

**Modulation der Glukose-6-Phosphat Isomerase induzierten Arthritis
durch die Blockade von ICOS Ligand**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

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

von Juliane Ilona Meisel
geboren am 14.10.1982 in Zeulenroda

Gutachter:

1. Prof. Dr. Thomas Kamradt
2. Prof. Dr. Rolf Bräuer
3. Prof. Dr. Andreas Radbruch, DRFZ Berlin

Tag der öffentlichen Verteidigung: 19.06.2009

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AIA	Antigen-induzierte Arthritis
akt.	aktiviert
APC	Allophycocyanin
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
ARA	<i>American Rheumatism Association</i>
BSA	Bovines Serum Albumin
BTLA	<i>B and T lymphocyte attenuator</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CFA	komplettes Freundsches Adjuvanz (<i>engl.: complete Freund's adjuvant</i>)
CIA	Kollagen-induzierte Arthritis (<i>engl.: collagen-induced arthritis</i>)
CII	Kollagen Typ II (<i>engl.: collagen type II</i>)
cpm	<i>counts per minute</i>
CTLA	<i>cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen</i>
COX	Cyclooxygenase
CXCR	CX-Chemokine Rezeptor
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid
dig	Digoxinin
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>engl.: desoxyribonucleic acid</i>)
DC	Dendritische Zelle (<i>engl.: dendritic cell</i>)
EAE	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Vorwärtsstreulicht (<i>engl.: forward scatter</i>)
GM-CSF	<i>granulocyte monocyte-colony stimulating factor</i>
G6PI	Glukose-6-Phosphat Isomerase

gp	Glycoprotein
HE	Hämatoxylin-Eosin
HLA	humanes Leukozytenantigen
HWS	Halswirbelsäule
i.p.	intraperitoneal
ICOS	<i>inducible costimulator molecule</i>
ICOSL	ICOS-Ligand
IFN- γ	Interferon- γ
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl-thio- β -D-galactopyranosid
KLH	<i>engl.: keyhole limpet hemocyanin</i>
KM	Kulturmedium
L	Ligand
mAb	monoklonaler Antikörper (<i>engl.: monoclonal antibody</i>)
M ϕ	Makrophage
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MTX	Methotrexat
N.D.	nicht detektierbar
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
NK Zellen	Natürliche Killerzellen
NOD	non obese diabetes
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
OD	optische Dichte
oPD	<i>ortho</i> -Phenylendiamin
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung (<i>engl.: phosphate buffered saline</i>)
PD	<i>programmed death</i>
PE	R-Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyllprotein
RA	Rheumatoide Arthritis
RF	Rheumafaktor

RKI	Robert-Koch-Institut
rpm	<i>rounds per minute</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institut
SI	Stimulationsindex
SSC	Seitwärtsstreulicht (<i>engl.: side scatter</i>)
t	Tag
TGF- β	transforming growth factor- β
Tfh-Zelle	follikuläre T-Helfer-Zelle
Th-Zelle	T-Helfer-Zelle
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
ZAP-70	<i>Zeta chain associated protein of 70kDa</i>
-/-	<i>engl.: knockout</i>

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Inhaltsverzeichnis	IV
1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	3
2.1 Rheumatoide Arthritis	3
2.1.1 Ätiologie und Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis	3
2.2 Tiermodelle	6
3 Ziele der Arbeit	14
4 Material und Methoden	15
4.1 Materialien	15
4.1.1 Chemikalien und Zusätze	15
4.1.2 Verbrauchsmaterial	15
4.1.3 Medien, Lösungen und Puffer	16
4.1.4 Geräte	18
4.1.5 Antikörper	19
4.2. Methoden	20
4.2.1 Proteinbiochemie	20
4.2.2 Zellbiologische Methoden	22
4.2.3 Durchflusszytometrie	28
4.2.4 Tierversuche	33
5 Ergebnisse	36
5.1 Klinischer Verlauf der G6PI induzierten Arthritis nach anti-ICOSL Behandlung	36
5.2 Histologischer Verlauf der G6PI induzierten Arthritis nach anti-ICOSL Behandlung	38
5.3 Oberflächenexpression von ICOS, CD25 und CD134	40
5.4 Nachweis G6PI spezifischer Antikörper	42

5.5	Proliferation nach anti-ICOSL Behandlung	43
5.6	Zytokinproduktion bei der G6PI induzierten Arthritis	45
5.7	Intrazelluläre Zytokinproduktion der aktivierten T-Zellen nach anti-ICOSL Behandlung	46
6	Diskussion	55
6.1	ICOS-ICOSL Interaktion im Modell der G6PI induzierten Arthritis	56
6.1.1	Klinischer Verlauf	56
6.2	Aktivierungszustand der CD4 ⁺ T-Zellen	58
6.3	Einfluss der ICOS-ICOSL Blockade auf die G6PI spezifische Antikörperproduktion	59
6.4	Funktionelle Untersuchung der Zellpopulation nach G6PI Immunisierung	61
6.4.1	Proliferation nach G6PI Immunisierung	61
6.4.2	Zytokinproduktion nach G6PI Immunisierung	62
6.4.3	Charakterisierung der Zytokinproduktion ICOS ⁺ T-Zellen	67
7	Schlussfolgerungen	70
8	Literaturverzeichnis	72
9	Anhang	80
	Lebenslauf	80
	Danksagung	81
	Ehrenwörtliche Erklärung	82

1 Zusammenfassung

Die Ätiologie und Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis (RA) sind bisher nur in Ansätzen aufgeklärt. Deshalb sind genauere Untersuchungen im Tiermodell von großer Bedeutung.

In einem von unserer Arbeitsgruppe kürzlich entwickelten Modell wurde durch einmalige Gabe von Glukose-6-Phosphat Isomerase (G6PI) in suszeptiblen Mausstämmen eine Arthritis induziert. Durch den definierten Krankheitsverlauf und die histologischen Ähnlichkeiten zur RA im Menschen eignet sich dieses Modell für funktionelle Untersuchungen besonders gut.

In der vorliegenden Arbeit habe ich die Rolle der Kostimulation durch ICOS-ICOSL Interaktionen für die Pathogenese der G6PI-Arthritis näher beleuchtet. Dazu wurden DBA/1 Mäuse mit G6PI immunisiert und frühzeitig mit einem blockierenden anti-ICOSL Antikörper behandelt. Dabei zeigte sich ein deutlich milderer Verlauf der Arthritis in den behandelten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe. Im histologischen Bild der entzündlich veränderten Gelenke waren in den mit anti-ICOSL Antikörper behandelten Tieren deutlich weniger granulozytäre und mononukleäre Infiltrate, sowie geringere destruktive Veränderungen sichtbar.

Diese eindrucksvollen, im klinischen und histologischen Bild, sichtbaren Effekte der anti-ICOSL Blockade führten zur Frage nach potentiell zu Grunde liegenden Mechanismen. Daher wurden die Antikörperantwort und die T-Zellantwort in den behandelten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe untersucht.

Für den in sekundären Keimzentren induzierten Antikörperklassenwechsel spielt die Interaktion zwischen ICOS-ICOSL eine Rolle. Deshalb wurden G6PI spezifische Isotypantikörper der Subklassen IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b und IgG3 nach Immunisierung im Serum bestimmt, wobei sich die gemessenen Titer der anti-ICOSL behandelten Gruppe und der Kontrollgruppe nicht deutlich unterschieden. Dieses Ergebnis wies darauf hin, dass die Antikörperproduktion der B-Zellen vermutlich nicht ursächlich für die deutlichen klinischen Effekte war.

Daneben wurde der Einfluss der Blockade von ICOS in Bezug auf die antigenspezifische Proliferation von Milzzellen untersucht, wobei sich kein deutlicher Unterschied zwischen den anti-ICOSL behandelten Tieren und den Kontrolltieren zeigte.

Für eine weitergehende Charakterisierung der Immunantwort wurden einige pathogeneserelevante proinflammatorische Zytokine quantitativ mit Hilfe der *ELISA*-Technik bestimmt. Dabei zeigte sich nur für IL-17 eine deutlich verminderte Zytokinproduktion in der Gruppe der behandelten Mäuse im Vergleich zur Kontrollgruppe. Da IL-17 ein wichtiges Zytokin in der Pathogenese der Arthritis darstellt, erfolgte eine detaillierte Analyse der Zytokinproduktion auf Einzelzellebene mittels Durchflusszytometrie im Zeitverlauf bis Tag 40 nach G6PI Immunisierung. Neben IL-17 wurde zusätzlich auch das für die Arthritispathogenese wichtige Zytokin TNF- α untersucht. Über den gesamten Zeitraum konnte eine deutlich verminderte IL-17 Produktion der behandelten Tiere nachgewiesen werden, jedoch zeigte sich kein Unterschied bei der Produktion von TNF- α .

Die Unterschiede der IL-17 Produktion könnten eine Ursache für die deutlich sichtbaren klinischen Effekte der ICOS-ICOSL Blockade sein. Aus diesen viel versprechenden Ergebnissen lassen sich eventuell Ansatzpunkte für neue Therapiestrategien der Rheumatoiden Arthritis ableiten.

2 Einleitung

2.1 Rheumatoide Arthritis

2.1.1 Ätiologie und Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis

Allgemeines

Weltweit sind ungefähr 0,5 bis 1 % der Bevölkerung von Rheumatoider Arthritis (RA), der häufigsten Erkrankung des entzündlich rheumatischen Formenkreises, betroffen (Firestein 2003). Allein in Deutschland leben 800.000 RA Patienten (Mittendorf et al. 2004). Der Beginn der RA liegt durchschnittlich bei 40 Jahren, wobei 2/3 der Betroffenen Frauen sind (Feldmann 2002).

Durch ihren chronischen Verlauf, die destruktive Veränderungen der betroffenen Gelenke und die daraus resultierende Funktionseinschränkung kann die RA zu einer ständigen Abnahme an Lebensqualität, bis hin zu Arbeitsunfähigkeit führen (Chorus et al. 2003, Lapsley et al. 2002).

Die Rheumatoide Arthritis ist eine chronisch-entzündliche, in der Regel progredient verlaufende Systemerkrankung, die bevorzugt bilateral-symmetrisch die Fingermittel- und Fingergrundgelenke, Handgelenke, Ellenbogen, Schultergelenke, HWS, Knie-, Sprung- und Zehengelenke betrifft (Gromnica-Ihle et al. 2001). Bei 50 % der Patienten treten neben der Synovitis im Gelenk auch extraartikuläre Manifestationen wie Rheumaknoten (subkutane Granulome) oder Amyloidosen auf (Turesson et al. 2004). Abbildung 1 zeigt exemplarisch massive rheumatische Veränderungen der Hände.



Abb. 1: Rheumatoide Veränderungen der Hand. Die chronische Entzündung der metacarpophalangealen Gelenke führt zu Deformation der Hände mit einer Deviation der Finger.
(Quelle: www.markusflueck.ch/images/medical_education)

Trotz intensiver Forschung in den letzten Jahrzehnten sind sowohl Ursache als auch Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis noch weitgehend ungeklärt, die bereits identifizierten beteiligten Zelltypen sind schematisch in Abbildung 2 aufgeführt.

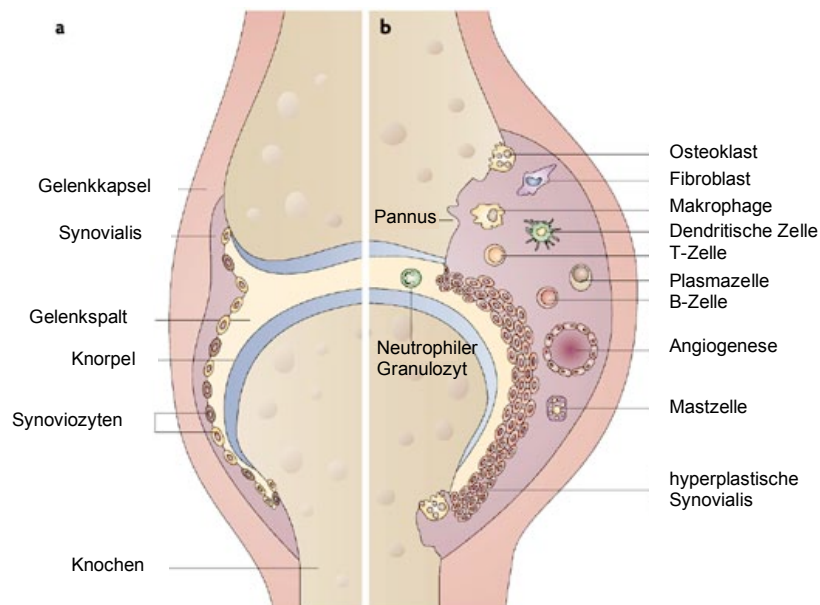


Abb. 2: Schematische Darstellung eines gesunden Gelenks und seine Veränderung bei RA. Unter physiologischen Bedingungen a) setzt sich die Synovialmembran aus einer dünnen Schicht von 1-3 Synoviozyten zusammen. Mit Ausnahme des Knorpels bedeckt sie alle intraartikulären Strukturen. Bei der RA kommt es zur Entzündung der Synovialmembran b) und einer massiven Infiltration von T-, B- und Plasmazellen, von dendritischen Zellen, Makrophagen und Mastzellen, sowie eine Gefäßneubildung kann beobachtet werden. Die synoviale Zellschicht hyperplasiert, die Synovialmembran erweitert sich und bildet Zotten. Der destruktive Anteil der Synovialmembran wird als Pannus bezeichnet. Durch Freisetzung von Zytokinen kommt es zum proteolytischen Knorpelabbau durch Synoviozyten und Chondrozyten sowie zu Knochendestruktion durch Osteoklasten. (Leicht verändert aus: (Smolen und Steiner 2003))

B-Zellen in der Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis

B-Zellen scheinen in der Pathogenese der RA eine bedeutende Rolle zu spielen, da eine Depletion der B-Zellen mit CD20 Antikörper (Rituximab[®]) eine therapeutische Wirksamkeit zeigt (De Vita et al. 2002). Weiterhin finden sich bei über 80 % aller Betroffenen Rheumafaktoren im Serum (Firestein 2003). Rheumafaktoren sind vor allem IgM Antikörper, die den Fc-Teil des IgG Antikörpers erkennen. Jedoch sind diese nicht spezifisch für die Rheumatoide Arthritis, da sie unter anderem bei Patienten mit Sjögren Syndrom oder Tuberkulose auftreten können (Fan und Leong 2007, Bongartz et al. 2006). Es wird angenommen, dass Rheumafaktoren an der Bildung großer Immunkomplexe beteiligt sind. Diese könnten den Krankheitsverlauf

begünstigen, indem sie das Komplementsystem aktivieren und somit die Zytokinsynthese fördern (Dorner et al. 2004). Die Anwesenheit von Rheumafaktoren im Serum wird seit langer Zeit als diagnostischer Marker für die Rheumatoide Arthritis eingesetzt (Firestein 2003). Daneben können noch weitere Autoantikörper nachgewiesen werden, wie z.B. gegen Kollagen Typ II, Hitze-Schock Protein oder hnRNP-33 (RA33) (Steiner et al. 2002). Das alleinige Vorhandensein der Autoantikörper ist jedoch nicht spezifisch für die Rheumatoide Arthritis. Möglicherweise existieren spezifischere Antikörper gegen citrullierte Antigene in Patienten mit RA (Union et al. 2002).

Zusammenfassend gibt es eine Reihe von Hinweisen darauf, dass B-Zellen in der Pathogenese der RA eine wichtige Rolle spielen, jedoch sind die genauen Mechanismen noch weitestgehend ungeklärt (McInnes und Schett 2007).

T-Zellen und Zytokine in der Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis

Obwohl die Immunkomplextheorie viele der Reaktionen bei einem akut entzündlichen Geschehen erklären kann, sind auch T-Zellen in entzündlichen Gelenksinfiltraten nachweisbar (Firestein 2003). Experimentell konnten in den letzten 30 Jahren Hinweise dafür gefunden werden, dass $CD4^+$ T-Zellen an den Entzündungsprozessen bei der RA entscheidend beteiligt sind (Firestein 2003). Dabei konnte eine starke Assoziation zwischen einem speziellen HLA-DR Haplotyp und der Rheumatoiden Arthritis nachgewiesen werden (McInnes und Schett 2007, Jawaheer et al. 2002). Schon lange ist es möglich, T-Zell assoziierte Zytokine, wie beispielsweise IL-1, IL-6, IL-15, IL-18, TNF- α und verschiedene Chemokine, in entzündeten Gelenken von RA Patienten nachzuweisen (Firestein 2003, McInnes und Schett 2007). Diese Zytokine werden vor allem von Makrophagen und Synoviozyten produziert und spielen für die Pathogenese eine wichtige Rolle.

So konnten Lipsky et al. zeigen, dass nach TNF- α Blockade der Verlauf der RA verlangsamt bzw. die Progression der Knochen- und Gewebszerstörung verhindert werden kann (Lipsky et al. 2000).

Auch von T-Zellen produzierte proinflammatorische Zytokine wie IFN- γ und IL-17 konnten in Gelenken detektiert werden (Firestein 2003). Bei IL-17 handelt es sich um ein kürzlich beschriebenes Zytokin, welches im Synovium und in der Synovialflüssigkeit von RA Patienten gefunden wurde (Kotake et al. 1999, Chabaud

et al. 1999). Die klinische Studie zur therapeutischen Wirkung von IL-17 befindet sich derzeit in Phase I (McInnes und Schett 2007).

2.2 Tiermodelle

Bei der RA handelt es sich um einen Symptomkomplex, wobei Ätiologie und Pathogenese noch immer weitestgehend ungeklärt sind. Deshalb sind die zahlreichen experimentellen Tiermodelle für die Rheumaforschung von essentieller Bedeutung, denn sie bieten die Möglichkeit, den Einfluss bestimmter Gene und Mechanismen gezielt zu untersuchen und neue Therapieansätze zu testen. Die daraus gewonnenen Ergebnisse bieten Möglichkeiten für die Untersuchung an humanem Material von RA Patienten.

Im Folgenden sollen die Wichtigsten dieser Modelle genauer vorgestellt werden.

Die G6PI induzierte Arthritis

In suszeptiblen Mausstämmen, wie beispielsweise DBA/1 Mäusen, kann durch einmalige Immunisierung mit rekombinanter humaner Glukose-6-Phosphat Isomerase (G6PI) in komplettem Freundschens Adjuvanz (CFA) eine monophasische Arthritis induziert werden (Schubert et al. 2004). Dabei beginnt die Entzündung der Karpal- und Metakarpalgelenke bzw. Tarsal- und Metatarsalgelenke, sowie der proximalen und distalen Interphalangealgelenke neun bis zehn Tage nach der Immunisierung. Histologisch sind die schwersten Anzeichen der Entzündung um den Tag 15 zu beobachten. Klinisch zeigt sich eine deutliche Schwellung und Rötung der Mauspfoten im Bereich der Karpal- und Metakarpalgelenke bzw. Tarsal- und Metatarsalgelenke. Nach etwa 30 Tagen klingt die Entzündung ab, was sich auch im histologischen Bild widerspiegelt. Regenerative Prozesse stehen dabei im Vordergrund.

Andere Arthritismodelle

Nachdem die Antigen-induzierte Arthritis (AIA) bereits im Kaninchenmodell von Dumonde und Glynn 1962 induziert werden konnte (Dumonde und Glynn 1962), wurden später auch andere Tierarten, wie beispielsweise Mäuse, erfolgreich immunisiert. Nach Primärimmunisierung eines Proteinantigens in Adjuvanz subkutan

wird selbiges Antigen intraartikulär appliziert, wodurch eine lokale Arthritis des entsprechenden Gelenks ausgelöst wird (Brackertz et al. 1977), (Lens et al. 1984).

Das am besten untersuchte Arthritismodell ist die Kollagen-induzierte Arthritis (CIA), welche zunächst um 1977 an Ratten etabliert werden konnte (Trentham et al. 1977). Zwischenzeitlich wurde dieses Modell für die Maus adaptiert, wobei zumeist aus Hühnern oder Rindern isoliertes Kollagen Typ II (CII) verwendet wurde. Nach mehrmaliger Gabe des Antigens in Freundschem Adjuvanz entwickeln suszeptible Mausstämme eine schwere progredient verlaufende Polyarthritis (Luross und Williams 2001, Brand et al. 2003).

Nachteilig bei diesem Modell ist jedoch der variable Krankheitsverlauf. Dieser hängt sowohl vom verwendeten Mausstamm, der Herkunft des Antigens als auch weiteren exogenen Faktoren (z.B. Tierhaltung) ab (Breban et al. 1993).

Ein weiteres Arthritismodell ist die Streptokokkenzellwand-induzierte Arthritis. Zur Induktion der Arthritis werden Zellwandbestandteile des Bakteriums *Streptokokkus pyogenes* intraartikulär appliziert. Durch fünfmalige Wiederholungen im Abstand von je einer Woche wird eine chronische destruktive Arthritis mit stärkerer T-Zellbeteiligung induziert (Lubberts et al. 2005).

Durch gentechnische Methoden existieren einige transgene oder knockout Tiermodelle von spontan auftretenden Arthritiden. Beispielsweise entwickeln transgene Mäuse, die das humane TNF- α überexprimieren (Li und Schwarz 2003, Keffer et al. 1991). Auch in IL-1 Rezeptorantagonist knockout Tieren (IL-1RA^{-/-}) entsteht spontan eine Arthritis (Horai et al. 2000). Eine Mutation im gp130 Molekül der Signaltransduktion führt zu einer gesteigerten Reaktionsfähigkeit der Zellen auf IL-6, wodurch sich eine Arthritis manifestiert (Atsumi et al. 2002).

Sakaguchi et al. beschrieben kürzlich einen Mausstamm mit einer Mutation im ZAP-70-Gen, welche zu einer gestörten Selektion von T-Zellen im Thymus führte (SKG Modell). Diese Mäuse entwickeln ein Krankheitsbild, das der Rheumatoiden Arthritis des Menschen sehr ähnelt. Es kommt in konventioneller Tierhaltung zu einer chronisch progredienten Arthritis mit Ausbildung von Rheumaknoten und weiteren extraartikulären Manifestationen (Sakaguchi et al. 2003).

Die Grundlage für die Experimente zur G6PI induzierten Arthritis lieferte das K/BxN Modell. Für dieses Modell wurden Mäuse gezüchtet, die einen transgenen T-Zellrezeptor exprimieren, der mit einem Epitop der Glukose-6-Phosphat Isomerase kreuzreagiert. Wenn diese mit NOD Mäusen, die MHC-II^{g7} exprimieren, gekreuzt werden, dann manifestiert sich in der F1-Generation (K/BxN) im Alter von drei bis vier Wochen eine chronisch progrediente Arthritis (Kouskoff et al. 1996). Wird durch Transfer von Serum dieser erkrankten F1-Tiere in Empfängertiere zahlreicher untersuchter Mausstämmen eine Arthritis induziert, verläuft diese nicht chronisch, sondern heilt nach ungefähr zwei Wochen wieder aus (Korganow et al. 1999). Erstmals konnte in diesem Modell gezeigt werden, dass eine Immunreaktion gegen ein ubiquitär exprimiertes Antigen zu einer organspezifischen Erkrankung führt.

Rolle der Antikörper im Tiermodell

Für die Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis ist das Zusammenspiel von B- und T-Zellen, sowie Zellen des angeborenen Immunsystems von entscheidender Bedeutung. Um den Einfluss von B-Zellen zu untersuchen, kann man μ MT Mäuse des entsprechenden genetischen Hintergrunds, in denen sich keine reifen B-Zellen ausbilden, verwenden. So entwickelte sich nach G6PI Immunisierung in μ MT Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren keine Arthritis (Bockermann et al. 2005). Auch im K/BxN Modell zeigten μ MT Mäuse im Vergleich zur Kontrollgruppe keine Krankheitszeichen (Kouskoff et al. 1996).

Serumtransferexperimente im K/BxN Modell waren erfolgreich. Die induzierte Arthritis verläuft allerdings nicht chronisch und klingt schon nach ungefähr 15 Tagen wieder ab (Korganow et al. 1999). Im Modell der CIA konnte ebenfalls durch Serumtransfer in Empfängertiere eine Arthritis ausgelöst werden (Holmdahl et al. 1990). Durch weitergehende Experimente wurde in beiden Modellen gezeigt, dass für eine Induktion der Arthritis eine Kombination von unterschiedlichen, aufgereinigten antigenspezifischen Immunglobulinsubklassen von entscheidender Bedeutung ist (Terato et al. 1992), (Matsumoto et al. 1999). Im Modell der G6PI induzierten Arthritis gelang es bisher nicht, durch Serumtransfer oder durch Transfer von antigenspezifischen Antikörperkombinationen eine Arthritis auszulösen (T. Kamradt und D. Schubert, persönliche Mitteilung).

Diese Ergebnisse lassen sich dahingehend interpretieren, dass zwischen der Rolle der B-Zellen und der Rolle der Antikörper für die Arthritispathogenese differenziert

werden muss. Offensichtlich haben in einigen Arthritismodellen, wie beispielsweise der G6PI Arthritis, Antikörper keine entscheidende Bedeutung für die Entwicklung der Erkrankung, während B-Zellen in bisher nicht näher spezifizierten Funktionen pathogenetisch relevant sind. In einigen Arthritismodellen ist die humorale Seite des Immunsystems nicht von primärer Relevanz, so dass in diesen keine entsprechenden Untersuchungen durchgeführt wurden.

Rolle der Zytokine im Tiermodell

Im Folgenden werden die nach derzeitigem Wissensstand entscheidenden Zytokine für die Pathogenese der Arthritis, IL-6, TNF- α und IL-17 näher beschrieben.

Im SKG Modell konnte gezeigt werden, dass das von primär Nicht-CD4⁺ T-Zellen produzierte IL-6 für die Pathogenese der Arthritis eine wichtige Rolle spielt (Hirota et al. 2007). In *in vitro* Untersuchungen wurde gezeigt, dass IL-6 (neben TGF- β) das entscheidende Zytokin für die Entstehung von Th17-Zellen ist (Veldhoen et al. 2006, Bettelli et al. 2006, Mangan et al. 2006). Im Modell der CIA entwickelten IL-6^{-/-} Mäuse im Vergleich zu den Kontrolltieren einen milderen Verlauf der Arthritis (Alonzi et al. 1998, Sasai et al. 1999). Einen weiteren Hinweis für die Bedeutung von IL-6 geben die gentechnisch veränderten gp130^(F759/F759) Mäuse, bei denen die Empfindlichkeit des IL-6 Rezeptorkomplexes vergrößert ist, was zu einem spontanen Auftreten der Arthritis führt (Atsumi et al. 2002).

Neben IL-6 spielt auch TNF- α eine entscheidende Rolle für die Pathogenese der Arthritis. Transgene Mäuse für humanes TNF- α entwickelten spontan eine erosive Polyarthritis (Li und Schwarz 2003, Kollias 2005). Im Modell der CIA konnte ein deutlich verminderter Verlauf der Arthritis nach anti-TNF- α Antikörperapplikation festgestellt werden (Williams et al. 1992, Thorbecke et al. 1992, Piguet et al. 1992). In K/BxN Mäusen zeigte die Behandlung mit einem anti-TNF- α Antikörper jedoch keinen Einfluss auf die Entwicklung einer Arthritis (Kyburz et al. 2000). Nach Serumtransfer aus erkrankten K/BxN Mäusen zeigten ungefähr zwei Drittel der TNF- α ^{-/-} Mäuse keine Arthritis (Ji et al. 2002). Im Arthritismodell der IL-1RA^{-/-} Maus wurden TNF- α ^{-/-} Tiere eingekreuzt, wodurch die Arthritsentwicklung zeitlich verzögert werden konnte (Horai et al. 2004). Im Modell der G6PI Arthritis konnte mittels Etanercept (Enbrel[®]), einem löslichem TNF- α Rezeptor, die Arthritis verhindert werden (Schubert et al. 2004).

