465.

- Tarbell KV, Yamazaki S, Olson K, Toy P, Steinman RM. 2004. CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells, expanded with dendritic cells presenting a single autoantigenic peptide, suppress autoimmune diabetes. *J Exp Med*, 199 (11):1467-1477.
- Taylor JJ, Mohrs M, Pearce EJ. 2006. Regulatory T cell responses develop in parallel to Th responses and control the magnitude and phenotype of the Th effector population. *J Immunol*, 176 (10):5839-5847.
- Thornton AM, Shevach EM. 1998. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med*, 188 (2):287-296.
- Thornton AM, Donovan EE, Piccirillo CA, Shevach EM. 2004. Cutting edge: IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cell suppressor function. *J Immunol*, 172 (11):6519-6523.
- Torgerson TR, Ochs HD. 2007. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked: forkhead box protein 3 mutations and lack of regulatory T cells. *J Allergy Clin Immunol*, 120 (4):744-750; quiz 751-742.
- Turesson C, O'Fallon WM, Crowson CS, Gabriel SE, Matteson EL. 2003. Extra-articular disease manifestations in rheumatoid arthritis: incidence trends and risk factors over 46 years. *Ann Rheum Dis*, 62 (8):722-727.
- Usui Y, Akiba H, Takeuchi M, Kezuka T, Takeuchi A, Hattori T, Okunuki Y, Yamazaki T, Yagita H, Usui M, Okumura K. 2006. The role of the ICOS/B7RP-1 T cell costimulatory pathway in murine experimental autoimmune uveoretinitis. *Eur J Immunol*, 36 (11):3071-3081.
- van Amelsfort JM, Jacobs KM, Bijlsma JW, Lafeber FP, Taams LS. 2004. CD4<sup>(+)</sup>CD25<sup>(+)</sup> regulatory T cells in rheumatoid arthritis: differences in the presence, phenotype, and function between peripheral blood and synovial fluid. *Arthritis Rheum*, 50 (9):2775-2785.
- van der Heijden IM, Wilbrink B, Tchvetverikov I, Schrijver IA, Schouls LM, Hazenberg MP, Breedveld FC, Tak PP. 2000. Presence of bacterial DNA and bacterial peptidoglycans in joints of patients with rheumatoid arthritis and other arthritides. *Arthritis Rheum*, 43 (3):593-598.
- van Roon JA, Bijlsma JW, Lafeber FP. 2006. Diversity of regulatory T cells to control arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 20 (5):897-913.
- Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. 2006. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*, 24 (2):179-189.
- Vermeire K, Heremans H, Vandeputte M, Huang S, Billiau A, Matthys P. 1997. Accelerated collagen-induced arthritis in IFN-gamma receptor-deficient mice. *J Immunol*, 158 (11):5507-5513.
- Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA. 2004. Loss of functional suppression by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med*, 199 (7):971-979.
- Vinuesa CG, Tangye SG, Moser B, Mackay CR. 2005. Follicular B helper T cells in antibody responses and autoimmunity. *Nat Rev Immunol*, 5 (11):853-865.
- Vu MD, Xiao X, Gao W, Degauque N, Chen M, Kroemer A, Killeen N, Ishii N, Chang Li X. 2007. OX40 costimulation turns off Foxp3<sup>+</sup> Tregs. *Blood*, 110 (7):2501-2510.
- Walker LS, Chodos A, Eggena M, Dooms H, Abbas AK. 2003. Antigen-dependent proliferation of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in vivo. *J Exp Med*, 198 (2):249-258.
- Wan YY, Flavell RA. 2007. 'Yin-Yang' functions of transforming growth factor-beta and T regulatory cells in immune regulation. *Immunol Rev*, 220 (1):199-213.
- Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR, Harrington LE. 2007. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol*, 25:821-852.
- Weyand CM, Klimiuk PA, Goronzy JJ. 1998. Heterogeneity of rheumatoid arthritis: from phenotypes to genotypes. *Springer Semin Immunopathol*, 20 (1-2):5-22.

