

„ Pathogenese und Modulation
der Glukose-6-phosphat-Isomerase-
induzierten Arthritis“

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr.rer.nat.)

eingereicht an der

Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät

der

Friedrich-Schiller-Universität Jena

von

Dipl.-Biochem. Lisa Bruns

geboren am 15.Juli 1975 in Oldenburg

Jena, 2009

Gutachter:

1. Prof. Dr. Jürgen Bolz

Institut für Allgemeine Zoologie und Tierphysiologie, Friedrich-Schiller
Universität, Jena

2. Prof. Dr. Thomas Kamradt

Institut für Immunologie, Friedrich-Schiller-Universität, Jena

3. Prof. Dr. Gottfried Alber

Institut für Immunologie, Universität Leipzig

Tag der öffentlichen Verteidigung:

01.03.2010

"Sure he was great...

but she did anything he did...

backwards and on high heels!"

about Fred Astaire and Ginger Rogers by Bob Thaves

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	8
1.1. Rheumatoide Arthritis	8
1.1.1. T-Zellen in der Pathogenese der RA	10
1.1.2. B-Zellen in der Pathogenese der RA	12
1.1.3. Therapie der RA	13
1.2. Tiermodelle für die RA	14
1.2.1. Die Kollagen-induzierte Arthritis (CIA)	15
1.2.2. Die K/BxN-Arthritis	16
1.2.3. Die Glukose-6-phosphat Isomerase-induzierte Arthritis	18
1.3. Th17-Zellen	20
1.4. Zielsetzung der Arbeit	23
2. Material und Methoden	24
2.1. Biologisches Material	24
2.1.1. Mäuse	24
2.1.2. Bakterienstämme	24
2.2. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	24
2.2.1. Chemikalien	24
2.2.2. Kits	24
2.2.3. Verbrauchsmaterialien	24
2.3. Antikörper	25
2.3.1. Antikörper für die Durchflusszytometrie	25
2.3.2. Antikörper für ELISA	26
2.3.3. Antikörper und Proteine für <i>in vivo</i> Experimente	26
2.4. Peptide	27
2.5. Geräte	27
3. Methoden	28
3.1. Methoden der Proteinbiochemie	28
3.1.1. Heterologe Proteinexpression in <i>E.coli</i>	28
3.1.2. Affinitätschromatographie von Proteinen mit His ₆ -Tag	28
3.1.3. Affinitätschromatographie über Protein G zur Aufreinigung von Antikörpern	29
3.1.4. Kopplung von Antikörpern	29
3.1.4.1. Biotinylierung von Antikörpern	29
3.1.4.1. Kopplung von Fluorochromen (Dye647) an Antikörper	30
3.1.5. SDS-PAGE	30
3.1.6. Western-Blot	31
3.1.7. <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ELISA)	32
3.1.7.1. Isotypspezifischer ELISA	32
3.1.7.2. Bestimmung von G6PI-spezifischem Gesamt-IgG	32
3.1.7.3. Zytokin-ELISA	33
3.2. Methoden der Zellbiologie	34
3.2.1. Zellkultur	34
3.2.2. Gewinnung von Lymphozyten aus Milz und Lymphknoten	34
3.2.3. Gewinnung von Zellen aus dem Blut	34
3.2.4. <i>In-vitro</i> -Proliferationsassay mit [³ H]-Thymidin	35
3.2.5. Messung der <i>in-vivo</i> -Proliferation durch BrdU-Inkorporation	35
3.2.6. Durchflusszytometrie	35
3.2.6.1. Oberflächenfärbung	36

3.2.6.2. Intrazelluläre Färbung	37
3.2.6.3. BrdU-Färbung	40
3.2.8. MACS	41
3.3. Tierversuche	42
3.3.1. Induktion der G6PI-induzierten Arthritis und Ermittlung des klinischen Index	42
3.3.2. Serumgewinnung	43
3.3.3. Intraperitoneale Applikation von Antikörpern	43
3.3.3.1. Depletion von B-Zellen mit anti-CD22-Cal	43
3.3.4. Histologie	44
3.3.5. Hämatoxylin und Eosin-Färbung eines Blutausstriches zur Verifizierung der Neutrophilen-Depletion	44
3.3.6. Statistische Auswertung und Darstellung	44
3. Ergebnisse	45
3.1. Pathogenetische Relevanz der Th17-Zellen in der G6PI-induzierten Arthritis	45
3.1.1. <i>In vivo</i> Proliferation von CD4 ⁺ T-Zellen	45
3.1.2. Kinetik der Expression von IL-17A in der G6PI-induzierten Arthritis	45
3.1.3. Th17-Zytokine und polyfunktionale T-Zellen in der G6PI-induzierten Arthritis	46
3.1.4. Blockade von IL-17, TNF- α , IFN- γ und IL-23p19 in der G6PI-induzierten Arthritis	55
3.2. Immunodominante T-Zellepitope in der G6PI-induzierten Arthritis	59
3.2.1. Mapping von T-Zell-Epitopen	59
3.2.2. Immunodominante Peptide G6PI ₈₅₋₉₉ und G6PI ₄₆₉₋₄₈₃	61
3.2.3. Induktion der Arthritis durch Immunisierung mit G6PI ₈₅₋₉₉ oder G6PI ₄₆₉₋₄₈₃	62
3.2.4. Histopathologie	63
3.2.5. Zytokin-Produktion in der Peptid-induzierten Arthritis	64
3.2.6. G6PI-spezifische Antikörper in der Peptid-induzierten Arthritis	66
3.3. G6PI-induzierte Arthritis in SJL-Mäusen	67
3.3.1. Klinischer Verlauf und Histopathologie der G6PI-induzierten Arthritis in SJL-Mäusen	67
3.3.2. G6PI-induzierte Arthritis in SJL-RAG ^{-/-} -Mäusen	69
3.3.3. <i>In vivo</i> Proliferation von CD4 ⁺ T-Zellen in SJL-Mäusen und Depletion von CD4 ⁺ T-Zellen	69
3.3.4. Depletion von neutrophilen Granulozyten in der G6PI-induzierten Arthritis von SJL-Mäusen	72
3.3.5. G6PI-spezifische Antikörper	73
3.3.6. Zytokin-Produktion in der G6PI-induzierten Arthritis in SJL-Mäusen	73
3.4. Rolle der B-Zellen in der G6PI-induzierten Arthritis	77
3.4.1. Neutrophile in der G6PI-induzierten Arthritis	77
3.4.2. Klinischer Effekt der Blockade des Fc γ RIV	79
3.4.3. Klinische Effekte der B-Zell-Depletion in der G6PI-induzierten Arthritis	79
3.4.4. G6PI-spezifische Antikörper nach Depletion der B-Zellen vor Induktion der Arthritis und in der Induktionsphase	84
3.4.5. Rolle der B-Zellen als APC: Zytokinproduktion und Proliferation nach Depletion der B-Zellen in der G6PI-induzierten Arthritis	85
4. Diskussion	89

4.1. Zusammenfassung	89
4.2 Pathogenetische Relevanz polyfunktioneller Th-Zellen in der G6PI-induzierten Arthritis	89
4.3. Induktion einer Arthritis durch ein autologes Peptid abgeleitet von G6PI	95
4.4. Die G6PI-induzierte Arthritis in SJL-Mäusen	98
4.5. B-Zellen: essentielle APC in der G6PI-induzierten Arthritis?	99
4.6. Ausblick	104
Summary	105
Abkürzungsverzeichnis	106
Literaturverzeichnis	110
Abbildungsverzeichnis	133
Tabellenverzeichnis	136
Wissenschaftliche Beiträge	137
Danksagung	139
Ehrenwörtliche Erklärung	141

1. Einleitung

1.1. Rheumatoide Arthritis

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist eine systemische, entzündliche Erkrankung, die vor allem die kleinen Gelenke der Hände und Füße betrifft. Typischerweise tritt die Erkrankung erstmalig im Alter von 40-70 Jahren auf. Insgesamt sind 1% der erwachsenen Weltbevölkerung an RA erkrankt, wobei Frauen dreimal so häufig betroffen sind wie Männer (Silman and Pearson, 2002).

Typische Symptome der RA sind Schmerzen, Morgensteifigkeit und Schwellung der peripheren Gelenke (proximale interphalangeale, metakarpophalangeale, metatarsophalangeale, Hand- und Sprunggelenke, aber auch Ellbogen-, Knie-, Schulter- und Hüftgelenke), die auf eine Synovitis in den Gelenken zurückzuführen ist. Typisch ist der symmetrische Befall der Gelenke. Als extraartikuläre Manifestationen können Rheumaknoten, Vaskulitis, Perikarditis, Myokarditis oder Vergrößerungen der Milz und Lymphknoten in der RA auftreten; auch Augen, Lunge und Leber können betroffen sein. Zusätzlich gehören Symptome wie Müdigkeit, Gewichtsverlust, Depressionen und Fieber zum klinischen Erscheinungsbild der RA. Der Krankheitsverlauf variiert von mild bis stark progressiv mit erhöhter Mortalität (Klareskog et al., 2009; Firestein, 2003; Lee and Weinblatt, 2001). Für die Diagnose der RA müssen vier der 1987 entwickelten sieben Kriterien (s. Tabelle 1) des *American College of Rheumatology* (ACR) zutreffen (Arnett et al., 1988).

Tabelle 1: Revidierte Kriterien des *American College of Rheumatology* (ACR) zur Klassifizierung der RA (Arnett et al., 1988)

Kriterium	Befund
Morgensteifigkeit der Gelenke (> 1h)	> 6 Wochen
Arthritis mit tastbarer Schwellung in mind. 3 Gelenkregionen	> 6 Wochen
Arthritis an Hand- oder Fingergelenken	> 6 Wochen
Symmetrische Arthritis	> 6 Wochen
Rheumaknoten	vorhanden
Rheumafaktor	positiv
Veränderungen im Röntgenbild (Osteopenie und/oder Erosionen)	vorhanden

Es sind noch viele Fragen bezüglich der Ätiologie und der Pathogenese der RA unbeantwortet. Man vermutet eine autoimmune Pathogenese für die RA: bei 80 % der Patienten treten Rheumafaktoren (RF) auf. Rheumafaktoren sind Autoantikörper, zumeist IgM Antikörper, die den Fc-Teil von IgG Antikörpern erkennen. In der RA sind RF mit einem aggressiveren Verlauf der Erkrankung assoziiert (Firestein, 2003). Es wurden auch Autoantikörper spezifisch für andere Kandidatenautoantigene der RA gefunden, z.B. für Kollagen II (CII), Aggrekan, Chondrozyten-Antigen und HC gp-39 (*human cartilage glycoprotein-39*), mikrobielle Antigene wie *heat shock protein 60* (hsp60), EBV-Transaktivatoren und *E.coli dnaJ* und andere (ubiquitäre) Antigene wie Immunglobuline, Glukose-6-phosphat-Isomerase (G6PI), Aldolase, α -Enolase, *far upstream binding protein 1* und 2, Phosphoglyceratkinase, *stress-*

induced phosphoprotein 1, *heterogeneous nuclear ribonuclearprotein A2/B1* und *Fillagrin* (Goeb et al., 2009; reviewed in (Cope and Sonderstrup, 1998)). Zusätzlich konnten autoreaktive T-Zellen spezifisch für das Proteoglykan Aggrekan (de Jong et al., 2009) aber auch z.B. Kollagen II (reviewed in (Cope and Sonderstrup, 1998) in RA-Patienten detektiert werden. Auch in experimentellen Tiermodellen für die RA kann durch eine systemische Immunisierung sowohl mit nicht-gelenkspezifischen Antigenen (Jirholt et al., 2001; van den Berg et al., 2007) als mit gelenkspezifischen Antigenen wie heterologem Kollagen Typ II (Holmdahl et al., 2002), Kollagen Typ XI (Cremer et al., 1994), *cartilage oligomeric matrix protein* (Carlsen et al., 1998) und Proteoglykan (Glant et al., 2003) in kompletten Freundschem Adjuvans eine Arthritis induziert werden. Diese Befunde unterstützen die Hypothese der autoimmunen Pathogenese in der RA. Das Autoantigen in der RA ist unbekannt.

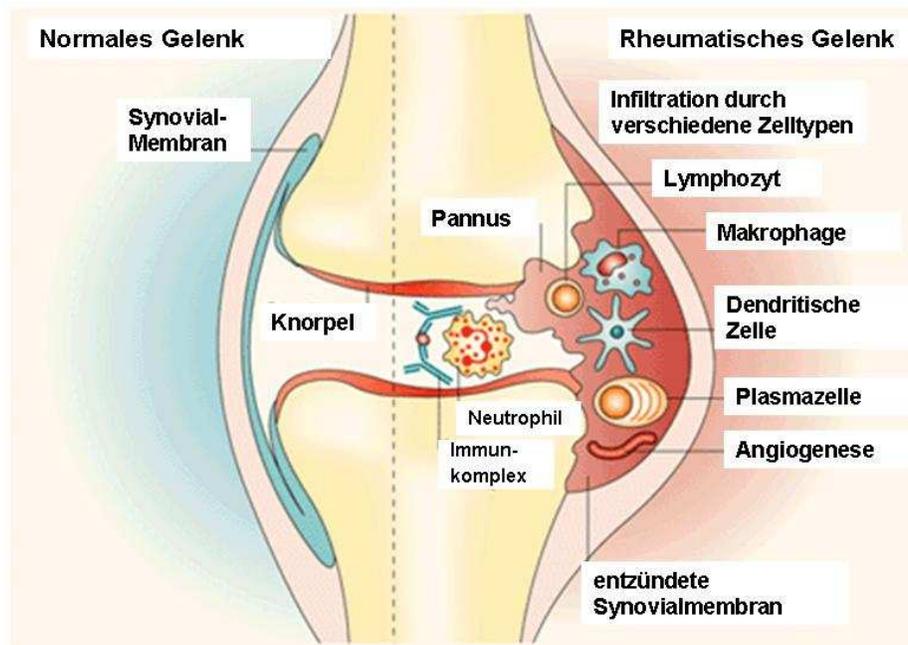


Abbildung 1: Vergleich zwischen einem normalen Gelenk und einem rheumatischen Gelenk (leicht verändert aus Feldman, Nature 2002): Im gesunden normalen Gelenk treffen die zwei Knochenenden aufeinander; der Knochen ist mit Knorpel überzogen; der Gelenkspalt ist frei und das gesamte Gelenk ist von der Gelenkkapsel umgeben. Die Synovialmembran ist im gesunden Gelenk dünn und ihre Deckzellschicht besteht aus einem bis drei Synoviozyten. Im Gegensatz dazu ist die Synovialmembran im rheumatischen Gelenk entzündet und hyperplasiert. Die Infiltration des Gelenks durch diverse Zelltypen wie Lymphozyten, Makrophagen, Dendritischen Zellen, Plasmazellen und Neutrophilen kann beobachtet werden. Es kommt zur Angiogenese und Pannusformation, der das Knorpel und Knochen des Gelenks zerstört.

Die RA ist eine komplexe, multifaktorielle Erkrankung (s. Abbildung 1): im rheumatoiden Gelenk ist die Synovialmembran entzündet; der Pannus, ein invasives Gewebe bestehend aus T-Zellen, B-Zellen, Plasmazellen sowie Makrophagen, Dendritischen Zellen (DC), Mastzellen und Osteoklasten, infiltriert die normalerweise azelluläre Synovialmembran und zerstört die Gelenkstrukturen (Sfikakis et al., 2005); teilweise ist die Bildung von Keimzentren-ähnlichen Strukturen zu beobachten; die zelluläre Hyperplasie der Synovialmembran hat ihre Ursache in der Zunahme an Makrophagen-ähnlichen und

Fibroblasten-ähnlichen Synoviozyten. Makrophagen und Fibroblasten exprimieren eine Reihe von degradierenden Enzymen, wie Matrixmetalloproteinasen, Serin-Proteasen und Aggrecanasen, die zu einer Zerstörung der extrazellulären Matrix führen; außerdem werden proinflammatorische Zytokine exprimiert, die zur Zerstörung der Gelenkstrukturen beitragen. Zusätzlich beobachtet man Angiogenese (Firestein, 2003; Lee and Weinblatt, 2001).

Der chronische Verlauf der RA und die damit einhergehenden destruktiven Veränderungen der betroffenen Gelenke führt zu einer stark eingeschränkten Lebensqualität und häufig zur Berufsunfähigkeit. Die aufwendigen Therapien verursachen enorme Kosten für das Gesundheitssystem (Michaud et al., 2003).

Intensive Studien von Tiermodellen der RA (s. Abschnitt 1.1.4.) ermöglichen ein tieferes Verständnis der immunologischen Prozesse in der Pathogenese der RA und bieten die Möglichkeit zur Entwicklung neuer weniger kostenintensiver Therapien.

1.1.1. T-Zellen in der Pathogenese der RA

CD4⁺ T-Zellen stellen einen der Hauptbestandteile des entzündlichen Infiltrats im rheumatoiden Gelenk dar (Van Boxel and Paget, 1975), was für eine wichtige Rolle von CD4⁺ T-Zellen in der Pathogenese der RA spricht. Darüber hinaus ist die RA mit dem Auftreten bestimmter HLA-Klasse-II-Allele assoziiert, vor allem HLA-DR1 und HLA-DR4 (Nepom et al., 1989). In den meisten Fällen ist die erhöhte Suszeptibilität mit dem HLA-DRB1 Locus assoziiert, v.a. mit den DRB1*0101, DRB1*0401, DRB1*0404 und DRB1*0405 Allotypen (Wordsworth et al., 1989). Diesen HLA-DR β -Ketten ist eine spezifische Aminosäure-Konsensus-Sequenz (QKRAA) in der dritten hypervariablen Region gemeinsam, das sogenannte „*shared epitope*“. Es konnte gezeigt werden, dass ein Aminosäureaustausch der Aminosäuren 67 bis 74 sowohl die Suszeptibilität für RA als auch den Schweregrad der Erkrankung beeinflussen kann (de Vries et al., 2002; du Montcel et al., 2005; Gourraud et al., 2006). Da die einzige bekannte Funktion von MHC-Klasse-II-Molekülen, wie HLA-DR, in der Antigenpräsentation für T-Lymphozyten besteht, spricht diese HLA-DR-Assoziation für eine direkte Beteiligung von CD4⁺ T-Zellen an der Pathogenese der RA.

Ein weiterer Locus, der die RA beeinflusst, ist das Gen *PTPN22* (*protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22*). *PTPN22* kodiert für Lyp, eine Tyrosin-Phosphatase, die in T-Lymphozyten exprimiert wird und die Signaltransduktion des T-Zellrezeptors (TCR) vermittelt (Pierer et al., 2006; van Oene et al., 2005). Eine Substitution von Tryptophan durch Arginin an Position 620 führt zu einer verminderten TCR-Signaltransduktion und somit zu einer verminderten Produktion von IL-2 (Vang et al., 2005). Man nimmt an, dass dieser Aminosäureaustausch dazu führt, dass autoreaktive T-Zellen im Thymus nicht deletiert werden und/oder weniger regulatorische T-Zellen (Treg-Zellen) gebildet werden.

Single-Nukleotid-Polymorphismen (SNP) im Gen, das für PD-1 (*programmed death-1*) kodiert, beeinflusst ebenfalls die Suszeptibilität für RA (Kong et al., 2005; Lin et al., 2004; Prokunina et al., 2004). PD-1 reguliert die T-Zell-Homöostase durch Apoptose. Studien von Wan *et al.* zeigen, dass PD-1 und sein Ligand in Synovialzellen von RA-Patienten überexprimiert werden. Alternative Splice-Varianten führen zur Bildung einer löslichen inhibitorischen Form von PD-1, welche im Serum und in der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten detektierbar sind (Wan et al., 2006). Vermutlich schützt das

lösliche PD-1 autoreaktive T-Zellen davor, in Apoptose zu gehen, und trägt so zur erhöhten Suszeptibilität für RA bei.

Für eine aktive Rolle von T-Zellen in der Pathogenese der RA spricht auch die erfolgreiche Therapie von RA Patienten mit dem Fusionsprotein CTLA-4-Ig (*cytotoxic T-lymphocyte antigen-4-Immunoglobulin*). CTLA-4 wird auf aktivierten T-Zellen exprimiert und ist ein inhibitorisches kostimulatorisches Molekül, das eine höhere Affinität zu CD80 und CD86 hat als CD28. CTLA-4-Ig blockiert die T-Helfer-Zell-Kostimulation und inhibiert so selektiv ihre Aktivierung (Genovese et al., 2008; Kremer et al., 2008).

Ein weiteres kostimulatorisches Molekül, ICOS (*inducible costimulator*), wird stärker auf aktivierten T-Zellen in RA-Patienten exprimiert als in gesunden Probanden, während sein Ligand (CD275) auch im Synovium exprimiert wird (Okamoto et al., 2003). Zusätzlich ist in RA-Patienten die Expression von CD275 erhöht (Her et al., 2009).

Neben T-Zellen zählen Fibroblasten-ähnliche Synoviozyten (FLS) und Makrophagen-ähnliche Synoviozyten zu den drei häufigsten Zelltypen im RA-Synovium. Tran *et al.* konnten zeigen, dass IFN- γ behandelte FLS-Linien aus RA-Patienten Peptide von HC gp-39 und CII präsentieren können und diese HLA-DRB*0401 restringierten T-Zell-Hybridomlinien präsentieren können und zur IL-2 Produktion veranlassen können (Tran et al., 2007).

Die Effektorfunktionen von arthritogenen T-Zellen entfalten sich in der Synovialmembran und im Gelenkspalt. Studien von Brennan *et al.* weisen darauf hin, dass die T-Zellen im Gelenk nicht zwingend durch MHC/TCR-Interaktionen aktiviert werden, sondern möglicherweise das Zytokin-Milieu des Gelenks zu einer unspezifischen *bystander* Aktivierung führt: es konnte gezeigt werden, dass die TNF- α Produktion im RA-Synovium T-Zell-abhängig ist und dass synoviale T-Zellen aus dem Gelenk von RA-Patienten T-Zellen ähnlicher sind, die durch IL-2, IL-6 und TNF- α aktiviert wurden, als T-Zellen die über den TCR aktiviert wurden. Diese Zytokin-aktivierten T-Zellen (*cytokine-activated T cells*, Tck) sowie auch T-Zellen aus dem RA-Synovium sind in der Lage die TNF- α Produktion von Monozyten zu induzieren (Brennan et al., 2002). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Tck-Effektorzellen den aktivierten Phänotyp von synovialen T-Zellen aus RA-Patienten exprimieren (CD4⁺CD45RO⁺CCR7⁺CD49d^{high}) und nach Stimulation ein breites Spektrum an T-Zell-Zytokinen sezernieren und proliferieren. Die Tck-Zellen differenzieren sich als Effektor-Memory CD4⁺ T-Zellen im Blut (Brennan et al., 2008).

Synoviale T-Zellen exprimieren den *receptor activator of NF- κ B ligand* (RANKL, CD254) auf der Zelloberfläche (Kotake et al., 2005). RANKL-exprimierende T-Zellen interagieren mit synovialen Monozyten und führt zur Osteoklastendifferenzierung. Diese Osteoklasten führen dann zur Knochendestruktion.

Ein weiterer wichtiger Hinweis auf die aktive Rolle von T-Lymphozyten in der Pathogenese der RA ist das Auftreten des T-Zell-Zytokins IL-17. IL-17 findet sich im Synovialflüssigkeit bei RA und in T-Zell-reichen Regionen des synovialen Gewebes (Lubberts et al., 2005; Stamp et al., 2004). Außerdem wird IL-17 im Serum und aktivierten peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) in RA-Patienten im Vergleich zu Gesunden überexprimiert (Cho et al., 2004; Kim et al., 2005). IL-17 ist das Markerzytokin einer T-Helferzellpopulation, den Th17-Zellen. Th17-Zellen wird eine Effektorfunktion und damit eine bedeutende Rolle in der Pathogenese der RA zugeschrieben. Auf diesen Aspekt wird in Abschnitt 1.3.

näher eingegangen. Neben IL-17 findet man im RA Synovium auch Zytokine, wie TGF- β , IL-6, IL-23, IL-1 β und TNF- α , die an der Differenzierung von T-Zellen zu TH17 beteiligt sind (Kim et al., 2007; Li et al., 2006; Lubberts et al., 2005; Stamp et al., 2004).

1.1.2. B-Zellen in der Pathogenese der RA

B-Zellen spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der RA. B-Zellen stellen die Vorläufer der Antikörper-sekretierenden Plasmazellen dar. Wie bereits erwähnt sind RF bei mehr als 80 % der RA-Patienten nachweisbar; sie besitzen zudem eine diagnostische Relevanz (Dörner et al., 2004; van Boekel et al., 2002). Man nimmt an, dass RF durch die Bindung von Immunglobulinen Immunkomplexe bilden, was zu einer Komplementaktivierung und anschließender Freisetzung von chemotaktischen Faktoren, wie z.B. C5a führt. Dieses führt zur Attraktion von Entzündungszellen ins Gelenk (Dörner et al., 2004). Es ist bekannt, dass in der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten zur Komplementaktivierung kommt und Komplement lokal produziert wird (Kaplan et al., 1980; Neumann et al., 2002; Ruddy and Austen, 1970; Ruddy et al., 1969). Neben RF findet man bei RA-Patienten Autoantikörper gegen CII, Hitzeschockproteine, Proteoglykane usw. (Cope and Sonderstrup, 1998; Silverman and Carson, 2003). Strittig bleibt die Rolle von G6PI-spezifischen Autoantikörper in der Pathogenese der RA: Schaller *et al.* fanden erhöhter anti-G6PI-Antikörper Titer in 64 % von 69 RA-Patienten aber nicht in Patienten mit Lyme Arthritis und Sjögren Syndrom (Schaller et al., 2001). Mehrere darauffolgende Studien konnten hingegen keine erhöhten Titer von G6PI-spezifischen Antikörpern bei RA-Patienten nachweisen (Herve et al., 2003; Kassahn et al., 2002; Matsumoto et al., 2003; Schubert et al., 2002). Schubert *et al.* konnten zeigen, dass das kommerziell erhältliche G6PI Verunreinigungen von Proteinen wie Kreatinkinase (CK) enthielt und dass Seren von RA-Patienten CK-spezifische Antikörper enthalten. Insgesamt scheinen G6PI-spezifische Antikörper als diagnostische Marker für die RA irrelevant zu sein. Allerdings konnten van Gallen *et al.* in 12 von 13 Patienten mit Felty-Syndrom G6PI-spezifische Autoantikörper nachweisen (van Gaalen et al., 2004b). Das Felty-Syndrom ist eine Sonderform der RA. Es tritt vorwiegend bei langjährigen und schweren Verläufen der RA auf und betrifft weniger als 1% der RA-Patienten. Typisch für das Felty-Syndrom sind neben den Symptomen der RA eine Neutropenie und Splenomegalie (Balint and Balint, 2004). Zusätzlich kommt es zu einer starken Reduktion der Granulozyten. Bei schweren Verläufen des Felty-Syndrom entwickeln sich Geschwüre an den Unterschenkeln.

Diagnostisch relevant sind Autoantikörper gegen citrullinierte Peptide und Proteine (Kamradt and Schubert, 2005; Silverman and Carson, 2003). Die Citrullinierung stellt eine posttranslationale Modifikation dar, bei der Arginin zu Citrullin durch Peptidyl Arginin Desiminase (PAD) desiminiert wird. Sie findet während der Apoptose und der terminalen Differenzierung von Zellen sowohl in gesunden als auch in an Arthritiden leidenden Individuen statt (Senshu et al., 1995; Senshu et al., 1996). PAD2 konnte in Makrophagen aus der Synovialflüssigkeit von Patienten mit RA nachgewiesen werden (Vossenaar et al., 2004b). Citrullin ist dabei das relevante Epitop, das von den Autoantikörpern erkannt wird. Citrullin-reaktive Autoantikörper die für die RA relevant sind erkennen *perinuclear factor* (Hoet et al., 1991a; Hoet et al., 1991b; Nienhuis and Mandema, 1964), Keratin (Simon et al., 1993), Fillagrin (Sebbag et al., 1995), Sa (Despres et al., 1994), Vimentin (Vossenaar et al., 2004a) und *cyclic citrullinated peptide* (CCP) (Schellekens et al., 2000). Die Sensivität der Tests für anti-CCP-

Antikörper, d.h. der Prozentsatz der RA-Patienten mit einem positiven Test, liegt zwischen 60 und 88 % in Abhängigkeit der charakteristischen Merkmale der untersuchten Population an RA-Patienten. Die Spezifität von anti-CCP-Antikörpern, d.h. der Prozentsatz von Nicht-RA-Patienten, die negativ für anti-CCP-Antikörper getestet werden, liegt zwischen 96 und 99 %, wiederum in Abhängigkeit der untersuchten Population an Nicht-RA-Patienten. So können anti-CCP-Antikörper auch bei gesunden Individuen (ca. 1%) oder bei parasitären Infektionen (ca. 2 %) detektiert werden (van Venrooij et al., 2002). Zusätzlich können anti-CCP-Antikörper schon in frühen Phasen der RA und sogar schon vor Ausbruch der Erkrankung nachgewiesen werden (Kurki et al., 1992; Rantapaa-Dahlqvist et al., 2003). Lundberg *et al.* konnten zeigen, dass die Menge an citrullinierten Proteinen und dem Enzym PAD4 mit dem Schweregrad der Entzündung im Tiermodell der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA) in Ratten korreliert (Lundberg et al., 2005).

B-Zellen können neben Antikörpern auch Zytokine sekretieren und in besonders effektiver Art und Weise als Antigen-präsentierende Zellen (APC) fungieren sowie die Aktivierung autoreaktiver T-Zellen unterstützen. Es konnte gezeigt werden, dass die T-Zellaktivierung B-Zell-abhängig ist: um die Rolle von B-Zellen für Aktivierung von T-Zellen zu untersuchen, wurde NOD-SCID Mäusen synoviales Gewebe, das Keimzentren enthielt, von RA-Patienten implantiert und dann die B-Zellen mit einem anti-CD20-Antikörper depletiert. Die Aktivierung der T-Zellen wurde anhand der Expressionslevel von IFN- γ mRNA im Gewebe überprüft. Diese war nach B-Zelldepletion um 60-80 % reduziert (Takemura et al., 2001).

Die wichtige Rolle der B-Zellen in der Pathogenese der RA wird v.a. durch den therapeutischen Erfolg der B-Zell-Depletion bei RA-Patienten deutlich: Edwards *et al.* konnten zeigen, dass bei der Therapie mit Rituximab, einem chimären anti-CD20 monoklonalen Antikörper, in Kombination mit Methotrexat (MTX) ein deutlich höherer Prozentsatz der Patienten eine Besserung der Symptome um mehr als 50 % nach ACR Kriterien erfuhr im Vergleich zu Patienten, die nur mit MTX behandelt wurden (Edwards et al., 2004).

1.1.3. Therapie der RA

Zur Therapie der RA werden drei Gruppen von Arzneimitteln eingesetzt: nichtsteroidale antiinflammatorische Medikamente (*nonsteroidal antiinflammatory drugs*, NSAID), Kortikosteroide und Krankheitsmodifizierende antirheumatische Medikamente (*disease-modifying anti-rheumatic drugs*, DMARD), die sowohl synthetische Therapeutika als auch die sogenannten *biologicals* umfasst. Die NSAID, wie Ibuprofen und Indomethacin, werden vor allem in den ersten Wochen nach Diagnosestellung eingesetzt. Durch Hemmung der Cyclooxygenase-2, hemmen sie die Prostaglandinsynthese und dienen der Schmerzlinderung (O'Dell, 2004).

Kortikosteroide sind potente Suppressoren der entzündlichen Prozesse bei der RA. Zu ihnen zählen Kortison, Hydrokortison und Prednison. Sie werden im akuten Schub eingesetzt und in niedriger Dosierung auch zur längeren Therapie (O'Dell, 2004).

Zu den synthetischen DMARD gehören Methotrexat, Sulfasalazin, Goldpräparate, Penicillamin, aber auch Chloroquin und Hydroxychloroquin. Der Folsäureantagonist Methotrexat dient als Standard bei der Therapie der RA und wird oft in Kombination mit *biologicals* eingesetzt (Lee and Weinblatt, 2001; O'Dell, 2004).

Zu den *biologicals* zählen neben löslichen Rezeptoren und molekularen Mimetika auch monoklonale Antikörper.

Inzwischen Standard in der Therapie der RA ist die Blockade von TNF- α entweder durch monoklonale anti-TNF- α Antikörper (Infliximab und Adalimumab) oder dem löslichen p75-TNF-Rezeptor-Fc Fusionsprotein (Etanercept). Auch die Blockade des IL-1-Rezeptors, welches neben TNF- α ein weiteres Schlüsselzytokin bei der Gelenkentzündung darstellt, durch einen IL-1-Rezeptor-Antagonisten (Anakinra) sind etabliert (Puppo et al., 2005). Bereits erwähnt wurden auch die erfolgreichen Therapien von RA-Patienten mit CTLA-4-Ig (Abatacept), bei der die Kostimulation der T-Helfer-Zellen inhibiert wird (Genovese et al., 2008; Kremer et al., 2008) und mit monoklonalen Antikörpern gegen CD20 (Rituximab), die zur Depletion B-Zellen führt (Edwards et al., 2004).

Weiterhin befinden sich in klinischen Studien monoklonale Antikörper gegen CD22 (Epratuzumab) und BAFF (*Synonym*: BLYS; Belimumab) und ein TACI-Immunglobulin (Atacicept) (Edwards et al., 2004).

Neben großen Erfolgen bei der Therapie haben die *biologicals* auch Nachteile: in einigen Fällen wirken sie immunogen, so dass sie nur für einen bestimmten Zeitraum angewendet werden können. Zum anderen sind *biologicals* sehr kostenintensiv.

1.2. Tiermodelle für die RA

Tabelle 2: Übersicht über Mausmodelle für die Rheumatoide Arthritis (Fournier, 2005; Kannan et al., 2005); G6PI: Glukose-6-phosphat Isomerase, AIA: Antigen-induzierte Arthritis, K/BxN: F1-Generation aus TCR-transgenen KRN-Mäusen und NOD-Mäusen; SKG: SKG-Mäuse besitzen eine Punktmutation in der SH2-Domäne von ZAP-70; huTNF tg: transgene Mäuse, die lösliches und membrangebundenes humanes TNF- α exprimieren und spontan eine Arthritis entwickeln; IL-1 RA^{-/-}: IL-1 Rezeptor Antagonist *knockout* Mäuse.

Mausmodelle für die Rheumatoide Arthritis			
Induziert		Spontane	
Gelenkspezifische Antigene	Ubiquitäre Antigene	Sonstige	
Kollagen II	G6PI	Pristan	K/BxN
Proteoglykan	AIA (mBSA)	Immunkomplexarthritis	SKG
Kollagen XI		Serum-Transfer-Arthritis	huTNF tg
			IL-1RA ^{-/-}

Tiermodelle der RA stellen ein nützliches Tool zur Analyse der pathogenen Prozesse in der RA dar. Obwohl keines der zahlreichen Tiermodelle die Situation der RA des Menschen exakt darzustellen vermag, liegt der Vorteil der Tiermodelle in ihrer Reproduzierbarkeit und genauen Charakterisierung

der Modelle. Insbesondere ermöglichen Tiermodelle die Untersuchung der initialen Phase in der Pathogenese von Arthritiden. Tabelle 2 zeigt eine Übersicht über Mausmodelle für die Rheumatoide Arthritis.

Exemplarisch wird im Folgenden auf die Kollagen-induzierte Arthritis (CIA), die Arthritis in K/BxN-Mäusen und die Glukose-6-phosphat Isomerase-induzierte Arthritis näher eingegangen.

1.2.1. Die Kollagen-induzierte Arthritis (CIA)

Kollagen Typ II ist der Hauptbestandteil des Gelenkknorpels. Die CIA ist das am meisten studierte Tiermodell der RA des Menschen. Bei der CIA wird durch Immunisierung mit heterologem Kollagen Typ II (CII) mit kompletten Freundschem Adjuvans (CFA) eine Arthritis in Ratten (Trentham et al., 1977), Affen (Terato et al., 1989; Yoo et al., 1988) oder Mäusen (Courtenay et al., 1980; Rosloniec et al., 1998; Rosloniec et al., 1997) induziert werden. Im Folgenden soll auf das Mausmodell eingegangen werden.

In der Maus entwickelt sich die Arthritis 4-5 Wochen nach der ersten Immunisierung und hält mindestens neun Wochen an.

Wie bei der RA des Menschen ist auch die CIA MHC-assoziiert: Mäuse mit dem MHC-Haplotyp H2-q (DBA/1 und B10.Q) oder dem MHC-Haplotyp H2-r sind suszeptibel für CIA. Auch DR4- und DR1-transgene Mäuse sind suszeptibel für CIA (Rosloniec et al., 1998; Rosloniec et al., 1997). Diese Tatsache ist besonders interessant, da das I-A^q Molekül und die DR4- und DR1-Moleküle, die mit der RA des Menschen assoziiert sind, strukturell ähnlich sind (Fugger et al., 1996).