Ein kürzlich in den Focus gerücktes Zytokin für die Pathogenese der Arthritis ist das IL-17. Neben den schon länger beschriebenen Untergruppen von T-Zellen (Th1-, Th2-Zellen; Treg-Zellen) wurde mit Th17 eine eigenständige Gruppe für IL-17 produzierende T-Zellen eingeführt (Weaver et al. 2006, Weaver et al. 2007, Harrington et al. 2006). Im Allgemeinen wird der Begriff IL-17 für mindestens zwei Mitglieder der IL-17 Familie (IL-17A und -F) verwendet (Weaver et al. 2007). Typischerweise können Th17-Zellen neben IL-17 auch TNF- α , GM-CSF und IL-6 (Infante-Duarte et al. 2000, Weaver et al. 2007), sowie IL-21 (Nurieva et al. 2007) und IL-22 (Liang et al. 2006) produzieren. *In vitro* konnten Th17-Zellen durch Zugabe von IL-6 und TGF- β in das Kulturmedium induziert werden (Veldhoen et al. 2006, Mangan et al. 2006, Bettelli et al. 2006). Kürzlich konnte durch weiterführende Experimente gezeigt werden, dass IL-2 eine blockierende Wirkung auf die Entstehung von Th-17 Zellen hat (Laurence et al. 2007, Kryczek et al. 2006). Versuche in p19^{-/-} Mäusen (p19 bildet zusammen mit p40 IL-23) konnten zeigen, dass IL-23 für die Population von IL-17 produzierenden Zellen eine wichtige Rolle spielt. Die Induktion von Autoimmunkrankheiten wie der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) und Arthritis gelang in diesen Mäusen nicht (Langrish et al. 2005, Cua et al. 2003, Murphy et al. 2003).

IL-17 ist wichtig für die Mobilisierung und Einwanderung von neutrophilen Granulozyten. Weiterhin induziert es die Produktion von G-CSF und GM-CSF in Makrophagen und Synoviozyten, CXC Chemokinen, Metalloproteasen und IL-6. Es wurde gezeigt, dass IL-17 proinflammatorische Effekte auf Endothelzellen, Fibroblasten, Osteoblasten und Monozyten/Makrophagen hat (Weaver et al. 2007).

Wenn in die IL-1RA^{-/-} Tiere eine Defizienz für IL-17 eingekreuzt wird, dann entwickeln diese Mäuse keine Arthritis (Nakae et al. 2003). Auch im SKG Modell zeigten IL-17^{-/-} Mäuse keine Arthritis (Hirota et al. 2007). Weiterhin konnte nach EAE Induktion in IL-17^{-/-} Tieren der Beginn der Erkrankung verzögert und Krankheitszeichen vermindert werden (Komiyama et al. 2006). In einem Arthritismodell, in dem wiederholt Zellwandbestandteile von Streptokokken injiziert wurden, zeigten IL-17R^{-/-} Tiere weniger Anzeichen einer chronisch progredienten Gelenkentzündung als die Wildtypiere (Lubberts et al. 2005). Mäuse, die eine genetische Deletion für IL-17 besitzen, entwickeln keine CIA Arthritis (Nakae et al. 2003).

Diese Beispiele zeigen, dass einige Zytokine in der Arthritispathogenese eine Rolle spielen und in synergistischem Zusammenhang zueinander stehen. Schon die

Inhibierung eines dieser Zytokine kann entweder zu einem milderem Verlauf oder gar einer Verhinderung der Krankheit führen.

Rolle von kostimulatorischen Molekülen in Tiermodellen

Um T-Zellen zu aktivieren spielen neben der Antigenpräsentation durch MHC-Moleküle und Zytokine auch kostimulatorische Moleküle eine Rolle.

Eine Gruppe von kostimulatorischen Molekülen zu der CD28, CTLA-4, PD-1, BTLA und ICOS gehören, wird als CD28 Familie bezeichnet (Greenwald et al. 2005). Deren Mitglieder sind schematisch in Abbildung 3 zusammengefasst.

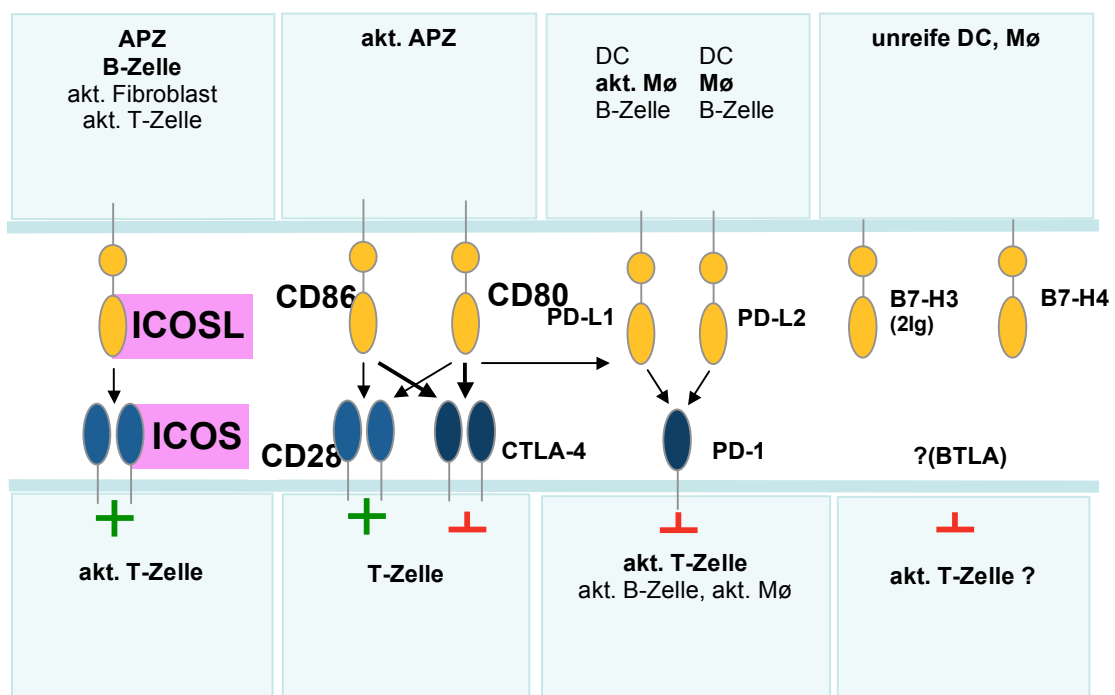


Abb. 3: Übersicht der Mitglieder der CD28 Familie.

Abbildung 3 zeigt eine schematische Übersicht der CD28 Familie und ihrer Liganden (soweit bisher bekannt). Die Zelltypen auf denen die kostimulatorischen Moleküle (blau) oder ihre Liganden (gelb) exprimiert werden sind jeweilig angegeben, wobei akt. als Abkürzung für aktiviert steht. Die Pfeile zwischen den Molekülen geben die jeweils möglichen Bindungspartner an, \perp steht für eine hemmende Wirkung in der Signaltransduktion, während $+$ für eine aktivierende Wirkung steht. Für viele der Moleküle gibt es noch weitere Bezeichnungen, die aber auf Grund der Übersichtlichkeit nicht berücksichtigt wurden. Quellen: (Chen 2004, Butte et al. 2007)

Im Gegensatz zum konstitutiv auf CD4⁺ T-Zellen exprimierten CD28 wird ICOS nach Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen, die sich dann zu Effektor- oder Gedächtniszellen entwickeln, exprimiert. Zusätzlich ist ICOS auf NK Zellen und CD8⁺ T-Zellen zu finden (Greenwald et al. 2005, Yoshinaga et al. 1999, Coyle et al. 2000).

Der Ligand für ICOS (ICOSL, B7H, B7RP-1) wird auf der Oberfläche von B-Zellen, Makrophagen, Dendritischen Zellen, T-Zellen und nicht-lymphoidem Gewebe (Fibroblasten, Endothel- und Epithelzellen) exprimiert (Swallow et al. 1999, Ling et al. 2000, Yoshinaga et al. 1999, Nakazawa et al. 2004). ICOSL ist der einzige bekannte Rezeptor, der mit ICOS interagiert (Nurieva 2005).

ICOS und CD28 haben teilweise ergänzende oder ähnliche Funktionen bei der Aktivierung von T-Zellen. So spielt es bei der Produktion von Th1, Th2 und Th17 Zytokinen eine entscheidende Rolle. Allerdings kann ICOS keine IL-2 Produktion in naiven T-Zellen induzieren (Greenwald et al. 2005, Park et al. 2005).

Weiterhin ist ICOS auf einer Untergruppe von aktivierten T-Zellen, den folliculären T-Helferzellen (Tfh-Zellen), zu finden. Diese sind CD4⁺ T-Zellen, die durch Koexpression von ICOS und CXCR5 charakterisiert sind. Nach Wanderung in die Keimzentren der Lymphknoten vermitteln sie dort den Antikörperklassenwechsel (Mahajan et al. 2007, Shilling et al. 2006).

Die Interaktion zwischen ICOS-ICOSL ist für drei Funktionskomplexe von Bedeutung: Es trägt zur Zytokinproduktion von T-Effektorzellen, zur T- und B-Zellinteraktion in sekundär lymphatischen Geweben und zur T-Zellkommunikation mit Gewebszellen bei.

Neben der Rolle von ICOS für die Induktion von T-Zellantworten in Infektionsmodellen, in Asthma- und Allergiemodellen und in experimentellen Transplantationsmodellen ist ICOS auch für den Krankheitsverlauf in Autoimmunmodellen entscheidend (Greenwald et al. 2005).

Beispielsweise entwickelten ICOS^{-/-} Tiere im Modell der CIA keine Arthritis (Dong und Nurieva 2003). Ebenso zeigten Mäuse, die mit einem anti-ICOSL Antikörper behandelt wurden, im Modell der CIA keine Krankheitszeichen (Iwai et al. 2002). Ein gegensätzliches Bild zeigte der Verlauf der EAE nach Behandlung mit anti-ICOS Antikörper in der Frühphase. Dort entwickelten die Tiere deutlich stärkere Anzeichen einer EAE. Erfolgte die Behandlung allerdings zu einem späteren Zeitpunkt, verzögerte sich der Ausbruch der EAE deutlich (Rottman et al. 2001).

Neben den Mitgliedern der CD28 Familie gibt es noch weitere kostimulatorische Moleküle. Ein Beispiel hierfür ist CD134 (Ox-40), das eines von vielen Mitgliedern der TNF-Rezeptorfamilie ist (Kroccek et al. 2004). Nakae et al. konnten zeigen, dass CD134 die für die Pathogenese im IL-1RA^{-/-} Arthritismodell wichtige IL-17 Produktion vermittelt (Nakae et al. 2003). Bei Aktivierung der T-Zellen werden neben den

Kostimulatorischen auch andere Moleküle, beispielsweise Rezeptoren für Zytokine verstärkt exprimiert, welche für die Änderungen der T-Zellfunktion von entscheidender Bedeutung sind. So wird beispielsweise CD25, ein Teil des IL-2 Rezeptors, nicht nur von regulatorischen T-Zellen sondern auch von aktivierten T-Zellen exprimiert (Ahmadzadeh et al. 1999, Knoechel et al. 2005).

3 Ziele der Arbeit

Eine tiefgreifendere Aufklärung von Ätiologie und Pathogenese der Arthritis ist notwendig, um möglicherweise auch eine Verbesserung therapeutischer Strategien zu erreichen. Dazu eignen sich besonders Tiermodelle, in denen selektiv durch Ausschalten oder Zugabe von Molekülen, die Auswirkungen auf den Krankheitsverlauf untersucht werden können. Es sind zahlreiche Tiermodelle für die Arthritis bekannt, wovon eines das Glukose-6-Phosphat Isomerase induzierte Arthritismodell ist. Dieses Modell hat histologisch große Ähnlichkeit mit der Rheumatoiden Arthritis des Menschen und der definierte Verlauf der Erkrankung erleichtert die Interpretation des Einflusses verschiedener Substanzen.

Ziel dieser Arbeit soll die Untersuchung des kostimulatorischen Moleküls ICOS in der Pathogenese der G6PI induzierten Arthritis sein. Um diese Fragestellung zu untersuchen, soll ein blockierender anti-ICOSL Antikörper eingesetzt werden, der die Interaktion zwischen ICOS und ICOSL verhindert.

- Zusätzlich zur Analyse des Einflusses der Blockade auf den klinischen Verlauf sollen histologische Untersuchungen von Gelenkschnitten durchgeführt werden, um den Schweregrad der Entzündung beurteilen zu können.

Ergibt sich daraus, dass die ICOSL Blockade einen klinischen Effekt hat, soll versucht werden, die zugrunde liegenden immunologischen Mechanismen näher zu charakterisieren.

- Die ICOS-ICOSL Interaktion spielt eine wichtige Rolle für die Produktion von antigenspezifischen Subklassenantikörpern, weswegen eine vergleichende Quantifizierung der Antikörperproduktion nach Blockade sinnvoll erscheint.

- Weiterhin ist ICOS eines der kostimulatorischen Moleküle, welches während der Differenzierung von T-Zellen zu Effektorzellen exprimiert wird. Charakteristisch für Effektorzellen ist deren Fähigkeit zur Proliferation sowie zur Sekretion von Zytokinen und zur Expression von speziellen Oberflächenmolekülen. Deshalb soll die Proliferation dieser Zellen untersucht werden. Zusätzlich möchte ich die Expression von ausgewählten Oberflächenmolekülen und die Produktion von charakteristischen proinflammatorischen Zytokinen im Zeitverlauf der Arthritis messen.

4 Material und Methoden

4.1 Materialien

4.1.1 Chemikalien und Zusätze

Ampicillin	Roth, Karlsruhe
2ß-Mercaptoethanol	Invitrogen, Karlsruhe
BCA Assay	Pierce, Rockford
Bovines Serum Albumin (BSA)	Roth, Karlsruhe
Brefeldin A	Sigma, Taufkirchen
Diethylether	Fischer, Wiesbaden
Ethanol (70 %)	Serva, Heidelberg
Fetales Kälberserum (FCS)	Sigma, Taufkirchen
Glycerin	Roth, Karlsruhe
H ₂ O ₂	Merck, Darmstadt
Hepes	PAA, Coelbe
Imidazol	Sigma, Taufkirchen
Komplettes Freund'sches Adjuvanz (CFA)	Sigma, Taufkirchen
Ni-NTA Superflow	Qiagen, Hilden
o-Phenylendiamin	Sigma, Taufkirchen
Paraformaldehyd	Sigma, Taufkirchen
Penicillin/Streptomycin Lösung	PAA, Coelbe
RPMI 1640 mit L-Glutamin	PAA, Coelbe
Saponin	Sigma, Taufkirchen
Trypanblau	Sigma, Taufkirchen
Tween 20	Fluka, Neu-Ulm
³ H-Thymidin	GE Healthcare, Freiburg

4.1.2 Verbrauchsmaterial

Zellsieb 70 µm	BD Falcon, Heidelberg
Plastikmaterial	Greiner, Solingen
	Nunc, Wiesbaden
	Sarstedt, Nümbrecht
	BD Falcon, Heidelberg

Vivaspin	Vivascience, Göttingen
Szintillationsflüssigkeit	Perkin-Elmer, Rodgau- Jügesheim
Filterplatten	Perkin-Elmer, Rodgau- Jügesheim

4.1.3 Medien, Lösungen und Puffer

Zellkultur

Kulturmedium (KM):	RPMI-1640, 10 % FCS, 10 mM Hepes, 50 μ M 2 β -Mercaptoethanol, 100 U/ml Penicillin, 100 μ g/ml Streptomycin
Erythrozytenlysepuffer:	0,01 M KHCO ₃ , 0,15 M NH ₄ Cl, 0,1 mM EDTA, pH 7,4, autoklaviert
PBS (10x):	136,9 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH ₂ PO ₄ , 7,9 mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O
Brefeldin A [5mg/ml]:	500 mg ad 100 ml Ethanol, 1:1000 einsetzen
BSA (10%):	100 g BSA ad 1 l dH ₂ O
Azidlösung (10%):	10 g NaN ₃ ad 100 ml dH ₂ O
Trypanblau-Lösung:	1:10 in PBS

Materialien zur Expression und Aufreinigung von G6PI

Regeneration der Säule:	50 ml 0,2 % Essigsäure 30 ml 30 % Glycerin 50 ml H ₂ O 20 % Ethanol
-------------------------	---

Lysispuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 10 mM Imidazol pH 8,0
Waschpuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 20 mM Imidazol pH 8,0
Elutionspuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 150 mM Imidazol pH 8,0
LB-Medium	1 % Pepton/Trypton 0,5 % Hefeextrakt 1 % Natriumchlorid in 1 l H ₂ O lösen und autoklavieren
1 M IPTG	1 g / 4,1 ml H ₂ O, sterilfiltrieren, aliquotieren (2 ml Aliquot), Lagerung bei -20 °C
FACS	
FACS-Puffer:	PBA: PBS, 0,5 % BSA, 0,02 % Azid
Saponin-Puffer:	PBA, 0,5 % (w/v) Saponin
Lösung zur Fixierung von Zellen:	PBS, 2 % Paraformaldehyd
ELISA	
Waschpuffer:	0,05 % Tween 20 in PBS

Blockpuffer:	1 % BSA in PBS (IL-17 ELISA) 2 % BSA in PBS (TNF- α , IFN- γ ELISA)
Phosphat-Citrat Puffer:	0,2 M Dinatriumhydrogenphosphat 0,1 M Zitronensäure, ddH ₂ O
A) Bicarbonatpuffer	0,84 g NaHCO ₃ in 100 ml ddH ₂ O
B) Natriumphosphatpuffer	1,38 g NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O in 100 ml ddH ₂ O

4.1.4 Geräte

β -Szintillationszähler	Perkin-Elmer, Rodgau-Jügesheim
Durchflußzytometer LSR II	BD Biosciences, Heidelberg
<i>DiVa Software</i>	BD Biosciences, Heidelberg
<i>FlowJo Version 8</i>	Tree Star
<i>Graph Pad Prism</i>	Graph Pad, San Diego
ELISA Messgerät	SLT Spectra von Tecan, Berlin
ELISA Waschgerät	Tecan, Berlin
ELISA Platten	Nunc Maxisorb, Wiesbaden
Falcon-Zentrifugen	Megafuge 1.0R von Heraeus, (Rotor #2704), Heraeus Biofuge
CO ₂ -Inkubator	Heraeus, Hanau
Mikroskop	Zeiss, Jena
Sterilbank	HeraSafe von Heraeus, Hanau
Ultraschallgerät	BANDELIN electronics, Berlin

4.1.5 Antikörper

Antikörper für die Zellkultur

Tab. 1: Stockkonzentration und Herkunft der Antikörper

Antikörper	Klon
anti-Maus CD3	145-2C11, Hybridomaufreinigung
anti-Maus CD28	37.51, Hybridomaufreinigung

Antikörper für den ELISA

Tab. 2: Stockkonzentration und Herkunft der verwendeten Antikörper für den *ELISA*

Antikörper	Herkunft
IL-17, #840525 (<i>Capture Ab</i>)	R&D Systems
IL-17, #840526 (<i>Detection Ab</i>)	R&D Systems
IFN- γ , R4-6A2 (<i>Capture Ab</i>)	Immunotools
IFN- γ , XMG1.2 (<i>Detection Ab</i>)	Immunotools
IL-2, JES6-1A12 (<i>Capture Ab</i>)	Immunotools
IL-2, BAF401 (<i>Detection Ab</i>)	Immunotools
IL-6, MP5-20F3 (<i>Capture Ab</i>)	Immunotools
IL-6, MP5-32C11 (<i>Detection Ab</i>)	Immunotools

Antikörper für die durchflußzytometrische Analysen

Tab. 3: Antikörper spezifisch für murine Oberflächenmoleküle

Antikörper	Klon	Herkunft
anti-Maus CD3 PE	145-2C11	BD
anti-Maus CD4 PerCp	RM4-5	BD
anti-Maus CD25 APC	PC61	eBioscience
anti-Maus CD134 bio		BD
anti-Maus ICOS dig	MIC280	Robert-Koch-Institut Berlin (RKI)

Tab. 4: Antikörper für intrazelluläre FACS-Färbung

Antikörper	Klon	Herkunft
anti-Maus TNF- α APC	C15.6	BD
anti-Maus ICOS dig	12A7	RKI
anti-Maus IL-17 PE	TC11-18H10.1	BD

Tab. 5: Antikörper und Färbereagenzien

Antikörper		Herkunft
m-Fc γ -Rezeptor Block	2.4 G2/75	Hybridom
Rat IgG		Jackson ImmunoResearch
anti-dig FITC		Roche
APC Isotype	Rat IgG1	BD
PE Isotype	Rat IgG1	BD
Streptavidin APC		eBioscience

4.2 Methoden

4.2.1 Proteinbiochemie

Der mit dem Expressionsplasmid hG6PI_pQE100S (His-Tag N-terminal) transformierte *E.coli* Stamm BL21 wurde von David Schubert, DRFZ Berlin AG Prof. Kamradt, zur Verfügung gestellt .

Kultivierung von *E.coli* BL21

Für die Vorkultur wurden 100 ml LB-Medium mit Ampicillin (100 μ g / ml) und dem transformierten *E.coli* Stamm BL21 (DE3) kultiviert. Dazu wurde in den bei -70 °C gelagerten Kryostock gestochen, eine kleine Menge entnommen und angeimpft. Anschließend wurde die Kultur über Nacht bei 37 °C und 200 rpm kultiviert.

Expression der rekombinanten humanen G6PI

Prinzip

Das Plasmid pQE100S codiert ebenfalls für den *lac* Repressor, welcher nach Expression an den *lac*-Operator bindet und dadurch die Expression der durch den *lac*-Operator kontrollierten Gene inhibiert.

Um diese Inhibition aufzuheben wird Isopropyl-thio- β -D-Galactopyranosid (IPTG) hinzu gegeben. Durch die Bindung von IPTG an den Repressor findet eine Konformationsänderung statt, so dass der Repressor vom Operator dissoziiert und die codierte Sequenz G6PI exprimiert wird.

Experimentelle Umsetzung

Die über Nacht kultivierte Bakterienkultur wurde in 2 l LB-Medium / Ampicillin (100 μ g / ml) überführt und für circa eine Stunde im Schüttler (37 °C, 200 rpm) kultiviert, bis eine optische Dichte (OD) von 0,6 – 0,7, gemessen bei 600 nm, erreicht war. Anschließend wurde die Proteinexpression induziert, indem IPTG (Endkonzentration: 2 mM) zugesetzt wurde.

Nach einer weiteren Inkubation von drei Stunden (37 °C, 200 rpm) wurde die Bakteriensuspension zentrifugiert (GS-3-Rotor, 5000 rpm, 15 min), der Überstand verworfen und das Bakterienpellet bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20 °C eingefroren.

Aufreinigung der G6PI

Prinzip

Die Aufreinigung der im *E.coli* BL21 (DE3) überexprimierten G6PI erfolgte mittels Affinitätschromatographie an einer Ni-NTA Säule.

Bei diesem Verfahren ist eine Metall-komplexierende Gruppierung (NTA, Nitrilotriessigsäure) am Säulenmaterial immobilisiert. Multivalente Übergangsmetallionen (Ni^{2+}) werden in der Weise an die NTA gebunden, dass Koordinationsstellen für die Wechselwirkung mit basischen Gruppierungen, wie beispielsweise die Histidine im G6PI-His6-Fusionsprotein, vorhanden sind. Die Bindung ist reversibel und kann durch einen stärkeren Bindungspartner (Imidazol) verdrängt werden, was zur Elution des Proteins führt.

Experimentelle Umsetzung

Die gesamte Aufreinigung des Proteins wurde auf Eis bzw. bei 4 °C durchgeführt, um es vor Denaturierung und proteolytischem Abbau zu schützen.

Das eingefrorene Bakterienpellet wurde mit 20 ml Lysispuffer resuspendiert und mittels Ultraschall aufgeschlossen. Dazu wurde die Suspension fünf Mal im Wechsel 90 Sekunden lang mit Ultraschall (50 % Power, 70 % Cycles) behandelt und anschließend für 30 Sekunden gekühlt, was der thermischen Denaturierung des Proteins entgegenwirkt. Daraufhin wurde das Lysat für 45 Minuten zentrifugiert (SS-34-Rotor, 12000 rpm), um Zellfragmente zu pelletieren.

Nun wurde der Überstand mit Lysispuffer auf ein Volumen von 140 ml aufgefüllt und auf eine mit Lysispuffer äquilibrierte Ni-NTA-Säule (5 ml) gegeben.

Danach erfolgten das Waschen der Säule mit 150 ml Waschpuffer und die anschließende Elution des Proteins mit 40 ml Elutionspuffer.

Das Eluat wurde in einen vorher (in dH₂O) abgekochten Dialyseschlauch gegeben und über Nacht bei 4 °C gegen PBS (5 l) dialysiert.

Die Aufkonzentrierung des Proteins erfolgte mit Vivaspin (30.000 MWCO, Vivascience).

Die Konzentration der Proteinlösung wurde über das BCA Protein Assay Kit gemäß den Herstellerangaben bestimmt und auf 5 mg / ml (mit PBS) eingestellt.

Abschließend wurde die Lösung steril filtriert (0,2 µl), aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

4.2.2 Zellbiologische Methoden

Zellkultur

Die Isolierung der Zellen und deren Weiterbehandlung erfolgten stets unter sterilen Bedingungen. Alle Kulturen wurden dabei in komplettem Zellkulturmedium (KM) bei 37 °C in einer 5 % CO₂-Atmosphäre und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Zellgewinnung

Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet und mit Ethanol (70 %) angefeuchtet. Anschließend wurden Fell sowie Peritoneum durchschnitten und die Milz vorsichtig gelöst.

Alle folgenden Verarbeitungsschritte erfolgten unter der Sterilbank unter Verwendung von kaltem Medium und PBS.

Die Milz wurde mit einem Spritzenstempel durch ein Nygonsieb (70 μm) gedrückt und in 30 ml Kulturmedium aufgenommen. Die Milzzellen wurden nun zentrifugiert (Heraeus #2704, 1300 rpm, 6 min, 4 °C) und anschließend die Erythrozyten lysiert (siehe auch Erythrozytenlyse). Nach erneutem Waschen mit 20 ml KM wurde die Zellkonzentration bestimmt (vgl. Viabilitätstest) und die gewünschte Zellzahl eingestellt.

Erythrozytenlyse

Prinzip

Erythrozyten sind im Vergleich zu Leukozyten und allen anderen kernhaltigen Zellen gegen eine hypotone Lyse empfindlicher.

Experimentelle Umsetzung

Um eine Erythrozytenlyse durch zu führen, wurde das Pellet in Erythrozyten-Lysispuffer resuspendiert. Nach 1-2 Minuten wird die Reaktion durch Zugabe von 20 ml KM abgestoppt und die Zellen abzentrifugiert. Danach wurde das Pellet in KM aufgenommen.

Viabilitätstest

Prinzip

Trypanblau und 4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI) verfügen nicht über die Eigenschaft, intakte Membranen von lebenden Zellen zu durchdringen, jedoch Membranen von toten Zellen, was bei der Viabilitätstestung angewandt wird.

Experimentelle Umsetzung

Färbung mit Trypanblau:

10 μl einer Zellsuspension werden mit 90 μl Trypanblau-Lösung gemischt und auf eine Neubauer Zählkammer gegeben. Mittels Mikroskopie lassen sich tote Zellen (blau angefärbt) von lebendigen (ungefärbt) unterscheiden.

Die Zellzahl n der lebenden Zellen pro ml kann wie folgt berechnet werden:

Zellzahl / ml Zellsuspension =

n (Mittelwert eines Großquadrates) $\times 10^4$ (Volumenberechnung der Zählkammer) $\times 10$ (Verdünnungsfaktor)

Färbung mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI):

Bei der durchflusszytometrischen Analyse kann mit Hilfe von DAPI der Lebend-Tot-Ausschluss vorgenommen werden. Dieser erfolgt im FACS durch Färbung der toten Zellen, da nur deren Membranen von DAPI penetriert werden und die doppelsträngige DNA angefärbt wird.

Kurz vor der Messung wird der Farbstoff (0,5 µM) zur Probe zugesetzt.

Proliferationstest mit ³H-Thymidin

Prinzip

Die Grundvoraussetzung einer Zellteilung ist die Duplikation ihrer DNA.

