

„Die Rolle
von Interferon- γ in der
Pathogenese der
Antigen-induzierten Arthritis“

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

eingereicht an der
Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von
Dipl. Biol. Ingo Michael Irmeler
geboren am 14. Dezember 1971 in Ravensburg

Jena, 2007

GUTACHTER:

1. **PROF. DR. ROLF BRÄUER**
INSTITUT FÜR PATHOLOGIE, FRIEDRICH-SCHILLER-UNIVERSITÄT, JENA
2. **PROF. DR. FALK WEIH**
FRITZ-LIPMANN-INSTITUT (FLI), JENA
3. **PROF. DR. ANDREAS RADBRUCH**
DEUTSCHES RHEUMA-FORSCHUNGSZENTRUM (DRFZ), BERLIN

Tag der öffentlichen Verteidigung: 03.03.2008

„PER ASPERA AD ASTRA“

Römisches Sprichwort mit Ursprüngen in den Versen von
Seneca dem Jüngeren und Cornelius Severus

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	3
2.1 Die Rheumatoide Arthritis	3
2.1.1 Allgemeines	3
2.1.2 Diagnose der Rheumatoiden Arthritis	4
2.1.3 Ätiologie	5
2.1.4 Aufbau des Gelenks	8
2.1.5 Pathogenese und Therapie	8
2.1.6 T-Helfer-Zellen, Interferon- γ und Arthritis	13
2.2 Experimentelle Arthritismodelle	18
2.2.1 Allgemeines	18
2.2.2 Die Antigen-induzierte Arthritis	19
2.2.3 Weitere Arthritismodelle	21
2.3 Ziel der Arbeit	23
3. Material und Methoden	24
3.1 Material	24
3.1.1 Mausstämme	24
3.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien	24
3.1.3 Reagenzien, Puffer und Kulturmedien	26
3.2 Methoden	29
3.2.1 Das Modell der Antigen-induzierten Arthritis	29
3.2.2 Klinische Bewertung der Arthritis	29
3.2.3 Immunhistochemische Untersuchungen	32
3.2.4 Nachweis von Zytokinen	32
3.2.5 Nachweis von Antikörpern	35
3.2.6 Zymographie	37
3.2.7 Durchflusszytometrie	38
3.2.8 Applikation von Interferon- γ oder Antikörpern	39
3.2.9 <i>In vitro</i> -Generierung von Th1/Th2-Zellen	39
3.2.10 Isolierung von CD4 ⁺ Zellen <i>ex vivo</i> und Zelltransfer	41

3.2.11	Modulation der IL-17-Sekretion <i>in vitro</i>	42
3.2.12	Quantifizierung der Proliferation der Th-Zellen	42
3.2.13	Statistische Auswertung und Darstellung	43
4.	Ergebnisse	44
4.1	Die Rolle von Th-Zellen bei der AIA	44
4.1.1	Transfer von unspezifischen Th1- und Th2-Zellen	44
4.1.2	Transfer von OVA-spezifischen Th1- und Th2-Zellen	46
4.1.3	AIA bei OT-II Mäusen	48
4.1.4	Zusammenfassung	50
4.2	Charakterisierung der AIA bei IFN-γ^{-/-} Mäusen	51
4.2.1	Akute Phase (Tag 3)	51
4.2.2	Chronische Phase (Tag 21 und Tag 63)	64
4.2.3	Suszeptibilität für CIA bei IFN- γ ^{-/-} Mäusen	65
4.2.4	Zusammenfassung	68
4.3	Neutralisation und Rekonstituierung von Zytokinen	69
4.3.1	Applikation von IFN- γ in IFN- γ ^{-/-} Mäuse und Wildtyp	69
4.3.2	Neutralisation von IFN- γ beim Wildtyp	71
4.3.3	Neutralisation von IL-17 bei IFN- γ ^{-/-} Mäusen	71
4.3.4	AIA bei IL-17 ^{-/-} Mäusen	73
4.3.5	Transfer von CD4 ⁺ Zellen aus Wildtyp, IFN- γ ^{-/-} und IL-17 ^{-/-} Mäusen	74
4.3.6	Zusammenfassung	76
4.4	Regulation der Th17-Zellen durch IFN-γ <i>in vitro</i>	77
4.4.1	Hemmung der IL-17-Sekretion durch IFN- γ	77
4.4.2	Hemmung der Expansion von Th-Zellen durch IFN- γ	78
4.4.3	Zusammenfassung	81
5.	Diskussion	82
5.1	Th-Zellen in der Pathogenese der Arthritis	84
5.2	Die protektive Rolle von IFN-γ bei der AIA	86
5.2.1	Exazerbation der AIA bei IFN- γ ^{-/-} Mäusen	86
5.2.2	Neutralisation und Rekonstituierung von IFN- γ	90
5.3	Im Fokus: Interleukin-17	93

5.4 IFN-γ: Immunmodulation statt Inflammation	98
5.5 Schlussfolgerung und Ausblick	100
6. Literaturverzeichnis	101
7. Anhang	115
Abkürzungsverzeichnis	115
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	117
Wissenschaftliche Beiträge	119
Danksagung	121
Lebenslauf	122
Ehrenwörtliche Erklärung	123

1 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden in Bezug auf das Th1/Th2-Paradigma die Rollen von T-Helfer-1-Zellen (Th1-Zellen) und dem von ihnen gebildeten Zytokin Interferon- γ (IFN- γ) bei der experimentellen Arthritis sowie die zugrunde liegenden Pathogenesemechanismen untersucht. Für die Untersuchungen wurde das Modell der murinen Antigen-induzierten Arthritis verwendet. Es handelt sich dabei um ein etabliertes Modell der humanen Rheumatoiden Arthritis, bei dem im Gelenk eine Entzündungsreaktion gegen ein xenogenes Antigen hervorgerufen wird. Im Verlauf der Immunreaktion werden gewebsresidente Zellen der Synovialmembran aktiviert, die zusammen mit eingewanderten Zellen über Pannusbildung und die Sekretion von matrixabbauenden Enzymen eine progrediente und histologisch nachweisbare Destruktion des Gelenks verursachen.

Es wurde versucht, die Arthritis durch die Beeinflussung des Gleichgewichts der einzelnen Th-Zell-Subtypen zu modulieren und die Schwere und der Verlauf der Arthritis wurden in IFN- γ -defizienten (IFN- $\gamma^{-/-}$) Mäusen anhand von klinischen und immunologischen Parametern charakterisiert. Weiterhin wurde die Entzündungsreaktion durch die Gabe von neutralisierenden Antikörpern oder von rekombinantem Zytokin moduliert und Zelltransfers von *in vitro* generierten oder *ex vivo* isolierten Th-Zellen zur Beurteilung des inflammatorischen Potentials bestimmter Subtypen von Th-Zellen durchgeführt.

Es konnte gezeigt werden, dass Effektor-Th-Zellen unabhängig vom Subtyp Th1 oder Th2 die Entzündungsreaktion begünstigen können und dass ohne die Möglichkeit einer Verlagerung der T-Zell-Antwort vom primären Antigen hin zu einer autoreaktiven T-Zell-Antwort im Tiermodell keine Chronifizierung, sondern eine spontane Remission der Arthritis eintritt.

Die Charakterisierung der experimentellen Arthritis bei IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäusen ergab, dass IFN- γ entgegen dem gebräuchlichen Paradigma einer Dominanz der Th1-Antwort bei der Rheumatoiden Arthritis für die Entstehung der akuten Entzündungsreaktion im Modell der Antigen-induzierten Arthritis nicht nur nicht notwendig ist, sondern sogar eine ausgeprägte antiinflammatorische Wirkung hat. Die Schwellung des Kniegelenks und die histologische Beurteilung ergaben bei IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäusen im

Vergleich zum Wildtyp einen signifikant schwereren Verlauf der Arthritis. Der Effekt des konstitutiven Fehlens von IFN- γ war auf die akute Phase der Arthritis beschränkt, in der chronischen Phase wiesen beide Stämme keine Unterschiede auf.

Die Neutralisation von IFN- γ im Wildtyp verstärkte die akute Schwellung des Kniegelenks, während die intraartikuläre Gabe von rekombinantem Zytokin in beiden Mausstämmen einen reduzierenden Effekt hatte. Es zeigte sich, dass vor allem die Infiltration von neutrophilen Granulozyten durch das Fehlen bzw. die Gabe von IFN- γ beeinflusst wurde. In den Gelenken von IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäuse kam es zu einer verstärkten Einwanderung dieser Zellen in das entzündete Kniegelenk, während exogenes IFN- γ auf die Zellinfiltration eine hemmende Wirkung hatte.

Während die Antikörper-Spiegel im Serum von IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäusen erniedrigt waren, wurden von isolierten Lymphknoten- und Milzzellen nach Stimulation deutlich mehr Zytokine sekretiert. Ein auffälliges Merkmal der erhöhten zellulären Reaktivität waren insbesondere große Mengen von Interleukin-17 (IL-17), für das ein stimulierender Effekt auf die neutrophile Granulopoese beschrieben ist. Adoptive Zelltransfers zeigten, dass Th-Zellen aus immunisierten IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäusen ein größeres arthritogenes Potential besitzen, als solche aus dem Wildtyp bzw. von IL-17 $^{-/-}$ Mäusen.

Die verringerte Arthritis bei IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäusen durch die Neutralisation von IL-17 mittels monoklonaler Antikörpern und die abgeschwächt verlaufende Arthritis bei IL-17 $^{-/-}$ Mäusen lassen auf eine hemmende Wirkung von IFN- γ auf IL-17 schließen. Diese Überlegung konnte *in vitro* bestätigt werden, wo in der Kultur von mehrfach stimulierten naiven Th-Zellen die Produktion von IL-17 durch IFN- γ dosisabhängig und über die Hemmung der Expansion der Th-Zellen inhibiert wurde.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass in der Pathogenese des Modells der Antigen-induzierten Arthritis eher IL-17-produzierende Th17-Zellen eine fundamentale Rolle spielen als IFN- γ -produzierende Th1-Zellen, wie dies gemäß dem Th1/Th2-Paradigma der RA zu erwarten wäre. Die Hemmung von IL-17 durch IFN- γ ist dabei ein bedeutender antiinflammatorischer Effektormechanismus von IFN- γ . Insofern stellt eine gegen IL-17 gerichtete Therapie der Rheumatoiden Arthritis einen sinnvolleren Ansatzpunkt dar als eine gegen IFN- γ gerichtete Therapie.

2 Einleitung

2.1 Die Rheumatoide Arthritis

2.1.1 Allgemeines

Bei der Rheumatoiden Arthritis (RA; arthron, gr. = Gelenk) handelt es sich um eine entzündliche, schubweise verlaufende Form der Gelenkerkrankung mit unbekannter Ätiologie, die in Westeuropa und in Nordamerika in allen ethnischen



Abb. 1 Pierre-Auguste Renoir (1841-1919), französischer Maler des Impressionismus. Die im Alter von 51 Jahren beginnende Arthritis führte zur Deformation der Hände und völligem Funktionsverlust der Finger.

Bevölkerungsgruppen mit einer Prävalenz von 0,5-1 % vorwiegend im fortgeschrittenen Lebensalter auftritt. Bezeichnend für die RA ist eine chronische entzündliche Veränderung der die Gelenkkapsel auskleidenden Gelenkinnenhaut, des Stratum synoviale (Synovialis). Da die Reaktionen des Immunsystems gegen körpereigenes Gewebe gerichtet sind, zählt die RA zu den Autoimmunerkrankungen.

Männer erkranken meist zwischen dem 45. und 65. Lebensjahr, Frauen zwischen dem 25. und 35. Lebensjahr oder nach der Menopause ab dem 50. Lebensjahr. Dabei sind Frauen und Männer im Verhältnis 3:1 betroffen. In Deutschland wird die Zahl der Erkrankten auf

ca. 800 000 geschätzt. Die RA wird auch als chronische Polyarthritis bezeichnet, da sich die Erkrankung bevorzugt an Finger-, Hand- und Fußgelenken manifestiert. Aber auch andere Organe wie z. B. Herz (Perikarditis), Lunge (Lungenfibrose, Pleuritis), Augen (Skleritis) oder die Haut (Vaskulitis, Rheumaknoten) können mit verringerter Häufigkeit betroffen sein (GABRIEL ET AL., 2003).

Ausgehend von einer mit Schmerzen und einer gesteigerten Druckempfindlichkeit einhergehenden Rötung und Schwellung der Gelenke, kann die RA unbehandelt zu

schweren funktionellen Beeinträchtigungen bis hin zur völligen Deformation und Zerstörung der Gelenke führen (Abb. 1). Die chronische RA ist durch schubweise auftretende akute Entzündungsreaktionen gekennzeichnet. Im Verlauf der Erkrankung werden immer mehr Gelenke betroffen und schon nach wenigen Monaten treten bei einem großen Prozentsatz der Betroffenen radiografisch sichtbare erosive Veränderungen an Knorpel und Knochen auf (Abb. 2). Bei 80 % der Erkrankten ist dies innerhalb von zwei

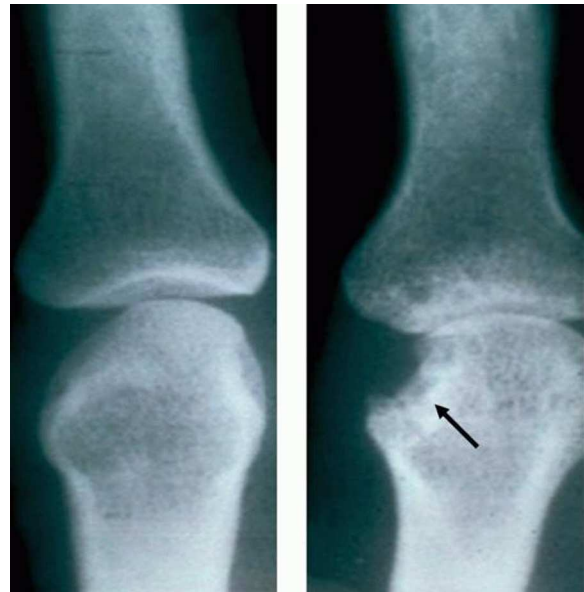


Abb. 2 Knochenerosion. Röntgenbild einer lokalen Erosion des subchondralen Knochen (Pfeil) bei der RA (SCHETT, 2003).

Jahren und bei 40 % bereits innerhalb der ersten 6 Monate der Fall. Dies begründet die große volkswirtschaftliche Bedeutung der RA. Das Bundesgesundheitsministerium schätzt die in der Bundesrepublik Deutschland aufgrund von Behandlung, Arbeitsunfähigkeit und vorzeitiger Verrentung anfallenden jährlichen Kosten auf 3,5 bis 5 Mrd. Euro (Stand 2004). Die Erkrankung an RA ist nicht nur mit einem großen Verlust an Lebensqualität, sondern auch mit einer signifikant verringerten Lebenserwartung verbunden. Insbesondere bei Formen, bei denen extraartikuläre Manifestationen auftreten, ist die Sterbewahrscheinlichkeit um ein 4-faches erhöht (GABRIEL ET AL., 2003).

2.1.2 Diagnose der Rheumatoiden Arthritis

Die Diagnose der RA erfolgt anhand der Krankengeschichte, Röntgenuntersuchungen von Hand- und Fußgelenken und dem Nachweis von C-reaktivem Protein und Rheumafaktor im Blut. Allerdings tritt der Rheumafaktor, ein gegen körpereigene Antikörper gerichteter Antikörper, als bekanntester diagnostischer Marker nur bei 70-80 % der RA-Patienten, aber auch bei Gesunden auf (VISSER ET AL., 1996). Man unterscheidet daher eine seropositive und eine seronegative RA. Zur besseren Klassifizierung der RA wurde vom American College of Rheumatology (ACR) 1987 ein Kriterienkatalog entwickelt (Tab. 1). Für die Diagnose einer RA müssen vier der sieben Kriterien erfüllt sein. Zunehmend wird anstelle der ACR-Kriterien alternativ

der DAS28 (‘Disease Activity Score’) eingesetzt. Es handelt sich dabei um die Bewertung der Schwere der Entzündung anhand der Krankheitsaktivität in 28 definierten Gelenken mittels einer von 0-10 reichenden Skala. Im Unterschied zu den ACR-Kriterien erlaubt der DAS28 nicht nur den Bezug auf die Ausgangssituation, sondern auch eine aktuelle Bewertung der RA, was in klinischen

Tab. 1 Revidierte Kriterien des American College of Rheumatology (ACR) zur Klassifizierung der RA (ARNETT ET AL., 1988).

<i>Kriterium</i>	<i>Befund</i>
Morgensteifigkeit der Gelenke (mind. 1h)	> 6 Wochen
Arthritis mit tastbarer Schwellung in mind. 3 Gelenkregionen	> 6 Wochen
Arthritis an Hand- oder Fingergelenken	> 6 Wochen
Symmetrische Arthritis (beidseits dieselbe Gelenkregion)	> 6 Wochen
Rheumaknoten	vorhanden
Rheumafaktornachweis im Blut	positiv
Röntgenveränderungen (Osteopenie und/oder Erosionen)	vorhanden

Studien zur Beurteilung der Wirksamkeit von anti-rheumatischen Therapien von Vorteil ist. Es hat sich gezeigt, dass durch den möglichst frühzeitigen Beginn einer adäquaten und wirksamen Therapie Folgeschäden verhindert oder zumindest verzögert werden können (STENGER ET AL., 1998; VAN DONGEN ET AL., 2007). Je später die Diagnose gestellt wird und die Behandlung erfolgt, desto geringer sind Chancen auf einen nur schwach ausgeprägten Verlauf der Erkrankung. Leider haben die individuell unterschiedlichen Krankheitsbilder und die anfängliche Unspezifität der Symptome oft erst verspätet die exakte diagnostische Zuordnung zur RA zur Folge.

2.1.3 Ätiologie

Bei der RA handelt es sich um eine Autoimmunerkrankung, bei der sich die Zellen des Immunsystems gegen körpereigene Autoantigene richten. Zytokine sind als Mediatoren an den Mechanismen des Entzündungsprozesses maßgeblich beteiligt. Trotz jahrzehntelanger intensiver Forschung und vieler Erkenntnisse über die interzellulären Wechselwirkungen auf molekularer Ebene sind die Ursachen für die

Entstehung und Progression der RA noch immer nicht hinlänglich geklärt. Mehrere Hypothesen werden diskutiert.

Die Entdeckung des Rheumafaktors (WAALER, 1940), ein gegen das Fc-Fragment („Fragment crystallizable“) von Immunglobulin G gerichteter Autoantikörper, führte zur **Autoimmunhypothese**, die zelluläre und/oder humorale Reaktionen des Immunsystems gegen Immunglobuline, Kollagene oder ein im Gelenk vorkommendes noch unbekanntes Autoantigen als Ursache für die RA betrachtet. Allerdings kommt der Rheumafaktor auch bei anderen Krankheitsbildern und nur bei 40-50 % der Patienten mit beginnender RA vor. Dagegen sind gegen von den Zellen der Synovialmembran exprimierte zyklische citrullinierte Peptide (CCP) gerichtete anti-CCP-Antikörper, die bei 50 % der Patienten vorkommen, hochspezifisch für die RA (BAETEN ET AL., 2001). Sie sind besonders für die Frühdiagnostik und bei seronegativen Patienten ein wertvoller diagnostischer Marker. Zwar sind diese Autoantikörper aufgrund der fehlenden Korrelation mit der Krankheitsaktivität der RA nicht als Verlaufsparemeter geeignet, sie scheinen jedoch eine prognostische Bedeutung mit Korrelation zu den radiologischen Veränderungen zu haben (VAN GAALEN ET AL., 2004).

Aufgrund familiärer Häufungen und der Tatsache, dass das Vorhandensein bestimmter Allele bei Genen, die den dritten Abschnitt der hypervariablen Region der β 1-Kette der Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)-II-Moleküle kodieren, das Risiko an RA zu erkranken erhöht, wird auch eine **genetische Prädisposition** angenommen. Diese konservierte Aminosäuresequenz wird auch als ‚shared epitope‘ bezeichnet (GREGERSEN ET AL., 1987). MHC-Moleküle dienen der Präsentation von Peptiden, die vom T-Zell-Rezeptor (TCR) der T-Zellen erkannt werden. Neben den Subtypen HLA-DR4 und HLA-DR1, sind auch HLA-DR10, HLA-DR11 und HLA-DR14 mit der RA assoziiert (O´DELL ET AL., 1998; NEWTON ET AL., 2004). Entweder können diese Subtypen das die Arthritis auslösende Peptid binden oder aber die RA wird durch direkten Kontakt zwischen dem dritten Abschnitt der hypervariablen Region der β 1-Kette und dem Antigen-Rezeptor der T-Zellen initiiert. Die Schwere der Arthritis kann durch das ‚shared epitope‘ beeinflusst werden. Liegen die Allele homozygot vor, steigt die Wahrscheinlichkeit für extraartikuläre Manifestationen und schwere Gelenkdestruktionen (WEYAND ET AL., 1992). Andere Funktionen als dem T-Zell-Rezeptor Antigene zu präsentieren, sind für MHC-II-Moleküle bisher nicht bekannt, was zumindest bei der Initiation der RA für eine Beteiligung von T-Zellen spricht.

Neben genetischen können weitere endogene und exogene Faktoren bei der Ätiologie und Chronifizierung der RA eine Rolle spielen. In synovialen Fibroblasten der Gelenkinnenhaut von Rheumapatienten wurde häufig eine **Trisomie des Chromosoms 7** festgestellt (TASCIOGLU ET AL., 2005). Dies könnte eine Aktivierung und Transformation der synovialen Fibroblasten in einen aggressiven, Knorpel und Knochen destruierenden Phänotyp bewirken.

Aber auch **virale und bakterielle Infektionen** des Synovialgewebes, die eine MHC-II-restringierte Immunreaktion induzieren und dabei antigenspezifische T-Zellen aktivieren, werden als Ursache für die initiale Entzündung der Gelenke diskutiert. Im Synovialgewebe bzw. Blut von Rheumapatienten konnte auf DNA-Ebene mittels der Polymerase-Ketten-Reaktion ein Zusammenhang von RA und Infektionen mit dem Epstein-Barr-Virus, dem Cytomegalie-Virus oder dem Parvo-Virus B19 nachgewiesen werden (SAAL ET AL., 1992; NEWKIRK ET AL., 1994; STAHL ET AL., 2000). Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang, dass die RA anhand von Skelettfunden oder von Aufzeichnungen in Europa erst ab dem 17. Jahrhundert belegt werden kann, während dies für Nordamerika schon zu vorgeschichtlicher Zeit möglich ist (FIRESTEIN, 2003). Dies würde für eine Verschleppung des die Arthritis auslösenden Faktors sprechen, bei dem es sich um einen Prokaryoten handeln könnte, wie dies für Fauna und Flora durch den transatlantischen Austausch bis heute ungewollt der Fall ist.

Das Vorhandensein einer zum ‚shared epitope‘ weitgehend homologen Aminosäure-Sequenz beim Glykoprotein gp110 des Epstein-Barr-Virus und einem Hitze-Schock-Protein von *Escherichia coli* (ROUDIER ET AL., 1989; ALBANI & ROUDIER, 1992) macht in der als **Molekulares Mimikry** bezeichneten Hypothese eine Assoziation von viralen oder bakteriellen Infektionen und genetischer Prädisposition bei der Auslösung und Progredienz der RA denkbar. Normalerweise erkennt das Immunsystem die den körpereigenen Bestandteilen ähnlichen Antigene der Pathogene nicht als solche, was für diese ein selektiver Vorteil ist. Die für diese Epitope spezifischen Zellen der adaptiven Immunabwehr werden bei der Reifung eliminiert. Ist die Selektion jedoch unvollständig, kann sich die Immunreaktion zur Beseitigung der Pathogene aufgrund der sich entsprechenden Molekülstrukturen gegen Selbst fortsetzen und zur Entstehung einer Autoimmunerkrankung führen. Eine Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus erhöht insbesondere bei Vorhandensein des Epitops HLA-DR4 das Risiko, an RA zu erkranken (SAAL ET AL., 1999).

2.1.4 Aufbau des Gelenks

Die bindegewebige Kapsel, die das Gelenk umschließt, besteht aus zwei Schichten, dem äußeren kollagenhaltigen und zur Stabilisation des Gelenks dienenden Stratum fibrosum und dem inneren Stratum synoviale. Dieses wird auch als Synovialmembran bezeichnet und besteht beim Gesunden aus einer 1-2 Lagen dicken synovialen Deckzellschicht. Zwei Typen von Synoviozyten werden morphologisch unterschieden. Typ A wird makrophagenähnlicher Synoviozyt genannt und dient der Resorption und der Phagozytose. Typ B ist vorherrschend und wird als fibroblastenähnlicher Synoviozyt bezeichnet. Er synthetisiert Hyaluronsäure und weitere Bestandteile der Synovialflüssigkeit und sorgt damit für die Ernährung des die Gelenkflächen überziehenden Gelenkknorpels. Die Synovialflüssigkeit hat außerdem für die reibungsarme Beweglichkeit der Gelenke funktionelle Bedeutung, ihre Viskosität wird durch die Struktur der Aggregate von Hyaluronsäure und Proteoglykanen bestimmt. Die Knorpelmatrix besteht hauptsächlich aus Kollagenfibrillen vom Typ II.

2.1.5 Pathogenese und Therapie

Während von der Ätiologie der RA viele Einzelheiten trotz intensiver Forschung in den letzten Jahrzehnten weiterhin unbekannt sind, wurden von den Pathogenesemechanismen der Erkrankung viele Details aufgeklärt. Ausgehend von einer Entzündung unbekannter Ursache bilden sich Immunkomplexe und es kommt zur Akkumulation von Zellen des Immunsystems im betroffenen Gelenk. Das zelluläre Infiltrat der akuten Entzündungsreaktion besteht vorwiegend aus polymorphonukleären neutrophilen Granulozyten, aber auch aus Makrophagen, T- und B-Lymphozyten und Dendritischen Zellen (DC). Die neutrophilen Granulozyten nehmen dabei eine zentrale Stellung zwischen angeborener und erworbener Immunantwort ein. Sie dienen nicht nur der Phagozytose, sondern beeinflussen über Zell-Zell-Kontakt und die Sekretion von Zytokinen und Chemokinen, die die Migration, Differenzierung und Aktivierung von Antigen-präsentierenden Makrophagen und DC steuern, auch die Art und Intensität der nachfolgenden Prozesse der Immunreaktion (NATHAN, 2006). Mit zunehmender Chronifizierung der RA nimmt der Anteil an polymorphonukleären Zellen im zellulären Infiltrats ab und es besteht zunehmend aus mononukleären und lymphoiden Zellen. Die Rolle von B-Zellen bei

der RA wird diskutiert, neben der Produktion von Antikörpern können B-Zellen auch Zytokine sezernieren und Antigene präsentieren (TANEJA ET AL., 2007). Zwar werden die Antigene, gegen die die bisher mit der RA assoziierten Antikörper gerichtet sind, nicht gelenkspezifisch exprimiert, doch zeigt eine gegen aktivierte B-Zellen gerichtete Therapie der RA gewisse Erfolge (siehe Seite 13).

Der persistierende entzündliche Prozess der RA führt unter Beteiligung von autoreaktiven T-Zellen zu zellulären und humoralen Immunreaktionen gegen körpereigenes Gewebe. Durch das inflammatorische Milieu, u. a. die von Makrophagen und DC sezernierten Zytokine Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α), IL-6 und IL-1 β , werden die gewebsresidenten synovialen Fibroblasten (SF) aktiviert (Abb. 3). Zytokine werden sowohl mit entzündlichen Prozessen als auch mit der Pathogenese vieler Erkrankungen in Verbindung gebracht und spielen somit bei der Regulation des Immunsystems eine wichtige Rolle. Neben dem direktem Zellkontakt dienen die Zytokine zur Kommunikation zwischen den Zellen und bewirken Änderungen des Aktivierungs- oder Differenzierungszustandes der Zielzellen (MCINNIS & SCHETT, 2007). Ihre Wirkung wird durch die Bindung an den spezifischen Rezeptor der Zielzelle vermittelt, wobei ihre Reichweite und Halbwertszeit beschränkt ist.

Das zentrale Charakteristikum der RA ist die entzündliche Veränderung der Synovialmembran (Synovitis). Von den aktivierten SF werden Knorpel- und Knochenmatrix abbauende Enzyme und weitere Zytokine sezerniert. Der aggressive Phänotyp dieser aktivierten SF ist stabil und bleibt auch nach Isolierung aus dem Gewebe und ohne die weitere Stimulation durch entzündliche Prozesse erhalten (MULLER-LADNER ET AL., 1996). Durch die unkontrollierte Vermehrung der SF wächst die Synovialmembran von 1-2 auf bis zu 10 Zelllagen an und es entsteht eine stark vaskularisierte Bindegewebswucherung (Pannus), die in den Gelenkspalt vorwächst und dort durch die Freisetzung großer Mengen von katabolen Enzymen zum Abbau des kollagenhaltigen Knorpels der Gelenkflächen und des subchondralen Knochens führt.

Der Knochenabbau erfolgt nicht nur durch SF, sondern hauptsächlich durch Osteoklasten, die von aktivierten SF oder Th-Zellen aktiviert wurden. Sowohl SF, als auch Th-Zellen verfügen durch die Expression von ‚Receptor activator of NF- κ B‘-Ligand (RANKL) über die Voraussetzung, die Differenzierung von Monozyten zu

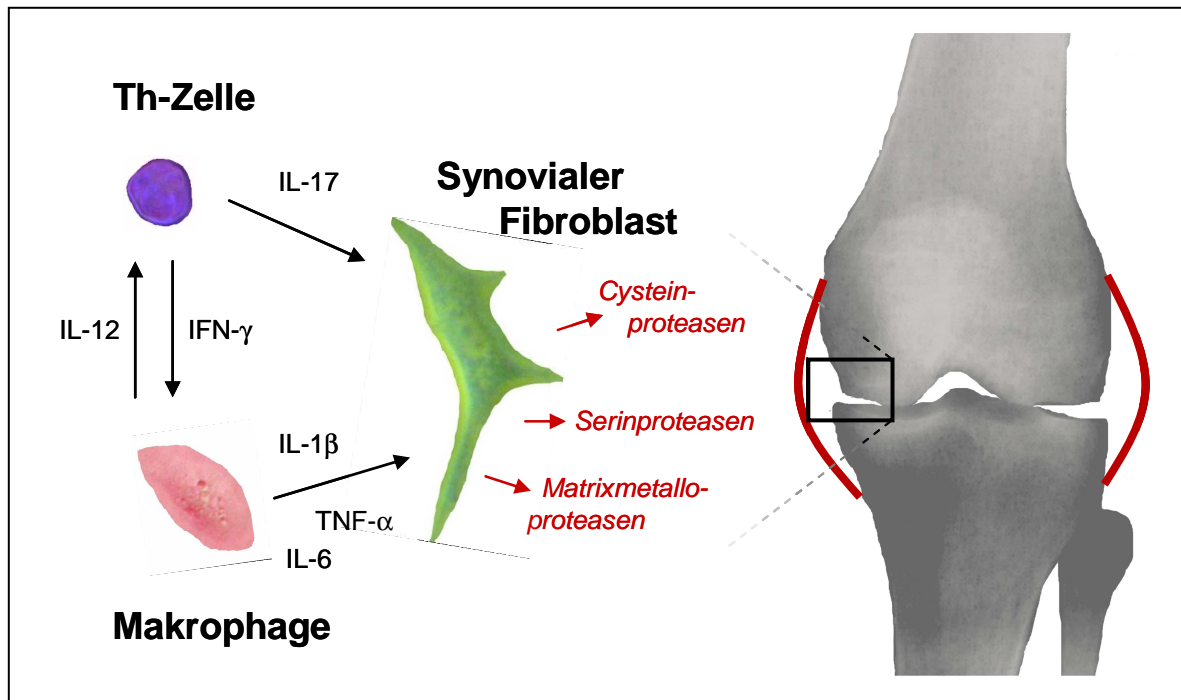


Abb. 3 Zelluläre Interaktionen. Vereinfachte schematische Darstellung der zellulären Wechselwirkungen von an der Entstehung und Progredienz der Arthritis beteiligten Zellen. Während Th-Zellen über IL-17 und Makrophagen über IL-1 β , IL-6 oder TNF- α synoviale Fibroblasten zur Sekretion von matrixabbauenden Proteasen stimulieren, aktivieren sich Th-Zellen und Makrophagen wechselseitig über IFN- γ und IL-12.

Osteoklasten zu induzieren (GRAVALLESE ET AL., 2000; SHIGEYAMA ET AL., 2000; SATO ET AL., 2006).

Aufgrund der Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und die extrazelluläre Matrix abbauender Proteasen nehmen beiden Typen von Synoviozyten, makrophagen- und fibroblastenähnliche, eine zentrale Stellung bei der Pathogenese der RA ein. Da die genetische Prädisposition des MHC-II-Moleküls die Antigen-erkennung durch die T-Zellen betrifft und gegen T-Lymphozyten bzw. von ihnen sezernierte Zytokine gerichtete Therapien wirksam sind, wird auch diesen eine herausragende Bedeutung bei dem entzündlichen Geschehen der RA zugeschrieben.

Zur Behandlung der RA steht eine Vielzahl von Therapien zur Verfügung, wobei das Hauptaugenmerk auf die Beseitigung der Schmerzen und den Erhalt bzw. das Wiedererlangen der Beweglichkeit der Gelenke gerichtet ist. Neben der medikamentösen Basistherapie sind operative Maßnahmen, Krankengymnastik und physikalischen Therapieformen weitere oder ergänzende Möglichkeiten zur

Behandlung der RA. Bei der medikamentösen Therapie werden mehrere Gruppen mit verschiedenen Wirkkonzepten unterschieden, die einzeln oder in Kombination erfolgreich eingesetzt werden:

DMARD („disease-modifying antirheumatic drugs“):

Die Gruppe der DMARD ist auch als langwirksame Antirheumatika bekannt und umfasst die Basistherapeutika zur Behandlung der RA. Sie haben eine lang anhaltende, vorwiegend immunsuppressive Wirkung und schränken somit die Aktivität der chronischen Entzündung und die Schädigung von Knorpel und Knochen in den Gelenken ein. Die wichtigsten Vertreter dieser Gruppe sind Methotrexat, Sulfasalazin, Hydroxychloroquin, injizierbares oder orales Gold, Cyclosporin A und Leflunomid. Insbesondere niedrig dosiertes Methotrexat (z. B. MTX[®], Lantarel[®]), das aus der Tumorthherapie stammt und dessen entzündungshemmende Mechanismen noch nicht eindeutig geklärt sind, stellt oft das Mittel der ersten Wahl dar, da es in der Regel in niedrigen Dosierungen weitgehend nebenwirkungsfrei große Wirksamkeit besitzt. Leflunomid (Arava[®]) hemmt die Pyrimidin-Synthese und damit die Vermehrung von aktivierten Lymphozyten und die Pannusbildung. Cyclosporin A hat einen sehr spezifischen Wirkmechanismus. Es hemmt die Aktivierung des Gens für IL-2 und verhindert so die Aktivierung und klonale Expansion der T-Lymphozyten.

Glukokortikoide (Kortison-Derivate):

Die orale Gabe von Glukokortikoiden hemmt effektiv entzündliche Prozesse und lindert somit die Symptome der RA. Die Wirkung ist allerdings zeitlich befristet und eine längere Therapie ist mit deutlichen Nebenwirkungen verbunden. Durch die Injektion in betroffene Gelenke kann der Wirkort lokal eingegrenzt werden. Aufgrund der schnell einsetzenden Wirkung eignen sich Glukokortikoide wie z. B. Dexamethason (Fortecortin[®]) besonders für die Behandlung von akuten Entzündungsschüben.

NSAR (Nicht-steroidale Antirheumatika):

Bei einer anfänglichen und milden RA werden oft NSAR, wie z. B. Ibuprofen oder Diclofenac, eingesetzt. Die entzündungshemmende Wirkung wird durch die Hemmung der beiden Formen COX-1 und COX-2 des Enzyms Cyclooxygenase (Umwandlung von Arachidonsäure in proinflammatorisch wirkende Prostaglandine) erreicht. Da COX-1 auch für den Schutz der Magenschleimhaut

notwendig ist, kann dies allerdings durch die Schädigung der Schleimhaut des Magen-Darm-Bereichs schwere gastrointestinale Nebenwirkungen wie etwa Geschwüre zur Folge haben. Einige neuere Wirkstoffe wie z. B. Rofecoxib (Vioxx®) umgehen diese Schleimhautschädigung durch eine spezifische Hemmung von COX-2. Langzeitstudien ergaben für dieses Präparat jedoch ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko, so dass es mittlerweile vom Markt genommen wurde (2004).

Biologika:

Das zunehmende Verständnis der der RA zugrunde liegenden molekularen Mechanismen führte zur Entwicklung der jüngsten Gruppe von anti-rheumatischen Therapeutika, den Biologika. Es handelt sich um biotechnologisch hergestellte Eiweißsubstanzen, die direkt in die dem Krankheitsverlauf zugrunde liegenden Mechanismen eingreifen, indem sie an der Entzündung beteiligte Schlüsselzytokine gezielt ausschalten und dadurch die Aktivierung der an der Zerstörung von Knorpel und Knochen beteiligten Zelltypen verhindern. Man unterscheidet zwei Wirkprinzipien. Entweder wird das Zytokin von Antikörpern gebunden oder aber die Hemmung des Zytokins erfolgt kompetitiv durch einen löslichen Rezeptor mit höherer Affinität. Die anfänglich entwickelten Biologika Enbrel® (Etanercept), Remicade® (Infliximab) und Humira® (Adalimumab) sind gegen das v. a. von Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und T-Zellen produzierte Zytokin TNF- α gerichtet, später kam mit dem IL-1-Rezeptorantagonisten (IL-1Ra) Kineret® (Anakinra) IL-1 β als Ziel hinzu. Beide Zytokine sind entscheidend an der Zerstörung des Gelenkes beteiligt. Auf der Jahrestagung des ACR 2006 vorgestellte Studien zeigen, dass auch IL-6 (Tocilizumab) ein wirksamer Ansatzpunkt zur Therapie der RA darstellt (NISHIMOTO ET AL., 2004).

Ausgehend von der Hypothese, dass es sich bei der RA um eine T-Zell-vermittelte Erkrankung handelt, wurden in den 90er Jahren klinische Studien zur RA mit depletierenden anti-CD4-Antikörpern durchgeführt, ohne dass ein therapeutischer Durchbruch erzielt werden konnte. Möglicherweise wurden durch die recht unspezifische therapeutische Ausrichtung auf CD4⁺ Zellen die unterschiedlichen und mitunter gegensätzlichen Eigenschaften der einzelnen Th-Subpopulationen nicht ausreichend berücksichtigt. Neue klinische Studien zur Hemmung der T-Zell-Aktivierung durch Unterbrechung der Interaktionen

zwischen den Antigen-präsentierenden Zellen (APC) und den T-Zellen mit dem Fusionsprotein CTLA4Ig auf Ebene der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 sind vielversprechend (KREMER ET AL., 2003). Oencia[®] (Abatacept) führte auch bei Patienten, die auf eine Therapie mit Methotrexat oder TNF- α -Inhibitoren nicht ädequat angesprochen haben, zu einer Verbesserung der RA (KREMER ET AL., 2005, GENOVESE ET AL., 2005). Neuerdings sind auch wieder an der Entzündung beteiligte Zellpopulationen das Ziel von Biologika. So ist MabThera[®] (Rituximab) ein gegen das an der Oberfläche von aktivierten B-Zellen exprimierte CD20 gerichteter Antikörper (COHEN ET AL., 2006).

Die Wirkung von Biologika setzt sehr schnell ein, neben den hohen Kosten sind allerdings noch fehlende Befunde zu Nebenwirkungen bei langjähriger Anwendung zu berücksichtigen. Die Verwendung von Infliximab wurde mittlerweile neu überarbeitet, da in Einzelfällen durch die Blockierung des für die Immunreaktion wichtigen TNF- α bis dahin latent vorhandene Tuberkulosen nicht mehr reguliert werden konnten und zum Ausbruch kamen.

2.1.6 T-Helfer-Zellen, Interferon- γ und Arthritis

CD4⁺ Th-Zellen wurden von MOSMANN ET AL. 1986 anhand der von ihnen sekretierten Zytokine in die sich wechselseitig regulierenden Th1- und Th2-Subtypen unterteilt (GAJEWSKI & FITCH, 1988; SCHINDLER ET AL., 2001). In den letzten Jahren wurde die ursprüngliche Dichotomie der Th1- und Th2-Subtypen bei Th-Zellen um regulatorische T-Zellen (T_{reg}) und IL-17-produzierende Th17-Zellen erweitert (Abb. 4). Die von verschiedenen Th-Subtypen sezernierten Zytokine sind als Mediatoren mit unterschiedlichen Effektorfunktionen ein zentraler Bestandteil der Immunregulation (Tab. 2).

So lassen sich im Mausmodell bei athymischen Rezipienten durch den adoptiven Transfer von Milz- und Lymphknotenzellen, bei denen die α -Kette des IL-2-Rezeptors exprimierende CD25⁺ Subpopulation entfernt wurde, histologisch und serologisch nachweisbare Autoimmunerkrankungen, u. a. Polyarthritis hervorrufen. Eine baldige Rekonstituierung der CD4⁺CD25⁺ Population verhindert die Symptome (SAKAGUCHI ET AL., 1995). Das Oberflächenmolekül CD25 ist nicht ausschließlich auf T_{reg}-Zellen begrenzt, sondern findet sich auch auf der Oberfläche von aktivierten T-Zellen. Der Transkriptionsfaktor Foxp3 (Forkhead box protein 3) hingegen ist

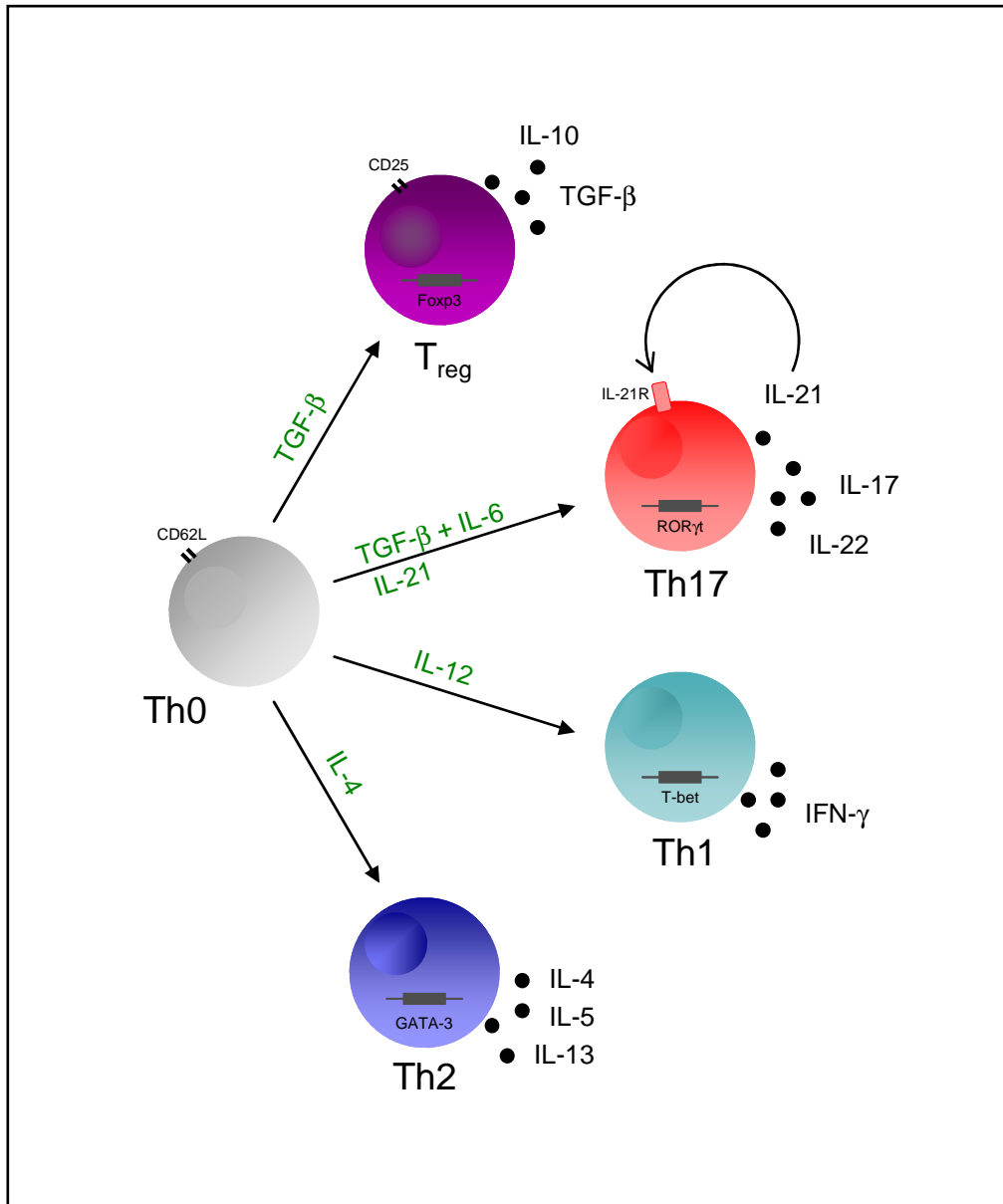


Abb. 4 Subpopulationen von Th-Zellen. Schematische Darstellung der Differenzierungswege der verschiedenen Subtypen von Th-Zellen. Unter Beteiligung von APC und abhängig vom vorhandenen Zytokinmilieu differenzieren naive CD62L⁺ Th-Zellen (Th0) zu T_{reg}-Zellen oder Effektorzellen vom Th1-, Th2- oder Th17-Typ. Jeder Th-Subtyp zeichnet sich durch einen spezifischen Transkriptionsfaktor und eine charakteristische Sekretion von Zytokinen aus (T_{reg}: Foxp3; IL-10, TGF-β; Th1: T-bet; IFN-γ; Th2: GATA-3; IL-4, IL-5, IL-13; Th17: RORγt; IL-17, IL-21, IL-22).

spezifisch für murine T_{reg}-Zellen (FONTENOT ET AL., 2003). Im Modell der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA) führt die Depletion von CD25⁺ Zellen zur Verschlimmerung der Arthritis. Der therapeutische adoptive Transfer von CD4⁺CD25⁺ Zellen macht diesen Effekt rückgängig, ohne dass dabei die systemische T- und B-Zell-Antwort gegen Kollagen II durch die T_{reg}-Zellen gehemmt wird (MORGAN ET AL., 2003). Ähnlich

verhält es sich bei der Antigen-induzierten Arthritis (AIA), wo die experimentelle Arthritis in CD25-depletierten Tieren eine schwerere Verlaufsform hat und zum Zeitpunkt der Arthritisinduktion transferierte CD4⁺CD25⁺ Zellen eine protektive Wirkung zeigen (FREY ET AL., 2005).