Die MHC-Assoziation lässt auf eine direkte Beteiligung von CD4⁺ T-Zellen an der Pathogenese der CIA schließen. Die Depletion von CD4⁺ T-Zellen durch Antikörper verhindert die Entstehung der Arthritis (Ranges et al., 1985). Darüber hinaus können im Blut und in der Synovialflüssigkeit von Mäusen mit CIA CII-spezifische T-Zellen nachgewiesen werden (Svendsen et al., 2004). Mäuse, die keine α/β T-Zellen besitzen sind resistent gegen CIA, während das Fehlen von γ/δ T-Zellen keinen Einfluss hat. Gegen die Beteiligung von CD4⁺ T-Zellen an der Pathogenese der CIA sprechen folgende Befunde: CD4-defiziente Mäuse und RAG-defiziente Mäuse entwickeln mit unverändertem Schweregrad und Inzidenz eine Arthritis (Plows et al., 1999; Tada et al., 1996). Auch Versuche CIA durch T-Zell-Transfer zu transferieren sind bisher erfolglos geblieben (Holmdahl et al., 1985). Somit bleibt die Rolle von CD4⁺ T-Zellen in der Pathogenese der CIA ungeklärt.

Für verschiedene CIA-suszeptible Mausstämme konnten unterschiedliche immunodominante CII-Epitope definiert werden (Bayrak et al., 1997; Holmdahl et al., 2002): das immunodominante T-Zell-Epitop für heterologes CII (Huhn, Ratte, Mensch, Rind) im Kontext von H-2q ist CII(256-270) (Michaelsson et al., 1992), während für autologes CII mCII (707-721) immunodominant ist (Bayrak et al., 1997). Die beiden Epitope sind nicht kreuzreaktiv.

B-Zellen spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der CIA. Die CIA kann durch passiven Transfer, d.h. durch den alleinigen Transfer von Serum, in andere Mäuse übertragen werden (Holmdahl et al., 1990; Stuart et al., 1983). Allerdings ist die Erkrankung nach einem passiven Transfer nicht so ausgeprägt wie nach einer Immunisierung mit CII. Dabei ist der Transfer der Arthritis auch in nicht-suszeptible Mausstämme möglich (Watson et al., 1987).

Sowohl in suszeptiblen als auch in nicht-suszeptiblen Mausstämmen sind hohe CII-spezifische Antikörpertiter nachweisbar (Holmdahl et al., 1988; Wooley et al., 1981). In der CIA werden vor allem hohe CII-spezifische Antikörpertiter der Isotypen IgG2a und IgG2b gebildet. Der Isotyp IgG1 ist nicht so prominent bei der CIA. Terato *et al.* konnten zeigen, dass einzelne monoklonale Antikörper, die gegen CII gerichtet sind, nicht in der Lage sind CIA zu transferieren. Für einen erfolgreichen Transfer der CIA benötigt man mindestens 4 verschiedene monoklonale Antikörper; alle Antikörper müssen unterschiedliche Epitope erkennen und mindestens ein Antikörper muss vom Isotyp IgG2b sein, während die anderen Antikörper den Isotyp IgG2a besitzen (Terato et al., 1992).

1.2.2. Die K/BxN-Arthritis

Eine attraktive Hypothese bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen ist, dass eine organ-spezifische Autoimmunerkrankung durch ein organ-spezifisches Autoantigen induziert wird bzw. ein organ-spezifisches Autoantigen erkannt wird. Für die RA bedeutet das, dass ein gelenkspezifisches Autoantigen erkannt wird.

Diese Hypothese wurde erstmalig 1996 durch das K/BxN-Modell in Frage gestellt:

K/BxN Mäuse stellen die F1-Generation der Kreuzung der TCR-transgenen KRN Mäuse, deren T-Zell-Rezeptor eine bovine Ribonuklease (RNase) im Kontext des MHC-Klasse-II Moleküls I-A^k erkennt, und dem NOD-Stamm (*non obese diabetes*), der das MHC-Klasse-II Molekül I-A^{g7} exprimiert. Diese Mäuse entwickeln spontan im Alter von 4-5 Wochen eine schwere, symmetrische Polyarthrit (Kouskoff et al., 1996). Erstaunlicherweise fanden Matsumoto *et al.*, dass im Modell der K/BxN-Arthritis ein ubiquitär exprimiertes glykolytisches Enzym das Autoantigen darstellt: Glukose-6-phosphat Isomerase (G6PI) (Matsumoto et al., 1999). Der transgene KRN-T-Zellrezeptor erkennt im Kontext von I-A^{g7} nicht mehr die bovine RNase, sondern ein Peptid der G6PI (G6PI₂₈₂₋₂₉₄) (Basu et al., 2000). Auch die Autoantikörper im K/BxN-Modell erkennen G6PI.

Die transgenen CD4⁺ T-Zellen und das MHC-Klasse-II Molekül I-A^{g7} sind essentiell für das K/BxN-Modell: Weder die F1 einer Kreuzung aus KRNxC57BL/6 noch eine Kreuzung aus KRNxBALB/c entwickeln eine Arthritis; allerdings entwickelt die F1-Generation aus der Kreuzung aus KRNxC57BL/6.H-2^{g7} (dieser Stamm ist kongen für I-A^{g7}) eine Arthritis (Kouskoff et al., 1996). Mangialaio *et al.* zeigen, dass lediglich die transgenen T-Zellerezeptoren der KRN-Mäuse für die Arthritisentwicklung verantwortlich sind: Knochenmarkchimären aus K/B/R⁰ Mäusen und C α ⁰/BxN entwickeln eine Arthritis. Die C α ⁰/BxN Mäuse besitzen aufgrund einer Mutation in α -Kette des TCR keine endogenen T-Zellen, aber ein funktionsfähiges B-Zellkompartiment, während die K/B/R⁰ Mäuse -aufgrund der RAG-Defizienz- lediglich transgene T-Zellen beisteuern (Mangialaio et al., 1999). Die CD4⁺ T-Zellen sind vor allem in der initialen Phase des K/BxN-Modells wichtig. Eine CD4-Depletion fünf Tage vor Ausbruch der Arthritis verhindert die Erkrankung; erfolgt die Depletion zu einem späteren Zeitpunkt hat sie keinen Effekt mehr (Kouskoff et al., 1996).

Pathogenetisch relevant sind in der K/BxN-Arthritis vor allen Dingen die B-Zellen und die von ihnen produzierten Antikörper. KxN/ μ MT^{0/0} Mäuse, die keine reifen B-Zellen besitzen, entwickeln keine Arthritis (Kouskoff et al., 1996). B-Zellen benötigen für die Produktion Antikörpern T-Zellhilfe. K/BxN Mäuse, die defizient für CD40 sind, entwickeln keine Arthritis (Korganow et al., 1999). Essentiell für die Entwicklung der K/BxN-Arthritis sind die Antikörper. Der vorherrschende Isotyp im Serum von

K/BxN Mäusen ist IgG1 (Kouskoff et al., 1996). Allein durch den Transfer von 100 µl Serum aus K/BxN Mäusen nach Ausbruch der Arthritis kann in Empfänger-mäusen eine Arthritis induziert werden (Korganow et al., 1999). Dabei ist die Entwicklung der Arthritis unabhängig vom Empfängerstamm. Sogar in RAG^{0/0} Mäusen, die keine B- oder T-Zellen besitzen, kann mit Hilfe von K/BxN-Serum eine Arthritis induziert werden (Korganow et al., 1999). Die K/BxN Serum-Transfer-Arthritis verläuft nicht chronisch und klingt nach zwei Wochen wieder ab. Die Arthritis kann auch durch Kombinationen von mindestens zwei monoklonalen IgG1 Antikörpern, die für G6PI spezifisch sind, transferiert werden (Maccioni et al., 2002). Die Bedeutung der Antikörper wird dadurch unterstrichen, dass Mäuse, die defizient für den aktivierenden FcγRIII sind, weniger suszeptibel für die Induktion der Arthritis durch Serumtransfer sind als nicht-defiziente Mäuse (Ji et al., 2001; Ji et al., 2002a). Mäuse, die für den inhibitorischen FcγRII defizient sind, sind im gleichen Maße suszeptibel für die Serum-Transfer-Arthritis wie nicht-defiziente Mäuse (Ji et al., 2001; Ji et al., 2002a). Corr *et al.* hingegen beschreiben FcγRII-defiziente Mäuse als suszeptibler für die K/BxN Serum-Transfer-Arthritis als normale Mäuse (Corr and Crain, 2002). Die G6PI-spezifischen Antikörper vermitteln unterschiedliche Effektorfunktionen. FcγRIII⁺ Zellen sind wichtig in der Pathogenese der K/BxN-Arthritis. Dazu zählen Neutrophile, Makrophagen und Mastzellen. Mastzell-defiziente Mäuse und Mäuse, in denen Neutrophile mit einem Antikörper depletiert werden, sind nicht suszeptibel für K/BxN Serum-Transfer-Arthritis (Lee et al., 2002; Wipke et al., 2004).

Auch das Komplementsystem spielt eine zentrale Rolle bei der Entwicklung der K/BxN Arthritis. Eine Blockade des Komplementfaktors C5 mittels Antikörper verhindert die K/BxN-Arthritis oder ist auch therapeutisch wirksam (Ji et al., 2002a). Entscheidend ist vor allem der alternative Weg der Komplementaktivierung: Mäuse, die defizient für den Faktor B sind, weisen eine sehr niedrige Arthritisinzidenz nach Serumtransfer auf, zusätzlich ist der klinische Schweregrad der Arthritis sehr gering (Ji et al., 2002a). Sind dagegen Komplementfaktoren des klassischen Weges (C1q oder C4) in Mäusen deletiert, entwickeln diese zu 100 % eine K/BxN Arthritis nach Serumtransfer (Ji et al., 2002a).

Es bleibt die Frage, wie ein ubiquitär exprimiertes Enzym eine gelenkspezifische Autoimmunerkrankung auslösen kann. Die G6PI ist ein glykolytisches Enzym, welches die Interkonversion von Glukose-6-phosphat zu Fructose-6-phosphat katalysiert. G6PI ist absolut essentiell und wird von allen Zellen exprimiert: G6PI-Defizienz ist bereits im 2-Zell-Stadium tödlich (West et al., 1990). G6PI ist identisch mit Neuroleukin, AMF (*autocrine motility factor*) and MF (*maturation factor*) (Chaput et al., 1988; Gurney et al., 1986; Liotta et al., 1986; Silletti and Raz, 1996; Xu et al., 1996). Der Rezeptor für G6PI, gp78, ist eine E3 Ubiquitin-Ligase, die im ER exprimiert wird (Fang et al., 2001). Es bleibt unbekannt inwieweit diese alternativen biologischen Funktionen der G6PI wichtig sind für die Arthritogenizität von G6PI. Guerny *et al.* beschreiben, dass G6PI von aktivierten T-Zellen sezerniert wird (Gurney et al., 1986). Dieser Befund konnte nicht bestätigt werden (Taubner, 2005). In CD4⁺-T-Lymphozyten und B-Lymphozyten aus mit G6PI-immunisierten DBA/1-Mäusen, *in vitro* generierten BMDC und aus naiven DBA/1-Mäusen isolierten Synovialfibroblasten konnten Transkripte des Rezeptors für G6PI, gp78 nachgewiesen werden (Freitag, 2006). Zusätzlich zeigen Synovialfibroblasten nach *in vitro* Stimulation mit G6PI eine Aktivierung der Signalmoleküle Erk1/2

sowie PKB/Akt (Freitag, 2006). Inwieweit diese Befunde für die arthritogenen Eigenschaften von G6PI relevant sind, bleibt unklar.

G6PI ist im Serum von Menschen und Mäusen nachweisbar (Matsumoto et al., 1999). Man vermutet, dass die Bildung von Immunkomplexen entscheidend für die Pathogenese der K/BxN-Arthritis ist. Bereits Minuten nach der Applikation G6PI-spezifischer Antikörper, können diese in den Vorder- und Hinterläufen der Mäuse detektiert werden (Wipke et al., 2002). Matsumoto *et al.* finden eine Akkumulation von extrazellulärem G6PI an der Knorpeloberfläche im Gelenk, die in arthritischen Mäusen noch stärker ausgebildet ist. G6PI ist dabei mit IgG und dem Komplementfaktor C3 kolokalisiert, was für die Ausbildung von Immunkomplexen spricht (Matsumoto et al., 2002). Binstedt *et al.* konnten zeigen, dass Immunkomplexe zu einer erhöhten Vasopermeabilität in den distalen Extremitäten führt (Binstadt et al., 2006). Dabei scheinen FcR γ -exprimierende Zellen, v.a. Mastzellen, eine wichtige Rolle zu spielen, da die Vasopermeabilität auch durch die Applikation von Histamin- und Serotonin-Rezeptor-Antagonisten reduziert wird (Binstadt et al., 2006).

1.2.3. Die Glukose-6-phosphat Isomerase-induzierte Arthritis

Bei der Glukose-6-phosphat Isomerase-induzierten Arthritis wird durch Immunisierung mit heterologer G6PI in verschiedenen nicht-transgenen Inzuchtstämmen eine symmetrische Polyarthritits der kleinen distalen Gelenke induziert (Schubert et al., 2004). Dieses Modell überbrückt die Lücke zwischen dem transgenen K/BxN-Modell und der rheumatoiden Arthritis des Menschen.

Tabelle 3 zeigt die Suszeptibilität die für G6PI-induzierte Arthritis für verschiedene Mausstämmen.

Wie in der CIA ist auch in der G6PI-induzierten Arthritis die Suszeptibilität und der klinische Schweregrad der Arthritis stark mit dem MHC-Haplotyp assoziiert (Bockermann et al., 2005; Schubert et al., 2004): Eine Suszeptibilität von >90% weisen DBA/1 Mäuse auf. Sie besitzen den MHC-Haplotyp H2-q. Insgesamt ist der MHC-Haplotyp H2-q von entscheidender Bedeutung für die G6PI-induzierte Arthritis. Neben den DBA/1 Mäusen erweist sich auch der H2-q-Stamm C3H.Q als suszeptibel. Hier verläuft die Arthritis sogar chronisch (Bockermann et al., 2005). Während Schubert *et al.* B10.Q Mäuse als nicht suszeptibel beschreiben, finden Bockermann *et al.* eine Suszeptibilität bei B10.Q Mäusen. Ein Grund für diese unterschiedlichen Beobachtungen liegt in der Herkunft der Mausstämmen. Schubert *et al.* verwendet den B10.Q Stamm aus den Jackson Laboratories, der eine natürliche Mutation auf Chromosom 9 im Gen der Januskinase Tyk2 besitzt. Diese Mäuse sind auch resistent gegen CIA (Shaw et al., 2003). Auch SWR Mäuse, ebenfalls H2-q, sind nicht suszeptibel für die G6PI-induzierte Arthritis. Dies ist begründet durch einen T-Zelldefekt des SWR-Stammes (Behlke et al., 1986): es fehlen 50 % des V β -Gens. Zusätzlich ist der SWR-Stamm defizient für das Komplementprotein C5 (Erickson et al., 1964). Da für die Pathogenese der G6PI-induzierten Arthritis sowohl CD4⁺-T-Zellen als auch Komplement eine entscheidene Rolle spielen (Schubert et al., 2004), liegen hier vermutlich die Gründe für die fehlende Suszeptibilität der SWR Mäuse. In C3H.NB Mäusen (H2-p) ist ein chronischer Verlauf der G6PI-induzierten Arthritis zu beobachten (Bockermann et al., 2005), der allerdings weniger stark ausgeprägt ist als bei C3H.Q Mäusen (Bockermann et al., 2005). Wie bei der CIA führt als der MHC-Haplotyp H2-q zu schwereren Verlaufsformen der Arthritis als H2-p. Der B10.RIII (H2-r) ist nicht suszeptibel für die G6PI-induzierte Arthritis (Bockermann et al., 2005).

Interessanterweise sind auch DR4-transgene Mäuse nicht suszeptibel für die G6PI-induzierte Arthritis (Bockermann et al., 2005; Schubert et al., 2004). Auch alle weiteren untersuchten Mausstämmen sind nicht suszeptibel (Bockermann et al., 2005; Schubert et al., 2004).

Tabelle 3: Suszeptibilität für die G6PI-induzierte Arthritis von unterschiedlichen Mausstämmen

Mausstamm	MHC-Haplotyp	Suszeptibilität
DBA/1	H2-q	+
SWR	H2-q	-
B10.Q	H2-q	(+)
C3H.NB	H2-p	+
C3H.Q	H2-q	+
B10.A	H2-k	-
B10.RIII	H2-r	-
AKR	H2-k	-
C57BL/6	H2-b	-
BALB/c	H2-d	-
DBA/2	H2-d	-
DBA/1xC57BL/6	H2-q/b	-
B10-Tg(DR4)	DR*0401	-

Eine Arthritis kann auch mit autologer G6PI induziert werden (Schubert et al., 2004).

Die ersten klinischen Anzeichen einer Arthritis sind in DBA/1 Mäusen an Tag 9 nach Immunisierung zu beobachten (Schubert et al., 2004), sie erreichen ihren Höhepunkt um den Tag 14 nach Immunisierung und klingen danach langsam wieder ab (Schubert et al., 2004). An den Vorderläufen entwickeln die Tiere hauptsächlich im Handgelenk, den metacarpalen Gelenken, sowie den proximalen und distalen interphalangealen Gelenken eine Arthritis. An den Hinterläufen sind vor allem die tarsalen, Knöchel- und Kniegelenke betroffen (Schubert et al., 2004). Rückgrat, Ellbogen-, Schulter- oder Hüftgelenke sind nie betroffen (Schubert et al., 2004). Am Höhepunkt der klinischen Anzeichen der Arthritis sind histopathologisch eine mittlere bis schwere Synovitis, Tenosynovitis und Periarthritis zu beobachten (Schubert et al., 2004). Dagegen können nur leichte bis mittlere Knorpel- und Knochendestruktion beobachtet werden. Histopathologisch liegt der Höhepunkt der Erkrankung zwischen Tag 12 und 15, was mit den klinischen Zeichen korreliert (Schubert et al., 2004).

In der G6PI-induzierten Arthritis sind CD4⁺ T-Zellen sowohl in der Induktionsphase als auch in der Effektorphase pathogenetisch relevant: Depletion von CD4⁺ T-Zellen an den Tagen -3, 0 und 5 verhindert die Arthritis; eine Depletion nach Ausbildung der klinischen Anzeichen der Arthritis an Tag 11 und 14 führt zu einer schnellen Genesung der Mäuse (Schubert et al., 2004).

In den suszeptiblen DBA/1 Mäusen ist eine stärkere proliferative Zellantwort nach Restimulation mit G6PI im Vergleich zu nicht-suszeptiblen Mäusstämmen zu beobachten (Schubert et al., 2004). Der Höhepunkt der zellulären Antwort liegt in den drainierenden Lymphknoten zwischen Tag 9 und 12 (Schubert et al., 2004).

CD4⁺ T-Zellen produzieren die proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-17 und IL-6 nach *in vitro* Restimulation mit G6PI. Wenig bis gar keine CD4⁺ T-Zellen exprimieren IFN- γ , IL-2, IL-4 und IL-10 (Schubert et al., 2004). TNF- α ist pathogenetisch relevant für die G6PI-induzierte Arthritis, da eine Blockade von TNF- α mit dem TNFR p75 IgG-Fc Fusionsprotein die Inzidenz und klinischen Schweregrad der G6PI-induzierten Arthritis reduziert.

In der G6PI-induzierten Arthritis sind G6PI-spezifische Antikörper sowohl in suszeptiblen als auch in nicht suszeptiblen Mäusstämmen ab Tag 6 nach Immunisierung detektierbar (Bockermann et al., 2005; Schubert et al., 2004). Der Schweregrad der Arthritis korreliert nicht mit der Höhe der Antikörpertiter (Bockermann et al., 2005). Außer Antikörpern des Isotyps IgM findet man Antikörper aller IgG-Isotypen (Bockermann et al., 2005; Schubert et al., 2004). Anders als in der CIA und den K/BxN Mäusen ist die G6PI-induzierte Arthritis nicht durch Serum oder Antikörper, die aus dem Serum erkrankter DBA/1 Mäuse aufgereinigt wurden, transferierbar (Schubert et al., 2004). Somit sind Antikörper allein nicht ausreichend für eine Induktion der Arthritis. Das G6PI-spezifische Antikörper dennoch relevant für die Pathogenese der G6PI-induzierten Arthritis sind, zeigt die Tatsache, dass DBA/1 Mäuse, die defizient für die γ -Kette der aktivierenden Fc γ -Rezeptoren I und III sind, eine geringere Inzidenz und einen stark verringerten Schweregrad der Arthritis aufweisen (Schubert et al., 2004). Darüber hinaus entwickeln DBA/1 Mäuse, die defizient für den inhibitorischen Fc γ RIIB sind, eine Arthritis mit stärkeren klinischen Symptomen und längerem Verlauf (Schubert et al., 2004).

Auch B-Zellen spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der G6PI-induzierten Arthritis: Bockermann *et al.* konnten zeigen, dass B-Zell-defiziente B10.Q keine Arthritis entwickeln (Bockermann et al., 2005). Auch B-Zelldefiziente C3H.Q entwickeln nur leichte Ödeme die nicht länger als 2 Tage anhalten und keine histologischen Veränderungen hinterlassen (Bockermann et al., 2005).

1.3. Th17-Zellen

Für lange Zeit wurden CD4⁺ T-Zellen anhand der von Mosman und Coffman 1986 postulierten Hypothese in Th1- und Th2-Zellen unterteilt (Coffman and Carty, 1986; Mosmann et al., 1986). Die Th1-Th2-Hypothese klassifiziert CD4⁺ T-Helfer-Zellen (Th-Zellen) aufgrund ihrer Zytokin-Profile und bestimmter Transkriptionsfaktoren (s. Abbildung 2) in IFN- γ -produzierende Th1-Zellen, die vor allem zellvermittelte Immunantworten gegen Viren oder intrazelluläre Pathogene wie *Leishmania major* vermitteln (Sacks and Noben-Trauth, 2002), und IL-4-produzierende Th2-Zellen, die vor allem für die humorale Immunität und die Kontrolle von Helmintheninfektionen verantwortlich sind (Anthony et al., 2007). Lange Zeit galten autoreaktive Th1-Zellen als entscheidend für die Pathogenese von Autoimmunmodellen, wie z.B. der experimentellen autoimmunen Encephalomyelitis (EAE) oder der CIA. Die Depletion oder Blockade von Th1-spezifischen Faktoren führte aber zu widersprüchlichen Resultaten: während die Injektion von IL-12 oder IFN- γ EAE verhinderte (Gran et al., 2004a; Gran et al., 2004b; Voorthuis et al., 1990), führte die Antikörper-vermittelte Blockade von IFN- γ zu einem schwereren Verlauf der EAE (Willenborg et al., 1999). IL-12p35-defiziente Mäuse sind suszeptibel für

EAE (Gran et al., 2002). Oppman *et al.* konnten zeigen, dass das Zytokin IL-23 aus den Untereinheiten p19 und p40 besteht und die Untereinheit p40 mit IL-12 gemeinsam hat (Oppmann et al., 2000). *In vivo* Studien von Cua *et al.* zeigten, dass IL-23 und nicht IL-12 essentiell für die Pathogenese der EAE ist (Cua et al., 2003).

Infante-Duarte *et al.* beschrieben bereits 2000 eine Population von CD4⁺ T-Zellen, die IL-17 produzierte und sich von den klassischen Th1 und Th2-Zellen unterschied (Infante-Duarte et al., 2000). Langrish *et al.* demonstrierten, dass IL-23-induzierte Th17-Zellen pathogener sind im Model der EAE als IL-12-induzierte Th1-Zellen (Langrish et al., 2005). Drei Arbeitsgruppen beschrieben schließlich unabhängig voneinander Th17-Zellen als dritte Th Subpopulation unabhängig von Th1- oder Th2-Zellen (Bettelli et al., 2006; Mangan et al., 2006; Veldhoen et al., 2006). Es werden die Subtypen IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E und IL-17F unterschieden (Moseley et al., 2003). IL-17A bindet an IL-17RA. Dieser Rezeptor wird ubiquitär exprimiert (Moseley et al., 2003). IL-17RB bindet IL-17B und IL-17E. Zusätzlich wurden aufgrund von Sequenzhomologie auch die Rezeptoren IL-17RC, IL-17RD und IL-17RE (Moseley et al., 2003). Die Liganden sind bisher unbekannt.

In vitro differenzieren Th17-Zellen in Gegenwart von IL-6 und TGF- β (Bettelli et al., 2006; Mangan et al., 2006; Veldhoen et al., 2006). Die Bildung von Th17-Zellen wird durch IL-23 verstärkt (Yang et al., 2007). Th17-Zellen sekretieren neben IL-17A auch IL-17F, IL-22, GM-CSF und IL-21 (Infante-Duarte et al., 2000; Langrish et al., 2005; Liang et al., 2006; Zheng et al., 2007). IL-21 entfaltet dabei eine autokrine Wirkung: von Th17-Zellen produziert, fördert es die Bildung derselben und supprimiert die Bildung von Th1-Zellen (Korn et al., 2007; Nurieva et al., 2007; Zhou et al., 2007).

Die Differenzierung von Th17-Zellen wird durch den Arylhydrocarbon-Rezeptor moduliert (Veldhoen et al., 2009).

Die Differenzierung von Th17-Zellen wird durch die Rezeptoren ROR γ und ROR α (*retinoid acid receptor-related orphan receptor*, ROR) reguliert (Ivanov et al., 2006; Yang et al., 2008c). Es konnte gezeigt werden, dass die Transkriptionsfaktoren ROR γ t und Interferon-regulatory factor 4 (IRF4) sowohl *in vitro* als auch *in vivo* entscheidend für die Differenzierung von Th17-Zellen sind (Ivanov et al., 2006; Brüstle et al., 2007). Die Differenzierung von Th17-Zellen wird durch IFN- γ , IL-4, IL-2, IL-27 und IL-35 negativ reguliert (Batten et al., 2006; Harrington et al., 2005; Laurence et al., 2007; Stumhofer et al., 2007; Yang et al., 2008a). Wie bereits erwähnt ist IL-17 in der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten detektierbar (Ziolkowska et al., 2000). IL-17 wird spontan von Kulturen mit Synovialmembran aus RA-Patienten produziert (Chabaud et al., 1999). IL-17 trägt zur Aktivierung von NF- κ B bei und fördert die Sekretion von IL-6 und IL-8 durch Fibroblasten, Endothel- und Epithelzellen; zusätzlich induziert es die Proliferation von T-Zellen (Fossiez et al., 1996; Yao et al., 1995). IL-17 veranlasst Synoviozyten dazu, GM-CSF und Prostaglandin E₂ zu produzieren, was für eine entscheidende Rolle von IL-17 in der Pathogenese der RA spricht (Fossiez et al., 1996). IL-17 ist in der Lage Makrophagen, die aus PBMC generiert wurden, zur Produktion von IL-1 und TNF- α zu veranlassen (Jovanovic et al., 1998). Es verstärkt sowohl die IL-1-vermittelte IL-6 Produktion durch Synoviozyten *in vitro* als auch die TNF- α induzierte Synthese von IL-1, IL-6 und IL-8 (Chabaud et al., 1999; Katz et al., 2001). Zusätzlich induziert IL-17 die Expression von RANKL, welches essentiell für Osteoklastogenese und die Knochenresorption ist, und trägt so zur Knochenerosion bei (Kotake et al., 2005; Kotake et al., 2001).

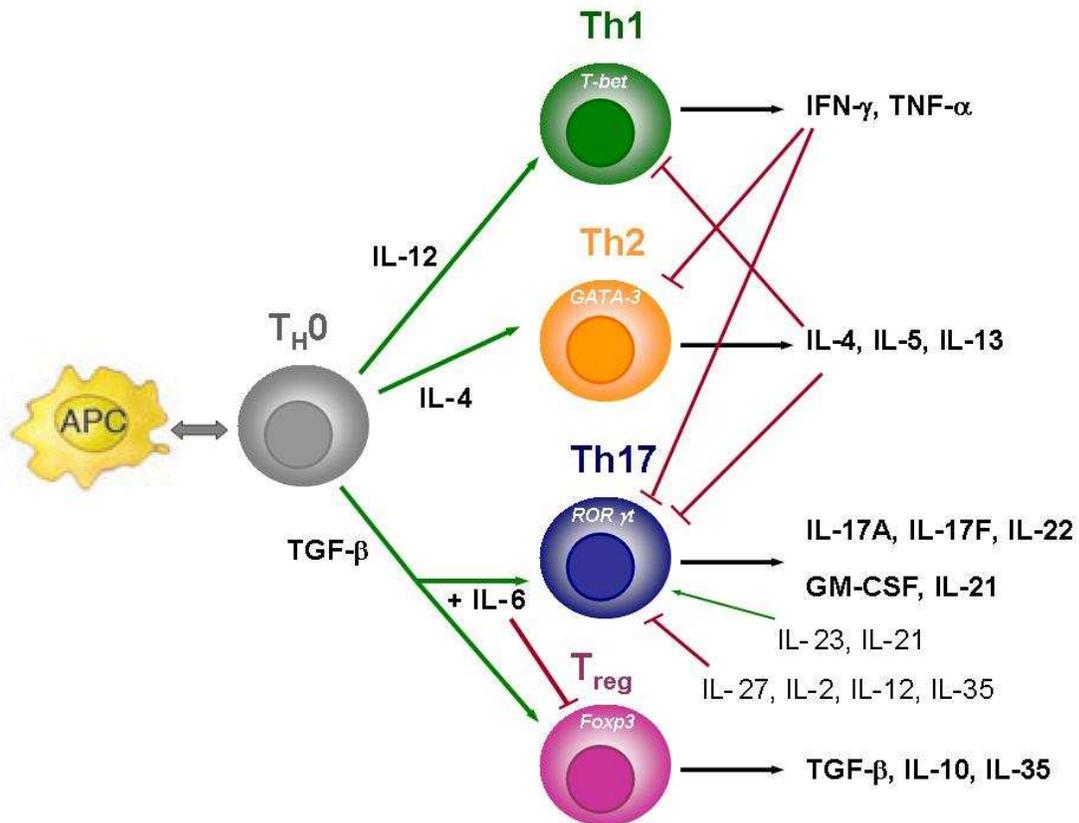


Abbildung 2: Darstellung der verschiedenen T-Helfer-Zell-Subpopulation: Th Zellen differenzieren in Abhängigkeit vom Zytokinmilieu in der Anwesenheit von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) in Th1, Th2, Th17 oder regulatorische T-Zellen (T_{reg}). Jede T-Helfer-Zellsubpopulation zeichnet sich durch spezifische Transkriptionsfaktoren und die Produktion charakteristischer Zytokine aus. Die Differenzierung von Th17-Zellen wird z.B. durch TGF- β und IL-6 induziert und durch IL-23 und IL-21 unterstützt (grüner Pfeil). IL-27, IL-2, IL-12, IL-35, IL-4 und IFN- γ regulieren die Differenzierung von Th17-Zellen in negativer Art und Weise (rote Pfeile). ROR γ t ist der Transkriptionsfaktor, der essentiell für die Differenzierung von Th17-Zellen ist (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Sylvia Heink).

Somit ist IL-17 in der Lage synergistisch mit IL-1, TNF- α und RANKL zu wirken, was die pathogenetische Relevanz von IL-17 für die RA unterstreicht. Erst kürzlich wurde beschrieben, dass die synergistische Wirkung von IL-17 mit TNF- α die Expression von IL-23p19 in Synovialfibroblasten induziert (Goldberg et al., 2009) und so möglicherweise einen *Feedback-Loop* ausgelöst wird, da im Menschen IL-23 zusammen mit IL-1 β direkt zur Generierung von Th17-Zellen führt.

IL-17 trägt zur Zerstörung des Knorpels bei, indem es einerseits den Metabolismus der Chondrozyten inhibiert und andererseits zum Abbau der Proteoglykane beiträgt: IL-17 hemmt die Synthese von Matrixproteinen durch Chondrozyten, indem es die Bildung von NO fördert (Lubberts et al., 2000). Zusätzlich induziert IL-17 Metalloproteinasen in Synoviozyten und Chondrozyten (Chabaud et al., 2000). Desweiteren fördert IL-17 den Influx von Neutrophilen: in Mäusen, die lokal im Gelenk IL-17 überexprimieren, kommt es zu einer verstärkten Einwanderung von Neutrophilen im Model der CIA (Lubberts et al., 2001).

Insgesamt kann IL-17 eine große Bedeutung in der Pathogenese der RA zugeschrieben werden. IL-17 stellt somit ein interessantes Ziel für Therapieansätze in der RA dar.

1.4. Zielsetzung der Arbeit

Trotz intensiver Forschung sind die Ätiologie und pathologischen Mechanismen der RA bisher unvollständig geklärt. Tiermodelle der RA, wie die Glukose-6-phosphat Isomerase-induzierte Arthritis, bieten die Möglichkeit pathologisch-relevante Mechanismen vor allen Dingen in der initialen Phase von Arthritiden zu untersuchen und mögliche Ansatzpunkte für neue Therapien zu definieren; darüber hinaus ermöglichen sie, den Erfolg von Therapien zu testen.

Ziel dieser Arbeit ist es die pathogenetische Bedeutung von T-Zellen, insbesondere Th17-Zellen, in der G6PI-induzierten Arthritis zu untersuchen. Es soll die Produktion weiterer Zytokine wie IL-22 und GM-CSF untersucht werden sowie die Kinetik der Expression von IL-17A untersucht werden. Von besonderem Interesse ist die Möglichkeit IL-17 und andere mit Th17-Zellen assoziierte Zytokine als therapeutischen Ansatzpunkt für die RA zu nutzen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die immunodominanten T-Zellepitope in der G6PI-induzierten Arthritis definiert werden, um die pathogenetische Relevanz von T-Zellen in der G6PI-induzierten Arthritis zu unterstreichen.

Zusätzlich sollte das Modell der G6PI-induzierten Arthritis in SJL Mäusen charakterisiert werden. Diese Charakterisierung stellte die Basis dar, für die Untersuchung pathogenetische Relevanz der B-Zellen durch Depletion der B-Zellen mit einem Toxin-gekoppelten Antikörper gegen CD22 in der Induktions- und der Effektorphase der G6PI-induzierten Arthritis.

2. Material und Methoden

2.1. Biologisches Material

2.1.1. Mäuse

Die Mäuse wurden soweit nicht anders angegeben unter SPF-Bedingungen (Spezifiziert Pathogen Frei) vom Institut für Versuchstierkunde in Jena gezüchtet. Es wurden die im Folgenden angegebenen Mausstämme verwendet.

Mausstamm	Haplotyp
DBA/1	H2-q
SJL	H2-s
SJL-RAG1-/-	H2-s
C57BL/6	H2-b
BALB/c	H2-d

Die SJL-RAG1-/- wurden von Vijay K. Kuchroo (*Brigham and Woman's Hospital, Harvard Medical School, USA*) erhalten.

2.1.2. Bakterienstämme

<i>E.coli</i> BL21 (DE3)	Expressionsstamm, T7-Polymerase Genotyp: F ⁻ ompT hsdS B (r _B ⁻ m _B ⁻) gal dcm (DE3)
--------------------------	---

2.2. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

2.2.1. Chemikalien

Allgemeine Laborchemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von SIGMA (Taufkirchen), ROTH (Karlsruhe), APPLICHEM (Darmstadt) bzw. SERVA (Heidelberg) bezogen. Gebrauchslösungen wurden bei Bedarf mit voll entsalztem Wasser aus einer „MilliQplus“ Filteranlage (MILLIPORE, Schwalbach) angesetzt und bei Bedarf autoklaviert.

2.2.2. Kits

BCA TM -Protein Assay Kit	Pierce, Rockford, USA
BrdU Staining Kit	BD Biosciences, Heidelberg
Isotypspezifischer ELISA ISO-2 (Mouse monoclonal antibody isotyping Kit)	Sigma, Deisenhofen

2.2.3. Verbrauchsmaterialien

AutoMACS®-Separationssäulen	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach
Cluster-Tubes	Corning/Costar, Bodenheim
Combitips	Eppendorf, Hamburg
Cryo 1 °C Freezing Container	Nalgene, Rochester

Dialyseschlauch	Roth, Karlsruhe
Einmalpipetten in verschiedenen Größen	Greiner, Frickenhausen
Einmalspitzen	Brand, Wertheim
Einmalspritzen und -kanülen	Braun-Melsungen, Melsungen
FACS® -Röhrchen	BD Biosciences, Heidelberg
Falcons (15 ml/ 50 ml)	Greiner, Frickenhausen
Kryo-Röhrchen	Greiner, Frickenhausen
MaxiSorp-Platte	nunc, Wiesbaden
Mikro-Quarzküvetten	Biometra, Goettingen
Nitrocellulose Protran®	Schleicher&Schuell, Dassen
Nitrocellophan-Membranen (Dry Ease	Invitrogen, Karlsruhe
Miniocellophane)	
PD 10 – Säule Sephadex™ G-25M	GE Healthcare, München
MACS® Preseparations-Filter	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
TopSeal Abdeckfolie	Perkin-Elmer, Rodgau-Jügesheim
Unifilter GF/C 96-Well-Platten;	Perkin-Elmer, Rodgau-Jügesheim
Vivaspin-Röhrchen (30000 MW)	Sartorius, Hannover
Whatman-Filterpapier	Bio-Rad, München
Zellkulturflaschen und Platten	Greiner, Frickenhausen
70µM Zellsieb	BD Biosciences, Heidelberg

2.3. Antikörper

2.3.1. Antikörper für die Durchflusszytometrie

Alle Antikörper erkennen Maus-Antigene. Antikörper waren mit Fluorescein Isothiocyanat (FITC), R-Phycoerythrin (PE), Biotin (Bio), Indodicarbocyanin (Cy), Alexa-Farbstoffen (A), Dyomics-Farbstoffe (Dye) Allophycocyanin (APC), Perdinin-Chlorophyll (PerCP) oder Tandem-Konjugaten dieser Fluorochrome markiert. Antikörper, bei denen als Bezugsquelle „Immunologie Jena“ angegeben ist, wurden am Institut für Immunologie in Jena aus Kulturüberständen der entsprechenden Hybridome aufgereinigt und/oder mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert.