³H-Thymidin ist ein radioaktiv markiertes Nukleotid, das in die DNA von Zellen eingebaut werden kann. Nach Zugabe von ³H-Thymidin in die Zellkultur über einen definierten Zeitraum und Extraktion der DNA können mittels Flüssigkeits-szintillationszähler die radioaktiven Zerfälle gemessen und somit eine Aussage über die Zellproliferation gemacht werden.

Experimentelle Umsetzung

Nachdem eine Einzelzellsuspension gewonnen und die Erythrozytenlyse durchgeführt wurde, erfolgte die Zellzählung, wobei die Einstellung der Zellzahl auf 1×10^6 Zellen / ml vorgenommen wurde.

Anschließend wurden je 100 µl der gewünschten Zellsuspension in Triplikaten in eine 96 Wellplatte ausgesät; mit 1 bzw. 10 µg / ml G6PI oder Medium (Negativkontrolle) stimuliert und für insgesamt 72 h bei 37 °C in einer 5 % CO₂-Atmosphäre inkubiert.

Daraufhin wurde in jedes Well 1 µCi ³H-Thymidin zugesetzt, für die letzten 12 bis 18 Stunden inkubiert und bei -80 °C eingefroren, bis sie vollständig durchgefroren waren. Anschließend wurde diese auf Filterplatten transferiert, Szintillationsflüssigkeit hinzu gegeben und die Radioaktivität mit Hilfe eines Szintillationsmeßgerätes gemessen.

Aus den gemessenen Werten in cpm (*counts per minute*) wurde der Stimulationsindex (SI) nach folgendem Vorgehen bestimmt:

$$SI = (\text{Mittelwert Triplikate} / \text{Probe}) / (\text{Mittelwert Triplikate} / \text{Negativkontrolle})$$

Diese Kenngröße gibt das Verhältnis der Proliferation von stimulierten Zellen zu unstimulierten an.

Gewinnung von Zellkulturüberständen

Für die Gewinnung von Überständen wurden Milzzellen auf eine Konzentration von 2×10^6 Zellen / ml eingestellt, je 1 ml der Einzelzellsuspension in eine 48 *Well*platte überführt und mit $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ G6PI stimuliert. Die Negativkontrollen blieben unstimuliert.

Nach einer Inkubation von 72 h ($37 \text{ }^\circ\text{C}$, 5 % CO_2 -Atmosphäre) wurden die Zellen abzentrifugiert, die Überstände geerntet und bei -80°C eingefroren.

Die Messung der Zytokine erfolgte mittels Zytokin-*ELISA* (siehe Zytokin-*ELISA*).

Isotypspezifischer ELISA gegen G6PI

Prinzip

Die Bestimmung der Konzentration von antigenspezifischen Antikörpern im Serum kann mit einem *ELISA* (**enzym-linked-immuno sorbent assay**) erfolgen. Die Technik des *ELISA*'s besteht in einer quantitativen Enzym-Antikörper-Bindung.

Um die antigenspezifischen Antikörper zu binden, wird das G6PI an die Oberfläche einer 96 *Well*platte gebunden. Die Isotypzusammensetzung der Seren wird anschließend durch die Bindung isotypspezifischer Antikörper gemessen. Die Detektion erfolgte durch Zugabe von Peroxidase gekoppelten Detektionsantikörper, welcher das Substrat *ortho*-Phenylendiamin (oPD) in Gegenwart von H_2O_2 umwandelt, so dass sich ein gelber Farbumschlag zeigt.

Die Menge des gebildeten Farbstoffs verhält sich direkt proportional zur Antikörperkonzentration im Serum. Die Farbreaktion wird bei 490 nm im *ELISA* Messgerät quantifiziert.

Experimentelle Umsetzung

96 *Well*platten (Nunc MaxiSorb) wurden mit $5 \mu\text{g} / \text{ml}$ G6PI in PBS beschichtet ($100 \mu\text{l} / \text{Well}$ Beschichtungslösung) und über Nacht bei 4°C inkubiert. Alle weiteren Inkubationen erfolgen in einer feuchten Kammer und bei Raumtemperatur.

Die Platten wurden dreimal mit Waschpuffer gewaschen und zur Verhinderung unspezifischer Bindungen mit 50 μl / Well 2 % BSA/PBS für 30 Minuten blockiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen wurden nun 50 μl / Well der Seren in verschiedenen Verdünnungen (1:100 – 1:409.600) oder Waschpuffer für die Negativkontrollen in Duplikaten auf die Platten aufgetragen und eine weitere Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Danach wurden die Platten gewaschen und 50 μl / Well des jeweiligen isotypspezifischen Antikörper Ziege-anti-Maus-IgG1, -IgG2a, -IgG2b, -IgG3 und IgM (Sigma, in Waschpuffer 1:1000 verdünnt) aufgetragen.

Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde und wiederholtem Waschen wurde ein POD gekoppelter Esel-anti-Ziege-IgG Antikörper (1:3000 in Waschpuffer) für die Detektion der isotypspezifischen Antikörper aufgetragen und für 15 Minuten inkubiert. Die Entwicklung des *ELISA* erfolgte nach nochmaligem Waschen mit dem Substrat *ortho*-Phenylendiamin (oPD). Dazu wurden 20 mg oPD in 10 ml Phosphat-Citrat-Puffer gelöst und 4 μl 30 % H_2O_2 hinzugegeben und je 50 μl in die 96 Wellplatte pipettiert.

Die entstandene Farbreaktion wurde nach etwa 20 Minuten mit 50 μl einer 1,5 M H_2SO_4 Lösung abgestoppt und die Absorption mit dem *ELISA* Messgerät bei 490 nm gemessen. Zur Auswertung wurde ein Grenzwert wie folgt definiert:

Mittelwert / Negativkontrolle + 2 x Standardabweichung und alle Werte oberhalb dieses Grenzwertes wurden als positiv definiert.

Die für jeden Isotyp höchste Verdünnungsstufe mit einem positiven Ergebnis wird angegeben.

Zytokin-ELISA:

Prinzip

Eine 96 Wellplatte wird mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper beschichtet und Standard sowie Überstände aufgetragen. Das vorhandene Zytokin kann an den auf der Platte verankerten Antikörper binden. Anschließend werden alle ungebundenen Partikel abgewaschen und ein spezifisch für das zu bestimmende Zytokin enzymgebundener Antikörper aufgetragen. Dann erfolgt das Auftragen des Substrates, das einen Farbumschlag katalysiert. Die Intensität des Farbumschlags

korreliert mit der Menge des gebundenen Antikörpers und Zytokins. Die Messung der optischen Dichte (OD) erfolgt im *ELISA* Messgerät.

Experimentelle Umsetzung

Die Zytokinkonzentration in den Zellüberständen (siehe Gewinnung von Zellkulturüberständen) wurde für IL-2, IL-6, IL-17 und IFN- γ bestimmt.

96 *Well*platten (Nunc MaxiSorb) wurden mit den in Tabelle 6 angegebenen *Capture*-Antikörpern in entsprechendem Beladungspuffern (siehe *ELISA*, 4.1.3) beladen (100 μ l / *Well*) und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Alle weiteren Inkubationen erfolgten in einer feuchten Kammer und bei Raumtemperatur.

Anschließend wurden die Platten dreimal mit Waschpuffer gewaschen und die unspezifischen Bindungsstellen mit 200 μ l / *Well* 2 % BSA/PBS für eine Stunde blockiert. Für den IL-17 *ELISA* wurde 1 % BSA/PBS benutzt.

Nach erneutem dreimaligen Waschen wurde der Standard in acht Konzentrationen (siehe Tabelle 7), sowie die Proben in Triplikaten (50 μ l / *Well*) auf die Platten aufgetragen und für zwei Stunden inkubiert.

Für die Detektion wurden die in Tabelle 6 genannten biotinylierten *Detektion*-Antikörper (50 μ l / *Well*) verwendet.

Nach zwei Stunden und wiederholtem Waschen wurde nun in jedes *Well* 50 μ l Streptavidin–Peroxidase (2 μ g / ml in PBS, 1% (w / v) BSA) pipettiert und für weitere 20 Minuten inkubiert.

Die Entwicklung des *ELISA*, sowie die anschließende Messung erfolgt entsprechend des Ablaufes des Isotypspezifischen *ELISA*'s (siehe oben). Anhand des linearen Abschnitts der Kurve aus der Standardverdünnungsreihe können aus allen OD Werten entsprechende Konzentrationen berechnet werden.

Tab. 6: Verwendete Antikörper und Puffer für die Zytokin-*ELISA*.

Buchstabe in Klammern gibt die Art des Beladungspuffers für den *Capture*-Antikörper an (siehe 4.1.3)

Zytokin	<i>Capture</i> -Antikörper	Konzentration (Beladungspuffer)	<i>Detection</i> -Antikörper	Konzentration
IL-2	JES6-1A12	1 µg / ml (B)	BAF401 (0,05µg / ml)	0,05 µg / ml
IL-6	MP5-20F3	2 µg / ml (A)	MP5-32C11 (0,25 ng / ml)	0,25 ng / ml
IL-17	#840525	2 µg / ml (PBS)	#840526	200 ng / ml
IFN-γ	R4-6A2	1 µg / ml (B)	XMG1.2 (0,5µg / ml)	0,5 µg / ml

Tab. 7: Standardkonzentrationen für die Zytokin-*ELISA*

Zytokin	Standardkonzentration	Verdünnungsfaktor
IL-2	1000 pg / ml	1:3
IL-6	2000 pg / ml	1:2
IL-17	1000 pg / ml	1:2
IFN-γ	3000 pg / ml	1:2

4.2.3 Durchflusszytometrie

In dieser Arbeit wurde die Durchflusszytometrie eingesetzt, um die Expression von Oberflächenmolekülen und die Zytokinproduktion zellspezifisch zu untersuchen.

Die zu bestimmenden Zytokine oder Oberflächenflächenmoleküle werden dazu mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern markiert, dessen Fluoreszenzintensität durchflusszytometrisch gemessen werden kann.

Die Färbung der Moleküle erfolgte in zwei verschiedenen Vorgehensweisen. Zum einen wurde der primäre selbstfluoreszierende Antikörper direkt zu den Zellen gegeben. Diese Methode wird daher als „direkt“ bezeichnet, wohingegen die Kopplung des primären Antikörpers an Biotin oder Digoxigenin (beide selbst nicht-fluoreszierend) und anschließende Färbung mit einem fluoreszierenden Sekundärantikörper, als „indirekte“ Methode bezeichnet wird.

Um Mehrfachfärbungen durchführen zu können, stehen unterschiedliche Farbstoffe wie FITC, PE oder APC zur Verfügung.

Die durchflusszytometrische Messung erfolgte im FACS, wo die Zellen einzeln in einem Flüssigkeitsstrom an drei Lasern (405 nm, 480 nm, 630 nm) vorbeigeführt werden. Das dabei detektierte optische Signal wird in ein elektrisches umgewandelt, welches mittels Datenverarbeitung (*DiVa Software*) grafisch dargestellt und statistisch ausgewertet wird.

Im LSR II wurden folgende Parameter laut Tabelle 8 festgelegt.

Tab. 8: Parameter am BD LSR II

Parameter		Ex (nm) _{max}	Em (nm) _{max}
<i>Forward Scatter (FSC)</i>	Streuung längs zum Lichtstrahl proportional zur Zellgröße	488	488
<i>Sideward Scatter (SSC)</i>	Streuung quer zum Lichtstrahl proportional zur Zellgranularität	488	488
FITC	Intensität von Fluoresceinisothiocyanat	495	519
PE	R-Phycoerythrin	480	578
PerCp	Peridinin Chlorophyllprotein	490	670
APC	Allophycocyanin	650	660
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid	360	460

Oberflächenfärbung

Die Präparation der Proben und die Oberflächenfärbung wurden in FACS-Puffer durchgeführt. Außerdem erfolgte nach jedem Waschschrift eine Zentrifugation (Heraeus #2704, 1300 rpm, 6 min, 4 °C). Alle anderen Schritte wurden auf Eis durchgeführt.

Etwa 4×10^6 Zellen / ml wurden in ein 5 ml FACS-Rundbodenröhrchen überführt und mit FACS-Puffer gewaschen. Danach wurde der Überstand verworfen und die Zellen resuspendiert. Um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden, wurden die Zellen mit 10 µg / ml α -Fc γ -Rezeptor Antikörper und 10 µg / ml Ratten-IgG für zehn Minuten auf Eis inkubiert. Im Folgenden wurden die Primärantikörper (aufgenommen in FACS-Puffer) zupipettiert und für zehn Minuten in der jeweiligen titrierten Konzentration inkubiert.

Primärantikörper binden spezifisch an die Oberflächenmoleküle, wobei die eingesetzte Menge für jeden Antikörper charakteristisch ist. Kam die „indirekte“ Färbemethode zur Anwendung, wurde wie folgt verfahren:

Nach einem wiederholten Waschschrift wurde der Sekundärantikörper in der entsprechenden Konzentration zugegeben und erneut für zehn Minuten inkubiert.

Danach wurde analog für beide Methoden der überschüssige Antikörper durch Waschen entfernt und die Zellen in 300 μ l FACS-Puffer aufgenommen.

Anschließend erfolgte die Messung im BD LSR II und die Datenverarbeitung mit Hilfe der *FlowJo-Software*. Tote Zellen wurden durch die Zugabe DAPI ausgeschlossen.

Daraufhin erfolgte die Auswertung mit Hilfe der *FlowJo Software*. Zur Verdeutlichung ist diese in Abbildung 4 beispielhaft dargestellt.

Die Lymphozytenpopulation wurde zuerst über die Parameter Größe und Granularität eingegrenzt. In einer zweidimensionalen Darstellung der Vorwärts- und Streulichteigenschaften, dem so genannten *FSC–SSC Dotplot*, ist dieser Vorgang verdeutlicht (Abb. 4a). Die verschiedenen Farben zeigen eine unterschiedliche Zelldichte an, wobei blau nur sehr wenige Zellen und rot hohe Zellzahlen repräsentiert. Die Eingrenzung der Zellpopulationen mit Lymphozytenmorphologie ist an Hand der pinken Linie gezeigt und ausschließlich die Zellen innerhalb dieser Grenze werden im Folgenden näher betrachtet: Da tote Zellen (DAPI⁺) in der Lage sind fluoreszierende Antikörper unspezifisch zu binden, was die Ergebnisse verfälschen würde, werden diese im weiteren Verlauf der Analyse ausgegrenzt (Abb. 4b). In der Abbildung 4c ist die Fluoreszenzintensität für die Färbung mit anti-CD3 und anti-CD4⁺ Antikörper gezeigt. Hierbei wurden die doppelt positiven CD4⁺ T-Zellen eingegrenzt und weiterhin in Abbildung 4d dargestellt. Die ICOS Expression dieser CD4⁺ Zellen wurde gezeigt, wobei hier das pinke Quadrat ausschließlich ICOS⁺ Zellen anzeigt und die Prozentzahl der ICOS⁺ Zellen angegeben wurde. In der Abbildung 4e sind dieselben CD4⁺ T-Zellen dargestellt, wobei nun ICOS und CD25 Expression aufgetragen sind. Die Auswertung erfolgte in diesem Fall mit Hilfe der dargestellten Quadranten, wobei die Zahlen die jeweilige Verteilung als Prozentwerte angeben. Eine identische Darstellung einer Kontrollfärbung, mit deren Hilfe die Grenzen der Quadrantwerte festgelegt wurden repräsentiert die Abbildung 4f.

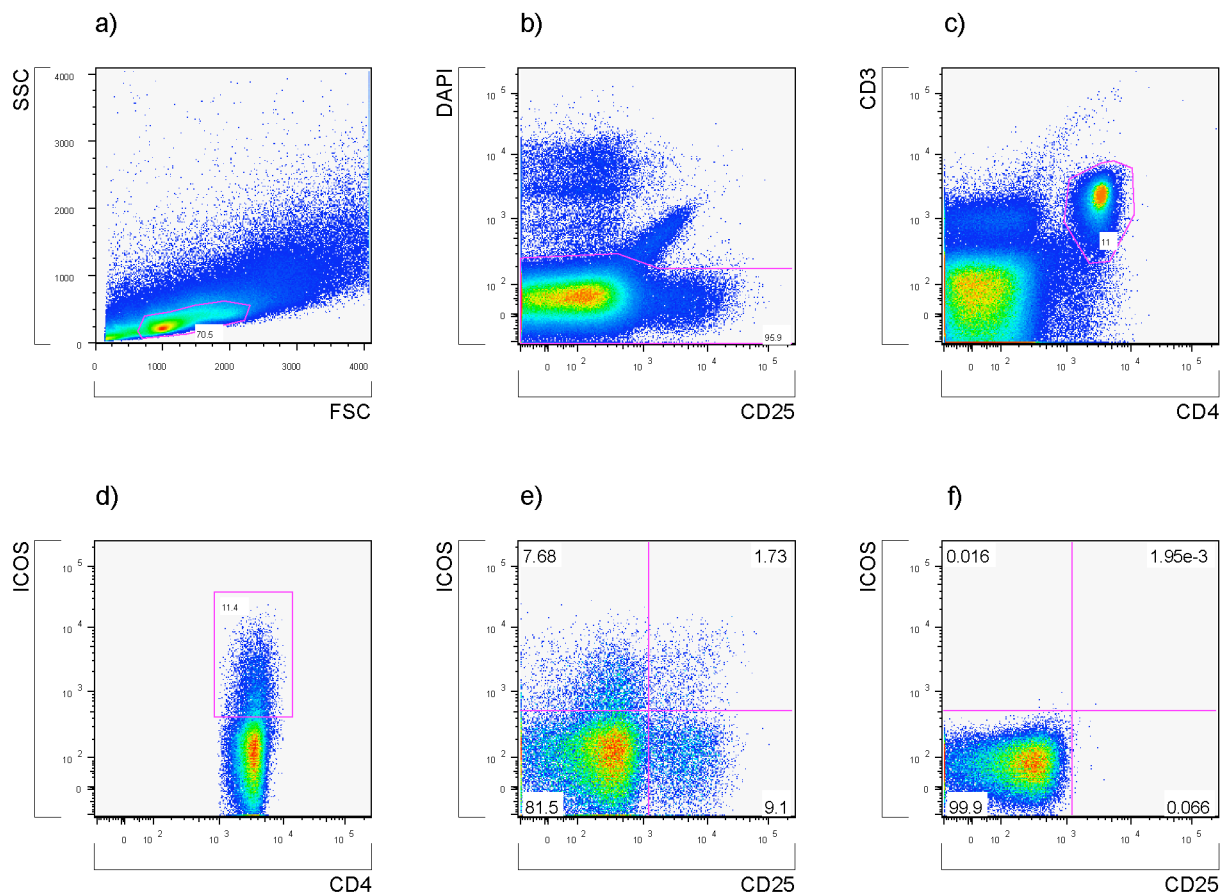


Abb. 4: Auswertung durchflusszytometrischer Messungen. Abbildung 4a-f zeigt unterschiedliche grafische Darstellungen einer durchflusszytometrischen Messung. Die obere Reihe zeigt die Eingrenzungsstrategie der $CD4^+$ T-Zellen, welche in der unteren Reihe dargestellt sind. Die x- und y-Achsen zeigen unterschiedliche Messparameter wie in der Achsenbeschriftung angegeben.

Intrazelluläre Färbung

Um Zytokine effizient anfärben zu können, sind einige Vorbereitungsmaßnahmen nötig. Da Antikörper nicht in der Lage sind Membranen zu durchdringen und Zytokine erst in der Zelle angereichert werden müssen, gehen der eigentlichen Färbung folgende Schritte voraus:

Stimulation und Fixierung der Zellen

Je 4×10^6 Zellen / ml der gewünschten Zellsuspension wurden in eine 12 Wellplatte überführt und mit $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ G6PI bzw. mit $3 \mu\text{g} / \text{ml}$ α -CD3 und $2,5 \mu\text{g} / \text{ml}$ α -CD28 versetzt und in Summe sechs Stunden stimuliert.

Nach zweistündiger Stimulation wurde in jedes *Well* Brefeldin A (5 μg / ml) zugegeben, um den Export der Zytokine zu hemmen. Im Folgenden wurden die Zellen in FACS-Rundbodenröhrchen überführt, zentrifugiert und in PBA gewaschen. Nach der Oberflächenfärbung erfolgten ein Waschschrift mit PBS und die anschließende zwanzigminütige Fixierung der Zellen mit Paraformaldehyd auf Eis. Danach wurden die Zellen wiederholt mit PBS gewaschen.

Permeabilisierung und Färbung

Zur Permeabilisierung wurden die Zellen mit Saponinpuffer gewaschen, wodurch eine Färbung der Zytokine möglich wurde. Die weiteren Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Proben wurden in Saponinpuffer bei 1300 rpm für sechs Minuten zentrifugiert (Heraeus #2704, 4 °C).

Auch hier war es notwendig unspezifische intrazelluläre Bindungsstellen mit 10 μg / ml $\alpha\text{-Fc}\gamma\text{-Rezeptor}$ Antikörper und 10 μg / ml Ratten-IgG zu blocken. Die Inkubationszeit betrug ebenfalls zehn Minuten.

Identisch zur Oberflächenfärbung wurden nun die Zellen mit den Primärantikörpern in der jeweiligen Konzentration für zehn Minuten inkubiert, anschließend gewaschen und je nach Methode, der Sekundärantikörper in Saponin suspendiert, hinzugefügt. Abschließend wurden die Zellen gewaschen, in 300 μl FACS-Puffer aufgenommen und im BD LSR II gemessen.

Da intrazelluläre Färbungen ein höheres Risiko für Färbeartefakte bergen, wurde bei jeder Färbung eine Isotypkontrolle mitgeführt. Bei dieser Isotypkontrolle handelt es sich um einen Antikörper, der den gleichen Isotyp wie der entsprechende Färbeantikörper besitzt sowie mit einem identischen Fluorochrom in einem gleichen Kopplungsverhältnis gekoppelt wurde. Somit ist dieser Antikörper bis auf die Epitoperkennung identisch mit dem Färbeantikörper und kann folglich unspezifisch genau so gut binden wie dieser. Die Färbeeigenschaften des Isotypantikörpers konnten genutzt werden, um die Spezifität der Zytokinfärbung zu beurteilen. Die Auswertung erfolgte entsprechend der Oberflächenfärbung mit der Ausnahme, dass nach Permeabilisierung der Zellmembran kein Lebend-Tot Ausschluss mehr durchgeführt wurde. Eine Färbung der Isotypkontrollen ist beispielhaft in Abbildung 14c dargestellt.

Die graphische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Programme *Sigma Plot* und *Graphpad Prism*. Auch die Signifikanzen wurde in *Graphpad Prism* berechnet (*two-tailed* Mann-Whitney-Analyse).

4.2.4 Tierversuche

Die in dieser Arbeit vorgenommenen Versuche an lebenden Tieren entsprachen den Institutsrichtlinien und folgten den staatlichen Gesetzen (G 02-24/04).

Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Die Tierexperimente wurden mit 8-10 Wochen alten DBA/1 Mäusen aus dem Institut für Versuchstierkunde (IVTK) im Forschungszentrum Lobeda in Jena durchgeführt. Die Haltung erfolgte unter standardisierten Bedingungen. Alle Manipulationen der Versuchstiere wurden nur von dafür qualifiziertem Personal durchgeführt.

Immunisierung

Zur Induktion der Arthritis wurden DBA/1 Mäuse am Tag 0 subkutan mit 400 µg G6PI in komplettem Freundschens Adjuvanz (CFA) immunisiert. Die finale Menge des Antigens wurde mit CFA im Verhältnis 1:1 gemischt und mittels Ultraschall emulgiert. Je 100 µl der Emulsion wurde an der desinfizierten Schwanzbasis beidseitig subkutan injiziert.

Beurteilung der Schwere der Arthritis

Die Schwere der Arthritis erfolgte durch visuelle Inspektion der Pfoten. Dabei wurde jede Pfote nach dem Grad der Schwellung und Rötung auf einer Scala von 0 bis 2 beurteilt, wobei 0, keine Anzeichen von Schwellung und Rötung, und 2, maximale Schwellung und Rötung bedeutete. Die Fotos in Abbildung 5 sind repräsentativ für die Scores 0, 1 und 2. Die Einzelwerte der Pfoten wurden addiert, so dass man eine Maximalpunktzahl von 8 pro Maus erhielt.



Abb. 5: Arthritisinduktion bei DBA/1 Mäusen. DBA/1 Mäuse wurden mit G6PI oder PBS immunisiert und 15 Tage später wurden die Hinterpfoten fotografiert. Die Abbildung zeigt beispielhaft ein unverändertes Bein nach PBS Immunisierung (links), Score 0, sowie nach Immunisierung mit GPI ein mäßig entzündetes Bein (mitte), Score 1 und ein massiv entzündetes Bein (rechts), Score 2.

Behandlungsschema

Die immunisierten Mäuse wurden randomisiert aufgeteilt und an den Tagen 2, 4 und 6 bzw. 13, 15, 17 mit je 100 µg anti-ICOSL (in 200 µl PBS) behandelt. Die Kontrollgruppe erhielt eine Injektion mit PBS. Die Injektionen erfolgten intraperitoneal.

Histologie

An den entsprechenden Tagen wurden die Mäuse für die histologische Untersuchung durch zervikale Dislokation getötet. Die Tiere wurden mit 70 %igem Ethanol besprüht und seziiert. Dabei wurde das Fell von den Vorder- und Hinterpfoten entfernt und die Pfoten in eine 5 %ige Formalinlösung überführt. Die gesamte weitere Aufarbeitung erfolgte durch Frau Gabriele Fernahl am Institut für Pathologie der Charité, Universitätsmedizin Berlin. Die Begutachtung erfolgte verblindet durch Herrn Dr. Lars Morawietz. Der Arthritisgrad wurde für jede Pfote individuell bestimmt und konnte den Maximalwert 4 erreichen. Die Werte wurden dann für die vier Pfoten der Maus addiert, so dass maximal 16 histologische Scorepunkte erreicht werden konnten. Betrachtet wurden die Kriterien Synovitis, Tenosynovitis, Periarthritis, Periostitis und Destruktion. Der Normalbefund ergab den Wert 0, mit 1 bis 4 entsprachen graduell abgestuft leichten, mittelschweren, schweren und schwersten Veränderungen.

Serumgewinnung

Zur Serumgewinnung wurde aus der rechten Herzkammer einer durch Diethylether getöteten Maus Blut entnommen und dieses anschließend für 30 Minuten bei Raumtemperatur zur Gerinnung stehen gelassen. Nachfolgend wurde das Serum 15 Minuten zentrifugiert (Heraeus Biofuge, 13000 rpm), der Überstand abgenommen und eingefroren (-20 °C).

5 Ergebnisse

5.1 Klinischer Verlauf der G6PI induzierten Arthritis nach anti-ICOSL Behandlung

Aus Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe ist bekannt, dass $CD4^+$ T-Zellen eine entscheidende Rolle im Krankheitsverlauf der G6PI-induzierten Arthritis spielen (Schubert et al. 2004). Ziel meiner Untersuchungen sollte es sein, die Bedeutung des von aktivierten $CD4^+$ T-Zellen exprimierten kostimulatorischen Moleküls ICOS zu analysieren.

Zu diesem Zweck wurde die ICOS-ICOSL Interaktion mit einem gegen ICOSL gerichteten monoklonalen Antikörper (MIL 5733) blockiert. Zunächst habe ich die Wirkung der ICOSL-Blockade auf den klinischen Verlauf der G6PI-induzierten Arthritis untersucht. Dazu wurden ein präventiver und ein therapeutischer Ansatz gewählt. Zur Untersuchung, ob eine ICOSL-Blockade die G6PI-Arthritis verhindern kann, wurde die erste Versuchsgruppe (vier DBA/1 Mäuse) am Tag 0 mit G6PI immunisiert und am Tag 2, 4 und 6 präventiv mit je 100 μ g anti-ICOSL Antikörper i.p. behandelt. In der zweiten Versuchsgruppe wurde mit der anti-ICOSL Antikörper Behandlung von fünf Tieren erst am Tag 13, also nach Beginn der klinischen Manifestationen der Arthritis begonnen, um den therapeutischen Effekt von ICOS zu untersuchen. Die Mäuse dieser Gruppe wurden dreimal mit jeweils 100 μ g anti-ICOSL Antikörper jeden zweiten Tag behandelt (Abb. 6). Die ebenfalls mit G6PI immunisierte Kontrollgruppe aus fünf Mäusen erhielt keine weitere Behandlung. Alle Tiere der Kontrollgruppe (Kreise) zeigten neun Tage nach der Immunisierung erste Schwellungen und Rötungen an einzelnen Pfoten (Abb. 6a). In den folgenden Tagen nahmen die Schwellungen und Rötungen an allen vier Pfoten stark zu und erreichten am Tag 15 ihr Maximum. Die Schwere der Entzündung blieb bis zum Tag 29 auf diesem hohen Niveau. Im weiteren Verlauf verringerte sich die Schwellung kontinuierlich. Selbst am Tag 40 waren noch Anzeichen von Schwellung und Rötung an einzelnen Pfoten zu beobachten.