Im Gegensatz zu den antiinflammatorisch wirkenden T_{reg}-Zellen haben Th17-Zellen ein bedeutendes proinflammatorisches Potential. Für die Entwicklung von Th17-Zellen ist der Transkriptionsfaktor ROR γ t („retinoic acid-related orphan receptor“) notwendig (IVANOV ET AL., 2006). Diese Zellen spielen bei der Induktion der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) eine wichtige Rolle und die Inzidenz und die Schwere der CIA ist in IL-17-defizienten Mäusen deutlich verringert (NAKAE ET AL., 2003a; LANGRISH ET AL., 2005). Neben IL-17 produzieren Th17-Zellen auch IL-21 und IL-22. Bei IL-21 handelt es sich um ein Zytokin, das für die Differenzierung der Th-17-Zellen notwendig ist und das dabei eine autokrine Wirkung

Tab. 2 Schlüsselfunktionen ausgewählter Zytokine. (+) Steigerung, (-) Hemmung.

Zytokin	Funktion
IL-4	Th2-Differenzierung (+), Th1-Differenzierung (-), APC (-), Antikörperbildung (+)
IL-5	Mastzell-Proliferation (+), Hämatopoese (+)
IL-6	Lymphozyten-Reifung (+), Akute-Phase-Reaktion (+), Th-17-Differenzierung (+)
IL-10	APC (-), proinflammatorische Zytokine (-)
IL-12	Th1-Differenzierung (+)
IL-13	Makrophagenaktivierung (-), proinflammatorische Zytokine (-), Chemokine (-)
IL-17	Aktivierung synovialer Fibroblasten (+), Osteoklastogenese (+), Chemotaxis neutrophiler Granulozyten (+)
IL-21	Th17-Differenzierung (+), Th1-Differenzierung (-)
IL-22	Akute-Phase-Reaktion (+)
IFN- γ	Makrophagenaktivierung (+), MHC-Expression (+), Th17-Differenzierung (-), Th2-Differenzierung (-)
TGF- β	Th17-Differenzierung (+), T _{reg} -Differenzierung (+), Proliferation aktivierter Lymphozyten (-)

hat (KORN ET AL., 2007; NURIEVA ET AL., 2007). Es induziert bei aktivierten oder B-Gedächtniszellen Apoptose und hemmt die Entwicklung von Th1-Zellen über die Hemmung der Expression von Eomesodermin (MEHTA ET AL., 2003; SUTO ET AL., 2006). Die physiologischen Funktionen von IL-22 sind bisher wenig aufgeklärt. Es wird durch IL-23 induziert und verstärkt in humanen Keratinocyten die Expression

antimikrobieller Peptide, wobei IL-17 synergistisch wirkt (LIANG ET AL., 2006; ZHENG ET AL., 2007).

Da bei der RA die in die Synovialmembran einwandernden bzw. daraus isolierte autoreaktive Th-Zellen hauptsächlich vom Th1-Phänotyp sind (DOLHAIN ET AL., 1996; FRITSCH ET AL., 2002), geht das vorherrschende Paradigma der RA von einem Ungleichgewicht der Th1/Th2-Balance aus, wobei die inflammatorische Th1-Antwort über die protektiv wirkende Th2-Antwort dominiert. Für Th1-Zellen sind der Transkriptionsfaktor T-bet (‘T box expressed in T cells’) und das Zytokin IFN- γ charakteristisch, während die Entwicklung der Th2-Zellen über GATA-3 (‘GATA binding protein 3’) gesteuert wird und von diesen Zellen IL-4 sezerniert wird (ZHENG & FLAVELL, 1997; SZABO ET AL., 2000). Die Rolle des Th1-Zytokins IFN- γ bei der RA und bei anderen Autoimmunerkrankungen nebst den zugehörigen Tiermodellen wurde ausgiebig untersucht, ohne dass die Funktion von IFN- γ bisher eindeutig bestimmt werden konnte (ROSLONIEC ET AL., 2002).

Die Interferone wurden als erste Zytokine 1957 von Isaacs und Lindenmann am National Institute for Medical Research in London entdeckt (ISAACS & LINDENMANN, 1957). Man unterscheidet anhand der Rezeptor-Spezifität und der Homologie der Aminosäuresequenz zwei Hauptgruppen. Interferon Typ I umfasst IFN- α , IFN- β , IFN- ω und IFN- τ , während IFN- γ das einzige Interferon vom Typ II ist. Interferone vom Typ I werden hauptsächlich von hämatopoetischen Zellen und Fibroblasten sezerniert. IFN- α und IFN- β wirken antiviral und werden für die Behandlung von Hepatitis, aber auch von Multipler Sklerose eingesetzt.

IFN- γ hingegen hat eine eher immunmodulatorische Funktion. Mit Ausnahme von Erythrozyten findet man auf nahezu allen Zelltypen Rezeptoren für IFN- γ . Der Rezeptor für IFN- γ besteht aus zwei strukturell verwandten Ketten, IFN- γ R α und IFN- γ R β . Die Bindung des ~ 17 kDa großen N-glykosilierten homodimeren Liganden an den Rezeptorkomplex aus zwei IFN- γ R α - und ein bis zwei IFN- γ R β -Ketten aktiviert den Signalweg Jak/Stat1 (Januskinase/ Signal transducer and activator of transcription 1; MARSTERS ET AL., 1995). IFN- γ stammt bei einer schnellen Reaktion der angeborenen Immunabwehr von Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), bei der adaptiven Immunantwort vorwiegend von T-Zellen. Es wird durch von aktivierten Makrophagen und DC stammendes IL-12 induziert und auch von B-Zellen produziert (CELLA ET AL., 1996; REIS E SOUSA ET AL., 1997; FLAISHON ET AL., 2000; FRUCHT ET AL.,

2001). IFN- γ bewirkt die Differenzierung von naiven Th-Zellen (Th0) in Th1-Zellen und verstärkt somit in parakriner Weise die zelluläre Immunantwort. Bei einer Haltung unter keimfreien Bedingungen zeigen IFN- γ -defiziente Mäuse keine phänotypischen Auffälligkeiten, weisen bei der Beseitigung von Keimen jedoch eine verringerte MHC-II-Expression und eine verringerte Produktion von antimikrobiellen reaktiven Sauerstoffmetaboliten und damit eine gestörte Makrophagenfunktion auf (DALTON ET AL., 1993).

Bedeutende proinflammatorische Effekte von IFN- γ sind neben der Aktivierung von Makrophagen die Induktion der Expression des MHC-II-Moleküls auf einer Reihe von Zelltypen und der Klassenwechsel zu Immunglobulin (Ig) G2a (NATHAN ET AL., 1983; SCHNEEBERGER ET AL., 1986; JAHN ET AL., 1987; FINKELMANN ET AL., 1988). Übereinstimmend mit diesen Eigenschaften wird die Proteoglykan-induzierte Arthritis (PGIA) dem Th1-Typ zugeordnet (FINNEGAN ET AL., 1999). In diesem Arthritismodell setzt die Erkrankung in IFN- γ -defizienten Tieren später ein und ist schwächer ausgeprägt als im Wildtyp (KAPLAN ET AL., 2002).

Im Gegensatz dazu zeigt IFN- γ bei der CIA sowohl anti- als auch proinflammatorische Effekte. Während KAGEYAMA ET AL. (1998) bei der F₂-Generation von IFN- γ R-defizienten (IFN- γ R^{-/-}) 129/Sv und DBA/1 Mäusen eine verringerte Häufigkeit und Schwere der CIA konstatieren, berichten VERMEIRE ET AL. (1997), dass bei IFN- γ R α ^{-/-} DBA/1 Mäusen die CIA früher einsetzt und stärker ausgeprägt ist als in Mäusen vom Wildtyp. Ein beschleunigtes Auftreten der Erkrankung ist auch beim Wildtyp zu beobachten, wenn monoklonale Antikörper gegen IFN- γ verabreicht werden. In der Arbeit von MANOURY-SCHWARTZ ET AL. (1997) wird bei IFN- γ R^{-/-} Tieren ebenfalls eine verfrüht einsetzende schwere CIA beschrieben. Die Funktionalität der durch IFN- γ induzierten Signalwege beeinflusst nicht nur das Einsetzen und die Schwere der CIA, sondern auch die Suszeptibilität dafür, eine für Zytokine ansonsten ungewöhnliche Eigenschaft. C57Bl/6 Mäuse des normalerweise nicht suszeptiblen MHC-Haplotyps H-2^b erkranken an CIA, wenn sie eine Defizienz für IFN- γ aufweisen (GUEDEZ ET AL., 2001; CHU ET AL., 2003). Wie jüngste Ergebnisse zeigen entsteht diese auf IFN- γ beruhende veränderte Suszeptibilität bei C57Bl/6 IFN- γ ^{-/-} Mäusen durch die fehlende Hemmung der IL-17-Antwort (CHU ET AL., 2007). Auch ist bei den für die CIA suszeptiblen DBA/1 Mäusen im Gegensatz zu den zu einer über IFN- γ

vermittelten Immunreaktion neigenden C57Bl/6 Mäusen eine Verschiebung zu einer IL-17-Antwort zu beobachten.

Von der EAE, dem Tiermodell der Multiplen Sklerose, ist ebenfalls ein solcher Zusammenhang von IFN- γ und Schwere der Erkrankung bzw. Suszeptibilität bekannt. Die Erkrankung läuft in IFN- $\gamma^{-/-}$ Tieren schlimmer ab und normalerweise nicht suszeptible Balb/c und C57Bl/6 Mäuse erkranken an EAE, wenn das Gen für IFN- γ bzw. IFN- γ R inaktiviert wurde (FERBER ET AL., 1996; WILLENBORG ET AL., 1999; TRAN ET AL., 2000). Im Zentralnervensystem von IFN- γ R $^{-/-}$ Mäusen zeigt sich eine verstärkte Einwanderung von neutrophilen Granulozyten, wobei die auf neutrophile Granulozyten chemotaktisch wirkenden Chemokine MIP-2 (macrophage inflammatory protein-2) und TAG-3 (T cell activation gene-3) verstärkt exprimiert werden (TRAN ET AL., 2000; ZEHNTNER ET AL., 2005). Das Unterbrechen der über IFN- γ gesteuerten Signalwege führt in diesem Mausmodell auch zu einer verringerten Zahl und eingeschränkten Funktion von CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ Foxp3 $^{+}$ T $_{reg}$ -Zellen. Werden *in vitro* CD4 $^{+}$ CD25 $^{-}$ Zellen unter Zugabe von rekombinantem murinem (rm) IFN- γ kultiviert, erlangen sie die Fähigkeit, die Proliferation von syngenen CD4 $^{+}$ CD25 $^{-}$ Zellen zu hemmen (WANG ET AL., 2006).

Ein weiterer wichtiger Mechanismus, über den IFN- γ die Immunmodulation beeinflusst, ist die Induktion von Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) bei DC. Dieses Enzym des Tryptophan-Katabolismus kontrolliert während der Schwangerschaft die maternale T-Zell-Immunität und spielt durch die Regulation der klonalen Expansion von T-Zellen über apoptotische Signale eine wichtige Rolle bei der Induktion peripherer Toleranz (MUNN ET AL., 1998; FALLARINO ET AL., 2003; GROHMANN ET AL., 2003).

2.2 Experimentelle Arthritismodelle

2.2.1 Allgemeines

Humanes Untersuchungsmaterial zur Erforschung der Pathogenesemechanismen stammt meist aus operativen Eingriffen bei einer schon fortgeschrittenen und in der Regel therapierten RA. Aufgrund der nur begrenzten Verfügbarkeit und zur Entwicklung neuer Therapien werden deshalb verschiedene tierexperimentelle Arthritismodelle genutzt. In der Literatur sind viele Modelle beschrieben, die sich in Ätiologie und verwendeter Tierart unterscheiden. Gebräuchlich ist die Verwendung

von Ratten oder Mäusen, welche neben der genetischen Homogenität und definierten Versuchsbedingungen den Vorteil großer Tierzahlen zur statistischen Absicherung der experimentellen Ergebnisse bieten. Außer bei den spontan auftretenden Arthritiden wird die experimentelle Arthritis in der Regel durch Erreger bzw. Bestandteile davon oder durch das Hervorrufen von Autoimmunreaktionen induziert. Die Vielzahl an Modellen spiegelt die Variabilität an individuellen Ausprägungsformen der humanen RA wider. Die Ergebnisse aus tierexperimentellen Untersuchungen erlauben zwar keine direkte Übertragung auf den Menschen, lassen aber Rückschlüsse auf die Mechanismen der RA zu und haben maßgeblich zur Entwicklung von Therapien, wie z. B. der Anti-TNF- α -Therapie, beigetragen.

2.2.2 Die Antigen-induzierte Arthritis

Bei der AIA handelt es sich um ein gebräuchliches Arthritismodell, welches von BRACKERTZ ET AL. 1977 (a-c) in der Maus etabliert wurde. In diesem Modell werden Mäuse vom Stamm C57Bl/6 durch zweimalige Applikation des in komplettem Freund'schen Adjuvans (CFA) emulgierten Antigens gegen methyliertes bovines Serum-Albumin (mBSA) immunisiert. Die intraartikuläre Injektion des Antigens in den Gelenkspalt des Kniegelenks löst durch die antigenspezifische Immunantwort eine monoartikuläre entzündliche Arthritis aus. Die AIA ist ein nicht-MHC-restringiertes Arthritismodell und kann auch in Mausstämmen mit anderem Haplotyp als H-2^b induziert werden. Nur wenige Mausstämme, u. a. CBA Mäuse, sind nicht suszeptibel (BRACKERTZ ET AL., 1977c). Daraus ergibt sich der nennenswerte Vorteil, dass transgene und knock-out Stämme, deren genetischer Hintergrund meist C57Bl/6 ist, in der Regel für Experimente verwendet werden können, ohne dass langwierige Rückkreuzungen notwendig sind. Weitere Vorteile dieses Modells sind die hundertprozentige Inzidenz der monoartikulären Arthritis und der bestimmbare Zeitpunkt des Beginns der Erkrankung. Durch die erneute Gabe von Antigen lassen sich in diesem Modell Flare-up-Reaktionen erzeugen, die den akuten Entzündungsschüben der RA ähneln.

Im gesunden Gelenk (Abb. 5A) kleiden ein bis zwei Lagen von Fibroblasten die Gelenkinnenhaut aus. Bei der AIA führt die durch das Antigen hervorgerufene akute Entzündungsreaktion zu einer Einwanderung von Immunzellen in das Gelenk und in das periartikuläre Gewebe. Es kommt zur Aktivierung und verstärkten Proliferation der synovialen Fibroblasten, die als synoviale Hyperplasie bezeichnet wird (Abb. 5B).

Dabei verschiebt sich die vorwiegend polymorphonukleäre Infiltration (neutrophile Granulozyten) zu Beginn der akuten Phase zunehmend in Richtung einer mononukleären Zusammensetzung (Makrophagen, Lymphozyten). Mit zunehmender Chronifizierung der Arthritis kommt es zur vermehrten Nekrose von Chondrozyten und zunehmendem Abbau von Knorpel- und subchondraler Knochensubstanz durch Matrixmetallo-, Cystein- und Serinproteasen (Abb. 5C). Durch den Abbau von

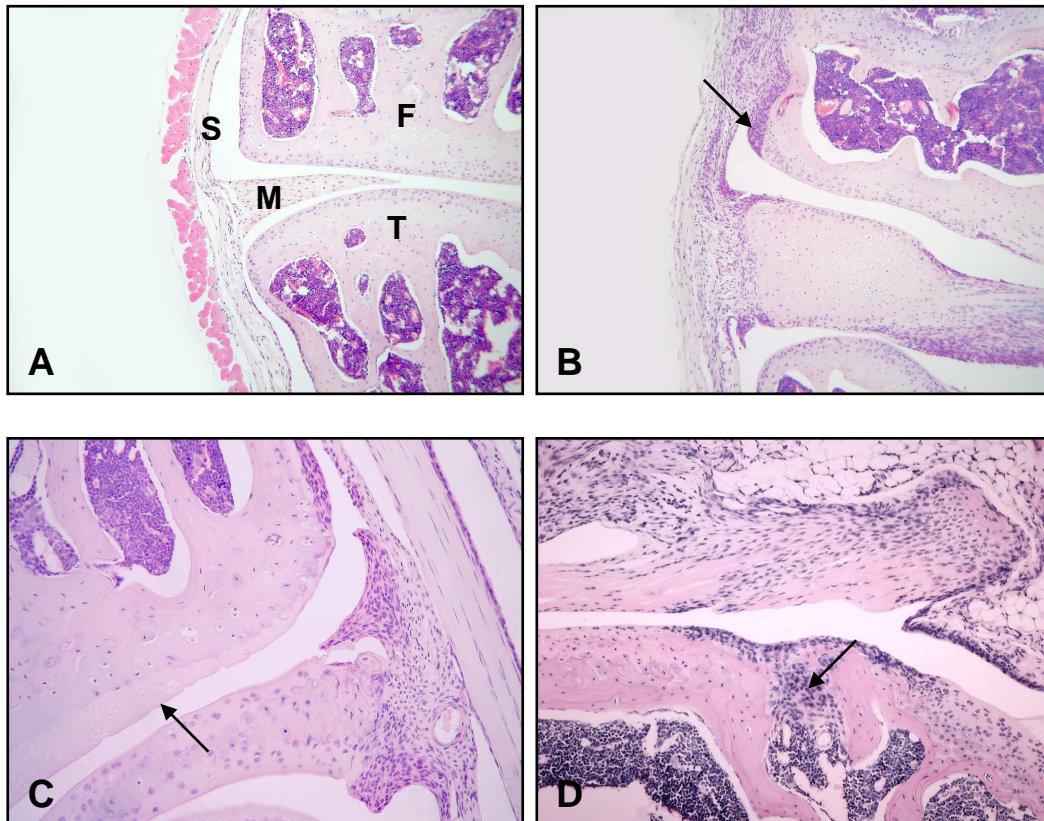


Abb. 5 Histologie der AIA. (A) Schnitt eines normalen Kniegelenks; S, Synovialmembran; F, Femur; T, Tibia; M, Meniskus. (B) Synoviale Hyperplasie nach Auslösen der AIA. HE-Färbung, 25-fach. (C) Nekrose der Chondrozyten und Abbau des Knorpels bei der chronischen AIA. (D) Einwachsen von Pannusgewebe in den Knochen. HE-Färbung, 40-fache Vergrößerung.

Kollagenen und Proteoglykanen wird die Knorpelsubstanz irreversibel geschädigt und von der Synovialis ausgehend wächst Pannusgewebe in die Knorpelmatrix ein (Abb. 5D). Die Hyperplasie der Synovialmembran, die zelluläre Infiltration von neutrophilen Granulozyten, Makrophagen, Lymphozyten und DC sowie die Pannusbildung und der Abbau von Knorpel und Knochen bei der AIA entsprechen dem histologischen Bild der humanen RA. Neben diesen histopathologischen Eigenschaften zeigen sich auch bei der Wirksamkeit von Therapien und bei der

Bedeutung von CD4⁺ Zellen für die Aufrechterhaltung der Arthritis Übereinstimmungen mit der RA. Die Immunreaktion auf das Antigen und somit die Entstehung der AIA lässt sich durch den Transfer von Milz- oder Lymphknoten-Zellen in immundefiziente Rezipienten übertragen. Werden dabei CD4⁺ Zellen entfernt, gelingt dies nicht mehr. Die Depletion von CD8⁺ Zellen hat keinen Effekt (PETROW ET AL., 1996). Die Behandlung der AIA mit monoklonalen Antikörpern (mAb) gegen CD4 verringert die entzündliche Gelenkschwellung, die Makrophagen-Aktivierung und die Gelenkdestruktion (POHLERS ET AL., 2004). In den Gelenkextrakten von Mäusen mit AIA finden sich erhöhte Level von IL-1 β , IL-6 und TNF- α (SIMON ET AL., 2001).

2.2.3 Weitere Arthritismodelle

Das Modell der **Kollagen-induzierten Arthritis** bei Mäusen wurde 1980 von COURTENAY ET AL. zum ersten Mal beschrieben. Es handelt sich um das in der Literatur am häufigsten beschriebene Arthritismodell. Hierzu werden Mäuse unter Verwendung von komplettem bzw. inkomplettem Freund'schen Adjuvans gegen bovines Kollagen vom Typ II immunisiert. Dies ruft eine gegen das Kollagen II des hyalinen Gelenkknorpels gerichtete humorale und zelluläre Immunantwort hervor, wobei die Suszeptibilität auf Mausstämmen mit H-2^q und H-2^r Haplotyp des MHC-Komplexes beschränkt ist. Zwei bis drei Wochen nach der Immunisierung kommt es in den distalen Gelenken der Vorder- und Hinterextremitäten zu einer Schwellung und Rötung, dabei kann die Entzündung bilateral auftreten oder auf eine Körperseite beschränkt bleiben. Histologisch zeigt sich eine Infiltration von polymorphonukleären neutrophilen Granulozyten und mononukleären Entzündungszellen.

Auch bei der **Proteoglykan-induzierten Arthritis** werden suszeptible Balb/c-Mäuse gegen einen Knorpelbestandteil, in diesem Fall humanes Proteoglykan (PG), immunisiert und entwickeln eine Arthritis, deren Einsetzen durch die Produktion von Autoantikörpern gegen murines PG beschleunigt wird (GLANT ET AL., 1987; GLANT ET AL., 1998; KAPLAN ET AL., 2002).

Die **Streptokokken-Zellwand-Arthritis** verdeutlicht, dass ein systemischer Kontakt mit Keimen zum Entstehen einer Arthritis in den Gelenken führen kann. Zellwandbestandteile von *Streptococcus pyogenes* werden intraperitoneal (i. p.) verabreicht und induzieren eine Polyarthrit, ohne dass die Verwendung eines Adjuvans notwendig ist (CROMARTIE ET AL., 1977).

Die spontan auftretende und mit extraartikulären Manifestationen assoziierte **SKG-Arthritis** beruht auf einer Punktmutation des ZAP-70-Proteins („Zeta-associated protein“). Durch die Mutation verändert sich das Signal des TCR dahingehend, dass autoreaktive T-Zellen, die normalerweise bei der negativen Selektion im Thymus eliminiert werden, positiv selektiert werden und in die Peripherie des Organismus gelangen können. Die Aufhebung der Selbsttoleranz von T-Lymphozyten gegenüber körpereigenen Antigenen führt zur Entstehung einer spontanen Arthritis (SAKAGUCHI ET AL., 2003). Neben den autoreaktiven T-Zellen spielen wie bei der RA die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α eine wichtige Rolle (HATA ET AL., 2004). Interessanterweise ist bei diesem Modell ein Kontakt der Tiere mit Keimen und die damit verbundene Aktivierung der angeborenen Immunantwort als Stimulus für die autoreaktiven T-Zellen notwendig, unter keimfreien Bedingungen tritt die Arthritis nicht auf (YOSHITOMI ET AL., 2005).

Bei der **KBxN-Arthritis** (KOUSKOFF ET AL., 1996) ist der T-Zell-Rezeptor einer F₁-Kreuzung von transgenen KRN-TCR- und NOD-Mäusen mit I-A^{g7} MHC-II spezifisch für das ubiquitär vorkommende Antigen GPI (Glukose-6-Phosphat-Isomerase). Dies führt zur Bildung von Antikörpern gegen GPI und zu einer Autoimmunreaktion, die sich aus noch nicht geklärten Gründen drei Wochen nach der Geburt im Gelenk spontan als entzündliche Arthritis manifestiert. Ein Transfer von 100 μ l Serum aus arthritischen Tieren ermöglicht die Übertragung der Arthritis. Komplementfaktoren und Fc γ -Rezeptoren spielen bei der Pathogenese in diesem Modell eine wichtige Rolle.

Die **GPI-Arthritis** ist in Bezug auf das verwendete Antigen von der KBxN-Arthritis abgeleitet. Mäuse vom Stamm DBA/1 werden gegen GPI immunisiert und entwickeln nach 9-10 Tagen eine entzündliche Arthritis (SCHUBERT ET AL., 2004). Die Arthritis erreicht ihren Höhepunkt ungefähr an Tag 15 und nimmt danach langsam ab. Histologisch geht die Synovitis zur Destruktion von Knorpel und Knochen über, wobei T-Zellen in der Induktions- und in der Effektorphase eine wichtige Rolle spielen. Die Übertragung durch Antikörper-Transfer ist nicht möglich.

Ein Beispiel für **transgene Arthritiden** sind genetisch veränderte Mäuse, die humanes TNF- α exprimieren und spontan eine Arthritis entwickeln. Das Entstehen der Arthritis lässt sich durch eine Behandlung mit gegen humanes TNF- α gerichteten monoklonalen Antikörpern verhindern (KEFFER ET AL., 1991). In diesem

Modell scheinen T- und B-Zellen bei der Pathogenese eine untergeordnete Rolle zu spielen, während bei Synovialzellen neben der Expression von humanem TNF- α die Expression von murinem IL-1 β und IL-6 erhöht ist. DBA/1 Mäuse sind gegenüber einem anderen genetischen Hintergrund, z. B. CBA oder C57Bl/6 stärker von der Arthritis betroffen (BUTLER ET AL., 1997).

2.3 Ziel der Arbeit

Trotz intensiver Forschung ist es aufgrund der Komplexität und Vielfalt der durch IFN- γ vermittelten Pathogenesemechanismen, aber auch aufgrund der teils widersprüchlichen tierexperimentellen Befunde nicht möglich, eine Aussage zur Bedeutung und Wirkung dieses für Th1-Zellen charakteristischen Zytokins bei Autoimmunerkrankungen, insbesondere der RA, zu machen.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung der Rolle von IFN- γ im Modell der Antigen-induzierten Arthritis. Dazu wurde die Schwere der Arthritis in IFN- γ -defizienten Mäusen anhand von klinischen und immunologischen Parametern charakterisiert. Weiterhin wurden Zelltransfers mit *in vitro* generierten oder *ex vivo* isolierten Th-Zellen durchgeführt. Zur Modulation der AIA wurden rekombinante Zytokine appliziert oder die Wirkung von Zytokinen durch die Neutralisation mit monoklonalen Antikörpern aufgehoben.

Die Untersuchungen sollten die Beantwortung der folgenden Fragestellungen ermöglichen:

1. Sind durch IFN- γ initiierte oder beeinflusste Pathogenesemechanismen notwendig für die Entstehung der AIA?
2. Welche Rolle spielt IFN- γ bei der AIA?
3. Über welche Mechanismen werden die Effektorfunktionen von IFN- γ gesteuert?
4. Stellen Th1-Zellen dem Th1/Th2-Paradigma entsprechend einen Ansatzpunkt für eine Therapie der RA dar?

3 Material & Methoden

3.1 Material

3.1.1 Mausstämme

In der vorliegenden Arbeit wurden für die tierexperimentellen Untersuchungen die folgenden Mausstämme mit dem genetischen Hintergrund C57Bl/6 verwendet:

Wildtyp	
IFN-γ^{-/-}	inaktiviertes Gen für IFN- γ
IL-17^{-/-}	inaktiviertes Gen für IL-17
OT-II	transgener TCR für OVA ₃₂₃₋₃₃₉

Die Stämme Wildtyp (1921 von C. C. Little entwickelt), IFN- γ ^{-/-} (DALTON ET AL., 1993) und IL-17^{-/-} (NAKAE ET AL., 2002) wurden am Institut für Versuchstierkunde der FSU Jena frei von spezifischen Keimen (SPF) gezüchtet. Die Tiere für die Zucht von IFN- γ ^{-/-} Mäusen stammen von Prof. Dr. Edgar Schmitt (Johannes Gutenberg-Universität, Mainz) und die Tiere für die Zucht von IL-17^{-/-} Mäusen von Prof. Dr. Gottfried Alber (Universität Leipzig) bzw. von Prof. Dr. Yoichiro Iwakura (University of Tokyo, Japan). Die OT-II Tiere (BARNDEN ET AL., 1998) kamen aus der Versuchstierzucht des Bundesinstituts für Risikobewertung in Berlin-Marienfelde.

Die Haltung der Tiere während der Experimente erfolgte in der Einrichtung für Tierhaltung am Institut für Pathologie unter standardisierten Bedingungen (24 °C, 12-stündiger Hell-/Dunkel-Rhythmus, Altromi n-Standard-Pellets für Nager, Wasser *ad libitum*). Die Tierversuche und das Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen waren durch das Thüringer Landesverwaltungsamt genehmigt.

3.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Geräte	Hersteller
Absorptionsmessgerät Sunrise™	Tecan, Crailsheim
Brutschrank Cellstar	Nunc, Wiesbaden
Durchflusszytometer FacsCalibur™	Becton Dickinson, Heidelberg
Elektrophorese-Einheit	Biorad, München

Fuchs-Rosenthal-Zählkammer	Fein-Optik, Bad Blankenburg
Gamma-Counter	Wallac, Turku, Finnland
Inverses Mikroskop Televal 3	Carl Zeiss Jena, Jena
Kühlzentrifuge CR 312	Jouan, Unterhaching
Laminar Flow-Box	Elektromat, Dresden
Magnetic Particle Concentrator	Dynal Biotech, Hamburg
MidiMACS [®] -Separationseinheit	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Mikro-Dismembrator	Braun, Melsungen
Mikro-Dismembrator Polytron PT 1200	Kinematica, Littau
Mikroskop Jenamed	Carl Zeiss Jena, Jena
Mikrotiterplattenwaschgerät Colombus Pro [™]	Tecan, Crailsheim
pH-Meter	Hanna Instruments, Karlsruhe
Präparationsbesteck	Aeskulap, Tuttlingen
Schnelltaster Oditest	Kroeplin, Schlüchtern
Szintillationszähler TopCount	Perkin-Elmer, Rodgau-Jügesheim
Tischzentrifuge 30F	Hettich, Tuttlingen
Vortexgerät VFZ	IKA-Labortechnik, Crailsheim
Wasserbad Thermostat	Julabo, Seelbach
Zellharvester Unifilter-96	Perkin-Elmer, Rodgau-Jügesheim

Verbrauchsmaterialien

Hersteller

Einmalfilter (0,2 und 0,45 µm)	Schleicher & Schüll, Dassel
Einmalkanülen (diverse Größen/Längen)	Braun, Melsungen
Einmalspitzen (10, 100 und 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Einmalspritzen (5 und 10 ml)	Braun, Melsungen
Einmalstangenpipetten (2 bis 25 ml)	Greiner, Frickenhausen
ELISA-Mikrotiterplatten, hochbindend	Greiner, Frickenhausen
ELISA-Mikrotiterplatten, Maxisorb	Nunc, Wiesbaden
FACS-Röhrchen	BD Falcon, Gräfeling-Locharn
Gewebekulturplatten (6-, 24- und 96-Well)	Greiner, Frickenhausen
Petrischalen (100/20 mm)	Greiner, Frickenhausen
Polystyrolröhrchen 14 ml	Greiner, Frickenhausen
Polypropylenröhrchen 50 ml	Greiner, Frickenhausen
Präseparationsfilter	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Reagiergefäße (0,5 und 1,5 ml)	Sarstedt, Nürnberg

Separationssäulen (LS/MS)
Zellsieb

Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
BD Falcon, Gräfeling-Locham

3.1.3 Reagenzien, Puffer und Kulturmedien

Reagenzien	Hersteller
AlCl_3	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
CaCl_2	Sigma-Aldrich, Steinheim
CH_3COOH	Merck, Darmstadt
CH_3OH	Sigma-Aldrich, Steinheim
Coomassie Blau	Serva, Heidelberg
<i>Bordetella pertussis</i> , hitzeinaktiviert	Chiron-Behring, Marburg
Bovines Serum-Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ether	Roth, Karlsruhe
Fast Green	Sigma-Aldrich, Steinheim
Fetales Kälberserum (FCS)	Invitrogen, Karlsruhe
Glycerol	Merck, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
HCl	Roth, Karlsruhe
HCOOH	Sigma-Aldrich, Steinheim
Heparin (Liquemin N20000)	Roche, Grenzach-Wyhlen
HEPES-Puffer	Sigma-Aldrich, Steinheim
H_2O_2	Roth, Karlsruhe
[^3H]-Thymidin	Amersham-Buchler, Braunschweig
Komplettes Freund'sches Adjuvans	Sigma-Aldrich, Steinheim
2-Mercapto-Ethanol	Invitrogen, Karlsruhe
Methyliertes Bovines Serum-Albumin	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (H37RA)	Becton Dickinson, Heidelberg
NaCl	Sigma-Aldrich, Steinheim
Na_2CO_3	Roth, Karlsruhe
NaHCO_3	Merck, Darmstadt
Na_2HPO_2	Sigma-Aldrich, Steinheim
NaN_3	Sigma-Aldrich, Steinheim

NaOH	Sigma-Aldrich, Steinheim
NH ₄ Cl	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ortho-Phenylendiamin (OPD)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Para-Nitrophenylphosphat (pNPP)	Serva, Heidelberg
Penicillin/Streptomycin/Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
Physiologische Kochsalzlösung	Braun, Melsungen
RPMI 1640 Medium	Invitrogen, Karlsruhe
Safranin O	Serva, Heidelberg
SDS	Serva, Heidelberg
Streptavidin-Peroxidase	Dianova, Hamburg
Szintillationscocktail Microscint O	Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim
TRIS	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tween 20	Sigma-Aldrich, Steinheim
Zitronensäure	Sigma-Aldrich, Steinheim

Puffer

ELISA:

Natriumcarbonatpuffer, pH 9,5

0,84 g NaHCO₃ je 100 ml Aqua dest.

Natriumphosphatpuffer, pH 6,5

1,48 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O + 1,85 g NaH₂PO₄ x H₂O je 100 ml Aqua dest.

Natriumphosphatpuffer, pH 9,0

1,38 g NaH₂PO₄ x H₂O je 100 ml Aqua dest.

Substratlösung für alkalische Phosphatase

3,13 mg/ml pNPP in Substratpuffer

Substratpuffer

0,2 mg/ml MgCl₂ x 6 H₂O in 1:1 TRIS Stammlösung und Aqua dest.

Stopplösung für alkalische Phosphatase

5,3 g Na₂CO₃ je 100 ml Aqua dest.

Substratlösung für Peroxidase

2 mg/ml OPD in Zitratpuffer mit 20 µl/ml 3 % H₂O₂

Zitratpuffer, pH 4,8

2,1 g Zitronensäure + 16,2 ml 1 N NaOH je 84 ml Aqua dest.

*Stopplösung für Peroxidase*2 N H₂SO₄*Waschpuffer*

0,05 % Tween 20 in PBS

Zymographie:*Coomassie-Blau-Lösung:*50 % CH₃OH + 10 % CH₃COOH + 0,25 % Coomassie Blau in Aqua dest.*Entfärbelösung*25 % CH₃OH + 7 % CH₃COOH in Aqua dest.*Elektrophoresepuffer, pH 8,3*

25 mM TRIS-HCl + 0,1 % SDS + 192 mM Glycin

*Inkubationspuffer, pH 7,8*100 mM TRIS-HCl + 30 mM CaCl₂ + 0,02 % NaN₃ in Aqua dest.*Probenpuffer, pH 6,8*1,5 M TRIS-HCl + 10 % Glycerol + 2 % SDS + 5 % Bromphenolblau
+ 0,02 % NaN₃**Sonstige:***Ammoniumchlorid/TRIS, pH 7,2*

- a) 0,83 % NH₄Cl (7,47 g je 900 ml H₂O)
- b) TRIS (2,059 g je 100 ml H₂O), pH 7,65
- a) und b) im Verhältnis 9:1 mischen

*FACS-Puffer*PBS mit 0,5 % BSA + 0,1 % NaN₃ in PBS*MACS-Puffer*

0,5 % BSA + 2 mM EDTA in PBS

Kulturmedium*RPMI 1640, supplementiert mit*

10 %	FCS	0,1 µg/ml	Streptomycin
10 mM	HEPES	2 mM	L-Glutamin
1 mM	Na-Pyruvat	0,05 mM	2-Mercapto-Etahnol
100 U/ml	Penicillin		

Weitere Reagenzien und die verwendeten Antikörper werden im folgenden Kapitel bei der Beschreibung der jeweiligen Methoden aufgeführt.

3.2 Methoden

3.2.1 Das Modell der Antigen-induzierten Arthritis

Im Modell der AIA werden 6-8 Wochen alte weibliche C57Bl/6 Mäuse 21 und 14 Tage vor Auslösen der Arthritis gegen mBSA als Antigen immunisiert. Dazu werden 100 µg mBSA in 50 µl physiologischer Kochsalzlösung (0,9 % NaCl) gelöst, in 50 µl CFA (supplementiert auf 2 mg/ml *Mycobacterium tuberculosis*) emulgiert und der Maus lateral bzw. bei der zweiten Immunisierung dorsal an der Schwanzwurzel subkutan (s. c.) injiziert. Um die Wirkung der Immunisierung zu verstärken, werden jeweils 5×10^8 hitzeinaktivierte *Bordetella pertussis*-Keime als Adjuvans i. p. verabreicht. Das Auslösen der Arthritis an Tag 0 (d0) erfolgt durch die intraartikuläre (i. a.) Gabe von 100 µg mBSA in 25 µl Saline ins rechte Kniegelenk.

Dies führt zur Entstehung einer akuten Synovitis, die im weiteren Verlauf mit dem Abbau von Knorpel und Knochen einhergeht. Das linke Kniegelenk bleibt unbehandelt und dient als Kontrolle. Wie anfängliche Experimente zeigten, bewirkt die Applikation von physiologischer Kochsalzlösung ohne Antigen keinen entzündlichen oder sonstigen Effekt und wurde deshalb nicht weiter vorgenommen. Zum Hervorrufen eines erneuten akuten Entzündungsschubs („Flare-up“) wurden drei Wochen nach Auslösen der AIA i. a. 25 µg mBSA in 25 µl physiologischer Kochsalzlösung appliziert. Das Abtöten der Mäuse zur Gewinnung von Serum bzw. der Entnahme von Lymphknoten, Milzen und Kniegelenken erfolgte nach Narkotisierung der Tiere mit Ether durch Durchtrennen der *Arteria carotis communis* und Ausbluten mit anschließender cervikaler Dislokation.

3.2.2 Klinische Bewertung der Arthritis

Der Durchmesser des rechten und des linken Kniegelenks wurde nach Auslösen der Arthritis an betäubten Tieren zu definierten Zeitpunkten (Tag 1, 3, 5, 7, 9, 12) mittels eines Schnelltasters gemessen (Abb. 6). Die Schwellung als Maß für die Stärke der Entzündungsreaktion wird aus der Differenz zwischen dem Durchmesser des arthritischen rechten und des gesunden linken Knies berechnet.



Abb. 6 Gelenkschwellung. Messung des Durchmessers des Kniegelenks.

Tab. 3 Histologisches Bewertungsschema. Skala für die Bewertung der Schwere der Arthritis in Kniegelenkschnitten anhand der Parameter für akute Entzündung, chronische Entzündung und Knorpel- und Knochendestruktion.

Akute Entzündung

Exsudat

- 1 einzelne Granulozyten
- 2 fleckförmiges Granulozytenexsudat
- 3 massiv

Granulozytäre Infiltration der Synovialmembran

- 1 einzelne Granulozyten
- 2 kleinherdig oder diffus mäßig
- 3 mittelgradig bis dicht

+1 wenn Fibrin deutlich nachweisbar

+1 wenn periartikuläres Gewebe mit betroffen

Chronische Entzündung

Synoviale Hyperplasie (= Hyperplasie der Deckzellschicht)

- 1 geringe Hyperplasie, keine Aktivierung der lining cells
oder keine Hyperplasie, Aktivierung von > 50 % der lining cells
- 2 > fleckförmige Hyperplasie, mit Aktivierung der lining cells
- 3 deutliche Hyperplasie

Mononukleäre Infiltration der Synovialmembran

- 0,5 herdförmig schütter
- 1 überwiegend schütter
- 1,5 überwiegend schütter, herdförmig mäßig
- 2 überwiegend mäßig
- 2,5 überwiegend mäßig, herdförmig dicht
- 3 überwiegend dicht

Periartikuläre Strukturen (Fibrose, Infiltration)

- 1 geringe Fibrose/Infiltrat
- 2 mässige Fibrose/Infiltrat
- 3 stark fibrös verbreitert/dichte entzündliche Infiltration

Destruktion Knorpel/Knochen

- 1 min. Gewebsdefekt oder eine Gruppennekrose von Chondrozyten
- 2 >1 kleiner Defekt oder flächenhafte Chondrozytennekrosen
oder multiple Gruppennekrosen
- 3 größere Defekte (>10 %) einer Gelenkfläche
- 4 massiver Defekt (>50 %) einer Gelenkfläche oder mehrere
große Defekte

Die Verzögerte Überempfindlichkeitsreaktion (DTH) als weiterer klinischer Parameter zur Bestimmung der Stärke der Immunreaktivität wurde durch intradermale Gabe einer geringen Menge Antigen (5 µg mBSA in 10 µl 0,9 % NaCl) in das Ohr an Tag 7 (d7) hervorgerufen. An den beiden darauf folgenden Tagen wurde der Durchmesser des Ohrs gemessen und die Ohrschwellung infolge der DTH-Reaktion prozentual als Mittelwert aus der Schwellung nach 24 und 48 h berechnet.

Zur histologischen Untersuchung wurden die Kniegelenke entnommen und *in toto* in 4,5 % Formalin für 24 h bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurden die Gelenke in Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) oder AlCl_3 entkalkt und nach Entwässerung in einer aufsteigenden Alkohohlreihe und Überführung in Xylol in Paraffin eingebettet. Serielle frontale Schnitte (3 µm; 3-4 je Tier) wurden zur Darstellung der basophilen Zellkerne und des azidophilen Zytoplasmas mit Hämatoxylin (blau) und Eosin (rot) gefärbt (HE; siehe Kapitel 2.2.2, Abb. 5). Der Verlust an Proteoglykanen in den oberflächlichen Schichten des Knorpelgewebes im Rahmen der Knorpeldestruktion wurde durch die kationische Färbung mit Safranin O untersucht. Dazu wurden die Paraffinschnitte entparaffiniert und über eine absteigende Alkoholreihe in Wasser überführt. Es folgte eine Kernfärbung mit Hämatoxylin, die Anfärbung der Proteoglykane mit Safranin O und die Bindegewebsdarstellung mit Fast Green. Anschließend wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkohohlreihe entwässert und nach Überführung in Xylol wieder eingebettet.

Die Beurteilung der Schwere der Arthritis erfolgte durch Pathologen, denen die Zugehörigkeit zu den jeweiligen Versuchsgruppen nicht bekannt war. Anhand einer von 0-3 reichenden makroskopischen Bewertungsskala für akute und chronische Entzündungsparameter im synovialen und periartikulären Gewebe und für Knorpel- und Knochendestruktion wurde die Ausprägung der Arthritis bewertet (Tab. 3).

In der grafischen Darstellung des Arthritis-Scores wurden Exsudat und granulozytäre Infiltration als akute Entzündung zusammengefasst, während die chronische Entzündung für synoviale Hyperplasie, Fibrose und mononukleäre Zellinfiltration steht. Die Werte für akute und chronische Entzündung im Gelenk und periartikulären Gewebe wurden jeweils zusammengezählt, ebenso wurden die Destruktion des Knorpels und die Destruktion des Knochens zusammengefasst. Der Gesamt-Arthritis-Score stellt die Summe aller Parameter dar.

3.2.3 Immunhistochemische Untersuchungen

Zur Untersuchung der Zusammensetzung des zellulären Infiltrats wurden an Tag 1 Kniegelenke aus IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäusen und Wildtyp entnommen und in flüssigem Stickstoff bei -196 °C schockgefroren. Die davon angefertigten Gefrierschnitte wurden in Aceton fixiert und unspezifische Bindungsstellen mit 4 % Milch in TRIS-Puffer blockiert. Dann erfolgte für 1 h bei 22 °C die Inkubation mit 10 μ g/ml monoklonalen Ratte anti-Maus Primär-Antikörpern (Tab. 4), gefolgt von der Inkubation mit biotinyliertem Ziege anti-Ratte IgG Sekundär-Antikörper (DakoCytomation, Hamburg) und anschließender Inkubation mit Streptavidin-gekoppelter Peroxidase. Zur Fixierung des Gewebes wurde 1 % Formalin, für das Waschen der Objektträger

Tab. 4 Antikörper Immunhistochemie. Zur Bestimmung der Zusammensetzung des zellulären Infiltrats verwendete primäre Ratte anti-Maus Antikörper.

<i>Antigen</i>	<i>Zelltypen</i>	<i>Klon</i>	<i>Hersteller</i>
Mac-1	Makrophagen und neutrophile Granulozyten	M1/70.15	Medac, Hamburg
F4/80	Makrophagen	Cl:A3-1	Serotec, Düsseldorf
Gr-1	Neutrophile Granulozyten	RB6-8C5	BD Pharmingen, Heidelberg
CD4	T-Helfer-Zellen	CT-CD4	Medac, Hamburg
B220	B-Zellen	RA3-6B2	Medac, Hamburg

zwischen den einzelnen Schritten TRIS-Puffer benutzt. Die Aktivität endogener Peroxidase wurde mit 0,3 % H₂O₂ in 0,1 M NaN₃ verhindert. Das Entwickeln der immunhistochemischen Färbungen erfolgte mit Diaminobenzidin (Sigma-Aldrich, Steinheim) in 0,03 % H₂O₂ als Substrat für die Farbreaktion der Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Komplexe. Zum Gegenfärben wurde Mayer's Hämatoxylin verwendet.

3.2.4 Nachweis von Zytokinen

Kulturüberstände („Enzyme-linked immunosorbent assay“; ELISA): Zum Herstellen einer Einzelzell-Suspension wurden den Mäusen Lymphknoten (inguinal, popliteal, subaortal) und Milzen steril entnommen. Die Organe wurden in supplementiertes RPMI 1640 überführt, mit Pinzetten zerkleinert und anschließend mit Spritzenstempel durch ein Zellsieb gedrückt. Nach Waschen der Zellen mit 37 °C warmem Kulturmedium zur Beseitigung von Fettgewebe und Zelltrümmern wurden

vorhandene Erythrozyten durch Zugabe von 3-4 ml mindestens 22 °C warmer Ammoniumchlorid/TRIS-Lösung lysiert. Das Abzentrifugieren erfolgte bei 1200 Umdrehungen/min für 6 min. Nach Bestimmen der Gesamtzellzahl mit Trypanblau (1:10 in PBS) und Fuchs-Rosenthal-Zählkammern wurden die Zellen auf 1×10^6 /ml eingestellt und in 24-Well-Platten à 1 ml eingesät. Zur Bestimmung von nach Antigen- und TCR-Stimulation gebildeten Zytokinen wurden 25 µg/ml mBSA hinzugegeben bzw. die Wells vorher mit 2 mg anti-CD3-Antikörpern (1452CII; Hybridomüberstand) beschichtet. Die Kultur erfolgte im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂. Nach 42 h wurden die Überstände geerntet, zum Entfernen der Zellen abzentrifugiert und bei -70 °C aufbewahrt.