Tabelle 4: Antikörper für die Durchflusszytometrie

Spezifität	Klon	Isotyp	Konjugate	Quelle
B220/CD45R	RA3.6B2	Ratte, IgG2a, κ	Dye647, Pacific Blue	Immunologie Jena
CD3	145-2C11	Armenischer Hamster, PE, - IgG1, κ		BD Biosciences, Immunologie Jena
CD4	RM4-5	Ratte, IgG2a, κ	PE-Cy7, APC-A750,	ebioscience
CD16/CD32	2.4G2/75	Ratte, IgG2b, κ	-	Immunologie Jena
CD19	1D3	Ratte, IgG2a, κ	PerCP-Cy5.5, Biotin	BD Biosciences

CD154	MR1	Armenischer Hamster	APC, PE IgG3, κ	Miltenyi Biotec
GM-CSF	MP1-22E9	Ratte, IgG2a, κ	PE	ebioscience
IFN-γ	XMG1.2	Ratte, IgG1, κ	A488, PE-Cy7, Pacific Blue	ebioscience
IL-2	Jes6-5H4	Ratte, IgG2b, κ	FITC	ebioscience
IL-4	11B11	Ratte, IgG1, κ	PE, APC	ebioscience
IL-6	MP5-20F3	Ratte, IgG1, κ	PE	BD Biosciences
IL-10	JES5-16E3	Ratte, IgG2b, κ	APC	BD Biosciences
IL-17A	ebio17B7	Ratte, IgG2a, κ	A488, FITC	ebioscience
IL-22	Ab02	Ratte, IgG1, κ	Dye647	Wyeth Research/ Immunologie Jena
RANKL	IK22/5	Ratte, IgG2a, κ	PE	ebioscience
TNF-α	MP6-XT22	Ratte, IgG1, κ	Pacific Blue	ebioscience

2.3.2. Antikörper für ELISA

Siehe 3.2.7.

2.3.3. Antikörper und Proteine für *in vivo* Experimente

Tabelle 5: Antikörper und Proteine für *in vivo* Experimente

Spezifität	Klon	Isotyp	Konjugate	Quelle
CD4	YTS191	Ratte, IgG2b, κ	-	Immunologie Jena
CD22	Cy34.1	Maus, IgG1	N-Acetyl-γ-Calicheamicin (Cal)	Kyri Dunussi-Joannopoulos, Wyeth Research, USA
FcγRIV	9E9	Hamster, IgG1	-	Falk Nimmerjahn, Rockefeller University, USA
Gr-1	RB6 8C5	Ratte, IgG2b, κ	-	Immunologie Jena
IFN-γ	XMG1.2	Ratte, IgG1, κ	-	Immunologie Jena
IL-4	11B11	Ratte, IgG1, κ	-	Immunologie Jena
IL-23p19	490	Maus, IgG1	-	Genentech, USA
IL-17	MM17F3	Maus, IgG1	-	Jacques Van Snick, Ludwig Institute for Cancer Research, Brüssel
sgp130	-	-	-	Stefan Rose-John,

				Universität Kiel
sTNFR-p75 (Enbrel®)	-	-	-	Wyeth

2.4. Peptide

G6PI ₆₅₋₇₉	MRMLVDLAKSRGVEA
G6PI ₈₅₋₉₉	FNGEKINYTEGRAVL
G6PI ₄₆₉₋₄₈₃	EGNRPTNSIVFTKLT
G6PI ₄₉₇₋₅₁₁	KIFVQGGIIWDINSFD
G6PI ₅₁₇₋₅₃₀	LGKQLAKKIEPELDG

Die Peptidbibliothek wurde mithilfe der SPOT-Technologie von Christiane Landgraf und Rudolf Volkmer am Institut für Medizinische Immunologie in der Abteilung Molekulare Bibliotheken an der Charité in Berlin erstellt. Die Cellulose-gebundenen Peptide wurden nach einem Standard-SPOT-Synthese-Protokoll mit dem MultiPep SPOT-Roboter (INTAVIS Bioanalytical instruments AG, Köln, Germany) auf einer β -Alanin modifizierten Cellulose-Membran synthetisiert.

Die einzelnen Spots wurden mit 200 μ l ddH₂O mit 5 % DMSO eluiert. Die resultierende Peptidkonzentration lag bei schätzungsweise 350-650 μ g/ml Peptid. Diese Lösungen wurden zur Kreation der Peptid-Pools verwendet. Die Endkonzentration für die *in vitro* Stimulation für jedes einzelne Peptid im Pool betrug 1 μ g/ml.

Die Peptide zur Immunisierung der Mäuse wurden nach der Standard-Fmoc-Technologie synthetisiert.

2.5. Geräte

AutoMACS®	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach
Biofuge fresco	Hettich, Tuttlingen
Durchflusszytometer LSR II	BD Biosciences, Heidelberg
ELISA-Lesegerät SLT Spectra	Tecan, Crailsheim
ELISA-Washer	Tecan, Crailsheim
Feinwaage	Sartorius, Hannover
Flüssigkeits-Szintillationszähler TopCount	Perkin-Elmer, Rodgau-Jügesheim
Heizblock Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Inkubatoren	Heraeus, Tuttlingen
Impfkäfig	FSU, Jena
Magnetrührer SB 162-3	Stuart BIBBY, Staffordshire UK
Megafuge 1.0R	Heraeus, Tuttlingen
Multipipette	Eppendorf, Hamburg
Lichtmikroskop Axiovert25	Zeiss, Jena
Neubauer Zählkammer	Fein-Optik, Bad Blankenburg
pH-Meter Knick	Portamess, Berlin
Photometer WPA biowave	Biochrom, Cambridge UK

Präparationsbesteck	Aeskulap, Tuttlingen
Schüttler	Heidolph, Kelheim
SDS-PAGE Elektrophoresekammer Mini-Protean3	Bio-Rad, München
Sterilbank HERAsafe	Heraeus, Tuttlingen
Stromversorgungsgerät für SDS-PAGE PowerPac Basic	Bio-Rad, München
Tischzentrifuge minispin	Eppendorf, Hamburg
Vortexer Mixer	Stuart BIBBY, Staffordshire UK
Whatman Fastblot B43	Biometra, Goettingen
Ultraschallstab	Sonoplus, Bandelin
Zellharvester Unifilter-96	Perkin-Elmer, Rodgau-Jügesheim

3. Methoden

3.1. Methoden der Proteinbiochemie

3.1.1. Heterologe Proteinexpression in *E.coli*

LB-Medium: 1 % Pepton /Trypton , 0.5 % Hefeextrakt, 1 % Natriumchlorid

1 M IPTG: 1 g/ 4,1 ml H₂O, sterilfiltrieren

Ampicillin: 0,1 g/ml H₂O, sterilfiltrieren

Der transformierte Expressionsstamm *E.coli* BL21(DE3) mit dem Vektor zur Überexpression von rekombinanter humaner G6PI (pQE100S_huG6PI) bzw. muriner G6PI (pQE100S_muG6PI) wurden von David Schubert zur Verfügung gestellt. Bei der Überexpression und der Aufreinigung der beiden Proteine wurde analog verfahren.

Für die Vorkultur wurden 100 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin mit dem entsprechenden transformierten Expressionsstamm angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttler kultiviert.

Die über Nacht kultivierte Bakterienkultur wurde in 2 l LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin transferiert und erneut bei 37°C inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,6 wurde die Proteinexpression durch Zugabe von von Isopropyl-Thio-β-D-Galactopyranosid (IPTG, Endkonzentration: 2 mM) in die Bakterienkultur induziert. Auf dem zur Überexpression verwendeten Plasmid pQE100S ist das Gen *lacIq* lokalisiert. Dieses Gen codiert für das *lac*-Repressor-Protein, welches durch Bindung an den *lac*-Operator die Expression der durch den *lac*-Operator kontrollierten Gene inhibiert. Diese Inhibition wird durch Zugabe IPTG verhindert. IPTG bindet an den Repressor, wodurch es zu einer Konformationsänderung kommt, die zur Dissoziation des Repressors vom Operator führt und die Expression des Gens induziert.

Die Bakterienkultur wurde für weitere 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien bei 4°C und 5000xg für 15 min geerntet. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet für die weitere Aufarbeitung bei -20°C eingefroren.

3.1.2. Affinitätschromatographie von Proteinen mit His₆-Tag

Lysispuffer: 50 mM NaH₂PO₄ x H₂O, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol

Waschpuffer: 50 mM NaH₂PO₄ x H₂O, 300 mM NaCl , 20 mM Imidazol

Elutionspuffer: 50 mM NaH₂PO₄ x H₂O, 300 mM NaCl, 150 mM Imidazol

Die gesamte Aufreinigung wurde auf Eis bzw. bei 4°C durchgeführt. Das gefrorene Bakterienpellet der 2l-Expressionskultur wurde mit 20 ml Lysispuffer resuspendiert. Anschließend wurden die Bakterien in 5 Zyklen á 90 Sekunden Ultraschall (50 % Power, 70 % Cycles; Bandelin Sonoplus HD 60) im Wechsel mit 30 Sekunden Inkubation auf Eis aufgeschlossen. Das Lysat wurde für 1 h bei 13000xg und 4°C zentrifugiert, um die schweren Zellfragmente zu pelletieren. Der Überstand wurde auf 100 ml mit Lysispuffer verdünnt und in eine mit Lysispuffer äquilibrierte Ni-NTA Säule (Säulenvolumen: 5 ml) gegeben. Das im *E.coli* Stamm überexprimierte G6PI enthält am N-Terminus eine Markierung aus 6 Histidinresten (*His₆-Tag*). Das Prinzip der Aufreinigung der Proteine beruht auf der hohen Affinität dieser Histidinreste zu der Nickel-Nitrilo-Tetra-Acetat (NTA)-Matrix. Die NTA bildet einen Chelatkomplex mit dem Nickel, indem sie vier der sechs Ligandenbindungsstellen in der Koordinationsphäre des Nickelatoms besetzt. Die beiden freien Ligandenbindungsstellen interagieren mit dem *His₆-Tag* des Proteins, wodurch dieses an die Säule gebunden wird. Anschließend kann durch schrittweise Erhöhung der Imidazolkonzentration im Elutionspuffer das Protein von der Säule verdrängt und eluiert werden. Das Prinzip beruht dabei auf der chemischen Ähnlichkeit zwischen Imidazol und dem Histidin.

Die Durchflussgeschwindigkeit betrug während der gesamten Aufreinigung ca. 1 ml/min. Anschließend wurde die Säule mit 100 ml Waschpuffer gewaschen. Die Elution erfolgte mit ca. 50 ml Elutionspuffer. Das Eluat wurde über Nacht gegen PBS dialysiert (MWCO 14000). Die Aufkonzentrierung erfolgte durch Zentrifugation im VivaSpin-Röhrchen nach Angaben des Herstellers. Die konzentrierte Proteinlösung wurde anschließend steril filtriert und die Konzentration über das BCATM Protein Assay Kit bestimmt. Die Reinheit der Präparation wurde in einem 10%igen SDS-Gel verifiziert.

3.1.3. Affinitätschromatographie über Protein G zur Aufreinigung von Antikörpern

PBS 1x : 136,9 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH₂PO₄, 7,9 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O

0,1 M Glycin pH 2,7: 7,5 g Glycin (MW 75,07) in 1l ddH₂O; pH-Wert auf 2,7 mit 37 %iger HCl einstellen

1 M Tris, pH 9,0: 121,14 g Tris Base (MW 121,14) in 1 l ddH₂O; pH auf 9,0 mit 37 %iger HCl einstellen

Die Protein G Säule (Protein G Sepharose 4 Fast Flow, GE Healthcare, München) wurde mit dem 5fachen Säulenvolumen an PBS äquilibriert. Nach Äquilibrierung der Säule wurde der Hybridomüberstand auf die Säule aufgebracht. Antikörper im Überstand besitzen eine hohe Affinität zum Protein G, das auf der Säulenmatrix gebunden ist. Die Elution der gebundenen Antikörper erfolgte mittels Senkung des pH-Wertes mit 0,1 M Glycin-Puffer pH 2,7. Die Elution wurde am UV-Detektor verfolgt. Das Eluat wurde mit 1 M Tris pH 9,0 neutralisiert. Die Antikörper wurden über Nacht gegen PBS dialysiert (MWCO 20000). Die Konzentration des Antikörpers wurde im das BCATM Protein Assay Kit nach Angaben des Herstellers bestimmt. Zusätzlich wurde die Intaktheit des Antikörpers in einem 10%igen SDS-Gel überprüft.

3.1.4. Kopplung von Antikörpern

3.1.4.1. Biotinylierung von Antikörpern

10 mg/ml Biotin: 10 mg EZ-Link®Sulfo-NHS-LC Biotin (Pierce) in 1 ml DMSO

PBS 1x: 136,9 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH₂PO₄, 7,9 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O

0,05 % (w/v) Natriumazid in PBS

Für die Biotinylierung von Antikörpern wurde die Biotin-Stocklösung in DMSO frisch angesetzt. Es wurden 1 mg Antikörper in PBS eingesetzt, wobei 3 Kopplungsverhältnisse (molares Verhältnis von Antikörper zu Biotin) ausgetestet wurden: 1:10, 1:20 und 1:50. Das gelöste Biotin wurde direkt zum Antikörper gegeben, kurz mit dem Vortexer gemixt und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Freies Biotin wurde von den Antikörper-Biotin-Komplexen durch Ausschlusschromatographie entfernt. Dafür wurde eine PD 10-Säule (SephadexTM G-25M) verwendet. Die Säule wurde mit dem 5fachen Säulenvolumen an 0,05 % Natriumazid in PBS äquilibriert. Der gekoppelte Antikörper wurde auf die Säule gegeben und Fraktionen á 0,5 ml aufgefangen. Nach dem Bradford-Spot-Test konnten die proteinhaltigen Fraktionen von 0,5 ml gepoolt werden. Für den Bradford-Spot-Test wurden je 25 µl Bradford-Reagenz (Sigma, Deisenhofen) auf Parafilm gegeben und jeweils 10 µl jeder Fraktion zugeben. Die proteinhaltigen Proben färbten sich blau.

3.1.4.1. Kopplung von Fluorochromen (Dye647) an Antikörper

PBS 1x : 136,9 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH₂PO₄, 7,9 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O

Bicarbonat Puffer, pH 9,0, 50 mM: 2,1 g NaHCO₃ in 400 ml ddH₂O lösen, pH auf 9,0 einstellen und mit ddH₂O auf 0,5 l auffüllen

PBS mit 0,02 % Natriumazid

25 nmol/µl Dye647: 1 mg Dye647 NHS-ester (Dyomics, Jena) in 50 µl DMSO lösen

Die Kopplung der Antikörper erfolgte nach Angaben des Herstellers.

3.1.5. SDS-PAGE

Acrylamidlösung: Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1) (Art.-Nr. 3029.1), Roth

10 % APS: 5 g Ammoniumpersulfat in 50 ml ddH₂O lösen

4x Trenngelpuffer, pH 8,8: 1,5 M Tris-HCl, 0,4 % SDS

4x Sammelgelpuffer, pH 6,8: 0,5 M Tris-HCl, 0,4 % SDS

10x Running Buffer, pH 8,3: 250 mM Tris, 2 M Glycin, 1 % SDS

6x Probenpuffer für SDS-PAGE nach Lämmli: 375 mM Tris pH 6,8, 12 % SDS, 30 % Glycerol, 500 mM DTT, 0,001 % Bromphenolblau

Für nicht-reduzierenden Probenpuffer wurde kein DTT verwendet

Coomassie Blue Färbelösung: 0,25% Coomassie Brilliant Blue R250 (w/v), 45% Methanol (v/v), 10% Essigsäure (v/v)

Entfärber : 45 % Methanol (v/v), 10 % Essigsäure (v/v)

Äquilibrierpuffer: 20 % Ethanol (v/v), 10 % Glycerol (v/v)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ermöglicht die Auftrennung von Proteingemischen entsprechend ihrer Masse; dabei überdeckt das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (engl. Sodium dodecyl sulfate, SDS) bei seiner Bindung die Eigenladung der

Proteine und zerstört gleichzeitig ihre Sekundär- und Tertiärstrukturen, so dass sich die stark negativ geladenen SDS-Protein-Micellen proportional zu ihrem Molekulargewicht im elektrischen Feld bewegen. Die SDS-PAGE basierte auf dem diskontinuierlichen Laemmli-System mit Tris-Glycin-Puffern, bei der ein 10%iges Trenngel mit einem 4%igen Sammelgel überschichtet wurde. Die Dicke der Gele betrug 0,75 mm. Es wurde ein vertikales Minigelsystem verwendet (*Mini-Protean 3 Electrophoresis Cell*, BioRad, München). Die Proteinproben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit 6x reduzierendem Probenpuffer versetzt und 10 min bei 95°C aufgeköcht. Die Elektrophorese wurde bei konstanter Spannung von 150 V durchgeführt.

Die Detektion erfolgte mittels Coomassie-Färbung. Dazu wurde das Gel zuerst kurzzeitig in *Coomassie Blue* Färbelösung in der Mikrowelle erhitzt, anschließend in Entfärber bis zur gewünschten Intensität der Banden.

Zum Trocknen der Gele wurden das Gel und die Cellulose-Folien in der Äquilibriumspuffer eingeweicht, in einen Rahmen eingespannt und bei Raumtemperatur getrocknet.

3.1.6. Western-Blot

<u>Transferpuffer pH 8.3:</u>	25 mM Tris-Base, 150 mM Glycin, 10 % Methanol
<u>10x TBS:</u>	0,5 M Tris-HCl, 1,5 M NaCl; pH 7.2
<u>TTBS:</u>	0,05 % Tween-20 TM in TBS
<u>‘Blotto’:</u>	5 % Magermilch in TTBS
<u>Entwickler:</u>	156,6 g in 1 l ddH ₂ O (Kodak / SIGMA; P-5670)
<u>Fixierer:</u>	184,2 g in 1 l ddH ₂ O (Kodak / SIGMA; Cat.: 197 1746)
<u>Substrat:</u>	Super Signal West Pico Mouse IgG <i>Detection</i> Kit; Pierce

Für den Transfer wurde die PVDF-Membran (Hybond-P, GE Healthcare, München) zunächst 1 min in Methanol, dann 1 min in ddH₂O aktiviert und schließlich zusammen mit dem Gel im Transferpuffer äquilibriert. Der Transfer der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine des Gels auf die Membran (*Western Blot ‘semi dry’*) erfolgte in einem kontinuierlichen Puffersystem, wobei zwischen Gel und Kathode sowie zwischen Membran und Anode jeweils 3 Lagen in Transferpuffer getränkten *Gel Blotting*-Papiers befanden. Der Transfer (Fastblot B43, Biometra) erfolgte für 30 min bei konstanter Stromstärke von 350 mA (ca. 1 mA / cm² Transferfläche).

Nach dem Transfer wurden die unspezifischen Bindungsstellen durch einstündige Inkubation bei 37°C oder bei 4°C über Nacht in ‘Blotto’ inkubiert. Die Membran wurde dreimal 10 min mit TTBS gewaschen. Die Inkubation mit dem Primärantikörper, verdünnt in ‘Blotto’ erfolgte über Nacht bei 4°C unter Schwenken. Anschließend wurde die Membran dreimal 10 min in TTBS gewaschen. Die Inkubation mit dem adäquaten Sekundärantikörper (s. Kapitel 2.6.2), verdünnt 1:10 000 in Blocking-Lösung erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur auf einem Taumler, woran sich erneutes Waschen (s.o.) anschloss. Die Blotentwicklung, d.h. zur Peroxidase-vermittelten Chemilumineszenz-Reaktion, wurde mit Super Signal West Pico Mouse IgG *Detection* Kit (Pierce) nach Herstellerprotokoll durchgeführt.

Zur Detektion wurden *Kodak Scientific Imaging* Filme (X-OMAT UV) verwendet (Exposition 1 bis 15min).

3.1.7. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Coating Buffer, pH 9,6: 50 mM Na₂CO₃

PBS 1x: 136,9 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH₂PO₄, 7,9 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O

Blocking Buffer: 2 % BSA/PBS (w/v)

Washing Buffer: 0,05 % Tween-20TM/PBS (v/v)

0,05 M Phosphat-Citrat-Puffer, pH 5,0: 0,1 M Dinatriumhydrogenphosphat, 0,05 M Zitronensäure

1,5 M H₂SO₄

3.1.7.1. Isotypspezifischer ELISA

Die Titerbestimmung der G6PI-spezifischen Antikörper der Isotypen IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b und IgG3 erfolgte mit dem *Mouse monoclonal isotyping Kit Iso-2* von Sigma entsprechend den Angaben des Herstellers. In Kürze: die MaxiSorp-Platte (96 well) wurde mit 50 µl G6PI in PBS (5 µg/µl) beschichtet und über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4°C inkubiert. Die Platte wurde dreimal mit *Washing Buffer* im ELISA-Washer gewaschen. Zur Blockade unspezifischer Bindungen wurde 100 µl Blocking Buffer in die Kavitäten der 96-well-Platte gegeben und 1 h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurde die Platte erneut gewaschen. Die Mausseren wurden seriell von 1:100 - 1:409.600 in *Washing Buffer* verdünnt und in Dupletts jeweils 50 µl in die Kavitäten der 96-well-Platte gegeben. Nach 1h wurde die Platte dreimal mit dem *ELISA-Washer* gewaschen. Nach dem Waschen mit *Washing Buffer* wurden die isotypspezifischen Ziege anti-Maus-Antikörper (IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3) 1:1000 in *Washing Buffer* verdünnt und aufgetragen. Nach 1 h wurde die Platte erneut gewaschen. Die Detektion erfolgte mit einem POD-gekoppelten Esel anti-Ziege-Antikörper, der 1:3000 in *Washing Buffer* verdünnt wurde. Nach einer Inkubation von 15 Minuten, erfolgte die Farbreaktion mit 1 mg/ml o-Phenylendiamnin (o-PD) in Phosphat-Citrat-Puffer mit 4 µl 30 H₂O₂ in 10 ml Substratlösung. Die Farbreaktion wurde durch die Zugabe von H₂SO₄ abgestoppt. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 492 im Photometer gemessen.

Der Titer ist die höchste Verdünnung bei der die Absorption größer ist als die Summe aus Absorption des Mittelwertes des Blankwertes und der dreifachen Standardabweichung der Absorption des Blankwertes.

3.1.7.2. Bestimmung von G6PI-spezifischem Gesamt-IgG

Für die Bestimmung von G6PI-spezifischem Gesamt IgG wurde wie beim isotypspezifischem ELISA die MaxiSorp-Platte (96 well) mit 50 µl G6PI in PBS (5 µg/µl) beschichtet und über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4°C inkubiert. Die Platte wurde dreimal mit *Washing Buffer* im ELISA-Washer gewaschen. Zur Blockade unspezifischer Bindungen wurde 100 µl *Blocking Buffer* in die Kavitäten der 96-well-Platte gegeben und 1h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurde die Platte erneut gewaschen. Die Mausseren wurden seriell von 1:100 - 1:409.600 in *Washing Buffer* verdünnt und in Dupletts jeweils 50 µl in die Kavitäten der 96-well-Platte gegeben. Nach 1 h

wurde die Platte dreimal mit dem ELISA-*Washer* gewaschen. Nach dem Waschen mit *Washing Buffer* wurde zur Detektion ein POD-markierter Ziege Fc-spezifischer Ziege anti-Maus-Antikörper 1:10000 in *Washing Buffer* verdünnt und in die Kavitäten der 96-*well*-Platte gegeben. Nach einstündiger Inkubation wurde die Platte erneut dreimal gewaschen. Die Farbreaktion erfolgte wie beim isotypspezifischen ELISA beschrieben.

3.1.7.3. Zytokin-ELISA

Zur Bestimmung von Zytokinen in Zellkulturüberständen wurden Milz bzw. die inguinalen Lymphknoten entnommen, eine Einzelzellsuspension hergestellt (s. Abschnitt 3.2.2.) und die Zellen für 48 h mit Kulturmedium allein, 20 µg/µl G6PI bzw. 2 µg/µl anti-CD3/CD28 stimuliert. Die Überstände wurden abgenommen und bei -20°C eingefroren.

Zur Bestimmung der Zytokine mittels *Sandwich-ELISA* wurden die MaxiSorp-Platten mit dem 50 µl des Primärantikörpers in PBS beschichtet wie in Tabelle 6 aufgeführt und über Nacht in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach dem Waschen wurden die unspezifischen Bindungen für 1 h bei Raumtemperatur mit *Blocking Buffer* blockiert. Von den Überständen und den Standards wurden in Duplikaten jeweils 50 µl aufgetragen und bei Raumtemperatur für 2 h in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde der 50 µl des biotinylierten Sekundärantikörpers wie in Tabelle 6 angegeben aufgetragen und die Platte 1h in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Die Detektion erfolgte mit Streptavidin-Peroxidase. Die Farbreaktion erfolgte wie beim isotypspezifischen ELISA beschrieben.

Tabelle 6: Antikörper für ELISA: Zur Bestimmung der Zytokine verwendete Primär- und Sekundär-Antikörper und zugehörige Puffer.

Zytokin	Klon	Konzentration	Markierung	Beladungspuffer	Herkunft
IL-4	11B11	2 µg/ml	Unmarkiert	PBS	eBioscience
	BVD6-24G2	1 µg/ml	Biotin	-	eBioscience
IL-6	MP5-20F3	4 µg/ml	Unmarkiert	PBS	eBioscience
	MP5-32C11	1 µg/ml	Biotin	-	eBioscience
IL-17	Kit von R&D	siehe	Unmarkiert	PBS	R&D
	DY421	Herstellerangaben	Biotin	-	
IL-22	Ab-01	4 µg/ml	Unmarkiert	PBS	Wyeth
	Ab-03	1 µg/ml	Biotin	-	Wyeth/ Jena
IFN-γ	AN-18	1 µg/ml	Unmarkiert	PBS	eBioscience
	R4-6A2	1 µg/ml	Biotin	-	eBioscience

3.2. Methoden der Zellbiologie

3.2.1. Zellkultur

Bei der Kultivierung von Zellen wurden bestimmte Verhaltensregeln beachtet, um steriles Arbeiten zu gewährleisten: Instrumente zur Präparation von Organen (Scheren, Pinzetten) wurden bei trockener Hitze sterilisiert. Puffer und Medien wurden entweder autoklaviert oder sterilfiltriert. Beim Umgang mit eukaryotischen Zellen wurde ausschließlich unter der Sterilbank gearbeitet. Die eukaryotischen Zellen wurden bei 37°C, einer Luftfeuchtigkeit von 95 % und einer CO₂-Konzentration von 5 % im entsprechenden Kulturmedium kultiviert.

3.2.2. Gewinnung von Lymphozyten aus Milz und Lymphknoten

Kulturmedium: RPMI-1640 (PAA Laboratories), 10 % FCS (Sigma), 100 mM HEPES (PAA Laboratories), 20 U/ml (PAA Laboratories), 0,1 mg/ml Streptomycin (PAA Laboratories), 50 µM 2-Mercaptoethanol (Applichem)

Erythrozytenlyse-Puffer: 0,01 M KHCO₃, 0,15 M NH₄Cl, 0,1 mM EDTA; pH 7,5

Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet. Milz und inguinale Lymphknoten wurden entnommen, in ein 70 µm-Zellsieb überführt und mithilfe eines Spritzenstempels zu einer Einzelzellsuspension in Kulturmedium verarbeitet. Nach der Zentrifugation (470xg, 4°C, 6 min) erfolgte die Erythrozytenlyse durch Zugabe von 2 ml Erythrozytenlyse-Puffer. Die Reaktion wurde nach 1 min durch Zugabe von Kulturmedium abgestoppt. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert und in Kulturmedium aufgenommen. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mithilfe der Neubauer-Zählkammer. Abschließend wurde die Zelldichte (Zellen/ml) auf den gewünschten Wert eingestellt.

3.2.3. Gewinnung von Zellen aus dem Blut

PBA: 0,25 % BSA (w/v), 0,02 % Natriumazid (w/v) in PBS

Erythrozytenlyse-Puffer: 0,01 M KHCO₃, 0,15 M NH₄Cl, 0,1 mM EDTA; pH 7,5

Zur Blutgewinnung wurden die Mäuse zunächst für kurze Zeit mit Rotlicht bestrahlt, um eine stärkere Durchblutung der Schwanzvene zu erreichen. Um die Mäuse zu immobilisieren, wurden sie in einen Impfkäfig gesetzt. Die Schwanzvene wurde nahe der Schwanzbasis vorsichtig mit dem Skalpell punktiert und die Blutropfen in einem MiniCollect® Röhrchen (Sarstedt) aufgefangen. Die Punktionsstelle wurde vorsichtig mit einem Papiertuch abgewischt und die Maus in den Käfig zurückgesetzt. Sie wurde dort so lange beobachtet, bis die Blutung vollständig zum Stillstand kam.

Das Blut wurde in ein FACS-Röhrchen überführt, mit 3 ml Erythrozytenlyse-Puffer versetzt und für 5 min inkubiert. Dann wurde das Röhrchen mit PBA aufgefüllt und 6 min bei 470xg bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen. Waren noch viele Erythrozyten vorhanden wurde der Vorgang wiederholt. Die Zellen wurden anschließend einmal mit PBA gewaschen und dann für die durchflusszytometrische Messung weiter verarbeitet.

3.2.4. *In-vitro*-Proliferationsassay mit [³H]-Thymidin

Kulturmedium: RPMI-1640 (PAA Laboratories), 10 % FCS (Sigma), 100 mM HEPES (PAA Laboratories), 20 U/ml (PAA Laboratories), 0.1 mg/ml Streptomycin (PAA Laboratories), 50 μ M 2-Mercaptoethanol (Applichem)

1 μ Ci [³H]-Thymidin: [methyl-³H]Thymidine, 37 MBq, 1 mCi (GE Healthcare, TRA310-1MCI), eingestellt auf 1 μ Ci/25 μ l Kulturmedium

Beim [³H]-Thymidin-Proliferationsassay kann die Proliferation von Zellen nach Stimulation mit einem Antigen durch Inkorporation des Radionukleotids [³H]-Thymidin gemessen werden.

Zunächst wurde eine Einzelzellsuspension hergestellt wie unter 3.2.2. beschrieben. 2×10^5 Zellen wurden in die Kavitäten einer *96-well*-Platte als Triplikate ausgesät. Die Zellen wurden mit 10 μ g/ml G6PI oder 1 μ g/ml Peptid stimuliert. Als Kontrolle (unstimulierte Probe) diente Kulturmedium. Die Zellen wurden für 72 h bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Für die letzten 18 h wurde 1 μ Ci [³H]-Thymidin der Kultur hinzugefügt. Nach 72h wurden die Zellen zum Aufschluss bei – 80°C eingefroren. Die Proben wurden mit Hilfe eines Zellerntegerätes (Zellharvester Unifilter-96; Perkin-Elmer) auf Filterplatten (Unifilter GF/C 96-Well-Platten; Perkin-Elmer) transferiert. Nach dem Trocknen der Filterplatten wurde Szintillator (Szintillationscocktail Microscint O; Perkin Elmer) auf die Filterplatten gegeben und diese versiegelt. Abschließend wurden die Platten im β -Szintillationszähler (Flüssigkeits-Szintillationszähler TopCount; Perkin-Elmer) vermessen.

Im Allgemeinen wurde die Proliferation in Form des Stimulationsindex angegeben. Der Stimulationsindex ist der Quotient aus dem Mittelwert der *counts per minute* (cpm) nach Stimulation mit G6PI bzw. Peptid und dem Mittelwert der cpm der unstimulierten Probe.

3.2.5. Messung der *in-vivo*-Proliferation durch BrdU-Inkorporation

PBS 1x : 136,9 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH₂PO₄, 7,9 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O

10 mg/ml BrdU : 10 mg Bromo-5'-Desoxyuridin (BrdU, Sigma, Deisenhofen) in 1 ml PBS lösen.

Um die Proliferation von Zellen *in vivo* zu analysieren, kann man sich den Einbau des Nukleotids Bromo-5'-desoxyuridin (BrdU) in die DNA sich teilender Zellen zu nutze machen. BrdU kann mit einem Antikörper durchflusszytometrisch nachgewiesen werden. Je mehr Zellen positiv für BrdU sind, desto mehr Zellen haben sich geteilt.

Für die Messung der *in-vivo*-Proliferation wurden Mäuse wie unter 3.3.1. mit G6PI/CFA immunisiert. Kontrolltiere wurden mit PBS/CFA immunisiert. Den Mäusen wurde von Tag 0 bis Tag 8 täglich 1 mg BrdU intraperitoneal appliziert. An Tag 9 wurden die Tiere getötet und die BrdU-Inkorporation durchflusszytometrisch analysiert (siehe 3.2.7.2.).

3.2.6. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Charakterisierung von einzelnen Zellen in Suspension, die mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern markiert wurden, anhand der Lichtstreuungseigenschaften sowie der emittierten Fluoreszenzstrahlung. Bei dem im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Durchflusszytometer (BD LSR II) können gleichzeitig die relative Zellgröße mittels des *Forward Scatters* (FSC), die Granularität mittels des *Side Scatters* (SSC) sowie bis zu 10 Fluoreszenzfarben

gemessen werden. Praktisch wurden maximal 7 Fluoreszenzfarben ausgeschöpft. Umgeben von einem laminaren Flüssigkeitsstrom gelangen die Zellen über ein Schlauchsystem mittels Überdruck in den Messbereich, wo sie die Laserstrahlen mit unterschiedlichen Anregungswellenlängen passieren. Durch den laminaren Flüssigkeitsstrom können die Zellen die Laser nur einzeln passieren. Die Streulicht- und Fluoreszenzsignale werden auf die verschiedenen *Photomultiplier* geleitet; durch die geeignete Kombination von *Longpass* (LP)- und *Bandpass* (BP)-Filtern ist es möglich, auch zwischen Fluorochromen zu differenzieren, die von dem gleichen Laser angeregt werden und deren Emissionswellenlängen nahe beieinander liegen (s. Tabelle); die gemessenen Signale werden durch die DiVa® Software verarbeitet und gespeichert. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der FlowJo® Software von TreeStar.

Tabelle 7: Setup des verwendeten verwendeten Durchflusszytometers BD LSR II und die Fluorochrome, die gemessen werden können: Alexa-Farbstoffen (A), Allophycocyanin (APC), Indodicarbocyanin (Cy), Dyomics-Farbstoffe (Dye), Fluorescein Isothiocyanat (FITC), R-Phycoerythrin (PE), Perdinin-Chlorophyll (PerCP)

Laser	BP	LP	Fluorochrom	Scatter
Rot (633 nm)	780/60	735	APC-Cy7, APC-A750	-
	710/50	685	Alexa700, Alexa680, Dye 682	-
	660/20	-	APC, Alexa647, Cy5	-
Blau (488nm)	780/60	735	PE-Cy7, PE-A750	-
	695/40	685	PerCP-Cy5.5, PE-Cy5.5, PE-A700	-
	575/26	550	PE, PI	-
	530/30	505	FITC, Alexa488, GFP	-
	488/10	-	-	SSC
Violett (405nm)	670/14	635	Qdot655	-
	525/50	505	ViD, Cascade Yellow	-
	440/40	-	Pacific Blue	-

3.2.6.1. Oberflächenfärbung

PBA: 0,25 % BSA (w/v), 0,02 % Natriumazid (w/v) in PBS

Für die *ex vivo* Analyse der Expression von Oberflächenmolekülen auf Zellen wurde eine Oberflächenfärbung durchgeführt. Für die Oberflächenfärbung wurden 1×10^6 bis 1×10^7 Zellen einer Einzelzellsuspension von Milz oder Lymphknoten bzw. Zellen des peripheren Blutes verwendet. Die Färbung wurde in FACS-Röhrchen oder *Cluster-Tubes* auf Eis und im Dunkeln in einem Endvolumen von 100 μ l durchgeführt. Die Zellen wurden mit PBA gewaschen und bei 470xg bei 4°C für 6 min

zentrifugiert. Zur Blockade der unspezifischen Bindung von Antikörpern an Fc-Rezeptoren wurden die Zellen mit 10 µg/ml Ratten-IgG und anti-CD16/CD32 (Klon 2.4G2) Antikörpern in PBA für 10 min inkubiert. Anschließend wurden die fluorochrom-gekoppelten Antikörper in PBA für weitere 15 min hinzugefügt. Die optimale Konzentration an fluorochrommarkiertem Antikörper wurde in Vorversuchen bestimmt. Danach wurden die Zellen erneut gewaschen und zentrifugiert. Bei der Verwendung biotinylierter Antikörper wurde Fluorochrom-gekoppeltes Streptavidin in PBA hinzugegeben und für 10 min inkubiert. Danach wurde erneut mit PBA gewaschen. Zum Schluß wurden die Zellen in 250-300 µl PBA aufgenommen und am Durchflusszytometer (BD LSRII) analysiert.