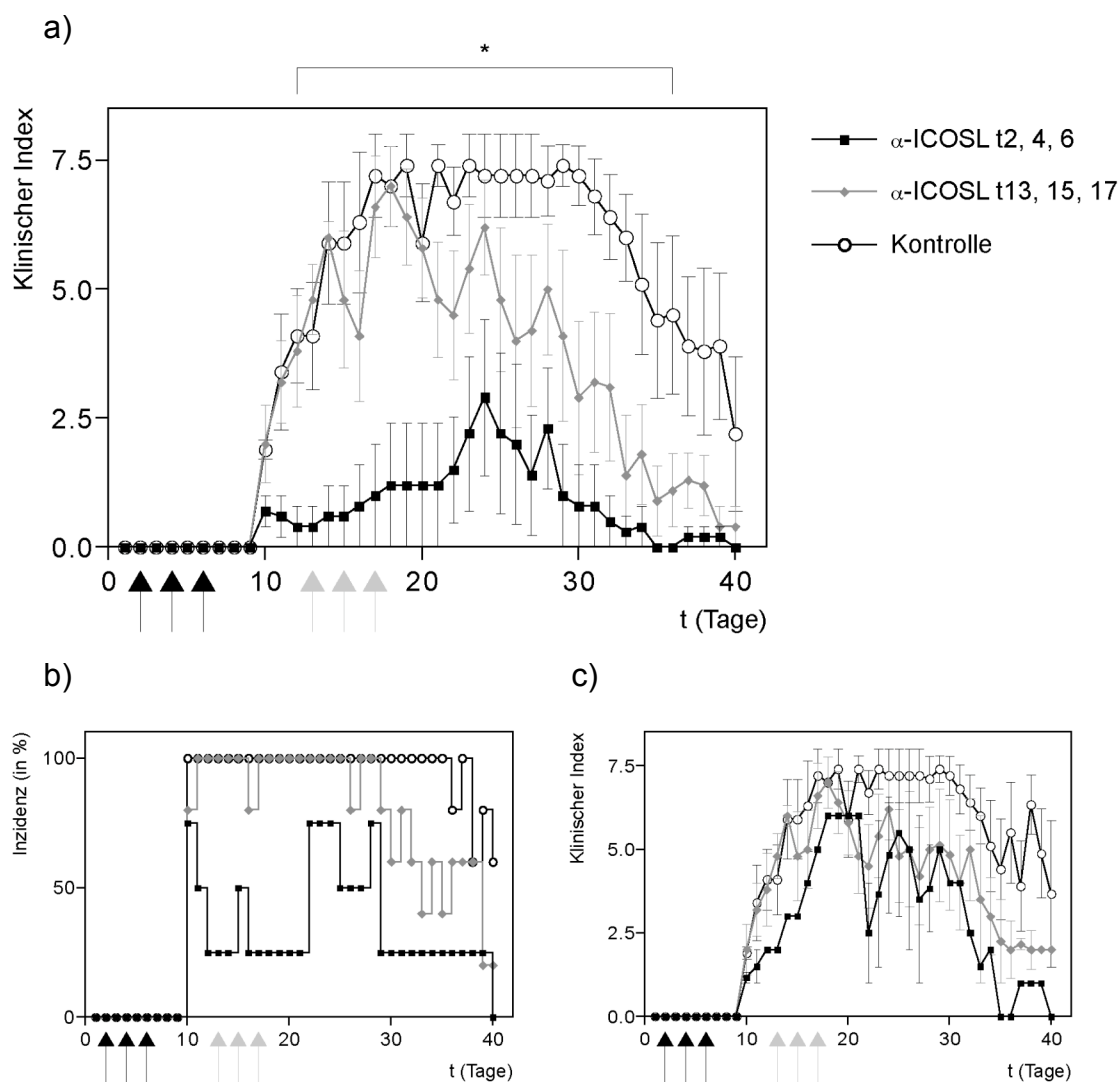


Abb. 6: Einfluss von anti-ICOSL Antikörper auf den Verlauf der G6PI induzierten Arthritis. DBA/1 Mäuse wurden mit G6PI in CFA immunisiert und über 40 Tage beobachtet. Drei Gruppen von je fünf Mäusen blieben entweder unbehandelt (Kreise) oder wurden mit 100 μ g anti-ICOSL Antikörper an den Tagen 2, 4 und 6 (gefüllte Quadrate) bzw. 13, 15, 17 (graue Diamanten) behandelt.

In Abb. 6a) ist die Pathogenese für alle Tiere als klinischer Index (y-Achse) im Tagesverlauf (x-Achse) dargestellt. Die Unterschiede zwischen den früh behandelten Tieren und der Kontrollgruppe sind zwischen Tag 12 und 36 statistisch signifikant ($p \leq 0,05$) und werden durch * markiert. Abb. 6b) zeigt die Inzidenz (Krankheitshäufigkeit) für die in a) dargestellten Tiere. Die Gesamtzahl der Tiere wird gleich 100 gesetzt und die erkrankten Tiere anteilig in Prozent dargestellt (y-Achse). Abb. 6c) zeigt den klinischen Verlauf (Index auf der y-Achse) für die erkrankten Tiere.

Die präventiv an den Tagen 2, 4 und 6 behandelte Versuchsgruppe (schwarze Vierecke) zeigte bis zum Tag 15 sehr geringe Anzeichen von Rötung und Schwellung. Erst nach Tag 20 stieg die Verlaufskurve leicht an, der mittlere klinische Schweregrad dieser Gruppe erreichte aber nie einen Scorewert über 3. Nach Tag 30 waren kaum noch Schwellung und Rötung zu sehen.

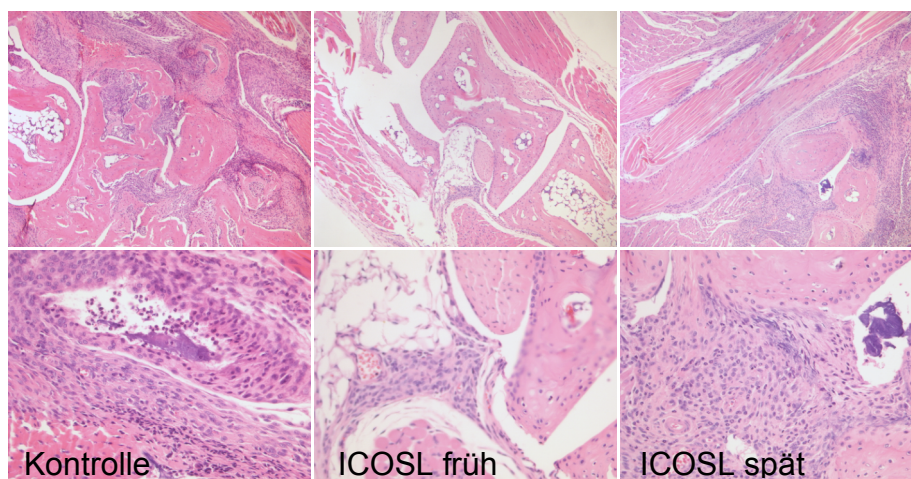
Die klinischen Verläufe zwischen der präventiv behandelten Gruppe und der Kontrollgruppe zeigten im Mann-Whitney Test signifikante Unterschiede (p -Wert $\leq 0,05$) von Tag 12 bis 36. Bei den Mäusen, die nach Beginn der Arthritis mit anti-ICOSL Antikörper behandelt wurden (graue Diamanten), zeigte sich ein therapeutischer Effekt der Behandlung: Am Tag 20 war ein massiver Rückgang des klinischen Scores nachweisbar. Im weiteren Verlauf nahm die Schwellung und Rötung in dieser Gruppe stärker ab als bei den Kontrolltieren, so dass am Tag 39 der Ausgangswert annähernd erreicht wurde. Abbildung 6b zeigt die Inzidenz der Arthritis der verschiedenen Gruppen. Die therapeutischen Effekte der spät behandelten Gruppe lieferten keine signifikanten Unterschiede (p -Wert $> 0,05$).

In der Abbildung 6b ist die Krankheitshäufigkeit (Inzidenz) im Zeitverlauf dargestellt. Von Tag 10 bis Tag 35 lag die Inzidenz in der Kontrollgruppe bei 100 %. Nur eines von vier Tieren (25 %) war über den gesamten Krankheitszeitraum in der früh behandelten Gruppe klinisch auffällig, während zwei weitere Tiere nur in der dritten Woche Krankheitszeichen aufwiesen. In den ersten zwei Wochen der Krankheitsphase sind fast alle der therapeutisch behandelten Tiere erkrankt. Von diesen Tieren gesundeten einige schneller, so dass ab Tag 30 zumeist nur noch drei von fünf Tieren erkrankt waren. Die Abbildung 6c zeigt im Gegensatz zu 6a ausschließlich die klinischen Verläufe der erkrankten Tiere. Die größten Unterschiede im Vergleich zur Abbildung 6a zeigt die präventiv behandelte Gruppe, da hier zu den meisten Zeitpunkten nur ein Tier relativ stark erkrankt ist.

5.2 Histologischer Verlauf der G6PI induzierten Arthritis nach anti-ICOSL Behandlung

Neben dem klinischen Verlauf wurde die Entwicklung der Arthritis am Tag 12 und 40 histologisch untersucht. Je nach Schweregrad wurden Werte von 0 bis 4 für jede einzelne Pfote vergeben und addiert, so dass sich eine Gesamtsumme von 16 pro Maus ergab. Der Wert 0 steht für keinerlei Anzeichen von Entzündung oder Destruktion, während 1 eine leichte, 2 eine mittelgradige, 3 eine schwere und 4 eine massive Entzündung und Destruktion darstellte.

a)



b)

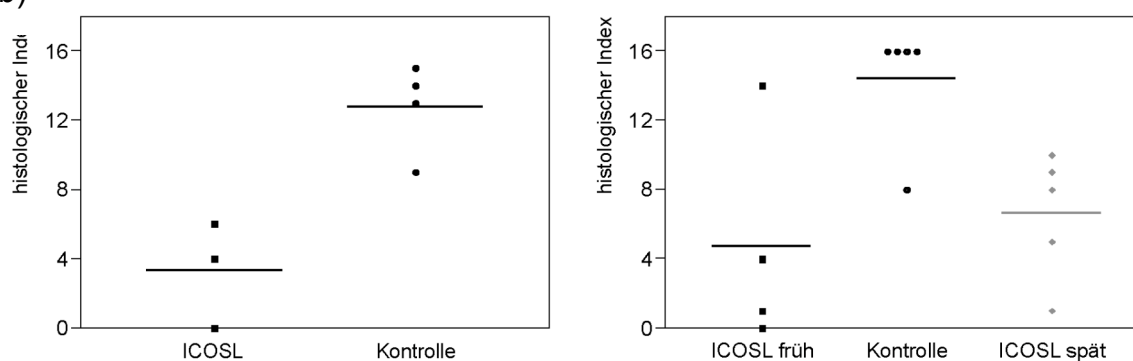


Abb. 7: Histologischer Verlauf der G6PI induzierten Arthritis. DBA/1 Mäuse wurden mit G6PI in CFA immunisiert und wie in Abb. 6 beschrieben mit anti-ICOSL Antikörper behandelt. Die Pfoten wurden für die histologische Beurteilung präpariert und nach den im Methodenteil beschriebenen Kriterien von einem erfahrenen Pathologen verblindet begutachtet. a) zeigt exemplarisch die HE gefärbten Schnitte (Tag 40) in den Vergrößerungen 50x (obere Reihe) und 200x (untere Reihe). Links wird eine Maus der Kontrollgruppe gezeigt, in der Mitte ein Tier der früh anti-ICOSL behandelten Gruppe und rechts ein spät behandeltes Tier. In b) sind die evaluierten Scorewerte grafisch für die Tage 12 (links) und 40 (rechts) dargestellt. Dabei repräsentiert jedes schwarze Quadrat eine anti-ICOSL Antikörper früh behandelte Maus, jeder Kreis ein Tier der Kontrollgruppe, während die grauen Diamanten Tiere der spät behandelten Gruppe darstellen. Die berechneten Mittelwerte werden durch die schwarzen Balken angezeigt.

In Abbildung 7a sind repräsentative Gewebeschnitte von entzündeten Gelenken 40 Tage nach der Immunisierung mit G6PI abgebildet. Bereits in der Übersichtsvergrößerung wird deutlich, dass das Kontrolltier im Vergleich mit den behandelten Tieren ein stärkeres entzündliches Infiltrat zeigt. Auch der Grad der Gelenksdestruktion war in der Maus der Kontrollgruppe schwerer als in den anti-ICOSL behandelten Tieren. Die Abbildung 7b zeigt die Graduierung der histologischen Veränderungen am Tag 12 und 40, wobei die späte

Behandlungsgruppe am Tag 12 unberücksichtigt blieb, da hier die Behandlung erst am Tag 13 begann.

Die behandelte Gruppe zeigte am Tag 12 im Mittel einen deutlich geringeren Score von 4 im Vergleich zu Kontrollgruppe, bei der der Mittelwert bei ungefähr 12 lag. Für Tag 40 zeigte sich ein vergleichbares Bild. Die anti-ICOSL Antikörper behandelten Tiere wiesen einen gemittelten Wert von annähernd 4 auf, hingegen erreichten vier Tiere der Kontrollgruppe den Maximalwert von 16, bei einem gemittelten Wert von ungefähr 14. Die fünf Tiere der spät behandelten Gruppe zeigten bei einer relativ breiten Streuung einen Mittelwert von annähernd 7.

5.3 Oberflächenexpression von ICOS, CD25 und CD134

Nach der Antigenerkennung wurden einige Oberflächenmoleküle von CD4⁺ T-Zellen verstärkt exprimiert, welche folglich zur Charakterisierung des Aktivierungszustandes dienen können. Da es neben Publikationen zur Rolle von ICOS im Modell der Rheumatoiden Arthritis auch zu CD25 und CD134 Untersuchungen gibt, wurden exemplarisch diese Moleküle ausgewählt. Die Oberflächenexpression dieser Moleküle wurde im Zeitverlauf durchflusszytometrisch analysiert, um zu untersuchen, ob die anti-ICOSL Blockade Einfluss auf die Expressionsstärke hat.

Die Abbildung 8a zeigt beispielhaft die Expression von ICOS mit CD25 oder CD134 am Tag 9. Die *Dotplots* der oberen Reihe zeigen das Messergebnis für eine Milzzellfärbung von ICOS zusammen mit CD25. Es ist exemplarisch die Zellfärbung einer behandelten Maus (links) und eines Kontrolltieres (rechts) aus einer Gruppe von je sechs Tieren gezeigt. Hier und im folgenden Textverlauf meint „Behandlung“ die Applikation von jeweils 100 mg anti-ICOSL Antikörper an den Tagen 2, 4 und 6. Die CD4⁺ T-Zellen der mit anti-ICOSL Antikörper behandelten Maus exprimierten ebenso wie die des Kontrolltieres ungefähr 10 % ICOS und CD25. Bei beiden Tieren gab es nur einen kleinen Teil (ca. 2 %) von ICOS und CD25 doppelt positiven Zellen. In der unteren Reihe wurde exemplarisch die Expression von ICOS und CD134 dargestellt. Weniger als 4 % der Zellen exprimierten CD134 und hiervon waren ungefähr die Hälfte der Zellen doppelt positiv für ICOS und CD134.

Die Mittelwerte der Oberflächenexpression wurden aus je sechs Mäusen errechnet und sind in der Abbildung 8b (\pm SEM) dargestellt.

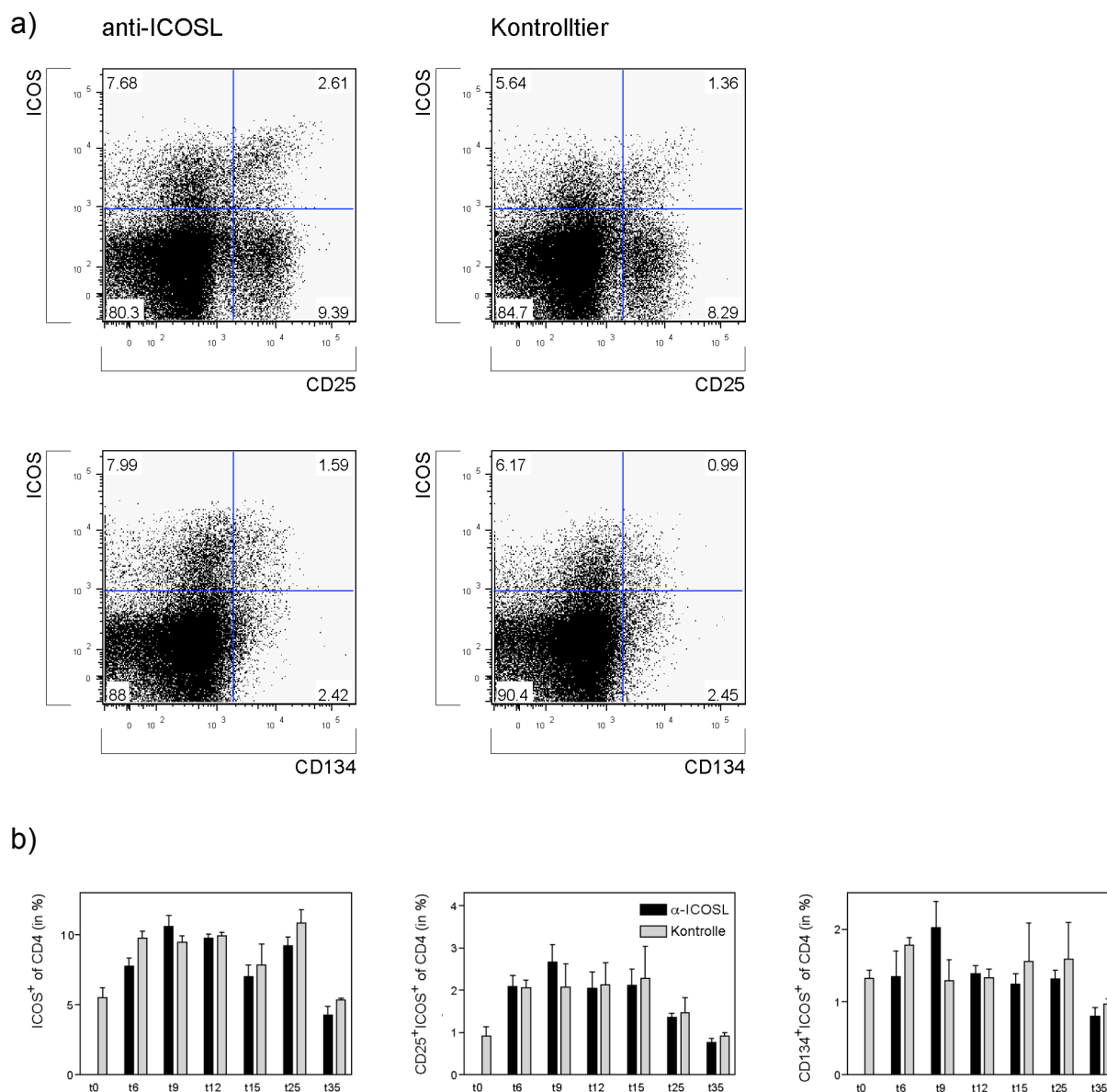


Abb. 8: Oberflächenexpression von CD25, ICOS und CD134. a) Milzzellen wurden aus präventiv behandelten anti-ICOSL Antikörper und unbehandelten Mäusen isoliert und mit anti-CD4 Antikörper, anti-CD25 und anti-ICOS Antikörper gefärbt. Die DAPI negativen Zellen wurden, wie im Methodenteil beschrieben, eingegrenzt. Dargestellt sind nur die CD4⁺ T-Zellen.

Gezeigt ist beispielhaft die Expression von ICOS auf der y-Achse und CD25 (obere Reihe) bzw. CD134 (untere Reihe) auf der x-Achse für ein anti-ICOSL behandeltes Tier auf der linken Seite und ein Kontrolltier auf der rechten.

b) Die Ergebnisse der unter 8a exemplarisch gezeigten Oberflächenfärbungen von je mindestens drei Mäusen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten (x-Achse) gemessen und zusammengefasst \pm SEM dargestellt.

Die Prozentzahlen der ICOS⁺ (links), der ICOS⁺CD25⁺ (mitte) und der ICOS⁺CD134⁺ (rechts) positiven CD4⁺ T-Zellen sind auf der y-Achse dargestellt.

In Abbildung 8b ist im linken Balkendiagramm die ICOS Expression auf CD4⁺ T-Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten (x-Achse) dargestellt. Der Anteil ICOS positiver Zellen in unbehandelten Mäusen liegt bei annähernd 5 %. Zwischen Tag 9 und Tag 25 stieg die Expression von ICOS auf ca. 10 % an, wobei kein Unterschied zwischen den ICOSL behandelten Mäusen und den Kontrolltieren messbar war. Am Tag 35 wurde in beiden Gruppen das Ausgangsniveau wieder erreicht.

In der mittleren und rechten Abbildung sind die CD25⁺ICOS⁺ und CD134⁺ICOS⁺ doppelt positiven CD4⁺ T-Zellen zu den auf der x-Achse angegebenen Zeitpunkten dargestellt. Als Ausgangswert wurde eine geringe Menge von unter 1 % ICOS⁺CD25⁺ und 1,3 % ICOS⁺CD134⁺ Zellen gemessen. Nach Immunisierung verdoppelte sich der Ausgangswert der CD25⁺ICOS⁺ doppelt positiven Zellen zwischen Tag 6 und Tag 15, was auf eine T-Zellaktivierung hindeutet. Bis zum Tag 35 nahm die Anzahl der ICOS⁺CD25⁺ CD4⁺ T-Zellen ab, bis das Ausgangsniveau wieder erreicht wurde. Die Menge der CD134⁺ICOS⁺ positiven CD4⁺ T-Zellen blieb an allen untersuchten Zeitpunkten relativ gleich.

5.4 Nachweis G6PI spezifischer Antikörper

Da eine frühe anti-ICOSL Blockade zu einem deutlich milderen Verlauf der Arthritis führte, sollte im Folgenden eine potentielle Beteiligung der B-Zellantwort an den immunologischen Mechanismen untersucht werden.

Es ist bekannt, dass eine Population von T-Helferzellen, die ICOS⁺ Tfh-Zellen, eine wichtige Rolle beim Klassenwechsel der von den B-Zellen produzierten Antikörper spielen. Daher habe ich die Antikörperantwort gegen G6PI gemessen (Abb. 9). Dazu wurden zehn DBA/1 Mäuse mit G6PI immunisiert. Fünf von ihnen wurden behandelt, die anderen erhielten keine weitere Behandlung.

Das an Tag 12 gewonnene Serum wurde auf die Anwesenheit von G6PI spezifischen Antikörpern im *ELISA* getestet. Zu diesem Zweck wurden die Seren seriell verdünnt und auf die mit G6PI gekoppelten *ELISA* Platten gegeben. Mit isotypspezifischen Antikörpern konnte anschließend der höchst verdünnte Titerwert von IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 und IgM bestimmt werden, der oberhalb der Nachweisgrenze lag. Die Abbildung 9 zeigt zusammengefasst die Mittelwerte der isotypspezifischen G6PI Antikörpertiter der behandelten und unbehandelten Gruppe am Tag 12.

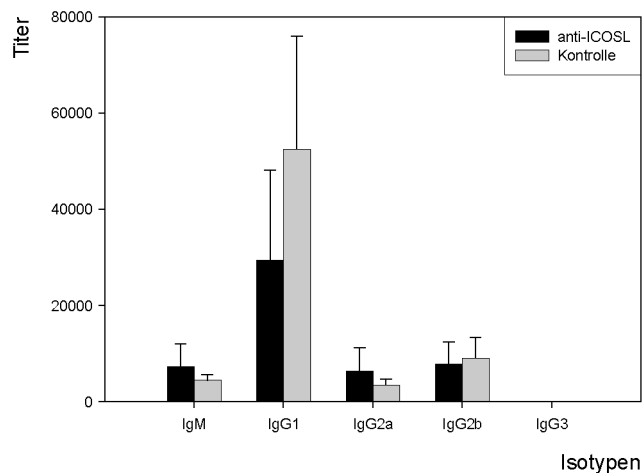


Abb. 9: Isotypspezifische Antwort gegen G6PI in DBA/1 Mäusen nach anti-ICOSL Antikörper Behandlung. DBA/1 Mäuse wurden mit G6PI immunisiert und entweder mit anti-ICOSL Antikörper (t2, t4, t6; schwarze Balken) behandelt oder blieben unbehandelt (graue Balken). Zwölf Tage nach Immunisierung wurde von allen Mäusen Serum gewonnen, seriell verdünnt und im *ELISA* die G6PI Antikörpertiter für IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 und IgM (x-Achse) gemessen. Auf der y-Achse ist die höchste Serumverdünnung, bei der anti-G6PI Antikörper detektierbar waren, dargestellt. Die Antikörpertiter der unterschiedlichen Isotypen wurden als Mittelwert von je fünf Tieren \pm SEM berechnet. Die gezeigten Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Die höchsten Antikörpertiter wurden bei IgG1 gemessen, wobei in der behandelten Gruppe (schwarze Balken) ein mittlerer Titerwert von circa 1:30000 erreicht wurde. In der Kontrollgruppe (graue Balken) lag der maximale mittlere Titerwert bei circa 1:50000. Die anti-IgG2b Titer lagen bei mindestens 1:7500 während für anti-IgM und anti-IgG2a ein niedrigerer Titer um 1:5000 gemessen werden konnte. Es gab keine deutlichen Unterschiede in der ICOSL behandelten und der unbehandelten Gruppe. IgG3 konnte bei beiden Versuchsgruppen nicht detektiert werden. Zusammenfassend zeigte sich der deutlich höchste Wert bei IgG1.

5.5 Proliferation nach anti-ICOSL Behandlung

Da die Unterschiede der Serumkonzentrationen der antigenspezifischen Immunglobuline in beiden Gruppen nicht so deutlich waren, dass sie einen entscheidenden Einfluss auf den Schweregrad der Erkrankung nahe legen, wurde im weiteren Verlauf die Effektorfunktion der T-Zellen detaillierter charakterisiert.

Hierbei sollte zunächst untersucht werden, ob Milzzellen von anti-ICOSL Antikörper behandelten und unbehandelten G6PI immunisierten Tieren nach *in vitro* Stimulation mit G6PI unterschiedlich stark proliferieren.

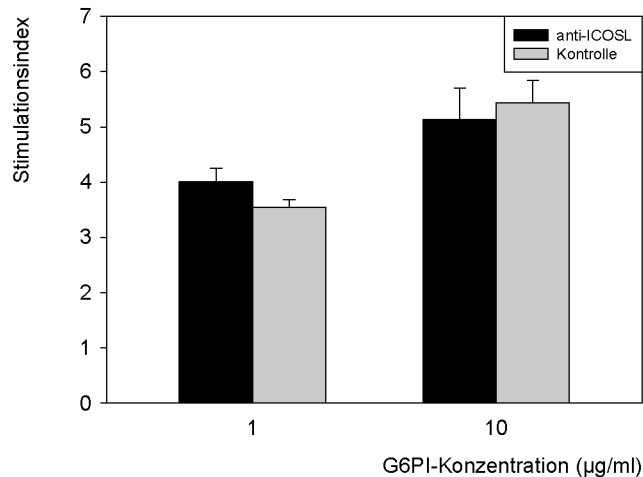


Abb. 10: Einfluss von anti-ICOSL Antikörper Behandlung auf die T-Zellproliferation.