Der Gehalt an Zytokinen wurde mittels Sandwich-ELISA gemessen. Dieses Verfahren erlaubt das Bestimmen der Proteinmenge in einer Probe und basiert auf zwei spezifischen Antikörpern für das Protein, welche unterschiedliche Bindungsstellen besitzen und von denen einer direkt oder indirekt mit einem Enzym gekoppelt wird. Die Zugabe eines Substrats führt zu einer enzymatischen Farbreaktion, die dabei gemessene Extinktion entspricht der Menge an gebundenem Protein. Dazu wurden 96-Well-Platten über Nacht bei 4 °C mit Primär-Antikörpern (50 µl/Well) gegen IFN-γ, TNF-α, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 oder IL-17 entsprechend der in Tab. 5 aufgeführten Konzentrationen und in Beladungspuffern mit dem entsprechenden pH-Wert beschichtet. Anschließend wurde mit 300 µl/Well

2 % BSA in PBS zum Blockieren potentieller unspezifischer Bindungsstellen für den Sekundär-Antikörper beladen. Für das Waschen der Mikrotiter-Platten zwischen den einzelnen Schritten wurde als Waschpuffer 0,05 % Tween 20 in PBS verwendet. Von den Proben und Standards wurden in Doppelbestimmung pro Well 50 µl aufgetragen und die Platten erneut über Nacht bei 8 °C aufbewahrt.

Im nächsten Schritt wurden gemäß Tab. 5 die biotinylierten Sekundär-Antikörper in PBS mit 1 % BSA und 0,05 % Tween 20 aufgetragen (100 µl/Well). Nach 1-2 h bei

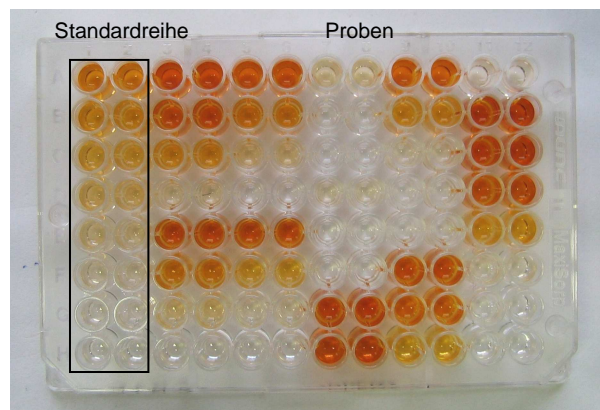


Abb. 7 ELISA. Beispiel einer entwickelten 96-Well-ELISA-Mikrotiterplatte. Die beiden linken Reihen enthalten die Standardreihe zur Berechnung der Zytokin-Konzentration der doppelt aufgetragenen Proben.

Tab. 5 Antikörper für ELISA. Zur Bestimmung der Zytokine verwendete Primär- und Sekundär-Antikörper und zugehörige Puffer.

Zytokin	Klon	Konzentration	Markierung	Beladungspuffer	Hersteller
IFN- γ	R4-6A2	2 $\mu\text{g/ml}$	ohne	Na-Phos., pH 9,0	BD Pharmingen
	XMG1.2	0,5 $\mu\text{g/ml}$	Biotin	-	BD Pharmingen
TNF- α	G281-2626	6 $\mu\text{g/ml}$	ohne	Na-Phos., pH 6,0	BD Pharmingen
	MP6-XT3	0,5 $\mu\text{g/ml}$	Biotin	-	BD Pharmingen
IL-1 β	MAB401	2 $\mu\text{g/ml}$	ohne	NaHCO ₃ , pH 9,5	R&D Systems
	BAF401	0,5 $\mu\text{g/ml}$	Biotin	-	R&D Systems
IL-2	JES6-1A12	1 $\mu\text{g/ml}$	ohne	Na-Phos., pH 9,0	BD Pharmingen
	JES6-5H4	0,5 $\mu\text{g/ml}$	Biotin	-	BD Pharmingen
IL-4	BVD4-1D11	1 $\mu\text{g/ml}$	ohne	NaHCO ₃ , pH 9,5	BD Pharmingen
	BVD6-24G2	0,1 $\mu\text{g/ml}$	Biotin	-	BD Pharmingen
IL-5	TRFK5	2 $\mu\text{g/ml}$	ohne	NaHCO ₃ , pH 9,5	BD Pharmingen
	TRFK4	0,25 ng/ml	Biotin	-	BD Pharmingen
IL-6	MP5-20F3	2 $\mu\text{g/ml}$	ohne	NaHCO ₃ , pH 9,5	BD Pharmingen
	MP5-32C11	0,25 ng/ml	Biotin	-	BD Pharmingen
IL-10	JES5-2A5	2 $\mu\text{g/ml}$	ohne	Na-Phos., pH 6,0	BD Pharmingen
	SXC-1	1 $\mu\text{g/ml}$	Biotin	-	BD Pharmingen
IL-17	MAB721	2 $\mu\text{g/ml}$	ohne	PBS	R&D Systems
	BAF421	100 ng/ml	Biotin	-	R&D Systems

Raumtemperatur wurden 100 μl /Well Streptavidin-Peroxidase (2 μl /Platte in PBS mit 1 % BSA und 0,05 % Tween 20) für 40 min bei Raumtemperatur zugegeben. Zum

Tab. 6 Standard Zytokine. Zur Zytokin-Bestimmung verwendete Standards aus rekombinanten Zytokinen.

Zytokin	max. Standard-Konzentration	Hersteller
IFN- γ	5000 pg/ml	Invitrogen
TNF- α	2500 pg/ml	BD Pharmingen
IL-1 β	1000 pg/ml	R&D Systems
IL-2	2000 pg/ml	BD Pharmingen
IL-4	10 000 pg/ml	Tebu
IL-5	5000 pg/ml	BD Pharmingen
IL-6	5000 pg/ml	Tebu
IL-10	2000 pg/ml	BD Pharmingen
IL-17	10 000 pg/ml	R&D Systems

Entwickeln wurden pro Well 100 μl Substratpuffer zugegeben und die enzymatische Reaktion der Peroxidase (PO) mit H₂SO₄ gestoppt (Abb. 7). Anschließend wurde die Extinktion mit einem Absorptionsmessgerät Sunrise™ bei 492 nm und einer Referenz von 620 nm gemessen. Anhand einer Regressionsgleichung der Extinktionswerte und Konzentrationen der Standardreihe aus rekombinantem Zytokin (Tab. 6) wurde der Zytokingehalt der Proben

in einem Bereich von 0 pg/ml bis zur maximalen Standardkonzentration berechnet.

Serum (ProteoPlex[®] 16-Well Murine Cytokine Array): Die Bestimmung von Zytokinen im Serum erfolgte mit dem ProteoPlex[®] 16-Well Murine Cytokine Array (Novagen, Bad Soden) gemäß den Arbeitsanweisungen des Herstellers.

Dieser Kit ermöglicht das gleichzeitige Messen von 10 pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen (IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p70, GM-CSF, IFN- γ , TNF- α) in 50 μ l Probenvolumen und ist für Zytokinkonzentrationen von 5-2500 pg/ml geeignet. In jedem Well des Objektträgers, auf den die Proben aufgetragen werden, befindet sich ein Mikroarray von für jedes Zytokin in Quadruplikaten diskret gespotteten Primär-Antikörpern sowie Spots für Positiv- und Negativkontrollen. Die Standardkurve umfasst den Bereich von 15-800 pg/ml. An die biotinylierten Sekundär-Antikörper bindet das SensiLight[™]-PBXL-3-Fluoreszenz-Detektions-Reagenz. Das Messen des Objektträgers bei 633 nm und das Auswerten der Daten wird durch den Hersteller durchgeführt.

3.2.5 Nachweis von Antikörpern

Zur Gewinnung von Serum wurde das koagulierte Blut der Tiere in einer Tischzentrifuge bei 5000 Umdrehungen/min abzentrifugiert, das Serum abgenommen und bei - 70 °C aufbewahrt. Der Gehalt an Gesamt-Ig G oder gegen mBSA, Kollagen Typ I (K I), Kollagen Typ II (K II) oder PG gerichtetes IgG im Serum wurde mittels ELISA gemessen. Dazu wurden 96-Well-Mikrotiter-Platten über Nacht bei 4 °C mit mBSA (100 ng/well), K I, K II oder PG (alle 1 μ g/Well) bzw. mit 100 ng/Well Antikörpern gegen IgG, IgG1, IgG2b oder IgG3 (Southern Biotech, Eching) in NaHCO₃-Puffer (pH 9,5) beschichtet. Das Blocken unspezifischer Bindungsstellen erfolgte mit 300 μ l/Well 2 % BSA in PBS bei Raumtemperatur für 2 h. Danach wurden 50 μ l/Well Probe in geeigneten Verdünnungen aufgetragen und über Nacht bei 4 °C inkubiert (Tab. 7).

Die Serum-Proben zur Bestimmung von K I, K II und PG wurden 1:100 verdünnt, die dazugehörigen antigenspezifischen Standards 1:50. Als Referenz für die antigenspezifischen IgG wurde gepooltes Serum von C57Bl/6 Mäusen mit 7 Tagen AIA verwendet. Der Gehalt an antigenspezifischem IgG der Proben bezieht sich prozentual auf diese Referenz. Für das Waschen der Mikrotiter-Platten zwischen den einzelnen Schritten wurde als Waschpuffer 0,05 % Tween 20 in PBS verwendet.

Zur Bestimmung des Isotyps wurden mit alkalischer Phosphatase (AP) konjugierte polyklonale Ziege anti-Maus Antikörper gegen IgG1, IgG2b und IgG3 (Southern Biotech, Eching) bzw. für Gesamt-IgG oder K I, K II und PG Ziege anti-Maus IgG Antikörper konjugiert mit Peroxidase (Southern Biotech, Eching) als sekundärer Antikörper benutzt. Der sekundäre Antikörper für IgG2a^b (C57Bl/6: Igh-C^b Haplotyp; BD Pharmingen, Heidelberg) war biotinyliert. Die Entwicklung der Mikrotiter-Platten für diesen biotinylierten bzw. für die mit Peroxidase gekoppelten Sekundär-Antikörper erfolgte analog der Entwicklung der Zytokin-ELISA, die ebenfalls Peroxidase als Enzym verwenden (siehe Kapitel 3.2.4 „Nachweis von Zytokinen“).

Tab. 7 Antikörper und Standards für ELISA. Zur Bestimmung der Immunglobuline verwendete Primär- und Sekundär-Antikörper und zugehörige Verdünnungen von Proben und Standard. AP, Alkalische Phosphatase; PO, Peroxidase.

Typ	Markierung	Probenverdünnung			
		mBSA	Standard	Gesamt	Standard
IgG	ohne PO	1 : 10 000	1 : 5000	1 : 100 000	500 ng/ml
IgG1	ohne AP	1 : 1000	1 : 500	1 : 10 000	500 ng/ml
IgG2a ^b	- Biotin	1 : 100 000	1 : 20 000	-	-
IgG2b	ohne AP	1 : 1000	1 : 500	1 : 100 000	500 ng/ml
IgG3	ohne AP	1 : 100	1 : 50	1 : 10 000	500 ng/ml

Als Substrat für die AP wurde pNPP in Substratpuffer verwendet und die Farbreaktion mit 100 µl 5,3 % Na₂CO₃ abgestoppt. Mit einem Absorptionmessgerät Sunrise™ wurde bei 405 nm und einer Referenz von 690 nm die Extinktion gemessen. Als Standard für IgG, IgG1, IgG2a^b, IgG2b oder IgG3 dienen Myeloma-Antikörper der entsprechenden Isotypen (Sigma-Aldrich, Steinheim).

3.2.6 Zymographie

Um bei IFN- γ ^{-/-} Mäusen und Wildtyp die an der akuten AIA beteiligten Zytokine und matrixdegradierenden Enzyme zu vergleichen, wurden aus Kniegelenken von Tieren beider Stämmen Gelenkextrakte von d3 angefertigt und mittels ELISA und Zymographie untersucht.

Gelenkextrakte: Zur Herstellung von Gelenkextrakten wurden die Kniegelenke drei Tage nach Induktion der Arthritis entnommen und sofort in flüssigem Stickstoff bei -196 °C schockgefroren. Für die grobe Zerkleinerung der Gelenke wurde Mörser und Stößel verwendet, die Pulverisierung der Proben erfolgte für zweimal 30 s bei 3000 Umdrehungen/min in einem Mikro-Dismembrator. Dabei wurde auf eine strikte Kühlung der Proben und Gerätschaften geachtet. Anschließend wurden die Proben in 2 ml physiologischer Kochsalzlösung gelöst und für 90 s manuell mit einem Mikro-Dismembrator Polytron PT 1200 homogenisiert. Die Abtrennung der flüssigen Phase erfolgte durch zwei Zentrifugationsschritte bei 4 °C mit 3000 Umdrehungen/min für 10 min und mit 13 000 Umdrehungen/min für 10 min in der Tischzentrifuge. Der Überstand wurde abgenommen und die Zytokine TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12 und IL-17 mittels ELISA bestimmt (siehe Kapitel 3.2.4 „Nachweis von Zytokinen“) und auf den Gesamtproteingehalt der Probe bezogen. Zur Quantifizierung der in den Gelenkextrakten vorhandenen aktiven Proteasen wurde eine Zymographie mit das entsprechende Substrat enthaltenden Gelen durchgeführt.

Zymographie: Um aktive Proteasen, insbesondere Matrixmetalloproteasen (MMP), in einem SDS-Polyacrylamidgel bei der Elektrophorese sichtbar zu machen, wird ein spezifisches Substrat in das Gel einpolymerisiert. Nach Inkubation werden in den Bereichen des Gels, wo das Substrat durch aktive Proteasen enzymatisch abgebaut wurde, durch Färbung Banden sichtbar.

Für die Bestimmung von MMP-2 und MMP-9 in den Gelenkextrakten wurden 10 % Polyacrylamidgele mit 2 mg/ml Elastin (EPC, Owensville, USA) und für MMP-3 mit 0,5 mg/ml Casein (Sigma-Aldrich, Steinheim) verwendet. Um niedermolekulare Bestandteile des Casein-Gels zu entfernen, wurde vor Beladen des Gels mit Proben für 2 h bei 40 mA ein ‚Pre-Run‘ ohne Proben durchgeführt. Für die eigentliche Elektrophorese wurden die Proben mit 1:5 nicht reduzierendem Probenpuffer versetzt und bei Elastin-Gelen 10 μ l und bei Casein-Gelen 20 μ l auf das Sammelgel

aufgetragen. Das Mitführen eines ‚wide range‘ Molekulargewichtsmarkers (Sigma-Aldrich, Steinheim) ermöglichte die Zuordnung der Banden im Trenngel zu den entsprechenden Molekülgrößen. Die Elektrophorese erfolgte bei 15 mA je Gel. Nach dem Auftrennen der Proben wurden die Gele zur Entfernung des die Faltung der MMP verändernden SDS zweimal für je 20 min in 2,5 % TritonX-100 (Ferak, Berlin) und danach mit Aqua dest. gewaschen. Die Inkubation erfolgte über Nacht in Inkubationspuffer bei 37 °C im Brutschrank. Zur Färbung wurden die Gele 45 min mit 0,25 % Coomassie-Blau-Lösung gefärbt und anschließend die Banden der enzymatisch aktiven Bereiche durch Entfärben mit Entfärber-Lösung sichtbar gemacht. Die Gele wurden in 0,5 % Glycerin in H₂O überführt und anschließend in Folie getrocknet.

3.2.7 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie („Fluorescence-activated cell sorting“; FACS) ermöglicht es, Zellen anhand der Expression von Oberflächenmolekülen zu unterscheiden, an die spezifische, mit Fluoreszenzfarbstoff gekoppelte monoklonale Antikörper binden. Im Durchflusszytometer wird die Probe durch eine Kapillare gesaugt und dabei in kleine Flüssigkeitströpfchen zerlegt, die im Idealfall eine einzelne Zelle enthalten. Die Tröpfchen passieren einen fokussierten Laserstrahl. Anhand des emittierten Vorwärts- und Seitwärtsstreulichts sowie des Fluoreszenzsignals der Antikörper-Fluoreszenz-Konjugate lassen sich die Zellen untergliedern. Zur Färbung wurden 10⁶ Zellen/Probe mit FACS-Puffer gewaschen, in 100 µl FACS-Puffer resuspendiert und anschließend mit 10 µg/ml Phycoerythrin (PE)-markiertem anti-CD4-Antikörper (BD Pharmingen, Heidelberg) für 15 min bei 4 °C inkubiert. Das Fixieren der Zellen erfolgte bei Raumtemperatur für 5 min mit 2 % Formalin. Zum Messen am Durchflusszytometer FACSCalibur™ (Becton Dickinson, Heidelberg) wurde die Probe mit FACS-Puffer gewaschen und in 300 µl resuspendiert. Für das Fluorochrom PE liegt das Absorptionsmaximum bei 498 nm und das Emissionsmaximum bei 578 nm. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Freeware WinMDI 2.8 von Joe Trotter (<http://facs.scripps.edu/software.html>).

3.2.8 Applikation von Interferon- γ oder Antikörpern

Zur Untersuchung der Wirkung von IFN- γ *in vivo* wurde dem Wildtyp und IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäusen zum Auslösen der AIA 25 μ l 0,9 % NaCl i. a. in den Gelenkspalt des rechten Kniegelenks injiziert, die neben 100 μ g mBSA Antigen 100 ng rmlFN- γ (Invitrogen, Karlsruhe) bzw. bei der Kontrollgruppe nur das Antigen enthielt. An den darauf folgenden Tagen wurde die Gelenkschwellung gemessen. Nach drei Tagen wurden die Tiere abgetötet und die Arthritis wie unter Kapitel 3.2.2 „Klinische Bewertung der Arthritis“ beschrieben histologisch bewertet.

Zur Neutralisation von IFN- γ im Wildtyp bzw. von IL-17 in IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäusen wurde jeweils 3 d und 5 h vor Auslösen der Arthritis monoklonaler Ratte anti-Maus-Antikörper in 200 μ l PBS intravenös (i. v.) in die Schwanzvene appliziert:

anti-IFN- γ : 2 x 50 μ g (Klon R4-6A2, Rainer Straub, Universität Regensburg)

anti-IL-17: 2 x 100 μ g (Klon 50104, R&D Systems, Wiesbaden)

Als Kontrolle wurde aufgereinigtes, aus naiven Ratten gewonnenes polyklonales Ratten-IgG (AG Immunpathologie) verwendet.

3.2.9 *In vitro*-Generierung von Th1/Th2-Zellen

Für adoptive Transfer-Experimente mit Th1/Th2-Zellen wurden naive CD62L⁺ Th-Zellen isoliert und durch Kultur im entsprechenden Zytokinmilieu zu Th1- oder Th2-Zellen polarisiert.

Isolation von CD62L⁺ Th-Zellen: Zur Isolation der naiven Th-Zellen wurde analog zu Kapitel 3.2.4 „Nachweis von Zytokinen“ aus Lymphknoten und Milzen von 6-7 Wochen alten nicht immunisierten Mäusen eine Einzelzell-Suspension hergestellt. Zur Verringerung der Zellzahl vor der magnetischen Trennung wurden adhärenente Zellen und B-Zellen mittels ‚Panning‘ entfernt. Dazu wurde die Einzelzell-Suspension auf über Nacht mit 30 μ g Kaninchen anti-Ratten-IgG (DakoCytomation, Hamburg) beschichteten Petrischalen (2 Stück/Tier) aufgetragen, für 20 min im Brutschrank inkubiert und anschließend vorsichtig wieder abgenommen. Dadurch wurden adhärenente Zellen und aufgrund der Kreuzreaktivität des gegen Ratten-IgG gerichteten Antikörpers mit dem IgM an der Oberfläche von B-Zellen auch diese entfernt (insgesamt ca. 50 % der Zellen). Anschließend wurden die Zellen gewaschen und in MACS-Puffer („Magnetic-activated cell sorting“) resuspendiert.

Um weitere Zelltypen zu entfernen und die CD4⁺ Zellpopulation einzugrenzen, wurde im nächsten Schritt eine Negativselektion durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen auf 10⁸/ml eingestellt und für 20 min bei 4 °C mit 100 µg/ml Ratte anti-Maus Antikörpern aus aufgereinigten Hybridomüberständen (AG Immunpathologie) inkubiert:

anti-CD16/32 (anti-FCγRIII/II), Klon 24G2

auf B-Zellen, Granulozyten, Mastzellen, Monozyten, NK-Zellen

anti-CD18/CD11b (Mac-1), Klon M1/70

auf Granulozyten, Makrophagen, DC

anti-CD8, Klon 2.4.3

auf zytotoxischen T-Zellen, DC

Nach erneutem Waschen und Einstellen der Zellen auf 10⁷/ml erfolgte anschließend für 30 min bei 4°C die Inkubation mit 50 µl/ml mit magnetischen Beads markierten Schaf anti-Ratten-IgG Antikörpern und 10 µl/ml Schaf anti-Maus-IgG Antikörpern (DynaL Biotech, Hamburg). Die Abtrennung der mit anti-Ratte markierten Zellfraktion (ca. 80 % der Zellen) nach einem Waschschrift erfolgte mit dem Magnetic Particle Concentrator (MPC; Dynal Biotech, Hamburg) gemäß den Angaben des Herstellers. Die Positivfraktion wird hierbei durch das Magnetfeld des MPC zurückgehalten.

Nach der magnetischen Trennung wurde zur Isolation der naiven Th-Zellen mit der unmarkierten Negativfraktion eine Positivselektion mit magnetisch markierten anti-CD62L-Antikörpern gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Der Oberflächenmarker L-Selektin (CD62L) ist charakteristisch für noch nicht aktivierte und differenzierte Zellen. Die Zellen wurden gewaschen, in MACS-Puffer auf 10⁸/ml eingestellt und mit 100 µl/ml CD62L-MicroBeads (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach) für 15 min bei 6 °C inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen zur magnetischen Abtrennung über eine vorgespülte Separationssäule in der MidiMACS[®]-Separationseinheit gegeben. Die in der Separationssäule zurückgehaltenen markierten Zellen wurden eluiert und in Kulturmedium überführt. Eine Überprüfung der CD62L⁺ Zellen (ca. 20 % der Zellen) auf CD4 mittels Durchflusszytometrie ergab einen Anteil von ~ 95 %.

Th1/Th2-Polarisierung: Um die naiven Th-Zellen zu Th1- und Th2-Zellen zu differenzieren, wurden die Zellen (10⁶/ml) für 3 Tage auf mit jeweils 2 µg/Well anti-CD3- und anti-CD28-Antikörpern aus Hybridomüberständen (1452CII; 37.51) beschichteten 12-Well-Platten kultiviert (37 °C, 5 % CO₂). Für die Differenzierung der

Zellen durch das entsprechende Zytokinmilieu in Richtung Th1 oder Th2 wurden die in Tab. 8 aufgelisteten Zytokine und Antikörper eingesetzt.

Anschließend wurden die Zellen für 4 weitere Tage mit Antikörpern und Zytokinen auf unbeschichteten Platten weiter kultiviert. Dabei wurde nach 2, 3 und 5 Tagen abhängig vom Verbrauch 30-50 % des Mediums ersetzt. Die Polarisierung der Th1-

Tab. 8 Antikörper und Zytokine für die Th1/Th2-Generierung.

<i>Typ</i>	<i>Antikörper/ Zytokine</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Hersteller</i>
Th1	IL-2	50 U/ml	Chiron Behring, Marburg
	IFN- γ	250 U/ml	Invitrogen, Karlsruhe
	IL-12	1000 U/ml	R&D Systems, Wiesbaden
	anti-IL-4	1 μ g/ml	BD Pharmingen, Heidelberg
Th2	IL-2	25 U/ml	Chiron Behring, Marburg
	IL-4	20 ng/ml	BD Pharmingen, Heidelberg
	anti-IFN- γ	5 μ g/ml	BD Pharmingen, Heidelberg
	anti-IL-12	10 μ g/ml	(C17.15 und C17.8)

und Th2-Zellen wurde anhand des Zytokinprofils überprüft. Dazu wurden die Zellen wie oben beschrieben (Kapitel 3.2.4 „Nachweis von Zytokinen“) mit anti-CD3/anti-CD28-Antikörpern stimuliert und die Zytokine in den Überständen der Th1- und Th2-Zellen mittels ELISA untersucht.

3.2.10 Isolierung von CD4⁺ Zellen *ex vivo* und Zelltransfer

Für adoptive Transfer-Experimente wurden zur Bestimmung ihres arthritogenen Potentials CD4⁺ Zellen *ex vivo* aus IFN- γ ^{-/-} und IL-17^{-/-} Mäusen und dem Wildtyp verwendet. Hierzu wurden die jeweiligen Mausstämme gemäß Kapitel 3.2.1 „Das Modell der Antigen-induzierten Arthritis“ immunisiert, an d0 die Lymphknoten und Milzen entnommen und eine Einzelzell-Suspension hergestellt (siehe Kapitel 3.2.4 „Nachweis von Zytokinen“). Die CD4⁺ Zellen wurden aus der zusammengeführten Fraktion von Lymphknoten- und Milzzellen mittels magnetischer Trennung mit dem MidiMACS[®]-System isoliert. Anstatt von gegen CD62L gerichteten MicroBeads wie in Kapitel 3.2.9 „*In vitro*-Generierung von Th1/Th2-Zellen“ beschrieben, wurden gegen CD4 gerichtete MicroBeads verwendet.

Beim adoptiven Transfer wurden in naive, nicht immunisierte Mäuse vom Wildtyp in die Schwanzvene i. v. 10^7 CD4⁺ Zellen in 200 μ l PBS injiziert. Das Auslösen der AIA erfolgte 1 h später mit 100 μ g mBSA i. a. ins rechte Kniegelenk. Nach 5 Tagen (d5) wurden die Tiere getötet und die Schwere der Arthritis histologisch bewertet.

3.2.11 Modulation der IL-17-Sekretion *in vitro*

Zur Untersuchung der Wirkung von IFN- γ *in vitro* auf die IL-17-Sekretion von über den TCR stimulierten CD4⁺ T-Zellen wurden naive Th-Zellen isoliert und mit verschiedenen Konzentrationen an IFN- γ kultiviert.

Hierzu wurden naive CD62L⁺CD4⁺ T-Zellen wie in Kapitel 3.2.9 „*In vitro*-Generierung von Th1/Th2-Zellen“ beschrieben isoliert und die Zellen zur Aktivierung für 3 Tage auf mit anti-CD3- und anti-CD28-Antikörpern (jeweils 2 μ g/Well) beschichteten 12-Well-Platten in supplementiertem RPMI in einer Konzentration von 10^6 Zellen/ml kultiviert. Nach einer 4-tägigen Ruhephase ohne anti-CD3- und anti-CD28-Antikörper wurden die Th-Zellen erneut für 3 Tage restimuliert. Während der Stimulationen wurde rmlFN- γ in Konzentrationen von 0 bis 50 ng/ml hinzugefügt. Der Gehalt an IL-17 in den Kulturüberständen wurde mittels ELISA gemessen.

3.2.12 Quantifizierung der Proliferation der Th-Zellen

Die Proliferation von Zellen lässt sich durch den Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin bei der Zellteilung quantifizieren. Hierzu wurden naive Th-Zellen wie im vorherigen Kapitel beschrieben isoliert und dann stimuliert. Um die durch Stimulation und Restimulation induzierte Proliferation zu messen, wurde während der letzten 18 h der Kultur 0,5 μ Ci/well [³H]-Thymidin hinzugefügt. Anschließend wurde die DNA der Zellen mit dem Zellharvester Unifilter-96 auf Unifilter-96-Well GF/C-Platten geerntet. Nach Trocknen der Platten wurden 30 μ l des Szintillationscocktail Microscint O in jedes Well gegeben und der Einbau von radioaktiv markiertem [³H]-Thymidin mittels eines Szintillations-Zählers TopCount gemessen.

3.2.13 Statistische Auswertung und Darstellung

Die Untersuchung auf signifikante Unterschiede zwischen den Messergebnissen der Versuchsgruppen wurde mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney U-Test der Statistik-Software SPSS 14.0 (SPSS GmbH Software, München) zweiseitig durchgeführt. Statistisch signifikante Unterschiede wurden für $p < 0,05$ (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$) als gegeben betrachtet.

Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgt in der vorliegenden Arbeit als arithmetischer Mittelwert der jeweiligen Gruppen mit dem Mittelwert des Standardfehlers (SEM) als Fehlerbalken. Zur Erstellung der Diagramme wurde die Software SigmaPlot 10.0 (Systat Software, Erkrath) und für photographische Aufnahmen Photoshop 7.0 (Adobe Systems, München) verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Die Rolle von Th-Zellen bei der AIA

Obwohl die mit der RA assoziierten Subtypen von Th-Zellen ausgehend von Th1- und Th2-Zellen in den letzten Jahren um die Subtypen T_{reg}- und Th17-Zellen erweitert wurden, ist das Paradigma der RA immer noch präsent. Demnach trägt ein Ungleichgewicht zwischen pathogenen Th1- und protektiven Th2-Zellen maßgeblich zur Erkrankung bei. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb im Modell der AIA untersucht, ob die experimentelle Arthritis durch Modulation der Th1/Th2-Balance beeinflusst werden kann und ob diese Modulation gegebenenfalls einen therapeutischen Ansatzpunkt darstellt. Dazu wurden adoptive Transfer-Experimente mit *in vitro* generierten Th1- und Th2-Zellen in immunisierte Rezipienten sowie eine modifizierte AIA in transgenen Mäusen mit für das Antigen spezifischem TCR zur Klärung der generellen Bedeutung von Th-Zellen für die experimentelle Arthritis durchgeführt.

4.1.1 Transfer von unspezifischen Th1- und Th2-Zellen

Zur Modulation der Arthritis wurden Th1- und Th2-Zellen aus naiven Th-Zellen durch entsprechende Kultur- und Stimulationsbedingungen *in vitro* generiert und jeweils

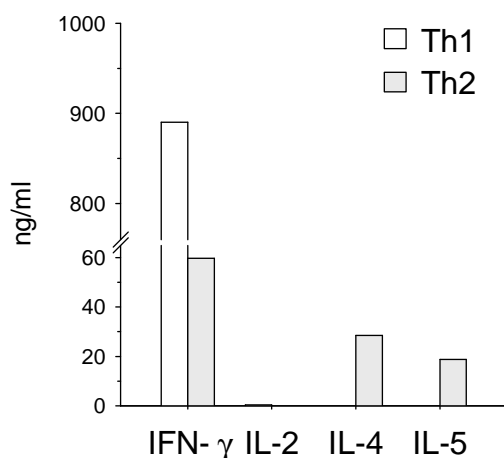


Abb. 8 Zytokinprofil von Th1/Th2-Zellen. Zytokine in den Überständen von *in vitro* generierten und polyklonal stimulierten Th1- und Th2-Zellen.

7 x 10⁶ Zellen in physiologischer Kochsalzlösung bzw. nur physiologische Kochsalzlösung bei der Kontrollgruppe eine Stunde vor Auslösung der AIA i. v. appliziert. Die Polarisierung der *in vitro* generierten Th1- und Th2-Zellen wurden anhand ihres Zytokinprofils in Kulturüberständen nach polyklonaler Stimulation überprüft (Abb. 8). Die Menge des sekretierten IFN- γ betrug bei Th1-Zellen das 15-fache der Th2-Zellen, während nur Th2-Zellen große Mengen an IL-4 und IL-5 produzierten. IL-2 wurde in sehr geringen

Mengen ($< 0,5$ ng/ml) von Th1-Zellen gebildet. Mit diesen polarisierten Th1- und Th2-Zellen wurde versucht, den Verlauf der AIA in immunisierten Rezipienten zu beeinflussen. Allerdings zeigte sich, dass durch einen derartigen adoptiven Transfer keine Modulation der Arthritis zu erzielen war. Weder die mit Th1- noch die mit Th2-Zellen behandelte Gruppe wies nach Auslösen der Arthritis bei der Schwellung des Kniegelenks Unterschiede zur Kontrollgruppe ohne Zelltransfer auf. In allen drei Gruppen lag der Schwellungswert an d1 bei ca. 0,8 mm und ging dann im weiteren Verlauf der Erkrankung auf 0,1 mm zurück (Abb. 9A).

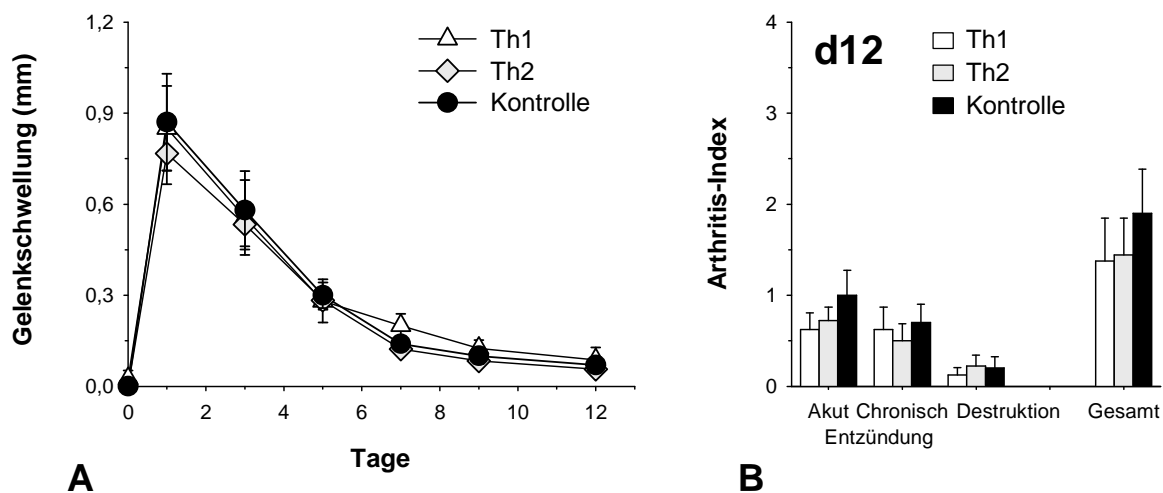


Abb. 9 Modulation der AIA durch Transfer von Th1/Th2-Zellen.

Der Verlauf der Gelenkschwellung bei der AIA wurde durch den Transfer von *in vitro* generierten Th1/Th2-Zellen nicht beeinflusst (A). Bei der histologischen Bewertung an d12 ergaben sich zwischen den Gruppen ebenfalls keine Unterschiede (B).

Die histologische Bewertung der Arthritis bestätigte den fehlenden modulierenden Effekt des Zelltransfers. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Rezipienten von Th1- und Th2-Zellen oder von diesen Gruppen zur Kontrolle. Auf die mBSA-spezifischen Immunglobuline im Serum hatte der Zelltransfer ebenfalls keine Auswirkung (nicht dargestellt). Hingegen waren in den Überständen von Milzzellen in den drei Versuchsgruppen nach polyklonaler Stimulation zwar gleiche Level von IFN- γ und IL-2, bei Th2-Rezipienten jedoch erhöhte Mengen von IL-4 (660 pg/ml ggü. 240-270 pg/ml) und IL-5 (1200 pg/ml ggü. 260-380 pg/ml) zu finden. Dies deutet darauf hin, dass die fehlende Wirkung weniger auf eine sofortige Eliminierung der Zellen, sondern wahrscheinlicher auf die nicht stattgefundene Aktivierung der Effektormechanismen der Zellen zurückzuführen war.

4.1.2 Transfer von OVA-spezifischen Th1- und Th2-Zellen

Da im vorherigen Experiment die Aktivierung der Zellen während der Kulturphase über die Stimulation des TCR erfolgte, waren die Zellen nicht spezifisch für das bei der AIA verwendete Antigen mBSA. Um einen adoptiven Transfer zur Modulation der Arthritis mit antigenspezifischen Th1- und Th2-Zellen durchführen zu können, wurde deshalb kationisiertes Ov-Albumin (catOVA) anstatt mBSA für die Immunisierung der C57Bl/6 Rezipienten verwendet. Aufgrund der positiven Ladung bindet catOVA bei der Antigen-Injektion in das Kniegelenk zum Auslösen der Arthritis an das negativ geladene Knorpelgewebe. Als Donoren zur Gewinnung naiver Th-Zellen dienten OT-II Mäuse. Der genetische Hintergrund dieser durch einen OVA-spezifischen TCR

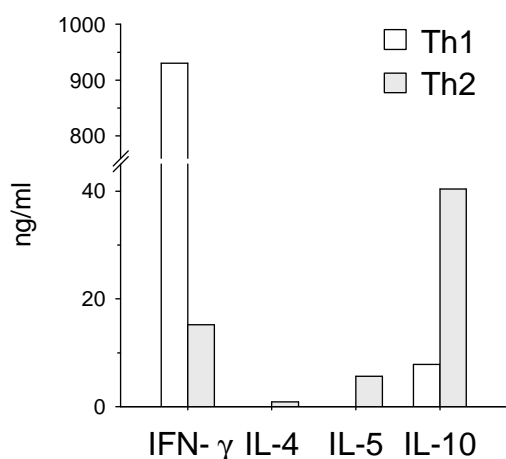


Abb. 10 Zytokinprofil von OVA-spezifischen Th1/Th2-Zellen.

Zytokine in den Überständen von *in vitro* generierten und polyklonal stimulierten OVA-spezifischen Th1- und Th2-Zellen.

charakterisierten transgenen Mauslinie ist C57Bl/6. Die *in vitro* generierten Th1- und Th2-Zellen waren bei diesem Versuchsaufbau somit spezifisch für das zum Auslösung der Arthritis benutzte Antigen. Die Überprüfung der Polarisierung der Th1/Th2-Zellen anhand der nach polyklonalen Stimulation produzierten Zytokine ergab eine Sekretion von IFN- γ bei den Th1-Zellen, während Th2-Zellen IL-4, IL-5 und IL-10 sezernierten (Abb. 10).

Zur Modulation der Arthritis wurden eine Stunde vor Auslösen 5×10^5 Zellen i. v. in die Schwanzvene injiziert. Das

Auslösen der Arthritis erfolgte i. a. mit catOVA. Die Verwendung von catOVA als Antigen führte zu einer stärkeren Entzündungsreaktion als dies bei mBSA der Fall ist. Bei der Kontrollgruppe ohne Zelltransfer betrug die Schwellung des Kniegelenks an d1 2,0 mm. Für eine mit mBSA induzierte AIA sind 0,7-1 mm üblich. Bei der Gruppe der Th1-Rezipienten betrug die Schwellung an d1 3,2 mm, bei den Th2-Rezipienten 2,9 mm (Abb. 11A).

Der Transfer von antigenspezifischen Th-Zellen führte somit unabhängig vom Typ der Zellen zu einer verstärkten Immunreaktion. Ab d3 lagen die Werte der

Gelenkschwellung bei den Tieren mit Zelltransfer unter denen der Kontrollgruppe, wobei Th2-Rezipienten eine geringere Schwellung aufwiesen als Th1-Rezipienten. Dieses Verhältnis blieb im weiteren Verlauf des Experiments bestehen, ohne dass aufgrund der Heterogenität der Versuchsgruppen zu einem Zeitpunkt das Signifikanzniveau erreicht wurde.

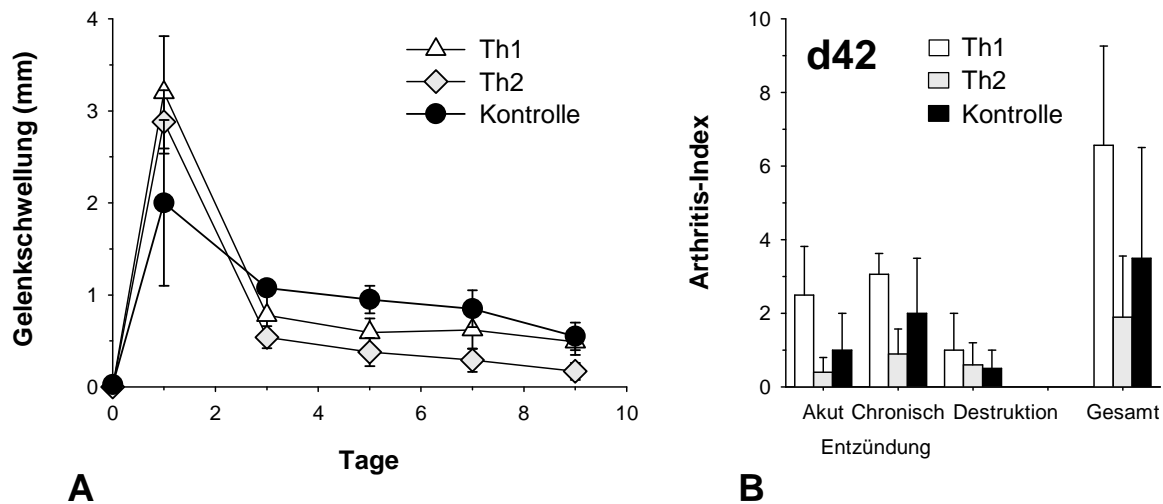


Abb. 11 Modulation der AIA durch Transfer von OVA-Th1/Th2-Zellen.

Der adoptive Transfer von Th1- oder Th2-Zellen in immunisierte Rezipienten führte zu einer Verstärkung der akuten Entzündungsreaktion (A). Die histologische Bewertung an d42 zeigte eine tendenzielle Verschlimmerung der AIA durch Th1- und eine tendenzielle Verbesserung durch Th2-Zellen (B).

Zur Untersuchung des langfristigen Effekts einer Modulation der Arthritis durch Th-Zellen wurde an d42 eine histologische Bewertung der Schwere vorgenommen. Für Th1-Zellen zeigte sich ein tendenzieller Effekt zur Verschlimmerung, während für Th2-Zellen die akuten und chronischen Entzündungsparameter tendenziell verringert waren (Abb. 11B).

Diese Ergebnisse lassen eine Modulation bzw. Therapie der RA mittels Th-Zellen wenig aussichtsreich erscheinen. Obwohl möglicherweise antiinflammatorische wirkende Zytokine langfristig eine leichte Verbesserung bewirken können, ist dies mit einer Verstärkung der akuten Entzündungsreaktion verbunden, wie die erhöhte Gelenkschwellung bei Rezipienten von Th2-Zellen zeigte.

4.1.3 AIA bei OT-II Mäusen

Bei der AIA spielen $CD4^+$ Th-Zellen für die Erkrankung eine maßgebliche Rolle (PETROW ET AL., 1996; POHLERS ET AL., 2004). Um die Bedeutung der Th-Zellen für die akute Entzündungsreaktion und die Chronifizierung der AIA abschätzen zu können, wurde der Verlauf einer mit catOVA induzierten AIA in TCR-transgenen OT-II Mäusen untersucht.

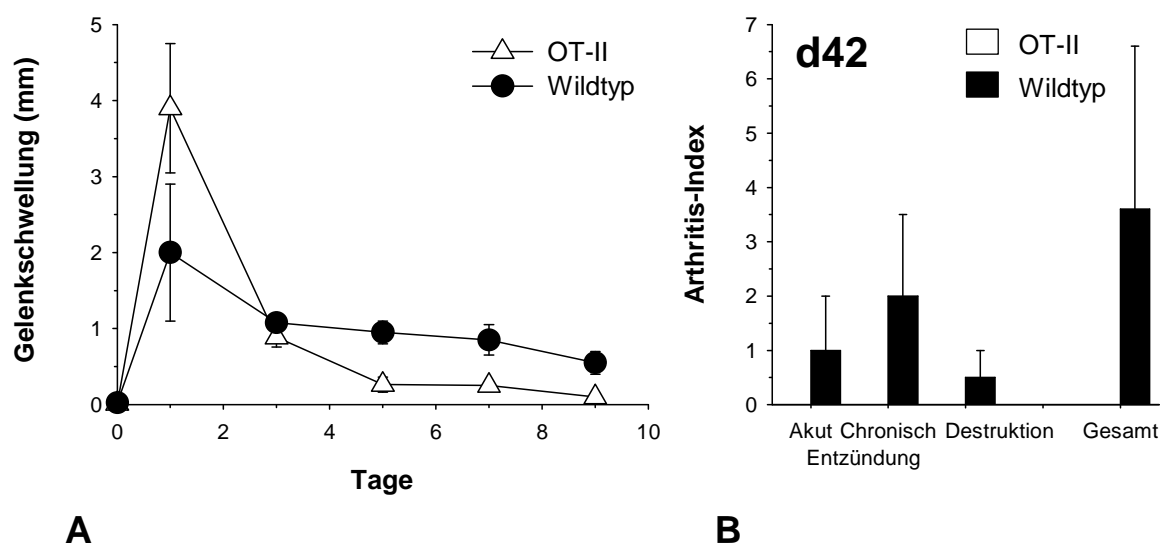


Abb. 12 Verlauf der AIA in TCR-transgenen OT-II Mäusen.

Die Spezifität des TCR für catOVA führte bei OT-II Mäusen zu einer verstärkten akuten Entzündungsreaktion (A). Die histologische Bewertung der AIA zeigte bei OT-II Mäusen an d42 eine vollständige Remission der Arthritis (B).

Es zeigte sich, dass das Vorhandensein einer erhöhten Anzahl von antigen-spezifischen Th-Zellen erwartungsgemäß zu einer deutlich verstärkten Entzündungsreaktion führte. Die Schwellung des Kniegelenks war bei den OT-II Mäusen mit 3,9 mm gegenüber der Kontrollgruppe mit 2,0 mm beinahe verdoppelt. An d3 betrug der Wert in beiden Gruppen rund 1 mm (Abb. 12A). Während beim Wildtyp die Schwellung auf niedrigem Niveau persistierte, war bei den OT-II Mäusen ab d9 die Entzündung des Gelenks nicht mehr meßbar. Dies bestätigte sich in der histologischen Bewertung von d42. Beim Wildtyp zeigten sich zu diesem Zeitpunkt im Gelenk der chronischen AIA sowohl akute und chronische Entzündung als auch Destruktion (Abb. 12B). Bei den OT-II Mäusen hingegen hatte spontan eine vollständige Remission der Arthritis stattgefunden, die beim Arthritis-Index für alle

Parameter zu einer Bewertung von 0 führte. In den histologischen Schnitten war weder eine Hyperplasie der Synovialmembran noch zelluläres Infiltrat oder der Abbau von Knorpel und Knochen erkennbar (Abb. 13A, 13C). Im Gegensatz dazu fanden sich beim Wildtyp diese Merkmale der chronischen AIA (Abb. 13B, 13D).

Diese Ergebnisse belegen die Abhängigkeit der Stärke der akuten Entzündungsreaktion von der Zahl der antigenspezifischen Th-Zellen und unterstreichen insbesondere die Bedeutung der Entstehung von autoreaktiven Th-Zellen im Verlauf des Entzündungsprozesses für die Persistenz und Chronifizierung der Arthritis. Ohne die Beteiligung von autoreaktiven Th-Zellen kommt der Entzündungsprozess nach Beseitigung des Antigens offensichtlich zum Erliegen.