3.2.6.2. Intrazelluläre Färbung

PBA: 0,25 % BSA (w/v), 0,02 % Natriumazid (w/v) in PBS

PBA-S: 0,5 % Saponin (v/v) in PBA

2 % PFA (w/v) in PBS

Brefeldin A: 5 mg/ml Brefeldin A (Sigma) in Ethanol; 1:1000

PMA: 5 µg/ml PMA in RPMI-1640 (PAA Laboratories); 1:1000

Ionomycin: 1 mg/ml Ionomycin in DMSO (AppliChem); 1:1000

Neben der Analyse von Oberflächenmolekülen bietet die Durchflusszytometrie auch die Möglichkeit die Produktion von Zytokinen nach Stimulation von Lymphozyten zu analysieren. Die Zellen können unspezifisch mittels einer Kombination des Phorbolesters Phorbolmyristatacetat (PMA) und dem Ionophor Ionomycin (Iono) stimuliert werden. PMA aktiviert aufgrund seiner chemischen Ähnlichkeit zu Diacylglycerol (DAG) die Proteinkinase C (PKC). Ionomycin kann wegen seiner hydrophoben Eigenschaften die Lipiddoppelschicht von Membranen durchdringen und erhöht den Calcium-Spiegel in der Zelle und aktiviert auch die PKC. Abschließend führen diese Prozesse zur Stimulation der Zytokinproduktion. T-Zellen können spezifisch durch Antikörper gegen CD3 (Klon 145-2C11) und gegen CD28 (Klon 37.51) aktiviert werden. Die antigenspezifische Aktivierung von T-Zellen erfolgte mit dem Protein G6PI und den davon abgeleiteten Peptiden G6PI₈₅₋₉₉ und G6PI₄₆₉₋₄₈₃.

Zur Stimulation wurden Zellen in einer Konzentration 1×10^6 bis 1×10^7 Zellen/ml für 4h (unspezifisch) bzw. 6h (T-Zell- und Antigen-spezifisch) bei 37°C, 5 % CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von 95 % kultiviert. Nach Ablauf von 2 h wurde Brefeldin A in einer Endkonzentration von 5 µg/ml den Kulturen hinzugefügt. Brefeldin A inhibiert den sekretorischen Vesikeltransport des Endoplasmatischen Retikulums, in dem es die Knospung der Transportvesikel verhindert. Nach der Stimulation wurde wie beschrieben eine Oberflächenfärbung durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen, um Proteinreste zu entfernen. Danach wurden die Zellen mit 2 % PFA in PBS für 20 min auf Eis fixiert. Durch die Zugabe von PBA wurde die Fixierung gestoppt. Die Zellen wurden bei 470xg zentrifugiert und dann mit PBS gewaschen. Um eine intrazelluläre Färbung zu ermöglichen wurden die Zellen mit PBA-S permeabilisiert. Dieser Puffer erhält Saponin. Saponin permeabilisiert die Zellen, so dass die Antikörper in die Zellen diffundieren können. Zur Blockade der unspezifischen Bindung von Antikörpern an Fc-Rezeptoren wurden die Zellen mit 10 µg/ml Ratten-IgG und anti-CD16/CD32 (Klon 2.4G2) Antikörpern in PBA-S für 10 min inkubiert. Anschließend wurden die fluorochrom-gekoppelten Antikörper in PBA-S für weitere 15 min hinzugefügt. Die Zellen werden einmal mit PBA-S und einmal mit PBA gewaschen, um die geöffneten Poren wieder zu verschließen. Zum Schluß

wurden die Zellen in 250-300 μ l PBA aufgenommen und am Durchflusszytometer (BD LSR II) analysiert.

3.2.6.2.1. Färbung von Antigen-spezifischen Th-Zellen über CD154

PBA: 0,25 % BSA (w/v), 0,02 % Natriumazid (w/v) in PBS

PBA-S: 0,5 % Saponin (v/v) in PBA

2 % PFA (w/v) in PBS

Brefeldin A: 5 mg/ml Brefeldin A (Sigma) in Ethanol; 1:1000

Es sollte die Zytokinproduktion von G6PI-spezifischen Th-Zellen analysiert werden. Die Analyse von Antigen-spezifischen Th-Zellen kann mittels Tetrameren erfolgen. Da zum Beginn dieser Arbeit die immundominanten Epitope in der G6PI-induzierten Arthritis noch nicht bekannt waren, wurden die Antigen-spezifischen Th-Zellen über die Expression von CD154 ermittelt. Die Expression von CD154 ist abhängig von der Aktivierung der Th-Zellen über den T-Zell-Rezeptor. Somit können über *de-novo*-synthetisiertes CD154 Antigen-spezifischen Th-Zellen identifiziert werden (Chattopadhyay et al., 2005).

1×10^7 Zellen/ml einer Einzelzellsuspension von Milz oder Lymphknoten wurden 6h nur in Kulturmedium, mit 20 μ g/ml G6PI bzw. 1 μ g/ml Peptid oder 2 μ g/ml anti-CD3 und anti-CD28 stimuliert. Für die letzten 4 h wurde Brefeldin A in einer Endkonzentration von 5 μ g/ml hinzugefügt. Dann wurden die Zellen in *Cluster-Tubes* überführt und mit PBS gewaschen. Da Zellmembranen toter Zellen Antikörper unspezifisch binden können, wurden die Zellen mit einem aminreaktiven Lebend-Tot-Farbstoff (*viability dye*, ViD) gefärbt. Diese Form der Lebend-Tot-Exklusion kann auch in Kombination mit einer intrazellulären Färbung verwendet werden. ViD (L34955, Invitrogen) wird 1:500 in PBS verdünnt; die Zellen werden mit 50 μ l der Verdünnung 20 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Anschließend werden die Zellen mit PBS gewaschen und 20 min auf Eis in 2 % PFA fixiert. Durch die Zugabe von PBA wurde die Fixierung gestoppt. Die Zellen wurden bei 470xg zentrifugiert und dann mit PBS gewaschen. Danach werden die Zellen mit PBA-S permeabilisiert. Die Blockade der unspezifischen Bindungen erfolgt wie zuvor beschrieben. Dann wurden die Zellen mit anti-CD4, anti-CD154 und den Zytokin-spezifischen Antikörpern in PBA-S gefärbt. Die Zellen werden einmal mit PBA-S und einmal mit PBA gewaschen. Schließlich wurden die Zellen in 250-300 μ l PBA aufgenommen und am Durchflusszytometer (BD LSR II) analysiert.

Für die Auswertung der Daten wurden diese mit FlowJo analysiert. Zum Ausschluss der Dubletten wurden die einzelnen Zellen (*Singlets*) im FSC-A/FSC-W-Plot markiert. Danach wurden im SSC-A/FSC-A-Plot die Lymphozyten ausgewählt. Im Plot ViD gegen Pacific Blue wurden die lebenden Zellen markiert. Nachdem die CD4⁺ Zellen ausgewählt wurden, konnte die Antigen-spezifische Zytokinproduktion, exemplarisch für IL-17 dargestellt, im Plot Zytokin (IL-17) gegen CD154 analysiert werden. Für die G6PI-spezifischen IL-17-Produzenten (CD154⁺IL-17⁺) wird anhand der Medium-Kontrolle, das *Gate* so gelegt, dass der Prozentsatz der CD154⁺IL-17⁺-Zellen kleiner 0,1 % ist. Dieses *Gate* wird auf die G6PI-stimulierte Probe übertragen.

Diese Form der Analyse ermöglicht es zu untersuchen, ob Zytokine nur Antigen-spezifisch also mit CD154 koexprimiert werden.

Für die Analyse polyfunktionaler Th-Zellen wurde eine alternative *Gating*-Strategie verwendet: das *progressive gating*.

Wie zuvor erfolgte der Ausschluss der Dubletten und danach die Auswahl der Lymphozyten, der lebenden Zellen und der CD4⁺-Zellen. Zusätzlich wurden im SSC-A/CD154-Plot die CD154⁺-Zellen die Antigen-spezifischen (CD154⁺) Zellen nach Stimulation mit G6PI im Vergleich zur Medium-Kontrolle ausgewählt. Diese Form die Analyse ermöglicht die Darstellung polyfunktionaler Antigen-spezifischer Th-Zellen, also CD4⁺CD154⁺ Th-Zellen, die mehr als ein Zytokin gleichzeitig produzieren.

Um polyfunktionale Th-Zellen zu analysieren, also Th-Zellen die mehrere Zytokine gleichzeitig produzieren, wurden mittels FlowJo®-Software *Boolean-Gates* generiert. Diese Daten wurden exportiert und mit PESTLE 1.5.4 und SPICE 4.1.6 Software (beide von Mario Roederer, Vaccine Research Center, NIAID/NIH) analysiert.

Allgemein bietet FlowJo die Möglichkeit *frequency of parent* (Frequenz bezogen auf das ausgewählten Zellen, z.B. CD4⁺ T-Zellen) oder *frequency of total* (Frequenz bezogen auf die insgesamt aufgenommenen Zellen also bezogen auf die Gesamtzellzahl) zu erfassen. In den den *Dot-Plots* ist immer *frequency auf parent* dargestellt, während für die statistischen Berechnungen, sofern nicht anders angegeben, *frequency of total* bzw. die daraus resultierende, berechnete absolute Zellzahl herangezogen wurde.

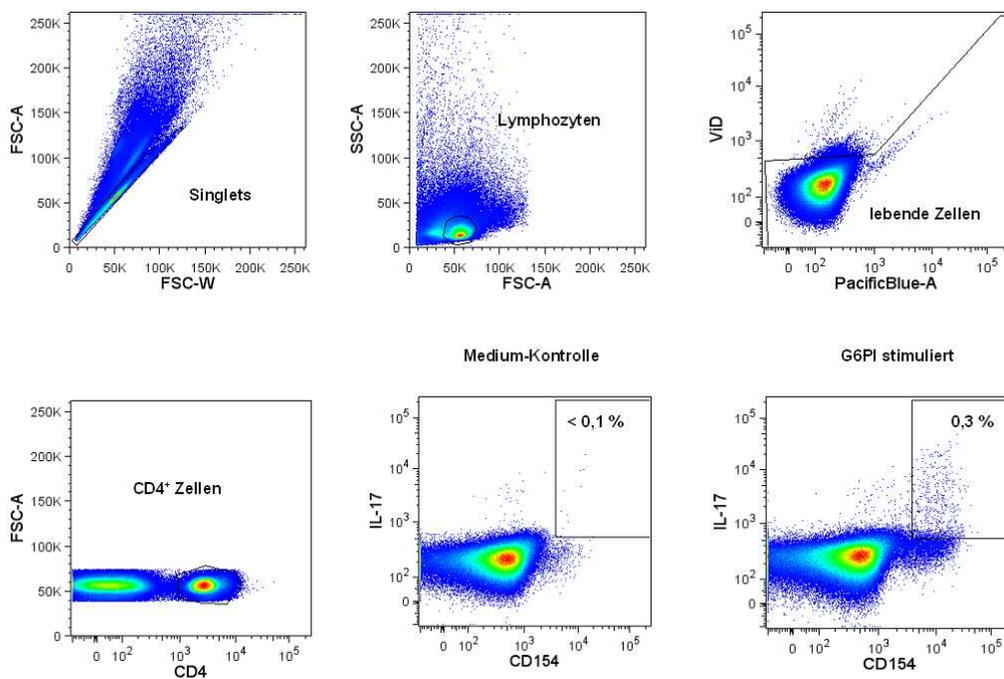


Abbildung 3: Analyse der G6PI-spezifischen Zytokinproduktion von Th-Zellen am Beispiel von IL-17:

Dargestellt ist eine *Gating*-Strategie zu G6PI-spezifischen IL-17 Produktion von Th-Zellen (von links nach rechts). Zum Ausschluss von Dubletten werden im FSC-A/FSC-W-Plot einzelne Zellen (*Singlets*) dargestellt, die auf der 45° Winkelhalbierenden liegen, anschließend werden Lymphozyten, lebende Zellen und CD4⁺ Zellen durch *Gates* eingegrenzt. Für die G6PI-spezifischen IL-17-Produzenten (CD154⁺IL-17⁺) wird anhand der Medium-Kontrolle, das *Gate* so gelegt, dass der Prozentsatz der CD154⁺IL-17⁺-Zellen kleiner 0,1 % ist. Dieses *Gate* wird auf die G6PI-stimulierte Probe übertragen.

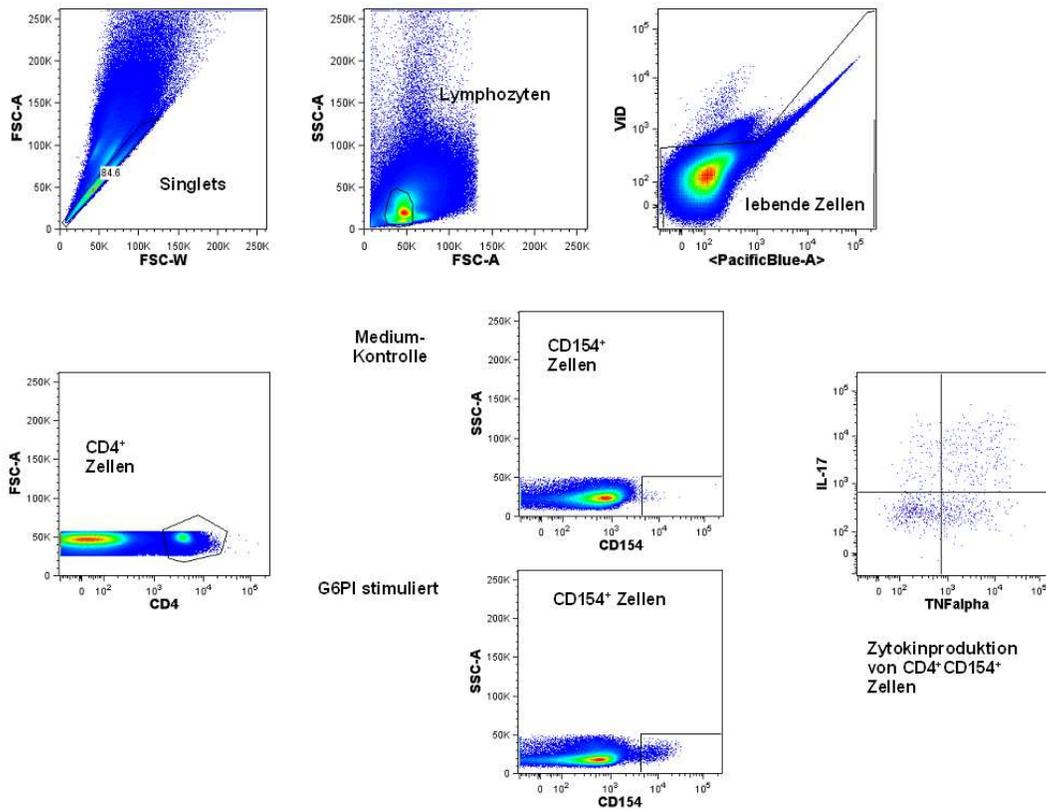


Abbildung 4: Darstellung der *progressive gating*-Strategie: Zum Ausschluss von Dubletten werden im FSC-A/FSC-W-Plot einzelne Zellen (*Singlets*) dargestellt, die auf der 45° Winkelhalbierenden liegen. Im SSC-A/FSC-A-Plot werden die Lymphozyten markiert und im ViD/Pacific-Blue-Plot werden die lebenden Zellen markiert (erste Reihe von links nach rechts). Danach werden die CD4⁺ im FSC-A/CD4-Plot ausgewählt. Die Antigen-spezifischen Zellen nach G6PI-Stimulation werden SSC-A/CD154-Plot im Vergleich zur Medium-Kontrolle markiert. So ist die Analyse der Polyfunktionalität von CD4⁺CD154⁺-Zellen in Bezug auf IL-17 und TNF- α möglich.

3.2.6.3. BrdU-Färbung

BrdU-Staining Kit BD Biosciences

Es wurden 1×10^6 Zellen pro Färbung eingesetzt. Die BrdU-Färbung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Die Auswertung erfolgte mit der FlowJo Software. Zunächst wurden im SSC-A/FSC-A-Plot die Lymphozyten markiert. Im CD4/CD3-Plot konnten die verschiedenen Lymphozytenpopulationen, z.B. die CD4⁺-Th-Zellen, dargestellt werden. Um die G6PI-spezifische Proliferation der CD4⁺-Th-Zellen anhand des BrdU-Einbaus zu bestimmen, wurden im BrdU-Histogramm der Kontrolltiere (PBS/CFA) die BrdU-positiven Zellen markiert. Dieses *Gate* wurde auf das Histogramm der G6PI/CFA-immunisierten Tiere übertragen. Der Prozentsatz der BrdU-positiven Zellen wurde auf die absolute Zellzahl umgerechnet.

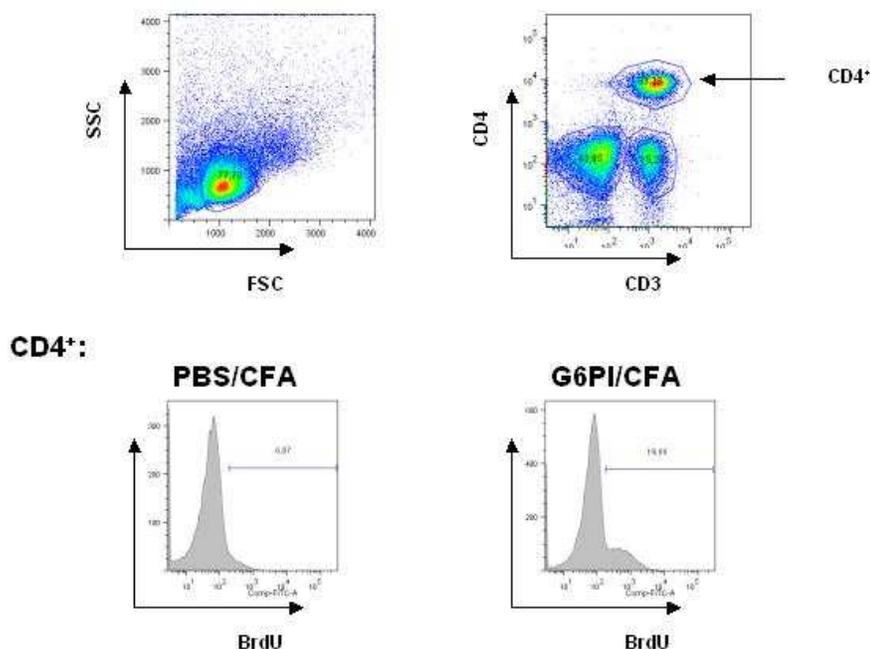


Abbildung 5: Auswertung der *in-vivo*-Proliferation: Im SSC-A/FSC-A-Plot wurden zunächst die Lymphozyten ausgewählt. Anhand der Oberflächenmarker CD3 und CD4 konnten die Lymphozytenpopulationen näher definiert werden, z.B. CD3⁺CD4⁺ Th-Zellen. Um die *in-vivo*-Proliferation der CD4⁺-Th-Zellen zu untersuchen wurden im BrdU-Histogramm die BrdU⁺-Zellen in den Kontrolltieren (PBS/CFA) markiert und dieses Gate auf die G6PI-immunisierten Tiere übertragen.

3.2.8. MACS

10x PBS: 136,9 mM NaCl , 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH₂PO₄, 7,9 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O; pH 7,2

MACS-Running-Buffer (=MACS-Puffer): 2 mM EDTA, 0,5 % BSA /PBS (w/v)

MACS-Rinsing-Solution: 2 mM EDTA in PBS

MACS-Cleaning-Solution: 70 % (v/v) Ethanol

1×10^7 Lymphozyten wurden in 90 μ l MACS-Puffer aufgenommen und mit 10 μ l MACS-*MicroBeads* (MiltenyiBiotech) gemischt. Bei Zellzahlen größer als 1×10^7 wurden die Volumina entsprechend erhöht. Zellen und *Beads* wurden 15 min bei 4°C im 'MACSmix' (MiltenyiBiotech) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit MACS-Puffer gewaschen, um die überschüssigen, ungebundenen *MicroBeads* zu entfernen. Nach der Zentrifugation (470xg, 4°C, 6 min) wurde das Zellpellet in 5 ml MACS-Puffer resuspendiert und über einen Präseparationsfilter (PreSep-Filter 30 μ m; MiltenyiBiotech) gegeben. Die Zellsortierung erfolgte mit dem AutoMACS® (MiltenyiBiotech). Die Reinheit der Sortierung wurde mittels FACS-Analyse verifiziert.

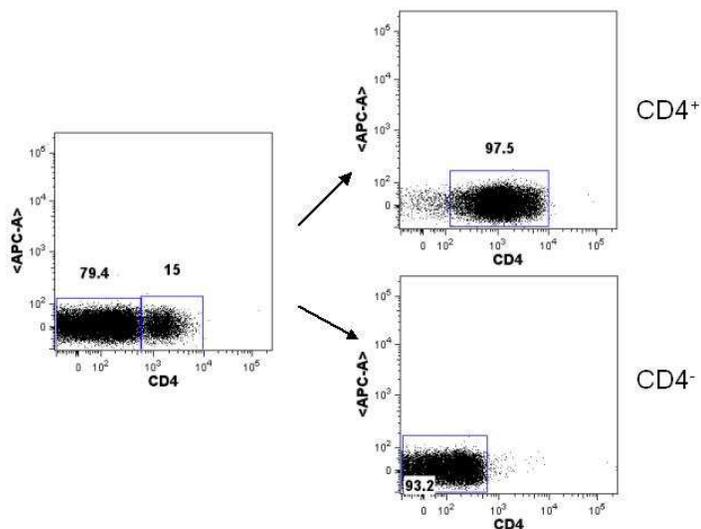


Abbildung 6: FACS-Analyse eines CD4⁺ MACS-Sorts: Nach Herstellung einer Einzelzellsuspension aus der Milz von SJL-Mäusen wurde ein CD4⁺ MACS-Sort nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Es wurde eine FACS-Färbung mit anti-CD4-FITC Antikörper durchgeführt. Die Reinheit der CD4⁺ T-Zellen lag zwischen 95-98 %.

3.3. Tierversuche

Für alle Tierexperimente wurden Mäuse im Alter von 6-10 Wochen verwendet. Die Tiere wurden am Institut für Versuchstierkunde der FSU Jena gehalten und gezüchtet. Die Haltung erfolgte unter standardisierten Bedingungen (Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 Stunden, Fütterung mit Altromin-Pellets # 1326, Wasser *ad libitum*). Alle Manipulationen der Versuchstiere wurden nur durch qualifizierte Personen durchgeführt. Alle Tierversuche waren Thüringer Landesverwaltungsamt genehmigt.

3.3.1. Induktion der G6PI-induzierten Arthritis und Ermittlung des klinischen Index

Zur Induktion der G6PI-induzierten Arthritis wurde soweit nicht anders angegeben 400 µg rekombinante humane G6PI verwendet. Die G6PI-Stocklösung wurde mit PBS auf 4 mg/ml verdünnt und mit dem gleichen Volumen CFA (Freund's Adjuvant complete; SIGMA # F5881; 1 mg/ml *Mycobacterium tuberculosis* H37RA) mittels Ultraschall emulgiert bis eine feste weiße Emulsion entstand. Diese Emulsion wurde luftblasenfrei in eine Spritze aufgezogen. Je 100 µl der Emulsion wurden links und rechts an der Schwanzbasis subkutan appliziert. Nach der Immunisierung wurden die Tiere in den Käfig zurück gesetzt und so lange beobachtet bis die Vitalitätszeichen dem Normalzustand entsprachen.

Bei Immunisierung mit G6PI-Peptiden wurde entsprechend vorgegangen.

Nach Immunisierung mit huG6PI entwickeln über 95 % aller DBA/1 Mäuse eine periphere symmetrische Arthritis in den Vorder- und Hinterpfoten. Bewertet wurden sowohl die Rötung als auch die Schwellung der Pfoten. Der Grad 0 entsprach einer gesunden, klinischen unauffälligen Pfote, während bei Grad 1 eine leichte Schwellung und leichte Rötung zu verzeichnen war, bei Grad 2 lag

eine massive Schwellung und starke Rötung vor und bei Grad 3 wurden zusätzlich Rhagaden zu beobachtet. Bei 4 Pfoten war somit ein maximaler klinischer Index von 12 Punkten zu erreichen. Es sind für alle Arthritis-Experimente die Inzidenz und der klinische Index der erkrankten Tiere angegeben.

3.3.2. Serumgewinnung

Zur Serumgewinnung wurden die Mäuse zunächst für kurze Zeit mit Rotlicht bestrahlt, um eine stärkere Durchblutung der Schwanzvene zu erreichen und zur Immobilisation in einen Impfkäfig gesetzt. Die Schwanzvene wurde nahe der Schwanzbasis vorsichtig mit dem Skalpell punktiert und die Blutropfen in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß aufgefangen. Die Punktionsstelle wurde vorsichtig mit einem Papiertuch abgewischt und die Maus in den Käfig zurückgesetzt. Sie wurde dort so lange beobachtet, bis die Blutung vollständig zum Stillstand kam. Das gewonnene Blut wurde zur Gerinnung für 30 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend für 10 min bei 10.000xg in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Das als Überstand verbliebene Serum wurde vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und bei -20 °C aufbewahrt.

3.3.3. Intraperitoneale Applikation von Antikörpern

Für die intraperitoneale (i.p.) Injektion wurde die entsprechende Menge an Antikörpern in sterilem PBS verdünnt. Die Antikörperverdünnungen wurden blasenfrei in einer Spritze aufgezogen. Die Mäuse wurde am Nacken und am Rücken so gefasst, so dass sie in ihrer Bewegungsfreiheit eingeschränkt waren und eine gefahrlose Applikation der Antikörperverdünnung ins Peritoneum möglich war. Es wurden maximal 500 µl appliziert. Die Einstichstelle wurde vor der Applikation desinfiziert. Nach der Injektion wurden die Mäuse in den Käfig zurück gesetzt und abgewartet bis die Vitalitätszeichen dem Normalzustand entsprachen.

3.3.3.1. Depletion von B-Zellen mit anti-CD22-Cal

Um die pathogenetische Relevanz von B-Zellen in der G6PI-induzierten Arthritis näher zu untersuchen, wurden B-Zellen mithilfe eines Antikörpers, der gegen CD22 gerichtet ist und an N-Acetyl-γ-Calicheamicin Dimethylsäure gekoppelt ist (anti-CD22-Cal), depletiert. CD22 ist ein Typ I Membranprotein und gehört zur Siglec (*sialic-acid binding immunoglobulin-like family*) Familie; es ist negativer Regulator der B-Zellrezeptor-Signaltransduktion (Tuscano et al., 1999). In der Peripherie wird CD22 von allen B-Zell-Subpopulationen außer von Plasmazellen exprimiert. CD22 wird konstitutiv endozytiert und degradiert. Bei der Bindung von anti-CD22-Cal gelangt so das Zellgift Calicheamicin in Zelle, welches durch Doppelstrangbrüche der DNA zur Apoptose und somit zur Depletion der B-Zellen führt. Der verwendete anti-CD22-Antikörperklon, Cy34.1, erkennt das Alloantigen Lyb-8.2 (Symington et al., 1982), welches nur von SJL nicht aber von DBA/1-Mäusen exprimiert wird. Deswegen wurden alle Experimente in SJL-Mäusen durchgeführt. Nach der Depletion der B-Zellen mithilfe von anti-CD22-Cal beginnt die Repopulation ab Tag 25 bis Tag 30 (Dunussi-Joannopoulos et al., 2005).

Zur Depletion der B-Zellen erhielten die Mäuse zu verschiedenen Zeitpunkten -vor Arthritisinduktion, in der Induktionsphase und in der Effektorphase der Arthritis- jeweils im Abstand von fünf Tagen 2

intraperitoneale Injektionen in einer Dosis von 160 µg/kg Körpergewicht/Injektion bezogen auf die Calicheamicin Dosis.

3.3.4. Histologie

Für die histopathologischen Untersuchungen wurden die Tiere zu den entsprechenden Zeitpunkten durch zervikale Dislokation getötet. Die Tiere wurden komplett mit 70 %igem Ethanol desinfiziert und Vorder- und Hinterpfoten präpariert. Dabei wurde das Fell entfernt. Die Pfoten wurden in gepufferte Formalinlösung nach Lilie überführt und für mindestens eine Woche fixiert. Die gesamte weitere Aufarbeitung wurde von Frau Gabriele Fernahl in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Veit Krenn am Institut für Pathologie der Charité in Berlin durchgeführt. Dort wurden die Hämatoxylin und Eosin gefärbten Gewebeschnitte von Dr. Lars Morawietz begutachtet und bewertet. Zur Bestimmung des Arthritisgrades einer Pfote wurden folgende fünf Kriterien berücksichtigt: Das Ausmaß der Synovitis, Tenosynovitis, Periostitis, Periarthritis und der Knorpel- und Knochendestruktion. Dabei wurde jedes Kriterium in 4 Schweregrade eingeteilt (0 bis 4), so dass durch bei Addition der Werte jedes Kriteriums für den Gesamtgrad einer Pfote maximal 15 Punkte erreicht werden konnte.

3.3.5. Hämatoxylin und Eosin-Färbung eines Blutausriches zur Verifizierung der Neutrophilen-Depletion

Accustain Eosin Y solution, alcoholic (Sigma HT110132)

Hämalaunlösung, sauer, nach Mayer (Dr., K. Hollborn & Söhne, Leipzig)

Ein Tropfen Mausblut wurde dünn auf einem Objektträger ausgestrichen und an der Luft getrocknet. Der Blutausrich wurde anschließend in 95 % Ethanol fixiert. Nach dem Waschen des Blutausriches mit ddH₂O wurde der Blutausrich 60 Sekunden mit Hämalaunlösung gefärbt und mit ddH₂O gewaschen. Anschließend wurde der Blutausrich 60 Sekunden mit Eosinlösung gefärbt und wieder gewaschen mit ddH₂O. Die Abwesenheit der Granulozyten wurde unter dem Mikroskop verifiziert.

3.3.6. Statistische Auswertung und Darstellung

Zur Analyse auf statistisch signifikanter Unterschiede zwischen den Messergebnissen der Versuchsgruppen wurde der nicht-parametrischen *Mann-Whitney* U-Test der Statistik-Software SPSS 15.0 (SPSS GmbH Software, München) zweiseitig durchgeführt. Als statistisch signifikant galt, wenn $p < 0,05$ (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Alle p -Werte $> 0,05$ galten als statistisch nicht signifikant.

In der vorliegenden Arbeit wird im allgemeinen das arithmetische Mittel der jeweiligen Gruppe dargestellt mit dem Mittelwerte des Standardfehlers (SEM) als Fehlerbalken. Zur Erstellung der Diagramme wurde die Software SigmaPlot 10.0 (Systat Software, Erkrath) verwendet.

3. Ergebnisse

3.1. Pathogenetische Relevanz der Th17-Zellen in der G6PI-induzierten Arthritis

3.1.1. *In vivo* Proliferation von CD4⁺ T-Zellen

Schubert *et al.* konnten bereits zeigen, dass CD4⁺ T-Zellen sowohl in der Induktionsphase als auch in der Effektorphase der G6PI-induzierten Arthritis pathogenetisch relevant sind. Um die Wichtigkeit der CD4⁺ T-Zellen zu unterstreichen, wurde die *in vivo* Proliferation von CD4⁺ T-Zellen in suszeptiblen DBA/1-Mäusen mit der in nicht-suszeptiblen C57BL/6-Mäusen durch BrdU-Inkorporation verglichen. DBA/1 und C57BL/6 Mäuse wurden mit G6PI/CFA bzw. PBS/CFA immunisiert und 9 Tage lang mit BrdU behandelt. An Tag 9 wurden die Milz und die inguinalen Lymphknoten entnommen und die BrdU-Inkorporation mittels Durchflusszytometrie analysiert (s. Abbildung 7).

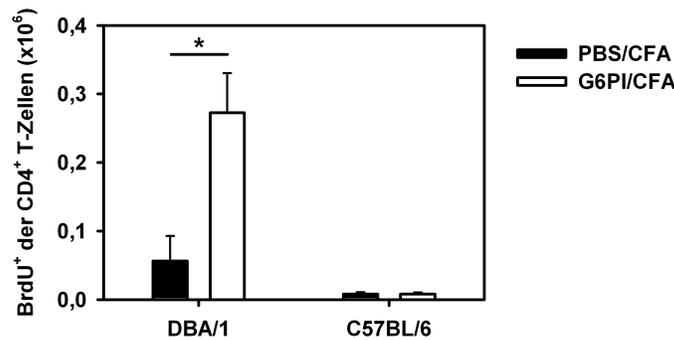


Abbildung 7: *In vivo* Proliferation von CD4⁺ T-Zellen in suszeptiblen und nicht-suszeptiblen Mausstämmen: DBA/1- bzw. C57BL/6-Mäuse wurden mit G6PI/CFA oder PBS/CFA immunisiert. An Tag 9 nach Immunisierung wurden die inguinalen Lymphknoten entnommen und die Zellen gegen CD3, CD4 und BrdU gefärbt und im FACS analysiert. Dargestellt ist der Mittelwert ± SEM der absoluten Anzahl an CD4⁺ T-Zellen in inguinalen Lymphknoten von 5 Tieren. Die *Gating*-Strategie ist im Material- und Methodenteil beschrieben. *, $p < 0,05$ nach *Man-Whitney*-U-Test. Das Experiment wurde einmal durchgeführt.

In den nicht-suszeptiblen C57BL/6 Mäusen ist kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der BrdU⁺CD4⁺ T-Zellen zwischen der Immunisierung mit PBS/CFA ($0,008 \pm 0,003 \times 10^6$) und der Immunisierung mit G6PI/CFA ($0,008 \pm 0,002 \times 10^6$) zu beobachten. In den suszeptiblen DBA/1-Mäusen ist die Anzahl der BrdU⁺CD4⁺ T-Zellen nach Immunisierung mit G6PI/CFA ($0,27 \pm 0,06 \times 10^6$) signifikant höher (*Man-Whitney*-U-Test: $p < 0,05$) als nach Immunisierung mit PBS/CFA ($0,05 \pm 0,03 \times 10^6$). Auffällig ist, dass auch in den PBS/CFA immunisierten DBA/1-Mäusen die Anzahl an BrdU⁺CD4⁺ T-Zellen deutlich höher ist als in C57BL/6-Mäusen nach Immunisierung mit PBS/CFA oder G6PI/CFA. In suszeptiblen Mausstämmen ist im Gegensatz zu nicht-suszeptiblen Mausstämmen eine *in vivo* Proliferation von CD4⁺ T-Zellen zu verzeichnen.

3.1.2. Kinetik der Expression von IL-17A in der G6PI-induzierten Arthritis

IL-17A ist das Markerzytokin für die 2006 erstmalig beschriebene dritte Th-Zellsubpopulation, den Th17-Zellen. Im Folgenden wird IL-17 als Synonym für IL-17A verwendet. Schubert *et al.* haben bereits beschrieben, dass in der G6PI-induzierten Arthritis auch IL-17 von CD4⁺ Th-Zellen produziert wird. Es sollte untersucht werden, ab welchem Zeitpunkt die Th17-Zellen in der G6PI-induzierten

Arthritis auftreten und ob die Expression von IL-17 Antigen-spezifisch auf $CD4^+CD154^+$ Th-Zellen erfolgt. Die Expression von CD154 ist abhängig von der Aktivierung der Th-Zellen über den T-Zell-Rezeptor. Somit können über *de-novo*-synthetisiertes CD154 Antigen-spezifischen Th-Zellen identifiziert werden (Chattopadhyay et al., 2005; Frensch et al., 2005). Dazu wurde die Expression von IL-17 zu verschiedenen Zeitpunkten im Verlaufe der Erkrankung untersucht.

DBA/1 Mäuse wurden mit G6PI/CFA immunisiert und die G6PI-spezifische IL-17-Produktion der Th-Zellen an den Tagen 6, 9, 12, 15 und 30 in der Milz und den inguinalen Lymphknoten untersucht.