Milzzellen von G6PI immunisierten, anti-ICOSL behandelten (schwarze Balken) oder unbehandelten Mäusen (graue Balken) wurden am Tag 12 für 72 h in Medium oder in Medium mit 1 und 10 µg / ml G6PI (x-Achse) kultiviert. Für die letzten 16 h wurde ³H-Thymidin zugesetzt und der Einbau gemessen. Die Relation zwischen den mit G6PI stimulierten Proben und dem Mediumwert wurde berechnet und als Stimationsindex (SI) auf der y-Achse dargestellt.

Jeweils fünf DBA/1 Mäuse wurden mit G6PI immunisiert und entweder anti-ICOSL behandelt (Tag 2, 4, 6) oder blieben unbehandelt. Aus Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe (Schubert et al. 2004) ist bekannt, dass die stärkste Proliferation zwölf Tage nach Immunisierung gemessen werden konnte. Daher wurden Milzzellen beider Gruppen zwölf Tage nach Immunisierung mit 1 µg / ml oder 10 µg / ml G6PI für 72 h restimuliert und anschließend der ³H-Thymidineinbau gemessen. Der Stimationsindex (SI) berechnete sich aus dem Quotienten der Werte stimulierter und unstimulierter Zellen (Abb. 10). Nach der Stimulation mit 1 µg / ml wurde ein Stimationsindex von ungefähr 4 errechnet. Hierbei zeigten sich keine deutlichen Unterschiede zwischen beiden Gruppen.

Bei *in vitro* Stimulation mit 10 µg / ml G6PI lag der Stimationsindex mit circa 5 höher als bei 1 µg / ml G6PI, aber auch hier war kein großer Unterschied zwischen der Gruppe der behandelten Tiere und der Kontrollgruppe erkennbar.

5.6 Zytokinproduktion bei der G6PI induzierten Arthritis

Im Verlauf einer Immunantwort spielt die Produktion von Zytokinen eine entscheidende Rolle. Für die *in vitro* Messung im *ELISA* habe ich die proinflammatorisch wichtigsten Zytokine: IFN- γ , IL-2, IL-6 und IL-17 ausgewählt. Zehn DBA/1 Mäuse wurden immunisiert und je fünf davon am Tag 2, 4 und 6 mit 100 μ g anti-ICOSL Antikörper behandelt oder blieben unbehandelt.

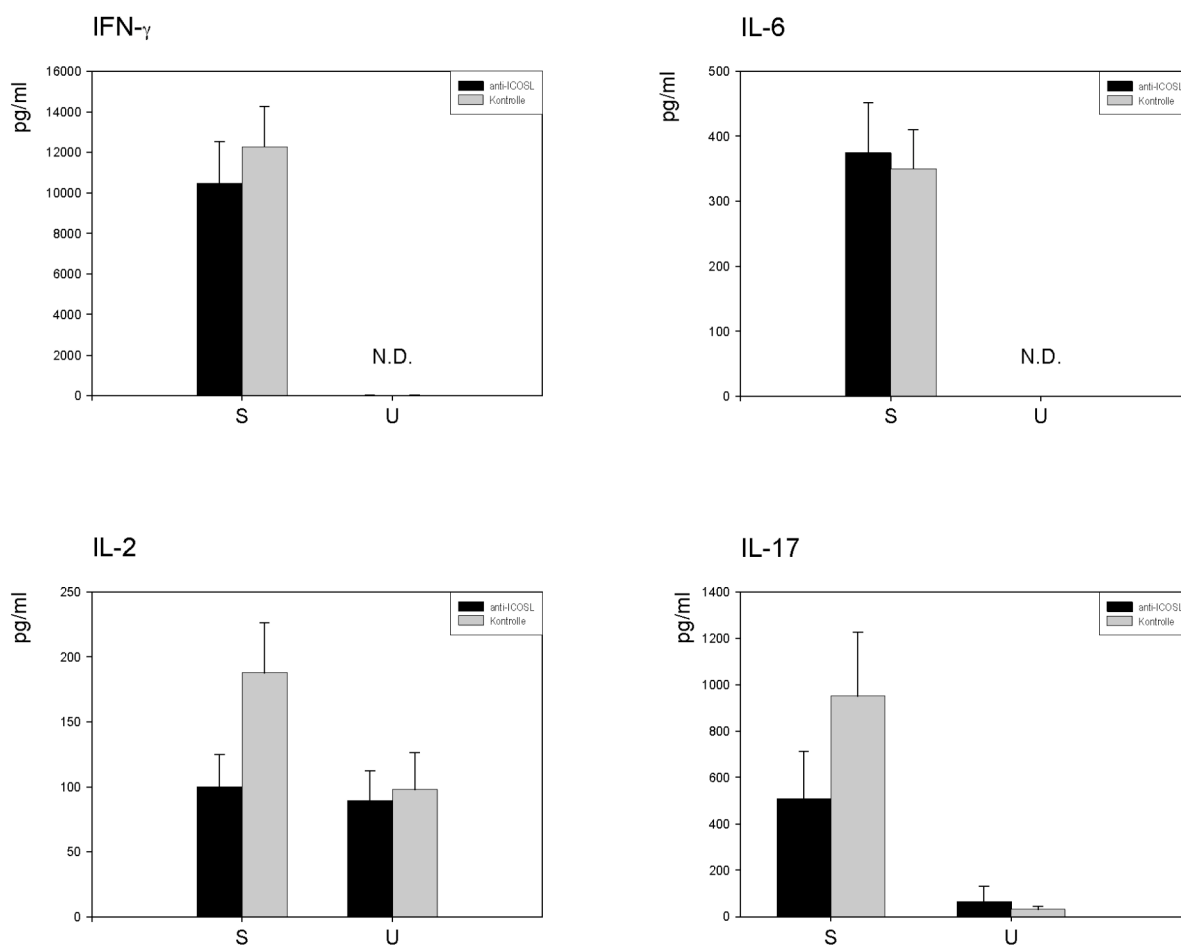


Abb. 11: Zytokinproduktion nach anti-ICOSL Behandlung. Milzzellen von behandelten (schwarze Balken) und unbehandelten (graue Balken) Mäusen (t12) wurden ohne (U) oder mit 10 μ g / ml G6PI (S) für 48 h stimuliert. Die Zytokinproduktion wurde im Überstand mittels *ELISA* gemessen. Dargestellt sind die Messungen von IFN- γ , IL-2, IL-6 und IL-17 wie in der Abbildungsüberschrift angezeigt. N.D. zeigt die Werte unterhalb des Detektionsminimums. Auf der y-Achse ist die Zytokinkonzentration als pg / ml angegeben.

Aus den Milzzellen wurden Einzelzellsuspensionen hergestellt, aufgeteilt und zur Hälfte mit 10 µg / ml G6PI restimuliert. 48 Stunden später wurden die Überstände abgenommen und die Zytokinproduktion im *ELISA* gemessen (Abb. 11). Nach Stimulation mit G6PI wurden annähernd 10 ng / ml IFN-γ in den Überständen von fünf behandelten Mäusen gemessen. Der Wert für die Produktion von IL-6 lag bei ungefähr 360 pg / ml nach Stimulation. Weder bei IL-6 noch bei IFN-γ konnte ein deutlicher Unterschied zwischen der behandelten und unbehandelten Gruppe gemessen werden. In den unstimulierten Proben beider Gruppen wurde kein IL-6 oder IFN-γ gemessen (N.D.).

In der stimulierten Probe der behandelten Gruppe konnten annähernd 100 pg / ml IL-2 nachgewiesen werden. Die IL-2 Produktion der unbehandelten Gruppe war fast doppelt so hoch. Die unstimulierten Proben beider Gruppen wiesen ebenfalls circa 100 pg / ml IL-2 auf.

In der Kontrollgruppe wurde nach Stimulation eine IL-17 Produktion von circa 1000 pg / ml gemessen (Mittelwert aus 5 Tieren). Nur halb so viel IL-17 konnte in den stimulierten gemittelten Proben der behandelten Gruppe nachgewiesen werden. In den unstimulierten Proben ließ sich eine sehr geringe Zytokinproduktion detektieren.

5.7 Intrazelluläre Zytokinproduktion der aktivierten T-Zellen nach anti-ICOSL Behandlung

Im *ELISA* wurden Unterschiede zwischen beiden Gruppen in der IL-2 und IL-17 Produktion festgestellt. Da die Gesamtmenge von IL-2 sehr gering war, habe ich die IL-17 Produktion der behandelten und unbehandelten Tiere genauer untersucht.

Eine wichtige Frage war die präzise Charakterisierung der IL-17 produzierenden Zellen. Diese sind zumeist CD4⁺ und bilden häufig auch TNF-α. Sie werden als Th17-Zellen bezeichnet und spielen in anderen Arthritismodellen eine wichtige Rolle bei der Pathogenese. Um genauere Aussagen über die IL-17 Produzenten machen zu können, wurden diese Zytokine durchflusszytometrisch analysiert. Es wurden DBA/1 Mäuse immunisiert und mit oder ohne anti-ICOSL Antikörper an den Tagen 2, 4 und 6 behandelt. Im Zeitverlauf der Erkrankung wurden sechs Zeitpunkte (wie in Abb. 15 dargestellt) ausgewählt, an denen Einzelzellsuspensionen von Milzzellen beider Gruppen hergestellt wurden. Diese blieben unstimuliert (Medium) oder wurden

für 6 h *in vitro* mit G6PI oder anti-CD3/CD28 restimuliert, damit die Zytokinproduktion intrazellulär gemessen werden konnte. Die Zellen wurden CD4⁺ gefärbt, fixiert und intrazellulär mit Antikörpern gegen IL-17, TNF- α und ICOS gefärbt. Danach wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert.

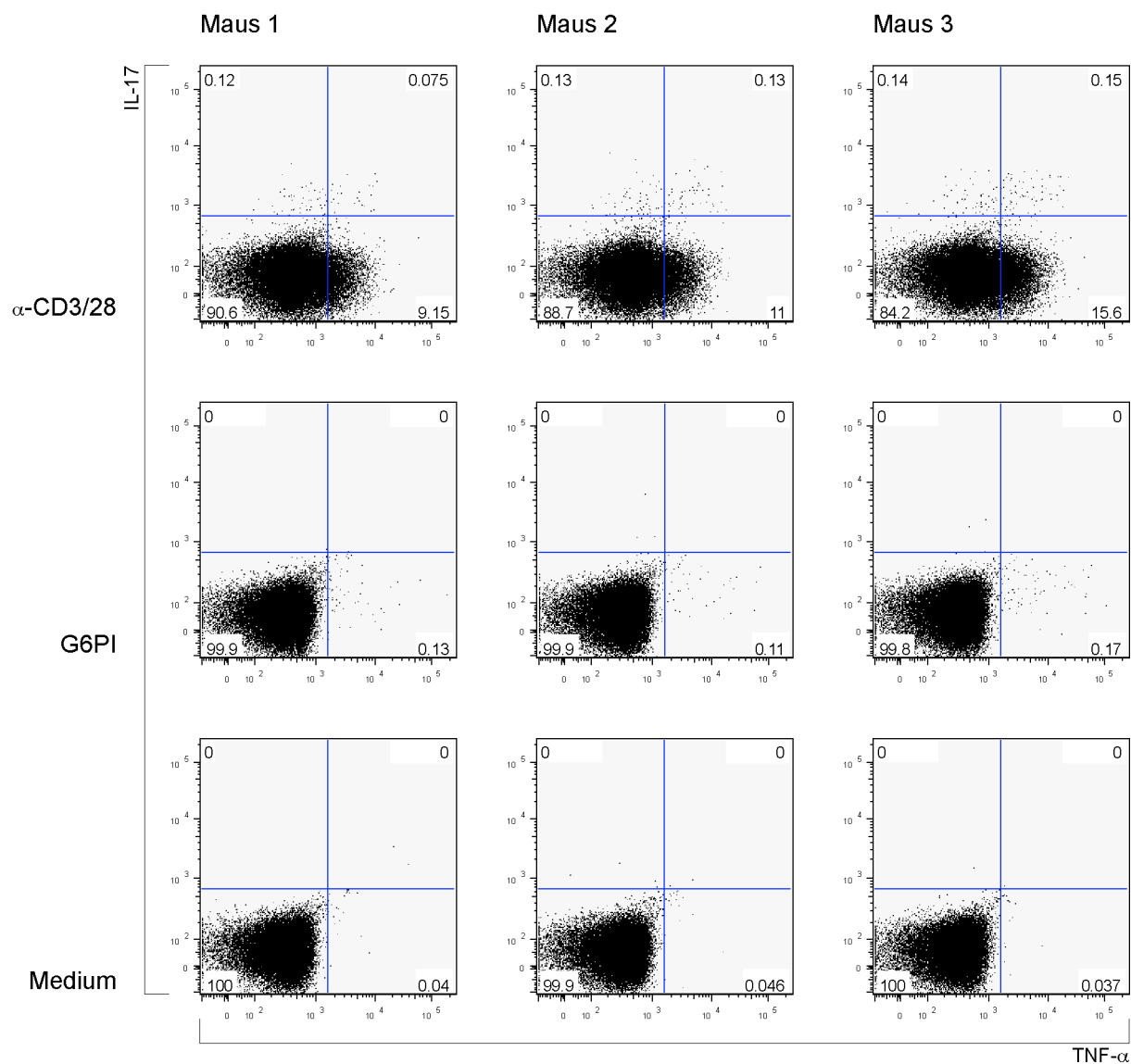
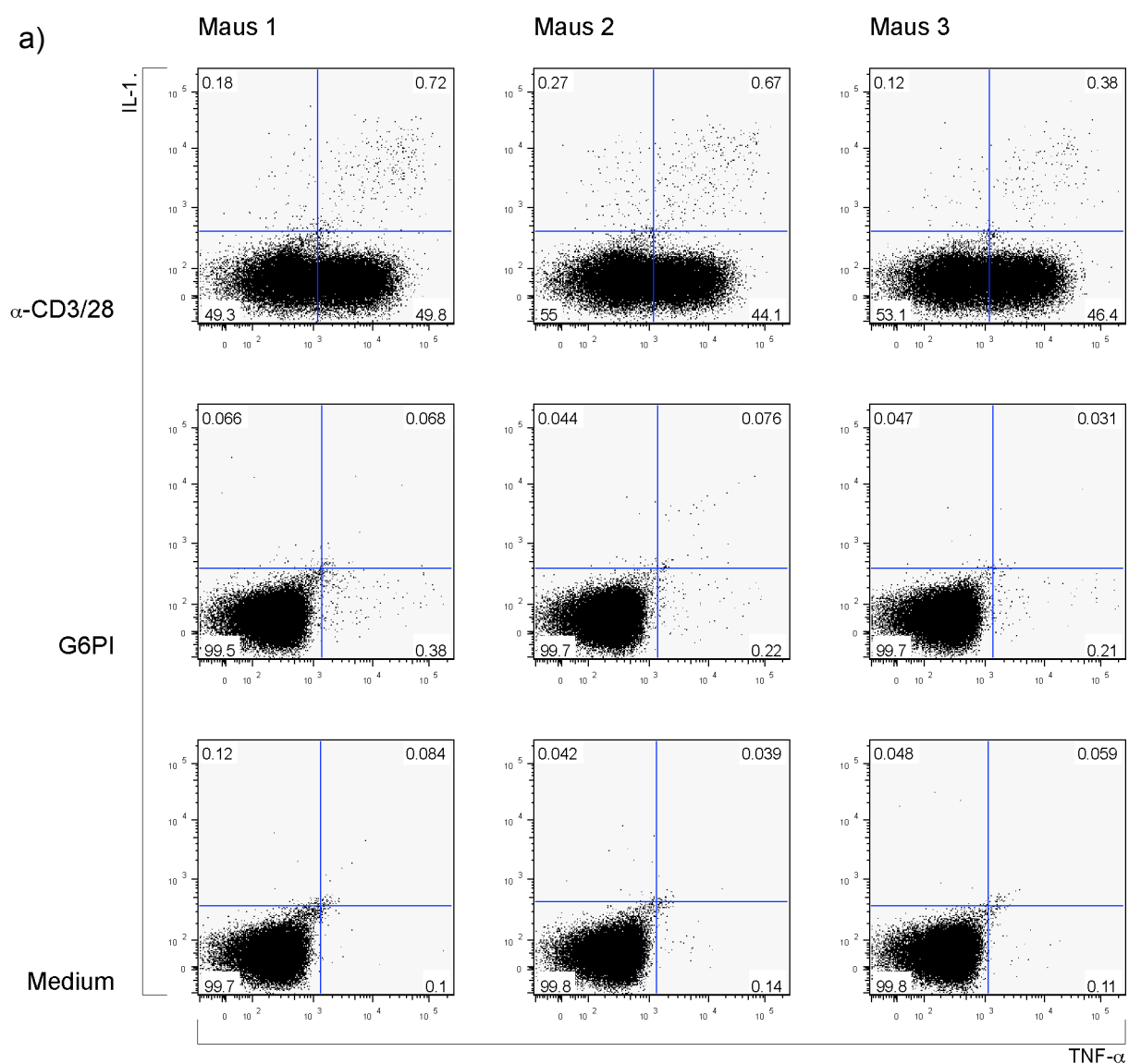


Abb. 12: Messung der Zytokinproduktion naiver Mäuse. Milzzellen drei naiver Mäuse wurden mit anti-CD4 Antikörper gefärbt, fixiert und permeabilisiert. Dargestellt sind nur die CD4⁺ Zellen. Die Milzzellen blieben entweder unstimuliert (Medium; untere Reihe) oder wurden mit 10 μ g / ml G6PI (mittlere Reihe) oder mit anti-CD3/CD28 (obere Reihe) stimuliert und für 6 h inkubiert. Gefärbt wurde intrazellulär mit einem anti-IL-17 (y-Achse) und anti-TNF- α Antikörper (x-Achse). Anhand der Isotypkontrolle (nicht dargestellt) wurden die Autofluoreszenzen für die IL-17 und TNF- α Messungen festgelegt und die Eingrenzung der positiven Zellen entsprechend gewählt.

Die Spezifität der Färbung wurde mit unspezifischen fluoreszenzfarbstoffmarkierten Isotypantikörpern kontrolliert (nicht gezeigt). Die Abbildung 12 zeigt beispielhaft die intrazellulären Färbungen von drei naiven Mäusen am Tag 0.

In der oberen Reihe wurden die Milzzellen mit anti-CD3/CD28 stimuliert, in der mittleren mit G6PI und in der unteren Reihe sind die unstimulierten Zellen abgebildet. Es wurden nur CD4 positive Zellen gezeigt. Alle drei Mäuse produzierten nach Restimulation mit G6PI weder IL-17 noch TNF- α . Bei den unstimulierten Zellen wurden keine Zytokine gemessen. Von den anti-CD3/CD28 stimulierten Zellen produzierten zwischen 9 und 15 % TNF- α . Unter 0,2 % der CD4⁺ Zellen, die mit anti-CD3/CD28 restimuliert wurden produzierten IL-17 oder IL-17 und TNF- α .

Neben Tag 0 wurde die Zytokinproduktion auch an den Tagen 6, 9, 12, 25 und 35 nach dem oben beschriebenen Verfahren durchflusszytometrisch bestimmt.



b)

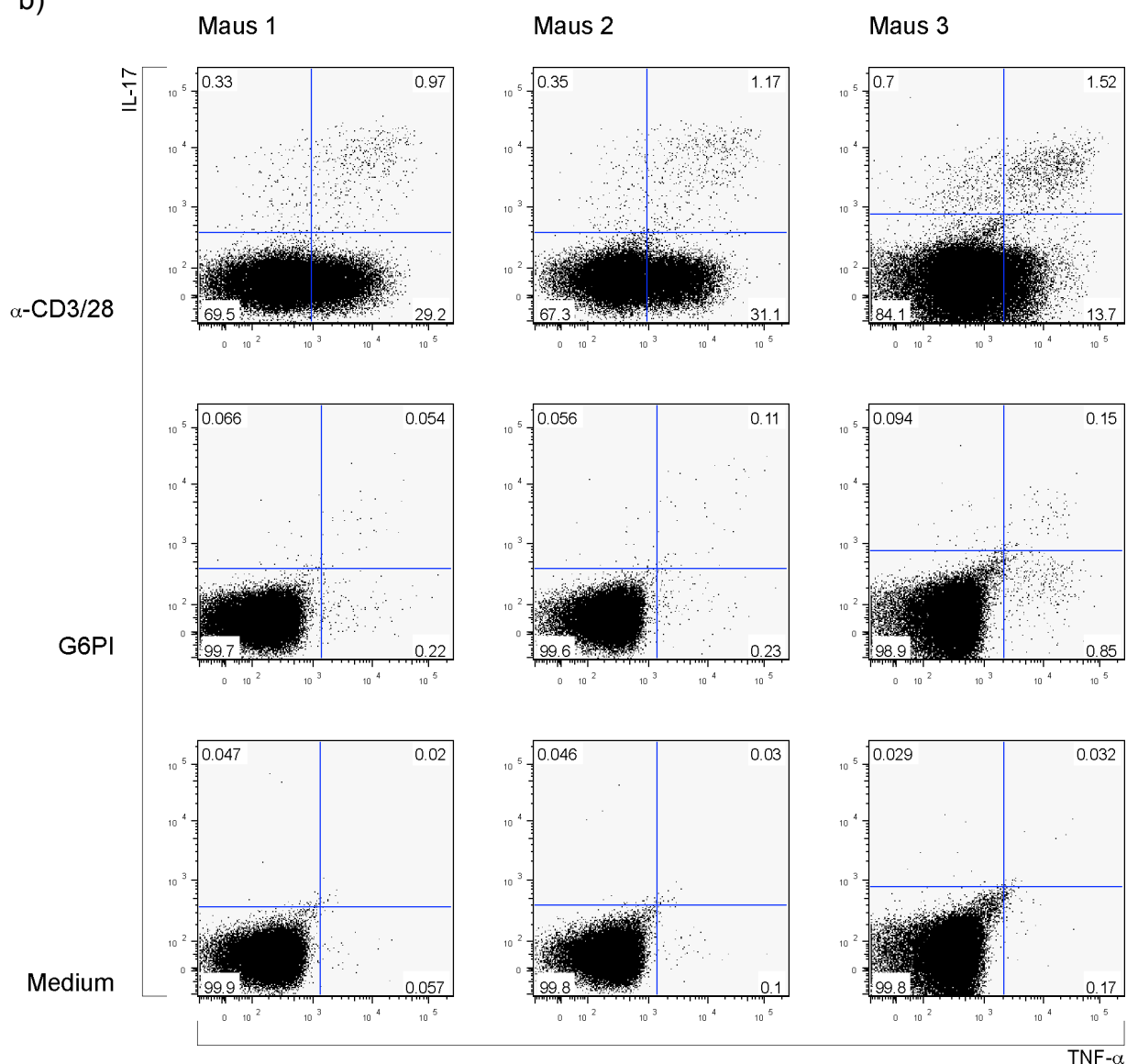


Abb. 13: Messung der intrazellulären Zytokinproduktion am Tag 9. Milzzellen von je drei anti-ICOSL behandelten a) oder Kontrollmäusen b) wurden mit anti-CD4 Antikörper gefärbt, fixiert und permeabilisiert. Gefärbt wurde intrazellulär mit einem anti-IL-17 (y-Achse) und anti-TNF- α Antikörper (x-Achse). Anhand der Isotypkontrolle wurden die Autofluoreszenzen für die IL-17 und TNF- α Messungen festgelegt. Dargestellt sind nur die CD4⁺ Zellen. Die Milzzellen blieben entweder unstimuliert (Medium; untere Reihe) oder wurden mit 10 μ g / ml G6PI (mittlere Reihe) oder mit anti-CD3/CD28 Antikörper (obere Reihe) stimuliert für 6 h inkubiert.

Beispielhaft wurde für Tag 9 die Zytokinproduktion von je drei anti-ICOSL behandelten (Abb. 13a) beziehungsweise unbehandelten Mäusen (Abb. 13b) gezeigt.

In der behandelten Gruppe schwankte die IL-17 Produktion nach anti-CD3/CD28 Restimulation zwischen 0,12 % und 0,27 % und die TNF- α Produktion zwischen 44,1 % und 49,8 %. 0,38 bis 0,72 % der CD4⁺ Zellen bildeten IL-17 und TNF- α . Die

Kontrolltiere zeigten eine deutlich höhere IL-17 Produktion am Tag 9 als die behandelten Mäuse. So bildeten die CD4 positiven Zellen 0,33 bis 0,7 % IL-17 und 0,97 bis 1,52 % der CD4⁺ Zellen waren IL-17 TNF- α doppelt positiv.

Die TNF- α Produktion war jedoch deutlich niedriger als bei den behandelten Mäusen, die Kontrolltiere produzierten zwischen 13,7 und 31,1 % TNF- α .

Die in der mittleren Reihe gezeigte Restimulation der Milzzellen mit G6PI zeigte bei beiden Gruppen CD4⁺ Zellen, von denen weniger als 0,1 % IL-17 bildeten. Die Kontrolltiere zeigten eine geringfügig höhere IL17⁺TNF- α ⁺ Produktion. Die TNF- α Produktion war in beiden Gruppen annähernd gleich und lag bei ungefähr 0,3 %. Die unstimulierten CD4⁺ Zellen bildeten unter 0,2 % IL-17 und TNF- α .

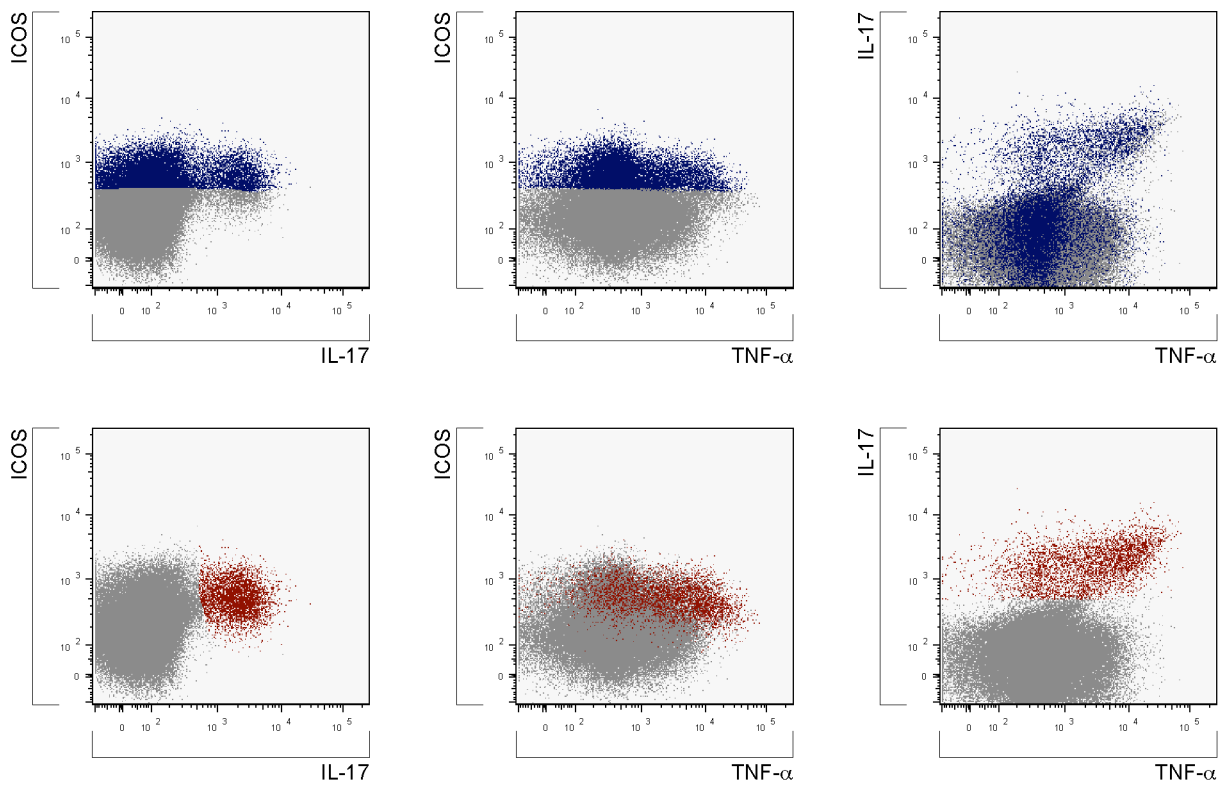
Da die Blockade von ICOSL zu einer verminderten IL-17 Produktion führte, sollte nun untersucht werden, inwieweit die IL-17 Produktion und ICOS Expression zusammen hängen. Abbildung 14 zeigt die Korrelation zwischen intrazellulärer ICOS-Expression und Zytokinproduktion der hier dargestellten CD4⁺ T-Zellen. Die folgenden Abbildungen besitzen alle den gleichen Aufbau, der beispielhaft an Hand der Abbildung 14a beschrieben wird.