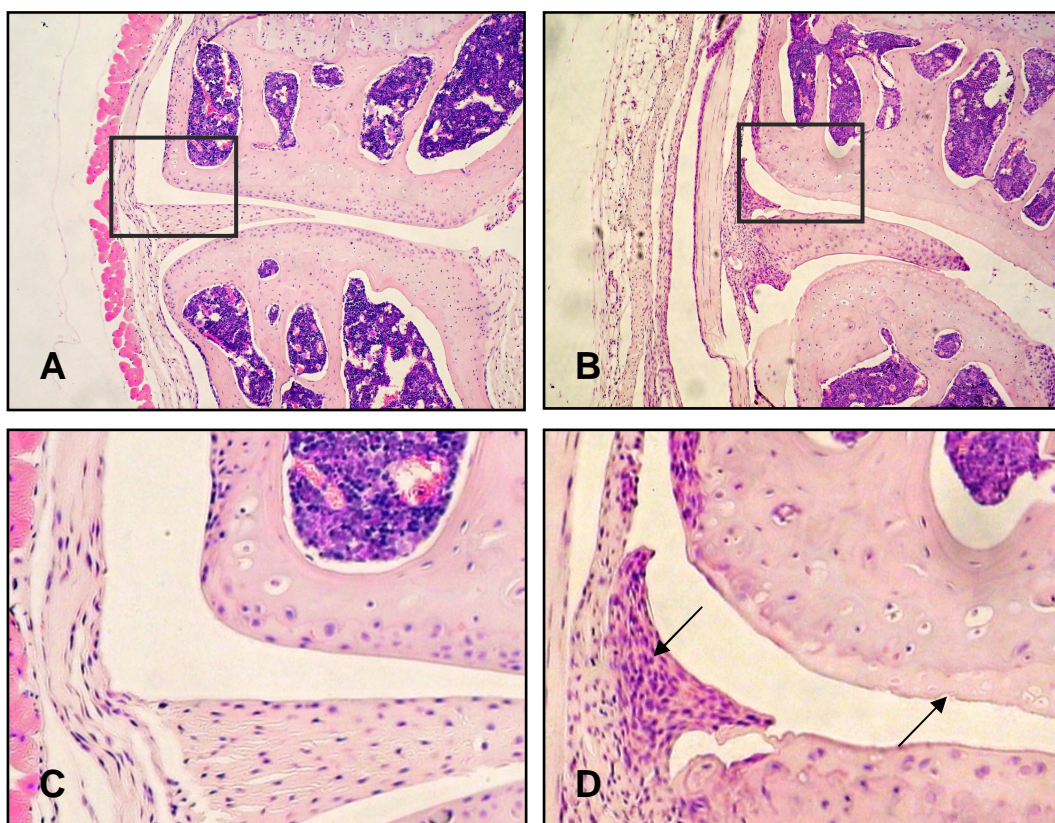


Abb. 13 Histologie der chronischen AIA in TCR-transgenen OT-II Mäusen. Spontane und vollständige Remission der Arthritis bei OT-II Mäusen an d42 (A, C). Hyperplasie der Synovialis und Knorpeldegradation bei Mäusen vom Wildtyp in der chronischen Phase der AIA (B, D). HE-Färbung, (A, B) 25-fache Vergrößerung, (C, D) 100-fache Vergrößerung.

4.1.4. Zusammenfassung

Der in diesen Experimenten unternommene Versuch, mittels eines adoptiven Transfers von *in vitro* generierten Th1- und Th2-Zellen das Gleich- bzw. Ungleichgewicht der an der Arthritis beteiligten Th-Subtypen zu beeinflussen und auf diese Weise die Schwere der Arthritis zu reduzieren, war nicht erfolgreich. Mittels nicht antigenspezifischer Th-Zellen ließ sich auf den Verlauf der AIA überhaupt kein Effekt erzielen. Antigen-spezifische Th1- und Th2-Zellen hatten zwar eine modulierende Wirkung auf die AIA, jedoch zeigten die Th2-Zellen nicht den gemäß des Th1-/Th2-Paradigmas angestrebten protektiven Effekt, da die langfristige leichte Verbesserung der klinischen Parameter durch den adoptiven Transfer von Th2-Zellen mit einem verstärkten akuten Entzündungsschub verbunden war. Die antiinflammatorische Wirkung der Zytokine in der akuten Phase der experimentellen Arthritis wurde offensichtlich durch andere, möglicherweise über direkten Zellkontakt vermittelte Effektormechanismen aufgehoben. Die spontane und vollständige Remission der Arthritis bei Mäusen, deren TCR für das Antigen spezifisch war, unterstreicht die elementare Bedeutung der Entstehung von autoreaktiven Th-Zellen während des Entzündungsprozesses für die Persistenz der Arthritis.

4.2 Charakterisierung der AIA bei IFN- γ ^{-/-} Mäusen

Th-Zellen werden anhand der Produktion von IFN- γ dem Th1-Subtyp zugeordnet. Um vor dem Hintergrund des Th1-/Th2-Paradigmas die Rolle dieses Zytokins im Modell der AIA zu untersuchen, wurde der Verlauf der Arthritis anhand von klinischen und immunologischen Parametern bei Mäusen charakterisiert, in denen das Gen für IFN- γ konstitutiv inaktiviert war. Für die akute Phase der Arthritis wurde Tag 3 nach Auslösen der AIA und für die chronische Phase der Arthritis Tag 21 bzw. Tag 63 ausgewählt. Zwischen d1 und d3 erreicht die Schwellung des Kniegelenks und damit die Stärke der akuten Entzündungsreaktion bei der AIA ihr Maximum, der Übergang zur chronischen Phase findet ab d7 statt. Die Schwere der Arthritis bei IFN- γ ^{-/-} Mäusen wurde mit der Erkrankung beim Wildtyp als Kontrolle verglichen.

4.2.1 Akute Phase (Tag 3)

Klinische Parameter (Gelenkschwellung, DTH, Histologie): Die i. a. Injektion des Antigens führte sowohl bei IFN- γ ^{-/-} Mäusen als auch beim Wildtyp zu einer Entzündungsreaktion, die zum Anschwellen des Gelenks führte. Das Maximum der

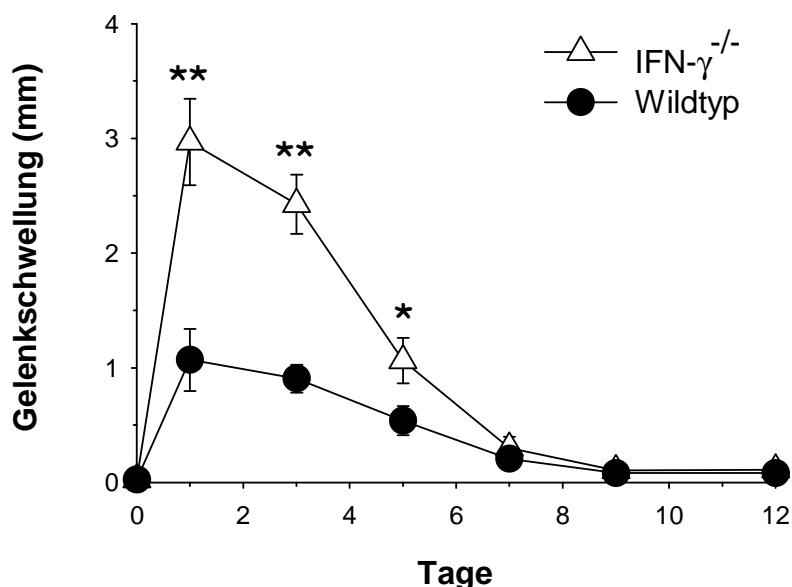


Abb. 14 Verlauf der Gelenkschwellung bei IFN- γ ^{-/-} Mäusen und beim Wildtyp.

Die Schwellung des Kniegelenks ist bei IFN- γ ^{-/-} Mäusen in der akuten Phase der AIA (Tag 1-5) gegenüber dem Wildtyp signifikant erhöht, nähert sich aber im Übergang zur chronischen Phase ab d7 der Kontrolle an (* p < 0,05, ** p < 0,01).

Schwellung war in beiden Gruppen an d1 zu beobachten und betrug bei den IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäusen ca. 3 mm, beim Wildtyp rund 1 mm (Abb. 14). Damit betrug die Zunahme des Gelenkdurchmessers infolge der hervorgerufenen Immunantwort gegen mBSA bei den IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäusen das Dreifache des Wertes der Kontrollgruppe. Die fehlende Möglichkeit einer IFN- γ -vermittelten Immunreaktion hatte somit schwere pathologische Konsequenzen, wie die nahezu Verdopplung des Gelenkdurchmessers innerhalb eines Tag zeigte. Bei einzelnen IFN- $\gamma^{-/-}$ Tieren wurden an d1 Schwellungen von 10 mm gemessen. Im Vergleich dazu beträgt bei einer Maus entsprechenden Alters der Durchmesser eines unbehandelten Knies 3,2-3,5 mm. Die ausgeprägte Entzündungsreaktion (Abb. 15) führte zu einer starken Beeinträchtigung der Motilität.

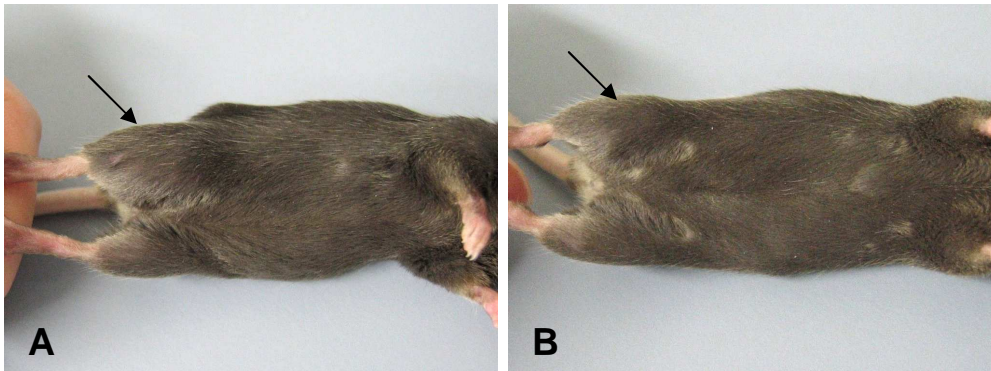


Abb. 15 Kniegelenk von IFN- $\gamma^{-/-}$ Maus und Wildtyp an d1 der AIA.

Schwellung des Kniegelenks einen Tag nach Auslösen der AIA bei einer IFN- $\gamma^{-/-}$ Maus (A) und beim Wildtyp (B). Die Entzündungsreaktion führte bei IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäusen zu einer sichtbar erhöhten Knieschwellung.

Während beim Wildtyp das arthritische Bein zumindest in eingeschränkter Form weiterhin zur Fortbewegung verwendet wurde und eine gewisse Beweglichkeit beibehielt, war dies bei den IFN- $\gamma^{-/-}$ Tieren nicht der Fall. Aufgrund der ausgeprägten Schwellung war ein Strecken der Extremität nicht mehr möglich und zur Bewegung wurden nur das unbehandelte linke Bein und die beiden Vorderextremitäten benutzt.

Nach drei Tagen ging in beiden Versuchsgruppen die Schwellung des Kniegelenks zurück und war gegen Ende der akuten Phase an d5 deutlich verringert, bei den IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäusen aber gegenüber dem Wildtyp immer noch signifikant erhöht. Zu Beginn der chronischen Phase an d7 war zwischen den beiden Gruppen kein Unterschied mehr messbar und jeweils noch ca. 0,3 mm Schwellung vorhanden.

Nach d7 betrug die Differenz zwischen gesundem und arthritischem Knie nur noch 0,05-0,1 mm. Diese Differenz blieb im weiteren Verlauf des Experiments bestehen.

Zur weiteren Untersuchung der Stärke der zellulären Immunantwort bei IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäusen wurde eine verzögerte Überempfindlichkeitsreaktion (DTH) am Ohr durchgeführt. Die intradermale Injektion einer geringen Menge (5 μ g) Antigen in die Ohrmuschel an d7 führte bei den IFN- $\gamma^{-/-}$ Tieren zu einer

Zunahme der Ohrdicke um 270 %, im Vergleich dazu nahm die Ohrdicke beim Wildtyp um 170 % zu (Abb. 16). Auch dieser Parameter zeigte, dass die Reaktion auf das Antigen bei bestehender Defizienz für IFN- γ aufgrund des Fehlens von durch IFN- γ vermittelten Effektormechanismen nicht zu einer Abschwächung, sondern zu einer Verstärkung der Immunantwort führte.

Als weitere Kenngröße zur Beurteilung der Schwere der Arthritis diente die histologische Bewertung von Kniegelenkschnitten. Schnitte von IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäusen aus der akuten Phase der AIA (d3) waren infolge der Entzündungsreaktion durch eine ausgeprägte zelluläre Infiltration gekennzeichnet (Abb. 17A). Beim Wildtyp war diese Migration von Immunzellen ins Gelenk deutlich verringert (Abb. 17B). Lichtmikroskopisch erkennbar bestand das zelluläre Infiltrat zu einem großen Teil aus polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten.

Auch in der frühen Phase der AIA finden bereits knorpeldegradierende Prozesse statt. Die Färbung von Kniegelenkschnitten von d3 mit Safranin O zeigte bei IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäusen einen tendenziell verstärkten Verlust von Proteoglykanen in der nicht mineralisierten oberen Schicht des Knorpels (Abb. 17C). Im Wildtyp erschien die obere Schicht des Knorpels aufgrund der vermehrt vorhandenen anfärbbaren Proteoglykane dunkler (Abb. 17D).

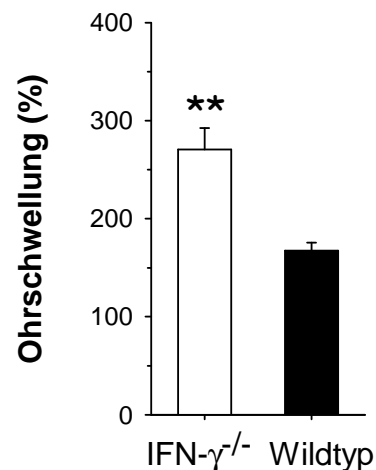


Abb. 16 Verzögerte Überempfindlichkeitsreaktion. Die Schwellung am Ohr nach intradermaler Injektion von 5 μ g mBSA war bei IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäusen signifikant erhöht (** p < 0,01).

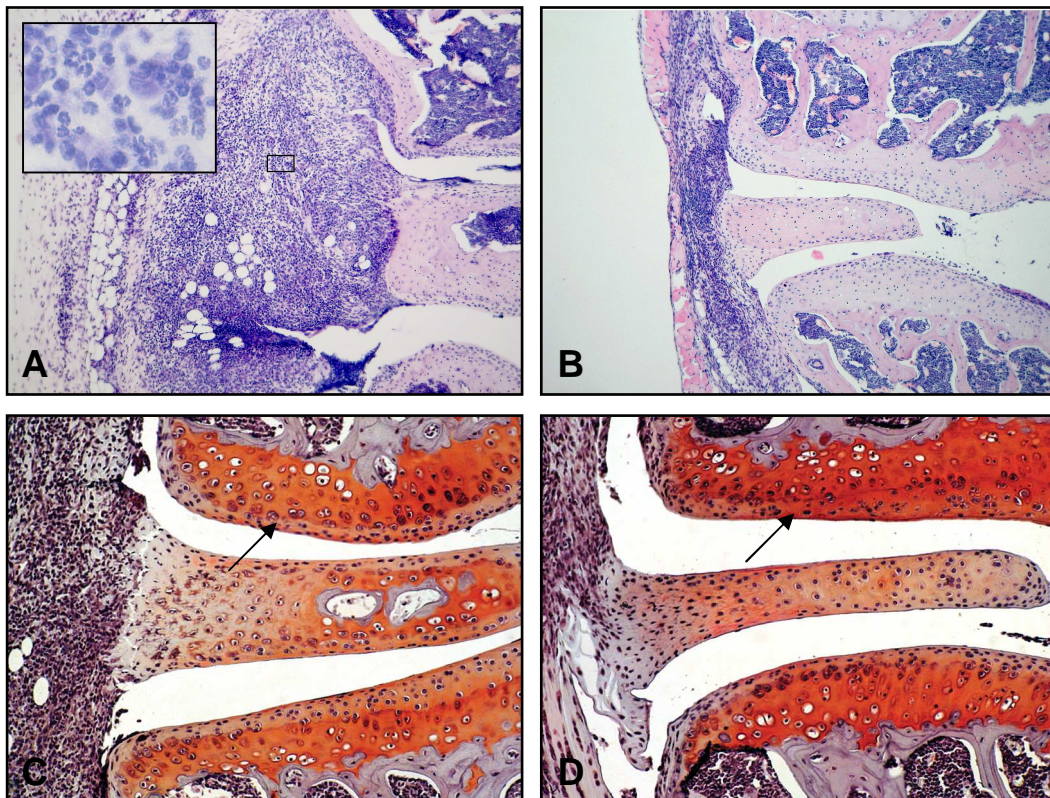


Abb. 17 Histologie der akuten Arthritis (d3) bei IFN- γ ^{-/-} Mäusen und Wildtyp. Die zelluläre Infiltration von Immunzellen in das Kniegelenk in der akuten Phase der AIA war bei IFN- γ ^{-/-} Mäusen (A) gegenüber dem Wildtyp (B) verstärkt. Das Infiltrat bestand vorwiegend aus polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (A; Ausschnitt). HE-Färbung, 25-fache Vergrößerung. Proteoglykane im Gelenkknorpel wurden bei IFN- γ ^{-/-} Mäusen (C) gegenüber dem Wildtyp (D) vermehrt freigesetzt. Safranin O-Färbung, 100-fache Vergrößerung.

Die semiquantitative Bewertung der mit Hämatoxylin und Eosin gefärbten Kniegelenkschnitte anhand der Parameter für akute Entzündung, chronische Entzündung und Destruktion ergab einen höheren Arthritis-Index für IFN- γ ^{-/-} Mäuse gegenüber den Mäusen vom Wildtyp (Abb. 18). Der Parameter für akute Entzündung (Granulozyteninfiltration, Exsudat) war bei den IFN- γ ^{-/-} Mäusen signifikant erhöht, während der Wert für die chronische Entzündung (synoviale Hyperplasie, Monozyteninfiltration, Fibrose) zwar leicht, aber statistisch nicht mehr signifikant erhöht war. Dasselbe war für den Parameter Destruktion von Knorpel und Knochen der Fall, wobei die absoluten Werte für diesen Parameter in dieser frühen Phase der Arthritis erwartungsgemäß gering waren. Der durch die Safranin O-Färbung gezeigte verstärkte Verlust von Proteoglykanen bei IFN- γ ^{-/-} Mäusen wurde hierdurch bestätigt. Der Gesamt-Arthritis-Index als Summe aller Parameter und damit die Schwere der Arthritis war bei den IFN- γ ^{-/-} Mäusen signifikant erhöht.

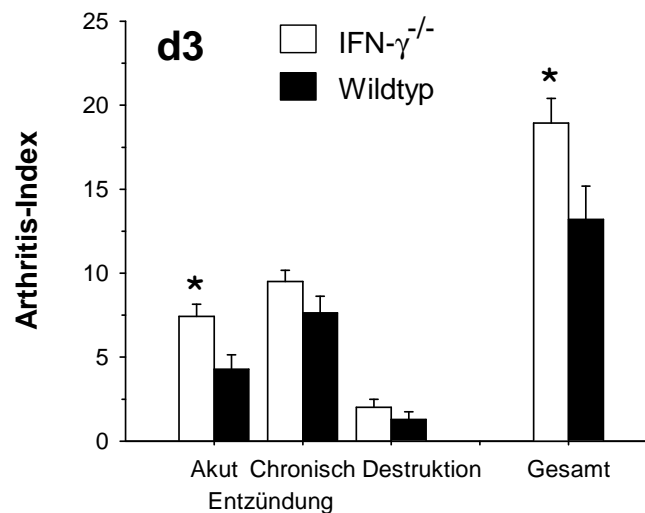


Abb. 18 Histologische Bewertung der akuten Arthritis an d3.

Die Parameter für akute Entzündung, chronische Entzündung und Destruktion, sowie der Gesamt-Arthritis-Index waren bei IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäusen erhöht (* $p < 0,05$).

Um eine detailliertere Aussage zur Zusammensetzung des ausgeprägten zellulären Infiltrats bei IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäusen in der akuten Phase der AIA treffen zu können, wurden immunhistochemische Untersuchungen von Kniegelenken von d1 durchgeführt. Anhand von Antikörpern, die an charakteristische Oberflächenmoleküle der jeweiligen Zelltypen spezifisch binden und einer enzymatischen Farbreaktion wurden die infiltrierenden Zellen weiter differenziert. Ein großer Teil der Zellen war positiv für Mac-1 (Abb. 19B). Dieser Oberflächenmarker wird von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten exprimiert. Die Färbung gegen F4/80 (Makrophagen; Abb. 19C) und Gr-1 (neutrophile Granulozyten; Abb. 19D) zeigte, dass die Mac-1 exprimierende Zellpopulation zum größten Teil aus Gr-1⁺ neutrophilen Granulozyten bestand. In geringerem Maße waren in den Gelenken auch CD4⁺ Th-Zellen (Abb. 19E) und B220⁺ B-Zellen (Abb. 19F) zu finden. Die immunhistochemische Analyse der Zusammensetzung des zellulären Infiltrats bestätigte somit den lichtmikroskopischen Befund (Abb. 17A), wonach das Fehlen von IFN- γ in der akuten Phase der AIA im Rahmen der Entzündungsreaktion zu einer verstärkten Einwanderung von polymorphonukleären neutrophilen Granulozyten in das Gelenk und in das periartikuläre Gewebe führte.

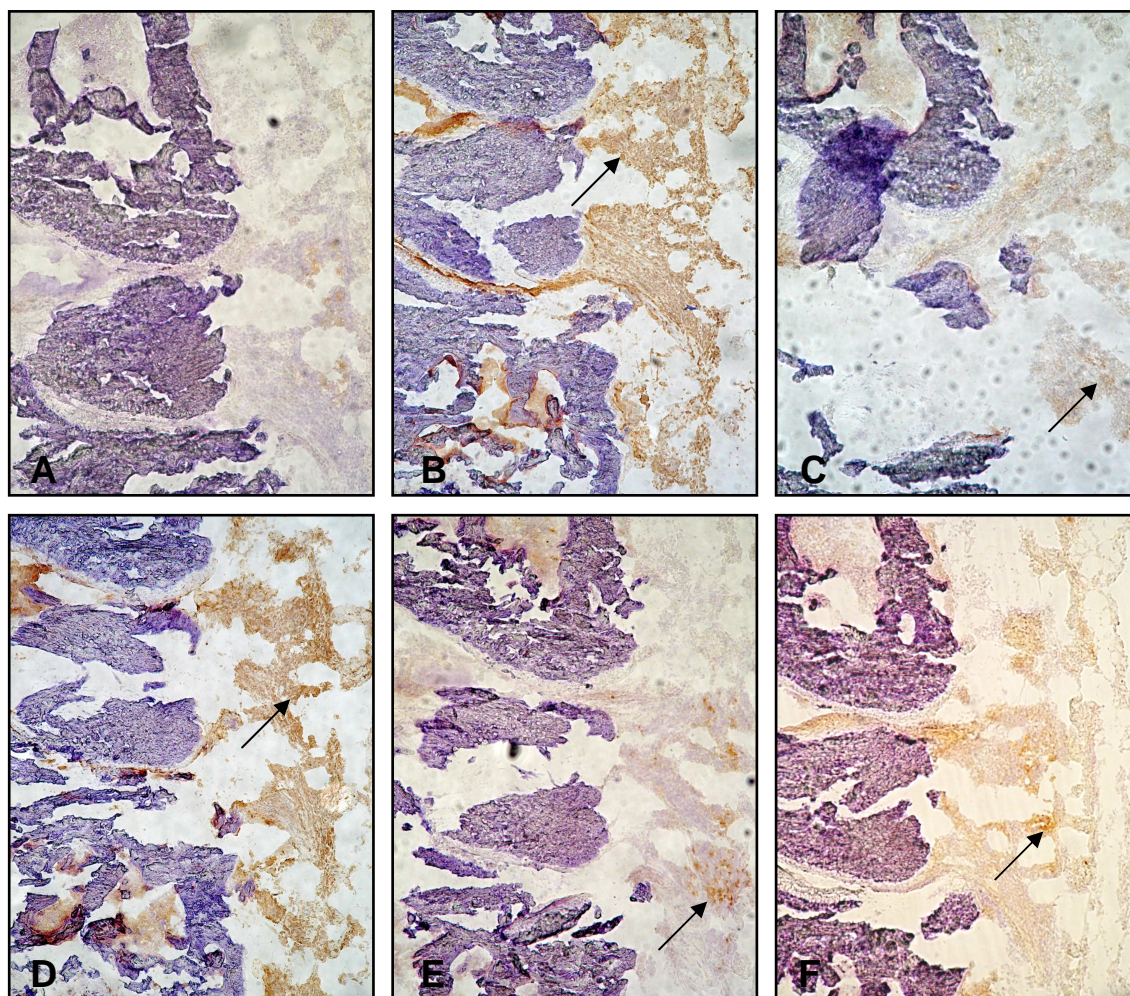


Abb. 19 Immunhistochemische Färbung von Gelenkschnitten von IFN- γ ^{-/-} Mäusen (d1). Immunhistochemische Färbung von charakteristischen Oberflächenmolekülen zur Bestimmung der Zusammensetzung des zellulären Infiltrats. (A) Kontrolle. (B) Mac-1: Makrophagen und neutrophile Granulozyten. (C) F4/80: Makrophagen. (D) Gr-1: neutrophile Granulozyten. (E) CD4: Th-Zellen. (F) B220: B-Zellen. PO-Färbung, 50-fache Vergrößerung.

Immunologische Parameter (Antikörper, Zytokine): Neben den klinischen wurden auch immunologische Parameter benutzt, um die AIA bei IFN- γ ^{-/-} Mäusen zu charakterisieren. Es wurden antigenspezifische, gesamte und gegen Knorpelbestandteile gerichtete Antikörper im Serum gemessen. Weiterhin wurden Zytokine im Serum, in Kulturüberständen von Lymphknoten- und Milzzellen und in Gelenkextrakten aus der akuten Phase der AIA bestimmt. In den Gelenkextrakten wurden auch Matrixmetalloproteasen untersucht.

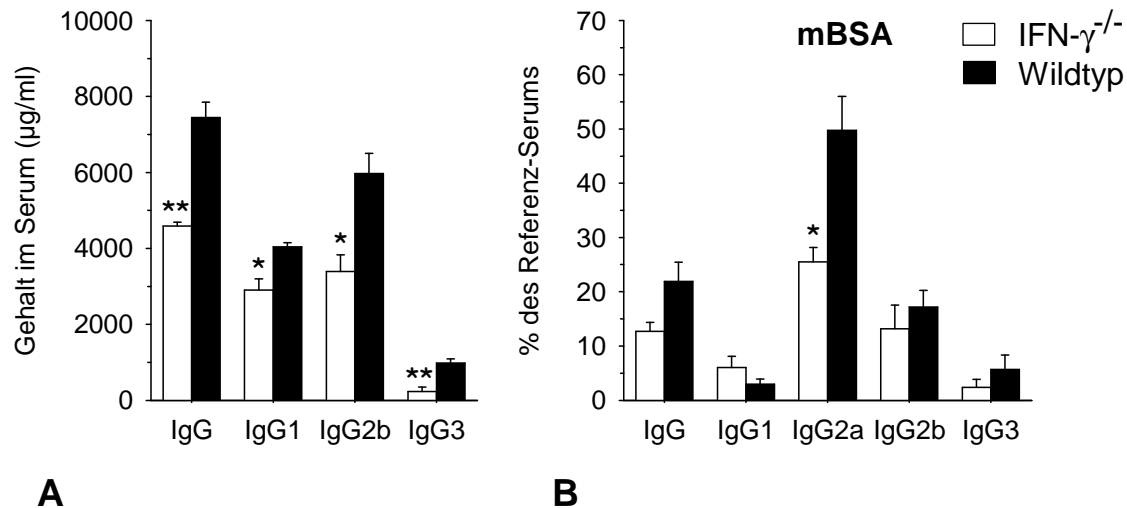


Abb. 20 Gesamt- und mBSA-spezifische IgG im Serum bei der akuten AIA (d3). Im Vergleich zum Wildtyp sind bei IFN- $\gamma^{-/-}$ Tieren die Titer für IgG, IgG1, IgG2b und IgG3 signifikant verringert (A). Von den mBSA-spezifischen IgG ist IgG2a signifikant reduziert (B) (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Antikörper spielen bei der CIA eine wichtige Rolle, der Transfer von Serum oder bestimmten, gegen Kollagen II gerichteten IgG-Subklassen ermöglicht die Übertragung der Arthritis auf gesunde Tiere. Um zu überprüfen, ob bei der AIA die verstärkte Immunantwort bei IFN- $\gamma^{-/-}$ Tieren auf erhöhte Werte von Antikörpern zurückzuführen ist, wurde im Serum mittels ELISA IgG bestimmt. Dabei wurden

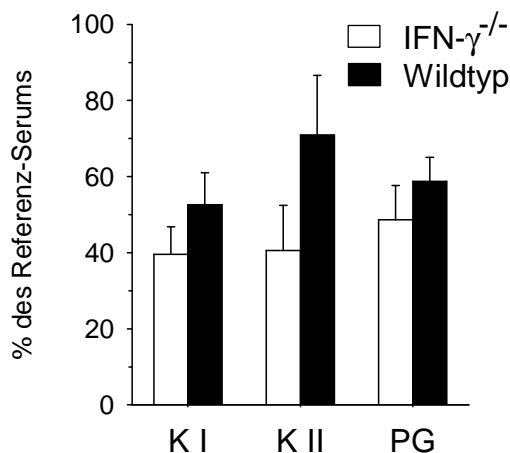


Abb. 21 Antikörper gegen Bestandteile der Knorpelmatrix (d3).

In der akuten Phase der AIA sind die Werte für Autoantikörper gegen Kollagen I (K I), Kollagen II (K II) und Proteoglykane (PG) im Serum von IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäusen erniedrigt.

sowohl die absoluten Mengen der verschiedenen Isotypen von IgG als auch antigenspezifische (mBSA, Kollagen I, Kollagen II, Proteoglykane) Isotypen bestimmt.

Die Spiegel von Gesamt-IgG und den Isotypen IgG1, IgG2b, IgG3 waren an d3 im Serum von IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäusen gegenüber dem Wildtyp signifikant verringert (Abb. 20A). Da für IgG2a nur ein biotinylierter Antikörper für den IgG2a^b-Subtyp von C57Bl/6 Mäusen kommerziell erhältlich war, konnte IgG2a nur antigenspezifisch gemessen werden.

Auch bei den gegen mBSA gerichteten Antikörpern waren die Werte von Gesamt-IgG, IgG2a, IgG2b und IgG3 erniedrigt, wobei der Unterschied zwischen den beiden Gruppen allerdings nur bei dem durch IFN- γ induzierten IgG2a statistisch signifikant war (Abb. 20B). Der Spiegel von mBSA-spezifischem IgG1 war bei IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäusen höher. Die Werte von gegen mBSA, Kollagen I, Kollagen II und Proteoglykane gerichtetem IgG beziehen sich auf ein als Referenz dienendes gepooltes Serum von Mäusen vom Wildtyp von d7 der AIA. Bei den Antikörpern gegen Knorpelbestandteile zeigte sich bei den IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäusen an d3 eine tendenzielle Verringerung ohne statistische Signifikanz. Insbesondere die Autoantikörper gegen Kollagen II, einem Hauptbestandteil des Knorpels, aber auch für Kollagen I und Proteoglykane spezifische Antikörper waren gegenüber dem Wildtyp erniedrigt (Abb. 21). Demzufolge kann eine verstärkte humorale Immunantwort nicht die Ursache für die verstärkte Entzündungsreaktion bei IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäusen sein.

Da die humorale Immunantwort in IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäusen nicht erhöht, sondern reduziert war und die DTH-Reaktion auf eine erhöhte zelluläre Immunreaktivität hindeutete, wurden *in vitro* in den Überständen von Lymphknoten- und Milzzellen die nach Stimulation sezernierten Zytokine bestimmt. Um festzustellen, ob einzelne oder alle Th-Subpopulationen erhöhte Aktivierungszustände aufwiesen, wurden neben den Th1-Zytokinen IFN- γ und IL-2 die Th2-Zytokine IL-4, IL-5, IL-10 sowie IL-6 und IL-17 gemessen (Abb. 22).

In den Überständen von Lymphknoten- und Milzzellen von d3 der AIA, die antigenspezifisch mit mBSA oder über den TCR mit immobilisierten anti-CD3-Antikörpern stimuliert wurden, waren bei IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäusen IL-2, IL-4, IL-5 und IL-17 erhöht. Die Konzentration an IL-5 war in den Überständen von mBSA-stimulierten Milzzellen unterhalb des Messbereichs von 10 pg/ml. IFN- γ konnte erwartungsgemäß bei Zellen aus IFN- $\gamma^{-/-}$ Tieren nicht nachgewiesen werden. Die Mengen an sezerniertem IL-6 und IL-10 waren bei Lymphknotenzellen gering, jedoch war beides bei anti-CD3-stimulierten Milzzell-Kulturen von IFN- $\gamma^{-/-}$ Tieren und IL-6 ebenso nach antigenspezifischer Stimulation erhöht.

Interessanterweise waren sowohl das Th1-Zytokin IL-2 als auch die Th2-Zytokine IL-4 und IL-5 bei IFN- $\gamma^{-/-}$ Zellen erhöht. Besonders auffallend waren große Mengen an sezerniertem IL-17 als Reaktion auf die Stimulation. Das Zytokinprofil zeigt, dass nicht einzelne Th-Zell-Subpopulationen überdurchschnittlich aktiviert waren, sondern

weist auf eine generelle Steigerung der zellulären Immunreaktivität bei $\text{IFN-}\gamma^{-/-}$ Mäusen hin.

In die Untersuchung des zellulären Immunreaktivität wurden auch die Zytokine im Serum mit einbezogen und mittels des ProteoPlex® 16-Well Murine Cytokine Array von Novagen gemessen. Der Kit erlaubt das gleichzeitige Bestimmen der Zytokine IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p70, GM-CSF, IFN- γ und TNF- α in einer Probe. Da allerdings die automatisierte Auswertung und Berechnung der Standardkurve für IFN- γ bei $\text{IFN-}\gamma^{-/-}$ Mäusen zu Serumkonzentrationen in der Größenordnung von mehreren tausend Pikogramm führte, während mittels ELISA bei

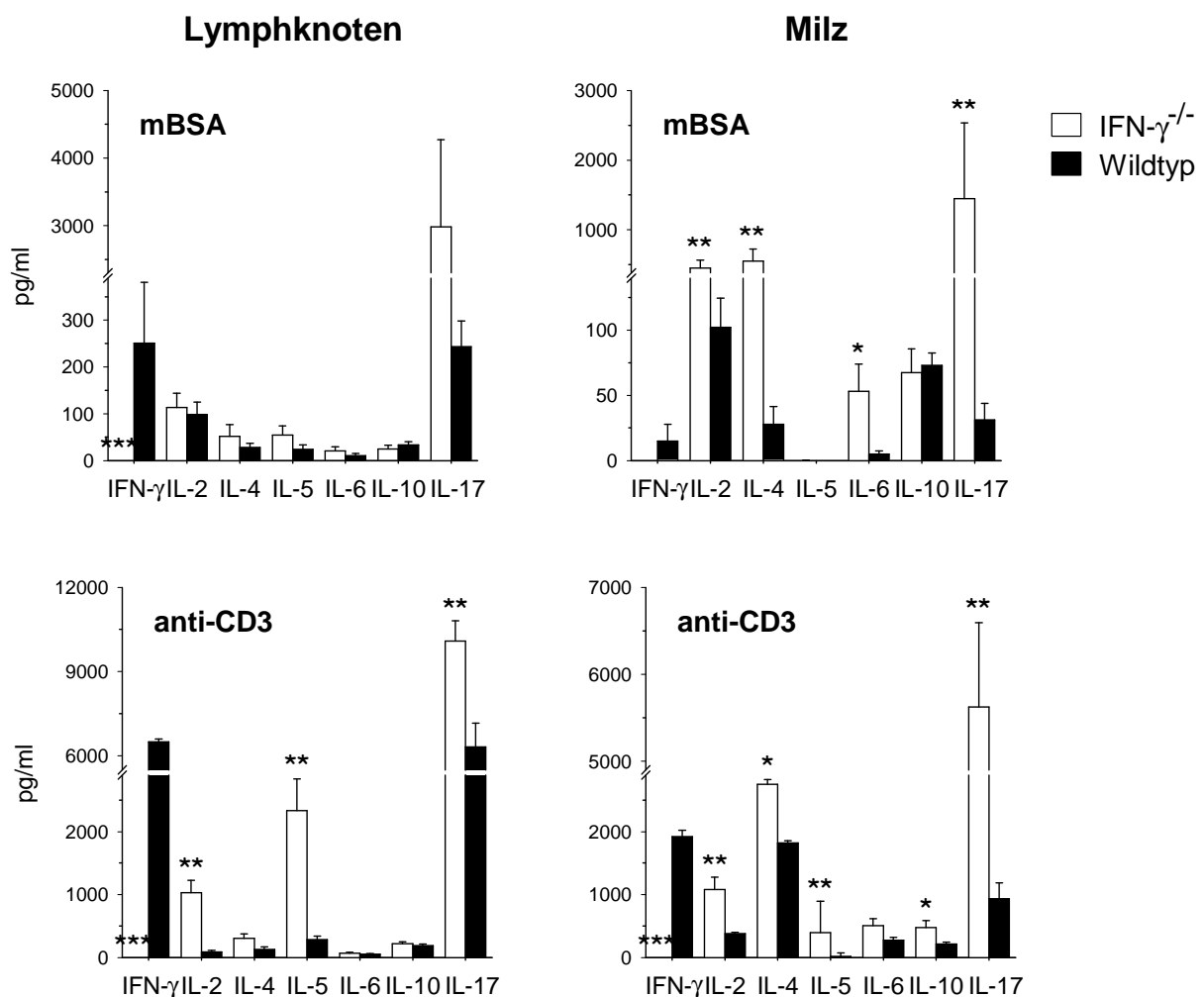


Abb. 22 Zytokine in Überständen von Lymphknoten- und Milzzellen (d3).

In den Überständen von Lymphknoten- und Milzzellen von $\text{IFN-}\gamma^{-/-}$ Mäusen und Wildtyp wurden die nach Stimulation mit mBSA oder anti-CD3 sezernierten Zytokine gemessen. Die erhöhte zelluläre Reaktivität bei $\text{IFN-}\gamma^{-/-}$ Mäusen war insbesondere durch eine ausgeprägte Sekretion von IL-17 gekennzeichnet (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Zellen aus $\text{IFN-}\gamma^{-/-}$ Mäusen im Gegensatz zu Zellen aus dem Wildtyp nie eine $\text{IFN-}\gamma$ -Sekretion festgestellt werden konnte, wurde $\text{IFN-}\gamma$ nach Überprüfung aller Standardkurven nicht in die Auswertung mit einbezogen. Entgegen der stärkeren Zytokinproduktion bei Lymphknoten- und Milzzellen nach Stimulation mit dem Antigen mBSA oder über den TCR war die Konzentration an Zytokinen im Serum und damit der systemische Aktivierungszustand bei $\text{IFN-}\gamma^{-/-}$ Mäusen generell verringert. Außer bei $\text{IL-1}\beta$ war dies bei den proinflammatorischen Zytokinen $\text{IL-1}\alpha$, IL-6 , IL-12 , GM-CSF und $\text{TNF-}\alpha$ der Fall, aber auch bei IL-2 und den antiinflammatorischen Zytokinen IL-4 und IL-10 (Abb. 23). Für IL-10 , GM-CSF und $\text{TNF-}\alpha$ waren diese Unterschiede statistisch signifikant. Die mit einer erhöhten Migration von neutrophilen Granulozyten zum Entzündungsherd verbundene verstärkte Entzündungsreaktion bei $\text{IFN-}\gamma^{-/-}$ Mäusen wurde somit nicht über eine erhöhte systemische Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine verursacht. Zwischen den Prozessen im Gelenk und den Zytokinen im Serum bestanden bei der AIA keine offensichtlichen Korrelationen.

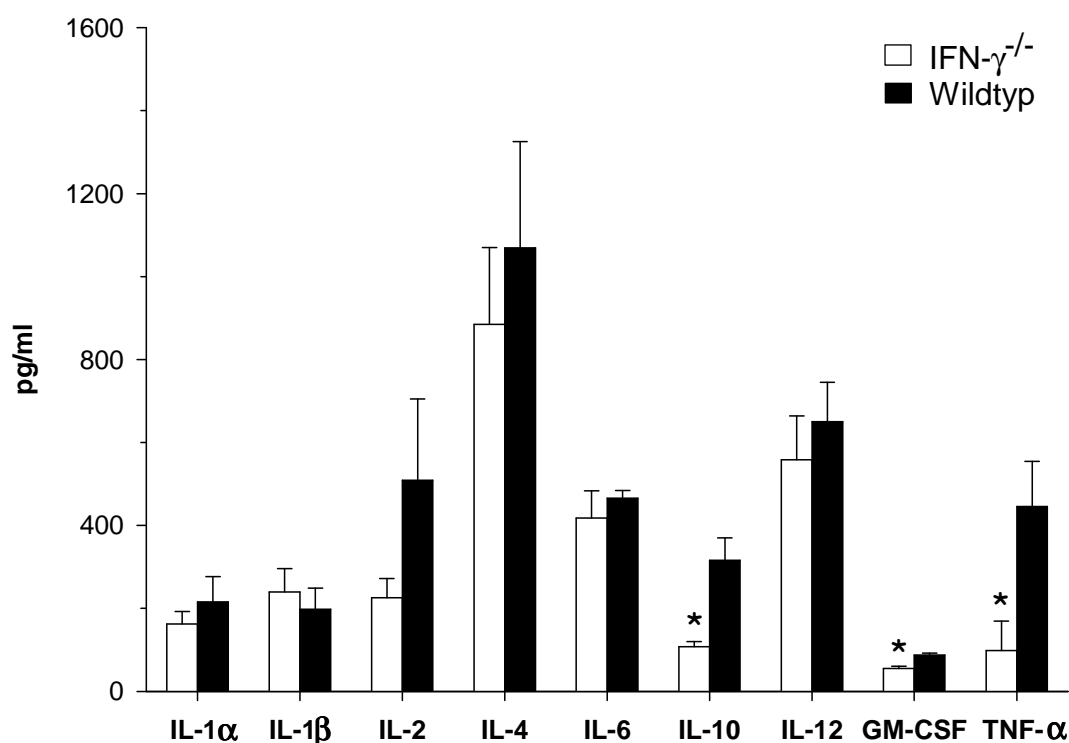


Abb. 23 Zytokine im Serum bei der akuten AIA (d3).

Im Serum von Mäusen mit akuter Arthritis wurden mit dem ProteoPlex® Cytokine Array Zytokine bestimmt. Im Gegensatz zu $\text{IL-1}\beta$ waren $\text{IL-1}\alpha$, IL-2 , IL-4 , IL-6 , IL-10 , IL-12 , GM-CSF und $\text{TNF-}\alpha$ bei den $\text{IFN-}\gamma^{-/-}$ Tieren erniedrigt (* $p < 0,05$).

Um die lokale Beteiligung proinflammatorischer Zytokine an der akuten Phase der AIA im Gelenk zu untersuchen, wurden IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-17 und TNF- α in Gelenkextrakten von d3 AIA mit ELISA bestimmt. Die gemessene Menge an Zytokin wurde auf die Menge des isolierten Gesamtproteins berechnet. Die dabei erhaltenen Unterschiede zwischen den beiden Gruppen wichen nur geringfügig von den Ergebnissen bei Betrachtung der absoluten Mengen an isolierten Zytokinen ab.

Es zeigte sich, dass vor allem größere Mengen an IL-1 β und IL-6 im Gelenk zu finden waren, wobei IL-1 β bei IFN- γ ^{-/-} Mäusen erhöht, IL-6 aber erniedrigt war. Weiterhin waren IL-12 und IL-17 vorhanden, während TNF- α in nur geringem Umfang festzustellen war (Abb. 24A). Aufgrund der Heterogenität der Ergebnisse konnte bei keinem der Zytokine das Signifikanzniveau von $p < 0,05$ erreicht werden. Für IL-6 und IL-17 war $p < 0,10$. Wie die Berechnung der Relation der Zytokine ergab, war IL-6 bei IFN- γ ^{-/-} Mäusen im Vergleich zum Wildtyp um 50 % verringert, TNF- α und IL-1 β um 30 % und IL-12 um 100 % erhöht. Besonders prägnant war die Erhöhung von > 250 % bei IL-17 (Abb. 24B).

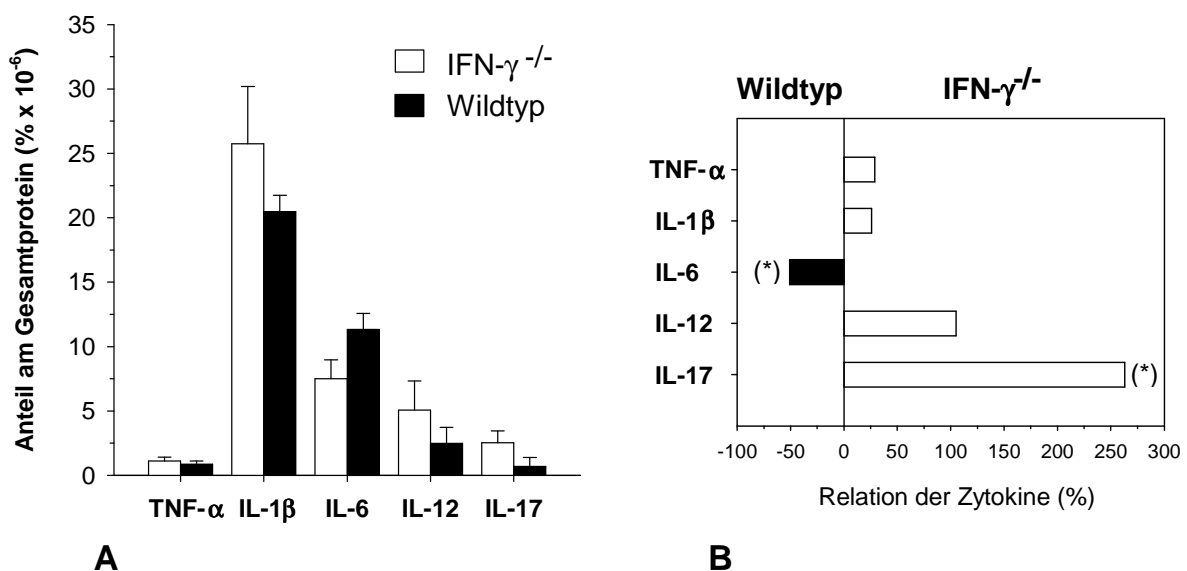


Abb. 24 Zytokine in Gelenkextrakten aus der akuten AIA (d3).