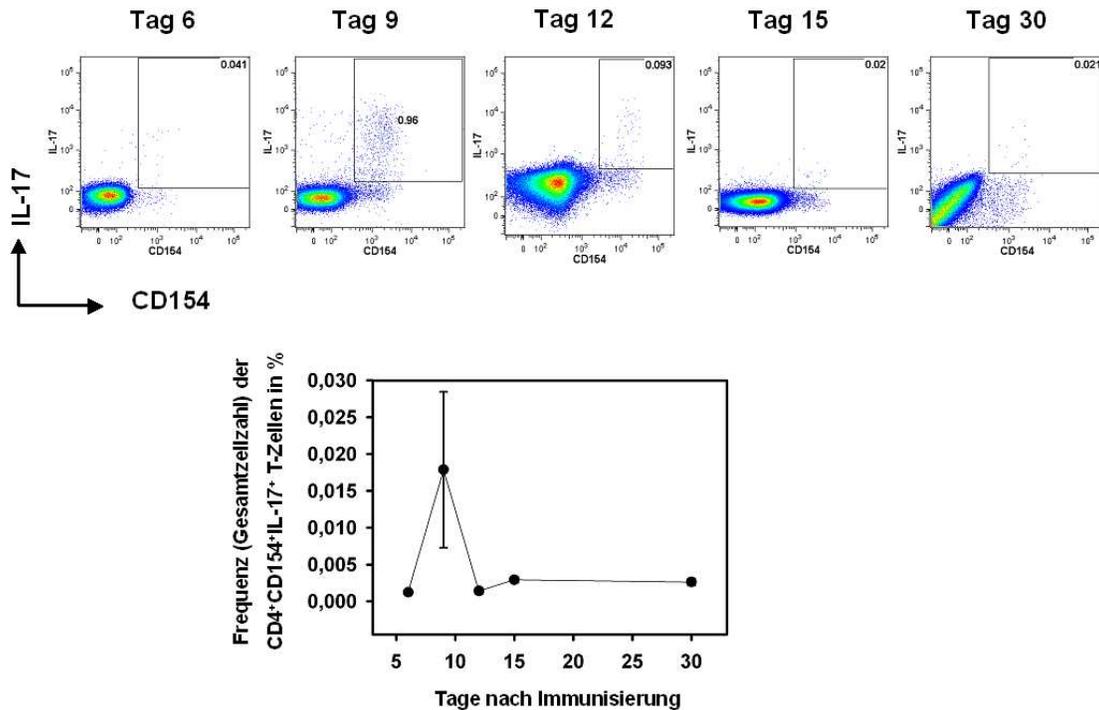


Abbildung 8: Kinetik des Expressionsprofils von IL-17A in der G6PI-induzierten Arthritis: Oben ist die G6PI-spezifische IL-17-Produktion ($CD154^+IL-17^+$, *Frequency of Parent*) der $CD4^+$ -T-Zellen in der Milz an den Tagen 6, 9, 12, 15 und 30 nach Immunisierung von DBA/1-Mäusen mit G6PI/CFA dargestellt. Unten sind die Mittelwerte \pm SEM ($n = 3$) der Frequenz (bezogen auf die Gesamtzellzahl, *Frequency of Total*) der $CD4^+CD154^+IL-17^+$ Th-Zellen an den Tagen 6, 9, 12 und 30 nach G6PI-Immunisierung dargestellt. Die vollständige Kinetik wurde zweimal durchgeführt. Die Kinetik an den Tagen 6, 9, 12 und 15 wurde mindestens 3mal durchgeführt.

Abbildung 8 zeigt exemplarisch den zeitlichen Verlauf der G6PI-spezifischen IL-17-Produktion in der Milz nach G6PI-Immunisierung. IL-17-Produzenten wurden ab Tag 6 detektiert. Der Höhepunkt der Antigen-spezifischen IL-17-Produktion lag sowohl in der Milz auch in den drainierenden Lymphknoten an Tag 9 nach Immunisierung; danach nahm die Anzahl der IL-17-Produzenten ab.

3.1.3. Th17-Zytokine und polyfunktionale T-Zellen in der G6PI-induzierten Arthritis

Schubert *et al.* haben bereits die Expression von IL-17, TNF- α und IL-6 durch $CD4^+$ T-Zellen beschrieben. Es sollte untersucht werden, ob diese Zytokine Antigen-spezifisch produziert wurden.

Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob auch weitere Th17-Zytokine, wie IL-22, oder Zytokine, die die Entwicklung von Th17-Zellen beeinflussen, wie z.B. GM-CSF, von $CD4^+CD154^+$ Th-Zellen exprimiert werden. Zusätzlich wurde die G6PI-spezifische Produktion von IL-6, IL-2, IL-4, IL-10 und RANKL untersucht.

Dazu wurden DBA/1-Mäuse mit G6PI/CFA immunisiert und an Tag 9 die G6PI-spezifische Zytokinproduktion in der Milz und den drainierenden Lymphknoten analysiert. Abbildung 9 zeigt, dass neben IL-17 auch $TNF-\alpha$ ($CD4^+CD154^+TNF-\alpha^+ \sim 0,6\%$) Antigen-spezifisch sezerniert wird. IL-22 wird zu einem sehr geringen Prozentsatz Antigen-spezifisch produziert ($CD4^+CD154^+IL-22^+ \sim 0,1\%$, (Abbildung 10)). Ein größerer Anteil von IL-22 wird von $CD4^+CD154^-$ Zellen exprimiert ($CD4^+CD154^-IL-22^+ \sim 0,5\%$). Auch das Zytokin GM-CSF wird Antigen-spezifisch produziert ($CD4^+CD154^+GM-CSF^+ \sim 0,3\%$, Abbildung 10). Ca. 0,2 % der $CD4^+$ T-Zellen sind $CD154^+IFN-\gamma^+$. Auch RANKL wird Antigen-spezifisch sezerniert ($CD4^+CD154^+RANKL^+ \sim 0,2\%$, Abbildung 12).

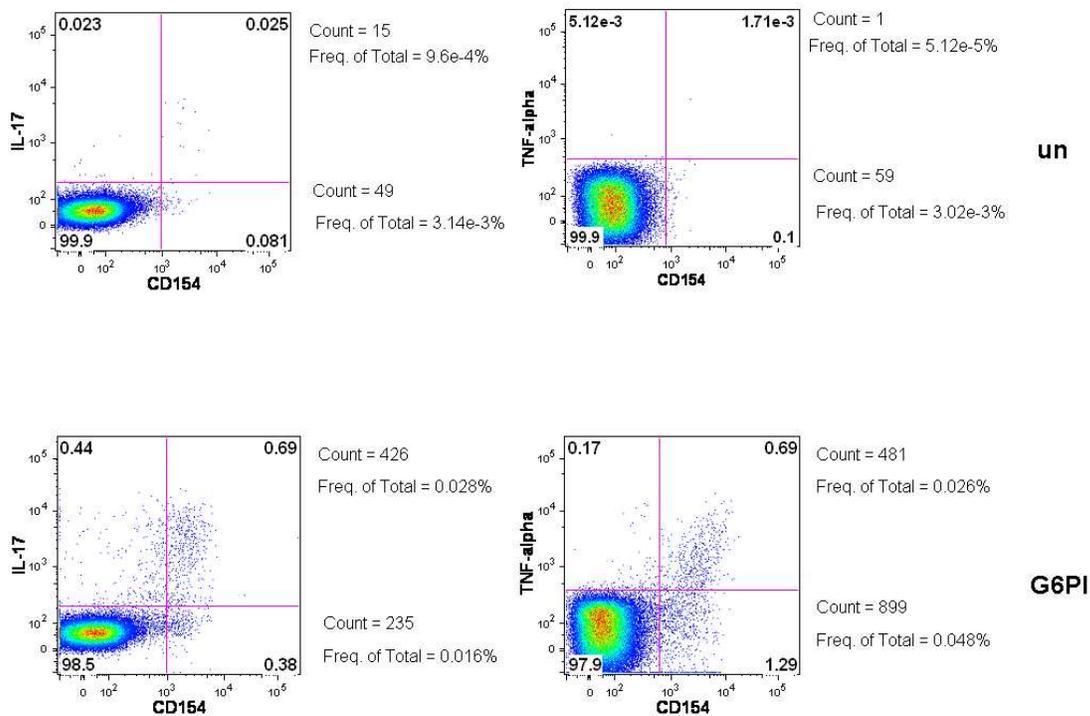


Abbildung 9: G6PI-spezifische Produktion der Th17-Zytokine, IL-17 und $TNF-\alpha$ in der G6PI-induzierten Arthritis: DBA/1-Mäuse wurden mit G6PI immunisiert. An Tag 9 wurden die inguinalen Lymphknoten entnommen und 6 h mit 20 $\mu\text{g/ml}$ G6PI bzw. Kulturmedium (un) restimuliert. Die Zellen wurden gegen CD4, CD154, IL-17 und $TNF-\alpha$ gefärbt. Es ist die Frequenz (bezogen auf die $CD4^+$ Zellen, *Frequency of Parent*) der $CD154^+$ Zytokin⁺ Th-Zellen repräsentativ einer Maus dargestellt. Zusätzlich ist die Frequenz bezogen auf die Gesamtzellzahl (*Frequency of Total*) und die *Counts* rechts neben den zugehörigen Quadranten angegeben. Dieses Experiment wurde mindestens 12mal mit mindestens 3 Mäusen durchgeführt.

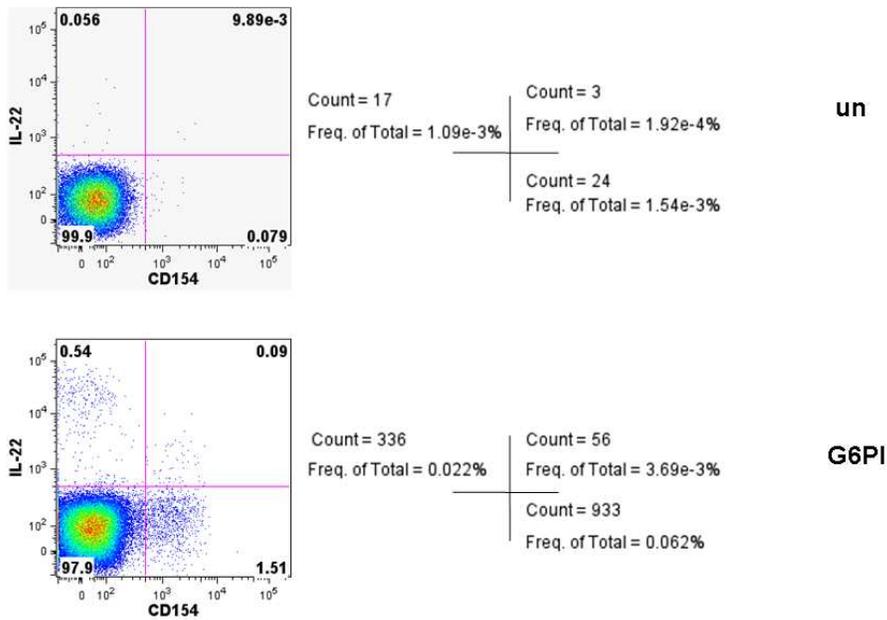


Abbildung 10: G6PI-spezifische Produktion des Th17-Zytokins IL-22 in der G6PI-induzierten Arthritis: DBA/1-Mäuse wurden mit G6PI immunisiert. An Tag 9 wurden die inguinalen Lymphknoten entnommen und 6 h mit 20 µg/ml G6PI bzw. Kulturmedium (un) restimuliert. Die Zellen wurden gegen CD4, CD154, IL-22 gefärbt. Es ist die Frequenz (bezogen auf die CD4⁺ Zellen, *Frequency of Parent*) der CD154⁺Zytokin⁺ Th-Zellen dargestellt. Zusätzlich ist die Frequenz bezogen auf die Gesamtzellzahl (*Frequency of Total*) und die *Counts* rechts neben den zugehörigen Quadranten angegeben. Dieses Experiment wurde 3mal mit 3 Mäusen wiederholt.

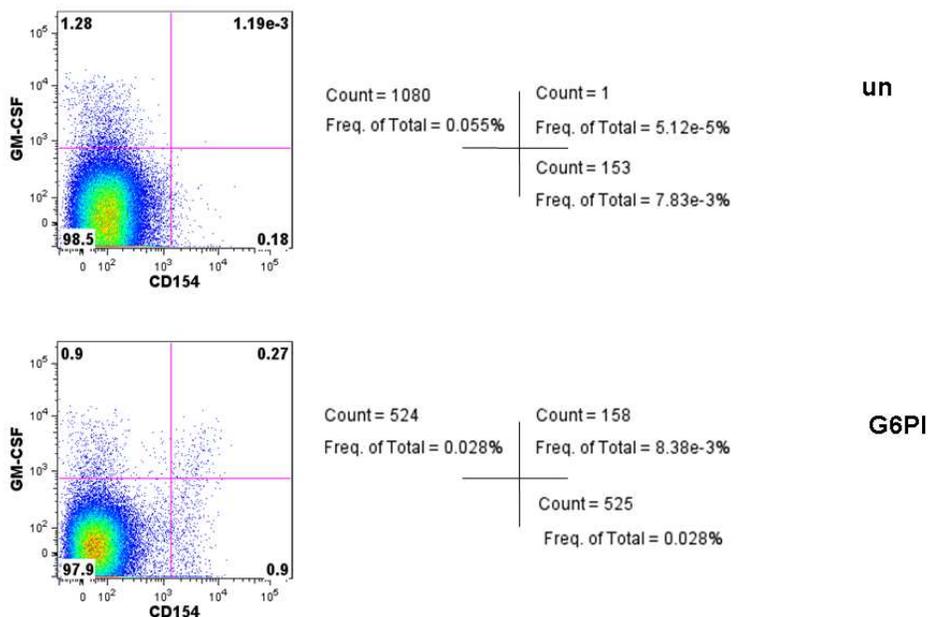


Abbildung 11: G6PI-spezifische Produktion von GM-CSF in der G6PI-induzierten Arthritis: DBA/1-Mäuse wurden mit G6PI immunisiert. An Tag 9 wurden die inguinalen Lymphknoten entnommen und 6 h mit 20 µg/ml G6PI bzw. Kulturmedium (un) restimuliert. Die Zellen wurden gegen CD4, CD154 und GM-CSF gefärbt. Es ist repräsentativ die Frequenz (bezogen auf die CD4⁺ Zellen, *Frequency of Parent*) der CD154⁺Zytokin⁺ Th-Zellen

dargestellt. Zusätzlich ist die Frequenz bezogen auf die Gesamtzellzahl (*Frequency of Total*) und die *Counts* rechts neben den zugehörigen Quadranten angegeben. Dieses Experiment wurde 3mal mit 3 Mäusen wiederholt.

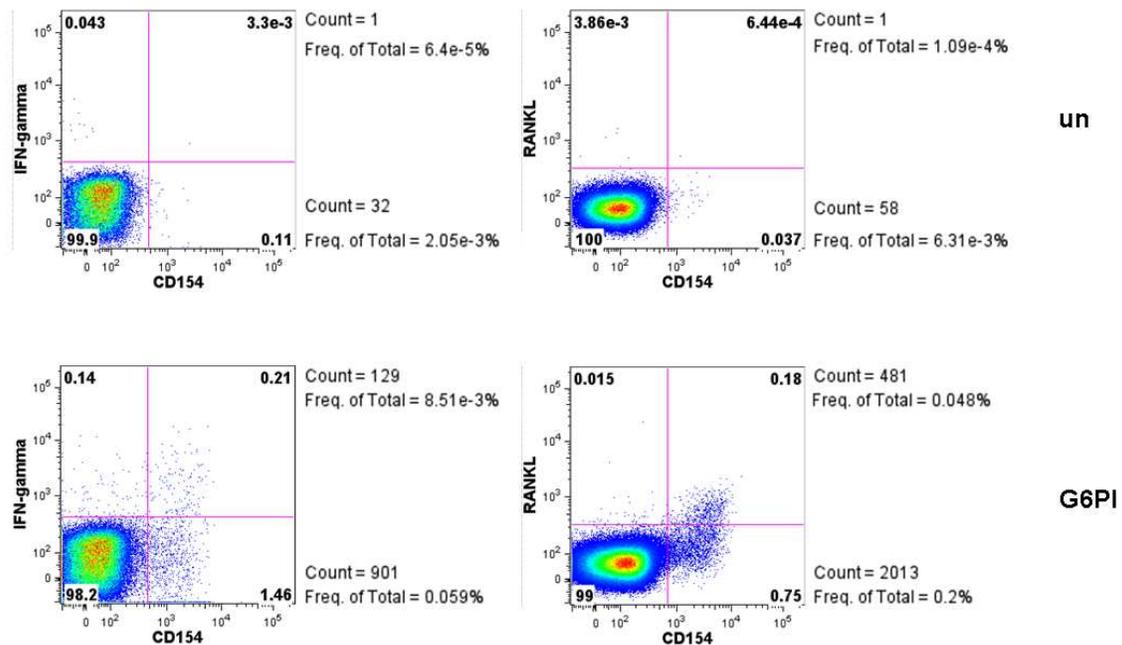


Abbildung 12: Antigen-spezifische Produktion von IFN- γ und RANKL: DBA/1-Mäuse wurden mit G6PI immunisiert. An Tag 9 wurden die inguinalen Lymphknoten entnommen und 6 h mit 20 μ g/ml G6PI bzw. Kulturmedium (un) restimuliert. Die Zellen wurden gegen CD4, CD154, IFN- γ und RANKL gefärbt. Es ist repräsentativ die Frequenz (bezogen auf die CD4⁺ Zellen, *Frequency of Parent*) der CD154⁺Zytokin⁺ Th-Zellen dargestellt. Zusätzlich ist die Frequenz bezogen auf die Gesamtzellzahl (*Frequency of Total*) und die *Counts* rechts neben den zugehörigen Quadranten angegeben. Dieses Experiment wurde mindestens 12mal mit mindestens 3 Mäusen durchgeführt.

Der Prozentsatz von CD4⁺CD154⁺IL-6⁺ ist 0 % (Abbildung 13). Im Falle der Zytokine GM-CSF, IL-6 und IL-22 wird ein größerer Anteil der Zytokine nicht Antigen-spezifisch also von CD4⁺CD154⁻ T-Zellen sezerniert. Da CD154⁺ strikt T-Zell-Rezeptor abhängig ist, könnte es sich bei diesen T-Zellen, um die T-Zellen handeln, die unspezifisch durch Endotoxine (LPS) aktiviert wurden, welche bedingt durch den Aufreinigungsprozess reichlich im prokaryotisch exprimierten G6PI vorhanden sind, welches zur Restimulation der Zellen verwendet wurde.

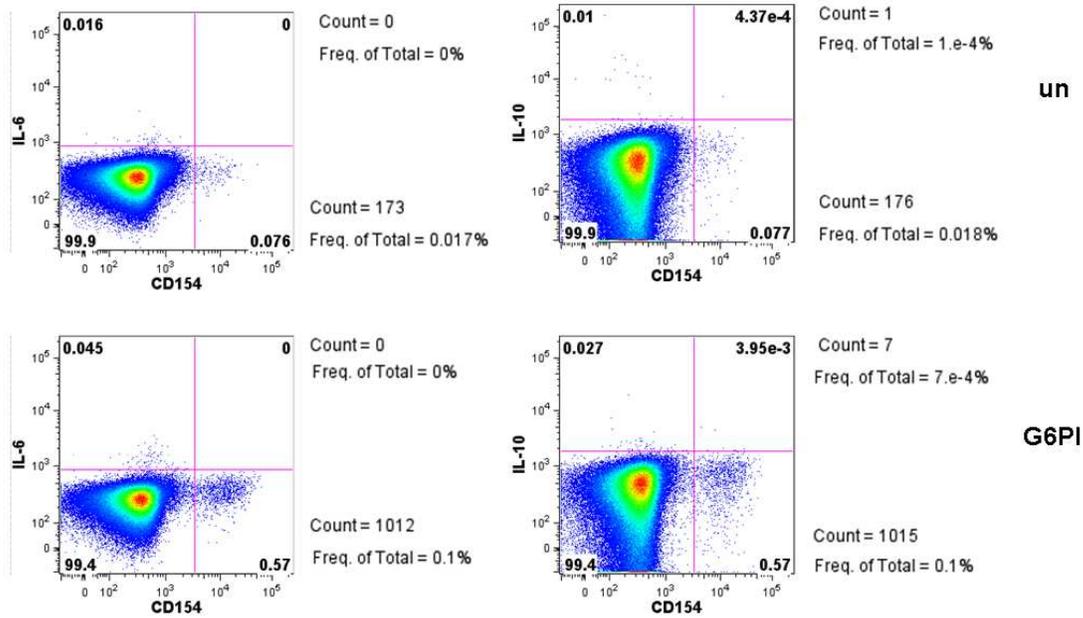


Abbildung 13: Antigen-spezifische Produktion von IL-6 und IL-10: DBA/1-Mäuse wurden mit G6PI immunisiert. An Tag 9 wurden die inguinalen Lymphknoten entnommen und 6h mit 20µg/ml G6PI bzw. Kulturmedium (un) restimuliert. Die Zellen wurden gegen CD4, CD154, IL-6 und IL-10 gefärbt. Es ist repräsentativ die Frequenz (bezogen auf die CD4⁺ Zellen, *Frequency of Parent*) der CD154⁺Zytokin⁺ Th-Zellen dargestellt. Zusätzlich ist die Frequenz bezogen auf die Gesamtzellzahl (*Frequency of Total*) und die *Counts* rechts neben den zugehörigen Quadranten angegeben. Dieses Experiment wurde mit insgesamt 10 Mäusen durchgeführt.

Die G6PI-spezifische Produktion des Th2-Zytokins IL-4 liegt unter 0,1 % (Abbildung 14). Ca. 0,1 % der CD4⁺ T-Zellen sind CD154⁺IL-2⁺. IL-10 konnte nicht detektiert werden (s. Abbildung 13). Im Allgemeinen wurden die *Gates* anhand der Medium-Probe (unstimulierte Probe) so gelegt, dass der Prozentsatz an CD154⁺ Zellen kleiner als 0,1 % war. In manchen Fällen war aber auch in der vermeintlich unstimulierten Probe ein beachtlicher Prozentsatz (> 0,1 %) an CD154⁺ Zellen zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Dies könnte dadurch zu erklären sein, dass G6PI als glykolytisches Enzym in den Milzzellen allgegenwärtig ist und somit immer synthetisiert und degradiert wird. Dem verwendeten Kulturmedium wird Kälberserum zugesetzt, welches ebenfalls G6PI enthält, das aufgenommen, prozessiert und präsentiert werden kann. Da die Sequenzidentität zwischen den Spezies 88 % beträgt, könnte es somit auch ohne den Zusatz von rekombinanter G6PI zur Kultur zu einer T-Zell-Rezeptor-spezifischen Stimulation und somit zur Expression von CD154 kommen.

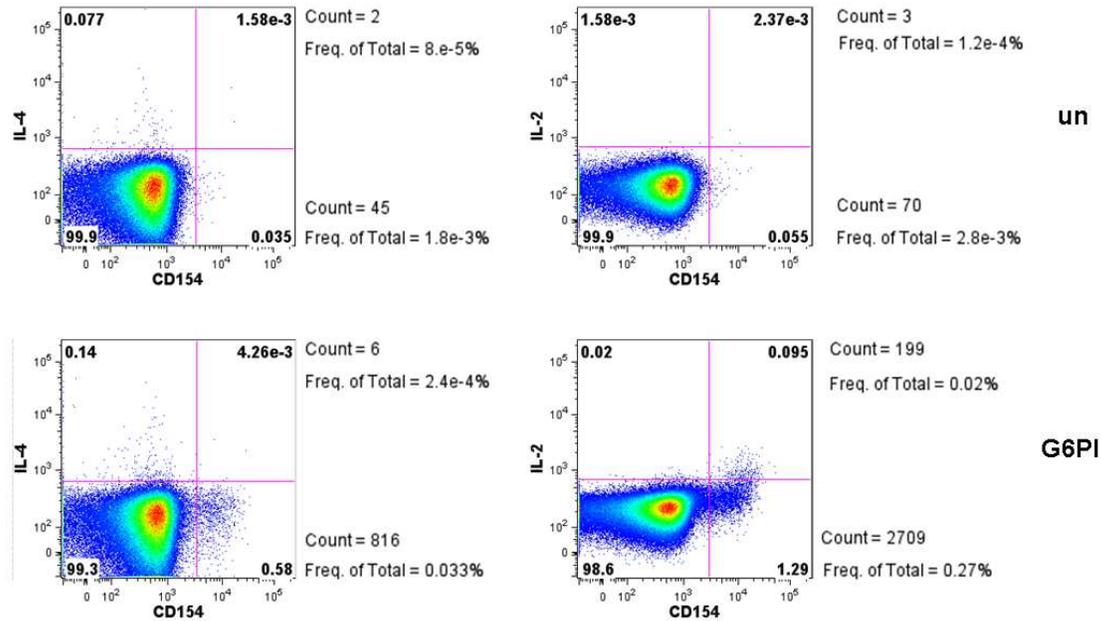


Abbildung 14: Antigen-spezifische Produktion von IL-4 und IL-2: DBA/1-Mäuse wurden mit G6PI immunisiert. An Tag 9 wurden die inguinalen Lymphknoten entnommen und 6 h mit 20 µg/ml G6PI bzw. Kulturmedium (un) restimuliert. Die Zellen wurden gegen CD4, CD154, IL-4 und IL-2 gefärbt. Es ist repräsentativ die Frequenz (bezogen auf die CD4⁺ Zellen, *Frequency of Parent*) der CD154⁺Zytokin⁺ Th-Zellen dargestellt. Zusätzlich ist die Frequenz bezogen auf die Gesamtzellzahl (*Frequency of Total*) und die *Counts* rechts neben den zugehörigen Quadranten angegeben. Dieses Experiment wurde mit insgesamt 10 Mäusen durchgeführt.

Als nächstes sollten Antigen-spezifische polyfunktionale T-Zellen untersucht werden. Unter polyfunktionalen T-Zellen versteht man T-Zellen, die zwei (*Double-Producer*), drei (*Triple-Producer*), vier (*Quadrupel-Producer*) oder mehr Zytokine gleichzeitig sezernieren. Bei der Generation von Th17-Zellen *in vitro* findet man z.B. keine IL-17 und IFN-γ *Double-Producer* (Veldhoen et al., 2006). Liang et al. beschreiben eine Koproduktion von IL-17 und IL-22 (Liang et al., 2006). Deswegen sollte die Koproduktion von IL-17 und IFN-γ, IL-17 und IL-22, sowie IL-17 und RANKL, IL-17 und TNF-α durch CD4⁺CD154⁺ *in vivo* in der G6PI-induzierten Arthritis untersucht werden.

Abbildung 15 zeigt die Frequenz bezogen auf die CD4⁺CD154⁺ T-Zellen (*Frequency of Parent*) der verschiedenen *Double-Producer*. Im Gegensatz zu den *in vitro* Daten finden sich *in vivo* IL-17/IFN-γ *Double-Producer* (7,25 % der CD4⁺CD154⁺ T-Zellen; Abbildung 15), aber sehr wenig bis keine IL-17/IL-22-*Double-Producer* (3,9 % der CD4⁺CD154⁺ T-Zellen.). Ein größerer Anteil der CD4⁺CD154⁺ T-Zellen sind IL-17/TNF-α-*Double-Producer* (24 %) bzw. IL-17/RANKL-*Double-Producer* (17,4%). Tabelle 8 zeigt die zugehörigen Frequenzen bezogen auf die Gesamtzellzahl (*Frequency of Total*) und die daraus berechneten Gesamtzellzahlen der CD4⁺CD154⁺Zytokin⁺ T-Zellen. Man beachte, dass die Färbung für die Koproduktion für IL-22 und IL-17 mit einer anderen Antikörperkombination für CD4 und CD154 gefärbt werden musste und deswegen nicht in dieser Tabelle enthalten ist. Die Frequenz bezogen auf die Gesamtzellzahl (*Frequency of Total*) der CD4⁺CD154⁺IL-17⁺IL-22⁺ ist $2,74 \times 10^{-3} \%$.

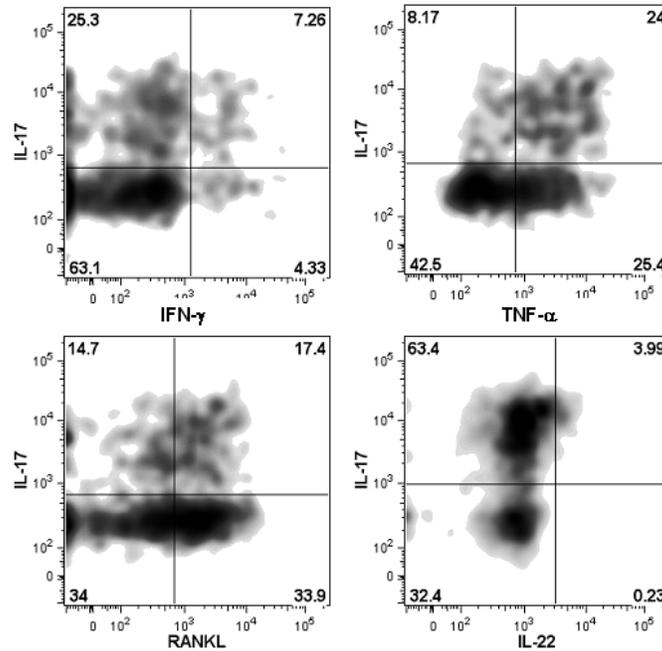


Abbildung 15: Polyfunktionale T-Zellen in der G6PI-induzierten Arthritis: DBA/1-Mäuse wurden mit G6PI immunisiert. An Tag 9 wurden die inguinalen Lymphknoten entnommen und 6 h mit 20 µg/ml G6PI restimuliert. Die Zellen wurden gegen CD4, CD154, IL-17, TNF- α , IL-22, IFN- γ und RANKL gefärbt. Dargestellt ist die Frequenz der Zytokin-Produzenten bezogen auf die CD4⁺CD154⁺ (*Frequenz of Parent*) nach *progressiv gating*. Jede Färbung wurde mindestens an drei Mäusen in drei unabhängigen Experimenten durchgeführt.

Zusätzlich wurden auch *Triple-* und *Quadrupel-Producer* untersucht. Abbildung 16 zeigt exemplarisch IL-17/IFN- γ /TNF- α -*Triple-Producer* im *density plot* IL-17 gegen IFN- γ . In diesem Beispiel beträgt die Frequenz bezogen auf die Gesamtzellzahl der CD154⁺ T-Zellen 0,04 % (*Frequenz of Total*), was einem *Count* von 993 Zellen entspricht. Die Frequenz, bezogen auf die Gesamtzellzahl (*Frequenz of Total*), der CD4⁺CD154⁺IL-17⁺IFN- γ ⁺TNF- α ⁺ Koproductanten beträgt 2×10^{-3} %, was einem *Count* von 69 entspricht. Man beachte, dass der *Count* nicht identisch ist mit der berechneten Gesamtzellzahl aus Tabelle 8, da diese aus der Frequenz bezogen auf die Gesamtzellzahl und der insgesamt im Lymphknoten gezählten Zellzahl berechnet wurde.

Tabelle 8 und Abbildung 17 zeigen, dass die Frequenz bezogen auf die Gesamtzellzahl (*Frequenz of Total*) aller polyfunktionalen T-Zellen (*Quadrupel-*, *Triple-*, *Double-Producer*) und auch die errechnete Gesamtzellzahl sehr gering ist. Die Ergebnisse zeigen, dass *in vivo* CD4⁺CD154⁺ T-Zellen nicht nur ein Zytokin produzieren, sondern auch mehrere Zytokine auf einmal (2, 3 oder 4) sezernieren können. Dabei können auch *in vivo* Zytokine, die charakteristisch für unterschiedliche Th-Zelllinien sind, koproduziert werden, z.B. IL-17 und IFN- γ . Die Frequenz bezogen auf die Gesamtzellzahl der *Quadrupel-Producer* ist am geringsten, gefolgt von den *Triple-* und *Double-Producern*.

Die Zytokin-Produktion in G6PI-immunisierten DBA/1 Mäusen wurde auch im ELISA analysiert (s. Abbildung 41). DBA/1 Mäuse wurden mit G6PI/CFA immunisiert. An Tag 9 nach der Immunisierung wurden die Milz und die inguinalen Lymphknoten (Lk) entnommen und eine Einzelzellsuspension hergestellt. Die Zellen wurden für 48 h mit G6PI restimuliert. Die Überstände wurden mittels ELISA auf

IL-17, IL-22, IL-6, IFN- γ und IL-4 analysiert. Sowohl in den Lymphknoten als auch in der Milz ist ein ähnliches Profil an Zytokinen detektierbar, insgesamt ist die Zytokin-Produktion in der Milz etwas

Tabelle 8: Frequenz (bezogen auf die Gesamtzellzahl, *Frequency of Total*) der CD4⁺CD154⁺Zytokin⁺ T-Zellen in den inguinalen Lymphknoten und die Gesamtzellzahl der CD4⁺CD154⁺Zytokin⁺ T-Zellen an Tag 9: DBA/1-Mäuse wurden mit G6PI immunisiert. An Tag 9 wurden die inguinalen Lymphknoten entnommen und 6 h mit 20 μ g/ml G6PI restimuliert. Die Zellen wurden gegen CD4, CD154, IL-17, TNF- α , IFN- γ und RANKL gefärbt. Durch *progressiv* und *boolean gating* wurde die Frequenz bezogen auf die Gesamtzellzahl der polyfunktionalen T-Zellen bestimmt. Mit Hilfe von SPICE wurde der Mittelwert der Frequenz (bezogen auf die Gesamtzellzahl) \pm SEM der Quadrupel-, Tripel-, Doppel- und Einfach-Produzenten dargestellt. Die Gesamtzellzahl der CD4⁺CD154⁺Zytokin⁺ T-Zellen wurde aus der Frequenz bezogen auf die Gesamtzellzahl und der durch Zählung bestimmten Zellzahl berechnet. Diese Färbung wurde mindestens 12mal mit mindestens drei Mäusen durchgeführt.

TNF- α	RANKL	IFN- γ	IL-17	<i>Frequency of Total</i>	Gesamtzellzahl
				der CD4 ⁺ CD154 ⁺ Zytokin ⁺ x 10 ⁻³ [%]	der CD4 ⁺ CD154 ⁺ Zytokin ⁺
+	+	+	+	0,15 \pm 0,07	< 100
-	+	+	+	0,24 \pm 0,14	<100
+	-	+	+	1,43 \pm 0,47	255 \pm 114
+	+	-	+	0,97 \pm 0,59	192 \pm 86
+	+	+	-	0,15 \pm 0,12	< 100
-	-	+	+	3,93 \pm 1,62	731 \pm 327
-	+	-	+	0,66 \pm 0,34	127 \pm 57
+	-	-	+	2,74 \pm 1,35	533 \pm 238
-	+	+	-	0,47 \pm 0,19	< 100
+	-	+	-	2,23 \pm 1,02	416 \pm 186
+	+	-	-	0,33 \pm 0,25	< 100
-	-	-	+	10,00 \pm 2,44	1740 \pm 778
-	-	+	-	18,00 \pm 6,80	3252 \pm 1454
-	+	-	-	1,51 \pm 0,43	260 \pm 116
+	-	-	-	6,76 \pm 2,84	1275 \pm 570

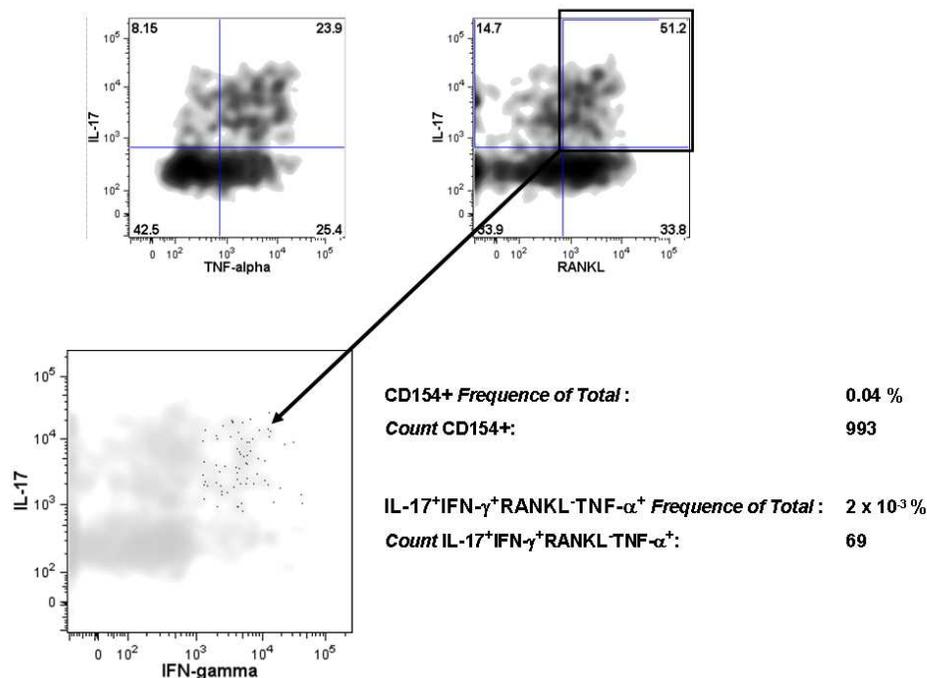


Abbildung 16: Polyfunktionale T-Zellen in der G6PI-induzierten Arthritis: Dargestellt sind die CD4⁺CD154⁺ Triple-Producer (IL-17⁺IFN- γ ⁺RANKL⁺TNF- α ⁺, unten) nach *progressiv gating* im *density plot* IL-17 gegen IFN- γ isoliert aus DBA/1 Mäusen in den inguinalen Lymphknoten an Tag 9 analog zu Abbildung 17.