Alle *Dotplots* der Abbildung 14a stellen dieselbe Messung dar, wobei die drei gezeigten Parameter in unterschiedlichen Kombinationen abgebildet wurden: In der linken Reihe ist ICOS gegen IL-17 abgebildet. Die mittlere Reihe zeigt ICOS gegen TNF- α und die rechte IL-17 gegen TNF- α .

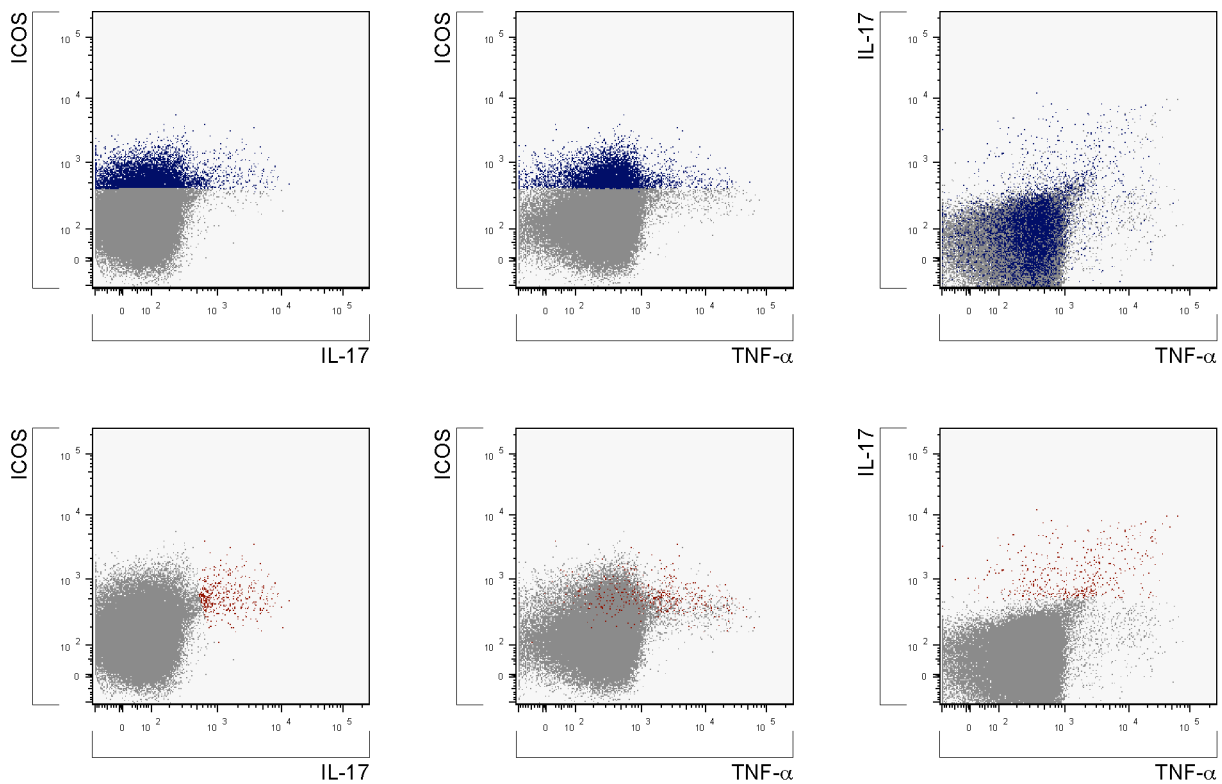
Die linken Abbildungen definieren die jeweils farblich herausgehobenen Populationen. In den oberen Reihen sind die ICOS positiven Zellen in blau dargestellt und in den unteren Reihen die IL-17 positiven in rot.

Auffällig war, dass die Mehrzahl der nach anti-CD3/CD28 Stimulation IL-17 produzierenden Zellen ICOS positiv war, da sie oberhalb der an Hand der Isotypkontrolle definierten Linie lagen (Abb. 14a). Nur ein geringer Teil der IL-17 produzierenden Zellen war unterhalb der Linie zu finden und ist grau dargestellt. Die mittlere obere Abbildung zeigt, dass ein Großteil der TNF- α positiven Zellen ICOS negativ waren (grau). Ein viel geringerer Teil der Zellen war oberhalb der Linie zu finden und ist folglich in blau dargestellt. Das rechte obere Bild in der Abbildung 9a zeigt, dass einige der IL-17⁺ Zellen auch TNF- α positiv sind. Die Mehrzahl der TNF- α Produzenten ist jedoch IL-17 negativ. Alle Zellen in blau dargestellt sind ICOS⁺ und daraus ergeben sich Informationen über alle drei Parameter in einem Bild.

a)



b)



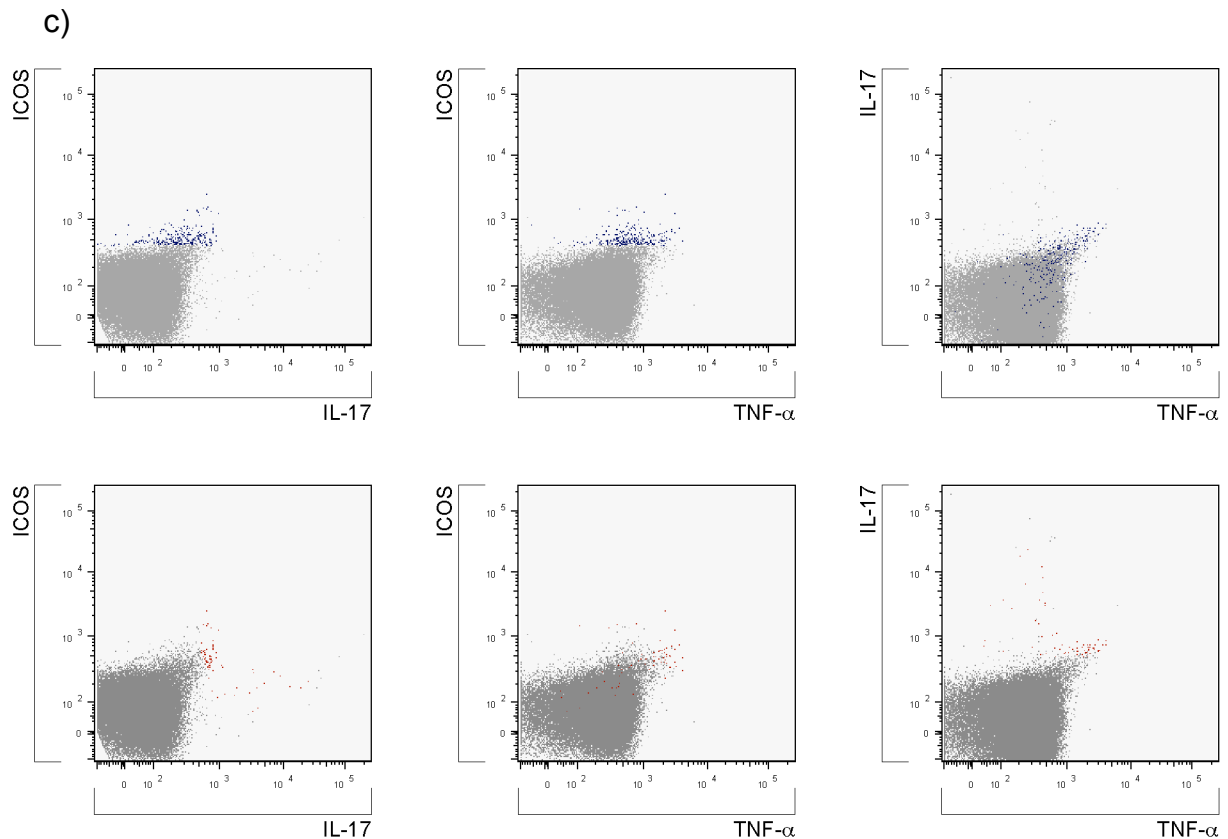


Abb. 14: Darstellung der intrazellulären Zytokinproduktion einer Kontrollmaus

am Tag 9. Milzzellen einer Kontrollmaus wurden mit anti-CD4 Antikörper gefärbt, fixiert und permeabilisiert. Dargestellt sind nur die CD4⁺ Zellen. Gefärbt wurde intrazellulär mit einem anti-IL-17, anti-TNF- α und anti-ICOS Antikörper.

In der oberen Reihe sind jeweils in blau die ICOS positiven Zellen dargestellt, die übrigen Zellen sind grau. In der unteren Reihe sind die IL-17 Zellen jeweils rot dargestellt, die übrigen Zellen sind grau. Die gezeigten *Dotplots* der oberen und unteren Reihe sind identisch. Die linke Reihe zeigt jeweils ICOS (y-Achse) gegen IL-17 (x-Achse), die mittlere Reihe zeigt ICOS (y-Achse) gegen TNF- α (x-Achse) und die rechte Reihe zeigt jeweils IL-17 (y-Achse) gegen TNF- α (x-Achse). Gezeigt wird die anti-CD3/28 Stimulation unter a) und die G6PI Stimulation unter b).

c) Anhand der Isotypkontrolle wurden die Begrenzungen für die IL-17 und ICOS festgelegt.

In den unteren Abbildungen sind die IL-17 produzierenden Zellen rot dargestellt, wie in dem linken unteren Bild gezeigt. Die IL-17 positiven Zellen sind fast ausschließlich ICOS positiv. Die mittlere untere Abbildung zeigt die Verteilung der IL-17⁺ Zellen auf ICOS und TNF- α . Aus diesem Bild sind Information über alle drei Parameter ersichtlich. Die rechte untere Abbildung zeigt, dass viele der IL-17⁺ Zellen auch TNF- α positiv sind.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass fast alle IL17⁺ Zellen und einige TNF- α Produzenten ICOS positiv sind, jedoch ist die Mehrzahl der TNF- α Produzenten ICOS negativ.

Die Abbildung 14b zeigt die Korrelation zwischen ICOS, IL-17 und TNF- α nach G6PI Stimulation. Alle Abbildungen stammen aus einer einzigen Messung, wobei die drei Parameter in unterschiedlichen Kombinationen abgebildet wurden. In der linken Reihe ist ICOS gegen IL-17 abgebildet. Die mittlere Reihe zeigt ICOS gegen TNF- α und die rechte IL-17 gegen TNF- α . Diese Abbildung soll verdeutlichen, dass nach antigenspezifischer Stimulation die IL-17⁺ Zellen ICOS positiv und das einige Zellen auch ICOS⁺ TNF- α ⁺ waren. Auffallend ist jedoch, dass keine ICOS negativen TNF- α Produzenten nachweisbar waren.

In Abbildung 14c sind die Kontrollfärbungen mit Isotypantikörpern dargestellt, um die unspezifische Hintergrundfärbung sichtbar zu machen.

Die Ergebnisse der IL-17 und TNF- α Produktion im Zeitverlauf sind in Abbildung 15 zusammengefasst.

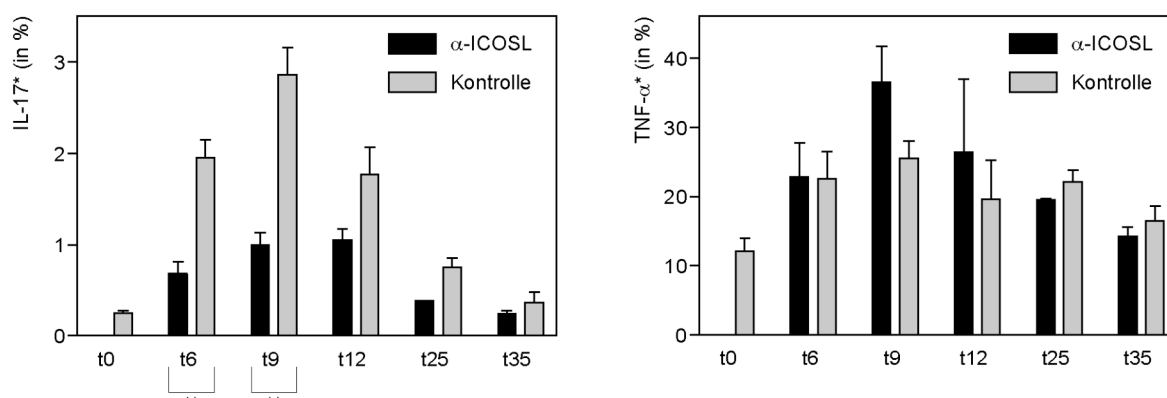


Abb.15: Zytokinantwort nach G6PI Immunisierung. Milzzellen von anti-ICOSL behandelten Mäusen (schwarze Balken) und Kontrolltieren (graue Balken) wurden zu den angegebenen Zeitpunkten analysiert (x-Achse). Auf den y-Achsen sind die Prozente der CD4⁺ Zellen angegeben, die in der linken Abbildung IL-17 positiv und in der rechten TNF- α positiv sind. Die Unterschiede der IL-17 Produktion zwischen der behandelten und unbehandelten Gruppe am Tag 6 und 9 sind statistisch signifikant ($p \leq 0,05$) und werden durch ** markiert.

Von jeweils drei bis sechs Mäusen pro Gruppe wurden die IL-17 Produktion im Verlauf der Arthritis gezeigt (Abb. 15a). Am Tag 0 konnte eine geringe Menge von ungefähr 0,3 % IL-17 in den naiven DBA/1 Mäusen nachgewiesen werden. Sechs Tage später konnte ein Anstieg der IL-17 Produzenten gemessen werden, wobei der Anteil der IL-17 Produzenten der Kontrollgruppe mit 2 % mehr als doppelt so hoch war wie in der behandelten Gruppe.

Bis zum Tag 9 stieg die Menge der IL-17 Produzenten an. In der Kontrollgruppe exprimierten 2,9 % der CD4⁺ Zellen IL-17. Im Gegensatz dazu konnte in der behandelten Gruppe nur eine IL-17 Expression von maximal 1 % gemessen werden, was ungefähr einem Drittel des Wertes der Kontrollgruppe entsprach. In der Gruppe der unbehandelten Mäuse bildeten am Tag 12 noch 1,7 % der CD4⁺Zellen IL-17. An den folgenden Tagen nahm die Frequenz der IL17⁺CD4⁺ Zellen weiter ab. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen blieb jedoch bis zum Tag 25 deutlich sichtbar. Am Tag 35 erreichte die behandelte Gruppe das Ausgangsniveau, während die Kontrolltiere immer noch leicht erhöhte IL-17 Expressionswerte aufwiesen.

Die Abbildung 15b zeigt die Messergebnisse für TNF- α . 12 % der CD4⁺ Zellen naiver Mäuse exprimierten TNF- α am Tag 0. In beiden Gruppen stiegen die Frequenzen für TNF- α in den folgenden Tagen an. Am Tag 6 konnten ähnlich hohe Messwerte von ungefähr 22 % in beiden Gruppen erzielt werden. Im weiteren Verlauf stieg die TNF- α Expression der anti-ICOSL behandelten Gruppe bis zum Tag 9 an und erreichte ein Maximum von 36,4 %. Im Gegensatz dazu exprimierten nur 25,5 % der CD4⁺ Zellen in der Kontrollgruppe TNF- α . Anschließend nahm die Menge der TNF- α Produzenten in beiden Gruppen ab, bis am Tag 35 das Ausgangsniveau in beiden Gruppen annähernd erreicht wurde.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die TNF- α Expression keinen Rückschluss über den milderen Verlauf der Arthritis bei ICOSL Behandlung geben konnte. Im Gegensatz dazu, wurden deutlich niedrigere Frequenzen von IL-17 Produzenten nach ICOSL Behandlung gemessen.

6 Diskussion

Unter dem Begriff der RA wurden beim Menschen verschiedene Krankheitsbilder zusammengefasst, denen wahrscheinlich keine völlig identischen pathologischen Prozesse zu Grunde lagen. Eine weitergehende Aufklärung der verschiedenen Arthritisursachen war von großer Bedeutung und daher wurde in vielen Tiermodellen versucht, Ätiologie und Pathogenese der Arthritis zu klären.

Im Modell der G6PI induzierten Arthritis wurden susceptible DBA/1 Mäuse mit G6PI immunisiert, worauf diese innerhalb eines definierten Zeitfensters eine symmetrische Polyarthritis entwickelten. Damit konnte in diesem Modell das erste Mal gezeigt werden, dass eine Immunisierung mit einem systemischen Antigen eine organspezifische Erkrankung in normalen nicht-transgenen Mäusen induzierte. Durch Depletionsversuche konnte weiterhin gezeigt werden, dass CD4⁺ T-Zellen für die Arthritispathogenese vorhanden sein müssen. Erfolgte der Beginn der CD4 Depletion erst bei Erreichen des Krankheitsgipfels, trat bei den behandelten Tiere eine raschere Heilung ein (Schubert et al. 2004).

Auch in anderen Arthritismausmodellen waren CD4⁺ T-Zellen von Bedeutung. Im Gegensatz zum G6PI Modell sind CD4⁺ T-Zellen in K/BxN Mäusen nur in der Induktionsphase für die Vermittlung der Antikörperantwort von Bedeutung, während das Fehlen der CD4⁺ T-Zellen zu einem späteren Zeitpunkt keinen Einfluss mehr auf den Krankheitsverlauf hatte (Kouskoff et al. 1996). Weitere Hinweise für die starke Bedeutung von T-Zellen in Arthritismodellen ergaben sich durch das spontane Auftreten einer Arthritis durch Mutation in der SH2-Domäne von ZAP-70, einem wichtigen Molekül für die Signaltransduktion in T-Zellen (Sakaguchi et al. 2003).

Da in diesen und anderen Modellen die große Bedeutung von T-Zellen gezeigt werden konnte, sind auch die zu Grunde liegenden Funktionsmechanismen der T-Zellaktivierung von Interesse. Aus einigen Publikationen gibt es Hinweise auf den Einfluss von kostimulatorischen Molekülen, wie beispielsweise CD28-CD80/CD86, CD40-CD40L und CD134-CD134L, auf den Verlauf einer CIA. Hierbei konnte jeweils durch die Blockade der Interaktion und Verhinderung der T-Zellaktivierung die Ausbildung einer Arthritis verhindert werden (Tada et al. 1999, Webb et al. 1996, Durie et al. 1993, Yoshioka et al. 2000). Diese Ergebnisse zeigten, dass die Aktivierung der CD4⁺ T-Zellen durch kostimulatorische Moleküle für die CIA Pathogenese eine wichtige Rolle spielen.

Deswegen wurde in dieser Arbeit der Einfluss des von T-Zellen aktivierungsabhängig exprimierten Moleküls *Inducible costimulator molecule* – ICOS (Hutloff et al. 1999, McAdam et al. 2000, Gonzalo et al. 2001) auf die Pathogenese der G6PI induzierten Arthritis untersucht.

6.1 ICOS-ICOSL Interaktion im Modell der G6PI induzierten Arthritis

Der Einfluss der ICOS-ICOSL Interaktion auf den Verlauf der G6PI induzierten Arthritis sollte analysiert werden, wozu ein blockierender anti-ICOSL Antikörper eingesetzt wurde. Der Vorteil dieser Blockade besteht darin, dass die in diesem Projekt interessierenden CD4⁺ T-Zellen keinen Antikörper gebunden haben, was bei einem blockierenden ICOS Antikörper der Fall gewesen wäre. Ein existierender anti-ICOS Antikörper zeigte *in vitro* nicht ausschließlich blockierende Funktionen (A.Hutloff, persönliche Mitteilung), so dass nicht auszuschließen wäre, dass eine solche Aktivierung auch bei *in vivo* Applikation des Antikörpers aufträte. Möglicherweise könnte dies eine denkbare Erklärung für die Versuchsergebnisse von Rottmann et al. im Modell der *Experimentellen Autoimmunen Encephalomyelitis (EAE)* (Rottman et al. 2001) sein. So verschlimmerte eine frühzeitige Gabe des anti-ICOS Antikörpers den Krankheitsverlauf, während eine späte Applikation protektiv wirkte.

6.1.1 Klinischer Verlauf

Wie in Abbildung 6a gezeigt, sieht man bei früher anti-ICOSL Gabe an Tag 2, 4 und 6 einen deutlich protektiven Effekt der Behandlung. Bei den therapeutisch behandelten Tieren zeigte sich ebenfalls ein milderer Verlauf der Arthritis, jedoch waren die Effekte nicht so deutlich ausgeprägt wie bei der früh behandelten Gruppe. Da die für diese Versuche verwendeten Tierzahlen mit vier beziehungsweise fünf Tieren sehr gering waren, ergab sich im Vergleich der spät behandelten Gruppe mit der Kontrollgruppe keine Signifikanz, während die Unterschiede zwischen Kontrollgruppe und früh behandelter Gruppe trotz des sehr kleinen n-Wertes bis Tag 39 signifikant waren.

Eine detailliertere Betrachtung der kranken Tiere in Abbildung 6b und 6c zeigte, dass in der früh behandelten Gruppe eine Maus erkrankte. Ursächlich hierfür könnte eine fehlerhafte Applikation des i.p. gespritzten anti-ICOSL Antikörper (MIL 5733) sein. Als ein weiterer Hinweis könnte die Tatsache gewertet werden, dass in später durchgeführten Versuchen so stark erkrankte Tiere nach Behandlung nicht mehr auftraten (Daten nicht gezeigt). Ab der dritten Woche nach G6PI Immunisierung wiesen zusätzlich weitere behandelte Tiere deutliche Krankheitszeichen auf, was möglicherweise auf ein Nachlassen der Antikörperwirkung zurück zu führen sein könnte. Bei der späten Behandlung gesunden einige Tiere im Vergleich mit Tieren der Kontrollgruppe schneller, was auf einen therapeutischen Effekt der Blockade der ICOS-ICOSL Interaktion zu einem späteren Zeitpunkt hindeuteten würde. Die klinischen Scores spiegeln sich in der histologischen Analyse der Pfoten am Tag 12 und 40 wieder.

Die ICOS-ICOSL Interaktion spielt auch in anderen Arthritismodellen eine wichtige Rolle. Beispielsweise entwickelten ICOS^{-/-} Mäuse im Modell der CIA nach Applikation von CII im Vergleich zu den Kontrolltieren keine Arthritis (Dong und Nurieva 2003). Weiterhin konnten Iwai et al. im CIA Modell zeigen, dass nach viermaliger Gabe von anti-ICOSL Antikörper der Verlauf der Arthritis in DBA/1 Mäusen deutlich milder verlief. Diese Effekte zeigten sich auch dann, wenn die Therapie erst bei Auftreten der ersten Krankheitsanzeichen begann, wobei die Interpretation der unterschiedlichen Therapieintervalle (Tag -1 bis 5 und Tag 5 bis 11 der Sekundärimmunisierung) durch die variable Verlaufsform der Scorekurven erschwert wurde (Iwai et al. 2002).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die anti-ICOSL Behandlung einen erheblichen Einfluss auf das Krankheitsgeschehen hat, so dass sich trotz der sehr geringen Tierzahlen statistisch abgesicherte Effekte zeigten. Im weiteren Verlauf sollten die Mechanismen der ICOS-ICOSL Blockade näher untersucht werden.

6.2 Aktivierungszustand der CD4⁺ T-Zellen

Da die Blockade der ICOS-ICOSL Interaktion einen deutlichen Effekt auf den Verlauf der G6PI Arthritis hatte, war es von großem Interesse die ICOS positiven Zellen näher zu charakterisieren. ICOS, ein Mitglied der CD28-Familie, wird nur auf aktivierten CD4⁺ T-Zellen exprimiert (Hutloff et al. 1999, McAdam et al. 2000, Gonzalo et al. 2001).

Daher war es wichtig zu überprüfen, ob die Immunisierung mit G6PI in CFA zu einer verstärkten Expression von ICOS auf der Zelloberfläche von CD4⁺ T-Zellen führte. Zusätzlich wurden CD25 und CD134 aus der Vielzahl von bekannten Aktivierungsmolekülen ausgewählt und in Koexpression mit ICOS über den gesamten Krankheitsverlauf untersucht. Die Analyse ergab, dass sich der Anteil von ICOS⁺ Zellen innerhalb der CD4⁺ T-Zellpopulation während der Krankheitsphase annähernd verdoppelte und die Blockade der ICOS-ICOSL Interaktion keinen Einfluss auf die ICOS Expression hatte. Offensichtlich gab es für die drei hier untersuchten Oberflächenmoleküle keine durch ICOSL vermittelte Expressionsregulation. Betrachtet man die Expression der hier untersuchten kostimulatorischen Oberflächenmoleküle als Maßstab für den Aktivierungszustand der CD4⁺ T-Zellen, so zeigten sich keine Unterschiede zwischen den anti-ICOSL behandelten Tieren und den Kontrolltieren, die den mildereren Verlauf der Arthritis erklären könnten.

Bei diesen Überlegungen ist zu berücksichtigen, dass antigenspezifische T-Zellen nach ihrem *Priming* das sekundär lymphatische Gewebe verlassen und in die entzündlich veränderten Gelenke einwandern. Folglich lieferte die Analyse der Milzzellen nur einen kleinen Ausschnitt der ablaufenden Immunreaktion (Muller-Ladner et al. 2005, Spargo et al. 2001, Mora und von Andrian 2006), weswegen Untersuchungen des T-Zell Aktivierungszustands innerhalb der Gelenke von Interesse sein könnten.

6.3 Einfluss der ICOS-ICOSL Blockade auf die G6PI spezifische Antikörperproduktion

Die folgenden Experimente sollten die immunologischen Mechanismen nach ICOSL Blockade an den frühen Zeitpunkten detaillierter untersuchen. Der deutlich mildere Verlauf bei anti-ICOSL Behandlung könnte mit einer verminderten G6PI spezifischen Antikörperantwort korrelieren, denn die ICOS-ICOSL Interaktion spielt eine wichtige Rolle für die B-Zellhilfe der so genannten Tfh-Zellen (McAdam et al. 2001).

Zur Charakterisierung des ICOSL Einflusses auf die Antikörperantworten im G6PI Modell wurden die Serumspiegel der G6PI spezifischen Isotypantikörper (IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3) bestimmt. Dazu wurde aus den immunisierten Tieren Serum (t12) aufgearbeitet, da in diesem Modell am Tag 12 die maximalen Antikörpertiter bestimmbar waren (Schubert et al. 2004). Beide Gruppen zeigten ähnlich hohe Antikörpertiter für IgG2a, IgG2b sowie IgM. Auch die Unterschiede bei IgG1 scheinen als Erklärung für die deutlichen klinischen Effekte bei der anti-ICOSL Blockade nicht ausreichend stark zu sein.

Grundsätzlich ist der Einfluss der ICOSL Blockade auf spezifische Antikörperantworten in murinen Arthritismodellen von Interesse, denn ICOS^{-/-} Mäusen haben histologisch kleinere Keimzentren und zeigen daher eine reduzierte B-Zellantwort (Akiba et al. 2005, McAdam et al. 2001). Auch im Menschen führt eine ICOS Defizienz zu vergleichbaren Effekten (Bossaller et al. 2006).