Die proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-1 β , IL-12 und IL-17 in Gelenkextrakten aus der akuten AIA waren bei IFN- γ ^{-/-} Mäusen bezogen auf das isolierte Gesamtprotein erhöht, IL-6 war erniedrigt (A). Im Verhältnis zum Wildtyp war insbesondere für IL-17 eine deutlich verstärkte Sekretion (B) zu erkennen ((* $p < 0,1$).

Die Verschiebung der Zytokinbalance in Richtung einer verstärkten IL-17-vermittelten Immunantwort in Gelenkextrakten von IFN- γ ^{-/-} Mäusen entsprach den Ergebnissen aus den Überständen von Lymphknoten- und Milzzellen. Hier führte die antigenspezifische Stimulation insbesondere zur Sekretion von IL-17 (Abb. 22). Die Berechnung der Relation der Zytokinmengen ergab, dass die Stimulation mit mBSA bei Lymphknotenzellen im Vergleich zum Wildtyp die Sekretion der 12-fachen, bei Milzzellen der 46-fachen Menge an IL-17 induzierte (Tab. 9). Andere Zytokine waren in den Überständen bei Lymphknotenzellen um das bis zu 2,3-fache, bei Milzzellen um maximal das 20-fache erhöht.

Tab. 9 Zytokine in Überständen von antigenspezifisch stimulierten Zellen aus IFN- γ ^{-/-} Mäusen in Relation zum Wildtyp (%).

	IFN- γ	IL-2	IL-4	IL-5	IL-6	IL-10	IL-17
<i>Lymphknoten</i>	-	120	190	230	200	70	1230
<i>Milz</i>	-	440	1990	-	1060	90	4630

Weiterhin wurden in den Gelenkextrakten mittels Zymographie die Matrixmetalloproteasen MMP-2, MMP-3 und MMP-9 verglichen (Abb. 25). Zur Bestimmung von MMP-2 und MMP-9 wurden dazu für die Elektrophorese Gele mit Elastin, für MMP-3 Gele mit Casein als Substrat benutzt. Ein mitgeführter Molekulargewichtsmarker diente der Zuordnung der MMP. Nach Auftrennung der Proben fand ein Abbau des Substrats statt, wodurch nach Anfärben abhängig von der Menge an Enzym helle Banden entstanden. Zwischen den Proben aus beiden Gruppen ließen sich hinsichtlich der Stärke und Helligkeit der Banden und damit für die Menge an MMP in d3 Gelenkextrakten keine Unterschiede feststellen.

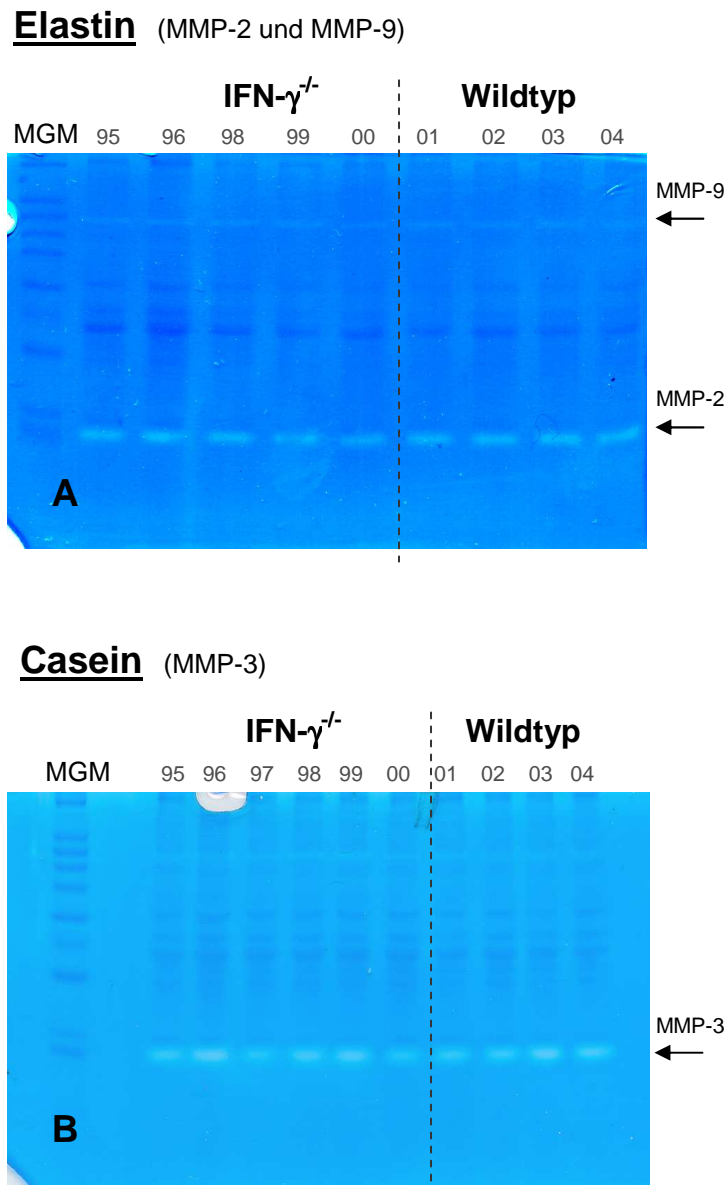


Abb. 25 Matrixdegradierende Proteasen in Gelenkextrakten (d3).

Gelenkextrakte aus der akuten AIA wurden mittels Zymographie auf aktive Proteasen untersucht. Die Menge an MMP-2 und MMP-9 (A) bzw. MMP-3 (B) in Extrakten aus Gelenken von IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäusen entsprach der Menge an MMP beim Wildtyp. MGM, Molekulargewichtsmarker.

4.2.2 Chronische Phase (Tag 21 und Tag 63)

IFN- γ hat über die Regulation des Liganden für RANK direkten Einfluss auf die Osteoklastogenese und bewirkt *in vitro* bei stimulierten synovialen Fibroblasten die Sekretion von Stickstoffmonoxid (NO) und proinflammatorischem IL-6, hemmt aber abhängig von den Kulturbedingungen auch die Sekretion von MMP (KOTAKE ET AL., 2005; HÜCKEL, 2003). Aufgrund dieser Eigenschaften wurde untersucht, ob das Fehlen von IFN- γ nicht nur in der akuten, sondern auch in der chronischen Phase auf den Verlauf und die Schwere der AIA Einfluss hat.

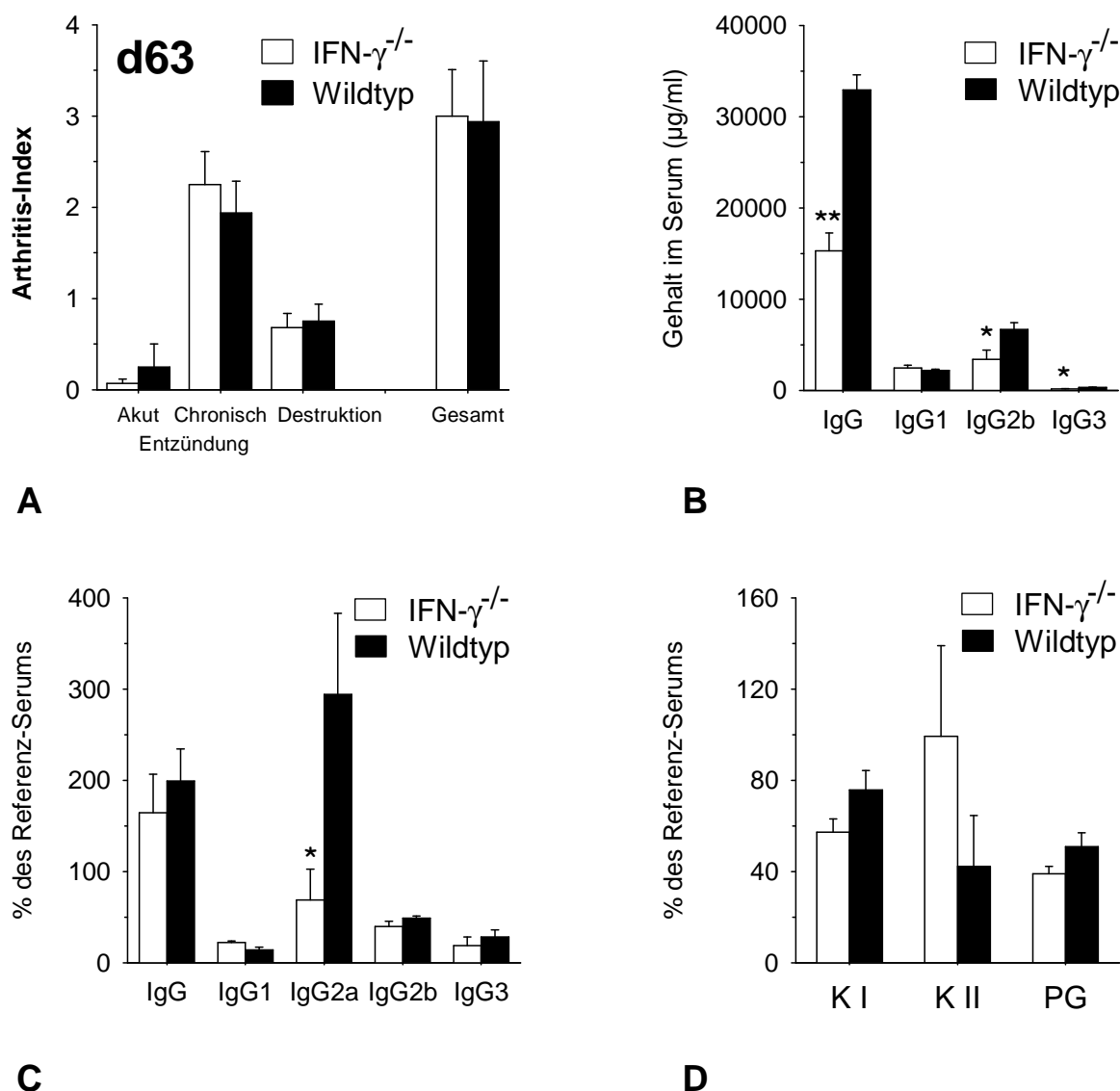


Abb. 26 Chronische AIA bei IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäusen.

Bei der Schwere der Arthritis zeigte sich in der chronischen Phase der AIA an d63 kein histologischer Unterschied zwischen IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäusen und Wildtyp (A). Gesamt-IgG (B) und mBSA-spezifisches IgG2a (C) waren an d21 signifikant erniedrigt. Antikörper gegen Kollagen I (K I) und Proteoglykane (PG) waren verringert, gegen Kollagen II (K II) erhöht (D) (* p < 0,05, ** p < 0,01).

Um für die histologische Bewertung der späten chronischen AIA dem Krankheitsbild der schubweise verlaufenden RA möglichst zu entsprechen, wurden bei den Mäusen an d21 und d42 mit einer erneuten i. a. Applikation von 25 µg mBSA zwei weitere akute Entzündungsschübe hervorgerufen („Flare-up“). An d63 wurden die Tiere präpariert und Kniegelenkschnitte angefertigt. Die histologische Bewertung ergab hinsichtlich der Schwere der chronischen Arthritis keinen Unterschied zwischen IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäusen und Wildtyp. Bei beiden Mauslinien war die akute Entzündung fast vollständig zurückgegangen, während chronische Entzündung und Destruktion ausgeprägt vorhanden waren. Hierbei entsprachen sich die Werte des Arthritis-Index bei beiden Gruppen jedoch nahezu (Abb. 26A).

Die Bewertung der Antikörper im Serum erfolgte in der chronischen Phase an d21 nach Auslösen der Arthritis. Individuelle Verlaufsstudien zeigten, dass die Antikörpertiter nach Abschluss der Immunisierungsphase maximale Werte annahmen und danach rückläufig waren (EILENSTEIN, 2006). Bei den Antikörpern im Serum zeigte sich ein ähnliches Muster wie in der akuten Phase an d3. Die Werte für die IgG-Isotypen waren bei den IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäusen mit Ausnahme des ohnehin nur wenig vorhandenen IgG1 erniedrigt (Abb. 26B). Außer für IgG2a war diese Verringerung bei den Antikörpern gegen mBSA nicht signifikant (Abb. 26C). Die gegen Kollagen I und Proteoglykane gerichteten Antikörper waren ebenfalls reduziert, nicht jedoch die gegen Kollagen II gerichteten Antikörper (Abb. 26D). Hier hatte sich infolge der Knorpeldegradation im Vergleich zu d3 das Verhältnis von IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäusen zum Wildtyp umgekehrt.

4.2.3 Suszeptibilität für CIA bei IFN- $\gamma^{-/-}$ C57Bl/6 Mäusen

Die Suszeptibilität für die experimentelle Arthritis ist, ähnlich der genetischen Prädisposition der humanen RA, bei vielen murinen Tiermodellen oftmals abhängig vom Haplotyp der MHC-Moleküle der jeweiligen Mausstämme. Für die CIA ist bekannt, dass der aufgrund seines Haplotyps normalerweise nicht suszeptible Stamm C57Bl/6 (H-2^b) eine CIA entwickelt, wenn eine Defizienz für das Zytokin IFN- γ besteht (GUEDEZ ET AL., 2001; CHU ET AL., 2003). Um dieses Ergebnis unter den laborspezifischen Bedingungen und mit den vorhandenen Mauspopulationen zu verifizieren, wurde mit den für die Charakterisierung der AIA verwendeten IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäusen eine CIA durchgeführt.

Die Tiere wurden gemäß dem Immunisierungsschema der CIA mit einer subkutanen Injektion von 100 µg Kollagen II in 100 µl CFA/10 mM Essigsäure (supplementiert auf 2 mg/ml *Mycobacterium tuberculosis*) behandelt und täglich auf eine arthritische Schwellung der Pfoten an Vorder- und Hinterextremitäten kontrolliert. Die Pfoten wurden entsprechend der Entzündung anhand einer Skala von 0-3 bewertet, was für den kumulativen Arthritis-Index je Tier ein Maximum von 12 Punkten und je Gruppe à 15 Tiere ein Maximum von 180 ergab.

Es zeigte sich, dass sich bei keiner Maus vom Wildtyp eine sichtbare CIA manifestierte. Bei den IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäusen hingegen wiesen 27 Tage nach der 1. Immunisierung 7 % der Tiere eine Entzündung an einer oder mehreren Pfoten auf (Abb. 27). Nach 62 Tagen waren 40 % der Tiere betroffen. Der kumulative Arthritis-Index stieg in der Zeit von d27 bis d62 von 1 auf 17 an. Die in der Literatur beschriebene höhere Inzidenz und Arthritisschwere ist auf das Verwenden wesentlich höherer Konzentrationen von *Mycobacterium tuberculosis* als Adjuvans und individuelle Unterschiede bei der Bewertung der Arthritis zurückzuführen.

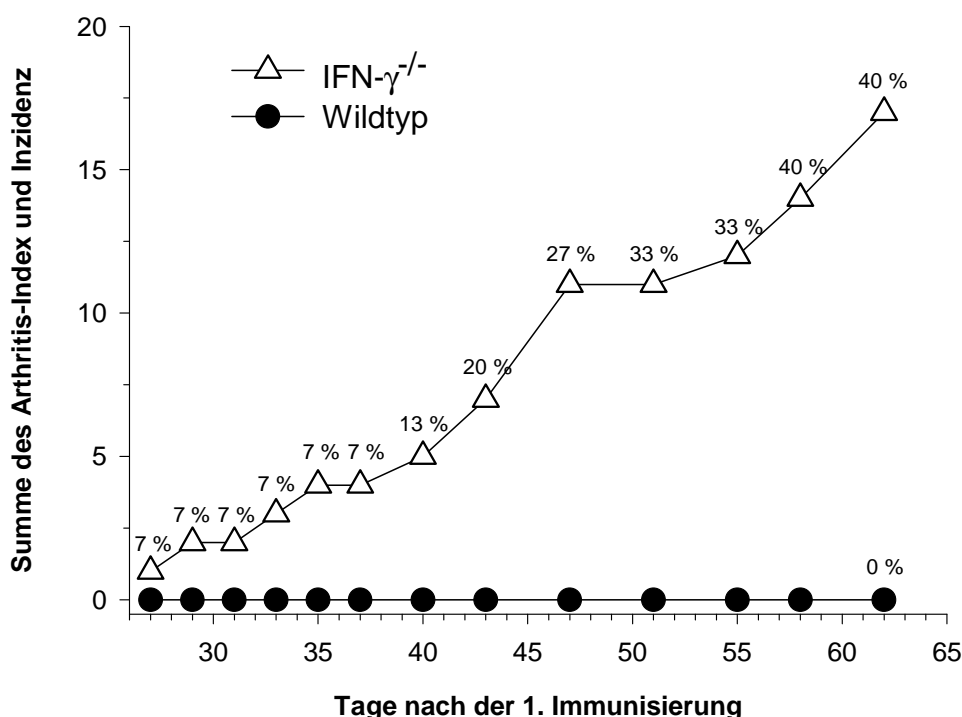
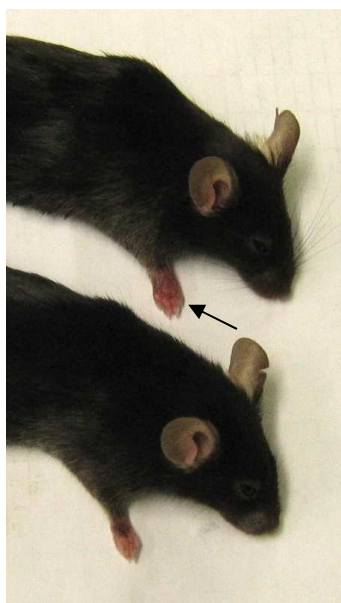


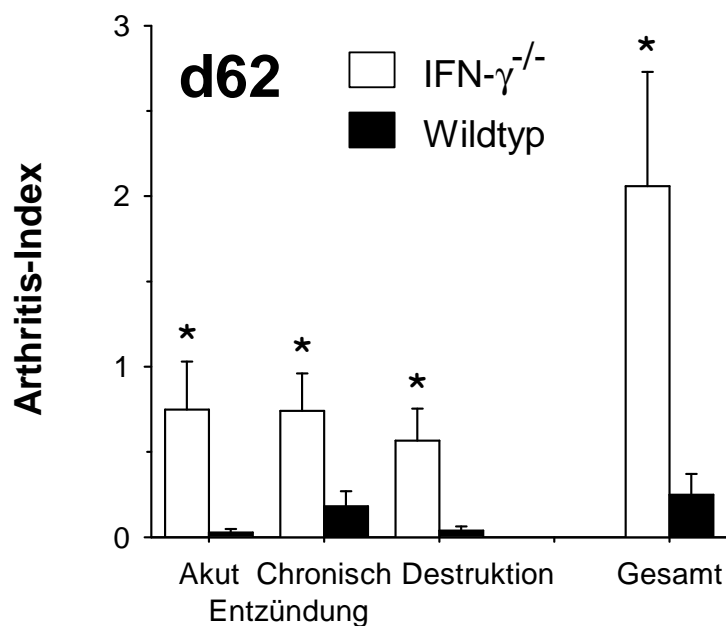
Abb. 27 Schwere und Inzidenz der CIA bei IFN- $\gamma^{-/-}$ C57Bl/6 Mäusen.

Während der Wildtyp von C57Bl/6 für CIA nicht suszeptibel war, wiesen an d62 bei den IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäusen 40 % der Tiere eine Arthritis auf. Der kumulative Arthritis-Index der Gruppe stieg dabei von 0 auf 17 Punkte.

Nach 62 Tagen wurde das Experiment beendet und die Schwere der Arthritis in den Pfoten histologisch bewertet. Die Schwere der Arthritis war bei den IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäusen gegenüber dem nicht suszeptiblen Wildtyp erhöht. Sowohl bei der akuten und chronischen Entzündung, als auch bei der Destruktion und dem Gesamt-Arthritis-Index waren die Unterschiede signifikant (Abb. 28). Absolut betrachtet war die Entzündung beim Wildtyp nur sehr schwach ausgeprägt und der Gesamt-Arthritis-Index bei IFN- $\gamma^{-/-}$ Tieren um das 8-fache erhöht. Die Ergebnisse der histologischen Bewertung entsprachen somit den Befunden der makroskopischen Bewertung der Pfotenschwellung. Das Fehlen einer durch IFN- γ vermittelten Immunantwort ermöglicht bei C57Bl/6 Mäusen unabhängig von dem ansonsten für die Suszeptibilität wichtigen Haplotyp das Entstehen einer CIA.



A



B

Abb. 28 Arthritis-Index der CIA bei IFN- $\gamma^{-/-}$ C57Bl/6 Mäusen.

Der Wildtyp C57Bl/6 war für die CIA nicht suszeptibel. Bei den IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäusen kam es zu einer mit einer starken Schwellung verbundenen Entzündung der Pfoten (A). Die Parameter akute und chronische Entzündung sowie Destruktion und Gesamt-Index waren an d62 bei IFN- $\gamma^{-/-}$ Tieren signifikant erhöht (B) (* p < 0,05).

4.2.4 Zusammenfassung

Das Fehlen von durch IFN- γ vermittelten Signalwegen und Effektormechanismen hatte bei IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäusen auf die Schwere der AIA gravierende Auswirkungen. Die Entzündungsprozesse nach Auslösen der AIA waren um ein Vielfaches verstärkt und es kam in der akuten Phase der Arthritis zu einer massiven Migration von polymorphonukleären neutrophilen Granulozyten in das Gelenk. Die verstärkte Entzündungsreaktion war mit einer erhöhten zellulären und einer verringerten humoralen Immunreaktivität assoziiert. Während die Antikörpertiter im Serum bei den IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäusen verringert waren, war die Zytokinsekretion in Kulturüberständen von Lymphknoten- und Milzzellen und lokal in Gelenkextrakten erhöht. Die Exazerbation der Arthritis zeigte bei den Zytokinen im Serum keinen systemischen Effekt auf. Besonders auffallend war auf Ebene der Zytokine die starke Produktion von IL-17 nach antigenspezifischer Stimulation. Bei MMP in Gelenkextrakten zeigte sich kein Unterschied zwischen IFN- $\gamma^{-/-}$ Tieren und Wildtyp.

Die Effekte von IFN- γ -Defizienz auf den Verlauf der AIA waren auf die akute Phase der Arthritis beschränkt. Langzeit-Studien ergaben in der chronischen Phase keine wesentlichen Unterschiede zum Wildtyp.

Durch Unterbrechung der IFN- γ -vermittelten Signaltransduktion lässt sich die Suszeptibilität der MHC-restringierten CIA aufheben. IFN- γ -defiziente C57Bl/6 Mäuse entwickelten eine progrediente Arthritis, während der Wildtyp nicht betroffen war.

4.3 Neutralisation und Rekonstituierung von Zytokinen

Bei ontogenetischer Defizienz eines Zytokins und der über dieses Zytokin vermittelten Signalwege und Effektormechanismen ist die Entstehung von redundanten Pathogenesemechanismen und Signalwegen nicht auszuschließen. Experimentelle Ergebnisse aus Versuchen mit Knock-out-Tieren sollten vor diesem Hintergrund reflektiert werden. Um zu untersuchen, ob die verstärkte Entzündungsreaktion bei $\text{IFN-}\gamma^{-/-}$ Mäusen direkt auf das Fehlen einer antiinflammatorischen Wirkung von $\text{IFN-}\gamma$ oder aber auf redundante Prozesse zurückzuführen ist, wurden Versuche durchgeführt, bei denen entweder das Zytokin verabreicht wurde oder aber dessen Wirkung durch gegen das Zytokin gerichtete Antikörper aufgehoben wurde.

4.3.1 Applikation von $\text{IFN-}\gamma$ in $\text{IFN-}\gamma^{-/-}$ Mäuse und Wildtyp

Zur Untersuchung der Wirkung von $\text{IFN-}\gamma$ wurde $\text{IFN-}\gamma^{-/-}$ Mäusen gleichzeitig mit dem Antigen i. a. 100 ng rm $\text{IFN-}\gamma$ appliziert. Vorversuche ergaben, dass lokal appliziertes rm $\text{IFN-}\gamma$ in dieser Größenordnung wirksam war, während eine systemische Gabe keinen Effekt zeigte. Die Gelenkschwellung war bei den mit rm $\text{IFN-}\gamma$ behandelten Tieren an d1 signifikant verringert (Abb. 29A). Dieser entzündungshemmende Effekt war jedoch an d3 nicht mehr zu beobachten. Möglicherweise wurde er durch den Verbrauch oder den raschen Abtransport des Zytokins aufgehoben. Übereinstimmend dazu ergab sich in der histologischen Bewertung der Kniegelenke von d3 kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen (Abb. 29B).

Um zu untersuchen, ob rm $\text{IFN-}\gamma$ auch bei Vorhandensein von endogenem $\text{IFN-}\gamma$ eine antiinflammatorische Wirkung besitzt, wurde mit derselben Versuchsanordnung Tieren vom Wildtyp die gleiche Menge rm $\text{IFN-}\gamma$ appliziert. Die beim Wildtyp im Vergleich zu $\text{IFN-}\gamma^{-/-}$ Mäusen ohnehin schwächer ausgeprägte Gelenkschwellung wurde durch die Gabe von rm $\text{IFN-}\gamma$ um > 50 % reduziert (Abb. 30A). Der signifikante entzündungshemmende Effekt blieb für die gesamte Dauer der akuten Phase der AIA bis d7 bestehen. Die histologische Bewertung ergab für die mit rm $\text{IFN-}\gamma$ behandelte Gruppe eine signifikante Verbesserung der Symptome. Sowohl die akute als auch die chronische Entzündung waren verringert. Insbesondere auf das zelluläre Exsudat und die granulozytäre Infiltration der Synovialmembran wirkte $\text{IFN-}\gamma$ hemmend (Abb. 30B). Der lokale entzündungshemmende Effekt von rm $\text{IFN-}\gamma$ war

somit nicht auf $\text{IFN-}\gamma^{-/-}$ Tiere beschränkt, sondern ließ sich auch im Wildtyp erzielen und blieb bei diesem sogar länger bestehen.

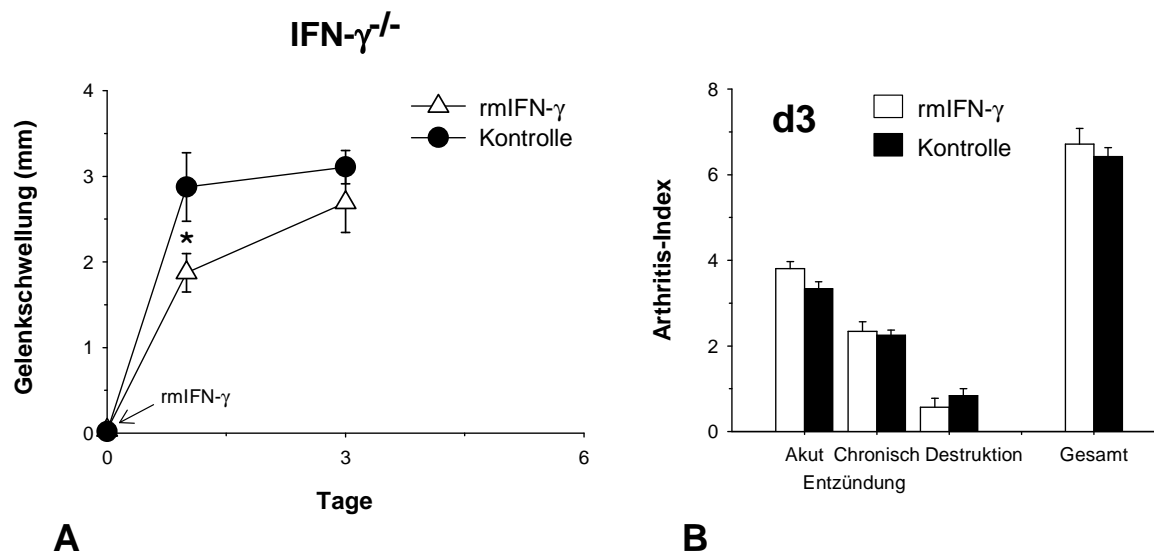


Abb. 29 Einfluss von $\text{IFN-}\gamma$ auf die AIA bei $\text{IFN-}\gamma^{-/-}$ Mäusen.

Die i. a. Gabe von rmIFN- γ verringerte bei $\text{IFN-}\gamma^{-/-}$ Mäusen die Kniegelenkschwellung an d1 signifikant, danach näherten sich die Werte in beiden Gruppen an (A). In der histologischen Bewertung der Arthritis an d3 zeigte sich kein Unterschied zwischen beiden Gruppen (B) (* $p < 0,05$).

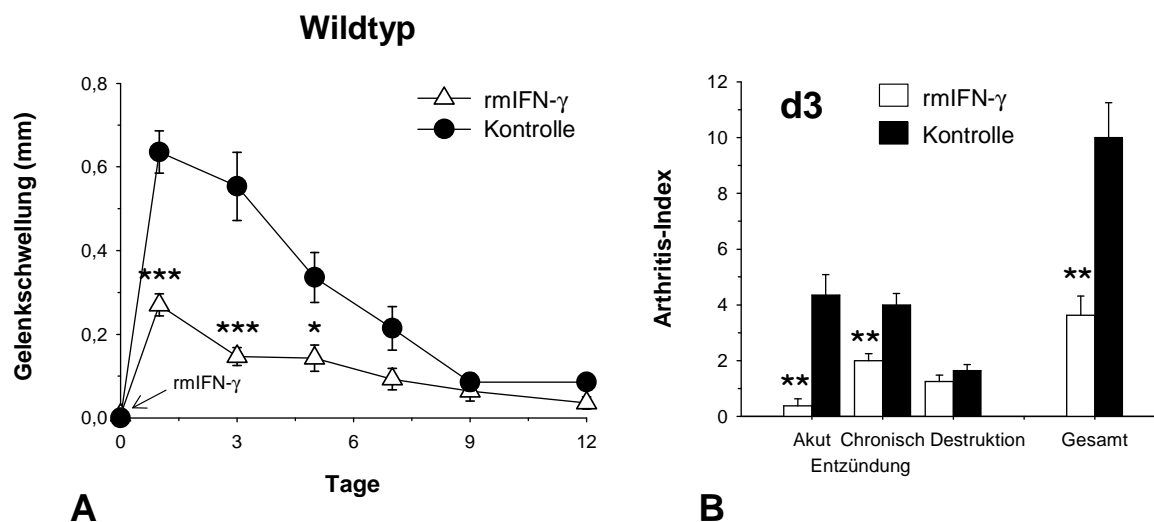


Abb. 30 Einfluss von $\text{IFN-}\gamma$ auf die AIA bei Mäusen vom Wildtyp.

Die i. a. Gabe von rmIFN- γ verringerte beim Wildtyp die Kniegelenkschwellung in der akuten Phase signifikant (A). In der histologischen Bewertung der Arthritis an d3 waren durch die Therapie die Entzündungsparameter, insbesondere die akute Entzündung, und der Gesamt-Arthritis-Index signifikant verringert (B) (** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$).

4.3.2 Neutralisation von IFN- γ beim Wildtyp

Der sich aus der Applikation von rmIFN- γ ergebende antiinflammatorische Effekt wurde auch in umgekehrter Herangehensweise durch Neutralisation von IFN- γ mit neutralisierenden Antikörpern untersucht. Dazu wurden Mäuse vom Wildtyp vor und während der Auslösung der AIA mit jeweils 50 μ g anti-IFN- γ -Antikörper (R4-6A2) behandelt.

Während sich an d1 kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen zeigte, lag der Wert der Gelenkschwellung ab d3 bei der anti-IFN- γ -behandelten Gruppe über der Kontrolle (Abb. 31A). An d6 war die Schwellung rund doppelt so groß wie bei der Kontrollgruppe und die Differenz erreichte das Signifikanzniveau. In der histologischen Bewertung der Arthritis an d6 zeigte sich bei den anti-IFN- γ -behandelten Mäusen eine tendenzielle Verschlimmerung (Abb. 31B).

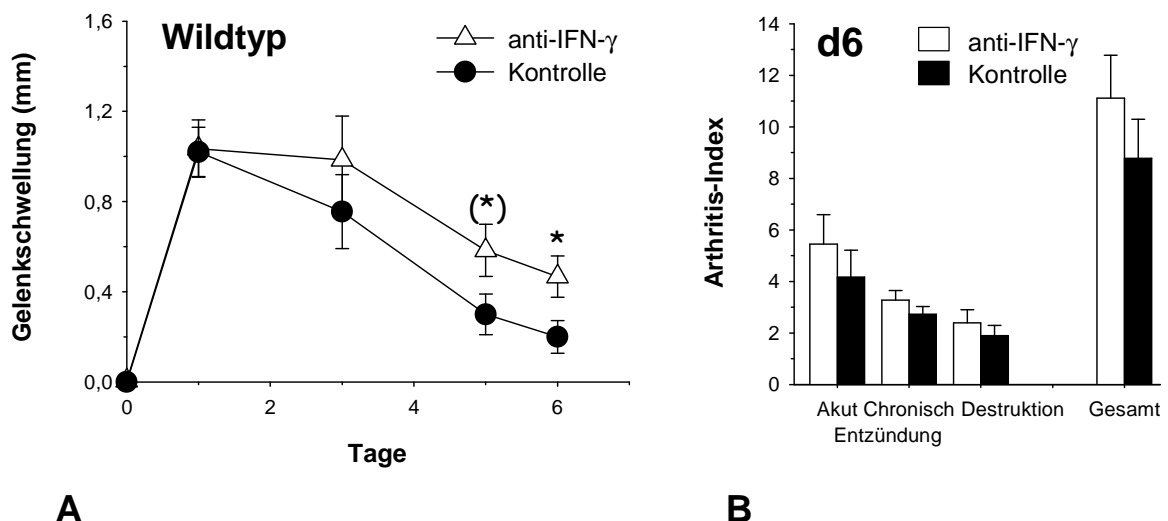


Abb. 31 Einfluss der Neutralisation von IFN- γ auf die AIA beim Wildtyp.

Die Blockade der über IFN- γ vermittelten Effektormechanismen mit monoklonalen Antikörpern führte bei Wildtyp C57Bl/6 Mäusen in der späten akuten Phase der AIA im Vergleich zur mit Ratten IgG behandelten Kontrolle zu einer Verstärkung der Gelenkschwellung (A). Die histologische Bewertung der Arthritis an d6 deutete eine tendenzielle Verschlimmerung der Arthritis an (B) ((*) $p < 0,10$, * $p < 0,05$).

4.3.3 Neutralisation von IL-17 bei IFN- γ ^{-/-} Mäusen

Die durch die fehlende Wirkung von endogenem IFN- γ in IFN- γ -defizienten Mäusen verstärkte akute Entzündungsreaktion war auf Ebene der Zytokine mit einer gesteigerten Produktion von IL-17 assoziiert. Um eine direkte Beteiligung von IL-17

an der beobachteten Exazerbation der Arthritis zu überprüfen, wurden IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäuse vor und zum Auslösen der AIA mit zweimal 100 μg kommerziell erhältlichem anti-IL-17-Antikörper (R&D Systems) behandelt.

Die Hemmung der über IL-17 gesteuerten Signalwege führte in der mit anti-IL-17-Antikörpern behandelten Gruppe zu einer signifikant verringerten Schwellung des Kniegelenks (Abb. 32A). An d1 war sie um 52 % auf eine fast dem Wildtyp entsprechende Größenordnung verringert, an d3 um 74 % und an d5 um 58 %. Die Gelenkschwellung war gegenüber der Kontrolle nicht nur anfänglich reduziert, sondern nahm auch schneller wieder ab. Die histologische Bewertung der Arthritis bestätigte die Ergebnisse der Kniegelenksmessung. Die Parameter akute Entzündung und Destruktion waren bei der anti-IL-17-Gruppe signifikant verringert. Bei der akuten Entzündung betrug diese Verringerung 73 %, bei der Destruktion von Knorpel und Knochen 63 % (Abb. 32B). Der deutliche Effekt der Hemmung von IL-17 weist auf einen kausalen Zusammenhang zwischen einer gesteigerten Entzündungsreaktion und der Wirkung von IL-17 hin. Somit ist anzunehmen, dass über IL-17 induzierte Effektormechanismen, deren Regulation durch IFN- γ aufgehoben ist, die Exazerbation der AIA in IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäusen maßgeblich mitverantworten.

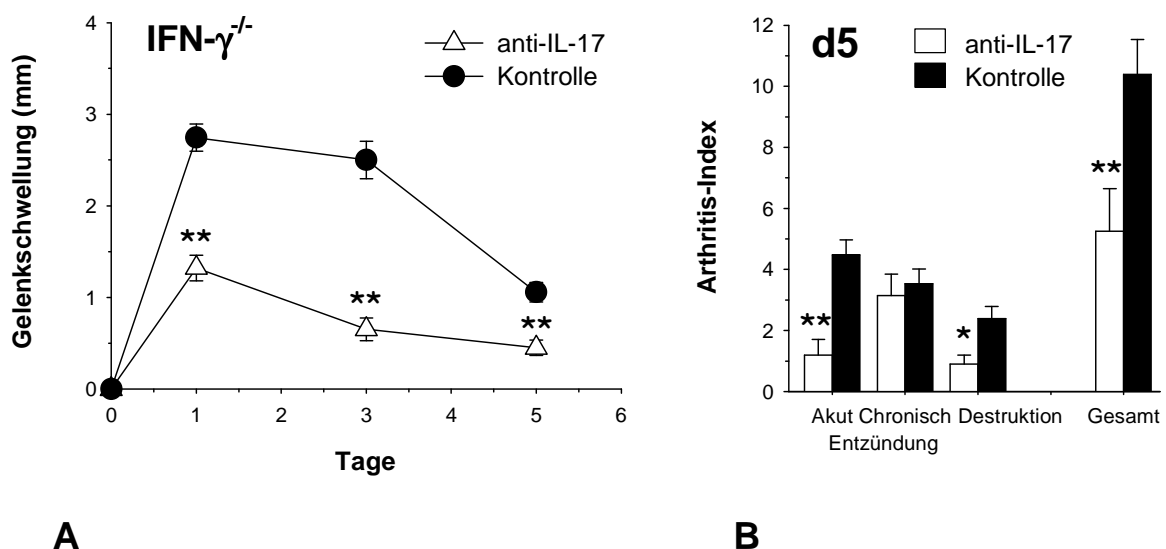


Abb. 32 Einfluss der Neutralisation von IL-17 auf die AIA bei IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäusen.

Die Gabe von gegen IL-17 gerichteten neutralisierenden Antikörpern bewirkte bei IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäusen eine signifikante Verringerung der Gelenkschwellung gegenüber der Kontrolle mit Ratten IgG (A). Die histologische Bewertung der Arthritis an d5 ergab einen signifikant reduzierten Arthritis-Index, insbesondere auf Ebene der akuten Entzündung und Destruktion (B) (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

4.3.4 AIA bei IL-17^{-/-} Mäusen

Eine weitere Möglichkeit zur Untersuchung der Bedeutung einer Unterbrechung der über IL-17 vermittelten Signalwege bot ein Mausstamm mit inaktiviertem Gen für IL-17. Bei dieser IL-17^{-/-} Maus wurde die Schwere der AIA mit dem Wildtyp verglichen.

Das Fehlen von IL-17 hatte relativ zur Kontrolle ähnliche Effekte, wie das Hemmen des Zytokins mit neutralisierenden Antikörpern bei IFN- γ ^{-/-} Mäusen. Die Reduktion der Gelenkschwellung bei den IL-17^{-/-} Mäusen war zwar erst im weiteren Verlauf und noch nicht an d1 signifikant gegenüber der Kontrolle, betrug an d3 aber 63 % und an d6 75 % (Abb. 33A). Übereinstimmend mit dem vorherigen Experiment war ab d1 ein

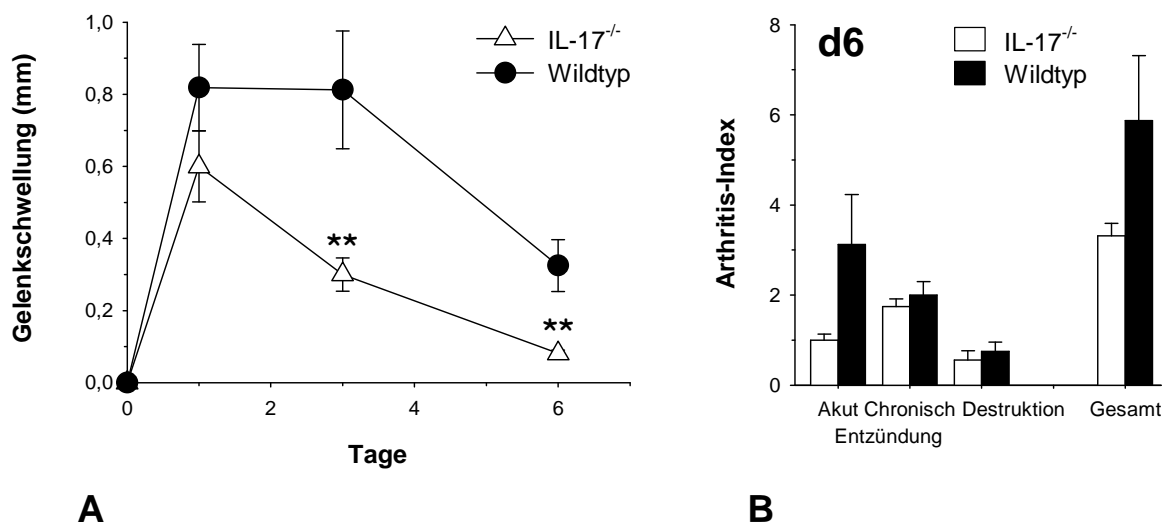


Abb. 33 Verlauf der AIA bei IL-17^{-/-} Mäusen.

Ab d3 kam es bei Tieren mit inaktiviertem Gen für IL-17 zu einer signifikanten Reduktion der Gelenkschwellung (A). Die histologische Bewertung der Arthritis an d6 deutete eine tendenzielle Verbesserung der Arthritis an, insbesondere die akute Entzündung war bei IL-17^{-/-} Mäusen gegenüber dem Wildtyp verringert (B) (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

schneller Rückgang der Gelenkschwellung zu beobachten. Alle Parameter der histologischen Bewertung und der Gesamt-Arthritis-Index waren tendenziell verringert, insbesondere wiederum die akute Entzündung (Abb. 33B). Das Fehlen oder das Hemmen von IL-17 bei der AIA hat offensichtlich auf diesen Parameter, der für Exsudat und granulozytäre Infiltration der Synovialmembran steht, eine besonders große Auswirkung.

4.3.5 Transfer von CD4⁺ Zellen aus Wildtyp, IFN- γ ^{-/-} und IL-17^{-/-} Mäusen

Der Verlauf der AIA in Tieren mit transgenem TCR weist darauf hin, dass Th-Zellen in der initialen Phase bzw. autoreaktive Th-Zellen auch bei der Chronifizierung der AIA eine zentrale Bedeutung haben (siehe Kapitel 4.1.3 „AIA bei OT-II Mäusen“). Um zu überprüfen, ob die Effektorfunktionen von antigenaktivierten Th-Zellen ohne Beteiligung der anderen durch die Immunisierung betroffenen Komponenten der adaptiven Immunabwehr allein ausreichend sind, eine Arthritis auszulösen, wurden adoptive Transfer-Experimente mit CD4⁺ Zellen aus Wildtyp, IFN- γ ^{-/-} und IL-17^{-/-} Mäusen durchgeführt. Auf diese Weise konnte die Wirkung der Zytokine auf die Pathogenese der Arthritis auch im Kontext mit anderen durch die Th-Zellen initiierten Effekten beobachtet werden.

Für den Zelltransfer dienten immunisierte Tieren als Donoren und naive Tiere, bei denen direkt nach dem Transfer die Arthritis ausgelöst wurde, als Rezipienten. Auf diese Weise ließ sich das arthritogene Potential der für das jeweilige Zytokin defizienten Th-Zellen ermitteln. Transferiert wurden jeweils 10⁷ CD4⁺ Zellen, die aus Lymphknoten- und Milzzellen mit magnetischen Beads isoliert wurden.

Das Übertragen der Arthritis durch adoptiven Transfer von CD4⁺ Zellen in naive Rezipienten war erfolgreich. Die Gelenkschwellung infolge der i. a. Applikation von Antigen war an d1 bei den Rezipienten von IFN- γ -defizienten Th-Zellen fast doppelt so groß wie bei der Th-Zellen vom Wildtyp erhaltenden Kontrolle (Abb. 34A). Dieses Verhältnis blieb auch an d3 und d5 bestehen. Bei den Rezipienten von IL-17-defizienten Th-Zellen war die Schwellung an d1 signifikant reduziert, wies aber im weiteren Verlauf keine deutlichen Unterschiede zur Kontrolle mehr auf und lag an d5, wenn auch auf sehr niedrigem Niveau, sogar etwas über der Kontrolle. Damit stand die allein durch die Th-Zellen ausgelöste Arthritis im Einklang mit dem Verlauf der AIA in den für IFN- γ oder IL-17 defizienten Tieren.

Die histologische Bewertung der Arthritis in Kniegelenkschnitten von d5 entsprach der Abfolge der Gelenkschwellung zu diesem Zeitpunkt. Am stärksten waren die Rezipienten von CD4⁺IFN- γ ^{-/-} Zellen von der Arthritis betroffen, die Werte bei den Rezipienten von CD4⁺IL-17^{-/-} Zellen waren gegenüber der Kontrolle geringfügig erhöht (Abb. 34B). Aufgrund der Heterogenität der Versuchsgruppen ergaben sich weder für

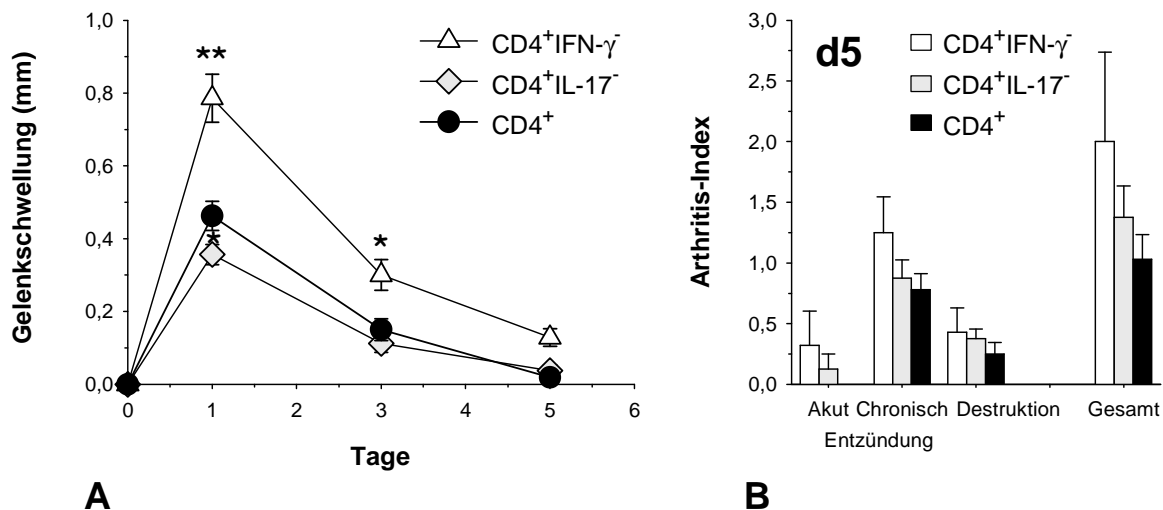


Abb. 34 Adoptiver Transfer von CD4⁺ Zellen aus Wildtyp, IFN- γ ^{-/-} und IL-17^{-/-} Mäusen. Aus immunisierten IFN- γ ^{-/-} Mäusen isolierte und in naive Rezipienten transferierte CD4⁺ Zellen wiesen gegenüber Zellen aus IL-17^{-/-} oder dem Wildtyp ein gesteigertes arthritogenes Potential auf. Bei den Rezipienten von CD4⁺ Zellen aus IL-17^{-/-} war die Gelenkschwellung im Vergleich zu CD4⁺ Zellen vom Wildtyp anfänglich verringert (A). Die histologische Bewertung der Arthritis an d5 ergab die tendenziell schwerste Arthritis bei Rezipienten von CD4⁺IFN- γ ^{-/-} Zellen (B) (* p < 0,05, ** p < 0,01).

die einzelnen Parameter noch für den Gesamt-Arthritis-Index statistische Signifikanzen.