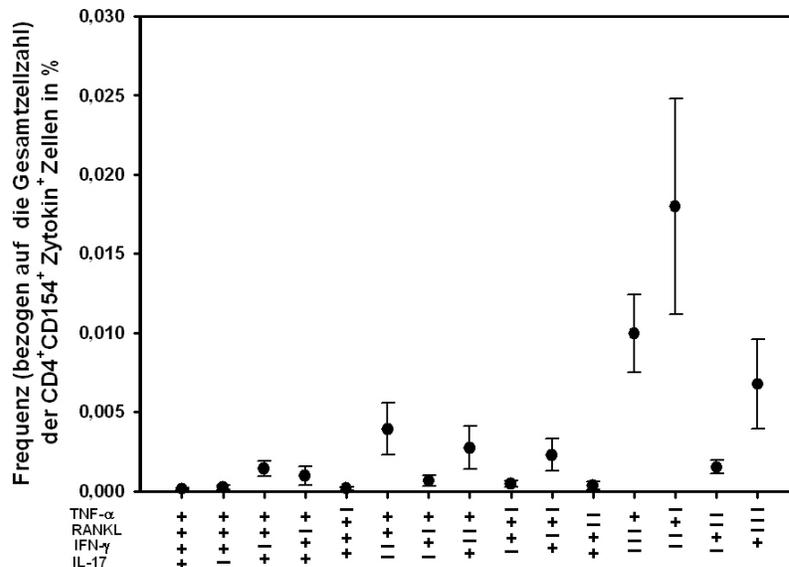


Abbildung 17: Polyfunktionale T-Zellen in der G6PI-induzierten Arthritis: DBA/1-Mäuse wurden mit G6PI immunisiert. An Tag 9 wurden die inguinalen Lymphknoten entnommen und 6 h mit 20 μ g/ml G6PI restimuliert. Die Zellen wurden gegen CD4, CD154, IL-17, TNF- α , IFN- γ und RANKL gefärbt. Durch *progressiv* und *boolean gating* wurde die Frequenz bezogen auf die Gesamtzellzahl der polyfunktionalen T-Zellen bestimmt. Mit Hilfe von SPICE wurde der Mittelwert der Frequenz (bezogen auf die Gesamtzellzahl, *Frequency of Total*) \pm SEM der Quadrupel-, Tripel-, Doppel- und Einfach-Produzenten dargestellt. Diese Färbung wurde mindestens 12mal mit mindestens drei Mäusen durchgeführt.

höher als in den Lymphknoten: am prominentesten ist die IL-22-Produktion (Milz: 7997 ± 751 pg/ml; Lk: 5040 ± 660 pg/ml) gefolgt von der IL-6-Produktion (Milz: 3037 ± 397 pg/ml; Lk: 1387 ± 620 pg/ml). Sowohl das Th1-Zytokin IFN- γ (Milz: 2488 ± 316 pg/ml; Lk: 3574 ± 1599 pg/ml) als auch das Th17-Zytokin (Milz: 1332 ± 228 pg/ml; Lk: 1473 ± 659 pg/ml) sind in Milz und Lymphknoten detektierbar. IL-4 ist nicht nachweisbar.

3.1.4. Blockade von IL-17, TNF- α , IFN- γ und IL-23p19 in der G6PI-induzierten Arthritis

CD4⁺CD154⁺ T-Zellen der G6PI-immunisierten DBA/1 Mäuse sezernierten nach Restimulation mit G6PI vor allem IL-17, RANKL und TNF- α . Im ELISA konnten in Milz und Lymphknoten von G6PI-immunisierten Mäusen nach Restimulation mit G6PI auch die Sekretion von IL-22, IFN- γ und IL-6 nachgewiesen werden.

Des wegen sollte untersucht werden inwieweit die *in vivo* Blockade von IL-17, TNF- α und IFN- γ durch Antikörper therapeutische Effekte im Verlauf des Schweregrades der G6PI-induzierten Arthritis hervorruft. Da IL-23 die Entwicklung von Th17-Zellen fördert, sollten auch die Effekte der *in vivo* Blockade von IL-23p19 untersucht werden.

Als erstes wurden die Effekte der *in vivo* Blockade von IL-23p19 in der Induktionsphase der G6PI-induzierten Arthritis untersucht. Dazu wurden die Mäuse mit anti-IL-23p19 (490) an Tag 1 und Tag 8 nach Immunisierung mit G6PI intraperitoneal behandelt. Die Kontrollgruppe wurde entsprechend mit einem Maus-IgG1 Antikörper als Isotypkontrolle behandelt. Die Inzidenz und der klinische Schweregrad der Arthritis wurden über einen Zeitraum von 30 Tagen beobachtet. Die Blockade von IL-23p19 in der Induktionsphase zeigte deutliche klinische Effekte (Abbildung 18): Ab Tag 11 waren nur 60-80 % der behandelten Tiere erkrankt, während die Kontrollgruppe eine Inzidenz von 100 % aufwies; die behandelten Tiere wiesen (Tag 12: $3,2 \pm 1,2$) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Tag 12: $9,2 \pm 0,9$) auch einen deutlich verringerten klinischen Index auf (*Man-Whitney-U-Test*: $p < 0,05$). Erste Anzeichen einer Arthritis waren jedoch in beiden Gruppen ab Tag 9 zu beobachten.

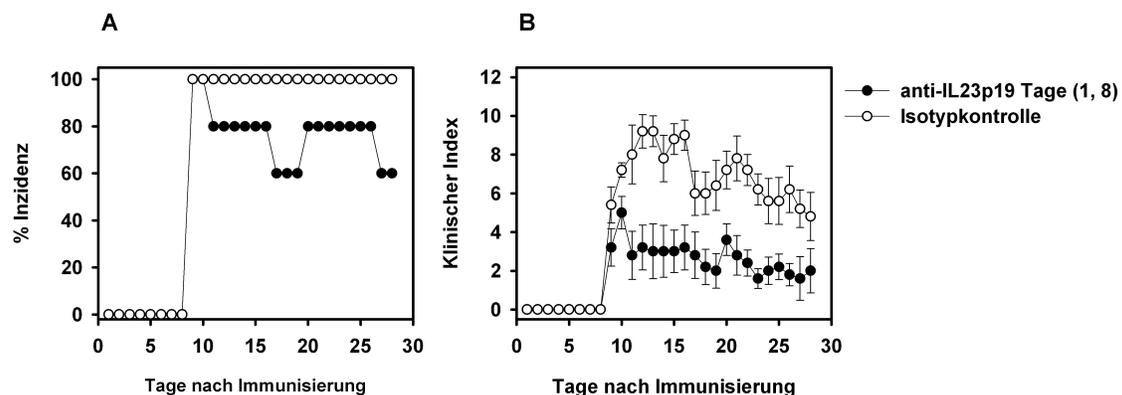


Abbildung 18: *In vivo* Blockade von IL-23p19 in der Induktionsphase der G6PI-induzierten Arthritis: Je 5 DBA/1 Mäuse pro Gruppe wurden mit G6PI/CFA immunisiert und die Inzidenz (A) und der klinische Verlauf der Arthritis (B) über 28 Tage verfolgt. Zur Blockade von IL-23p19 wurden an Tag 1 und 8 je 1 mg anti-IL-23p19 (490) i.p. verabreicht. Die Kontrollgruppe wurde mit mIgG1 (27F11) als Isotypkontrolle behandelt. Dargestellt ist der Mittelwert des klinischen Index der arthritischen Mäuse \pm SEM. Dies Experiment wurde einmal durchgeführt.

Als nächstes sollten die therapeutischen Effekte eine Blockade von IL-23p19 in der Effektorphase untersucht werden. DBA/1 Mäusen wurde an den Tagen 9 und 16 nach Immunisierung mit G6PI anti-IL-23p19 (490) intraperitoneal appliziert. Die Kontrollgruppe wurde zu den entsprechenden Zeitpunkten mit einem Maus-IgG1 behandelt. Die Inzidenz und der klinische Schweregrad der Arthritis wurden 30 Tage lang beobachtet. Die *in vivo* Blockade von IL-23p19 in der Effektorphase beeinflusste weder die Inzidenz noch den klinischen Index der G6PI-induzierten Arthritis (s. Abbildung 19).

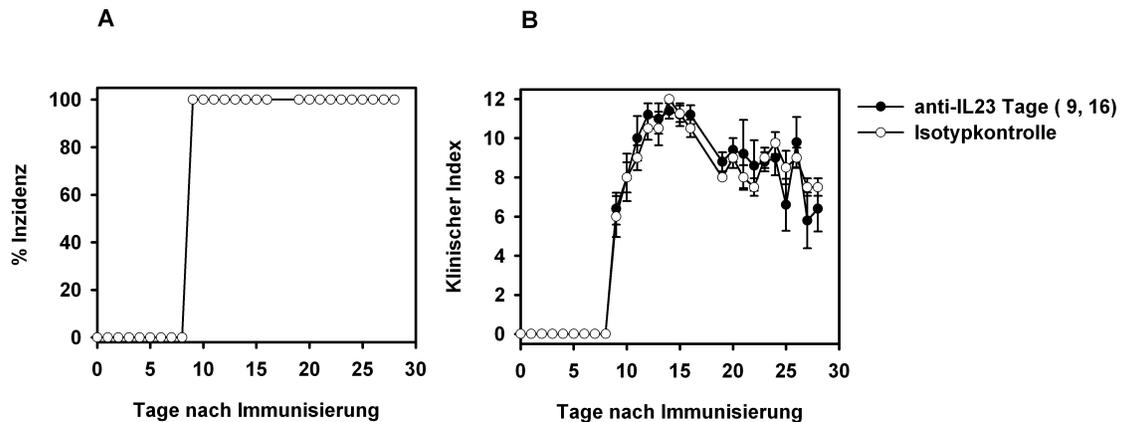


Abbildung 19: *In vivo* Blockade von IL-23p19 in der Effektorphase: Je 5 DBA/1 Mäuse pro Gruppe wurden mit G6PI/CFA immunisiert und die Inzidenz (A) und der klinische Verlauf der Arthritis (B) über 28 Tage verfolgt. Zur Blockade von IL-23p19 wurden an Tag 9 und 16 je 1 mg anti-IL-23p19 (490) i.p. verabreicht. Als Isotypkontrolle wurde je 1 mg mIgG1 (27F11) appliziert. Dargestellt ist der Mittelwert des klinischen Index der arthritischen Mäuse \pm SEM. Dies Experiment wurde einmal durchgeführt.

Zur Analyse der Effekte einer Blockade von IL-17 wurde der IL-17-Antikörperklon (MM17F3) an den Tagen 0, 2, 4, 6, und 8 appliziert. Die Kontrollgruppe erhielt einen Maus-IgG-Antikörper.

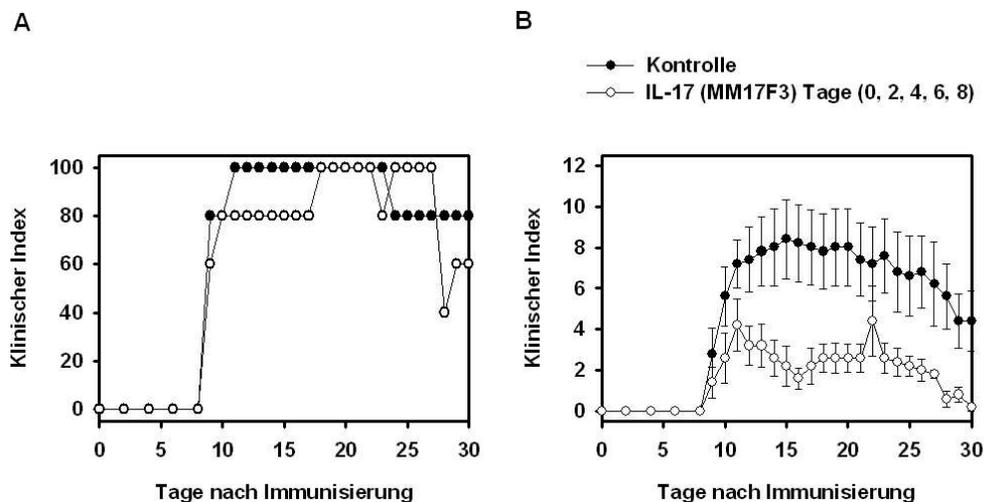


Abbildung 20: *In vivo* Blockade von IL-17 mit MM17F3: Je 5 DBA/1 Mäuse pro Gruppe wurden mit G6PI/CFA immunisiert und die Inzidenz (A) der klinische Verlauf (B) der Arthritis über 30 Tage verfolgt. IL-17 wurde durch Applikation von je 500 μ g i.p. anti-IL-17 (MM17F3) an den Tagen 0, 2, 4, 6 und 8 blockiert. Dargestellt ist der Mittelwert des klinischen Index der arthritischen Mäuse \pm SEM. Dies Experiment wurde einmal durchgeführt.

Es wurde ein statistisch signifikanter Effekt auf den klinischen Index der Arthritis in der mit anti-IL-17-Antikörper behandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe ab dem Tag 11 bis zu Tag 30 beobachtet (*Man-Whitney-U-Test*: $p < 0,05$). Die Inzidenz in der behandelten Gruppe war gegenüber der Kontrollgruppe von Tag 9 bis Tag 17 auf 80 % gegenüber 100 % reduziert.

Schubert *et al.* konnten bereits die therapeutischen Erfolge in der G6PI-induzierten Arthritis einer Blockade von TNF- α zeigen. Für eine Reproduktion der Ergebnisse sollte TNF- α in der Induktionsphase und in der Effektorphase durch die Applikation eines löslichen dimeren Rezeptors des TNF- α , dem sTNFR-p75 (Enbrel®), der mit dem Fc-Teil des humanen IgG1 fusioniert wurde, blockiert werden.

Zur Blockade von TNF- α in der Induktionsphase wurden täglich von Tag 0-9 sTNFR-p75 intraperitoneal appliziert, zur der Blockade in der Effektorphase wurden die Mäuse von Tag 10 bis Tag 19 behandelt. Bei einer Blockade von TNF- α in der Induktionsphase sind die ersten klinischen Anzeichen einer Arthritis erst ab Tag 10 zu beobachten, nach dem Ende der Behandlung. Schweregrad und Inzidenz sind im Vergleich zur Kontrollgruppe reduziert (*Man-Whitney-U-Test*: $p < 0,05$; Tag 15: Kontrolle: $6,4 \pm 1,9$; sTNFR-p75: $4,4 \pm 1,0$; s. Abbildung 21). Erfolgt die Behandlung erst in der Effektorphase bleibt die Inzidenz unbeeinflusst. Der klinische Index ist im Vergleich zur Kontrollgruppe geringer (Tag 15: Kontrolle: $6,4 \pm 1,9$; sTNFR-p75: $5,2 \pm 1,2$; *Man-Whitney-U-Test*: $p < 0,05$).

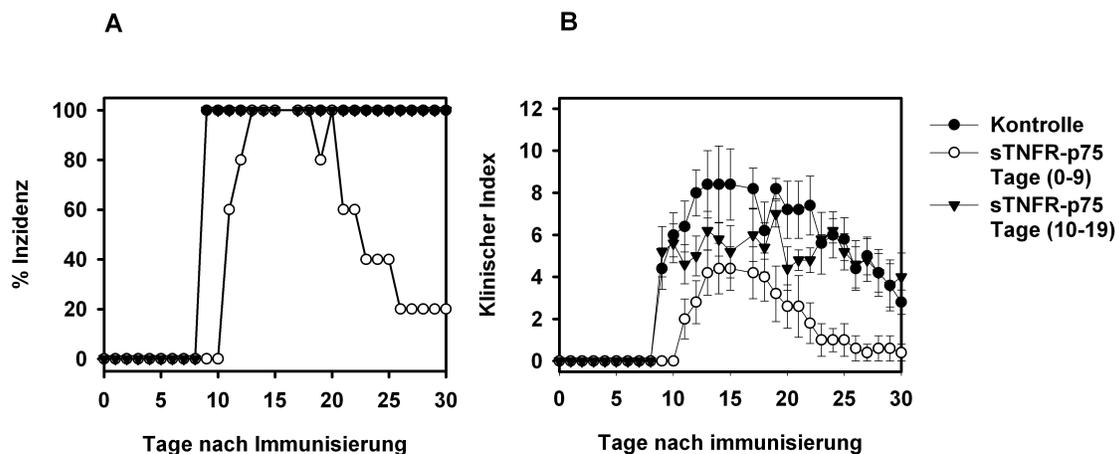


Abbildung 21: *In vivo* Blockade von TNF- α in der Induktions- und der Effektorphase der G6PI-induzierten Arthritis: Pro Gruppe wurden jeweils 5 DBA/1 Mäuse mit G6PI/CFA immunisiert und die Inzidenz (A) und der klinische Verlauf der Arthritis (B) über 30 Tage verfolgt. Zu Blockade von TNF- α in der Induktionsphase wurde täglich von Tag 0 bis Tag 9 100 μ g sTNFR-p75 (Enbrel®) i.p. appliziert. Zur Blockade in der Effektorphase wurde von Tag 10 bis Tag 19 täglich behandelt. Dargestellt ist der Mittelwert des klinischen Index der arthritischen Mäuse \pm SEM. Dies Experiment wurde einmal durchgeführt.

Als nächstes sollte untersucht werden, ob eine Blockade des *Transsignalling* des IL-6-Rezeptors einen Einfluss auf den Verlauf der G6PI-induzierten Arthritis hat. Der IL-6-Rezeptor rekrutiert nach der Bindung von IL-6 das Membran-Glykoprotein gp130 und vermittelt so die Signaltransduktion (Kallen et al. 2002). Das Membranprotein gp130 befindet sich auch auf Zellen, die den IL-6-Rezeptor nicht exprimieren. Der IL-6-Rezeptor kann mit gebundenem IL-6 proteolytisch abgespalten werden und an

gp130 auf Zellen ohne IL-6-Rezeptor binden und dort Effekte vermitteln. Diesen Prozess bezeichnet man als *Transsignalling*. Durch die Applikation von löslichem gp130 (sgp130) sollte dieses Transsignalling blockiert werden.

Zur Blockade des *Transsignalling* in der Induktionsphase wurden die Mäuse intraperitoneal mit sgp130 3 Tage vor Immunisierung mit G6PI, sowie an den Tagen 3, 6, 9, 12 und 15 behandelt. Die Behandlung hatte keinen Effekt auf die Inzidenz: sowohl in der behandelten Gruppe als auch in der Kontrollgruppe waren die ersten Anzeichen einer Arthritis an Tag 9 zu beobachten (Abbildung 22). Der klinische Schweregrad der Arthritis war in der sgp130-behandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe geringer (Tag 11: Kontrolle $8,8 \pm 0,4$; sgp130: $7,0 \pm 0,6$). Dieser Unterschied war an den Tag 10 und 11 statistisch signifikant (*Man-Whitney-U-Test*: $p < 0,05$). Zur Blockade des *Transsignalling* in der Effektorphase wurden die Mäuse an den Tagen 15, 18 und 21 mit sgp130 behandelt. Eine der Blockade des IL-6-*Transsignalling* zeigte keinerlei Effekte (Abbildung 22).

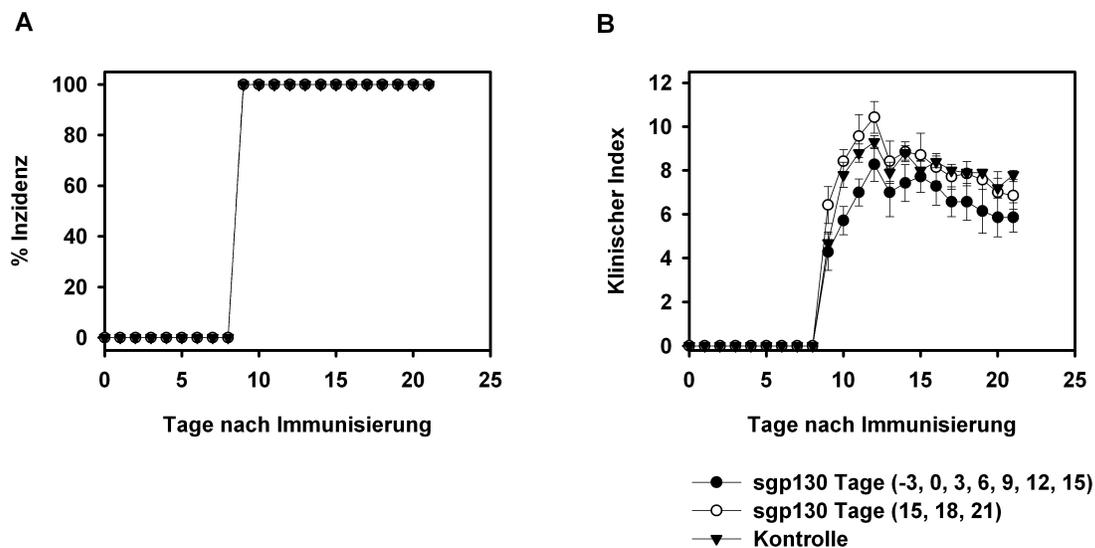


Abbildung 22: Blockade des *Transsignalling* des IL-6R mit löslichem gp130 (sgp130): DBA/1 Mäuse ($n = 10$ pro Gruppe) wurden mit G6PI/CFA immunisiert. Es wurden die Inzidenz (A) und der Schweregrad der Arthritis der arthritischen Tiere (B) evaluiert. Zu den dargestellten Zeitpunkten wurde den Mäusen jeweils $75 \mu\text{g}$ sgp130 i.p. appliziert. Es ist der Mittelwert des klinischen Index der erkrankten Tiere \pm SEM dargestellt.

Abschließend wurde die *in vivo* Blockade des Th1-Zytokins IFN- γ in der Induktionsphase der G6PI-induzierten Arthritis untersucht. Gleichzeitig wurde auch eine *in vivo* Blockade des Th2-Zytokins IL-4 vorgenommen. IFN- γ wurde durch die intraperitoneale Applikation eines anti-IFN- γ -Antikörpers (XMG1.2) an den Tagen 1 und 8 nach Immunisierung mit G6PI blockiert. IL-4 wurde mit dem mAk 11B11 in entsprechender Art und Weise appliziert.

Die Inzidenz und der Schweregrad der Arthritis wurden über einen Zeitraum von 30 Tagen beobachtet. Wie erwartet hatte die Blockade von IL-4 keinerlei Effekte auf die Inzidenz oder den Schweregrad der Arthritis (Abbildung 23). Aber auch die Blockade von IFN- γ zeigte kaum Effekte: die Inzidenz erreichte nach Blockade von IFN- γ bereits an Tag 9 100%, während sie in der Kontrollgruppe noch bei 80 % lag. Ab Tag 10 wiesen alle Gruppen eine Inzidenz von 100 % auf. Der klinische

Schweregrad scheint nach der Blockade von IFN- γ von Tag 12 an leicht erhöht gegenüber der Kontrollgruppe, jedoch ist der Unterschied nicht statistisch signifikant (Abbildung 23).

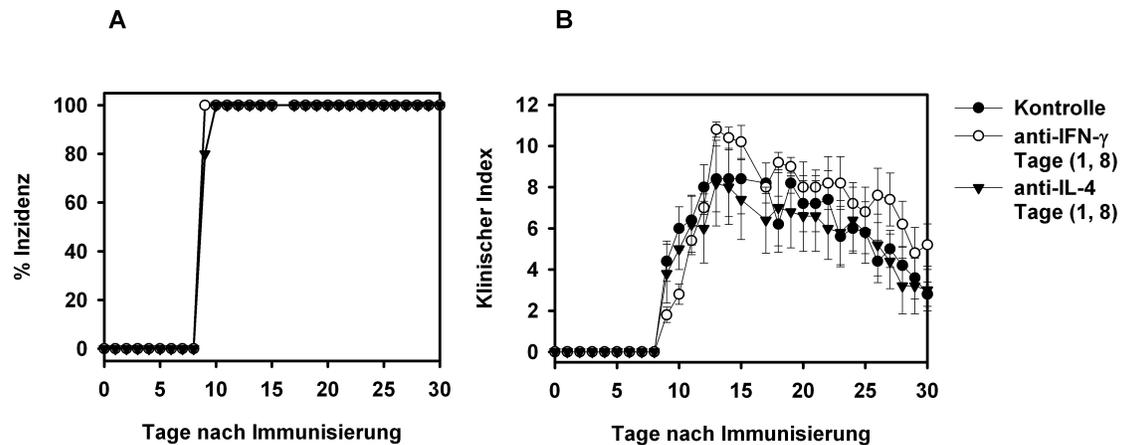


Abbildung 23: In vivo Blockade von IFN- γ und IL-4 bei der G6PI-induzierten Arthritis: Je 5 DBA/1 Mäuse wurden mit G6PI/CFA immunisiert und die Inzidenz (A) und der klinische Verlauf der Arthritis (B) über 30 Tage verfolgt. Zur Blockade von IFN- γ bzw. IL-4 wurden an Tag 1 und 8 je 1 mg des XMG1.2 bzw. 11B11 i.p. verabreicht. Dargestellt ist der Mittelwert des klinischen Index der erkrankten Mäuse \pm SEM. Das Experiment wurde einmal durchgeführt.

3.2. Immunodominante T-Zellepitope in der G6PI-induzierten Arthritis

3.2.1. Mapping von T-Zell-Epitopen

Um die immunodominanten G6PI-T-Zell-Epitope zu bestimmen wurden DBA/1 Mäuse mit G6PI immunisiert und die T-Zell-Antwort auf G6PI und einer Sammlung von 137 Peptiden, die die gesamte Sequenz von G6PI repräsentieren in *in vitro* Proliferationsassays untersucht. Jedes der 137 Peptide ist 15 Aminosäuren (AS) lang und überlappt mit dem vorhergehenden Peptid um 11 AS. Für ein effizientes Screening wurden zweidimensionale Peptid-Pools kreiert (s. Abbildung 24). das bedeutet, dass jedes Peptid durch zwei Pools repräsentiert wird, so ist z.B. das Peptid 22 in den Pools 10 und 14 enthalten.

Rekombinantes G6PI führte zu einer deutlichen T-Zell-Proliferation (SI:4-12, Abbildung 25). Peptid-Pools die einen Stimulationsindex (SI) > 2 induzierten, wurden als Pools betrachtet, die ein immundominantes Peptid enthielten. Die Peptid-Pools 10 und 14 induzierten in 3 von 3 Experimenten einen SI > 2 . Die Pools 5, 22 und 23 induzierten in 2 von 3 Experimenten einen SI > 2 . Zusätzlich wiesen die Pools 6, 7, 13, 17, 18, 19, 20 und 24 in 1 von 3 Experimenten einen SI > 2 auf.

Die Pools 10 und 14 repräsentieren das Peptid 22 (G6PI₈₅₋₉₉). Es wurde daher angenommen das G6PI₈₅₋₉₉ eine immundominante Epitop in der G6PI-induzierten Arthritis darstellt. Darüberhinaus galten G6PI₆₅₋₇₉ (Pool 5 und 14), G6PI₄₆₉₋₄₈₃ (Pool 10 und 22), G6PI₄₉₇₋₅₁₁ (Pool 5 und 23) sowie G6PI₅₁₇₋₅₃₀ (Pool 10 und 23) als hypothetisch immundominant in der G6PI-induzierten Arthritis. Zunächst wurde G6PI₈₅₋₉₉ für weitere Experimente ausgewählt, da es in 3 von 3 Experimenten immundominant war. Zusätzlich wurde das Peptid G6PI₄₆₉₋₄₈₃ für weitere Experimente gewählt, da seine Aminosäuresequenz für Mensch und Maus identisch ist.

A

Peptid 1 MAALTRDPQFQKLQQ G6PI₁₋₁₅
 Peptid 2 TRDPQFQKLQQWYRE G6PI₅₋₁₉



11 AS

B

Pool	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
13	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
14	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
15	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
16	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
17	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
18	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72
19	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
20	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96
21	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108
22	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
23	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132
24	133	134	135	136	137							

Abbildung 24: Epitop-Mapping in der G6PI-induzierten Arthritis. A: die Peptid-Sammlung, die die Sequenz des gesamten huG6PI abdeckt, umfasst 137 Peptide (schwarze Zahlen auf weißem Hintergrund). Jedes Peptid besteht aus 15 Aminosäuren (AS). Die aufeinanderfolgenden Peptide überlappen jeweils um 11 AS. **B:** Zweidimensionale Peptid-Pools: Es wurden insgesamt 24 Pools gebildet (weiße Zahlen auf schwarzem Hintergrund). Jeder Pool umfasst entweder alle Peptide einer Horizontalen oder alle Peptide einer Vertikalen: Z.B. gehören zum Pool 14 alle Peptide von 13 bis 24. Jedes Peptide wird durch zwei Pools repräsentiert: Z.B. wird Peptid 22 durch die Pools 10 und 14 repräsentiert.

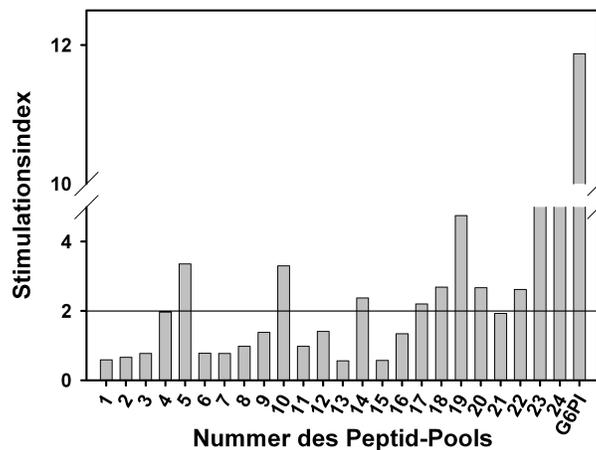


Abbildung 25: Beispiel *Epitop-Mapping* in der G6PI-induzierten Arthritis: DBA/1-Mäuse wurden mit G6PI/CFA immunisiert. An Tag 12 wurden Milz und Lymphknoten entnommen, eine Einzelzellsuspension hergestellt und Proliferationsassay durchgeführt wie im Material- und Methodenteil beschrieben. Es sind Stimulationsindices dargestellt. SIs > 2 wurden als positiv angesehen. Das Experiment wurde dreimal durchgeführt. Gezeigt ist ein Experiment von dreien

3.2.2. Immunodominante Peptide G6PI₈₅₋₉₉ und G6PI₄₆₉₋₄₈₃

Um die zelluläre Immunantwort auf G6PI₈₅₋₉₉ und G6PI₄₆₉₋₄₈₃ zu untersuchen, wurden DBA/1 Mäuse entweder mit dem jeweiligen Peptid oder rekombinantem G6PI immunisiert. Die *in vitro* T-Zell-Proliferation nach Restimulation mit G6PI, G6PI₈₅₋₉₉ oder G6PI₄₆₉₋₄₈₃ wurde untersucht.

Sowohl Zellen von Mäusen, die mit Protein immunisiert worden waren, als auch Zellen von Mäusen, die mit einem der Peptide immunisiert worden waren, proliferierten nach Restimulation mit G6PI bzw. dem Peptid, das zur Immunisierung verwendet worden war. Somit sind sowohl G6PI₈₅₋₉₉ als G6PI₄₆₉₋₄₈₃ immunogen.

Die Peptide waren untereinander nicht kreuzreaktiv, d.h. Zellen von Mäusen, die mit G6PI₈₅₋₉₉ immunisiert worden waren, proliferierten nicht nach Restimulation mit G6PI₄₆₉₋₄₈₃ und umgekehrt.

Im Allgemeinen wurde der höchste SI erreicht, wenn zur Restimulation das gleiche Antigen wie zur Immunisierung verwendet wurde (Ausnahme G6PI₄₆₉₋₄₈₃). Zellen aus Mäusen, die mit G6PI₄₆₉₋₄₈₃ immunisiert worden waren, zeigten einen höheren SI nach Restimulation mit G6PI (s. Abbildung 26).

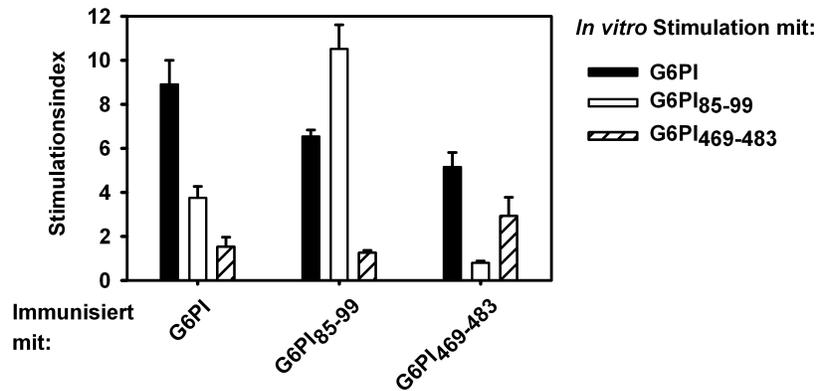


Abbildung 26: *In vitro* Proliferation der immunodominanten Peptide G6PI₈₅₋₉₉ und G6PI₄₆₉₋₄₈₃: DBA/1-Mäuse wurden mit 400 µg G6PI/CFA oder 50 µg Peptid/CFA immunisiert. An Tag 12 wurden die Milzen entnommen und ein Proliferationsassay wie im Material- und Methodenteil beschrieben durchgeführt. Es sind die Mittelwerte der SI (n = 3) ± SEM dargestellt eines repräsentativen Experimentes von vieren dargestellt.

3.2.3. Induktion der Arthritis durch Immunisierung mit G6PI₈₅₋₉₉ oder G6PI₄₆₉₋₄₈₃

Als nächstes sollte untersucht werden, ob durch Immunisierung mit den immunodominanten Peptiden G6PI₈₅₋₉₉ bzw. G6PI₄₆₉₋₄₈₃ eine Arthritis induziert werden kann.

Eine Immunisierung von DBA/1 Mäusen mit G6PI₈₅₋₉₉ oder G6PI₄₆₉₋₄₈₃ induzierte eine Arthritis in mehr als 90 % der Tiere an Tag 12 (Abbildung 27). Die ersten Anzeichen einer Arthritis waren in Peptid-immunisierten Mäusen etwas später zu beobachten (Tag 10-12) als bei Protein-immunisierten Mäusen.

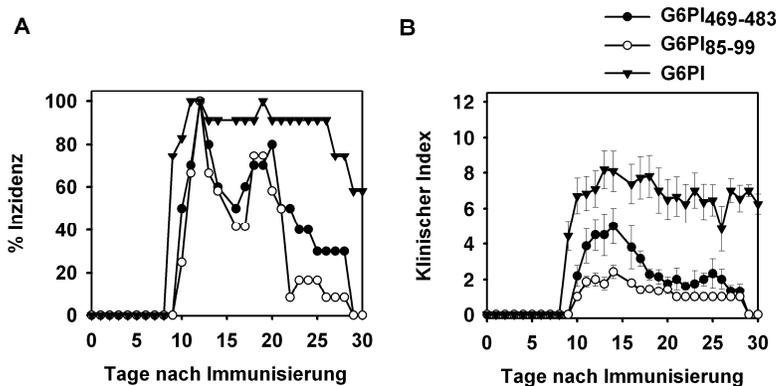


Abbildung 27: Arthritisinduktion in DBA/1 Mäusen durch Immunisierung mit G6PI₈₅₋₉₉ und G6PI₄₆₉₋₄₈₃. **A:** Inzidenz (15 DBA/1 Mäuse) **B:** Klinischer Schweregrad der Arthritis über 30 Tage. Dargestellt ist der Mittelwert des klinischen Index der erkrankten Tiere ± SEM. Die Mäuse wurden mit 400 µg G6PI/CFA, 50 µg G6PI₈₅₋₉₉/CFA oder 50 µg G6PI₄₆₉₋₄₈₃/CFA immunisiert. Dargestellt ist die Zusammenfassung der Ergebnisse aus drei Experimenten.

Allerdings war der klinische Schweregrad deutlich geringer in Peptid-immunisierten Tieren im Vergleich zu Tieren, die mit rekombinantem G6PI immunisiert wurden. Der klinische Schweregrade der Arthritis war nach Immunisierung mit G6PI₄₆₉₋₄₈₃ (Tag 14: 5 ± 1) größer als nach Immunisierung mit G6PI₈₅₋₉₉ (Tag 14: $2,4 \pm 0,4$). In Peptid-immunisierten Mäusen waren häufig nur 1 oder 2 Pfoten betroffen, die dann aber einen klinischen Index von 2 aufwiesen.

3.2.4. Histopathologie

Histopathologische Analysen der Mäuse, die mit rekombinanten G6PI oder mit einem der beiden Peptide immunisiert worden waren, zeigten die typischen Zeichen einer Arthritis: Wie bereits von Schubert et al. beschrieben waren vor allen Dingen die kleinen Gelenke betroffen und sehr selten die Knie. Die Entzündung betraf die Synovialflüssigkeit und die Synovialmembran (Abbildung 28; Kreise) und erstreckte sich auch auf die anliegenden Strukturen wie Sehnen, Sehnenscheiden und Muskeln. (Abbildung 28; Sterne).