Aus dem K/BxN-Modell ist bekannt, dass Antikörper bei der Pathogenese dieser Arthritis eine wichtige Rolle spielen und durch Antikörpertransfer die Arthritis auf Empfängertiere übertragen werden kann (Maccioni et al. 2002). Schubert et al. konnten im Modell der G6PI induzierten Arthritis in DBA/1 Mäusen antigenspezifische Antikörper nachweisen (Schubert et al. 2004). Allerdings gelang es nicht, durch Transfer von Serum aus kranken Mäusen oder durch Applikation von *in vitro* generierten G6PI spezifischen Antikörpern die Arthritis zu übertragen (D. Schubert, persönliche Kommunikation). Diese Ergebnisse könnten zu der Schlussfolgerung führen, dass die Antikörper im G6PI Modell (im Gegensatz zu anderen Modellen) für die Pathogenese nicht von primärer Bedeutung sind.

In CIA Modell führte die anti-ICOSL Blockade zu signifikant reduzierten IgG1, IgG2a und IgG2b Antworten (Iwai et al. 2002), wobei nicht unerwähnt bleiben sollte, dass

die gewählte Auswertungsmethode gegen selbst definiertes Standardserum nur eine eingeschränkte Interpretation der Ergebnisse erlaubt.

In einem weiteren CIA Modell verglich die Arbeitsgruppe um Dong die Antikörperkonzentrationen in ICOS^{-/-}- und Wildtypmäusen. Bei Untersuchungen des die CIA vermittelnden IgG2a Antikörperspiegels im Serum am Tag 58 zeigte sich nur in der geringsten Verdünnungsstufe von 1:5 ein Unterschied in den gemessenen OD Werten zwischen den beiden Gruppen (Dong und Nurieva 2003). Da auf eine weitergehende Quantifizierung der Immunglobulinkonzentrationen verzichtet wurde, ist hier der Aussagewert allerdings beschränkt. Zusammenfassend ist zu sagen, dass eine endgültige Bewertung des Einflusses von ICOS auf die Produktion der Antikörper in den oben genannten Publikationen durch die methodischen Unzulänglichkeiten der Auswertung erschwert wurde. Zusätzlich sollte nicht unberücksichtigt bleiben, dass in der CIA, im Gegensatz zum G6PI Modell, Antikörper durchaus eine größere Rolle spielen könnten, da hier die Krankheitsinduktion mittels Serumtransfer funktioniert (Brand et al. 2003).

Da die T-Zellhilfe zum Klassenwechsel nur in einem relativ definierten Zeitfenster nach Immunisierung erfolgt, lassen sich die klinischen Effekte der ICOSL Blockade in der G6PI Arthritis über die geringe Modulation der Antikörperkonzentration nicht ausreichend erklären, zumal auch die therapeutische Gabe des anti-ICOSL Antikörpers klinische Effekte zeigte.

Ein grundlegender Unterschied zwischen dem G6PI Modell und anderen Modellen wie CIA oder K/BxN scheint die bislang nicht geglückte Krankheitsinduktion mittels Serum- oder Antikörpertransfer zu sein, während CD4⁺ T-Zellen auch in der späteren Krankheitsphase relevant waren (Schubert et al. 2004). Folglich wäre eine direkte Beeinflussung der T-Zellen als Erklärungsmöglichkeit der klinischen sichtbaren Behandlungseffekte denkbar.

6.4 Funktionelle Untersuchung der Zellpopulation nach G6PI Immunisierung

6.4.1 Proliferation nach G6PI Immunisierung

Neben der Expression von charakteristischen Oberflächenmolekülen ist die Proliferation ein weiteres wichtiges Merkmal der Zellaktivierung.

Aus Vorarbeiten im G6PI Arthritismodell ist bekannt, dass die antigenspezifische Zellproliferation 12 Tage nach Immunisierung am stärksten ist (Schubert et al. 2004). Deshalb wurde dieser Zeitpunkt gewählt um den Einfluss der ICOSL Blockade auf die Proliferation zu analysieren. Dabei zeigte sich eine antigenspezifische Proliferation, wobei keine Unterschiede zwischen der behandelten und der Kontrollgruppe nachweisbar waren.

Der Einfluss von ICOS auf die Proliferation wurde auch von anderen Arbeitsgruppen in ICOS^{-/-} und Wildtypmäusen vergleichend untersucht (Dong et al. 2001, McAdam et al. 2001): In Experimenten der Arbeitsgruppe um Sharpe zeigten sich nur geringe Unterschiede in der anti-CD3 induzierten *in vitro* Proliferation zwischen den ICOS^{-/-} und den Wildtyptieren (McAdam et al. 2001). Die von Dong et al. generierten *knockout* Mäuse zeigten dagegen einen größeren Einfluss von ICOS auf die Proliferation von Milz- und Lymphknotenzellen, da in *knockout* Tieren das Zellwachstum nach *in vitro* Stimulation mit anti-CD3 Antikörper vermindert war (Dong et al. 2001). Auch im Modell der CIA wurde der Einfluss einer anti-ICOSL Blockade auf die Proliferation untersucht. Fünf Tage nach der letzten CII Immunisierung wurden Milz- und Lymphknotenzellen, sowie aus der Milz aufgereinigte CD4⁺ T-Zellen, isoliert, und *in vitro* antigenspezifisch stimuliert, wobei die Zellen der anti-ICOSL behandelten Tiere eine signifikant verminderte Proliferation zeigten (Iwai et al. 2002). Nurieva et al. untersuchten die Proliferation in ICOS^{-/-} und Wildtypmäusen im CIA Modell. Hierzu wurden 14 Tage nach der letzten Immunisierung Milzzellen isoliert und mit CII stimuliert. Die Zellproliferation zwischen den beiden Gruppen unterschied sich dabei nur marginal. Eine Erklärungsmöglichkeit für die unterschiedlichen Ergebnisse der beiden Arbeitsgruppen könnte sein, dass an dem neun Tage späteren Untersuchungszeitpunkt ein Teil der antigenspezifischen Zellen bereits aus dem sekundär lymphatischen Gewebe ausgewandert war und somit eine antigenspezifische Proliferation nicht mehr nachgewiesen werden konnte.

In keinem der drei untersuchten Arthritismodelle ließ sich die Proliferation vollständig unterdrücken, nur in einem der oben beschriebenen CIA Modelle konnte ein leichter Unterschied in der Proliferation detektiert werden. Somit spielt offensichtlich die Zellproliferation in keinem der hier beschriebenen Modelle für die klinisch nachweisbaren Effekte der ICOS-ICOSL Interaktion eine entscheidende Rolle.

Zusammenfassend lieferten die bisher untersuchten Parameter zur Oberflächenexpression von Aktivierungsmolekülen, der G6PI spezifischen Antikörperantwort sowie der Zellproliferation noch keine befriedigende Erklärung für die deutlichen klinischen Effekte bei ICOSL Blockade.

6.4.2 Zytokinproduktion nach G6PI Immunisierung

Eine weitere wichtige Effektorfunktion von CD4⁺ T-Zellen ist die Zytokinproduktion. Im Modell der G6PI Arthritis sind vor allem die proinflammatorischen Zytokinen für die Pathogenese bedeutsam (Schubert et al. 2004). Daher wurden die Zytokine IFN- γ , IL-2, IL-6 und IL-17 ausgewählt und ihre Produktion mit Hilfe des *ELISAs* quantitativ gemessen.

In den eigenen Messungen war nach G6PI Stimulation eine erhebliche IFN- γ Produktion nachweisbar. Es konnten aber keine Unterschiede zwischen der behandelten und der unbehandelten Gruppe festgestellt werden.

Die Publikationen zum Einfluss von ICOS auf die Produktion von IFN- γ zeigten kein homogenes Bild. So produzierten ICOS^{-/-} Mäuse im Vergleich zu Wildtyptieren nach KLH Immunisierung vermehrt IFN- γ (McAdam et al. 2001, Park et al. 2005). Im EAE Modell zeigten ICOS^{-/-} Mäuse sowie Tiere nach einer präventiven Behandlung mit einem blockierenden anti-ICOS Antikörper höhere IFN- γ Spiegel als die Kontrolltiere (Dong et al. 2001, Rottman et al. 2001). Auch im Modell der CIA wurde in ICOS^{-/-} Mäusen vermehrt IFN- γ gemessen (Nurieva et al. 2003), jedoch zeigten anti-ICOSL behandelte Tiere im Modell der CIA eine deutlich verminderte IFN- γ Produktion verglichen mit den Kontrolltieren (Iwai et al. 2002).

Zusammenfassend ergibt sich kein einheitliches Bild über den Einfluss der ICOS-ICOSL Interaktion auf die Produktion von IFN- γ . Es konnte bislang nicht gezeigt werden, dass IFN- γ für die Arthritispathogenese eine entscheidende Rolle spielt und deshalb ist dieses Modell unter Umständen nicht optimal geeignet für

weiterführende Untersuchungen zum Einfluss der ICOS-ICOSL Interaktion auf die IFN- γ Produktion.

IL-6 ist ein weiteres wichtiges proinflammatorisches Zytokin, welches für die Arthritispathogenese von Bedeutung ist (McInnes und Schett 2007). Beispielsweise besitzt es stimulatorische Aktivität auf Osteoklasten, so dass die Knochenbildung inhibiert und die Resorption gefördert werden könnte (Kwan Tat et al. 2004).

Eigene Untersuchungen ergaben, dass in den Kulturüberständen der Milzzellsuspensionen nach Stimulation mit G6PI IL-6 detektiert werden konnte, wobei keine Unterschiede zwischen der behandelten und unbehandelten Gruppe zu finden waren. Offensichtlich hat die Blockade von ICOSL keinen Einfluss auf die IL-6 Produktion nach G6PI Immunisierung.

Die Konzentration von IL-6 und seinem löslichen Rezeptor ist in der Synovialmembran von RA-Patienten erhöht (Kotake et al. 1996) und auch aus Tiermodellen ergibt sich ein Einfluss auf die Arthritispathogenese. So zeigten IL-6^{-/-} Mäuse einen deutlich milderen Arthritisverlauf als die Wildtyp-Kontrolltiere (Alonzi et al. 1998, Sasai et al. 1999). In einem kürzlich von der Gruppe um Sakaguchi näher untersuchten Modell mit SKG Mäusen wurde die Bedeutung von IL-6 differenzierter analysiert. Die Untersuchungen ergaben, dass die Produktion von IL-6 für die Krankheitsinduktion der SKG Arthritis relevant ist. Als Quelle dieses Zytokins konnten Zellen des angeborenen Immunsystems identifiziert werden (Hirota et al. 2007).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass IL-6 für die Arthritispathogenese wichtig ist. Wenn man von Nicht-CD4⁺ T-Zellen als Quelle ausgeht, wäre erklärlich, dass auch die ICOSL Blockade anscheinend keinen Einfluss auf die Menge des produzierten IL-6 hat.

IL-2 ist ein Zytokin, welches von aktivierten CD4⁺ T-Zellen produziert wird. Meine Ergebnisse zeigten, dass die Produktion von IL-2 nur sehr gering und zumeist antigenunabhängig war, was darauf hindeutet, dass die IL-2 Produktion keine entscheidende Rolle in der Arthritispathogenese spielt. Diese Annahme wird gestützt durch aktuelle Arbeiten, in denen gezeigt werden konnte, dass die Generierung von Th17 Zellen (siehe unten) durch IL-2 aktiv inhibiert wurde (Laurence et al. 2007).

Wie bei einer Vielzahl von entzündlichen Erkrankungen besitzt das proinflammatorische Zytokin TNF- α auch für die Pathogenese der RA eine große Bedeutung (McInnes und Schett 2007, Feldmann 2002). Ein Großteil von Zelltypen,

beispielsweise T-Lymphozyten, Makrophagen und Mastzellen, kann TNF- α exprimieren und freisetzen. TNF- α wirkt chemotaktisch, angiogenetisch und induziert die Freisetzung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen (McInnes und Schett 2007). So führt es beispielsweise im entzündeten Gelenk zu einer verstärkten Synthese der Kollagenase in synovialen Zellen, einer verstärkten Resorption von Proteoglykanen und deren Inhibition der Synthese sowie zur Knochenresorption durch Osteoklasten (McInnes und Schett 2007, Beutler und Cerami 1989).

Der Einsatz von TNF- α blockierenden Medikamenten, wie beispielsweise löslichem TNF-Rezeptor (Enbrel[®]) oder Antikörpern gegen TNF- α (z.B. Remicade[®]), ist ein neuer Therapieansatz bei der Behandlung von RA Patienten. Bei 70 % der Behandelten wurde eine Verbesserung der Symptome erreicht (Smolen et al. 2007, Feldmann 2002). Dabei konnte schon nach weniger als 24 Stunden ein Abfall des Serumspiegels von IL-6 und Akute Phase Protein nachgewiesen werden (McInnes und Schett 2007).

In meinen Untersuchungen konnte ich keinen Einfluss der anti-ICOSL Behandlung auf die Anzahl der TNF- α produzierenden CD4⁺ T-Zellen feststellen. Am Tag 9 produzierten sogar mehr CD4⁺ T-Zellen der behandelten Gruppe TNF- α , wobei diese Unterschiede nicht signifikant waren. Im G6PI Modell gibt es allerdings Ergebnisse, die eine Relevanz von TNF- α für den Schweregrad der Erkrankung zeigen: Durch Verwendung blockierender anti-TNF- α Antikörper (Enbrel[®]) wurde der Einfluss von TNF- α auf die Pathogenese der G6PI Arthritis untersucht (Schubert et al. 2004). Bei regelmäßigen Applikationen von 30 μ g wurde nur ein geringfügig milderer Verlauf der Arthritis beobachtet, während die Gabe von 100 μ g einen deutlicheren Effekt auf die klinische Symptomatik ausübte. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Menge der applizierten TNF- α blockierenden Substanzen von erheblicher Bedeutung für die Behandlungserfolge sind.

Es gibt viele Beispiele in anderen Tiermodellen, welche die große Bedeutung von TNF- α in der Arthritispathogenese zeigen. Im Modell der CIA konnte beispielsweise nach der Behandlung mit anti-TNF- α eine deutliche Verbesserung der klinischen Symptomatik beobachtet werden (Williams et al. 1992, Thorbecke et al. 1992). Zeitgleich generierte die Gruppe um Kollias eine für humanes TNF- α transgene Maus, welche unter anderem eine erosive Polyarthritits entwickelte (Keffer et al. 1991). Durch Transfer von Serum aus erkrankten K/BxN Mäusen in TNF- α ^{-/-} Mäusen

konnte die Arbeitsgruppe von Mathis eine Bedeutung von TNF- α in der Pathogenese dieses Arthritismodells zeigen (Ji et al. 2002). Während der Induktionsphase konnte allerdings im K/BxN Modell durch Gabe eines TNF- α Antikörpers kein protektiver Effekt nachgewiesen werden (Kyburz et al. 2000), wobei die verwendete Antikörperdosis relativ gering erscheint.

Im SKG Modell wurde kürzlich versucht, die Bedeutung von einigen proinflammatorischen Zytokinen für die Entstehung der Arthritis aufzuschlüsseln. Dabei konnte gezeigt werden, dass pathogeneserelevantes TNF- α nicht nur von CD4⁺ T-Zellen, sondern auch von Zellen des angeborenen Immunsystems produziert wurde (Hirota et al. 2007).

Nach Blockade mit anti-ICOSL wurde im Modell der CIA die mRNA Expression für TNF- α in den Gelenken untersucht, wobei nach Applikation des Antikörpers die Bandenstärke für TNF- α reduziert war (Iwai et al. 2002). In ICOS^{-/-} Mäusen konnte im Vergleich mit Wildtyptieren nach Immunisierung mit CII kein Unterschied der TNF- α Produktion durch *in vitro* Stimulation festgestellt werden (Nurieva et al. 2003).

Die Behandlung mit anti-ICOSL in meinen Untersuchungen zeigte keinen direkten Einfluss auf die TNF- α Produktion der aktivierten CD4⁺ T-Zellen. Indirekte Effekte könnten einen Einfluss auf die Gesamtmenge des produzierten TNF- α haben, denn es wäre beispielsweise eine Modulation der TNF- α Produktion durch Makrophagen denkbar. Dies könnte ein Ansatzpunkt für weitergehende Experimente sein.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Rolle, die TNF- α in der Pathogenese der G6PI induzierten Arthritis spielt (wie durch Behandlung mit Etanercept gezeigt) für meine Blockadeexperimente mit anti-ICOSL so nicht abschließend geklärt werden konnte, da nur CD4⁺ T-Zellen betrachtet wurden. Weiterführende Untersuchungen zur Analyse der TNF- α Produktion von Nicht-CD4⁺ T-Zellen (die ICOSL positiv sein könnten) wären notwendig.

Kürzlich wurde eine weitere T-Zell Subpopulation, die sogenannten Th17 Zellen, definiert (Park et al. 2005, Weaver et al. 2006, Weaver et al. 2007). Diese Th17 Zellen, welche unter anderem IL-17 produzieren, sind für die Arthritispathogenese von großer Bedeutung (McInnes und Schett 2007, Murphy et al. 2003). In der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten wurde IL-17 detektiert und T-Zellklone, die aus RA-Patienten gewonnen und expandiert wurden, exprimierten IL-17 (Aarvak et al. 1999, Ziolkowska et al. 2000). IL-17 kann in Fibroblasten die Produktion von

Chemokinen induzieren. Beispielsweise können auf diese Art aktivierte Synoviozyten die Migration von neutrophilen Granulozyten ins Gelenk verursachen. Weiterhin steigert IL-17 die Produktion von einigen proinflammatorischen Zytokinen, wie IL-6, TNF- α und IL-1 β (Weaver et al. 2007).

In meinen Untersuchungen konnte ich sowohl im *ELISA* wie auch in anschließenden intrazellulären Messungen eine hohe IL-17 Produktion meiner erkrankten Tiere nachweisen. Die Synthese von IL-17 erreichte am Tag 9 ihr Maximum, was im zeitlichen Vergleich deutlich vor dem Erreichen des Krankheitsgipfels (Tag 15) lag. Bemerkenswert war, dass in beiden verwendeten Analyseverfahren ein deutlicher Unterschied in der IL-17 Konzentration zwischen der anti-ICOSL behandelten und der unbehandelten Gruppe zu finden war. Die quantitative Messung der IL-17 Produktion zeigte deutlich mehr Zytokinsekretion der Kulturzellen aus Tieren der Kontrollgruppe als der behandelten Gruppe. Auch die intrazelluläre Analyse der IL-17 Produktion zeigte an Tag 6 und Tag 9 deutlich höhere Werte für die Kontrollgruppe. Bei der mathematischen Berechnung der Signifikanz ergab sich ein p-Wert < 0,001 (hoch signifikant).

Das IL-17 auch in anderen Arthritis-Tiermodellen eine Rolle spielt, wurde beispielsweise im CIA Modell gezeigt. Nach Immunisierung mit CII entwickelten IL-17^{-/-} Mäuse eine Arthritis mit geringerer Inzidenz als die Kontrolltiere (Nakae et al. 2003). Wurden im AIA Arthritismodell IFN- γ ^{-/-} Mäuse mit einem blockierenden anti-IL-17 Antikörper behandelt, so erkrankten diese weniger heftig als die entsprechenden Kontrolltiere (Irmiler et al. 2007). Auch die Entwicklung einer autoimmunen Arthritis in SKG Mäusen hängt stark von der Menge der IL-17 produzierenden CD4⁺ T-Zellen ab (Hirota et al. 2007). Weiterhin wurde in IL-17R^{-/-} Mäusen gezeigt, dass nach intraartikulärer Injektion von Streptokokkenwandbestandteilen die chronische Phase der Synovitis verhindert werden konnte (Lubberts et al. 2005). Die Gruppe um Nurieva hat in ICOS^{-/-} Mäusen, die nach CII Immunisierung keine CIA entwickelten, eine verminderte IL-17 Produktion nachweisen können. Zusätzlich zeigten detaillierte *in vitro* Untersuchungen, dass durch die Zugabe eines stimulierenden anti-ICOS Antikörpers die Produktion von IL-17 in Milzzellen aus Wildtyptieren verdoppelt werden konnte (Nurieva et al. 2003). Weitergehende Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe ergaben bei *ex vivo* Restimulation von KLH immunisierten Tieren eine deutlich verminderte IL-17 Produktion in ICOS^{-/-} Tieren (Park et al. 2005).

Zusammenfassend könnte man postulieren, dass initial zur Entwicklung der antigenspezifischen CD4⁺ Th17-Zellen benötigtes IL-6 von Nicht-CD4⁺ T-Zellen produziert wurde. Durch Behandlung mit anti-ICOSL Antikörper wurde die Population der antigenspezifischen CD4⁺ Effektorzellen beeinflusst, denn meine Untersuchungen zeigten einen deutlichen Unterschied in der Menge des produzierten IL-17. Denkbar wäre, dass die verminderte IL-17 Konzentration nach ICOSL Blockade die Produktion proinflammatorischer Zytokine, wie beispielsweise TNF- α oder IL-1, in Zellen des angeborenen Immunsystems verringert.

Ich habe mich in meiner Untersuchung primär auf die Rolle der CD4⁺ T-Zellen konzentriert, da aus Vorarbeiten bekannt war, dass eine depletierende anti-CD4⁺ Antikörper Behandlung den Krankheitsverlauf der G6PI Arthritis hemmt (Schubert et al. 2004). Weiterführende Experimente zur näheren Charakterisierung von Nicht-CD4⁺ T-Zellen wären von Interesse. In diesem Zusammenhang könnten Effekte entweder durch eine verminderte CD4⁺ T-Zellaktivierung (IL-17) vermittelt werden, oder aber der blockierende anti-ICOSL Antikörper könnte direkt auf Zellen des angeborenen Immunsystems wirken (Chen 2004).

6.4.3 Charakterisierung der Zytokinproduktion ICOS⁺ T-Zellen

Weitergehende Experimente nach Analyse der klinischen Effekte der anti-ICOSL Behandlung ergaben nur in der IL-17 Produktion der CD4⁺ T-Zellen einen deutlichen Unterschied. Deswegen war es von Interesse die Korrelation zwischen ICOS Expression auf CD4⁺ T-Zellen und der IL-17 Produktion zu untersuchen.

ICOS wird im Gegensatz zu CD28 nach Aktivierung von T-Effektorzellen und -Gedächtniszellen verstärkt exprimiert. In den ersten Publikationen zur ICOS Expression gab es deutliche Hinweise auf ein verstärktes Vorkommen von ICOS auf Th2-Zellen sowie IL-10 produzierenden Zellen mit regulatorischen Funktionen (Hutloff et al. 1999, Dong et al. 1999). Weitergehende Untersuchungen ergaben eine Bedeutung von ICOS auch für Th1-Zellen (Sperling und Bluestone 2001). Werden *in vitro* generierte T-Helferzellenpopulationen ICOS vermittelt restimuliert, so wird die Produktion des jeweilig charakteristischen Zytokinmusters induziert. So produzierten beispielsweise Th1-Zellen IFN- γ , Th2-Zellen IL-4, IL-10, IL-5 und IL-13 und Th17-Zellen IL-17 (van Berkel und Oosterwegel 2006).

In einer Publikation von Löhning et al. (2003) wurde die Intensität der ICOS Expression auf der Oberfläche von CD4⁺ T-Zellen mit den produzierten Zytokinen in Beziehung gesetzt. Dazu wurden Zellen aus BALB/c Mäusen mit ICOS Antikörper gefärbt und an Hand ihrer ICOS Expression sortiert. Nach Stimulation dieser Zellfraktionen konnte die Intensität der ICOS Expression der CD4⁺ Zellen berechnet und im Zusammenhang mit der Prozentzahl der zytokinproduzierenden Zellen dargestellt werden: TNF- α wurde zumeist von ICOS negativen Zellen produziert, während IL-2, IFN- γ und GM-CSF von ICOS intermediär exprimierenden Zellen hergestellt wurden. Auf IL-5, IL-13 und IL-4 produzierenden Zellen wurde ICOS stärker exprimiert, die stärkste ICOS Expression konnte auf IL-10 produzierenden Zellen beobachtet werden (Löhning et al. 2003). Diese Beziehung zwischen ICOS Expression und Zytokinproduktion von CD4⁺ T-Zellen konnte sich durch unterschiedliche Stimuli verschieben. Dies wurde für IL-2, IL-10 und IFN- γ nach Infektion mit *Schistosoma mansoni* und *Toxoplasma gondii* und in einem Mausmodell für chronisch entzündliche Darmerkrankungen gezeigt (Bonhagen et al. 2003). Bislang wurden noch keine Untersuchungen zur Koexpression von ICOS und IL-17 durchgeführt. Meine Untersuchungen zu dieser Fragestellung ergaben, dass ICOS^{high} oder ICOS^{intermediäre} CD4⁺ T-Zellen die Produzenten von IL-17 sind.

Es gibt Hinweise darauf, dass die ICOS Expression für eine längere Überlebensdauer von T-Zellen nach Antigenkontakt steht (A. Hutloff; persönliche Mitteilung). Durch ICOS Stimulation konnte die Expression von für das Überleben von Zellen wichtigen Genen wie beispielsweise Bcl-X_L und A1 induziert werden (van Berkel und Oosterwegel 2006, Lutz et al. 2007). Daraus ergibt sich als Hypothese, dass die ICOS Expression nicht im direkten Zusammenhang mit einer spezifischen T-Helferzellpopulation steht, sondern das ICOS von längerlebigen T-Gedächtniszellen nach Antigenkontakt exprimiert wird. Innerhalb dieser T-Zellpopulation könnten sich somit auch die jeweilig für die Pathogenese relevanten zytokinproduzierenden Zellen befinden. Daher wäre denkbar, dass ICOS ein potentiell interessantes Zielmolekül für die Modulation dieser speziellen T-Zellpopulation sein könnte.

Eine deutliche Beeinflussung der IL-17 Produktion war in dem hier untersuchten Modell nach anti-ICOSL Blockade nachweisbar. In vielen anderen Mausmodellen

konnte gezeigt werden, dass IL-17 ein entscheidendes Zytokin in der Arthritispathogenese dieser Modelle ist (Hirota et al. 2007, Lubberts et al. 2005). Es ist denkbar, dass auch in diesen Modellen die ICOS^{high} T-Gedächtniszellen die IL-17 produzierenden Zellen sein könnten. Möglicherweise könnte auch in diesen Modellen durch Blockade der Interaktion mit ICOSL die IL-17 Produktion reduziert werden.

In einer der beiden früheren Arbeiten zur Rolle von ICOS im Modell der CIA wurde die IL-17 Produktion nicht untersucht (Iwai et al. 2002). Auch die Arbeiten zur Rolle von ICOS im Modell der EAE stammen aus einer Zeit in der die entscheidende Bedeutung von IL-17 für die Pathogenese noch nicht bekannt war (Rottman et al. 2001, Dong et al. 2001). Eine Betrachtung der Korrelation von ICOS mit der Produktion von IFN- γ ohne IL-17 macht es aus heutiger Sicht schwierig, die Ergebnisse dieser Arbeiten vollständig zu interpretieren.

Die Ergebnisse meiner Arbeit lassen weiterführende Arbeiten zum Einfluss der ICOS-ICOSL Interaktion auf die IL-17 Produktion durchaus interessant erscheinen.

7 Schlussfolgerungen

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigen, dass eine frühzeitige Blockade der ICOS-ICOSL Interaktion zu einem massiv abgeschwächten Verlauf der G6PI Arthritis führt. Neben ICOS gehört zur CD28-Familie auch das inhibitorisch wirkende Molekül CTLA4, mit dem als rekombinant hergestelltem Fusionsprotein (Abatacept®), bereits viel versprechende Blockadeexperimente in RA Patienten durchgeführt wurden. Die Kombination von *Biologicals* mit MTX erzielte generell bessere Behandlungserfolge als eine Monotherapie, während die Verwendung zweier *Biologicals* keine Heilung oder Verbesserung der Therapieerfolge erbrachte, dafür allerdings ein höheres Infektionsrisiko entstand (Smolen et al. 2007). Diese Ergebnisse zeigen, dass durch Kombinationen Modulationen des Krankheitsverlaufs erzielt werden können, wobei der derzeitige Kenntnisstand nicht ausreicht, um zielgerichtet synergistisch wirkende protektive Effekte zu erreichen. Deshalb ist ein tiefgreifendes Verständnis der zu Grunde liegenden Mechanismen von entscheidender Bedeutung, wozu weitere Forschungen notwendig sind. Daraus könnten Therapiemöglichkeiten resultieren, die eher zu einer vollständigen Heilung als zu einer Progressionverhinderung der Erkrankung führen, was dann die deutlich höheren Kosten einer Therapie mit *Biologicals* rechtfertigen könnte.