Das Experiment bestätigte die zentrale Bedeutung von Th-Zellen bei der Antigen-induzierten Arthritis. Durch das Antigen aktivierte Th-Zellen waren in der Lage, eine ausgeprägte akute Entzündungsreaktion hervorzurufen. Dass IFN- γ Th-Zellen hierbei eine schwerere Arthritis auslösen können als solche vom Wildtyp, ist eine Bestätigung der sich aus der AIA bei IFN- γ ^{-/-} Tieren ergebenden protektiven Rolle des Zytokins im Modell der AIA. Für IL-17 hingegen zeigte sich eine inflammatorische Funktion.

4.3.6 Zusammenfassung

Die Schwere der Arthritis ließ sich sowohl bei IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäusen als auch beim Wildtyp effektiv durch die lokale Gabe von rekombinantem Zytokin auf der Ebene der Gelenkschwellung und der histologischen Bewertung positiv beeinflussen. Dies belegt eine direkte antiinflammatorische Wirkung von IFN- γ . Umgekehrt führte die Neutralisation von IFN- γ mit neutralisierenden monoklonalen Antikörpern im Wildtyp zu einer Verschlimmerung der AIA. Durch die Behandlung mit Antikörpern ließen sich allerdings keine Effekte in vergleichbarer Größenordnung zur Therapie mit rekombinantem Zytokin erzielen.

Die Ergebnisse der Zytokinuntersuchungen bei der Charakterisierung der AIA in IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäusen weisen auf eine kausale Beteiligung von IL-17 an der erhöhten Schwere der Erkrankung bei Tieren mit inaktiviertem Gen für IFN- γ hin. Die Neutralisation von IL-17 in IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäusen verbesserte die klinischen Symptome eindrucksvoll und bestätigte damit diese Hypothese. Dies steht im Einklang mit dem beobachteten deutlich abgeschwächten klinischen Verlauf der AIA in IL-17 $^{-/-}$ Tieren.

Der adoptive Transfer von Th-Zellen ermöglichte die erfolgreiche Übertragung der Arthritis in naive Rezipienten und belegt, dass die Aktivität der Th-Zellen in Zusammenarbeit mit den Komponenten der angeborenen Immunabwehr der Rezipienten ausreichend ist, eine Arthritis auszulösen. Dabei wiesen Zellen, die nicht in der Lage waren IFN- γ zu bilden, eine deutlich größere Fähigkeit zur Arthritisinduktion auf, als solche vom Wildtyp. Das arthritogene Potential der IL-17-defizienten Zellen war hingegen verringert.

4.4 Regulation der Th17-Zellen durch IFN- γ *in vitro*

Das bessere Verständnis der sich in den tierexperimentellen Studien abzeichnenden Wirkung von IFN- γ *in vivo* auf die Stärke der durch IL-17 gesteuerten Immunreaktivität war das Ziel weiterer Experimente *in vitro*. Zur Untersuchung eines unmittelbaren Zusammenhangs zwischen IFN- γ und IL-17 bot der *in vitro* klar definierbare experimentelle Rahmen die Möglichkeit der Kultur von CD4⁺ T-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an IFN- γ . Auf diese Weise konnte die Wechselwirkung mit anderen Zellen des Immunsystems vermieden werden und der direkte Effekt von IFN- γ auf die Sekretion von IL-17 analysiert werden.

4.4.1 Hemmung der IL-17-Sekretion durch IFN- γ

Zur Untersuchung der Wirkung von IFN- γ auf die Sekretion von IL-17 durch CD4⁺ T-Zellen wurden naive CD62L⁺ Zellen aus IFN- γ ^{-/-} Mäusen isoliert und zur Aktivierung über zwei Stimulationszyklen mit anti-CD3- und anti-CD28-Antikörpern und einer dazwischen liegenden Ruhephase ohne Stimulation kultiviert. Während der Stimulationsphasen der Kultur wurde exogenes rmIFN- γ in Konzentrationen von 0-50 ng/ml zugesetzt. In den Kulturüberständen wurde mit ELISA die Konzentration an unter diesen Bedingungen sezerniertem IL-17 bestimmt.

Die Stimulation des TCR über anti-CD3- und anti-CD28-Antikörper ohne Zusatz von IFN- γ führte in den Kulturüberständen zu Konzentrationen von 400 pg/ml IL-17. Das Vorhandensein von 2 ng/ml rmIFN- γ in der Kultur reichte aus, diesen Wert um

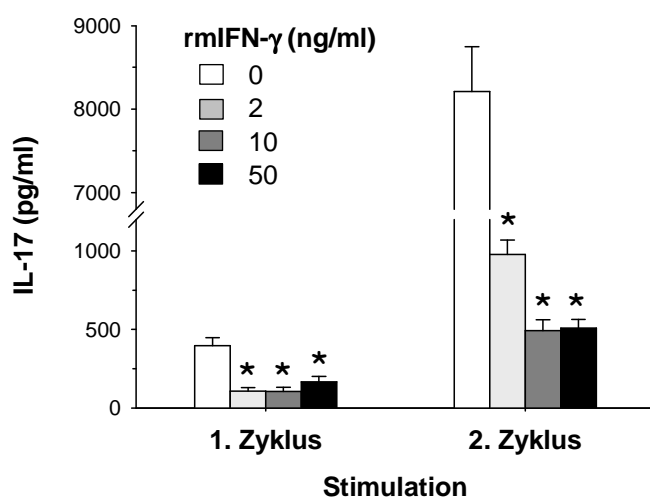


Abb. 35 Hemmung der IL-17-Produktion *in vitro* durch IFN- γ .

Die ein- bzw. zweimalige Stimulation von naiven Th-Zellen mit anti-CD3- und anti-CD28-Antikörpern führte zur Sekretion großer Mengen von IL-17, die durch die Zugabe von rmIFN- γ dosisabhängig gehemmt wurde (* $p < 0,05$).

75 % auf 100 pg/ml zu verringern. Höhere Dosen an rmIFN- γ bewirkten darüber hinaus keine weitere Reduktion, sondern bei 50 ng/ml nur eine Reduzierung um 58 % (Abb. 35).

Nach dem 2. Stimulationszyklus war die Produktion an IL-17 durch die zuvor schon einmal über den TCR stimulierten Th-Zellen um das 20-fache erhöht. Ohne rmIFN- γ führte dies zu Konzentrationen von über 8000 pg/ml IL-17. Durch 2 ng/ml rmIFN- γ in der Kultur wurde die IL-17-Sekretion um 90 %, durch 10 ng/ml rmIFN- γ um 95 % verringert. Größere Mengen an rmIFN- γ hatten darüber hinaus keinen weiteren Effekt auf die IL-17-Produktion der CD4⁺ T-Zellen.

4.4.2 Hemmung der Expansion von Th-Zellen durch IFN- γ

Auffällig an der Kultur der CD4⁺ T-Zellen mit hohen Konzentrationen an rmIFN- γ war das Fehlen der aus sich teilenden T-Zellen bestehenden sogenannten Proliferationshäufchen. Diese Zellaggregate sind charakteristisch für über den TCR stimulierte CD4⁺ T-Zellen und bilden sich insbesondere unmittelbar nach der Aktivierung der Zellen in der Phase der Kultur ohne anti-CD3/anti-CD28-Antikörper. Aus der *In vitro*-Generierung von Th1/Th2-Zellen ist bekannt, dass die Dauer der Kultur auf anti-CD3/anti-CD28-Antikörpern auf das Differenzierungsmuster der Zellen

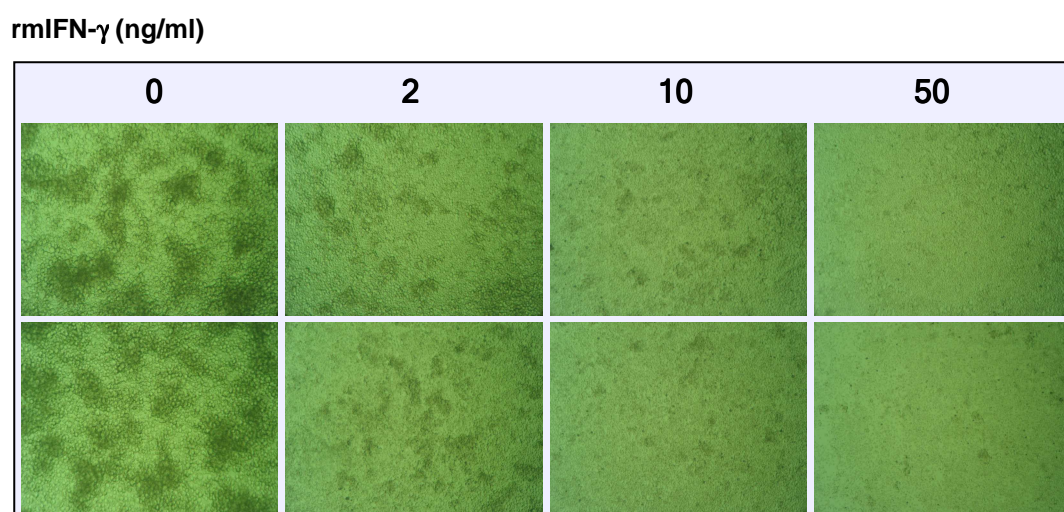


Abb. 36 Hemmung der Th-Zell-Proliferation durch IFN- γ .

Die Proliferation von CD62L⁺CD4⁺ T-Zellen in mit anti-CD3- und anti-CD28-Antikörpern stimulierten Kulturen wurde *in vitro* durch die Zugabe aufsteigender Konzentrationen von rmIFN- γ gehemmt. 400-fache Vergrößerung.

verfestigend wirkt, während in der anschließenden stimulationslosen Phase die Expansion der CD4⁺ T-Zellen stattfindet. Diese Expansion war zwar bei den ohne rmIFN- γ kultivierten Zellen lichtmikroskopisch zu beobachten, war aber mit steigenden Konzentrationen an Zytokin zunehmend schwächer ausgeprägt (Abb. 36). Die dunklen Bereiche in Abb. 36 stellen die sich durch Teilung bildenden Zellaggregate von CD4⁺ T-Zellen dar. Im linken Bereich ohne rmIFN- γ sind diese deutlich zu erkennen, während rechts mit 50 ng/ml rmIFN- γ kaum noch Zellteilung stattfindet.

Um die Hemmung der Expansion der CD4⁺ T-Zellen durch rmIFN- γ zu quantifizieren, wurden Proliferationsassays mit radioaktiv markiertem Thymidin durchgeführt. Während der Zellteilung wird dieses in die Zellen mit eingebaut und die Stärke der Proliferation lässt sich anhand des radioaktiven Signals messen. Für diesen Assay wurden sowohl Zellen aus IFN- γ ^{-/-} Mäusen, als auch aus dem Wildtyp verwendet.

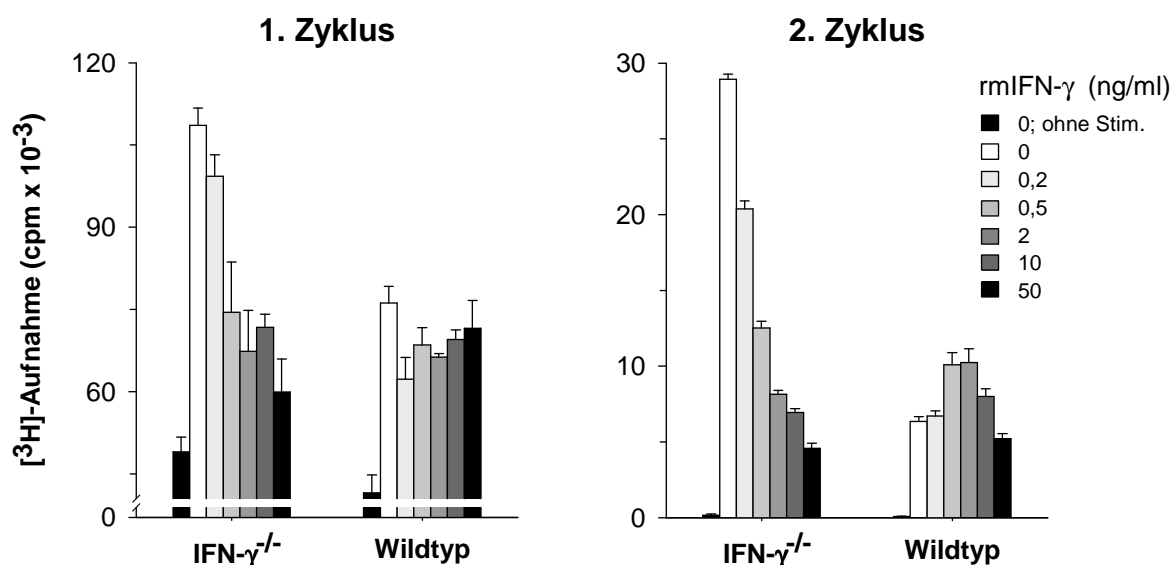


Abb. 37 Hemmung der Proliferation von Th-Zellen durch IFN- γ .

CD62L⁺CD4⁺ T-Zellen aus IFN- γ ^{-/-} Mäusen zeigten *in vitro* gegenüber Zellen aus dem Wildtyp nach Stimulation mit anti-CD3- und anti-CD28-Antikörpern eine verstärkte Proliferation, quantifiziert durch den Einbau von [³H]-Thymidin. Zunehmende Konzentrationen von rmIFN- γ hemmten wirksam die Expansion von IFN- γ ^{-/-} Th-Zellen, hatten aber wenig Wirkung auf Zellen aus dem Wildtyp.

Die Aktivierung über anti-CD3/anti-CD28-Antikörper induzierte eine starke Proliferation der T-Zellen. Die Messungen ergaben einen hemmenden Einfluss von rmIFN- γ auf die Expansion der CD4⁺ T-Zellen, wenn in der Kultur kein endogenes

IFN- γ vorhanden war (Abb. 37). Bei den Zellen aus IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäusen wurden ohne rmIFN- γ im 1. Stimulationszyklus 109 000 counts per minute (cpm) gemessen, mit 2 ng/ml rmIFN- γ war dieser Wert auf 67 000 cpm und mit 50 ng/ml rmIFN- γ auf 60 000 cpm reduziert. Auch im 2. Stimulationszyklus zeigte sich eine dosisabhängige Hemmung der Proliferation durch rmIFN- γ , im Maximum um 85 %. Das im 1. Zyklus im Vergleich zum 2. Zyklus höhere Grundniveau der Proliferation war bei den Experimenten wiederholt zu beobachten und ist vermutlich durch einen durch den Vorgang der Zellisolation bedingten gewissen Aktivierungsgrad der naiven Th-Zellen zurückzuführen.

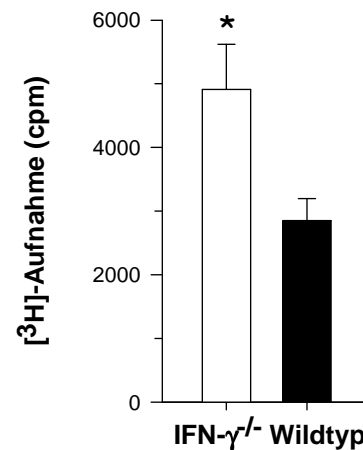


Abb. 38 Proliferation von Lymphknotenzellen nach mBSA-Stimulation.

Die durch antigenspezifische Stimulation induzierte Zell-Proliferation war bei Lymphknotenzellen aus IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäusen signifikant erhöht (* p < 0,05).

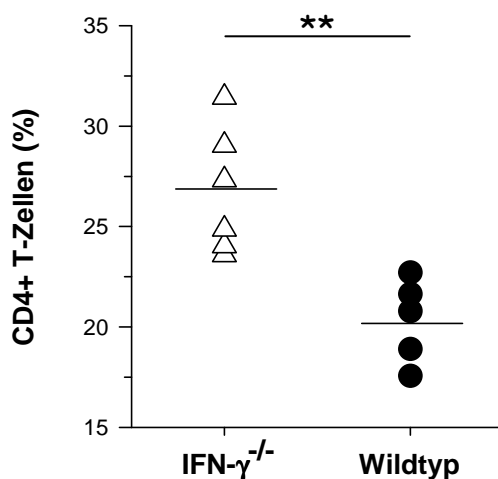


Abb. 39 Anteil CD4⁺ T-Zellen in den Lymphknoten von IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäusen und Wildtyp.

Die Zahl der CD4⁺ T-Zellen in den durch die Immunisierung betroffenen Lymphknoten wurde vor Auslösen der AIA (d0) durchflusszytometrisch bestimmt. Bei IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäusen war der Anteil von CD4⁺ T-Zellen in den Lymphknoten im Vergleich zum Wildtyp signifikant erhöht (** p < 0,01).

Bei Zellen vom Wildtyp, die selbst IFN- γ bilden konnten, bewirkte exogenes Zytokin keine dosisabhängigen hemmenden Effekte. Im 1. Zyklus führten niedere Dosen von rmIFN- γ zu einer geringen Hemmung, höhere Dosen hatten keine Wirkung. Beim 2. Zyklus war die Wirkung eher umgekehrt. Niedrige Konzentrationen bewirkten eine leichte Erhöhung der Proliferation, höhere Konzentrationen zeigten keine Wirkung.

Dass die antiproliferative Wirkung von IFN- γ nicht nur auf *In vitro*-Versuche beschränkt ist, zeigte der Proliferationsassay mit Lymphknotenzellen aus arthritischen IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäusen und dem Wildtyp (d3 AIA), die mit mBSA stimuliert wurden. Das Antigen induzierte bei beiden

Gruppen eine starke Proliferation der Th-Zellen. Bei den Lymphknotenzellen aus IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäusen ohne endogenes IFN- γ in der Kultur war die Proliferation gegenüber den Zellen aus dem Wildtyp, bei denen die über IFN- γ vermittelten Signal- und Effektormechanismen nicht unterbrochen waren, signifikant erhöht (Abb. 38).

Wie die Bestimmung der Zahl der CD4⁺ T-Zellen in den inguinalen und subaortalen Lymphknoten bei immunisierten Tieren an d0 ergab, hatte das Fehlen von IFN- γ auch *in vivo* Einfluss auf die Größe der T-Zell-Population (Abb. 39). Ohne die hemmenden Effekte von IFN- γ war der Anteil der CD4⁺ T-Zellen mit $26,7 \pm 1,3$ % der Zellen bei IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäusen gegenüber $20,3 \pm 0,9$ % beim Wildtyp signifikant erhöht.

4.4.3 Zusammenfassung

Es konnte gezeigt werden, dass IFN- γ *in vitro* auf die Sekretion von IL-17 eine dosisabhängige Hemmung bewirkt. Diese Hemmung war auf eine antiproliferative Wirkung von IFN- γ zurückzuführen. Dabei verhielt sich die Expansion der CD4⁺ T-Zellen umgekehrt proportional zu der in der Kultur vorhandenen Menge an IFN- γ . Auch die Proliferation von *ex vivo* isolierten und mit Antigen stimulierten Lymphknotenzellen wurde durch das Vorhandensein von IFN- γ maßgeblich beeinflusst. Fehlte IFN- γ in der Kultur, war der Proliferationsindex signifikant erhöht.

Die Hemmung der T-Zell-Population durch IFN- γ war auch *in vivo* nachweisbar. Bei IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäusen war der Anteil von CD4⁺ T-Zellen in den Lymphknoten gegenüber dem Wildtyp erhöht.

5 Diskussion

Bei der RA handelt es sich um eine chronische entzündliche Erkrankung der Gelenke unbekannter Ursache, die mit einem fortschreitenden Verlust von artikulärer Knorpel- und Knochensubstanz einhergeht. Verantwortlich für die Gelenkdestruktion durch den Abbau extrazellulärer Matrix sind neben Osteoklasten gewebsresidente Fibroblasten der Synovialis, die einen stabilen aggressiv-invasiven Phänotyp angenommen haben und Matrixmetalloproteasen und Kathepsine sezernieren (MULLER-LADNER ET AL., 1996; CUNNANE ET AL., 1999). Die Aktivierung der synovialen Fibroblasten resultiert aus einer initialen Entzündungsreaktion im Synovium, bei der T-Zellen eine zentrale Rolle spielen. Hierbei ist vor allem die CD4⁺ Subpopulation von Bedeutung, da sich die genetische Assoziation der RA vorwiegend auf MHC-Klasse-II-Allele bezieht und diese ausschließlich der Antigenerkennung durch CD4⁺ T-Zellen dienen. CD4⁺ T-Zellen kommen in lymphoiden Follikeln im entzündlich veränderten Synovium in großer Zahl vor (WAGNER ET AL., 1998). Deshalb wird für CD8⁺ T-Zellen bei der Entstehung der Arthritis eine eher untergeordnete funktionelle Relevanz angenommen.

Befunde aus Tiermodellen autoimmuner Arthritiden unterstützen die elementare Bedeutung von CD4⁺ T-Zellen für die Immunpathogenese der RA. Im Modell der AIA lässt sich die Arthritis durch den adoptiven Transfer von Lymphknoten-Zellen in immundefiziente SCID (Severe combined immunodeficiency) Mäuse übertragen. Die Arthritis manifestiert sich auch, wenn bei den für den Transfer benutzten Zellen zuvor die CD8⁺ T-Zellen entfernt wurden, nicht jedoch bei Entfernen der CD4⁺ T-Zellen (PETROW ET AL., 1996). Bei Mäusen, in denen durch transgene Expression von anti-CD4-Antikörpern die CD4⁺ T-Lymphozyten eliminiert werden, entwickelt sich nur eine schwache AIA (WONG ET AL., 2006). Ebenso hat die Behandlung der AIA mit gegen CD4 gerichteten monoklonalen Antikörpern einen therapeutischen Effekt (POHLERS ET AL., 2004). Bei der CIA werden Mäuse ohne CD4⁺ T-Zellen nur schwach betroffen, während die Schwere der Erkrankung bei Tieren ohne CD8⁺ T-Zellen keinen Unterschied zum Wildtyp aufweist (EHINGER ET AL., 2001). Ebenso wie bei der AIA lässt sich die spontane SKG-Arthritis durch den adoptiven Transfer von Thymozyten auf syngene Rezipienten übertragen und im Modell der GPI-Arthritis

spielen T-Zellen in der Induktions- und in der Effektorphase eine wichtige Rolle (PETROW ET AL., 1996; SAKAGUCHI ET AL., 2003; SCHUBERT ET AL., 2004).

Durch die Regulation der Aktivität anderer Immunzellen bzw. gewebsresidenter Zellen kontrollieren die CD4⁺ T-Zellen die Art und den Verlauf der Immunreaktion. Die hierbei vermittelten Signale werden über direkten Zell-Zell-Kontakt oder über die Sekretion von Signalmolekülen mit begrenzter Reichweite, den Zytokinen, gegeben (VEY ET AL., 1996; MCINNIS ET AL., 1997). Basierend auf den Ergebnissen aus Arthritismodellen, die eine therapeutische Wirksamkeit der Behandlung mit anti-CD4-Antikörpern andeuteten, wurden derartige Ansätze auch bei RA-Patienten verfolgt, allerdings ohne wirklichen Erfolg und ohne die Möglichkeit, die langfristigen Folgen einer Lymphopenie abschätzen zu können (HASLER, 2006). Ausgehend vom derzeitigen Wissen um verschiedene Th-Subpopulationen mit teilweise entgegengesetzten Effektorfunktionen war diese Herangehensweise bezüglich der T-Zellen nicht selektiv genug.

Die von Mosmann et al. (1986) vorgenommene Unterteilung der CD4⁺ T-Zellen anhand ihres Zytokinprofils in Th1- und Th2-Subpopulationen bot erstmalig die Möglichkeit einer Klassifizierung der Th-Zellen. Th1-Zellen werden seitdem mit zellulären Immunreaktionen assoziiert, Th2-Zellen mit humoralen Immunreaktionen. Die Th1/Th2-Dichotomie fand rasch Eingang in das Konzept der Pathogenese der RA, zumal die CD4⁺ T-Zellen aus der Synovialflüssigkeit und dem Synovialgewebe von RA-Patienten vorwiegend das Th1-Zytokin IFN- γ produzieren (KUSABA ET AL., 1998; MORITA ET AL., 1998).

Aus der Dichotomie der Th-Zellen wurde das Th1/Th2-Paradigma abgeleitet, nach dem bei der RA die pathogene Th1-assoziierte Immunantwort die protektive Th2-Antwort dominiert (SCHULZE-KOOPS & KALDEN, 2001; SKAPENKO ET AL., 2005). Da Th1- und Th2-Zellen ihre Differenzierung über Zytokine wechselseitig hemmen, entstand schon früh für die RA und andere Th1-vermittelte Autoimmunerkrankungen die Überlegung, ob über eine Verschiebung des Ungleichgewichts zwischen Th1- und Th2-Zellen zugunsten der Th2-Zellen gemäß dem Th1/Th2-Paradigma die Erkrankung möglicherweise therapeutisch beeinflussbar ist (CHARLTON & LAFFERTY, 1995; ADORINI ET AL., 1996; MÜLLER ET AL., 1998; SINGH ET AL., 1999).

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde deshalb auf tierexperimenteller Ebene der Frage nachgegangen, ob eine solche Modulation der Th1-/Th2-Balance auf Zell-Ebene

wirklich einen möglichen therapeutischen Ansatzpunkt darstellt. Das Modell der AIA in C57Bl/6 Mäusen wurde gewählt, weil dieses Modell viele Gemeinsamkeiten mit der RA aufweist und immunologisch gut charakterisiert ist (BRACKERTZ ET AL., 1977 a-c). Weiterhin neigen C57Bl/6 Mäuse bei einer Immunreaktion zu einer Th1-Antwort und der genetische Hintergrund erlaubte die Verwendung von transgenen und knock-out Mausstämmen (AHMED, 1994). Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Bedeutung des Th1-Zytokins IFN- γ im Modell der AIA untersucht. Die Arthritis wurde in IFN- γ ^{-/-} Mäusen anhand klinischer und immunologischer Parameter charakterisiert und im dritten Teil stand die Wirkung von IFN- γ auf die AIA durch Neutralisation mit monoklonalen Antikörpern oder die Gabe von rekombinantem Zytokin im Vordergrund. Aufgrund des sich abzeichnenden Zusammenhangs der Defizienz für IFN- γ und der IL-17-Antwort wurde die AIA in IL-17^{-/-} Mäusen durchgeführt bzw. IL-17 bei der Arthritis in IFN- γ ^{-/-} Tieren gehemmt. Der vierte Teil der Arbeit untersucht *in vitro* den Effekt von IFN- γ auf die IL-17-Produktion von CD4⁺ Th-Zellen.

5.1 Th-Zellen in der Pathogenese der AIA

Zur Modulation der Th1/Th2-Balance wurden zum Zeitpunkt der Arthritisinduktion adoptive Transfers mit über anti-CD3/anti-CD28-Stimulation *in vitro* generierten Th1- und Th2-Zellen in immunisierte Rezipienten durchgeführt. Obwohl die Polarisierung erfolgreich war und die generierten Th1- und Th2-Zellen das entsprechende Zytokinprofil (IFN- γ bzw. IL-4/IL-5) aufwiesen, hatte dies auf die Manifestation und den Verlauf der Arthritis keine Auswirkung. Die Ursache hierfür war die nicht gegebene Antigen-spezifität der Zellen und die dadurch unterbliebene Aktivierung der Th-Zellen, wie die experimentellen Befunde nach dem Wechsel auf catOVA als Antigen und der Verwendung von OT-II Mäusen mit OVA-spezifischem TCR als Donoren der Zellen nahe legen.

Der adoptive Transfer dieser für die Induktion der AIA verwendete Antigen-spezifischen Th-Zellen zeigte Effekte auf den Verlauf der Arthritis, obgleich die Ergänzung des T-Zell-Pools der Tiere sowohl mit Th1- als auch mit Th2-Zellen eine verstärkte akute Entzündungsreaktion zur Folge hatte. Eine antiinflammatorische Wirkung auf die akute Arthritis zeigte sich bei Th2-Zellen nicht. Allerdings wiesen im weiteren Verlauf die Rezipienten von Th2-Zellen eine tendenziell leicht schwächer entwickelte experimentelle Arthritis auf.

Die gentechnisch veränderten OT-II Mäuse mit AIA wiesen gegenüber den Kontrollen vom Wildtyp eine wesentlich stärkere Kniegelenkschwellung auf. Da bei diesem Mausstamm nahezu alle Th-Zellen spezifisch für das Antigen sind, entsprach die verstärkte akute Entzündungsreaktion entsprechend der Bedeutung von Th-Zellen für die Pathogenese der Arthritis den Erwartungen. Nach fünf Tagen war der Gelenkdurchmesser im Vergleich zur Kontrolle jedoch deutlich verringert und in histologischen Schnitten aus der chronischen Phase konnten überhaupt keine Anzeichen von Arthritis mehr festgestellt werden.

Die spontane und vollständige Remission der Arthritis bei OT-II Mäusen zeigt, dass die Intensität der Immunreaktion im Gelenk stark abhängig von antigenspezifischen Th-Zellen ist. Dabei war die zeitlich kurze Entzündungsreaktion nicht ausreichend, das für die Aktivierung der synovialen Fibroblasten und das Initiieren der knorpel-destruierenden Prozesse notwendige inflammatorische Milieu zu schaffen. Vor diesem Hintergrund wäre für die Pathogenese der RA ein Autoantigen als initialer Stimulus der T-Zell-Aktivierung eher zu vermuten als ein körperfremdes Antigen. Andererseits ist es genauso vorstellbar, dass bei der Beseitigung eines fremden Antigens und der damit verbundenen Gewebeschädigung autoreaktive Th-Zellen entstehen, die eine persistierende Autoimmunreaktion hervorrufen. Dieser Schritt war bei den TCR-transgenen OT-II Mäusen nicht möglich. Es wurde die Überlegung diskutiert, dass T-Zellen zwar an der Entstehung der RA beteiligt sind und später in einen inaktiven, anergen Zustand übergehen, doch steht dies im Widerspruch zur erfolgreichen Therapie der RA über die eingangs erwähnte selektive Hemmung der T-Zell-Aktivierung mit dem Fusionsprotein CTLA4Ig durch Blockade der Liganden für CD28 und CD152 auf APC (FIRESTEIN & ZVAIFLER, 1990; KREMER ET AL., 2003).

Die tierexperimentellen Befunde bestätigen die Wichtigkeit der Th-Zellen für die Arthritis. Der Versuch, die Homöostase von Th1- und Th2-Zellen mittels Zelltransfer zu modulieren, war jedoch therapeutisch nicht erfolgreich. Obwohl die von Th2-Zellen sezernierten Zytokine antiinflammatorisch wirken, verstärkten sowohl Th1- als auch Th2-Zellen die akute Entzündungsreaktion. Hierfür könnten inflammatorische interzelluläre Wechselwirkungen über direkten Zell-Zell-Kontakt verantwortlich gewesen sein. Desweiteren wird diskutiert, ob der konzeptionelle Rahmen des Th1/Th2-Paradigmas prinzipiell ausreichend weit gefasst ist (KIDD, 2003).

5.2 Die protektive Rolle von IFN- γ bei der AIA

5.2.1 Exazerbation der AIA bei IFN- γ ^{-/-} Mäusen

Der Schwerpunkt der Arbeit lag auf der Charakterisierung der AIA bei IFN- γ ^{-/-} Mäusen und damit bei der Untersuchung der Bedeutung dieses Zytokins für die Pathogenese in diesem Arthritismodell. Ausgehend von der Hypothese, dass Th1-Zellen und das für diesen Zelltyp charakteristische Zytokin IFN- γ proinflammatorische Eigenschaften besitzen, wäre gemäß dem Th1/Th2-Paradigma der RA durch die Unterbrechung der über IFN- γ vermittelten Signalwege bei solchen Mäusen eine abgeschwächte Verlaufsform der Arthritis zu erwarten.

Überraschenderweise war trotz der bekannten proinflammatorischen Funktionen von IFN- γ das genaue Gegenteil der Fall. Das Fehlen des Zytokins hatte auf die Entstehung der experimentellen Arthritis nicht nur keine Auswirkung, sondern führte in der akuten Phase sogar zu einer deutlich verstärkten Immunreaktion und Ausprägung der Arthritis. Folglich bestehen bei der AIA von IFN- γ unabhängige Pathogenesemechanismen und in diesem Arthritismodell ruft dieses Zytokin *in vivo* protektive und entzündungshemmende Effekte hervor.

Die experimentellen Befunde der Untersuchungen zeigten bei IFN- γ ^{-/-} Mäusen eine stärkere Ausprägung der klinischen Parameter als beim Wildtyp. Die die Intensität der Immunantwort reflektierende Schwellung des Kniegelenks war bei den IFN- γ ^{-/-} Mäusen auf fast das Dreifache erhöht. Obwohl die DTH-Reaktion normalerweise den Th1-Zellen zugeordnet wird, die Migration von Lymphozyten durch IFN- γ gesteuert wird und über Antikörper gegen das Zytokin gehemmt werden kann, war diese bei den IFN- γ ^{-/-} Mäusen ebenfalls signifikant erhöht (CHER & MOSMANN, 1987; ISSEKUTZ ET AL., 1988). Histologisch konnte in den Schnitten von IFN- γ ^{-/-} Mäusen mit akuter AIA eine massive Einwanderung von Entzündungszellen festgestellt werden, wobei es sich vorwiegend um polymorphonukleäre neutrophile Granulozyten handelte. Trotz der hemmenden Effekte von IFN- γ auf die Osteoklastogenese war das Maß an Knochen- und Knorpelabbau in dieser frühen Phase der Arthritis nur gering.

T-Zell-Zytokine waren in den Überständen von Kulturen von Lymphknoten- und Milzzellen von IFN- γ ^{-/-} Mäusen mit akuter AIA gegenüber dem Wildtyp vermehrt vorhanden. Bei den Th2-typischen Zytokinen IL-4 und IL-5 könnte dies mit der

fehlenden Hemmung durch IFN- γ erklärt werden. Da aber auch andere Zytokine erhöht waren, fand keine unilaterale Aktivierung einzelner Th-Zell-Subpopulationen, sondern eine generelle Aktivierung der Th-Zellen statt. Insbesondere die Produktion großer Mengen von IL-17 als Reaktion auf die Stimulation des TCR mit mBSA oder über anti-CD3-Antikörper war auffallend.

Die humorale Immunantwort andererseits war bei den IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäusen abgeschwächt. Die Antikörper-Gesamt-Titer im Serum, aber auch mBSA-spezifische und gegen Kollagen I und II sowie Proteoglykane gerichtete Antikörper waren verringert, obwohl Antikörper in anderen Arthritismodellen bei der Entstehung der Erkrankung eine wichtige Rolle spielen (HOLMDAHL ET AL., 1985; KNEILLING ET AL., 2007). Das Fehlen von IFN- γ betraf insbesondere die Sekretion von IgG2a, welches durch das Zytokin induziert wird (FINKELMANN ET AL., 1988). Folglich lässt sich die verstärkte Entzündungsreaktion bei IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäusen nach Applikation des Antigens nicht einer erhöhten Antikörper-Produktion und nachfolgender Aktivierung des Komplementweges zuordnen, sondern ist vielmehr durch eine verstärkte Ausprägung der zellulären Effektormechanismen begründet.

Auch in Gelenkextrakten aus der akuten Arthritis waren bei IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäusen im Vergleich zum Wildtyp die proinflammatorischen Zytokine mit Ausnahme von IL-6 erhöht, insbesondere IL-17. Dies stimmt mit den Befunden aus den Kulturüberständen von Lymphknoten- und Milzzellen überein. Die Zytokine im Serum hingegen waren bei den IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäusen zum gleichen Zeitpunkt verringert. Die lokale Aktivierung der zytokinproduzierenden Zellen am Entzündungsort und in den peripheren lymphatischen Organen muss somit nicht zwangsläufig systemisch in Erscheinung treten.

In der chronischen Phase der AIA war zwischen Gelenkschnitten von IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäusen und dem Wildtyp histologisch kein Unterschied erkennbar, obwohl IFN- γ über die Regulation von RANKL einen der wichtigsten Faktoren der Osteoklastogenese beeinflusst und in der AIA bei Balb/c Mäusen zu diesem Zeitpunkt verstärkt knorpelabbauende Prozesse stattfinden (KOTAKE ET AL., 1999; TAKAYANAGI ET AL., 2000; WILLIAMS ET AL., 2007). Zymographisch ergab sich bei Gelenkextrakten von d3 zwischen IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäusen und Wildtyp kein Unterschied an matrixabbauenden MMP. Neben den verschiedenen Mausstämmen könnten auch Unterschiede bei den verwendeten Adjuvantien eine Ursache sein, warum in der vorliegenden Arbeit in der

chronischen Phase keine verstärkte Gelenkdestruktion bei $\text{IFN-}\gamma^{-/-}$ Mäusen beobachtet wurde. So kann in C57Bl/6 Mäusen bei der AIA die Bildung von ektopischen lymphoiden Follikeln im arthritischen Gelenk oder die Suszeptibilität für die CIA mit sehr hohen Dosen an *Mycobacterium tuberculosis* herbeigeführt werden (CAMPBELL ET AL., 2000; WENGNER ET AL., 2007). Die Antikörper-Titer im Serum waren bei den $\text{IFN-}\gamma^{-/-}$ Tieren in der chronischen Phase ebenso wie in der akuten Phase erniedrigt. Eine Ausnahme bildeten die gegen Kollagen II gerichteten IgG. Diese waren gegenüber dem Wildtyp erhöht.

Die Fähigkeit, genotypisch verankerte Grenzen zu überwinden, ist für ein Zytokin eine ungewöhnliche und seltene Eigenschaft. Die Suszeptibilität für die CIA ist normalerweise MHC-restringiert und auf die Haplotypen H-2^q and H-2^r begrenzt (WOOLEY ET AL., 1981). Die als Wildtyp resistenten Mausstämme C57Bl/6 (H-2^b), BALB/c (H-2^d) oder 129/Sv (H-2^b) werden jedoch hochsuszeptibel für die CIA, wenn die Gene für $\text{IFN-}\gamma$ oder $\text{IFN-}\gamma\text{R}$ ausgeschaltet werden (GUEDEZ ET AL., 2001; ORTMANN & SHEVACH, 2001; CHU ET AL., 2003). Die gemachten Versuche zur Suszeptibilität für die CIA bei $\text{IFN-}\gamma^{-/-}$ C57Bl/6 Mäusen konnten dies bestätigen. Während die Mäuse vom Wildtyp keine Arthritis entwickelten, war dies bei 40 % der $\text{IFN-}\gamma^{-/-}$ Tiere der Fall. Die Kompetenz, auf Antigenexposition mit einer $\text{IFN-}\gamma$ -vermittelten Antwort zu reagieren, kann folglich eine experimentelle Arthritis genauso effektiv verhindern, wie ein nicht suszeptibler Haplotyp der MHC-Moleküle.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass im Modell der AIA, in welchem Th-Zellen bei der Pathogenese eine maßgebliche Rolle spielen (PETROW ET AL., 1996; POHLERS ET AL., 2004), das Fehlen des für Th1-Zellen charakteristischen Zytokins $\text{IFN-}\gamma$ eine Verstärkung und nicht eine Verringerung der inflammatorischen Immunantwort bewirkte. Dabei hatte die Defizienz für $\text{IFN-}\gamma$ kaum Auswirkung auf die chronische Arthritis, beeinflusste aber maßgeblich den Verlauf der akuten Entzündungsreaktion.

Die erlangten Ergebnisse unterstützen nicht die verbreitete Vorstellung eines proinflammatorischen Zytokins, entsprechen aber Befunden aus anderen Modellen für Arthritis oder weiteren Autoimmunerkrankungen. So führt die Deletion des Rezeptors für $\text{IFN-}\gamma$ bei für die CIA suszeptiblen Mausstämmen im Vergleich zum Wildtyp zu einem früheren Beginn der Erkrankung und zeigt damit, dass die Unterbrechung der über $\text{IFN-}\gamma$ induzierten Signalwege die Inzidenz und den Verlauf

der Arthritis negativ beeinflusst (MANOURY-SCHWARTZ ET AL., 1997; VERMEIRE ET AL., 1997). Übereinstimmend mit den Beobachtungen bei der CIA ist bei der EAE die Schwere der Erkrankung bei IFN- γ ^{-/-} Tieren verstärkt und die nicht suszeptiblen Mausstämme Balb/c und C57Bl/6 werden suszeptibel, wenn IFN- γ -vermittelte Signalwege aufgehoben werden (FERBER ET AL., 1996; TRAN ET AL., 2000).

Ein Kennzeichen für die Unterbrechung der über IFN- γ gesteuerten Signalwege und Effektormechanismen bei tierexperimentellen Autoimmunerkrankungen ist Neutrophilie, die verstärkte Freisetzung von neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark und ihre Einwanderung am Entzündungsherd. Dies wurde nicht nur für experimentelle Arthritiden festgestellt, sondern auch für die EAE, wo im Zentralnervensystem von Mäusen mit einer Defizienz für IFN- γ oder IFN- γ R aufgrund der Überexpression von chemotaktisch wirkenden Zytokinen zahlreiche neutrophile Granulozyten zu finden sind (TRAN ET AL., 2000; WILLIAMS ET AL., 2007). Eine Regulation der Expression von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen hat schwerwiegende Auswirkungen auf die Einwanderung von immunkompetenten Zellen zum Ort der Entzündung und beeinflusst dadurch maßgeblich die Stärke und Effektivität der Immunantwort. So hemmt IFN- γ neben Chemokinen die Expression von E- und P-Selektinen auf aktivierten humanen Endothelzellen (OHMORI ET AL., 1994; MELROSE ET AL., 1998; WUYTS ET AL., 2003).

Diese Adhäsionsmoleküle sind sowohl wichtig für die Infiltration von neutrophilen Granulozyten und Leukozyten in das entzündete Gewebe, als auch für die Migration von Th1-Zellen in das arthritische Gelenk (AUSTRUP ET AL., 1997; ISSEKUTZ ET AL., 2001; KULIDJIAN ET AL., 2002). Neben der Lymphozytenmigration beeinflusst IFN- γ auch die Migration der neutrophilen Granulozyten und reguliert die Produktion des auf neutrophile Granulozyten wirkenden Chemokins GPC-2 (,granulocyte chemotactic protein 2') durch stimulierte humane Fibroblasten und bei Mäusen werden das von Makrophagen stammende KC (,keratinocyte-derived chemokine') und MIP-2 durch IFN- γ gehemmt (PILLINGER & ABRAMSON, 1995; WITKO-SARSAT ET AL., 2000). Studien mit RA-Fibroblasten *in vitro* zeigten eine signifikante Verringerung der mit IL-1 β oder TNF- α induzierten Bildung des neutrophile Granulozyten aktivierenden Chemokins CXCL8 durch IFN- γ , im Gegensatz dazu aber eine Erhöhung der Produktion von CCL2 (CASSATELLA ET AL., 1997).

5.2.2 Neutralisation und Rekonstituierung von IFN- γ

Studien mit rekombinantem Zytokin oder IFN- γ -neutralisierenden monoklonalen Antikörpern führten zu widersprüchlichen Ergebnissen. Die Applikation von IFN- γ verstärkt entweder die CIA oder hemmt im Gegensatz dazu die Entwicklung der Erkrankung (COOPER ET AL., 1988; MAURITZ ET AL., 1988; NAKAJIMA ET AL., 1991). Oder aber beim gleichen experimentellen Ansatz führen hohe Dosen zu einer verstärkten und niedrige Dosen zu einer abgeschwächten CIA (BOISSIER ET AL., 1995). Bei der Adjuvans-Arthritis der Ratte hängt die Art der Wirkung von IFN- γ vom Zeitpunkt der Applikation des Zytokins ab. Wird IFN- γ vor dem CFA verabreicht, führt dies zu einer Verschlimmerung der Arthritis, während die Gabe nach CFA eine Verbesserung bewirkt (JACOB ET AL., 1989).

Auch bei der Neutralisierung von IFN- γ mit spezifischen Antikörpern ist der Zeitpunkt entscheidend darüber, ob eine Hemmung oder Verstärkung der CIA eintritt. Eine Therapie mit Antikörpern in einem frühen Stadium führt zu einer schwächer verlaufenden Form der Arthritis, während die Neutralisation zu einem späten Zeitpunkt die Inzidenz und die Schwere einer etablierten CIA erhöht (BOISSIER ET AL., 1995; THORNTON ET AL., 2000). Im Modell der EAE verhindert die Behandlung mit IFN- γ die Erkrankung (HEREMANS ET AL., 1996). Zusammengefasst verdeutlichen diese Befunde aufgrund der vielseitigen immunmodulatorischen Eigenschaften von IFN- γ die Schwierigkeit, korrekte Vorhersagen zu der Wirkung dieses Zytokins auf die Pathogenese von Autoimmunerkrankungen zu machen.

Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse zur Therapie mit rekombinantem IFN- γ oder der Neutralisation des Zytokins mit Antikörpern belegen im Modell der AIA für IFN- γ eine die Arthritis hemmende Wirkung und die Modulation der Immunreaktion über die Hemmung der Einwanderung von Entzündungszellen in das Gelenk. Die Verabreichung von rekombinantem IFN- γ über eine einzelne lokale Injektion in den Kniegelenksspalt verringerte die akute Gelenkschwellung um 30-40 %. Der signifikant verringerte Arthritis-Index aus der histologischen Bewertung der Kniegelenke bestätigte die Wirksamkeit einer solchen Behandlung. Dabei waren keine Veränderungen bei den Immunglobulinen im Serum oder den Zytokinen in Kulturüberständen und damit kein systemischer Effekt der Zytokinapplikation feststellbar.