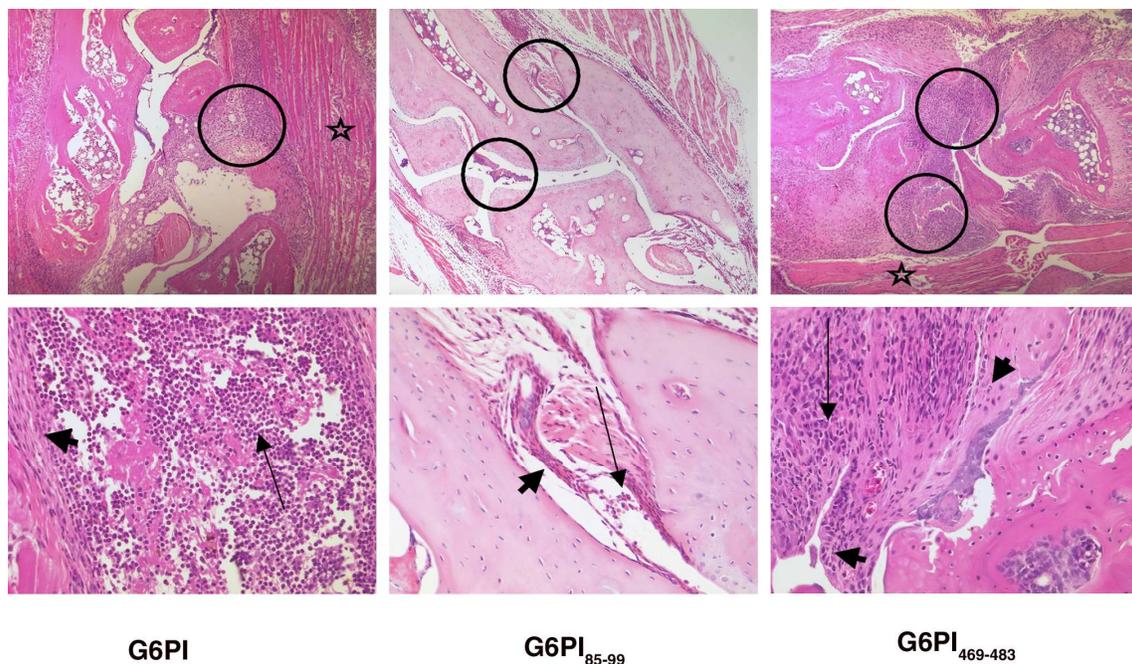


Abbildung 28: Histopathologie nach der Induktion der Arthritis mit G6PI₈₅₋₉₉ oder G6PI₄₆₉₋₄₈₃: DBA/1 Mäuse, die mit G6PI immunisiert worden sind, zeigten eine ausgeprägte Synovitis (Kreise) und eine Entzündung der angrenzenden Skelettmuskulatur (Stern). Als Zeichen einer akuten Entzündung findet man vor allem neutrophile Granulozyten (lange, dünne Pfeile) sowie aktivierte Synovialfibroblasten (breite, kurze Pfeile). Das Synovium war durch entzündliche Infiltrate verdickt. Eine Knochendestruktion war nur teilweise zu beobachten. Nach der Immunisierung mit G6PI₈₅₋₉₉ waren ähnliche Befunde zu beobachten, wenn auch der Schweregrad deutlich geringer war. Die Immunisierung mit G6PI₄₆₉₋₄₈₃ führte zu einer Entzündung die vergleichbar war mit der Entzündung nach Immunisierung mit dem Protein. Die Präparate und die Histopathologische Begutachtung wurden von Dr. Lars Morawietz erstellt. (H&E; oben: 50x, unten: 200x). Gezeigt sind repräsentative Ergebnisse aus zwei Experimenten mit mindestens 9 Mäusen.

An Tag 12 waren sowohl Anzeichen einer akuten als auch einer chronischen Entzündung ausgeprägt, wobei die Zeichen einer akuten Entzündung leicht überwogen: In den Gelenken aller Tiere konnten Infiltrate von neutrophilen Granulozyten beobachtet werden. In schwereren Fällen zeigte sich die Bildung von Abszessen und die Absonderung von Fibrin (Abbildung 28; lange dünne Pfeile).

Typische Zellen einer chronischen Entzündung wie Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen waren nicht so häufig anzutreffen (Abbildung 28; Pfeilköpfe). Die Bildung von multinukleären Riesenzellen oder von Granulomen konnte nicht beobachtet werden. Allerdings zeigt sich eine Verdickung der Synovialmembran sowie eine Proliferation von Fibroblasten, die mit der Pannusbildung bei der RA des Menschen vergleichbar war (s. Abbildung 28).

In manchen Fällen befand sich der Pannus an der Gelenkfläche und führte zur Knorpel- und Knochendestruktion. Allerdings blieben Knorpel und Knochen in den meisten Fällen intakt trotz einer ausgeprägten Entzündung des Synoviums.

Qualitativ unterschied sich die Entzündung in Peptid-immunisierten Mäusen nicht von der in den Protein-immunisierten Mäusen. Allerdings war der Schweregrad der Entzündung in den Tieren, die mit G6PI₈₅₋₉₉ immunisiert worden waren, geringer im Vergleich zu Tieren, die mit rekombinantem G6PI immunisiert worden waren. Der Entzündungsgrad in G6PI-immunisierten Mäusen und G6PI₄₆₉₋₄₈₃-immunisierten Mäusen war vergleichbar.

3.2.5. Zytokin-Produktion in der Peptid-induzierten Arthritis

Es sollte die Zytokin-Produktion nach Immunisierung mit Protein oder Peptid untersucht werden. Dazu wurden die inguinale Lymphknoten an Tag 9 nach Immunisierung entnommen und eine Einzelzellsuspension hergestellt.

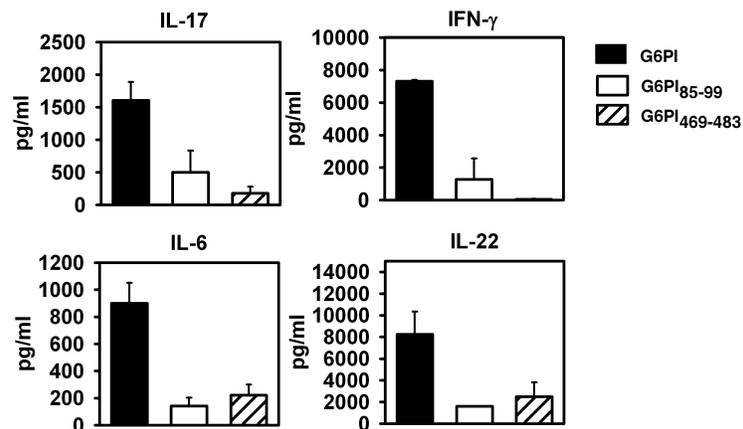


Abbildung 29: Messung der Zytokine IL-17, IFN-γ, IL-6 und IL-22 nach Stimulation mit G6PI, G6PI₈₅₋₉₉ bzw. G6PI₄₆₉₋₄₈₃ im ELISA: DBA/1 Mäuse wurden 400 µg G6PI/CFA immunisiert oder mit 50 µg Peptid/CFA. An Tag 9 wurden die inguinalen Lymphknoten entnommen und eine Einzelzellsuspension hergestellt. Die Zellen wurden mit dem gleichen Antigen restimuliert, das zur Immunisierung verwendet wurde (10 µg/ml G6PI bzw. 1 µg/ml Peptid). Nach 48h wurden die Überstände genommen und im ELISA analysiert. Gezeigt sind die Mittelwerte (n = 12) ± SEM. Die 12 Proben stammten aus drei unabhängigen Experimenten.

Die Zellen wurden für 48h mit dem gleichen Antigen restimuliert, das zur Immunisierung verwendet wurden war. Die Überstände wurden im ELISA auf IL-17, IFN- γ , IL-22, IL-4 und IL-6 untersucht. Die Immunisierung mit G6PI oder den Peptiden induzierte die Produktion von IFN- γ , IL-6, IL-22 und IL-17 (s. Abbildung 29). IL-4 konnte nicht detektiert werden.

Die Immunisierung mit rekombinantem G6PI führte zu einer höheren Produktion von IL-17, IFN- γ , IL-6 und IL-22 als die Immunisierung mit einem der Peptide.

Zusätzlich wurde die G6PI-spezifische Produktion von IL-17, TNF- α , RANKL und IFN- γ durch CD4⁺ T-Zellen untersucht. Dazu wurde die Zytokin-Produktion der CD154⁺ T-Zellen der CD4⁺ T-Zellen untersucht. Die Frequenz der CD154⁺-Zytokinproduzenten war nach Immunisierung mit rekombinantem G6PI an Tag 9 am höchsten, während sie nach Immunisierung mit einem der Peptide ihren Höhepunkt an Tag 12 erreichte (Abbildung 30).

Der Prozentsatz an Zytokin-produzierenden Zellen war in Milz und Lymphknoten vergleichbar.

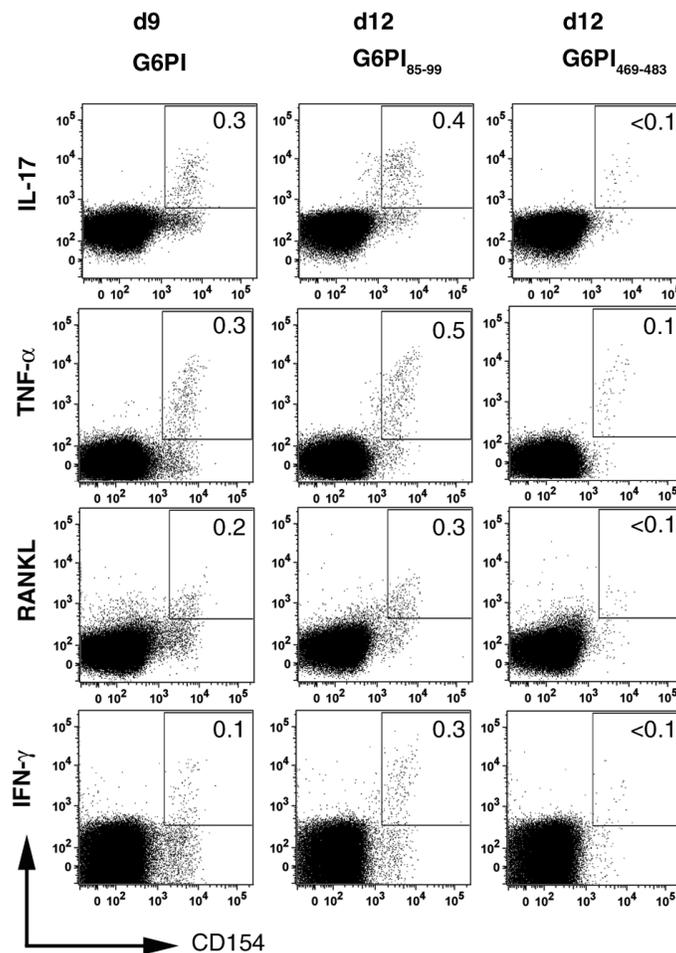


Abbildung 30: Antigen-spezifische Zytokin-Produktion in der Peptid-induzierten Arthritis: DBA/1-Mäuse wurden mit G6PI/CFA immunisiert. An Tag 9 wurde die Milz entnommen und 6 h mit 20 μ g/ml G6PI restimuliert. Die Zellen wurden gegen CD4, CD154, IL-17, TNF- α , RANKL und IFN- γ gefärbt. Es ist repräsentativ die Frequenz (bezogen auf die CD4⁺ Zellen, *Frequency of Parent*) der CD154⁺Zytokin⁺ Th-Zellen einzelner Mäuse eines Experimentes von acht dargestellt.

Die dominierenden Zytokine, die von den CD4⁺ T-Zellen sezerniert wurden, waren IL-17, TNF- α und RANKL (Abbildung 30). Ca. 0,3 % der CD4⁺ Th-Zellen aus G6PI-immunisierten Mäusen produzierten IL-17 bzw. TNF- α nach Restimulation mit G6PI (0,3 % CD4⁺CD154⁺ IL-17⁺; 0,3 % CD4⁺CD154⁺TNF- α ⁺). ~ 0,2 % der CD4⁺ Th-Zellen sezernieren RANKL (0,2 % CD4⁺CD154⁺RANKL⁺), während nur ~0,1 % der CD4⁺ Th-Zellen IFN- γ produzieren (0,1 % CD4⁺CD154⁺IFN- γ ⁺) (s. Abbildung 30).

Das Zytokin-Profil nach Immunisierung mit den immunodominanten Peptiden war vergleichbar dem Zytokin-Profil nach Immunisierung mit rekombinantem G6PI (Abbildung 30). Die Frequenzen der CD4⁺CD154⁺ Zytokin-Produzenten nach Immunisierung mit G6PI₈₅₋₉₉ waren vergleichbar oder sogar höher als nach Immunisierung mit Protein. Ungefähr 0,4 % der CD4⁺ Th-Zellen produzierten IL-17 nach Restimulation mit G6PI₈₅₋₉₉ (0,4 % CD4⁺CD154⁺IL-17⁺). Die Frequenzen der RANKL und TNF- α -Produzenten war vergleichbar (0,5 % CD4⁺CD154⁺TNF- α ⁺; 0,4 % CD4⁺CD154⁺RANKL⁺). Die Frequenz der IFN- γ -Produzenten war sogar höher (0,3 % CD4⁺CD154⁺IFN- γ ⁺).

Nach Immunisierung mit G6PI₄₆₉₋₄₈₃ war die Frequenz von Antigen-spezifischen Zytokin-Produzenten deutlich geringer (Abbildung 30). Die Fraktion der CD4⁺CD154⁺ Zytokin-Produzenten, die IL-17, IFN- γ und RANKL sezernierten war kleiner als 0,1%. Ca. 0,1 % der CD4⁺ Th-Zellen produzierten TNF- α .

3.2.6. G6PI-spezifische Antikörper in der Peptid-induzierten Arthritis

Es sollte die Produktion G6PI-spezifischer Antikörper nach Immunisierung mit G6PI, G6PI₈₅₋₉₉ oder G6PI₄₆₉₋₄₈₃ untersucht werden. An Tag 15 nach Immunisierung wurden die Seren entnommen und im ELISA mit isotypspezifischen Antikörpern auf G6PI-spezifische Antikörper untersucht.

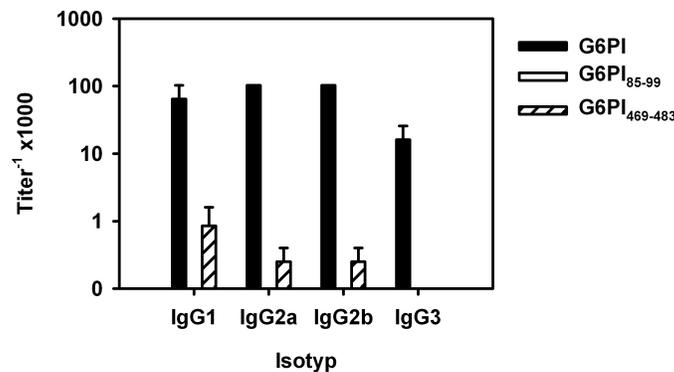


Abbildung 31: G6PI-spezifische Antikörper nach Immunisierung mit G6PI, G6PI₈₅₋₉₉ oder G6PI₄₆₉₋₄₈₃: DBA/1-Mäuse wurden mit 400 μ g G6PI/CFA bzw. 50 μ g Peptid/CFA immunisiert. An Tag 15 wurden von jeweils 5 Mäusen Seren gewonnen. Die Seren wurden seriell verdünnt und im ELISA auf die Anwesenheit isotypspezifischer anti-G6PI-Antikörper getestet. Dargestellt sind die Mittelwerte der Antikörpertiter der verschiedenen Isotypen \pm SEM aus einem Experiment, welches willkürlich aus 4 Experimenten ausgewählt wurde.

Nach Immunisierung mit G6PI₈₅₋₉₉ waren nur sehr niedrige Titer an G6PI-spezifischen Antikörper detektierbar (IgG1: 100 \pm 0; IgG2a: 50 \pm 50; IgG2b: 100 \pm 0; IgG3: 50 \pm 50; Abbildung 31). Nach Immunisierung mit G6PI₄₆₉₋₄₈₃ waren die Antikörpertiter im Vergleich zur Immunisierung mit rekombinantem G6PI um Faktor 10-100 geringer (IgG1: 850 \pm 150; IgG2a: 250 \pm 150; IgG2b: 250 \pm

150; IgG3: 0 ± 0). IgG3 konnte gar nicht nachgewiesen werden. Nach Immunisierung mit dem rekombinanten G6PI wurden die höchsten Titer an G6PI-spezifischen Antikörpern gemessen (IgG1: 64000 ± 38400 ; IgG2a: 102400 ± 0 ; IgG2b: 102400 ± 0 ; IgG3: 16000 ± 9600).

Es muss erwähnt werden, dass die Titer an G6PI-spezifischen Antikörpern nach Immunisierung mit den Peptiden in den einzelnen Experimenten sehr stark schwankten. Das gezeigte Experiment wurde willkürlich ausgewählt. Allen Experimenten war gemeinsam, dass die Höhe der Titer in Peptid-immunisierten Mäusen deutlich unter den Titern in den G6PI-immunisierten Mäusen lag.

3.3. G6PI-induzierte Arthritis in SJL-Mäusen

3.3.1. Klinischer Verlauf und Histopathologie der G6PI-induzierten Arthritis in SJL-Mäusen

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die G6PI-induzierte Arthritis in SJL-Mäusen charakterisiert werden. Es sollte untersucht werden, ob SJL Mäuse auch suszeptibel sind für die G6PI-induzierte Arthritis. Dazu wurden DBA/1- (als Kontrollgruppe) und SJL-Mäuse mit rekombinanter humaner G6PI immunisiert und die Inzidenz und der klinische Verlauf über einen Zeitraum von 80 Tagen untersucht. SJL-Mäuse sind auch suszeptibel für die G6PI-induzierte Arthritis (Abbildung 32). Im Vergleich zu DBA/1 Mäusen ist die Inzidenz bei SJL-Mäusen von Tag 9 bis Tag 30 niedriger: während die Inzidenz bei DBA/1-Mäusen durchgehend bei 100 % liegt, ist sie bei SJL-Mäusen auf ca. 90 % reduziert. In einzelnen Experimenten (Daten nicht gezeigt) betrug die Inzidenz bei SJL-Mäusen lediglich 50 %. Die ersten klinischen Anzeichen sind sowohl bei DBA/1- als auch bei SJL-Mäusen ab Tag 9 zu beobachten; allerdings liegt der Höhepunkt der Erkrankung bei SJL-Mäusen etwas später um Tag 20. Während die klinischen Anzeichen einer Arthritis bei DBA/1-Mäusen an Tag 30 schon deutlich zurückgegangen sind und sich am Tag 80 vollständig aufgelöst haben, sind die klinischen Zeichen einer Arthritis in SJL-Mäusen auch an Tag 80 deutlich zu erkennen (Abbildung 32). Der klinische Index liegt am Höhepunkt der Erkrankung bei SJL-Mäusen bei 8 ± 1 und hat sich am Tag 80 ungefähr auf die Hälfte reduzierte (4 ± 1). Der klinische Verlauf der Arthritis in SJL-Mäusen ist im Vergleich zu DBA/1-Mäusen chronisch; es erfolgt keine Remission des klinischen Index bis auf null.

Histopathologisch zeigten SJL-Mäuse an Tag 30 deutliche Zeichen sowohl einer akuten als auch einer chronischen Entzündung sowie Knorpel- und Knochendestruktion: in allen Gelenken wurde eine massive Infiltration von neutrophilen Granulozyten beobachtet (akute Entzündung). Es wurden typische Zeichen einer chronischen Entzündung wie Lymphozyten und Fibroblasten gefunden. Das Synovium war entzündet: es zeigte sich eine deutliche Verbreiterung der Deckzellschicht im Synovium. Zusätzlich wurden fibrinöse Exsudate auf dem Knorpel gefunden. Sowohl in den kleinen Gelenken als auch im Knie kam es durch Pannusformation zur massiven Destruktion von Knorpel und

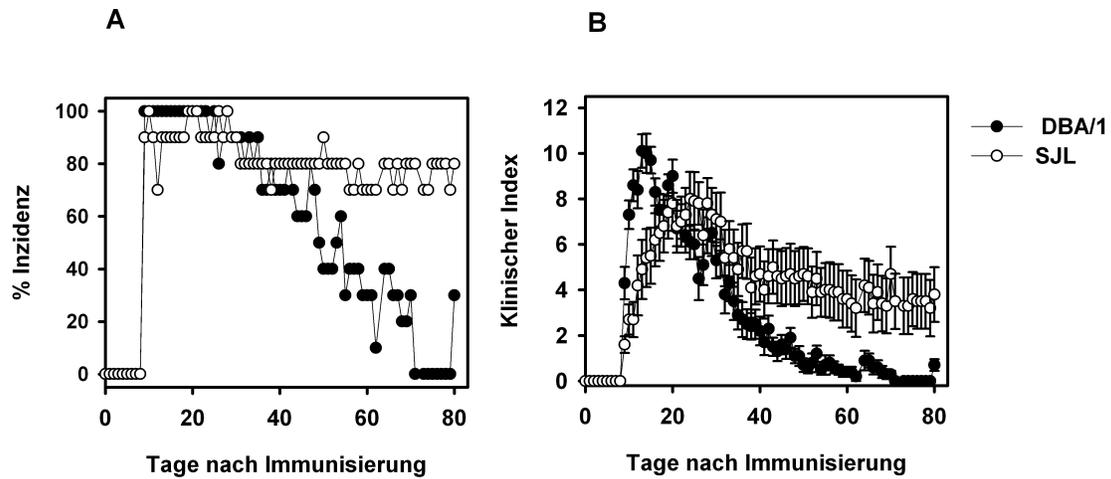


Abbildung 32: Chronischer Verlauf der G6PI-induzierten Arthritis in SJL-Mäusen: 10 DBA/1 Mäuse und 10 SJL Mäuse wurden mit 400 μ g G6PI/CFA immunisiert und die Inzidenz (A) und der klinische Schweregrade (B) über einen Zeitraum von 80 Tagen beobachtet. Das Experiment wurde zweimal wiederholt. Dargestellt ist der Mittelwert des klinischen Index der erkrankten Tiere \pm SEM eines repräsentativen Experiments.

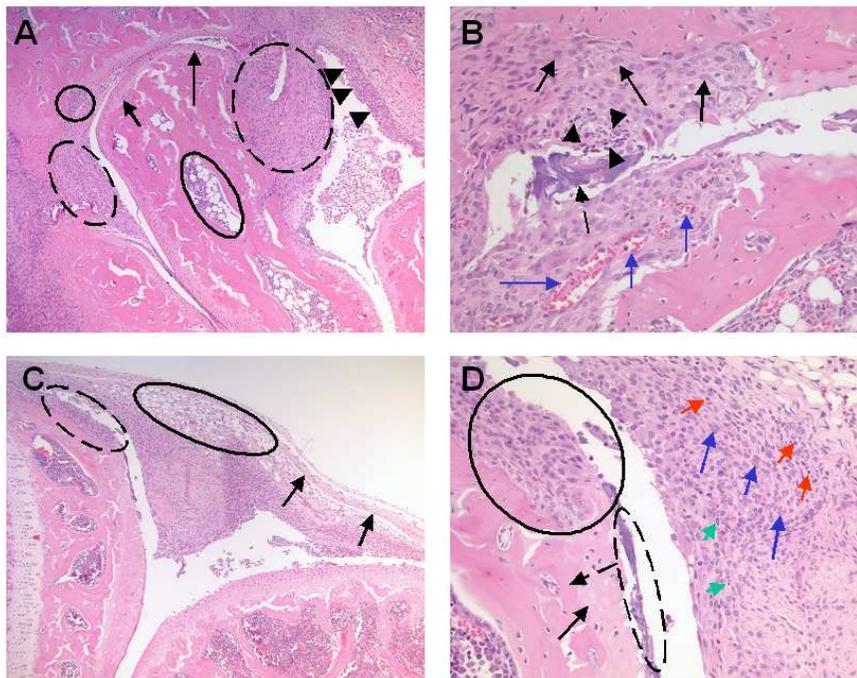


Abbildung 33: Histopathologie bei SJL Mäusen an Tag 30: SJL-Mäuse wurden mit G6PI/CFA immunisiert. An Tag 30 wurden die Gelenke an Vorder- und Hinterläufen histologisch untersucht. **A:** Gestrichelte Ovale: Pannus, der Knochen zerstört, Kreis: Pannus, der Knorpel zerstört, Oval: Knochenmark, Pfeile: Knorpel, Pfeilköpfe: Hyperplasierte Deckzellschicht des Synoviums, H&E, 50x. **B:** Scharfe Pfeile: Fibroblasten im Pannus, Pfeilköpfe: Neutrophile Granulozyten an der Pannusoberfläche, gestrichelter Pfeil: Fibrinöses Exsudat, blaue Pfeile: Neovaskularisation im Pannus, H&E, 200x. **C:** Knie, Oval: periartikuläres Fettgewebe, gestricheltes Oval: Pannus der Knorpel zerstört, schwarze Pfeile: Bindegewebe, H&E, 50x. **D:** Knie, Oval: Pannus, der Knorpel zerstört, gestricheltes Oval: zarte Fibrinschicht auf dem Knorpel, gestrichelter schwarzer Pfeil: Knorpel, schwarzer Pfeil: Knochen, blaue Pfeile: Fibroblasten im Pannus, rote Pfeile: vereinzelte Lymphozyten in Pannus, grüne Pfeile:

neutrophile Granulozyten im Pannus, H&E, 200x. Die histopathologische Evaluation wurde von Dr. Lars Morawietz durchgeführt.

Knochen (s. Abbildung 33). In der G6PI-induzierten Arthritis der SJL-Mäuse waren die Knie häufiger befallen als in DBA/1-Mäusen.

3.3.2. G6PI-induzierte Arthritis in SJL-RAG^{-/-}-Mäusen

Es sollte überprüft werden, ob SJL-RAG^{-/-}-Mäuse susceptibel für die G6PI-induzierte Arthritis sind. Dazu wurden SJL-RAG^{-/-}-Mäuse und SJL-Mäuse mit G6PI/CFA immunisiert und die klinischen Anzeichen über einen Zeitraum von 30 Tagen beobachtet. SJL-RAG^{-/-}-Mäuse entwickeln keine klinischen Anzeichen einer Arthritis nach Immunisierung mit G6PI (Abbildung 34).

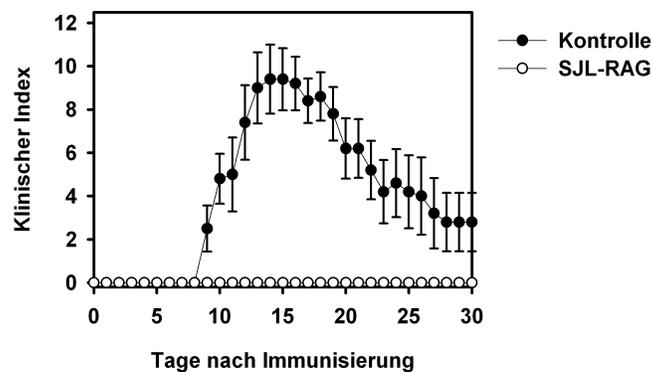


Abbildung 34: G6PI-induzierte Arthritis in SJL-RAG^{-/-}-Mäusen: 5 SJL bzw. 5 SJL-RAG^{-/-}-Mäuse wurden mit 200µg G6PI/CFA immunisiert und der klinische Schweregrad über 30 Tage beobachtet. Es ist der Mittelwert des klinischen Index \pm SEM dargestellt. Das Experiment wurde einmal durchgeführt.

3.3.3. *In vivo* Proliferation von CD4⁺ T-Zellen in SJL-Mäusen und Depletion von CD4⁺ T-Zellen

In der G6PI-induzierten Arthritis bei DBA/1 Mäusen sind CD4⁺ T-Zellen in der Pathogenese unabdingbar. Es sollte untersucht werden, ob CD4⁺ T-Zellen in der G6PI-induzierten Arthritis bei SJL Mäusen eine ähnlich wichtige Rolle spielen. Es wurde die *in vivo* Proliferation von CD4⁺ T-Zellen in SJL-Mäusen mit der in DBA/1-Mäusen durch BrdU-Inkorporation verglichen. DBA/1- und SJL-Mäuse wurden mit G6PI/CFA bzw. PBS/CFA immunisiert und 9 Tage lang mit BrdU behandelt. An Tag 9 wurden die Milz und die inguinalen Lymphknoten entnommen und die BrdU-Inkorporation mittels Durchflusszytometrie analysiert. In SJL-Mäusen war nach Immunisierung mit G6PI/CFA die absolute Anzahl an BrdU⁺CD4⁺ T-Zellen gegenüber der Immunisierung mit PBS/CFA leicht erhöht (PBS/CFA: $0,04 \pm 0,01 \times 10^6$; G6PI/CFA: $0,08 \pm 0,02 \times 10^6$) jedoch war der Unterschied nicht statistisch signifikant (Abbildung 35 und Abbildung 36). Die absolute Anzahl an BrdU⁺CD4⁺ T-Zellen war in den DBA/1-Mäusen im Vergleich zu SJL-Mäusen deutlich höher (G6PI/CFA: $0,27 \pm 0,06 \times 10^6$; PBS/CFA: $0,05 \pm 0,03 \times 10^6$). Auffällig ist, dass auch in SJL-Mäusen wie bei den DBA/1-Mäusen nach Immunisierung mit PBS/CFA eine deutliche Inkorporation von BrdU zu verzeichnen ist.

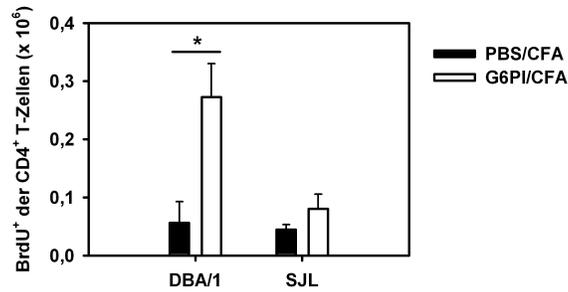


Abbildung 35: *In vivo* Proliferation von CD4⁺ T-Zellen nach Immunisierung mit G6PI in SJL-Mäusen: DBA/1- bzw. SJL-Mäuse wurden mit 200 µg G6PI/CFA oder PBS/CFA immunisiert. An Tag 9 nach Immunisierung wurden die inguinalen Lymphknoten entnommen und die Zellen gegen CD3, CD4 und BrdU gefärbt und im FACS analysiert. Dargestellt ist der Mittelwert ± SEM der absoluten Anzahl an CD4⁺ T-Zellen in inguinalen Lymphknoten von 5 Tieren. Die *Gating*-Strategie ist im Material- und Methodenteil beschrieben. Das Experiment wurde einmal durchgeführt.

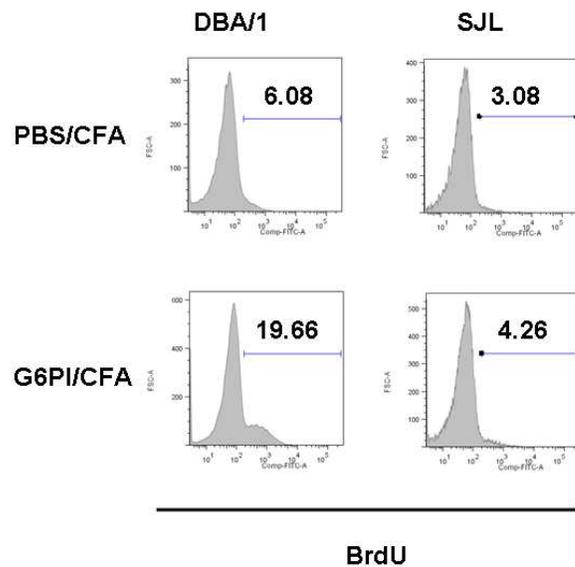


Abbildung 36: Exemplarische Darstellung der BrdU-Färbung zur Messung der *in vivo* Proliferation von CD4⁺ T-Zellen nach Immunisierung mit G6PI in SJL-Mäusen: DBA/1- bzw. SJL-Mäuse wurden mit 200 µg G6PI/CFA oder PBS/CFA immunisiert. An Tag 9 nach Immunisierung wurden die inguinalen Lymphknoten entnommen und die Zellen gegen CD3, CD4 und BrdU gefärbt und im FACS analysiert. Dargestellt ist im Histogramm die Frequenz (*Frequency of Parent*) der BrdU⁺ CD4⁺ T-Zellen in inguinalen Lymphknoten. Die *Gating*-Strategie ist im Material- und Methodenteil beschrieben.

Als nächstes wurde untersucht inwieweit die Inzidenz und der klinische Schweregrad der G6PI-induzierten Arthritis in SJL-Mäusen durch eine Depletion von CD4⁺ T-Zellen in der Induktionsphase beeinflusst werden kann.

Dazu wurden SJL-Mäuse mit G6PI/CFA immunisiert. An den Tagen 6 und 9 wurde ein anti-CD4-Antikörper (YTS191) i.p. appliziert und die Inzidenz und der klinische Schweregrad über einen

Zeitraum von 30 Tagen beobachtet. Die Abwesenheit der CD4⁺ T-Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie verifiziert (Daten nicht gezeigt).

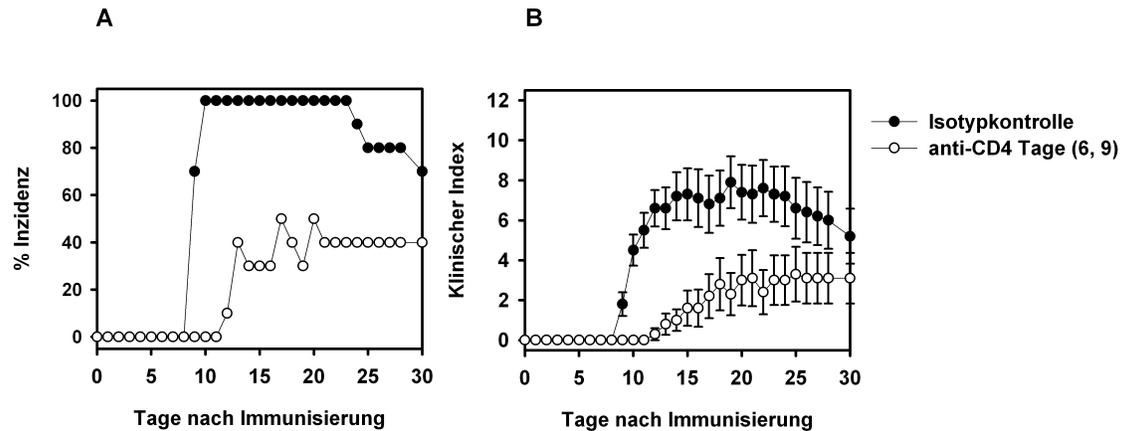


Abbildung 37: *In vivo* Depletion von CD4⁺ T-Zellen in der Induktionsphase der G6PI-induzierten Arthritis bei SJL-Mäusen: Die Inzidenz (A) und der klinische Schweregrad der Arthritis (B) wurde über 30 Tage verfolgt. Jeweils 10 SJL Mäuse pro Gruppe wurden mit 400 µg G6PI/CFA immunisiert. Die Depletion der CD4⁺ T-Zellen erfolgte mit 300µg YTS191 i.p. an den Tagen 6 und 9. Als Isotypkontrolle wurde ein rIgG (13C4) appliziert. Dargestellt ist der Mittelwert des klinischen Index der arthritischen Tiere ± SEM. Das Experiment wurde einmal durchgeführt.

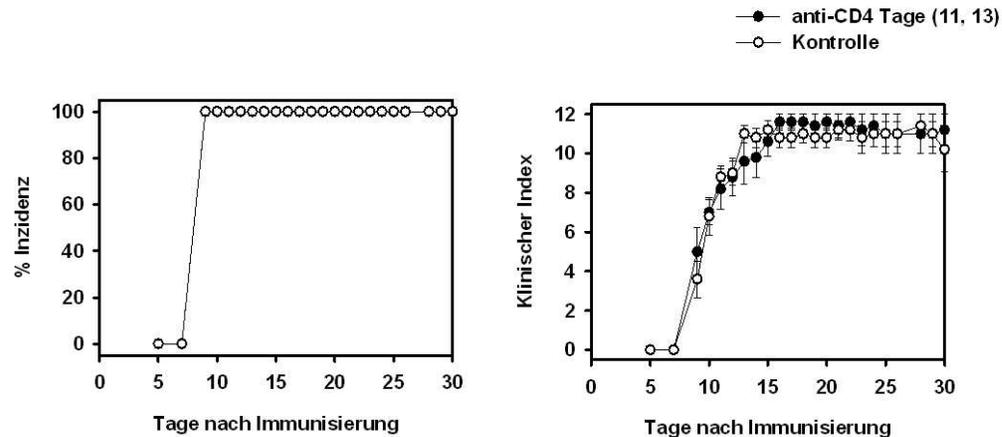


Abbildung 38: *In vivo* Depletion von CD4⁺ T-Zellen in der Effektorphase der G6PI-induzierten Arthritis bei SJL-Mäusen: Die Inzidenz (A) und der klinische Schweregrad der Arthritis (B) wurde über 30 Tage verfolgt. Jeweils 10 SJL Mäuse pro Gruppe wurden mit 400 µg G6PI/CFA immunisiert. Die Depletion der CD4⁺ T-Zellen erfolgte mit 300 µg YTS191 i.p. an den Tagen 11 und 13. Dargestellt ist der Mittelwert des klinischen Index der erkrankten Tiere ± SEM. Das Experiment wurde einmal durchgeführt.

Im Vergleich zur Kontrollgruppe war die Inzidenz in CD4-depletierten Mäusen an den Tagen 13 bis 16 von 100 % auf 30 bis 50 % reduziert (Abbildung 37). Die ersten klinischen Anzeichen einer Arthritis waren in den CD4-depletierten Mäusen erst ab Tag 12 zu beobachten. Auch der klinische Schweregrad war in CD4-depletierten Individuen (Tag 20: 3 ± 1,3) im Vergleich zu Individuen aus der Kontrollgruppe (Tag 20: 7,4 ± 1,4) deutlich geringer (Abbildung 37). Diese Resultate sprechen dafür,

dass auch in der G6PI-induzierten Arthritis in SJL-Mäusen CD4⁺ T-Zellen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Arthritis spielen.

Eine Depletion der CD4⁺ T-Zellen in der Effektorphase an den Tagen 11 und 13 in SJL-Mäusen hatte weder auf den klinischen Schweregrad noch auf die Inzidenz Auswirkungen (Abbildung 38). In diesem Punkt unterscheiden sich SJL-Mäuse von DBA/1-Mäusen.