Die Ergebnisse meiner Untersuchungen könnten ein Erfolg versprechender Beginn einer generellen Eignung der ICOS-ICOSL Blockade für einen theoretisch möglichen Einsatz als *Biological* sein. Bei Blockade von ICOSL konnte im Tierexperiment eine deutlich verminderte IL-17 Produktion der CD4⁺ Zellen nachgewiesen werden.

Sowohl im Tiermodell als auch im Menschen wurde kürzlich die wichtige Rolle von IL-17 für die Arthritisinduktion beschrieben. Dieses Zytokin, welches auch in der Synovialflüssigkeit von RA Patienten detektiert werden konnte, ist unter anderem für die Aktivierung der Synoviozyten von großer Bedeutung. Eine Kombination der Blockaden von TNF- α und IL-17 wäre nach heutigem Stand der Forschung viel versprechend. Aus meinen Untersuchungen ergeben sich Anhaltspunkte dafür, dass die Blockade der ICOS-ICOSL Interaktion einen Einfluss auf die antigenspezifischen zytokinproduzierenden CD4⁺ T-Zellen ausübt.

Diese Zusammenhänge sollten in weiterführenden Experimenten näher charakterisiert werden.

Die Bedeutung von IL-17 auf die Pathogenese der Arthritis könnte durch Applikation eines IL-17 Antikörper in G6PI immunisierte Mäuse verifiziert werden. Wenn die Hypothese richtig sein sollte, dass die klinischen Effekte der ICOSL Blockade auf die Beeinflussung der antigenspezifischen IL-17 (\pm TNF- α) produzierenden Zellen zurück zu führen sind, dann müssten ähnliche klinische Effekte bei IL-17 Antikörperblockade auftreten.

Zukünftige Untersuchungen sollten eine Charakterisierung der Effektorzellpopulationen im Gelenk einschließen, da hier auch die für die klinischen Manifestationen entscheidenden Pathogenesevorgänge ablaufen. Hier würden sich beispielsweise immunhistochemische Analysen von Gelenkschnitten anbieten. ICOS⁺, IL-17 produzierende Zellen könnten nach unterschiedlichen Behandlungskonzepten angefärbt und anschließend ausgezählt werden.

8 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.
- Ahmadzadeh M, Hussain SF, Farber DL. 1999. Effector CD4 T Cells Are Biochemically Distinct from the Memory Subset: Evidence for Long-Term Persistence of Effectors In Vivo. *Journal of Immunology*, 163:3053-3063.
- Akiba H, Takeda K, Kojima Y, Usui Y, Harada N, Yamazaki T, Ma J, Tezuka K, Yagita H, Okumura K. 2005. The role of ICOS in the CXCR5+ follicular B helper T cell maintenance in vivo. *J Immunol*, 175 (4):2340-2348.
- Alonzi T, Fattori E, Lazzaro D, Costa P, Probert L, Kollias G, De Benedetti F, Poli V, Ciliberto G. 1998. Interleukin 6 is required for the development of collagen-induced arthritis. *J Exp Med*, 187 (4):461-468.
- Atsumi T, Ishihara K, Kamimura D, Ikushima H, Ohtani T, Hirota S, Kobayashi H, Park SJ, Saeki Y, Kitamura Y, Hirano T. 2002. A point mutation of Tyr-759 in interleukin 6 family cytokine receptor subunit gp130 causes autoimmune arthritis. *J Exp Med*, 196 (7):979-990.
- 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.
- Beutler B, Cerami A. 1989. The biology of cachectin/TNF--a primary mediator of the host response. *Annu Rev Immunol*, 7:625-655.
- Bockermann R, Schubert D, Kamradt T, Holmdahl R. 2005. Induction of a B-cell-dependent chronic arthritis with glucose-6-phosphate isomerase. *Arthritis Res Ther*, 7 (6):R1316-1324.
- Bongartz T, Sutton AJ, Sweeting MJ, Buchan I, Matteson EL, Montori V. 2006. Anti-TNF antibody therapy in rheumatoid arthritis and the risk of serious infections and malignancies: systematic review and meta-analysis of rare harmful effects in randomized controlled trials. *Jama*, 295 (19):2275-2285.
- Bonhagen K, Liesenfeld O, Staderker MJ, Hutloff A, Erb K, Coyle AJ, Lipp M, Kroczeck RA, Kamradt T. 2003. ICOS+ Th cells produce distinct cytokines in different mucosal immune responses. *Eur J Immunol*, 33 (2):392-401.
- Bossaller L, Burger J, Draeger R, Grimbacher B, Knoth R, Plebani A, Durandy A, Baumann U, Schlesier M, Welcher AA, Peter HH, Warnatz K. 2006. ICOS deficiency is associated with a severe reduction of CXCR5+CD4 germinal center Th cells. *J Immunol*, 177 (7):4927-4932.
- Brackertz D, Mitchell GF, Mackay IR. 1977. Antigen-induced arthritis in mice. I. Induction of arthritis in various strains of mice. *Arthritis Rheum*, 20 (3):841-850.
- Brand DD, Kang AH, Rosloniec EF. 2003. Immunopathogenesis of collagen arthritis. *Springer Semin Immunopathol*, 25 (1):3-18.
- Breban MA, Moreau MC, Fournier C, Ducluzeau R, Kahn MF. 1993. Influence of the bacterial flora on collagen-induced arthritis in susceptible and resistant strains of rats. *Clin Exp Rheumatol*, 11 (1):61-64.
- Butte MJ, Keir ME, Phamduy TB, Sharpe AH, Freeman GJ. 2007. Programmed Death-1 Ligand 1 Interacts Specifically with the B7-1 Costimulatory Molecule to Inhibit T Cell Responses. *Immunity*, 27:111-122.

- 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.
- Chen L. 2004. CO-INHIBITORY MOLECULES OF THE B7-CD28 FAMILY IN THE CONTROL OF T-CELL IMMUNITY. *Nature Reviews Immunology*, 4:336-347.
- Chorus AM, Miedema HS, Boonen A, Van Der Linden S. 2003. Quality of life and work in patients with rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis of working age. *Ann Rheum Dis*, 62 (12):1178-1184.
- Coyle AJ, Lehar S, Lloyd C, Tian J, Delaney T, Manning S, Nguyen T, Burwell T, Schneider H, Gonzalo JA, Gosselin M, Owen LR, Rudd CE, Gutierrez-Ramos JC. 2000. The CD28-related molecule ICOS is required for effective T cell-dependent immune responses. *Immunity*, 13 (1):95-105.
- 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.
- De Vita S, Zaja F, Sacco S, De Candia A, Fanin R, Ferraccioli G. 2002. Efficacy of selective B cell blockade in the treatment of rheumatoid arthritis: evidence for a pathogenetic role of B cells. *Arthritis Rheum*, 46 (8):2029-2033.
- Dong C, Nurieva RI. 2003. Regulation of immune and autoimmune responses by ICOS. *J Autoimmun*, 21 (3):255-260.
- Dong C, Juedes AE, Temann UA, Shresta S, Allison JP, Ruddle NH, Flavell RA. 2001. ICOS co-stimulatory receptor is essential for T-cell activation and function. *Nature*, 409 (6816):97-101.
- Dong H, Zhu G, Tamada K, Chen L. 1999. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med*, 5 (12):1365-1369.
- Dorner T, Egerer K, Feist E, Burmester GR. 2004. Rheumatoid factor revisited. *Curr Opin Rheumatol*, 16 (3):246-253.
- Dumonde DC, Glynn LE. 1962. The production of arthritis in rabbits by an immunological reaction to fibrin. *Br J Exp Pathol*, 43:373-383.
- Durie FH, Fava RA, Foy TM, Aruffo A, Ledbetter JA, Noelle RJ. 1993. Prevention of collagen-induced arthritis with an antibody to gp39, the ligand for CD40. *Science*, 261 (5126):1328-1330.
- Fan PT, Leong KH. 2007. The use of biological agents in the treatment of rheumatoid arthritis. *Ann Acad Med Singapore*, 36 (2):128-134.
- Feldmann M. 2002. Development of anti-TNF therapy for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol*, 2 (5):364-371.
- Firestein GS. 2003. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature*, 423 (6937):356-361.
- Gonzalo JA, Tian J, Delaney T, Corcoran J, Rottman JB, Lora J, Al-garawi A, Kroccek R, Gutierrez-Ramos JC, Coyle AJ. 2001. ICOS is critical for T helper cell-mediated lung mucosal inflammatory responses. *Nat Immunol*, 2 (7):597-604.
- Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. 2005. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol*, 23:515-548.
- Gromnica-Ihle E, Ganser G, Genth E. 2001. Neue Erkenntnisse zum klinischen Verlauf ("outcome") rheumatischer Erkrankungen. *Internist* 42:237-249.
- Harrington LE, Mangan PR, Weaver CT. 2006. Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage. *Curr Opin Immunol*, 18 (3):349-356.

- Hirota K, Hashimoto M, Yoshitomi H, Tanaka S, Nomura T, Yamaguchi T, Iwakura Y, Sakaguchi N, Sakaguchi S. 2007. T cell self-reactivity forms a cytokine milieu for spontaneous development of IL-17⁺ Th cells that cause autoimmune arthritis. *J Exp Med*, 204 (1):41-47.
- Holmdahl R, Jansson L, Larsson A, Jonsson R. 1990. Arthritis in DBA/1 mice induced with passively transferred type II collagen immune serum. Immunohistopathology and serum levels of anti-type II collagen auto-antibodies. *Scand J Immunol*, 31 (2):147-157.
- Horai R, Saijo S, Tanioka H, Nakae S, Sudo K, Okahara A, Ikuse T, Asano M, Iwakura Y. 2000. Development of chronic inflammatory arthropathy resembling rheumatoid arthritis in interleukin 1 receptor antagonist-deficient mice. *J Exp Med*, 191 (2):313-320.
- Horai R, Nakajima A, Habiro K, Kotani M, Nakae S, Matsuki T, Nambu A, Saijo S, Kotaki H, Sudo K, Okahara A, Tanioka H, Ikuse T, Ishii N, Schwartzberg PL, Abe R, Iwakura Y. 2004. TNF-alpha is crucial for the development of autoimmune arthritis in IL-1 receptor antagonist-deficient mice. *J Clin Invest*, 114 (11):1603-1611.
- Hutloff A, Dittrich AM, Beier KC, Eljaschewitsch B, Kraft R, Anagnostopoulos I, Kroczeck RA. 1999. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature*, 397 (6716):263-266.
- 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.
- Irmeler IM, Gajda M, Bräuer R. 2007. Exacerbation of Antigen-Induced Arthritis in IFN-gamma Deficient Mice As a Result of Unrestricted IL-17 Response. *Journal of Immunology*, 179:6228-6236.
- Iwai H, Kozono Y, Hirose S, Akiba H, Yagita H, Okumura K, Kohsaka H, Miyasaka N, Azuma M. 2002. Amelioration of collagen-induced arthritis by blockade of inducible costimulator-B7 homologous protein costimulation. *J Immunol*, 169 (8):4332-4339.
- Jawaheer D, Li W, Graham RR, Chen W, Damle A, Xiao X, Monteiro J, Khalili H, Lee A, Lundsten R, Begovich A, Bugawan T, Erlich H, Elder JT, Criswell LA, Seldin MF, Amos CI, Behrens TW, Gregersen PK. 2002. Dissecting the Genetic Complexity of the Association between Human Leucocyte Antigens and Rheumatoid Arthritis. *American Journal of Human Genetics*, 71:585-594.
- Ji H, Pettit A, Ohmura K, Ortiz-Lopez A, Duchatelle V, Degott C, Gravallesse E, Mathis D, Benoist C. 2002. Critical roles for interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha in antibody-induced arthritis. *J Exp Med*, 196 (1):77-85.
- 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.
- Knoechel B, Lohr J, Kahn E, Bluestone JA, Abbas AK. 2005. Sequential development of Interleukin 2-dependent effector and regulatory T cells in response to endogenous systemic antigen. *Journal of experimental medicine*, 202 (10):1375-1386.
- Kollias G. 2005. TNF pathophysiology in murine models of chronic inflammation and autoimmunity. *Semin Arthritis Rheum*, 34 (5 Suppl1):3-6.
- 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.
- Korganow AS, Ji H, Mangialaio S, Duchatelle V, Pelanda R, Martin T, Degott C, Kikutani H, Rajewsky K, Pasquali JL, Benoist C, Mathis D. 1999. From

- systemic T cell self-reactivity to organ-specific autoimmune disease via immunoglobulins. *Immunity*, 10 (4):451-461.
- Kotake S, Sato K, Kim KJ, Takahashi N, Udagawa N, Nakamura I, Yamaguchi A, Kishimoto T, Suda T, Kashiwazaki S. 1996. Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptors in the synovial fluids from rheumatoid arthritis patients are responsible for osteoclast-like cell formation. *J Bone Miner Res*, 11 (1):88-95.
- 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.
- Kroczek RA, Mages HW, Hutloff A. 2004. Emerging paradigms of T-cell co-stimulation. *Curr Opin Immunol*, 16 (3):321-327.
- Kryczek I, Wei S, Vatan L, Escara-Wilke J, Szeliga W, Keller ET, Zou W. 2006. Opposite effects of IL-1 and IL-2 on the Regulation of IL-17+ T Cell Pool IL-1 Subverts IL-2-Mediated Suppression *Journal of Immunology*, 179:1423-1426.
- Kwan Tat S, Padrines M, Theoleyre S, Heymann D, Fortun Y. 2004. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev*, 15 (1):49-60.
- Kyburz D, Carson DA, Corr M. 2000. The role of CD40 ligand and tumor necrosis factor alpha signaling in the transgenic K/BxN mouse model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 43 (11):2571-2577.
- 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.
- Lapsley HM, March LM, Tribe KL, Cross MJ, Courtenay BG, Brooks PM. 2002. Living with rheumatoid arthritis: expenditures, health status, and social impact on patients. *Ann Rheum Dis*, 61 (9):818-821.
- Laurence A, Tato CM, Davidson TS, Kanno Y, Chen Z, Yao Z, Blank RB, Meylan F, Siegel R, Hennighausen L, Shevach EM, O'Shea J J. 2007. Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity*, 26 (3):371-381.
- Lens JW, van den Berg WB, van de Putte LB. 1984. Flare-up of antigen-induced arthritis in mice after challenge with intravenous antigen: studies on the characteristics of and mechanisms involved in the reaction. *Clin Exp Immunol*, 55 (2):287-294.
- Li P, Schwarz EM. 2003. The TNF-alpha transgenic mouse model of inflammatory arthritis. *Springer Semin Immunopathol*, 25 (1):19-33.
- Liang SC, Tan X-Y, 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. *Journal of experimental medicine*, 203 (10):2271-2279.
- Ling V, Wu PW, Finnerty HF, Bean KM, Spaulding V, Fouser LA, Leonard JP, Hunter SE, Zollner R, Thomas JL, Miyashiro JS, Jacobs KA, Collins M. 2000. Cutting edge: identification of GL50, a novel B7-like protein that functionally binds to ICOS receptor. *J Immunol*, 164 (4):1653-1657.

- Lipsky PE, van der Heijde DM, St Clair EW, Furst DE, Breedveld FC, Kalden JR, Smolen JS, Weisman M, Emery P, Feldmann M, Harriman GR, Maini RN. 2000. Infliximab and methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. Anti-Tumor Necrosis Factor Trial in Rheumatoid Arthritis with Concomitant Therapy Study Group. *N Engl J Med*, 343 (22):1594-1602.
- Lohning M, Hutloff A, Kallinich T, Mages HW, Bonhagen K, Radbruch A, Hamelmann E, Kroczeck RA. 2003. Expression of ICOS in vivo defines CD4⁺ effector T cells with high inflammatory potential and a strong bias for secretion of interleukin 10. *J Exp Med*, 197 (2):181-193.
- Lubberts E, Schwarzenberger P, Huang W, Schurr JR, Peschon JJ, van den Berg WB, Kolls JK. 2005. Requirement of IL-17 receptor signaling in radiation-resistant cells in the joint for full progression of destructive synovitis. *J Immunol*, 175 (5):3360-3368.
- Luross JA, Williams NA. 2001. The genetic and immunopathological processes underlying collagen-induced arthritis. *Immunology*, 103 (4):407-416.
- Lutz J, Lu R, Strobl M, Huang H, Deng M, Wang M, Ouyang N, Heemann U. 2007. ICOS/B7RP-1 Interference in Mouse Kidney Transplantation. *Transplantation*, 84 (2):223-230.
- Maccioni M, Zeder-Lutz G, Huang H, Ebel C, Gerber P, Hergueux J, Marchal P, Duchatelle V, Degott C, van Regenmortel M, Benoist C, Mathis D. 2002. Arthritogenic monoclonal antibodies from K/BxN mice. *J Exp Med*, 195 (8):1071-1077.
- Mahajan S, Cervera A, MacLeod M, Fillatreau S, Perona-Wright G, Meek S, Smith A, MacDonald A, Gray D. 2007. The role of ICOS in the development of CD4 T cell help and the reactivation of memory T cells. *Eur J Immunol*, 37 (7):1796-1808.
- Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO, Hatton RD, Wahl SM, Schoeb TR, Weaver CT. 2006. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature*, 441 (7090):231-234.
- Matsumoto I, Staub A, Benoist C, Mathis D. 1999. Arthritis provoked by linked T and B cell recognition of a glycolytic enzyme. *Science*, 286 (5445):1732-1735.
- McAdam AJ, Greenwald RJ, Levin MA, Chernova T, Malenkovich N, Ling V, Freeman GJ, Sharpe AH. 2001. ICOS is critical for CD40-mediated antibody class switching. *Nature*, 409 (6816):102-105.
- McAdam AJ, Chang TT, Lumelsky AE, Greenfield EA, Boussiotis VA, Duke-Cohan JS, Chernova T, Malenkovich N, Jabs C, Kuchroo VK, Ling V, Collins M, Sharpe AH, Freeman GJ. 2000. Mouse inducible costimulatory molecule (ICOS) expression is enhanced by CD28 costimulation and regulates differentiation of CD4⁺ T cells. *J Immunol*, 165 (9):5035-5040.
- McInnes IB, Schett G. 2007. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol*, 7 (6):429-442.
- Mittendorf T, Greiner W, Graf von der Schulenburg J-M. 2004. Die Bedeutung der Lebensqualität bei Rheumatoider Arthritis (RA). *Gesundheitsökonomisches Qualitätsmanagement*, 9:322-327.
- Mora JR, von Andrian UH. 2006. T-cell homing specificity and plasticity: new concepts and future challenges. *Trends in Immunology*, 27 (5):235-241.
- Muller-Ladner U, Pap T, Gay RE, Neidhart M, Gay S. 2005. Mechanisms of disease: the molecular and cellular basis of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol*, 1 (2):102-110.
- 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, Saijo S, Horai R, Sudo K, Mori S, Iwakura Y. 2003. IL-17 production from activated T cells is required for the spontaneous development of destructive arthritis in mice deficient in IL-1 receptor antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 (10):5986-5990.
- Nakazawa A, Dotan I, Brimnes J, Allez M, Shao L, Tsushima F, Azuma M, Mayer L. 2004. The expression and function of costimulatory molecules B7H and B7-H1 on colonic epithelial cells. *Gastroenterology*, 126 (5):1347-1357.
- 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*, 448:480-483.
- Nurieva RI. 2005. Regulation of immune and autoimmune responses by ICOS-B7h interaction. *Clin Immunol*, 115 (1):19-25.
- Nurieva RI, Treuting P, Duong J, Flavell RA, Dong C. 2003. Inducible costimulator is essential for collagen-induced arthritis. *J Clin Invest*, 111 (5):701-706.
- 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.
- Piguet PF, Grau GE, Vesin C, Loetscher H, Gentz R, Lesslauer W. 1992. Evolution of collagen arthritis in mice is arrested by treatment with anti-tumour necrosis factor (TNF) antibody or a recombinant soluble TNF receptor. *Immunology*, 77 (4):510-514.
- Rottman JB, Smith T, Tonra JR, Ganley K, Bloom T, Silva R, Pierce B, Gutierrez-Ramos JC, Ozkaynak E, Coyle AJ. 2001. The costimulatory molecule ICOS plays an important role in the immunopathogenesis of EAE. *Nat Immunol*, 2 (7):605-611.
- 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.
- Sasai M, Saeki Y, Ohshima S, Nishioka K, Mima T, Tanaka T, Katada Y, Yoshizaki K, Suemura M, Kishimoto T. 1999. Delayed onset and reduced severity of collagen-induced arthritis in interleukin-6-deficient mice. *Arthritis Rheum*, 42 (8):1635-1643.
- 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.
- Shilling RA, Bandukwala HS, Sperling AI. 2006. Regulation of T:B cell interactions by the Inducible Costimulator molecule: Does ICOS "induce" disease? *Clinical Immunology*, 121:13-18.
- Smolen JS, Steiner G. 2003. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Drug Discov*, 2 (6):473-488.
- Smolen JS, Aletaha D, Koeller M, Weisman MH, Emery P. 2007. New therapies for treatment of rheumatoid arthritis. *Lancet*.
- Spargo LD, Cleland LG, Wing SJ, Hawkes JS, Mayrhofer G. 2001. Characterization of thoracic duct cells that transfer polyarthritis. *Clinical Experimental Immunology*, 126 (3):560-569.
- Sperling AI, Bluestone JA. 2001. ICOS costimulation: It's not just for TH2 cells anymore. *Nat Immunol*, 2 (7):573-574.

- Steiner G, Shovman O, Skriner K, Gilburd B, Langevitz P, Miholits M, Hoet R, Levy Y, Zandman-Goddard G, Hoefler E, Smolen JS, Shoenfeld Y. 2002. Induction of anti-RA33 hnRNP autoantibodies and transient spread to U1-A snRNP complex of spliceosome by idiotypic manipulation with anti-RA33 antibody preparation in mice. *Clin Exp Rheumatol*, 20 (4):517-524.
- Swallow MM, Wallin JJ, Sha WC. 1999. B7h, a novel costimulatory homolog of B7.1 and B7.2, is induced by TNFalpha. *Immunity*, 11 (4):423-432.
- Tada Y, Nagasawa K, Ho A, Morito F, Ushiyama O, Suzuki N, Ohta H, Mak TW. 1999. CD28-deficient mice are highly resistant to collagen-induced arthritis. *J Immunol*, 162 (1):203-208.
- Terato K, Hasty KA, Reife RA, Cremer MA, Kang AH, Stuart JM. 1992. Induction of arthritis with monoclonal antibodies to collagen. *J Immunol*, 148 (7):2103-2108.
- Thorbecke GJ, Shah R, Leu CH, Kuruvilla AP, Hardison AM, Palladino MA. 1992. Involvement of endogenous tumor necrosis factor alpha and transforming growth factor beta during induction of collagen type II arthritis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89 (16):7375-7379.
- Trentham DE, Townes AS, Kang AH. 1977. Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis. *J Exp Med*, 146 (3):857-868.
- Turesson C, Weyand CM, Matteson EL. 2004. Genetics of rheumatoid arthritis: Is there a pattern predicting extraarticular manifestations? *Arthritis Rheum*, 51 (5):853-863.
- Union A, Meheus L, Humbel RL, Conrad K, Steiner G, Moereels H, Pottel H, Serre G, De Keyser F. 2002. Identification of citrullinated rheumatoid arthritis-specific epitopes in natural filaggrin relevant for antifilaggrin autoantibody detection by line immunoassay. *Arthritis Rheum*, 46 (5):1185-1195.
- van Berkel ME, Oosterwegel MA. 2006. CD28 and ICOS: similar or separate costimulators of T cells? *Immunol Lett*, 105 (2):115-122.
- 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.
- Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR, Harrington LE. 2007. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol*, 25:821-852.
- Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, Murphy KM. 2006. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity*, 24 (6):677-688.
- Webb LM, Walmsley MJ, Feldmann M. 1996. Prevention and amelioration of collagen-induced arthritis by blockade of the CD28 co-stimulatory pathway: requirement for both B7-1 and B7-2. *Eur J Immunol*, 26 (10):2320-2328.
- Williams RO, Feldmann M, Maini RN. 1992. Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89 (20):9784-9788.
- Yoshinaga SK, Whoriskey JS, Khare SD, Sarmiento U, Guo J, Horan T, Shih G, Zhang M, Coccia MA, Kohno T, Tafuri-Bladt A, Brankow D, Campbell P, Chang D, Chiu L, Dai T, Duncan G, Elliott GS, Hui A, McCabe SM, Scully S, Shahinian A, Shaklee CL, Van G, Mak TW, Senaldi G. 1999. T-cell co-stimulation through B7RP-1 and ICOS. *Nature*, 402 (6763):827-832.
- Yoshioka T, Nakajima A, Akiba H, Ishiwata T, Asano G, Yoshino S, Yagita H, Okumura K. 2000. Contribution of OX40/OX40 ligand interaction to the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol*, 30 (10):2815-2823.

Ziolkowska M, Koc A, Luszczkiewicz G, Ksiezopolska-Pietrzak K, Klimczak E, Chwalinska-Sadowska H, Maslinski W. 2000. High levels of IL-17 in rheumatoid arthritis patients: IL-15 triggers in vitro IL-17 production via cyclosporin A-sensitive mechanism. *J Immunol*, 164 (5):2832-2838.

9 Anhang

Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtsdatum: 14.10.1982 in Zeulenroda
 Staatsangehörigkeit: deutsch
 Familienstand: ledig

Lebenslauf

1989 – 1993	Grundschule Hohenleuben
1993 – 1999	Friedrich-Schiller-Gymnasium Zeulenroda
1999 – 2000	Highschool Year in den USA
2000 – 2002	Gymnasiale Oberstufe am Friedrich-Schiller Gymnasium Zeulenroda
2002	allgemeine Hochschulreife
Oktober 2002 – Juni 2009	Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
	<ul style="list-style-type: none"> - Famulatur im Krankenhaus Bozen, Italien - Famulatur im Tygerberg Hospital, University of Stellenbosch, South Africa
Oktober 2005 – April 2006	IZKF-Promotionsstipendium
	<ul style="list-style-type: none"> - Dissertation am Institut für Immunologie der FSU Jena: Modulation der Glukose-6-Phosphat Induzierten Arthritis durch die Blockade von ICOS Ligand

Jena, den 19.06.2009

Juliane Meisel

Danksagung

Für die Möglichkeit der Promotion und deren wissenschaftliche Betreuung möchte ich Herrn Prof. Dr. Thomas Kamradt danken.

Besonderer Dank gebührt Frau Dr. Kerstin Bonhagen für die stetige fachliche Unterstützung und konstruktive Diskussionen, sowie die zahlreichen persönlichen Gespräche.

Frau Dr. Sylvia Heink möchte ich für das Korrekturlesen und die vielen aufbauenden Worte danken sowie allen Mitarbeitern des Instituts für Immunologie, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Des Weiteren möchte ich danken: Herrn Prof. Dr. Richard KroczeK und Dr. Andreas Hutloff, Robert-Koch-Institut Berlin, für die Bereitstellung der Antikörper und die guten Ratschläge; Frau Gabriele Fernahl und Herrn Dr. Lars Morawietz, Charité, Universitätsmedizin Berlin für die histologische Präparation und Beurteilung; der AG Bräuer für die Bereitstellung der Zytokin *ELISA*.

Für ihre Geduld und tatkräftige Unterstützung in den letzten Monaten möchte ich mich bei Sven und meinen Freunden bedanken. Meiner Familie danke ich dafür, dass sie mich immer wieder daran erinnern wer ich bin, woher ich komme und das sie den Glaube an mich nie verlieren.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass

- mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,
- ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,
- mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Prof. Dr. Thomas Kamradt

Dr. med. vet. Kerstin Bonhagen

Dr. rer. nat. Sylvia Heink

Dr. med. Lars Morawietz

- die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,
- dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und
- dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 19.06.2009

Juliane Meisel