Da die lokale antiinflammatorische Wirkung von IFN- γ sowohl in IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäusen als auch beim Wildtyp erzielt werden konnte, können potentiell veränderte Signalwege aufgrund des Fehlens des Zytokins während der Ontogenese der IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäuse hierbei nicht von Bedeutung sein. Die systemische Neutralisation von IFN- γ mit monoklonalen Antikörpern führte in der akuten AIA zu einer leichten Verschlimmerung der Arthritis, allerdings war der Effekt nicht so ausgeprägt wie bei der Therapie mit rekombinantem Zytokin.

Die im Tiermodell beobachteten antiinflammatorische Effekte von rekombinantem IFN- γ lassen sich auch bei der humanen RA nachweisen. Während einige Studien mit relativ kleinen Patientenzahlen keinen therapeutischen Effekt ergaben, verringerte die Therapie mit rekombinantem IFN- γ in Ende der 80er Jahre durchgeführten klinischen Doppel-Blind-Studien (n ~ 100) die Beschwerden der Betroffenen ohne nennenswerte Nebenwirkungen (LEMMEL ET AL., 1988; CANNON ET AL., 1989). Selbst ohne therapeutischen Effekt stellen diese Studien die aus dem Th1/Th2-Paradigma abgeleitete proinflammatorische Rolle von IFN- γ in Frage, zumal die bei der RA festgestellte Dominanz der Th1-Zellen auf einem Stadium mit etablierter Arthritis beruht (KUSABA ET AL., 1998; MORITA ET AL., 1998). Neuere Studien zur detaillierten Analyse der Zytokine in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit früher RA konnten zwar Th2-Zellen zugeordnete Zytokine nachweisen, aber kein IFN- γ , was die Beteiligung und Notwendigkeit dieses Zytokins bzw. der Th1-Zellen an der Entstehung der RA in Frage stellt (RAZA ET AL., 2005).

Für die AIA zeigt sich *in vivo* eine deutliche Dominanz der antiinflammatorischen gegenüber den proinflammatorischen Eigenschaften von IFN- γ . Aufgrund der vielfältigen Beteiligung von IFN- γ an Signalwegen und Effektormechanismen ist diese protektive Wirkung weniger auf einen singulären Mechanismus zurückzuführen, sondern vielmehr als Summe der durch IFN- γ induzierten Effekte zu verstehen. Dennoch sind einige von IFN- γ beeinflusste Mechanismen sicherlich von besonders großer funktioneller Relevanz für die protektive Wirkung in der Pathogenese der Arthritis.

Experimentelle Befunde aus verschiedenen Tiermodellen zeigen, dass IFN- γ für die Homöostase der T-Zellen von großer Bedeutung ist. Aus adoptiven Transfer-Experimenten mit Th1-Zellen ist bekannt, dass IFN- γ bei der Selbst-Regulation des

Pools von Th1-Effektorzellen nach der Gabe von Antigen eine Rolle spielt (FEUERER ET AL., 2006). Die regulatorische Funktion von Th1-Zellen in einem Modell für Diabetes hängt von IFN- γ und direktem Zell-Zell-Kontakt ab. In diesem Modell ist durch APC produziertes NO notwendig für die Hemmung der Proliferation pathogener T-Zellen (CHEN ET AL., 2006). Bei der EAE führt das Fehlen von IFN- γ zu einer nicht limitierten Expansion der aktivierten CD4⁺ Th-Zellen und bei der CIA wird die Aktivität der T_{reg}-Zellen durch endogenes IFN- γ reguliert (WILLENBORG ET AL., 1999; CHU ET AL., 2000; KELCHTERMANS ET AL., 2005).

Die Induktion des Tryptophan-Katabolismus durch IFN- γ in DC, Makrophagen und Fibroblasten über das Enzym IDO führt zur Bildung von die T-Zell-Apoptose auslösenden Kynureinen (DU ET AL., 2000; SOTERO-ESTEVA ET AL., 2000; GROHMANN ET AL., 2003). Über diesen Mechanismus können auch T_{reg}-Zellen über CTLA-4 die Aktivität der DC modulieren (FALLARINO ET AL., 2003). IDO verhindert bei trächtigen Mäusen die T-Zell-vermittelte Abstoßung allogener Feten (MUNN ET AL., 1998). Auch für die Umwandlung von CD4⁺CD25⁻ Zellen in CD4⁺ T_{reg}-Zellen wird eine Beteiligung von IFN- γ diskutiert (WANG ET AL., 2006).

Die Produktion von IFN- γ ist nicht auf CD4⁺ Th-Zellen beschränkt. Bei der CIA ist ein aktiver Suppressionsmechanismus beschrieben, der über die Expansion von IFN- γ -produzierenden CD11⁺CD8⁺ T-Zellen die Erkrankung hemmt und über anti-4-1BB-Antikörper ausgelöst werden kann (SEO ET AL., 2004). Neben CD4⁺ Th-Zellen, CD8⁺ Th-Zellen und DC kommen auch NK-Zellen, NKT-Zellen oder B-Zellen als physiologische Quelle von IFN- γ in Frage.

Ein sich in jüngster Zeit herauskristallisierender von IFN- γ induzierter anti-inflammatorischer Mechanismus ist die hemmende Wirkung auf die Differenzierung der IL-17-produzierenden Th-Zellen. Diesem Th-Zell-Subtyp wird zunehmend funktionelle pathologische Relevanz bei der RA und anderen Autoimmunerkrankungen zugewiesen.

Durch den adoptiven Transfer von CD4⁺ Zellen konnte die Arthritis in der vorliegenden Arbeit erfolgreich in naive Mäuse übertragen werden. Diese Experimente bestätigten die Bedeutung von Th-Zellen für die Pathogenese dieses Arthritismodells. Interessanterweise entwickelten die Empfänger von CD4⁺IFN- γ Zellen mehr Arthritis als die Empfänger von CD4⁺ Zellen aus dem Wildtyp. Bei den

Rezipienten von $CD4^+IL-17^-$ war die akute Phase der Arthritis leicht abgeschwächt. Für das arthritogene Potential der $CD4^+$ Zellen aus den drei Mausstämmen ergibt sich somit die Reihenfolge $CD4^+IFN-\gamma^- > CD4^+ > CD4^+IL-17^-$, was die antiinflammatorischen Effekte von $IFN-\gamma$ bestätigt.

5.3 Im Fokus: Interleukin-17

Das Th1/Th2-Paradigma und die daraus abgeleiteten Vorhersagen erwiesen sich für die Erklärung einiger experimenteller Befunde als nicht ausreichend. So führt die Unterbrechung der über $IFN-\gamma$ vermittelten Signalwege und Effektormechanismen in Modellen für Arthritis oder andere Autoimmunerkrankungen häufig zu verstärkten Immunreaktionen und schwereren Krankheitsverläufen. Es zeigte sich, dass es bei der genetischen Defizienz des die Differenzierung von Th1-Zellen induzierenden IL-12 maßgeblich ist, welche der beiden Untereinheiten des Heterodimers ausgeschaltet wird (O'GARRA, 1998; MURPHY ET AL., 2003). Während das Fehlen der aus einem 35 kDa großen Protein (p35) bestehenden Untereinheit kaum Auswirkungen hat, hemmt das Fehlen der 40 kDa großen Untereinheit (p40) die Entwicklung der experimentellen Autoimmunerkrankung. Da p40 im Gegensatz zu p35 nicht nur ein Bestandteil von IL-12, sondern auch von IL-23 ist, haben über IL-23 induzierte Mechanismen offensichtlich eine wesentlichere Funktion bei der Pathogenese als über IL-12/ $IFN-\gamma$ initiierte Prozesse (CUA ET AL., 2003).

IL-23 wird nach Antigenexposition von DC und Makrophagen produziert und vor allem mit der Differenzierung und Expansion von Th-Zellen des Th17-Subtyps in Verbindung gebracht (AGGARWAL ET AL., 2003; HAPPEL ET AL., 2003; LANGRISH ET AL., 2005). Die Wirkung ist auf Th17-Zellen beschränkt, Th1- und Th2-Zellen reagieren nicht mit einer erhöhten Proliferation auf IL-23 (HARRINGTON ET AL., 2005). Neuere Arbeiten betrachten $TGF-\beta$ (Transforming growth factor- β) und IL-6 als die entscheidenden Faktoren für die Differenzierung pathogener Th17-Zellen aus naiven Th-Zellen (Abb. 4; BETTELLI ET AL., 2006; VELDHOEN ET AL., 2006). Charakteristisch für Th17-Zellen ist die Produktion der Zytokine IL-17, IL-21, IL-22, GM-CSF (Granulocyte macrophage colony-stimulating factor) und $TNF-\alpha$ (INFANTE-DUARTE ET AL., 2000; LIANG ET AL., 2006; KORN ET AL., 2007; NURIEVA ET AL., 2007).

Eine Vielzahl aktueller Veröffentlichungen zeigt, dass IL-17 sowohl bei der RA als auch bei anderen organspezifischen Autoimmunerkrankungen und ihren Modellen

ein pathologisch sehr relevantes proinflammatorisches Zytokin ist (NAKAE ET AL., 2003a, 2003b; OGAWA ET AL., 2004; LUBBERTS ET AL., 2005; ISHIZU ET AL., 2005; WONG ET AL., 2006; KOMIYAMA ET AL., 2006; SCHNYDER-CANDRIAN ET AL., 2006; RANGACHARI ET AL., 2006). Es werden die Subtypen IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E und IL-17F unterschieden, wobei IL-17 in der Regel für IL-17A und IL-17F steht, da sich die immunologische Forschung bisher primär auf diese Subtypen konzentriert (KOLLS & LINDEN, 2004; ALBER & KAMRADT, 2007). IL-17A und IL-17F stammen hauptsächlich von Th-Zellen und haben teilweise redundante Effektorfunktionen. Analog zu den für die Th1-Differenzierung wichtigen Transkriptionsfaktoren STAT-4, T-bet und STAT-1 bzw. STAT-6 und GATA-3 für die Th2-Differenzierung, gibt es für die Genese der Th17-Zellen mit STAT-3 und ROR γ t charakteristische und essentielle Transkriptionsfaktoren (ZHENG & FLAVELL, 1997; SZABO ET AL., 2000; IVANOV ET AL. 2006; LAURENCE ET AL. 2007).

Die Aktivierung des Rezeptors für IL-17 auf T-Zellen, B-Zellen, Fibroblasten, Endothelzellen und myeloiden Zellen führt zur Expression der proinflammatorischen Mediatoren IL-1 β , IL-6, IL-8, G-CSF und TNF- α (FOSSIEZ ET AL., 1996; JOVANOVIC ET AL., 1998; CHABAUD ET AL., 1999; LAAN ET AL., 1999; MOLET ET AL., 2001; JONES & CHAN, 2002). Damit hat IL-17 maßgeblichen Einfluss auf die Aktivierung und Migration neutrophiler Granulozyten (Hoshino ET AL., 2000; FORLOW ET AL., 2001; LUBBERTS ET AL., 2005). Aus Infektionsmodellen ist bekannt, dass neutrophile Granulozyten unter Umständen selbst IL-17 bilden können (FERRETTI ET AL., 2003).

Ein charakteristisches Merkmal der akuten Entzündungsreaktion bei der AIA ist die Infiltration von neutrophilen Granulozyten in das arthritische Kniegelenk. Bei IFN- γ ^{-/-} Mäusen sind die diese Infiltration regulierenden Mechanismen unterbrochen, wie die um ein Vielfaches erhöhte Zahl an neutrophilen Granulozyten in den Gelenkschnitten zeigt. Diese in einer weit größeren Zahl als Makrophagen vorhandenen neutrophilen Granulozyten sind eine grundlegende Quelle von die extrazelluläre Matrix abbauenden Proteasen und proinflammatorischen Zytokinen. Sie spielen möglicherweise eine zentrale Rolle bei den regulatorischen Wechselwirkungen zwischen angeborener und erworbener Immunität (CASSATELLA ET AL., 1995; PILLINGER & ABRAMSON, 1995; CASSATELLA ET AL., 1997; WITKO-SARSAT ET AL., 2000).

In Gelenkextrakten von IFN- γ ^{-/-} Mäusen mit akuter AIA konnte mit Ausnahme von IL-6 eine im Vergleich zum Wildtyp erhöhte Produktion von proinflammatorischen

Zytokinen (IL-1 β , IL-17, TNF- α) festgestellt werden. Am deutlichsten war der Unterschied mit einer 2,5-fachen Erhöhung bei IL-17 ausgeprägt. Die generell erhöhte Aktivierung und Zytokinproduktion der Th-Zellen aus Lymphknoten und Milzen bei IFN- γ ^{-/-} Tieren mit AIA war ebenfalls mit einer verstärkten IL-17-Antwort assoziiert. Somit ergab sich als charakteristisches Merkmal der AIA bei IFN- γ ^{-/-} Mäusen die Koexistenz von aktivierten T-Zellen, massiver Einwanderung neutrophiler Granulozyten in das arthritische Gelenk und der Sekretion großer Mengen von IL-17.

Durch die Neutralisation von IL-17 ließ sich die Schwere der Arthritis bei IFN- γ ^{-/-} Mäusen wirksam verringern. Insbesondere die Migration der neutrophilen Granulozyten zum Ort der Entzündung wurde gehemmt, wie es der Arthritis-Index der histologischen Bewertung zeigte. Der Grad der Kniegelenkschwellung bei IFN- γ ^{-/-} Mäuse konnte auf diese Weise auf das Niveau des Wildtyps reduziert werden. Damit ließ sich durch die systemische Hemmung von IL-17 bei IFN- γ ^{-/-} Tieren ein größerer therapeutischer Erfolg erzielen als über die lokale Gabe von rekombinantem Zytokin, welche wiederum im Wildtyp die Arthritis effektiver unterdrückte als die Zell-Therapie mit regulatorischen T-Zellen (FREY ET AL., 2005). Welcher therapeutische Ansatz am sinnvollsten ist, lässt sich allerdings erst nach der Durchführung breit angelegter Vergleichsstudien mit verschiedenen Dosierungen, Therapiezeitpunkten und Applikationsformen exakt abschätzen.

Bei IL-17^{-/-} Mäusen verlief die AIA in abgeschwächter Form. Die Kniegelenkschwellung war verringert und klang schneller wieder ab als beim Wildtyp. Die Unterschiede beim Arthritis-Index zeigten sich vor allem auf Ebene der akuten Entzündung, die besonders die Infiltration neutrophiler Granulozyten repräsentiert. Die Infiltration dieser Zellen war bei diesen Tieren ohne die Effektorfunktion von IL-17 deutlich reduziert. Dies impliziert, dass für die abnorm verstärkte pathologische Reaktion bei der in IFN- γ ^{-/-} Mäusen durchgeführten AIA hauptsächlich IL-17-induzierte Mechanismen verantwortlich sind.

Die elementare Bedeutung von IL-17 in diesem Modell der RA steht im Einklang mit der beschriebenen pathologischen Relevanz von Th17-Zellen und IL-17 für Autoimmunmodelle (PARK ET AL., 2005). Die EAE lässt sich über diese Subpopulation von Th-Zellen effizient induzieren und in den peripheren Immunorganen und im Zentralnervensystem findet sich in diesem Modell eine starke antigenspezifische Produktion von IL-17 (HOFSTETTER ET AL., 2005; LANGRISH ET AL., 2005). Bei IL-17^{-/-}

Mäusen ist die Entwicklung der EAE unterdrückt, was zu einem verzögerten Einsetzen, einer verringerten Schwere und einer vorzeitigen Remission der Erkrankung führt (KOMIYAMA ET AL., 2006). Dabei stammt das nach Antigenstimulation produzierte IL-17 beim Wildtyp vorwiegend von CD4⁺ T-Zellen und nur zu einem geringen Teil von CD8⁺ T-Zellen. Im Gegensatz zu CD4⁺ T-Zellen aus dem Wildtyp ist es nicht möglich, die EAE über einen adoptiven Transfer mit T-Zellen aus IL-17^{-/-} Tieren erfolgreich zu übertragen. Die Vakzinierung gegen IL-17 mit virusähnlichen und mit IL-17 konjugierten Partikeln unterdrückt sowohl die EAE als auch die CIA (RÖHN ET AL., 2006).

Bei IL-1Ra^{-/-} Mäusen entwickelt sich durch den übermäßigen IL-1-Stimulus spontan eine mit IL-17 assoziierte destruktive Arthritis, nicht jedoch in Tieren, die für IL-1Ra und IL-17 defizient sind (NAKAE ET AL., 2003b). Die Inzidenz und Schwere der CIA ist bei IL-17^{-/-} Mäusen verringert und die antigenspezifische T-Zell-Antwort vermindert (NAKAE ET AL., 2003a). Die im vorigen Kapitel beschriebene Suszeptibilität von IFN- γ ^{-/-} C57Bl/6 Mäusen für die Erkrankung trotz H-2^b Haplotyps wird durch die fehlende Hemmung der IL-17-Produktion verursacht (CHU ET AL., 2007). IL-17 ist bei der experimentellen Arthritis ein wichtiges Signalmolekül für die primäre Entzündung und Flare-up-Reaktionen. So hat die Behandlung mit polyklonalen anti-IL-17-Antikörpern bei der CIA einen therapeutischen Effekt. Die Schwere der Erkrankung und die radiographisch detektierbare Schädigung der Gelenke werden dadurch vermindert, ebenso der systemische Spiegel an IL-6 und die Zahl von IL-1 β ⁺ und RANKL⁺ Zellen im Synovium (LUBBERTS ET AL., 2004). IL-1 β und RANKL sind zwei wichtige Faktoren für die Osteoklastogenese und Gelenkdestruktion bzw. die Differenzierung von synovialen Makrophagen zu Osteoklasten (HSU ET AL., 1999; KOTAKE ET AL., 1999; ITONAGA ET AL., 2000; ZWERINA ET AL., 2007). Über die Modulation der Balance von RANKL und seinem Antagonisten Osteoprotegerin (OPG) fördert IL-17 in der CIA die Gelenkdestruktion (LUBBERTS ET AL., 2003).

Die lokale Überexpression von IL-17 im Gelenk über adenoviralen Gentransfer führt zu einem verstärkten Influx neutrophiler Granulozyten und vermehrtem Knorpelabbau (LUBBERTS ET AL., 2001). Das Blockieren von IL-17 mit polyklonalen Antikörpern unterdrückt im Modell der AIA bei Flare-up-Reaktionen die Gelenkschwellung und Entzündung (KOENDERS ET AL., 2005a). Ebenso wird über die Hemmung der mRNA-Expression von IL-1 β und RANKL die Osteoklasten-Aktivität und der Knorpelabbau

vermindert. Mit den proinflammatorischen Zytokinen IL-1 β und TNF- α wirkt IL-17 synergistisch, es kann aber auch unabhängig davon wirken (KATZ ET AL., 2001; LEGRAND ET AL., 2001).

Auch in der humanen RA ist IL-17 von großer pathogenetischer Relevanz. Es induziert in synovialen Fibroblasten die Produktion von proinflammatorischem IL-6 (CHABAUD ET AL., 1999). Ebenso findet sich in der Synovialflüssigkeit und im Synovium von RA-Patienten vermehrt IL-17 und in Kulturen mit RA-Synovialgewebe

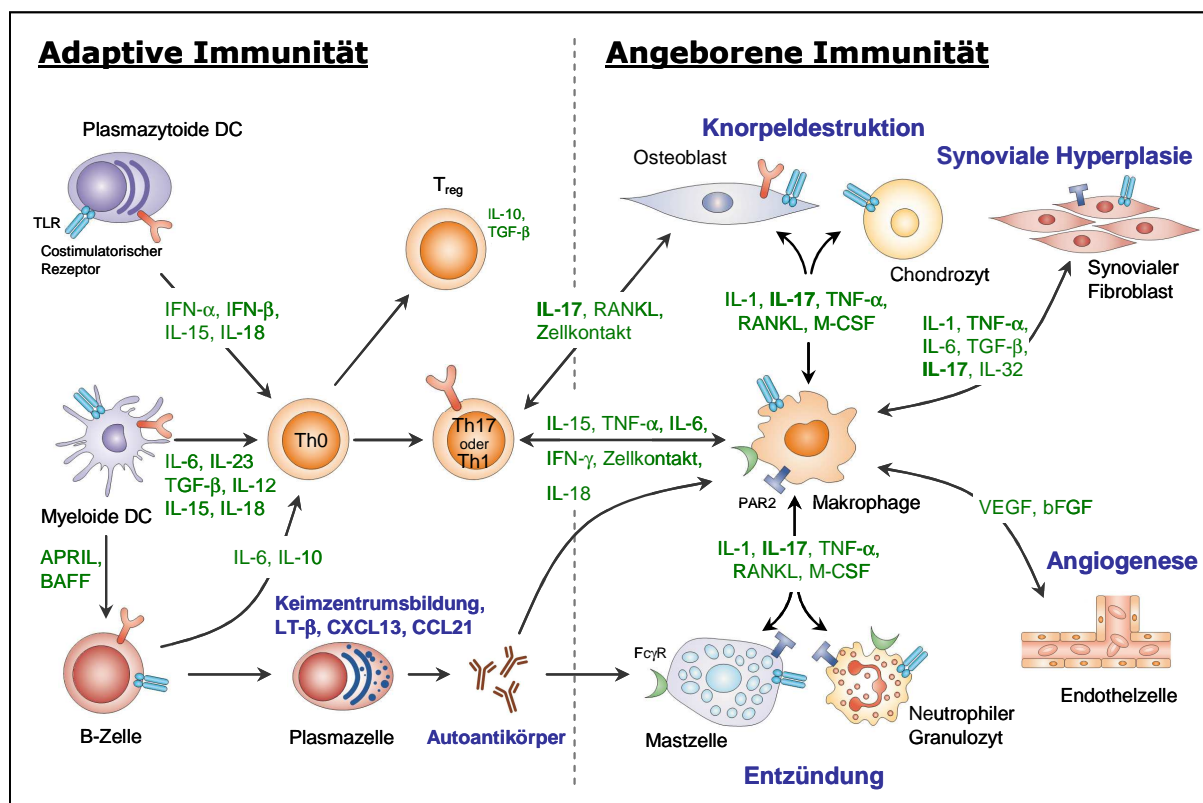


Abb. 40 Übersicht der durch Zytokine vermittelten Mechanismen im Synovium.

Die an der Immunreaktion im entzündeten Synovium beteiligten Zellen lassen sich in Bestandteile des adaptiven und des angeborenen Teils des Immunsystems untergliedern. Die über Zytokine ausgelösten Mechanismen führen zur Aktivierung von T-Zellen, B-Zellen, DC und Makrophagen, welche ihrerseits die Aktivierung der Effektorzellen, darunter neutrophile Granulozyten, Mastzellen, Endothelzellen und synoviale Fibroblasten steuern. IL-17 ist an einer Reihe grundlegender, die adaptive und die angeborene Immunität verbindender Prozesse beteiligt und begünstigt dadurch Entzündung, synoviale Hyperplasie und Knorpeldestruktion.

Abkürzungen: APRIL, a proliferation-inducing ligand; BAFF, B-cell activating factor; bFGF, basic fibroblast growth factor; CCL21, CC-Chemokin-Ligand 21; CXCL13, CXC-Chemokin-Ligand 13; LT, Lymphotoxin; M-CSF, macrophage colony-stimulating factor; PAR2, protease-activated receptor 2; TLR, Toll-like receptor; VEGF, vascular endothelial growth factor. (modifiziert nach MCINNES & SCHETT, 2007).

hemmen anti-IL-17-Antikörper die Reifung von Osteoklasten aus Vorläuferzellen (CHABAUD ET AL., 1999; KOTAKE ET AL., 1999; ZIOLKOWSKA ET AL., 2000). In einer prospektiven Studie mit RA-Patienten konnte gezeigt werden, dass die Expression von IL-17 mRNA in der Synovialmembran prädiktiv für das Ausmaß der Gelenkdestruktion ist, während IFN- γ eine protektive Wirkung hat (KIRKHAM ET AL., 2006).

Über die Regulation der Migration von neutrophilen Granulozyten ist IL-17 für das Ausmaß der akuten Entzündungsreaktion verantwortlich. Weiterhin beeinflusst IL-17 mit der Differenzierung von Osteoklasten aus Gewebsmakrophagen, der Hemmung der Proteoglykansynthese und der Induktion von MMP bei synovialen Fibroblasten maßgeblich die Kernprozesse der Gelenkdestruktion (CHABAUD ET AL., 2000; DUDLER ET AL., 2000; KOSHY ET AL., 2002; KOENDERS ET AL., 2005a, 2005b). Somit nimmt IL-17 eine Schlüsselstellung in der Pathogenese der Arthritis ein (Abb. 40) und es ist anzunehmen, dass es sich dabei um einen zukünftigen und vielversprechenden Ansatzpunkt für eine gegen proinflammatorische Zytokine gerichtete Therapie der RA handelt (LUBBERTS ET AL., 2005; HOFSTETTER ET AL., 2005; RÖHN ET AL., 2006; ASQUITH & MCINNES, 2007).

5.4 IFN- γ : Immunmodulation statt Inflammation

Aktuelle Ergebnisse zeigen, dass IFN- γ die über IL-23 induzierte Expansion von IL-17-produzierenden T-Zellen bzw. die Expression von IL-23R mRNA hemmt und auch das Th2-Zytokin IL-4 inhibitorische Effekte auf die Th17-Differenzierung hat (HARRINGTON ET AL., 2005; CRUZ ET AL., 2006). Übereinstimmend konnte in der vorliegenden Arbeit beobachtet werden, dass IFN- γ *in vitro* in Kulturen von über den TCR stimulierten naiven Th-Zellen dosisabhängig die Entstehung einer größeren Zahl von IL-17-produzierenden T-Effektor-Zellen hemmt. Die Hemmung der IL-17-produzierenden Th-Zellen kam durch eine effektive Hemmung der Proliferation zustande. Ein über IL-23 bzw. IL-23R vermittelter indirekter Mechanismus kann in diesem Fall ausgeschlossen werden, da es sich um T-Zell-Kulturen ohne APC als potentielle Produzenten von IL-23 handelte. Dass die Präsenz von IFN- γ die Population der T-Effektor-Zellen auch *in vivo* beeinflusst, konnte durchflusszytometrisch bei immunisierten Tieren vom Wildtyp und IFN- γ ^{-/-} gezeigt werden.

In den Lymphknoten von IFN- γ ^{-/-} Mäusen war der Anteil an CD4⁺ T-Zellen signifikant erhöht.

Die Regulation der IFN- γ - und IL-17-Produktion durch das jeweils andere Zytokin ist wechselseitig (NAKAE ET AL., 2007). In Kulturen von T-Zellen aus IFN- γ ^{-/-} Tieren findet sich eine erhöhte Zahl von IL-17-Produzenten, während bei Kulturen mit T-Zellen aus IL-17^{-/-} Tieren vermehrt Zellen zu IFN- γ ⁺ T-Zellen differenzieren (KOMIYAMA ET AL., 2006). Bei Eomesodermin handelt es sich um einen zu T-bet paralogen Transkriptionsfaktor. Die über IL-21 induzierte Hemmung der Eomesodermin-Expression ist ein Mechanismus, über den Th17-Zellen die Th1-Differenzierung hemmen können (SUTO ET AL., 2006). Mehrere Arbeiten berichten von einem gewissen Prozentsatz an T-Zellen, die sowohl IFN- γ als auch IL-17 produzieren (AARVAK ET AL., 1999; ACOSTA-RODRIGUEZ ET AL., 2007a, 2007b; ANNUNZIATO ET AL., 2007; SURYANI & SUTTON, 2007). Diese Doppelproduzenten können Ausdruck eines noch nicht abgeschlossenen Differenzierungszustandes sein, wie auch IFN- γ ⁺ und IL-4⁺ Th-Zellen zu einem gewissen Maß die Fähigkeit besitzen, unter entsprechenden Bedingungen das jeweils andere Zytokin zu exprimieren (MESSI ET AL., 2003). Weiterhin gibt es gemeinsame Entwicklungswege bei Th1- und Th17-Zellen. Das Inaktivieren des Transkriptionsfaktors T-bet mit ‚small interfering‘ RNA unterdrückt auch die Expression von IL-23R und damit die Expansion von Th17-Zellen (GOCKE ET AL., 2007). Im Modell der EAE kann über den adoptiven Transfer von IL-23-induzierten Th17-Effektor-Zellen die Krankheit übertragen werden, nicht jedoch über IL-12-induzierte Th1-Effektor-Zellen (LANGRISH ET AL., 2005). Zusätzlich führen anti-IL-17-Antikörper zu einer Abschwächung, anti-IFN- γ -Antikörper zu einer Verstärkung der Erkrankung.

Die Summe an experimentellen Befunden zeigt die Notwendigkeit für einen Paradigmenwechsel im Pathogenesekonzept der RA und anderer, bisher als Th1-vermittelt betrachteter Autoimmunerkrankungen. Die bisher den Th1-Zellen und IFN- γ zugewiesene proinflammatorische Rolle als solche kann in dieser Form nicht weiter aufrechterhalten werden und sollte auf Th17-Zellen und IL-17 übertragen werden. Als einziger der Th-Subtypen Th1, Th2, Th17, T_{reg} haben Th17-Zellen die Fähigkeit, die Osteoklastogenese zu induzieren und verbinden auf diese Weise Inflammation und Gelenkdestruktion (SATO ET AL., 2006).

Trotzdem bleibt IFN- γ nicht zuletzt durch die Hemmung von IL-17 ein wichtiger immunmodulatorischer Faktor in der Pathogenese der RA, der über die Aktivierung von Komponenten des angeborenen Immunsystems nicht nur entzündungsfördernd, sondern auch sehr effektiv entzündungshemmend auf das adaptive Immunsystems wirken kann.

5.5 Schlussfolgerung und Ausblick

Die Ergebnisse der Arbeit belegen nicht nur, dass im Modell der AIA von IFN- γ unabhängige proinflammatorische Signalwege existieren, sondern dass IFN- γ auch in der initialen Phase der Arthritis antiinflammatorisch wirkt. Überraschenderweise spielen bei der Pathogenese dieses Arthritismodells eher IL-17-produzierende Th17-Zellen eine fundamentale Rolle als IFN- γ -produzierende Th1-Zellen, wie dies gemäß dem Th1/Th2-Paradigma der RA zu erwarten gewesen wäre.

Ein wichtiger Mechanismus für die protektive Rolle von IFN- γ in der Pathogenese der Arthritis ist die effektive Hemmung der Expansion der IL-17-produzierenden Th-Zellen. Vor diesem Hintergrund erscheint die Unterbrechung der über IFN- γ aktivierten Signalwege als wenig sinnvoller therapeutischer Ansatzpunkt. Auf diese Weise ist für die Entzündung nicht nur keine protektive Wirkung zu erwarten, sondern gleichzeitig eine Begünstigung der proinflammatorischen IL-17-Antwort.

IL-17 hingegen zeichnet sich zunehmend als neuer und erfolgversprechender therapeutischer Ansatzpunkt der RA ab, insbesondere bei bisher therapierefraktären Verlaufsformen der Erkrankung. Die Ergebnisse dieser Arbeit tragen zur Aufklärung der Effektormechanismen bei den für die Pathogenese wichtigen Wechselwirkungen von IFN- γ , IL-17 und der Migration neutrophiler Granulozyten bei. Auf welche Phasen der RA über IL-17 therapeutisch Einfluss genommen werden kann, etwa die akute Entzündungsreaktion und/oder die Gelenkdestruktion, kann bisher nicht abgeschätzt werden und muss durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

Weiterhin bietet die Regulation der IL-17-Antwort der Th-Zellen durch IFN- γ eine plausible Erklärung für die in vielen Modellen von Autoimmunerkrankungen beobachteten proinflammatorischen Auswirkungen, sobald die über IFN- γ vermittelten Signalwege unterbrochen werden.

6 Literaturverzeichnis

- Aarvak T, Chabaud M, Miossec P, Natvig JB (1999). IL-17 is produced by some proinflammatory Th1/Th0 cells but not by Th2 cells. *J Immunol.* 162(3):1246-1251.
- Acosta-Rodriguez EV, Rivino L, Geginat J, Jarrossay D, Gattorno M, Lanzavecchia A, Sallusto F, Napolitani G (2007a). Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol.* 8(6):639-646.
- Acosta-Rodriguez EV, Napolitani G, Lanzavecchia A, Sallusto F (2007b). Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol.* 8(9):942-949.
- Aggarwal S, Ghilardi N, Xie MH, de Sauvage FJ, Gurney AL (2003). Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem.* 278(3):1910-1914.
- Ahmed SA (1994). Autoimmune lesions: is the C57BL/6 mouse strain normal or autoimmunity-prone? *Immunol Today.* 15(8):389-390.
- Adorini L, Guery JC, Trembleau S (1996). Manipulation of the Th1/Th2 cell balance: an approach to treat human autoimmune diseases? *Autoimmunity.* 23(1):53-68.
- Albani S, Roudier J (1992). Molecular basis for the association between HLA DR4 and rheumatoid arthritis. From the shared epitope hypothesis to a peptidic model of rheumatoid arthritis. *Clin Biochem.* 25(3):209-212.
- Alber G, Kamradt T (2007). Regulation of Protective and Pathogenic Th17 Responses. *Current Immunology Reviews.* 3:3-16.
- Anunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, Maggi L, Liotta F, Mazzinghi B, Parente E, Fili L, Ferri S, Frosali F, Giudici F, Romagnani P, Parronchi P, Tonelli F, Maggi E, Romagnani S (2007). Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med.* 204(8):1849-1861.
- Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS, et al. (1988). The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 31(3):315-324.
- Asquith DL, McInnes IB (2007). Emerging cytokine targets in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 19(3):246-251.
- Austrup F, Vestweber D, Borges E, Lohning M, Brauer R, Herz U, Renz H, Hallmann R, Scheffold A, Radbruch A, Hamann A (1997). P- and E-selectin mediate recruitment of T-helper-1 but not T-helper-2 cells into inflamed tissues. *Nature.* 385(6611):81-83.
- Baeten D, Peene I, Union A, Meheus L, Sebbag M, Serre G, Veys EM, De Keyser F (2001). Specific presence of intracellular citrullinated proteins in rheumatoid arthritis synovium: relevance to antifilaggrin autoantibodies. *Arthritis Rheum.* 44(10):2255-2262.
- Barnden MJ, Allison J, Heath WR, Carbone FR (1998). Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and beta-chain genes under the control of heterologous regulatory elements. *Immunol Cell Biol.* 76(1):34-40.
- 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(7090):235-238.

- Boissier MC, Chiocchia G, Bessis N, Hajnal J, Garotta G, Nicoletti F, Fournier C (1995). Biphasic effect of interferon-gamma in murine collagen-induced arthritis. *Eur J Immunol.* 25(5):1184-1190.
- Brackertz D, Mitchell GF, Mackay IR (1977a). Antigen-induced arthritis in mice. I. Induction of arthritis in various strains of mice. *Arthritis Rheum.* 20(3):841-850.
- Brackertz D, Mitchell GF, Vadas MA, Mackay IR (1977b). Studies on antigen-induced arthritis in mice. III. Cell and serum transfer experiments. *J Immunol.* 118(5):1645-1648.
- Brackertz D, Mitchell GF, Vadas MA, Mackay IR, Miller JF (1977c). Studies on antigen-induced arthritis in mice. II. Immunologic correlates of arthritis susceptibility in mice. *J Immunol.* 118(5):1639-1644.
- Butler DM, Malfait AM, Mason LJ, Warden PJ, Kollias G, Maini RN, Feldmann M, Brennan FM (1997). DBA/1 mice expressing the human TNF-alpha transgene develop a severe, erosive arthritis: characterization of the cytokine cascade and cellular composition. *J Immunol.* 159(6):2867-2876.
- Campbell IK, Hamilton JA, Wicks IP (2000). Collagen-induced arthritis in C57BL/6 (H-2b) mice: new insights into an important disease model of rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol.* 30(6):1568-1575.
- Cannon GW, Pincus SH, Emkey RD, Denes A, Cohen SA, Wolfe F, Saway PA, Jaffer AM, Weaver AL, Cogen L, et al. (1989). Double-blind trial of recombinant gamma-interferon versus placebo in the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 32(8):964-973.
- Cassatella MA, Meda L, Gasperini S, D'Andrea A, Ma X, Trinchieri G (1995). Interleukin-12 production by human polymorphonuclear leukocytes. *Eur J Immunol.* 25(1):1-5.
- Cassatella MA, Gasperini S, Russo MP (1997). Cytokine expression and release by neutrophils. *Ann N Y Acad Sci.* 832:233-242.
- Cella M, Scheidegger D, Palmer-Lehmann K, Lane P, Lanzavecchia A, Alber G (1996). Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med.* 184(2):747-752.
- Chabaud M, Durand JM, Buchs N, Fossiez F, Page G, Frappart L, Miossec P (1999). Human interleukin-17: A T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum.* 42(5):963-970.
- Chabaud M, Garnero P, Dayer JM, Guerne PA, Fossiez F, Miossec P (2000). Contribution of interleukin 17 to synovium matrix destruction in rheumatoid arthritis. *Cytokine.* 12(7):1092-1099.
- Charlton B, Lafferty KJ (1995). The Th1/Th2 balance in autoimmunity. *Curr Opin Immunol.* 7(6):793-798.
- Chen C, Lee WH, Zhong L, Liu CP (2006). Regulatory T cells can mediate their function through the stimulation of APCs to produce immunosuppressive nitric oxide. *J Immunol.* 176(6):3449-3460.
- Cher DJ, Mosmann TR (1987). Two types of murine helper T cell clone. II. Delayed-type hypersensitivity is mediated by TH1 clones. *J Immunol.* 138(11):3688-3694.
- Chu CQ, Wittmer S, Dalton DK (2000). Failure to suppress the expansion of the activated CD4 T cell population in interferon gamma-deficient mice leads to exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med.* 192(1):123-128.
- Chu CQ, Song Z, Mayton L, Wu B, Wooley PH (2003). IFN-gamma deficient C57BL/6 (H-2b) mice develop collagen induced arthritis with predominant usage of T cell receptor Vbeta6 and Vbeta8 in arthritic joints. *Ann Rheum Dis.* 62(10):983-990.
- Chu CQ, Swart D, Alcorn D, Tocker J, Elkon KB (2007). Interferon-gamma regulates susceptibility to collagen-induced arthritis through suppression of interleukin-17. *Arthritis Rheum.* 56(4):1145-1151.

- 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; REFLEX Trial Group (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.
- Cooper SM, Sriram S, Ranges GE (1988). Suppression of murine collagen-induced arthritis with monoclonal anti-Ia antibodies and augmentation with IFN-gamma. *J Immunol.* 141(6):1958-1962.
- 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.
- Cromartie WJ, Craddock JG, Schwab JH, Anderle SK, Yang CH (1977). Arthritis in rats after systemic injection of streptococcal cells or cell walls. *J Exp Med.* 146(6):1585-602.
- Cruz A, Khader SA, Torrado E, Fraga A, Pearl JE, Pedrosa J, Cooper AM, Castro AG (2006). IFN-gamma regulates the induction and expansion of IL-17-producing CD4 T cells during mycobacterial infection. *J Immunol.* 177(3):1416-1420.
- Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, Seymour B, Lucian L, To W, Kwan S, Churakova T, Zurawski S, Wiekowski M, Lira SA, Gorman D, Kastelein RA, Sedgwick JD (2003). Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature.* 421(6924):744-748.
- Cunnane G, FitzGerald O, Hummel KM, Gay RE, Gay S, Bresnihan B (1999). Collagenase, cathepsin B and cathepsin L gene expression in the synovial membrane of patients with early inflammatory arthritis. *Rheumatology* 38(1):34-42.
- Dalton DK, Pitts-Meek S, Keshav S, Figari IS, Bradley A, Stewart TA (1993). Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes. *Science* 259(5102):1739-1742.
- Dolhain RJ, van der Heiden AN, ter Haar NT, Breedveld FC, Miltenburg AM (1996). Shift toward T lymphocytes with a T helper 1 cytokine-secretion profile in the joints of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 39(12):1961-1969.
- Du MX, Sotero-Esteva WD, Taylor MW (2000). Analysis of transcription factors regulating induction of indoleamine 2,3-dioxygenase by IFN-gamma. *J Interferon Cytokine Res.* 20(2):133-142.
- Dudler J, Renggli-Zulliger N, Busso N, Lotz M, So A (2000). Effect of interleukin 17 on proteoglycan degradation in murine knee joints. *Ann Rheum Dis.* 59(7):529-532.
- Ehinger M, Vestberg M, Johansson AC, Johannesson M, Svensson A, Holmdahl R (2001). Influence of CD4 or CD8 deficiency on collagen-induced arthritis. *Immunology.* 103(3):291-300.
- Eilenstein R (2006). Untersuchung der Rolle von Cathepsin B und L in der Antigen-induzierten Arthritis. *Diplomarbeit. Friedrich-Schiller-Universität Jena.*
- Fallarino F, Grohmann U, Vacca C, Orabona C, Spreca A, Fioretti MC, Puccetti P (2003). T cell apoptosis by kynurenines. *Adv Exp Med Biol.* 527:183-190.
- Ferber IA, Brocke S, Taylor-Edwards C, Ridgway W, Dinisco C, Steinman L, Dalton D, Fathman CG (1996). Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J Immunol.* 156(1):5-7.
- Ferretti S, Bonneau O, Dubois GR, Jones CE, Trifilieff A (2003). IL-17, produced by lymphocytes and neutrophils, is necessary for lipopolysaccharide-induced airway neutrophilia: IL-15 as a possible trigger. *J Immunol.* 170(4):2106-2112.

- Feuerer M, Eulenburg K, Loddenkemper C, Hamann A, Huehn J (2006). Self-limitation of Th1-mediated inflammation by IFN-gamma. *J Immunol.* 176(5):2857-2863.
- Finkelman FD, Katona IM, Mosmann TR, Coffman RL (1988). IFN-gamma regulates the isotypes of Ig secreted during in vivo humoral immune responses. *J Immunol.* 140(4):1022-1027.
- Finnegan A, Mikecz K, Tao P, Glant TT (1999). Proteoglycan (aggrecan)-induced arthritis in BALB/c mice is a Th1-type disease regulated by Th2 cytokines. *J Immunol.* 163(10):5383-5390.
- Firestein GS (2003). Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature.* 423(6937):356-361.
- Firestein GS, Zvaifler NJ (1990). How important are T cells in chronic rheumatoid synovitis? *Arthritis Rheum.* 33(6):768-773. Erratum in: *Arthritis Rheum* 33(9):1437.
- Flaishon L, Hershkoviz R, Lantner F, Lider O, Alon R, Levo Y, Flavell RA, Shachar I (2000). Autocrine secretion of interferon gamma negatively regulates homing of immature B cells. *J Exp Med.* 192(9):1381-1388.
- 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
- Forlow SB, Schurr JR, Kolls JK, Bagby GJ, Schwarzenberger PO, Ley K (2001). Increased granulopoiesis through interleukin-17 and granulocyte colony-stimulating factor in leukocyte adhesion molecule-deficient mice. *Blood.* 98(12):3309-3314.
- Fossiez F, Djossou O, Chomarat P, Flores-Romo L, Ait-Yahia S, Maat C, Pin JJ, Garrone P, Garcia E, Saeland S, Blanchard D, Gaillard C, Das Mahapatra B, Rouvier E, Golstein P, Banchereau J, Lebecque S (1996). T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med.* 183(6):2593-2603.
- 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
- Fritsch R, Eselbock D, Skriner K, Jahn-Schmid B, Scheinecker C, Bohle B, Tohidast-Akrad M, Hayer S, Neumuller J, Pinol-Roma S, Smolen JS, Steiner G (2002). Characterization of autoreactive T cells to the autoantigens heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2 (RA33) and filaggrin in patients with rheumatoid arthritis. *J Immunol.* 169(2):1068-1076.
- Frucht DM, Fukao T, Bogdan C, Schindler H, O'Shea JJ, Koyasu S (2001). IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. *Trends Immunol.* 22(10):556-560.
- Gabriel SE, Crowson CS, Kremers HM, Doran MF, Turesson C, O'Fallon WM, Matteson EL (2003). Survival in rheumatoid arthritis: a population-based analysis of trends over 40 years. *Arthritis Rheum.* 48(1):54-58.
- Gajewski TF, Fitch FW (1988). Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. I. IFN-gamma inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones. *J Immunol.* 140(12):4245-4252.
- Genovese MC, Becker JC, Schiff M, Luggen M, Sherrer Y, Kremer J, Birbara C, Box J, Natarajan K, Nuamah I, Li T, Aranda R, Hagerty DT, Dougados M (2005). Abatacept for rheumatoid arthritis refractory to tumor necrosis factor alpha inhibition. *N Engl J Med.* 353(11):1114-1123. Erratum in: *N Engl J Med.* 353(21):2311.
- Glant TT, Mikecz K, Arzoumanian A, Poole AR (1987). Proteoglycan-induced arthritis in BALB/c mice. Clinical features and histopathology. *Arthritis Rheum.* 30(2):201-212

- Glant TT, Cs-Szabo G, Nagase H, Jacobs JJ, Mikecz K (1998). Progressive polyarthritis induced in BALB/c mice by aggrecan from normal and osteoarthritic human cartilage. *Arthritis Rheum.* 41(6):1007-1018.
- Gocke AR, Cravens PD, Ben LH, Hussain RZ, Northrop SC, Racke MK, Lovett-Racke AE (2007). T-bet regulates the fate of Th1 and Th17 lymphocytes in autoimmunity. *J Immunol.* 178(3):1341-1348.
- Gravallese EM, Manning C, Tsay A, Naito A, Pan C, Amento E, Goldring SR (2000). Synovial tissue in rheumatoid arthritis is a source of osteoclast differentiation factor. *Arthritis Rheum.* 43(2):250-258.
- Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ (1987). The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 30(11):1205-1213.
- Grohmann U, Fallarino F, Puccetti P (2003). Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO. *Trends Immunol.* 24(5):242-248.
- Guedez YB, Whittington KB, Clayton JL, Joosten LA, van de Loo FA, van den Berg WB, Rosloniec EF (2001). Genetic ablation of interferon-gamma up-regulates interleukin-1beta expression and enables the elicitation of collagen-induced arthritis in a nonsusceptible mouse strain. *Arthritis Rheum.* 44(10):2413-2424.
- Happel KI, Zheng M, Young E, Quinton LJ, Lockhart E, Ramsay AJ, Shellito JE, Schurr JR, Bagby GJ, Nelson S, Kolls JK (2003). Cutting edge: roles of Toll-like receptor 4 and IL-23 in IL-17 expression in response to *Klebsiella pneumoniae* infection. *J Immunol.* 170(9):4432-4436.
- Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT (2005). Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol.* 6(11):1123-1132.
- Hasler P (2006). Biological therapies directed against cells in autoimmune disease. *Springer Semin Immunopathol.* 27(4):443-456.
- Hata H, Sakaguchi N, Yoshitomi H, Iwakura Y, Sekikawa K, Azuma Y, Kanai C, Moriizumi E, Nomura T, Nakamura T, Sakaguchi S (2004). Distinct contribution of IL-6, TNF-alpha, IL-1, and IL-10 to T cell-mediated spontaneous autoimmune arthritis in mice. *J Clin Invest.* 114(4):582-588.
- Heremans H, Dillen C, Groenen M, Martens E, Billiau A (1996). Chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis (CREAE) in mice: enhancement by monoclonal antibodies against interferon-gamma. *Eur J Immunol.* 26(10):2393-2398.
- Hofstetter HH, Ibrahim SM, Koczan D, Kruse N, Weishaupt A, Toyka KV, Gold R (2005). Therapeutic efficacy of IL-17 neutralization in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cell Immunol.* 237(2):123-130.
- Holmdahl R, Jansson L, Gullberg D, Rubin K, Forsberg PO, Klareskog L (1985). Incidence of arthritis and autoreactivity of anti-collagen antibodies after immunization of DBA/1 mice with heterologous and autologous collagen II. *Clin Exp Immunol.* 62(3):639-646.
- Hoshino H, Laan M, Sjostrand M, Lotvall J, Skoogh BE, Linden A (2000). Increased elastase and myeloperoxidase activity associated with neutrophil recruitment by IL-17 in airways in vivo. *J Allergy Clin Immunol.* 105(1 Pt 1):143-149.
- Hsu H, Lacey DL, Dunstan CR, Solovyev I, Colombero A, Timms E, Tan HL, Elliott G, Kelley MJ, Sarosi I, Wang L, Xia XZ, Elliott R, Chiu L, Black T, Scully S, Capparelli C, Morony S, Shimamoto G, Bass MB, Boyle WJ (1999). Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96(7):3540-3545.