- Willerford DM, Chen J, Ferry JA, Davidson L, Ma A, Alt FW. 1995. Interleukin-2 receptor alpha chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment. *Immunity*, 3 (4):521-530.
- Williams CA, Murray SE, Weinberg AD, Parker DC. 2007. OX40-mediated differentiation to effector function requires IL-2 receptor signaling but not CD28, CD40, IL-12Rbeta2, or T-bet. *J Immunol*, 178 (12):7694-7702.
- Wipke BT, Wang Z, Nagengast W, Reichert DE, Allen PM. 2004. Staging the initiation of autoantibody-induced arthritis: a critical role for immune complexes. *J Immunol*, 172 (12):7694-7702.
- Wu Y, Borde M, Heissmeyer V, Feuerer M, Lapan AD, Stroud JC, Bates DL, Guo L, Han A, Ziegler SF, Mathis D, Benoist C, Chen L, Rao A. 2006. FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell*, 126 (2):375-387.
- Yamaguchi T, Hirota K, Nagahama K, Ohkawa K, Takahashi T, Nomura T, Sakaguchi S. 2007. Control of immune responses by antigen-specific regulatory T cells expressing the folate receptor. *Immunity*, 27 (1):145-159.
- Yang CP, Sparshott SM, Duffy D, Garside P, Bell EB. 2006. The phenotype and survival of antigen-stimulated transgenic CD4 T cells in vivo: the influence of persisting antigen. *Int Immunol*, 18 (4):515-523.
- Yi H, Zhen Y, Jiang L, Zheng J, Zhao Y. 2006. The phenotypic characterization of naturally occurring regulatory CD4+CD25+ T cells. *Cell Mol Immunol*, 3 (3):189-195.
- Yuasa T, Kubo S, Yoshino T, Ujike A, Matsumura K, Ono M, Ravetch JV, Takai T. 1999. Deletion of fcgamma receptor IIB renders H-2(b) mice susceptible to collagen-induced arthritis. *J Exp Med*, 189 (1):187-194.
- Zelenay S, Demengeot J. 2006. Comment on "Cutting edge: anti-CD25 monoclonal antibody injection results in the functional inactivation, not depletion, of CD4+CD25+ T regulatory cells". *J Immunol*, 177 (4):2036-2037; author reply 2037-2038.
- Zhao DM, Thornton AM, DiPaolo RJ, Shevach EM. 2006. Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes. *Blood*, 107 (10):3925-3932.
- Ziegler SF. 2006. FOXP3: of mice and men. *Annu Rev Immunol*, 24:209-226.
- Ziolkowska M, Koc A, Luszczkiewicz G, Ksiezopolska-Pietrzak K, Klimczak E, Chwalinska-Sadowska H, Maslinski W. 2000. High levels of IL-17 in rheumatoid arthritis patients: IL-15 triggers in vitro IL-17 production via cyclosporin A-sensitive mechanism. *J Immunol*, 164 (5):2832-2838.

## 9. Anhang

### Lebenslauf

Name: Andreas Reichel  
 Adresse: Schlegelstrasse 4/402, 07747 Jena  
 Geburtsdatum: 19.05.1983  
 Geburtsort: Erfurt  
 Nationalität: deutsch

### Schulbildung

1989 - 1993 Besuch der Grundschule in Suhl, Thüringen  
 1993 - 2001 Besuch des Johann-Gottfried-Herder-Gymnasiums in Suhl  
 Juli 2000 Sprachreise nach San Diago, USA  
 2001 Abitur

### Zivildienst

2001 - 2002 Zivildienst im pflegerischen Bereich am Städtischen  
 Fachkrankenhaus Zella-Mehlis

### Studium

2002 - 2004 Vorklinischer Abschnitt des Humanmedizinstudiums an der  
 Friedrich-Schiller Universität Jena  
 2004 Physikum  
 2004 Klinischer Abschnitt des Studiums an der Friedrich-Schiller  
 Universität Jena  
 2005 Beginn der Doktorarbeit am Institut für Immunologie Jena  
 2006 Famulatur am Tygerberg Hospital in Kapstadt, Südafrika  
 2008 - 2009 Praktisches Jahres  
 Juni 2009 Abschluss des Studiums mit dem Staatsexamen

### Stipendium

2005 - 2006 Erhalt des IZKF-Promotionsstipendiums im Rahmen der  
 Dissertation zum Thema: Der Einfluss CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>  
 regulatorischer T-Zellen auf die G6PI-induzierte Arthritis

## Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei Prof. Dr. Thomas Kamradt für die freundliche Überlassung der Doktorarbeit, sowie für die Betreuung und die offenen Diskussionen bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Kerstin Bonhagen für die zahllosen Anregungen und die Hilfe bei der wissenschaftlichen Durchführung meiner Experimente, sowie Juliane Meisel für die Unterstützung während unserer gemeinsamen Doktorandenzeit.

Mein Dank gilt auch allen wissenschaftlichen Mitarbeitern des Institutes für Immunologie für die freundliche Aufnahme, den kollegialen Umgang und die Übernahme von Wochenenddiensten im Tierstall. Frau Dipl.-Biochem. Lisa Bruns danke ich für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Weiterhin möchte ich allen technischen Assistentinnen des Institutes für ihre Hilfe bei der Vorbereitung von Experimenten danken, ohne die diese nicht möglich gewesen wären.

Danken möchte ich auch Dr. Lars Morawietz und Frau Fernahl der Charité in Berlin für die histologische Aufarbeitung und Auswertung meiner Daten, Dr. Andreas Hutloff und Prof. Dr. Richard Kroczeck für die Bereitstellung von Antikörpern, sowie Frau Grau vom klinischen Medienzentrums Jena für die Anfertigung der Photographien.

Ganz herzlich Bedanken möchte ich mich bei meinen Freunden und meiner Familie, vor allem bei meiner Mutter für ihre stets aufbauenden und liebevollen Worte und die ständige Unterstützung.

## Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich,

- dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,
- ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,
- mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. Thomas Kamradt, Frau Dr. Kerstin Bonhagen, Dr. Lars Morawietz,
- die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,
- dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 14.07.2009

Andreas Reichel