- Hückel M (2003). Interaktionen zwischen T-Helfer-Zellen und Synoviozyten im experimentellen Arthritismodell. *Dissertation. Friedrich-Schiller-Universität Jena.*
- 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.
- Isaacs A, Lindenmann J (1957). Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 147(927):258-267.
- Ishizu T, Osoegawa M, Mei FJ, Kikuchi H, Tanaka M, Takakura Y, Minohara M, Murai H, Mihara F, Taniwaki T, Kira J (2005). Intrathecal activation of the IL-17/IL-8 axis in opticospinal multiple sclerosis. *Brain.* 128(5):988-1002.
- Issekutz TB, Stoltz JM, vd Meide P (1988). Lymphocyte recruitment in delayed-type hypersensitivity. The role of IFN-gamma. *J Immunol.* 140(9):2989-2993.
- Issekutz AC, Mu JY, Liu G, Melrose J, Berg EL (2001). E-selectin, but not P-selectin, is required for development of adjuvant-induced arthritis in the rat. *Arthritis Rheum.* 44(6):1428-1437.
- Itonaga I, Fujikawa Y, Sabokbar A, Murray DW, Athanasou NA (2000). Rheumatoid arthritis synovial macrophage-osteoclast differentiation is osteoprotegerin ligand-dependent. *J Pathol.* 192(1):97-104.
- Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, Cua DJ, Littman DR (2006). The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell.* 126(6):1121-1133.
- Jacob CO, Holoshitz J, Van der Meide P, Strober S, McDevitt HO (1989). Heterogeneous effects of IFN-gamma in adjuvant arthritis. *J Immunol.* 142(5):1500-1505.
- Jahn B, Burmester GR, Schmid H, Weseloh G, Rohwer P, Kalden JR (1987). Changes in cell surface antigen expression on human articular chondrocytes induced by gamma-interferon. Induction of Ia antigens. *Arthritis Rheum.* 30(1):64-74.
- Jones CE, Chan K (2002). Interleukin-17 stimulates the expression of interleukin-8, growth-related oncogene-alpha, and granulocyte-colony-stimulating factor by human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 26(6):748-753.
- Jovanovic DV, Di Battista JA, Martel-Pelletier J, Jolicoeur FC, He Y, Zhang M, Mineau F, Pelletier JP (1998). IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages. *J Immunol.* 160(7):3513-3521.
- Kageyama Y, Koide Y, Yoshida A, Uchijima M, Arai T, Miyamoto S, Ozeki T, Hiyoshi M, Kushida K, Inoue T (1998). Reduced susceptibility to collagen-induced arthritis in mice deficient in IFN-gamma receptor. *J Immunol.* 161(3):1542-1548.
- Kaplan C, Valdez JC, Chandrasekaran R, Eibel H, Mikecz K, Glant TT, Finnegan A (2002). Th1 and Th2 cytokines regulate proteoglycan-specific autoantibody isotypes and arthritis. *Arthritis Res.* 4(1):54-58.
- Katz Y, Nadiv O, Beer Y (2001). Interleukin-17 enhances tumor necrosis factor alpha-induced synthesis of interleukins 1,6, and 8 in skin and synovial fibroblasts: a possible role as a "fine-tuning cytokine" in inflammation processes. *Arthritis Rheum.* 44(9):2176-2184.
- 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.

- 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.
- Kidd P (2003). Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern Med Rev.* 8(3):223-246.
- Kirkham BW, Lassere MN, Edmonds JP, Juhasz KM, Bird PA, Lee CS, Shnier R, Portek IJ (2006). Synovial membrane cytokine expression is predictive of joint damage progression in rheumatoid arthritis: a two-year prospective study (the DAMAGE study cohort). *Arthritis Rheum.* 54(4):1122-1131.
- Kneilling M, Hultner L, Pichler BJ, Mailhammer R, Morawietz L, Solomon S, Eichner M, Sabatino J, Biedermann T, Krenn V, Weber WA, Illges H, Haubner R, Rocken M (2007). Targeted mast cell silencing protects against joint destruction and angiogenesis in experimental arthritis in mice. *Arthritis Rheum.* 56(6):1806-1816.
- 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 (2005a). 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.
- Koenders MI, Kolls JK, Oppers-Walgreen B, van den Bersselaar L, Joosten LA, Schurr JR, Schwarzenberger P, van den Berg WB, Lubberts E (2005b). Interleukin-17 receptor deficiency results in impaired synovial expression of interleukin-1 and matrix metalloproteinases 3, 9, and 13 and prevents cartilage destruction during chronic reactivated streptococcal cell wall-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 52(10):3239-3247.
- Kolls JK, Linden A (2004). Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity.* 21(4):467-476.
- Komiyama Y, Nakae S, Matsuki T, Nambu A, Ishigame H, Kakuta S, Sudo K, Iwakura Y (2006). IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 177(1):566-573.
- Korn T, Bettelli E, Gao W, Awasthi A, Jager A, Strom TB, Oukka M, Kuchroo VK (2007). IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature.* 448(7152):484-487.
- Koshy PJ, Henderson N, Logan C, Life PF, Cawston TE, Rowan AD (2002). Interleukin 17 induces cartilage collagen breakdown: novel synergistic effects in combination with proinflammatory cytokines. *Ann Rheum Dis.* 61(8):704-713.
- 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.

- Kremer JM, Dougados M, Emery P, Durez P, Sibilia J, Shergy W, Steinfeld S, Tindall E, Becker JC, Li T, Nuamah IF, Aranda R, Moreland LW (2005). Treatment of rheumatoid arthritis with the selective costimulation modulator abatacept: twelve-month results of a phase iib, double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum.* 52(8):2263-2271. Erratum in: *Arthritis Rheum.* 52(10):3321.
- Kulidjian AA, Issekutz AC, Issekutz TB (2002). Differential role of E-selectin and P-selectin in T lymphocyte migration to cutaneous inflammatory reactions induced by cytokines. *Int Immunol.* 14(7):751-760.
- Kusaba M, Honda J, Fukuda T, Oizumi K (1998). Analysis of type 1 and type 2 T cells in synovial fluid and peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 25(8):1466-1471.
- Laan M, Cui ZH, Hoshino H, Lotvall J, Sjostrand M, Gruenert DC, Skoogh BE, Linden A (1999). Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in the airways. *J Immunol.* 162(4):2347-2352.
- Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA, Cua DJ (2005). IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med.* 201(2):233-240.
- Laurence A, Tato CM, Davidson TS, Kanno Y, Chen Z, Yao Z, Blank RB, Meylan F, Siegel R, Hennighausen L, Shevach EM, O'shea JJ (2007). Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity.* 26(3):371-381.
- LeGrand A, Fermor B, Fink C, Pisetsky DS, Weinberg JB, Vail TP, Guilak F (2001). Interleukin-1, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-17 synergistically up-regulate nitric oxide and prostaglandin E2 production in explants of human osteoarthritic knee menisci. *Arthritis Rheum.* 44(9):2078-2083.
- Lemmel EM, Brackertz D, Franke M, Gaus W, Hartl PW, Machalke K, Mielke H, Obert HJ, Peter HH, Sieper J, et al. (1988). Results of a multicenter placebo-controlled double-blind randomized phase III clinical study of treatment of rheumatoid arthritis with recombinant interferon-gamma. *Rheumatol Int.* 8(2):87-93.
- 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.
- Lubberts E, Joosten LA, Oppers B, van den Bersselaar L, Coenen-de Roo CJ, Kolls JK, Schwarzenberger P, van de Loo FA, van den Berg WB (2001). IL-1-independent role of IL-17 in synovial inflammation and joint destruction during collagen-induced arthritis. *J Immunol.* 167(2):1004-1013.
- Lubberts E, van den Bersselaar L, Oppers-Walgreen B, Schwarzenberger P, Coenen-de Roo CJ, Kolls JK, Joosten LA, van den Berg WB (2003). IL-17 promotes bone erosion in murine collagen-induced arthritis through loss of the receptor activator of NF-kappa B ligand/osteoprotegerin balance. *J Immunol.* 170(5):2655-2662.
- 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, Koenders MI, van den Berg WB (2005). The role of T-cell interleukin-17 in conducting destructive arthritis: lessons from animal models. *Arthritis Res Ther.* 7(1):29-37.

- Manoury-Schwartz B, Chiocchia 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.
- Marsters SA, Pennica D, Bach E, Schreiber RD, Ashkenazi A (1995). Interferon gamma signals via a high-affinity multisubunit receptor complex that contains two types of polypeptide chain. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92(12):5401-5405.
- Mauritz NJ, Holmdahl R, Jonsson R, Van der Meide PH, Scheynius A, Klareskog L (1988). Treatment with gamma-interferon triggers the onset of collagen arthritis in mice. *Arthritis Rheum.* 31(10):1297-1304.
- McInnes IB, Leung BP, Sturrock RD, Field M, Liew FY (1997). Interleukin-15 mediates T cell-dependent regulation of tumor necrosis factor-alpha production in rheumatoid arthritis. *Nat Med.* 3(2):189-195.
- McInnes IB, Schett G (2007). Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol.* 7(6):429-442.
- Mehta DS, Wurster AL, Whitters MJ, Young DA, Collins M, Grusby MJ (2003). IL-21 induces the apoptosis of resting and activated primary B cells. *J Immunol.* 170(8):4111-4118.
- Melrose J, Tsurushita N, Liu G, Berg EL (1998). IFN-gamma inhibits activation-induced expression of E- and P-selectin on endothelial cells. *J Immunol.* 161(5):2457-2464.
- Messi M, Giacchetto I, Nagata K, Lanzavecchia A, Natoli G, Sallusto F (2003). Memory and flexibility of cytokine gene expression as separable properties of human T(H)1 and T(H)2 lymphocytes. *Nat Immunol.* 4(1):78-86.
- Molet S, Hamid Q, Davoine F, Nutku E, Taha R, Page N, Olivenstein R, Elias J, Chakir J (2001). IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines. *J Allergy Clin Immunol.* 108(3):430-438.
- Morgan ME, Suttmuller RP, Witteveen HJ, van Duivenvoorde LM, Zanelli E, Melief CJ, Snijders A, Offringa R, de Vries RR, Toes RE (2003). CD25+ cell depletion hastens the onset of severe disease in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 48(5):1452-1460.
- Morita Y, Yamamura M, Kawashima M, Harada S, Tsuji K, Shibuya K, Maruyama K, Makino H (1998). Flow cytometric single-cell analysis of cytokine production by CD4+ T cells in synovial tissue and peripheral blood from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 41(9):1669-1676.
- 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
- Müller B, Gimsa U, Mitchison NA, Radbruch A, Sieper J, Yin Z (1998). Modulating the Th1/Th2 balance in inflammatory arthritis. *Springer Semin Immunopathol.* 20(1-2):181-196.
- Müller-Ladner U, Kriegsmann J, Franklin BN, Matsumoto S, Geiler T, Gay RE, Gay S (1996). Synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis attach to and invade normal human cartilage when engrafted into SCID mice. *Am J Pathol.* 149(5):1607-1615.
- Munn DH, Zhou M, Attwood JT, Bondarev I, Conway SJ, Marshall B, Brown C, Mellor AL (1998). Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science.* 281(5380):1191-1193.
- Murphy CA, Langrish CL, Chen Y, Blumenschein W, McClanahan T, Kastelein RA, Sedgwick JD, Cua DJ (2003). Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J Exp Med.* 198(12):1951-1957.

- Nakae S, Komiyama Y, Nambu A, Sudo K, Iwase M, Homma I, Sekikawa K, Asano M, Iwakura Y (2002). Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses. *Immunity*. 17(3):375-387.
- 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 USA*. 100(10):5986-5990.
- Nakae S, Iwakura Y, Suto H, Galli SJ (2007). Phenotypic differences between Th1 and Th17 cells and negative regulation of Th1 cell differentiation by IL-17. *J Leukoc Biol*. 81(5):1258-1268.
- Nakajima H, Takamori H, Hiyama Y, Tsukada W (1991). The effect of treatment with recombinant gamma-interferon on adjuvant-induced arthritis in rats. *Agents Actions*. 34(1-2):63-65.
- Nathan CF, Murray HW, Wiebe ME, Rubin BY (1983). Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *J Exp Med*. 158(3):670-689.
- Nathan C (2006). Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol*. 6(3):173-182.
- Newkirk MM, Watanabe Duffy KN, Leclerc J, Lambert N, Shiroky JB (1994). Detection of cytomegalovirus, Epstein-Barr virus and herpes virus-6 in patients with rheumatoid arthritis with or without Sjogren's syndrome. *Br J Rheumatol*. 33(4):317-322.
- Newton JL, Harney SM, Wordsworth BP, Brown MA (2004). A review of the MHC genetics of rheumatoid arthritis. *Genes Immun*. 5(3):151-157.
- Nishimoto N, Yoshizaki K, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, Takeuchi T, Hashimoto J, Azuma J, Kishimoto T (2004). Treatment of rheumatoid arthritis with humanized anti-interleukin-6 receptor antibody: a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum*. 50(6):1761-1769.
- Nurieva R, Yang XO, Martinez G, Zhang Y, Panopoulos AD, Ma L, Schluns K, Tian Q, Watowich SS, Jetten AM, Dong C (2007). Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature*. 448(7152):480-483.
- O'Dell JR, Nepom BS, Haire C, Gersuk VH, Gaur L, Moore GF, Drymalski W, Palmer W, Eckhoff PJ, Klassen LW, Wees S, Thiele G, Nepom GT (1998). HLA-DRB1 typing in rheumatoid arthritis: predicting response to specific treatments. *Ann Rheum Dis*. 57(4):209-213.
- O'Garra A (1998). Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity*. 8(3):275-283.
- Ogawa A, Andoh A, Araki Y, Bamba T, Fujiyama Y (2004). Neutralization of interleukin-17 aggravates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Clin Immunol*. 110(1):55-62.
- Ohmori Y, Hamilton TA (1994). IFN-gamma selectively inhibits lipopolysaccharide-inducible JE/monocyte chemoattractant protein-1 and KC/GRO/melanoma growth-stimulating activity gene expression in mouse peritoneal macrophages. *J Immunol*. 153(5):2204-2212.
- Ortmann RA, Shevach EM (2001). Susceptibility to collagen-induced arthritis: cytokine-mediated regulation. *Clin Immunol*. 98(1):109-118.
- 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.

- Petrow PK, Thoss K, Katenkamp D, Brauer R (1996). Adoptive transfer of susceptibility to antigen-induced arthritis into severe combined immunodeficient (SCID) mice: role of CD4+ and CD8+ T cells. *Immunol Invest.* 25(4):341-353.
- Pillinger MH, Abramson SB (1995). The neutrophil in rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am.* 21(3):691-714.
- Pohlert D, Nissler K, Frey O, Simon J, Petrow PK, Kinne RW, Brauer R (2004). Anti-CD4 monoclonal antibody treatment in acute and early chronic antigen-induced arthritis: influence on T helper cell activation. *Clin Exp Immunol.* 135(3):409-415.
- Rangachari M, Mauermann N, Marty RR, Dirnhofer S, Kurrer MO, Komnenovic V, Penninger JM, Eriksson U (2006). T-bet negatively regulates autoimmune myocarditis by suppressing local production of interleukin 17. *J Exp Med.* 203(8):2009-2019.
- Raza K, Falciani F, Curnow SJ, Ross EJ, Lee CY, Akbar AN, Lord JM, Gordon C, Buckley CD, Salmon M (2005). Early rheumatoid arthritis is characterized by a distinct and transient synovial fluid cytokine profile of T cell and stromal cell origin. *Arthritis Res Ther.* 7(4):R784-795.
- Reis e Sousa C, Hieny S, Scharon-Kersten T, Jankovic D, Charest H, Germain RN, Sher A (1997). In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. *J Exp Med.* 186(11):1819-1829.
- Röhn TA, Jennings GT, Hernandez M, Grest P, Beck M, Zou Y, Kopf M, Bachmann MF (2006). Vaccination against IL-17 suppresses autoimmune arthritis and encephalomyelitis. *Eur J Immunol.* 36(11):2857-2867.
- Rosloniec EF, Latham K, Guedez YB (2002). Paradoxical roles of IFN-gamma in models of Th1-mediated autoimmunity. *Arthritis Res.* 4(6):333-336.
- Roudier J, Petersen J, Rhodes GH, Luka J, Carson DA (1989). Susceptibility to rheumatoid arthritis maps to a T-cell epitope shared by the HLA-Dw4 DR beta-1 chain and the Epstein-Barr virus glycoprotein gp110. *Proc Natl Acad Sci USA.* 86(13):5104-5108.
- Saal JG, Steidle M, Einsele H, Muller CA, Fritz P, Zacher J (1992). Persistence of B19 parvovirus in synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int.* 12(4):147-151.
- Saal JG, Krimmel M, Steidle M, Gerneth F, Wagner S, Fritz P, Koch S, Zacher J, Sell S, Einsele H, Muller CA (1999). Synovial Epstein-Barr virus infection increases the risk of rheumatoid arthritis in individuals with the shared HLA-DR4 epitope. *Arthritis Rheum.* 42(7):1485-1496.
- 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.
- Sato K, Suematsu A, Okamoto K, Yamaguchi A, Morishita Y, Kadono Y, Tanaka S, Kodama T, Akira S, Iwakura Y, Cua DJ, Takayanagi H (2006). Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J Exp Med.* 203(12):2673-2682.
- Schett G (2003). Die Rolle von Osteoklasten bei der arthritischen Knochenerosion. *Journal für Mineralstoffwechsel* 10 (3): 6-9.
- Schindler H, Lutz MB, Rollinghoff M, Bogdan C (2001). The production of IFN-gamma by IL-12/IL-18-activated macrophages requires STAT4 signaling and is inhibited by IL-4. *J Immunol.* 166(5):3075-3082.

- Schneeberger EE, DeFerrari M, Skoskiewicz MJ, Russell PS, Colvin RB (1986). Induction of MHC-determined antigens in the lung by interferon-gamma. *Lab Invest.* 55(2):138-144.
- Schnyder-Candrian S, Togbe D, Couillin I, Mercier I, Brombacher F, Quesniaux V, Fossiez F, Ryffel B, Schnyder B (2006). Interleukin-17 is a negative regulator of established allergic asthma. *J Exp Med.* 203(12):2715-2725.
- 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.
- Schulze-Koops H, Kalden JR (2001). The balance of Th1/Th2 cytokines in rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 15(5):677-691.
- Seo SK, Choi JH, Kim YH, Kang WJ, Park HY, Suh JH, Choi BK, Vinay DS, Kwon BS (2004). 4-1BB-mediated immunotherapy of rheumatoid arthritis. *Nat Med.* 10(10):1088-1094. Erratum in: *Nat Med.* 10(11):1261.
- Shigeyama Y, Pap T, Kunzler P, Simmen BR, Gay RE, Gay S (2000). Expression of osteoclast differentiation factor in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 43(11):2523-2530.
- Simon J, Surber R, Kleinstaub G, Petrow PK, Henzgen S, Kinne RW, Brauer R (2001). Systemic macrophage activation in locally-induced experimental arthritis. *J Autoimmun.* 17(2):127-136.
- Singh VK, Mehrotra S, Agarwal SS (1999). The paradigm of Th1 and Th2 cytokines: its relevance to autoimmunity and allergy. *Immunol Res.* 20(2):147-161.
- Skapenko A, Leipe J, Lipsky PE, Schulze-Koops H (2005). The role of the T cell in autoimmune inflammation. *Arthritis Res Ther.* 7 Suppl 2:S4-14.
- Sotero-Esteva WD, Wolfe D, Ferris M, Taylor MW (2000). An indoleamine 2,3-dioxygenase-negative mutant is defective in stat1 DNA binding: differential response to IFN-gamma and IFN-alpha. *J Interferon Cytokine Res.* 20(7):623-632.
- Stahl HD, Hubner B, Seidl B, Liebert UG, van der Heijden IM, Wilbrink B, Kraan MC, Emmrich F, Tak PP (2000). Detection of multiple viral DNA species in synovial tissue and fluid of patients with early arthritis. *Ann Rheum Dis.* 59(5):342-346.
- Stenger AA, Van Leeuwen MA, Houtman PM, Bruyn GA, Speerstra F, Barendsen BC, Velthuysen E, van Rijswijk MH (1998). Early effective suppression of inflammation in rheumatoid arthritis reduces radiographic progression. *Br J Rheumatol.* 37(11):1157-1163.
- Suryani S, Sutton I (2007). An interferon-gamma-producing Th1 subset is the major source of IL-17 in experimental autoimmune encephalitis. *J Neuroimmunol.* 183(1-2):96-103.
- Suto A, Wurster AL, Reiner SL, Grusby MJ (2006). IL-21 inhibits IFN-gamma production in developing Th1 cells through the repression of Eomesodermin expression. *J Immunol.* 177(6):3721-3727.
- Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH (2000). A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell.* 100(6):655-669.
- Takayanagi H, Ogasawara K, Hida S, Chiba T, Murata S, Sato K, Takaoka A, Yokochi T, Oda H, Tanaka K, Nakamura K, Taniguchi T (2000). T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN-gamma. *Nature.* 408(6812):600-605.
- Taneja V, Krco CJ, Behrens MD, Luthra HS, Griffiths MM, David CS (2007). B cells are important as antigen presenting cells for induction of MHC-restricted arthritis in transgenic mice. *Mol Immunol.* 44(11):2988-2996.

- Tascioglu F, Durak B, Oner C, Artan S (2005). Trisomy 7 in synovial fluid cells of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int.* 25(8):571-575.
- Thornton S, Boivin GP, Kim KN, Finkelman FD, Hirsch R (2000). Heterogeneous effects of IL-2 on collagen-induced arthritis. *J Immunol.* 165(3):1557-1563.
- Tran EH, Prince EN, Owens T (2000). IFN-gamma shapes immune invasion of the central nervous system via regulation of chemokines. *J Immunol.* 164(5):2759-2768.
- Van Dongen H, van Aken J, Lard LR, Visser K, Roday HK, Hulsmans HM, Speyer I, Westedt ML, Peeters AJ, Allaart CF, Toes RE, Breedveld FC, Huizinga TW (2007). Efficacy of methotrexate treatment in patients with probable rheumatoid arthritis: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum.* 56(5):1424-1432.
- Van Gaalen FA, Linn-Rasker SP, van Venrooij WJ, de Jong BA, Breedveld FC, Verweij CL, Toes RE, Huizinga TW (2004). Autoantibodies to cyclic citrullinated peptides predict progression to rheumatoid arthritis in patients with undifferentiated arthritis: a prospective cohort study. *Arthritis Rheum.* 50(3):709-715.
- 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.
- Vey E, Burger D, Dayer JM (1996). Expression and cleavage of tumor necrosis factor-alpha and tumor necrosis factor receptors by human monocytic cell lines upon direct contact with stimulated T cells. *Eur J Immunol.* 26(10):2404-2409.
- Visser H, Gelinck LB, Kampfraath AH, Breedveld FC, Hazes JM (1996). Diagnostic and prognostic characteristics of the enzyme linked immunosorbent rheumatoid factor assays in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 55(3):157-161.
- Waalder E (1940). On the occurrence of a factor in human serum activating the specific agglutination of sheep blood corpuscles. *Acta Pathol Microbiol Scand.* 17:172-178.
- Wagner UG, Kurtin PJ, Wahner A, Brackertz M, Berry DJ, Goronzy JJ, Weyand CM (1998). The role of CD8+ CD40L+ T cells in the formation of germinal centers in rheumatoid synovitis. *J Immunol.* 161(11):6390-6397.
- Wang Z, Hong J, Sun W, Xu G, Li N, Chen X, Liu A, Xu L, Sun B, Zhang JZ (2006). Role of IFN-gamma in induction of Foxp3 and conversion of CD4+ CD25- T cells to CD4+ Tregs. *J Clin Invest.* 116(9):2434-2441.
- Wengner AM, Hopken UE, Petrow PK, Hartmann S, Schurigt U, Brauer R, Lipp M (2007). CXCR5- and CCR7-dependent lymphoid neogenesis in a murine model of chronic antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 56(10):3271-3283.
- Weyand CM, Hicok KC, Conn DL, Goronzy JJ (1992). The influence of HLA-DRB1 genes on disease severity in rheumatoid arthritis. *Ann Intern Med.* 117(10):869-871.
- Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L (2000). Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest* 80(5):617-53.
- Willenborg DO, Fordham SA, Staykova MA, Ramshaw IA, Cowden WB (1999). IFN-gamma is critical to the control of murine autoimmune encephalomyelitis and regulates both in the periphery and in the target tissue: a possible role for nitric oxide. *J Immunol.* 163(10):5278-5286.

- Williams AS, Richards PJ, Thomas E, Carty S, Nowell MA, Goodfellow RM, Dent CM, Williams BD, Jones SA, Topley N (2007). Interferon-gamma protects against the development of structural damage in experimental arthritis by regulating polymorphonuclear neutrophil influx into diseased joints. *Arthritis Rheum.* 56(7):2244-2254.
- Wong PK, Quinn JM, Sims NA, van Nieuwenhuijze A, Campbell IK, Wicks IP (2006). Interleukin-6 modulates production of T lymphocyte-derived cytokines in antigen-induced arthritis and drives inflammation-induced osteoclastogenesis. *Arthritis Rheum.* 54(1):158-168.
- Wooley PH, Luthra HS, Stuart JM, David CS (1981). Type II collagen-induced arthritis in mice. I. Major histocompatibility complex (I region) linkage and antibody correlates. *J Exp Med.* 154(3):688-700.
- Wuyts A, Struyf S, Gijsbers K, Schutyser E, Put W, Conings R, Lenaerts JP, Geboes K, Opdenakker G, Menten P, Proost P, Van Damme J (2003). The CXC chemokine GCP-2/CXCL6 is predominantly induced in mesenchymal cells by interleukin-1beta and is down-regulated by interferon-gamma: comparison with interleukin-8/CXCL8. *Lab Invest.* 83(1):23-34.
- Yoshitomi H, Sakaguchi N, Kobayashi K, Brown GD, Tagami T, Sakihama T, Hirota K, Tanaka S, Nomura T, Miki I, Gordon S, Akira S, Nakamura T, Sakaguchi S (2005). A role for fungal β -glucans and their receptor Dectin-1 in the induction of autoimmune arthritis in genetically susceptible mice. *J Exp Med.* 201(6):949-960.
- Zehntner SP, Brickman C, Bourbonniere L, Remington L, Caruso M, Owens T (2005). Neutrophils that infiltrate the central nervous system regulate T cell responses. *J Immunol.* 174(8):5124-5131.
- Zheng W, Flavell RA (1997). The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell.* 89(4):587-596.
- Zheng Y, Danilenko DM, Valdez P, Kasman I, Eastham-Anderson J, Wu J, Ouyang W (2007). Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. *Nature.* 445(7128):648-651.
- 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.
- Zwerina J, Redlich K, Polzer K, Joosten L, Kronke G, Distler J, Hess A, Pundt N, Pap T, Hoffmann O, Gasser J, Scheinecker C, Smolen JS, van den Berg W, Schett G (2007). TNF-induced structural joint damage is mediated by IL-1. *Proc Natl Acad Sci USA.* 104(28):11742-11747.

7 Anhang

Abkürzungsverzeichnis

ACR	American College of Rheumatology	HLA	Human leucocyte antigen
AIA	Antigen-induzierte Arthritis	i.a.	intraartikulär
AP	Alkalische Phosphatase	IFN-γ	Interferon- γ
APC	Antigen presenting cell	IFN-γ^{-/-}	Interferon- γ -knockout
BSA	Bovines Serum-Albumin	IFN-γR^{-/-}	Interferon- γ -Rezeptor-knockout
catOVA	Kationisiertes Ov-Albumin	Ig	Immunglobulin
CCP	Zyklische citrullinierte Peptide	IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
CD	Cluster of differentiation	IL	Interleukin
CFA	Complete Freund's adjuvans	i.p.	intraperitoneal
CIA	Collagen-induced arthritis	i.v.	intravenös
cpm	Counts per minute	Jak	Januskinase
COX	Cyclooxygenase	K I	Kollagen Typ 1
DAS	Disease activity score	K II	Kollagen Typ 2
DC	Dendritic cell	KC	Keratinocyte-derived chemokine
DMARD	Disease-modifying antirheumatic drugs	L	Ligand
DTH	Delayed type hypersensitivity	mAb	Monoclonal antibody
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis	MACS	Magnetic-activated cell sorting
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	mBSA	methyliertes bovines Serum-Albumin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	MHC	Major histocompatibility complex
FACS	Fluorescence-activated cell sorting	MIP	Macrophage inflammatory protein
Fc	Fragment crystallizable	MMP	Matrixmetalloprotease
FCS	Fetal calf serum	MPC	Magnetic particle concentrator
Foxp3	Forkhead box protein 3	MTX	Methotrexat
GATA3	GATA binding protein 3	NK	Natürliche Killerzellen
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor	NO	Stickstoffmonoxid
gp	Glykoprotein	NSAR	Nicht-steroidale Antirheumatika
GPC	Granulocyte chemotactic protein	OPD	Ortho-Phenylendiamin
GPI	Glukose-6-Phosphat-Isomerase	OPG	Osteoprotegerin
HE	Hämatoxilin-Eosin	OVA	Ov-Albumin
		PBS	Phosphate buffered saline
		PE	Phycoerythrin
		PG	Proteoglykan

PGIA	Proteoglykan-induzierte Arthritis
pNPP	Para-Nitrophenylphosphat
PO	Peroxidase
R	Rezeptor
Ra	Rezeptorantagonist
RA	Rheumatoide Arthritis
RANK	Receptor activator of NF- κ B
rm	rekombinant murin
RORγt	Retinoic acid-related orphan receptor
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SCID	Severe combined immunodeficiency
s.c.	subkutan
SEM	Standard error mean
SF	Synoviale Fibroblasten
SPF	Specific pathogen-free
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TAG	T cell activation gene
T-bet	T-box expressed in T cells
TCR	T cell receptor
TGF-β	Transforming growth factor- β
Th	T-Helfer
Th0	Naive Th-Zelle
TNF	Tumornekrosefaktor
T_{reg}	Regulatorische T-Zelle
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan
ZAP	Zeta-associated protein

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

- Abb. 1** Pierre-Auguste Renoir.
- Abb. 2** Knochenerosion.
- Abb. 3** Zelluläre Interaktionen.
- Abb. 4** Subpopulationen von Th-Zellen.
- Abb. 5** Histologie der AIA.
-
- Abb. 6** Gelenkschwellung.
- Abb. 7** ELISA.
-
- Abb. 8** Zytokinprofil von Th1/Th2-Zellen.
- Abb. 9** Modulation der AIA durch Transfer von Th1/Th2-Zellen.
- Abb. 10** Zytokinprofil von OVA-spezifischen Th1/Th2-Zellen.
- Abb. 11** Modulation der AIA durch Transfer von OVA-Th1/Th2-Zellen.
- Abb. 12** Verlauf der AIA in TCR-transgenen OT-II Mäusen.
- Abb. 13** Histologie der chronischen AIA in TCR-transgenen OT-II Mäusen.
- Abb. 14** Verlauf der Gelenkschwellung bei IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäusen und beim Wildtyp.
- Abb. 15** Kniegelenk von IFN- $\gamma^{-/-}$ Maus und Wildtyp an d1 der AIA.
- Abb. 16** Verzögerte Überempfindlichkeitsreaktion.
- Abb. 17** Histologie der akuten Arthritis (d3) bei IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäusen und Wildtyp.
- Abb. 18** Histologische Bewertung der akuten Arthritis an d3.
- Abb. 19** Immunhistochemische Färbung von Gelenkschnitten von IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäusen (d1).
- Abb. 20** Gesamt- und mBSA-spezifische IgG im Serum bei der akuten AIA (d3).
- Abb. 21** Antikörper gegen Bestandteile der Knorpelmatrix (d3).
- Abb. 22** Zytokine in Überständen von Lymphknoten- und Milzzellen (d3).
- Abb. 23** Zytokine im Serum bei der akuten AIA (d3).
- Abb. 24** Zytokine in Gelenkextrakten bei der akuten AIA (d3).
- Abb. 25** Matrixdegradierende Proteasen in Gelenkextrakten (d3).
- Abb. 26** Chronische AIA bei IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäusen.
- Abb. 27** Schwere und Inzidenz der CIA bei IFN- $\gamma^{-/-}$ C57Bl/6 Mäusen.
- Abb. 28** Arthritis-Index der CIA bei IFN- $\gamma^{-/-}$ C57Bl/6 Mäusen.
- Abb. 29** Einfluss von IFN- γ auf die AIA bei IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäusen.

- Abb. 30** Einfluss von IFN- γ auf die AIA bei Mäusen vom Wildtyp.
- Abb. 31** Einfluss der Neutralisation von IFN- γ auf die AIA beim Wildtyp.
- Abb. 32** Einfluss der Neutralisation von IL-17 auf die AIA bei IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäusen.
- Abb. 33** Verlauf der AIA bei IL-17 $^{-/-}$ Mäusen.
- Abb. 34** Adoptiver Transfer von CD4 $^{+}$ Zellen aus Wildtyp, IFN- $\gamma^{-/-}$ und IL-17 $^{-/-}$ Mäusen.
- Abb. 35** Hemmung der IL-17-Produktion *in vitro* durch IFN- γ .
- Abb. 36** Hemmung der Th-Zell-Proliferation durch IFN- γ .
- Abb. 37** Hemmung der Proliferation von Th-Zellen durch IFN- γ .
- Abb. 38** Proliferation von Lymphknotenzellen nach mBSA-Stimulation.
- Abb. 39** Anteil CD4 $^{+}$ T-Zellen in den Lymphknoten von IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäusen und Wildtyp.
- Abb. 40** Übersicht der durch Zytokine vermittelten Mechanismen im Synovium.
-
- Tab. 1** Revidierte Kriterien des American College of Rheumatology (ACR) zur Klassifizierung der RA.
- Tab. 2** Schlüsselfunktionen ausgewählter Zytokine.
- Tab. 3** Histologisches Bewertungsschema.
- Tab. 4** Antikörper Immunhistochemie.
- Tab. 5** Antikörper für ELISA.
- Tab. 6** Standard Zytokine.
- Tab. 7** Antikörper und Standards für ELISA.
- Tab. 8** Antikörper und Zytokine für die Th1/Th2-Generierung.
- Tab. 9** Zytokine in Überständen von antigenspezifisch stimulierten Zellen aus IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäusen in Relation zum Wildtyp.

Wissenschaftliche Beiträge

Publikationen:

Irmeler I., Bräuer R. (2007). Neues aus der Forschung - Paradoxe Rolle von IFN- γ bei Arthritis.
Z Rheumatol. 66(7):591-594.

Irmeler I. M., Gajda M., Bräuer R. (2007). Exacerbation of antigen-induced arthritis in IFN- γ -deficient mice as a result of unrestricted IL-17 response.
J Immunol. 179(9):6228-6236.

Schurigt U., Pfirschke C., **Irmeler I.**, Hückel M., Gajda M., Janik T., Baumgrass R., Bernhagen J., Bräuer R. (2007). Matrix metalloproteinase overexpression in cocultures of fibroblast-like synoviocytes and T helper cells is partially mediated by the macrophage migration inhibitory factor (MIF).
Arthritis Rheum. [Resubmitted].

Irmeler I., Schmidt K., Starck J. M. (2004). Developmental variability during early embryonic development of zebra fish, *Danio rerio*.
J Exp Zool B Mol Dev Evol. 302(5):446-457. Erratum 2007 Nov 5 [Epub ahead of print].

Vorträge:

35. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie, 2007, Hamburg.

Irmeler I., Gajda M., Bräuer R.: Exacerbation of Antigen-induced Arthritis in IFN- γ -deficient Mice as a Result of Unrestricted IL-17 Response.
Z Rheumatol. 2007; 66 Suppl 1:17.

37th Annual Meeting of the German Society of Immunology, 2007, Heidelberg.

Irmeler I., Gajda M., Bräuer R.: Exacerbation of Antigen-induced Arthritis in IFN- γ -deficient Mice as a Result of Unrestricted IL-17 Response.

10th German Meeting on Th1/Th2 research, 2007, Marburg.

Irmeler I., Gajda M., Bräuer R.: Exacerbation of Antigen-induced Arthritis in IFN- γ -deficient Mice as a Result of Unrestricted IL-17 Response.

24th Winter School on Proteinases and Their Inhibitors, 2007, Tiers, Italy.

Schurigt U., Pfirschke C., **Irmeler I.**, Hückel M., Gajda M., Baumgrass R., Bräuer R.: Inhibition of matrix metalloproteinase overexpression in cocultures of arthritic synoviocytes and T helper cells by MIF tautomerase inhibitor I.

33. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie, 2005, Dresden.

Irmeler I., Gajda M., Bräuer R.: Aggravation of antigen-induced arthritis in IFN- γ -deficient mice.
Z Rheumatol. 2005; 64 Suppl 1:21.

36th Annual Meeting of the German Society of Immunology, 2005, Kiel and

36th Annual Meeting of the SSI Scandinavian Society for Immunology.

Irmeler I., Gajda M., Bräuer R.: Aggravation of antigen-induced arthritis in IFN- γ -deficient mice.
Immunobiology. 2005; 210(6-8):514-515.

8th German Meeting on Th1/Th2 research, 2005, Marburg.

Irmeler I., Gajda M., Bräuer R.: Aggravation of inflammatory arthritis in IFN- γ -deficient mice.

22nd Winter School on Proteinases and Their Inhibitors, 2005, Tiers, Italy.

Schurigt U., Eilenstein R., Gajda M., Stopfel N., **Irmeler I.**, Reinheckel T., Peters C., Bräuer R., Wiederanders B.: Cathepsin L, but not cathepsin B influences the severity of experimental arthritis.

32. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie, 2004, Düsseldorf.

Irmlier I., Hückel M., Scheffold A., Gajda M., Petrow P.K., Radbruch A., Bräuer R.: Protective role of IFN- γ in murine antigen-induced arthritis.

31. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie, 2003, Frankfurt.

Hückel M., Simon J., **Irmlier I.**, Scheffold A., Radbruch A., Bräuer R.: Shifting of Th1/Th2 response in arthritis - a real worthwhile goal?
Z Rheumatol. 2003; 62 Suppl 1:36.

Poster:

37th Annual Meeting of the German Society of Immunology, 2007, Heidelberg.

Irmlier I., Gajda M., Bräuer R.: Exacerbation of Antigen-induced Arthritis in IFN- γ -deficient Mice as a Result of Unrestricted IL-17 Response.

16th European Congress of Immunology, 2006, Paris, France.

Irmlier I., Gajda M., Bräuer R.: Anti-inflammatory Effect of IFN- γ in Antigen-induced Arthritis.

1st International MUGEN Conference on "Animal Models for Human Immunological Disease", 2006, Athens, Greece.

Irmlier I., Gajda M., Stirnweiss J., Bräuer R.: Exacerbation of inflammatory arthritis in IFN- γ -deficient mice by increased IL-17 production.

7th World Congress on Inflammation, 2005, Melbourne, Australia.

Irmlier I., Hückel M., Simon J., Gajda M., Petrow P. K., Scheffold A., Radbruch A., Bräuer R.: Protective effects of interferon-gamma in experimental arthritis.
Inflamm Res. 2005; 54 Suppl 2:S117.

33. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie, 2005, Dresden.

Schurigt U., Eilenstein R., Gajda M., **Irmlier I.**, Reinheckel T., Peters C., Bräuer R., Wiederanders B.: Cathepsin L, but not cathepsin B influences the severity of experimental arthritis.
Z Rheumatol. 2005; 64 Suppl 1:101.

Schurigt U., Pfirschke C., **Irmlier I.**, Gajda M., Hückel M., Frey O., Bräuer R.: The macrophage migration inhibitory factor (MIF) is a proinflammatory cytokine secreted by Th1 and Th2 cells stimulating the proteinase expression in synovial fibroblasts.
Z Rheumatol. 2005; 64 Suppl 1:104.

32. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie, 2004, Düsseldorf.

Schurigt U., Pfirschke C., **Irmlier I.**, Frey O., Hückel M., Bräuer R.: In vitro generated Th1 and Th2 cells secrete the macrophage migration inhibitory factor (MIF), a pro-inflammatory cytokine stimulating the proteinase expression in synovial fibroblasts.

4^d Global Arthritis Research Network (GARN) Symposium, 2004, Montreal, Kanada.

Hückel M., **Irmlier I.**, Simon J., Radbruch A., Scheffold A., Bräuer R.: Protective role of IFN- γ in murine antigen-induced arthritis.
Arthritis Res Ther. 2004; 6 Suppl 3:59.

34th Annual Meeting of the German Society of Immunology, 2003, Berlin.

Irmlier I., Petrow P. K., Bräuer R.: Protective effect of IFN- γ in murine antigen-induced arthritis, a Th1-mediated disease model.
Immunobiology. 2003; 208(1-3):141.

Hückel M., **Irmlier I.**, Bräuer R.: Interaction between synovial fibroblasts and T helper cells in experimental arthritis.
Immunobiology. 2003; 208(1-3):140.

Danksagung

Diese Promotionsarbeit wurde unter Betreuung von Prof. Dr. Rolf Bräuer im Rahmen einer Förderung durch das Interdisziplinäre Zentrum für Klinische Forschung am Institut für Pathologie der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena in der Arbeitsgruppe Immunpathologie angefertigt.

Ich möchte mich an dieser Stelle herzlich bei Prof. Dr. Rolf Bräuer für die interessante Themenstellung und die stete Bereitschaft zur Unterstützung bedanken. Allen derzeitigen und ehemaligen Kollegen aus der Arbeitsgruppe, insbesondere Prof. Dr. Rolf Bräuer, Dr. Marion Hückel, Dr. Mieczyslaw Gajda, Dr. Jörg Stirnweiß, Dr. Anja Wölfert, Rene Eilenstein, Christina Rose, Renate Stöckigt, Conny Hüttich und Uta Griechen danke ich für die interessanten Diskussionen, Hilfe in experimentellen und theoretischen Fragen und das gute Arbeitsklima. Die Zeit in der Arbeitsgruppe wird mir in guter Erinnerung bleiben.

Mein weiterer Dank gilt Prof. Dr. Andreas Radbruch, Prof. Dr. Alf Hamann, Prof. Dr. Jochen Hühn, Dr. Alexander Scheffold und Dr. Frank Hardung vom Deutschen Rheumaforschungszentrum in Berlin und Prof. Dr. Thomas Kamradt und Dr. Oliver Frey vom Institut für Immunologie des Universitätsklinikums Jena.

Prof. Dr. Edgar Schmitt (Johannes-Gutenberg-Universität Mainz), Prof. Dr. Gottfried Alber (Universität Leipzig) und Prof. Dr. Yoichiro Iwakura (University of Tokyo) danke ich für die das bereitwillige zur Verfügung stellen der Knock-out-Mäuse.

Mein besonderer Dank gilt meiner Frau Anke Irmeler für den mir allzeit gegebenen Rückhalt und meinem Sohn Cedric Irmeler, der die Fähigkeit besitzt, auch einen Tag mit experimentellen Misserfolgen zu einem positiven Ausklang zu bringen.

Ebenso bedanke ich mich bei meinen Eltern Franz und Roswitha Irmeler und meinen Großeltern Josef und Gertrud Lerch. Sie ermöglichten mir meinen Werdegang und brachten mir die vielen, nicht weniger wichtigen Dinge des Lebens außerhalb der Wissenschaft bei.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Ingo Michael Irmner
Geburtsdatum / Ort	14.12.1971, Ravensburg
Staatsangehörigkeit	deutsch
verheiratet mit	Anke Irmner, geb. 05.02.1978
	Dipl. Biochem., Lehramtsanwärter Gymnasium
Kinder	Cedric Irmner, geb. 23.05.2005

Berufserfahrung

ab Januar 2008	Wissenschaftlicher Mitarbeiter Institut für Immunologie Universitätsklinikum Jena
August 2001 – Dezember 2007	Wissenschaftlicher Mitarbeiter Institut für Pathologie Universitätsklinikum Jena Thema der Dissertation: „Die Rolle von Interferon- γ in der Pathogenese der Antigen-induzierten Arthritis.“

Studium

Oktober 1997 – Juni 2001	Hauptstudium Spezielle Zoologie an der Friedrich-Schiller-Universität Jena Thema der Diplomarbeit: „Die embryonale Variabilität beim Zebrafisch <i>Danio rerio</i> und das Phylotypische Stadium.“
Oktober 1995 – September 1997	Grundstudium Biologie an der Friedrich-Schiller-Universität Jena

Wanderjahre

Oktober 1993 – Mai 1995	Rucksackreise (Indien, Südostasien, Australien, Südpazifik, Nordamerika)
-------------------------	--

Armee

Oktober 1991 – September 1993	Soldat auf Zeit für 2 Jahre Unteroffizier im Jägerregiment 10 „Linzgau“ Mörser-Truppführer
-------------------------------	--

Schulbildung

1982 – 1991	Gymnasium Mengen
1978 – 1982	Grund- und Hauptschule Hohentengen

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe. Bei der Erstellung des Manuskripts und der Auswertung des Materials wurde ich von Prof. Dr. Rolf Bräuer und Dr. Mięczyslaw Gajda unterstützt.

Desweiteren erkläre ich, dass die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und Dritte im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir erhalten haben.

Die Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena ist mir bekannt und die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung wurde von mir nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht .

Jena, den 15.11.2007



.....
Ingo Irmeler