3.3.4. Depletion von neutrophilen Granulozyten in der G6PI-induzierten Arthritis von SJL-Mäusen

Schubert *et al.* konnten bereits zeigen, dass FcγR⁺-Effektorzellen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der G6PI-induzierten Arthritis spielen (Schubert *et al.*, 2004). Zu den FcγR⁺-Effektorzellen zählen unter anderem neutrophile Granulozyten. Da in DBA/1-Mäusen nach der Depletion in der Induktions- bzw. der Effektorphase von neutrophilen Granulozyten klinische Effekte beobachtet werden konnten (s. Abschnitt 3.4.1.), sollte untersucht werden ob auch in der G6PI-induzierten Arthritis von SJL-Mäusen die Inzidenz und der klinische Schweregrad durch die Depletion von neutrophilen Granulozyten beeinflusst wird.

Dazu wurden SJL-Mäuse mit G6PI/CFA immunisiert. Die neutrophilen Granulozyten wurden durch die intraperitoneale Applikation eines anti-Gr1-Antikörpers (RB6 8C5) an den Tagen 6, 8 10 und 12 depletiert. Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten zu den gleichen Zeitpunkten ein Ratten-IgG als Isotypkontrolle. Die Abwesenheit der neutrophilen Granulozyten wurde durch einen Blutausstrich verifiziert. Im Vergleich zur Kontrollgruppe war nach Depletion der Neutrophilen die Inzidenz deutlich geringer (Abbildung 39): Während in der Kontrollgruppe von Tag 10 bis Tag 23 die Inzidenz bei 100 % lag, schwankte die Inzidenz in Mäusen, bei denen die Neutrophilen depletiert worden waren, im gleichen Zeitraum zwischen 10 und 60 %. Die ersten klinischen Zeichen einer Arthritis waren in beiden Gruppen an Tag 9 zu beobachten (Abbildung 39).

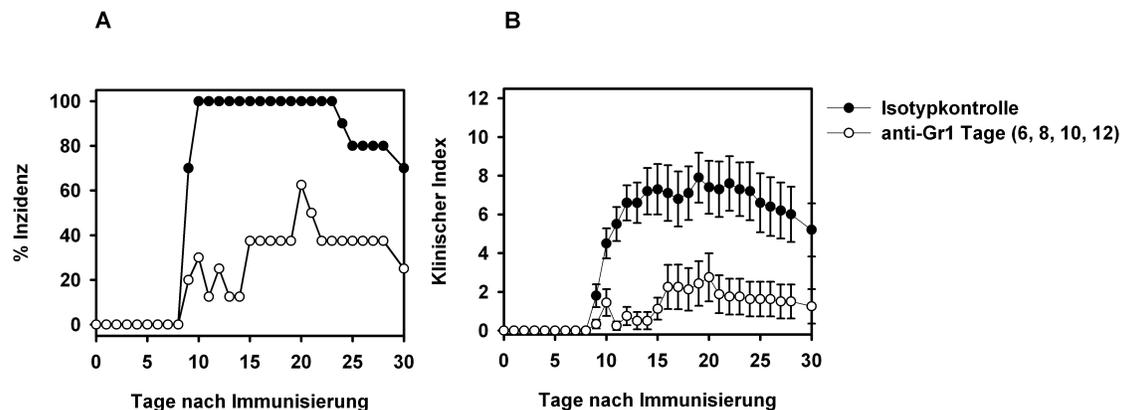


Abbildung 39: Depletion von Neutrophilen in der G6PI-induzierten Arthritis von SJL-Mäusen: Die Inzidenz (A) und der klinische Schweregrad der Arthritis (B) wurde über 30 Tage verfolgt. Jeweils 10 SJL Mäuse pro Gruppe wurden mit 400 µg G6PI/CFA immunisiert. Die Depletion der Neutrophilen erfolgte mit 160 µg RB6 8C5 i.p. an den Tagen 6, 8, 10 und 12. Als Isotypkontrolle wurde ein rIgG (13C4) appliziert. Dargestellt ist der Mittelwert des klinischen Index der erkrankten Tiere ± SEM. Das Experiment wurde einmal durchgeführt.

Der klinische Schweregrad war nach Depletion der Neutrophilen deutlich weniger ausgeprägt als in der Kontrollgruppe: Während in der Kontrollgruppe der klinische Index an Tag 20 bei $7,4 \pm 1,4$ lag, wies die Neutrophilen-depletierte Gruppe eine Inzidenz von $2,8 \pm 1,2$ auf (Abbildung 39). Somit scheinen neutrophile Granulozyten eine wichtige Gruppe von Effektorzellen in der G6PI-induzierten Arthritis darzustellen.

3.3.5. G6PI-spezifische Antikörper

Im K/BxN- und dem CIA-Modell sind Antikörper pathogenetisch relevant. Auch in der G6PI-induzierten Arthritis konnten hohe Titer an G6PI-spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden (Schubert et al., 2004). Deswegen sollte die Bildung G6PI-spezifischer Antikörper in der G6PI-induzierten Arthritis in SJL-Mäusen im Vergleich zu SJL-Mäusen untersucht werden. Dazu wurden DBA/1 und SJL-Mäuse mit G6PI/CFA immunisiert. An Tag 30 wurden Seren entnommen, diese seriell verdünnt und mittels eines Isotypspezifischen ELISAs untersucht. SJL-Mäuse weisen für die Isotypen IgM ($1:23860 \pm 19709$), IgG2a ($1:8320 \pm 4451$), IgG2b ($1:12160 \pm 5556$) und IgG3 ($1:16000 \pm 5878$) im Vergleich zu DBA/1-Mäusen (IgM: $1:2800 \pm 1833$; IgG2a: $1:2800 \pm 1833$; IgG2b: $1:12160 \pm 0$; IgG3: $1:16000 \pm 2000$) leicht erhöhte Titer G6PI-spezifischer Antikörper auf (*Man-Whitney-U-Test*: $p > 0,05$; Abbildung 40). Nur für IgG1 weisen DBA/1-Mäuse einen höheren Antikörpertiter auf (SJL: $1:33280 \pm 17805$; DBA/1: $1:76800 \pm 25600$). Insgesamt sind die Unterschiede in den beiden Mausstämmen jedoch nicht statistisch signifikant und können als vergleichbar angesehen werden.

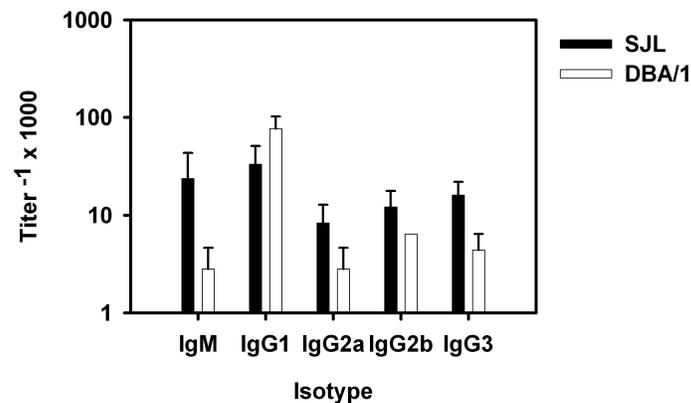


Abbildung 40: G6PI-spezifische Antikörper in der G6PI-induzierten Arthritis im Vergleich zwischen DBA/1- und SJL-Mäusen an Tag 30: DBA/1- und SJL-Mäuse wurden mit $200 \mu\text{g}$ G6PI/CFA immunisiert. An Tag 30 wurden von jeweils 5 Mäusen Seren gewonnen. Die Seren wurden seriell verdünnt und im ELISA auf die Anwesenheit isotypspezifischer anti-G6PI-Antikörper getestet. Dargestellt sind die Mittelwerte der Antikörpertiter der verschiedenen Isotypen \pm SEM eines Experimentes von zweien.

3.3.6. Zytokin-Produktion in der G6PI-induzierten Arthritis in SJL-Mäusen

Es sollte untersucht werden, welche Zytokine in der G6PI-induzierten Arthritis der SJL-Mäuse exprimiert und sezerniert werden. Dazu wurden DBA/1- und SJL-Mäuse mit G6PI/CFA immunisiert. An Tag 9 wurden die drainierenden Lymphknoten und die Milz entnommen und

Einzelzellsuspensionen hergestellt. Die Zellen wurden in Kultur mit G6PI restimuliert; nach 48 h wurden die Überstände abgenommen und im ELISA analysiert.

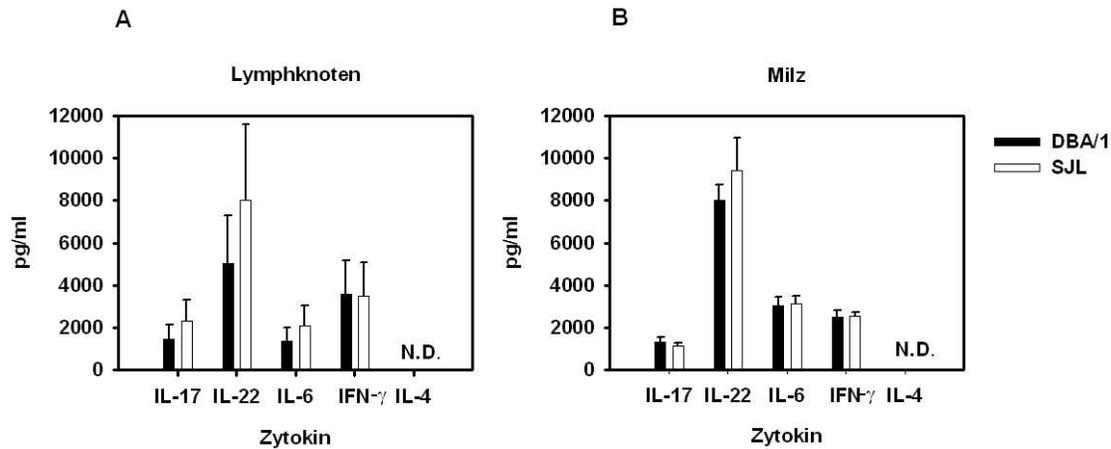


Abbildung 41: Zytokinproduktion in der G6PI-induzierten Arthritis im Vergleich zwischen DBA/1- und SJL-Mäusen: DBA/1- und SJL-Mäuse wurden G6PI/CFA. An Tag 9 wurden die inguinalen Lymphknoten und die Milz entnommen und eine Einzelzellsuspension hergestellt. Die Zellen wurden mit 10 μ g/ml G6PI restimuliert. Nach 48 h wurden die Überstände genommen und im ELISA analysiert. Gezeigt sind die Mittelwerte ($n = 5$) \pm SEM eines Experimentes von zweien.

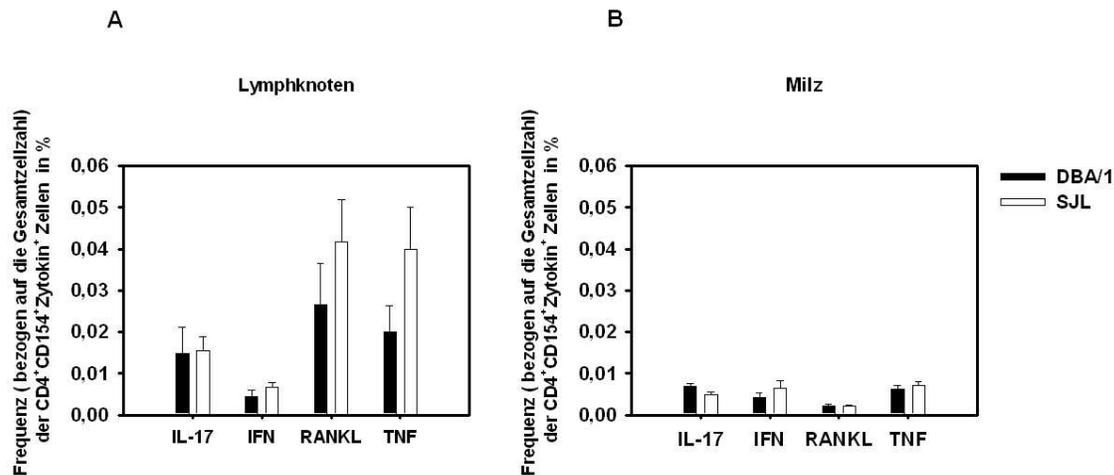


Abbildung 42: Frequenz der Antigen-spezifischen Zytokin-produzierenden CD4⁺-T-Zellen im Vergleich zwischen DBA/1- und SJL-Mäusen in den drainierenden Lymphknoten und der Milz: DBA/1 und SJL-Mäuse wurden mit G6PI immunisiert. An Tag 9 wurden die inguinalen Lymphknoten und die Milz entnommen und 6 h mit 20 μ g/ml G6PI restimuliert. Die Zellen wurden gegen CD4, CD154, IL-17, TNF- α , IFN- γ und RANKL gefärbt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Gesamtzellzahl CD4⁺CD154⁺Zytokin⁺ nach *progressiv gating* ($n = 5$) \pm SEM eines Experimentes. Das Experiment wurde zweimal durchgeführt.

Auch in der G6PI-induzierten Arthritis der SJL-Mäuse werden die Zytokine IL-17, IL-22, IL-6 und IFN- γ produziert (Abbildung 41). IL-4 ist nicht detektierbar (Abbildung 41). Im Vergleich zu DBA/1 Mäusen ist in SJL-Mäusen im Lymphknoten die Produktion von IL-17, IL-6 und IL-22 erhöht; allerdings sind die

Unterschiede nicht statistisch signifikant. In der Milz ist nur die Produktion von IL-22 erhöht. Wie auch bei DBA/1-Mäusen ist die Zytokin-Produktion in der Milz etwas höher als in den Lymphknoten: erneut ist die IL-22-Produktion (Milz: 9426 ± 1521 pg/ml; Lk: 8000 ± 3578 pg/ml) am höchsten gefolgt von der IL-6-Produktion (Milz: 3146 ± 326 pg/ml; Lk: 2095 ± 937 pg/ml). Sowohl das Th1-Zytokin IFN- γ (Milz: 2544 ± 188 pg/ml; Lk: 3500 ± 1565 pg/ml) als auch das Th17-Zytokin IL-17 (Milz: 1123 ± 157 pg/ml; Lk: 2299 ± 1028 pg/ml) sind in Milz und Lymphknoten detektierbar (Abbildung 41).

Wie bereits für die DBA/1 Mäuse im Abschnitt 3.1.4. beschrieben wurde auch die Antigen-spezifische Zytokinproduktion von CD4⁺CD154⁺ T-Zellen bei SJL-Mäusen im Vergleich zu DBA/1-Mäusen untersucht (Abbildung 42).

Sowohl in DBA/1- als auch in SJL-Mäusen findet man das gleiche Spektrum an Antigen-spezifisch sezernierten Zytokinen: IL-17, IFN- γ , RANKL und TNF- α . Betrachtet man die Frequenz der Antigen-spezifischen T-Zellen, die IL-17, IFN- γ , RANKL und TNF- α produzieren, so findet man an Tag 9 nach Immunisierung höhere Frequenzen an Antigen-spezifischen T-Zellen in den drainierenden Lymphknoten als in der Milz. Dabei ist die Frequenz an CD4⁺CD154⁺IL-17⁺ und CD4⁺CD154⁺IFN- γ ⁺ T-Zellen in DBA/1- und SJL-Mäusen nahezu gleich (Abbildung 42).

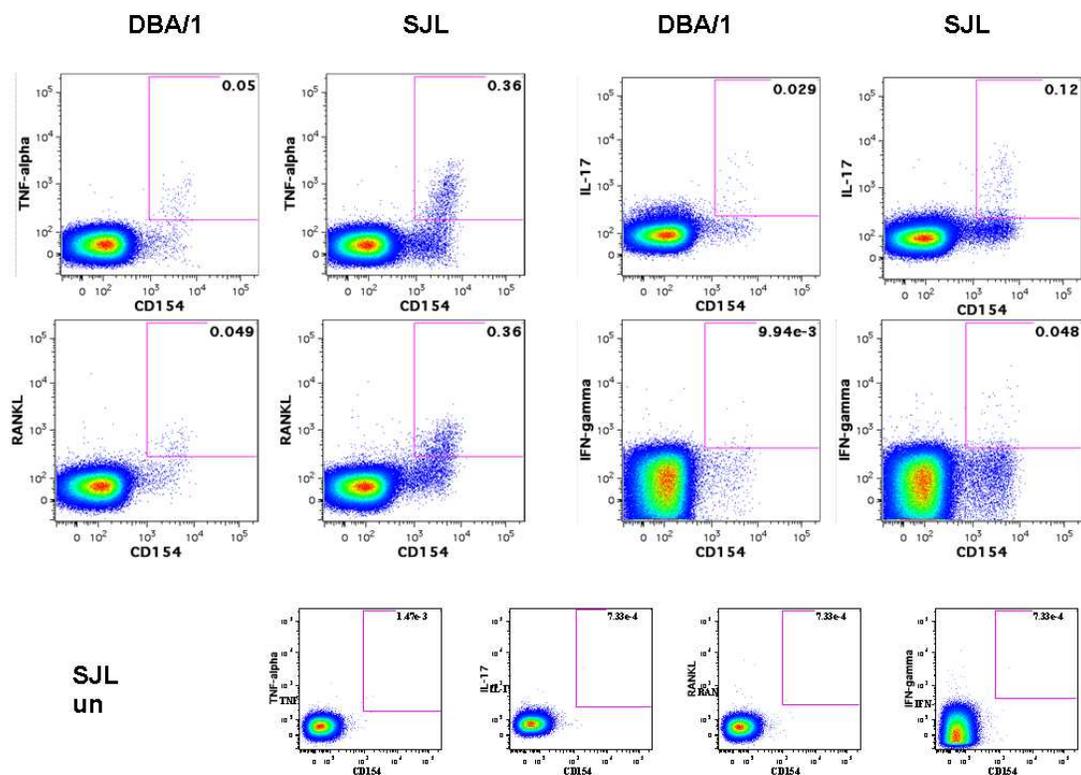


Abbildung 43: Exemplarische Darstellung der Antigen-spezifischen Zytokin-Produktion in der G6PI-induzierten Arthritis im Vergleich zwischen DBA/1- und SJL-Mäusen: DBA/1 und SJL-Mäuse wurden mit G6PI immunisiert. An Tag 9 wurden die inguinalen Lymphknoten und die Milz entnommen und 6 h mit 20 μ g/ml G6PI restimuliert. Die Zellen wurden gegen CD4, CD154, IL-17, TNF- α , IFN- γ und RANKL gefärbt. Es ist die Frequenz (bezogen auf die CD4⁺ Zellen, *Frequency of Parent*) der CD154⁺Zytokin⁺ Th-Zellen nach Restimulation mit G6PI dargestellt (oben). Die FACS-Plots (unten) zeigen korrespondierende Färbungen aus SJL-Mäusen mit Medium-stimulierten Zellen (un).

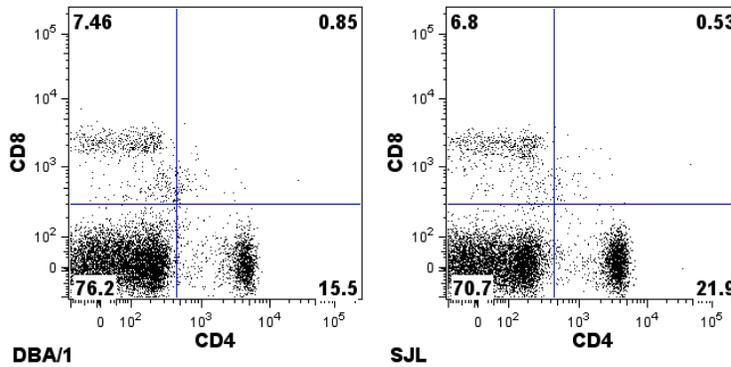


Abbildung 44: Frequenz von CD4⁺ T-Zellen in DBA/1- und SJL-Mäusen: aus naiven DBA/1- bzw. SJL-Mäusen wurde die Milz entnommen und eine FACS-Färbung auf CD4 und CD8 durchgeführt. Es ist eine repräsentative Färbung gezeigt.

Die Frequenz an CD4⁺CD154⁺RANKL⁺ und CD4⁺CD154⁺TNF- α ⁺ T-Zellen ist in SJL-Mäusen im Vergleich zu DBA/1-Mäusen erhöht, wobei der Unterschied nicht statistisch signifikant ist.

SJL-Mäuse besitzen im Vergleich zu DBA/1-Mäusen eine höhere Frequenz an CD4⁺-T-Zellen (Abbildung 44), was in einer größeren Zellzahl resultiert. Um diesem Umstand bei der Auswertung Rechnung zu tragen, wurde auch die Gesamtzellzahl der Zytokin-produzierenden CD4⁺CD154⁺ T-Zellen bestimmt (Abbildung 45).

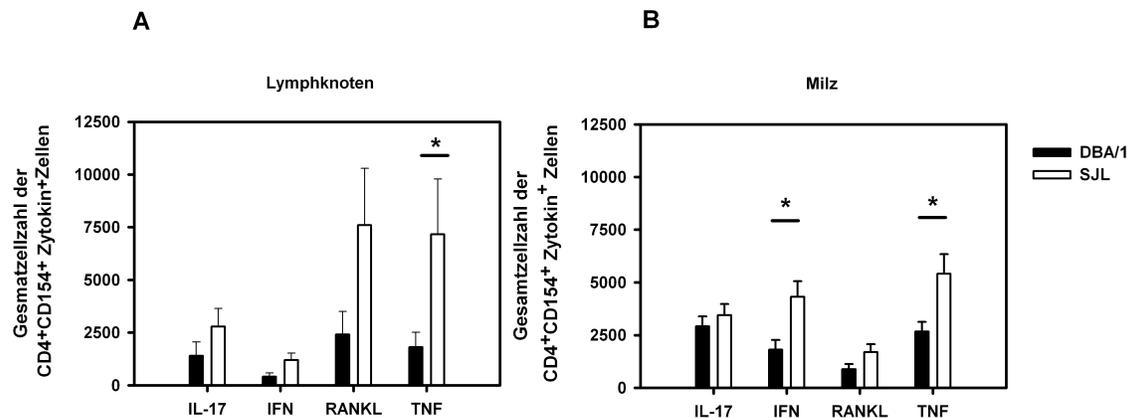


Abbildung 45: Zytokinproduktion von CD4⁺CD154⁺ T-Zellen in der G6PI-induzierten Arthritis im Vergleich zwischen DBA/1- und SJL-Mäusen in den drainierenden Lymphknoten und der Milz: DBA/1 und SJL-Mäuse wurden mit G6PI immunisiert. An Tag 9 wurden die inguinalen Lymphknoten und die Milz entnommen und 6 h mit 20 μ g/ml G6PI restimuliert. Die Zellen wurden gegen CD4, CD154, IL-17, TNF- α , IFN- γ und RANKL gefärbt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Gesamtzellzahl CD4⁺CD154⁺Zytokin⁺ nach *progressiv gating* (n = 5) \pm SEM eines Experimentes von zweien.

SJL-Mäuse wiesen im Vergleich zu DBA/1-Mäusen in Milz und Lymphknoten eine größere Gesamtzellzahl an CD4⁺CD154⁺IL-17⁺, CD4⁺CD154⁺IFN- γ ⁺, CD4⁺CD154⁺RANKL⁺ und CD4⁺CD154⁺TNF- α ⁺ T-Zellen auf (Abbildung 45). In den Lymphknoten ist der Unterschied für CD4⁺CD154⁺TNF- α ⁺ statistisch signifikant (*Man-Whitney-U-Test*: p < 0,05); in der Milz ist der

Unterschied zwischen DBA/1 und SJL-Mäusen für $CD4^+CD154^+IFN-\gamma^+$ und $CD4^+CD154^+TNF-\alpha^+$ statistisch signifikant (*Man-Whitney-U-Test*: $p < 0,05$).

3.4. Rolle der B-Zellen in der G6PI-induzierten Arthritis

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden in welcher Art und Weise B-Lymphozyten an der Pathogenese der G6PI-induzierten Arthritis beteiligt sind. B-Lymphozyten haben neben der Produktion von Antikörpern weitere wichtige Fähigkeiten wie die Antigenpräsentation und Kostimulation sowie die Produktion von Zytokinen. Darüber hinaus können B-Zellen regulatorische Funktionen wahrnehmen und sind an der Bildung von Keimzentren beteiligt.

Schubert *et al.* konnten bereits zeigen, dass anders als im K/BxN Modell der adoptive Transfer der Arthritis im Modell der G6PI-induzierten Arthritis allein durch Antikörper nicht möglich ist (Schubert *et al.*, 2004). Allerdings sind die Präsenz von B-Zellen und $Fc\gamma$ -Rezeptor-vermittelte Effektormechanismen für die Entwicklung einer Arthritis erforderlich (Bockermann *et al.*, 2005; Schubert *et al.*, 2004). Diese Befunde sprechen dafür, dass nicht allein die G6PI-spezifischen Antikörper pathogenetisch relevant sind, sondern möglicherweise andere Effektorfunktionen der B-Lymphozyten.

3.4.1. Neutrophile in der G6PI-induzierten Arthritis

Die Bindung von Antigenen durch Antikörper führt mittels der Bindung dieser Immunkomplexe durch Fc-Rezeptoren zur Aktivierung akzessorischer Effektorzellen. Neutrophile Granulozyten gehören zu den $Fc\gamma R^+$ -Effektorzellen, die eine wichtige Rolle in der Pathogenese der G6PI-induzierten Arthritis spielen wie Schubert *et al.* zeigen konnten. Im Modell der CIA konnte bereits gezeigt werden, dass IL-17, welches im Gelenk überexprimiert wird, zu einem Influx von Neutrophilen führt. Deswegen sollten die klinischen Effekte einer Depletion von Neutrophilen in der Induktions- und der Effektorphase der G6PI-induzierten Arthritis untersucht werden.

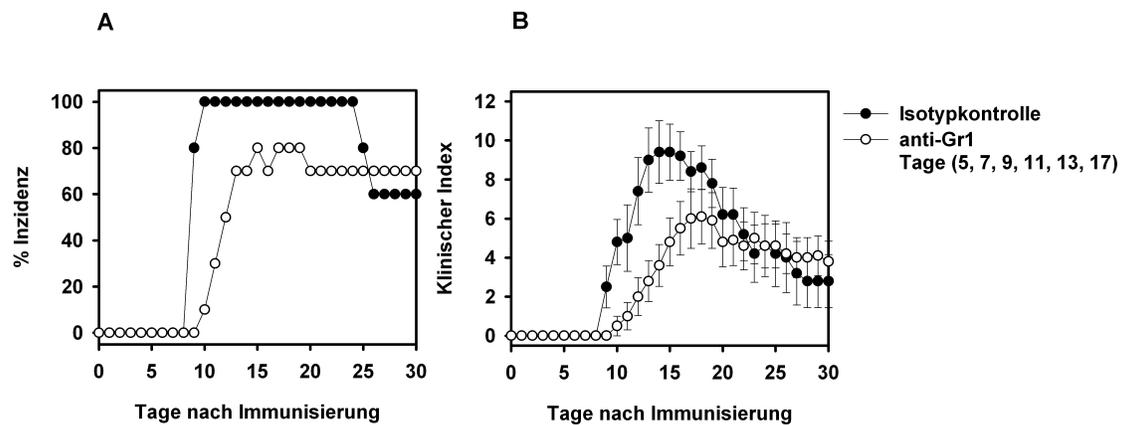


Abbildung 46: Neutrophilendepletion in der Induktionsphase der G6PI-induzierten Arthritis: Die Inzidenz (A) und der klinische Schweregrad der Arthritis (B) wurde über 30 Tage verfolgt. Jeweils 10 DBA/1 Mäuse pro Gruppe wurden mit 400 μ g G6PI/CFA immunisiert. Die Depletion der Neutrophilen erfolgte durch Applikation von 160 μ g RB6 8C5 i.p. an den Tagen 5, 7, 9, 11, 13 und 17. Als Isotypkontrolle wurde ein rIgG (13C4) appliziert. Dargestellt ist der Mittelwert des klinischen Index der erkrankten Tiere \pm SEM. Das Experiment wurde zweimal durchgeführt.

Dazu wurden DBA/1 Mäuse mit G6PI/CFA immunisiert. Die Depletion der neutrophilen Granulozyten erfolgte mithilfe eines anti-Gr1-Antikörpers. Gr1, auch Ly-6G genannt, ist ein 25 kDa Protein, das mit Glykosylphosphatidylinositol verbunden ist. Es ist ein myeloider Differenzierungsmarker, dessen Expression direkt mit der Reifung und Differenzierung von Granulozyten korreliert. Zur Depletion der neutrophilen Granulozyten in der Induktionsphase wurde der anti-Gr1-Antikörper (RB6 8C5) intraperitoneal an den Tagen 5, 7, 9, 11, 13 und 17 appliziert. Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten zu den gleichen Zeitpunkten ein Ratten-IgG als Isotypkontrolle. Die Abwesenheit der neutrophilen Granulozyten wurde durch einen Blutausstrich verifiziert. Die Tiere, in denen die Neutrophilen depletiert worden waren, zeigten erst an Tag 10 die ersten klinischen Zeichen einer Arthritis, während diese in den Kontrolltieren bereits an Tag 9 zu beobachten waren. Im Vergleich zur Kontrollgruppe war auch die Inzidenz an den Tagen 13 bis 24 reduziert: während in der Kontrollgruppe die Inzidenz bei 100 % lag, wiesen die behandelten Tiere lediglich eine Inzidenz von 70 % auf. Auch der klinische Schweregrad war in den Tieren, bei denen die Neutrophilen depletiert worden waren deutlich geringer: an Tag 15 lag der klinische Index in der Kontrollgruppe bei $9,4 \pm 1,4$, während die behandelten Tiere lediglich einen klinischen Index von $4,8 \pm 1,2$ aufwiesen.

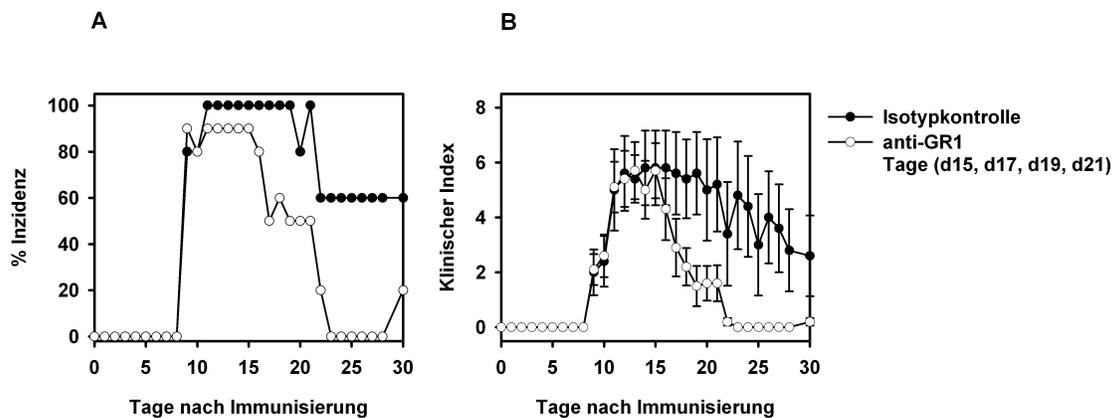


Abbildung 47: Depletion der Neutrophilen in der Effektorphase der G6PI-induzierten Arthritis: Die Inzidenz (A) und der klinische Schweregrad der Arthritis (B) wurde über 30 Tage verfolgt. Jeweils 5 DBA/1 Mäuse pro Gruppe wurden mit 400 µg G6PI/CFA immunisiert. Die Depletion der Neutrophilen erfolgte durch Applikation von 160 µg RB6 8C5 i.p. an den Tagen 15, 17, 19 und 21. Als Isotypkontrolle wurde ein rIgG (13C4) appliziert. Dargestellt ist der Mittelwert des klinischen Index der arthritischen Mäuse \pm SEM eines Experimentes von zweien.

Zur Depletion der neutrophilen Granulozyten in der Effektorphase wurde der anti-Gr1-Antikörper intraperitoneal an den Tagen 15, 17, 19 und 21 appliziert. Wiederum wurde die Kontrollgruppe zu den gleichen Zeitpunkten mit einem Ratten-IgG als Isotypkontrolle behandelt.

Bei den Tieren, bei denen ab Tag 15 die Neutrophilen depletiert wurden, war bereits vor Beginn die Inzidenz auf 90 % reduziert; mit Beginn der Behandlung verringerte sich die Inzidenz aber nochmals deutlich auf 50 %. Die Depletion der Neutrophilen ab Tag 15 führte zu einer rascheren Auflösung der klinischen Zeichen der Arthritis: während bei den behandelten Tieren bereits an Tag 23 keine klinischen Zeichen einer Arthritis zu beobachten waren, betrug der mittlere klinische Index in der Kontrollgruppe auch Tag 30 noch $2,6 \pm 1,4$.

3.4.2. Klinischer Effekt der Blockade des Fc γ RIV

Schubert *et al.* konnte zeigen, dass DBA/1-Mäuse, die keine Fc γ -Kette exprimieren und somit keine aktivierenden Fc γ -Rezeptoren besitzen, einen wesentlich milderen klinischen Verlauf der G6PI-induzierten Arthritis sowie eine geringere Inzidenz als die Kontrollmäuse aufweisen. Nimmerjahn *et al.* beschrieben 2005 einen weiteren aktivierenden Fc γ -Rezeptor, der Fc γ RIV. Der Fc γ RIV wird auf Neutrophilen, Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert, aber nicht auf T- oder B-Zellen. Der Fc γ RIV bindet IgG2a und IgG2b, nicht aber IgG1 oder IgG3, mit mittlerer Affinität (K_a : 2-3 $\times 10^7$ M $^{-1}$).

Es sollte untersucht werden, ob eine Blockade des Fc γ RIV durch einen Antikörper klinische Effekte in der G6PI-induzierten Arthritis hat.

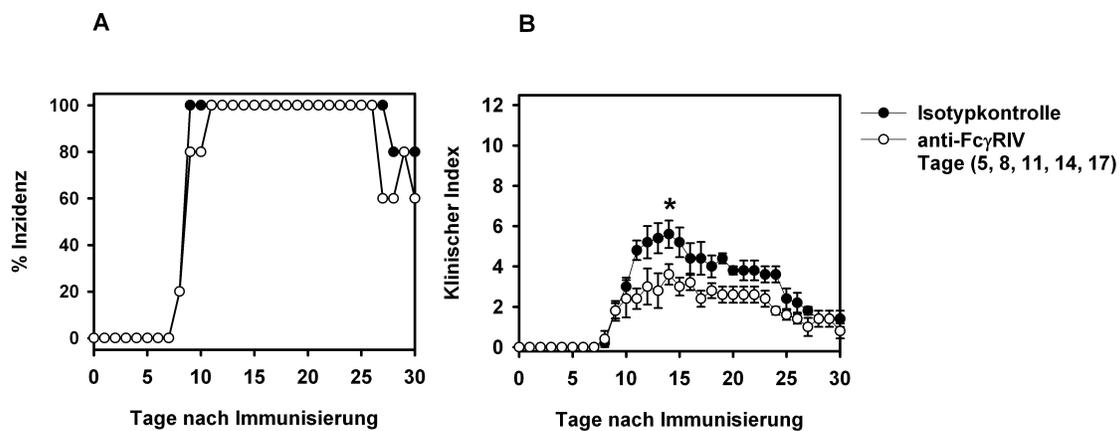


Abbildung 48: Klinische Effekte der *in vivo* Blockade des Fc γ RIV in der G6PI-induzierten Arthritis: Die Inzidenz (A) und der klinische Schweregrad der Arthritis (B) wurde über 30 Tage verfolgt. Jeweils 5 DBA/1 Mäuse pro Gruppe wurden mit 200 μ g G6PI/CFA immunisiert. Die Blockade des Fc γ RIV erfolgte durch Applikation von 500 μ g anti-Fc γ RIV (9E9) i.p. an den Tagen 5, 7, 11, 14 und 17. Hier ist beispielhaft ein Experiment von dreien gezeigt. Dargestellt ist der Mittelwert des klinischen Index der erkrankten Mäuse \pm SEM.

Die Blockade des Fc γ RIV führte zu einem milderen Verlauf der G6PI-induzierten Arthritis im Vergleich zur Kontrollgruppe (Tag 14: Kontrolle: $5,6 \pm 0,6$, Fc γ RIV: $3,6 \pm 0,5$, *Man-Whitney-U-Test*: $p < 0,05$). Der klinische Index der Kontrollgruppe war in diesem Experiment nicht so ausgeprägt, da die Tiere nur mit 200 μ g G6PI immunisiert wurden. Die Inzidenz wurde durch die Blockade des Fc γ RIV nicht beeinflusst.

3.4.3. Klinische Effekte der B-Zell-Depletion in der G6PI-induzierten Arthritis

Um die pathogenetische Relevanz von B-Zellen in der G6PI-induzierten Arthritis näher zu untersuchen, wurden B-Zellen mithilfe eines Antikörpers, der gegen CD22 gerichtet ist und an N-Acetyl- γ -Calicheamicin Dimethylsäure gekoppelt ist (anti-CD22-Cal), depletiert (s. Material- und Methodenteil). Der verwendete anti-CD22-Antikörperklon, Cy34.1, erkennt das Alloantigen Lyb-8.2, welches nur von SJL nicht aber von DBA/1-Mäusen exprimiert wird. Deswegen wurden alle nachfolgenden Experimente in SJL-Mäusen durchgeführt. Nach der Depletion der B-Zellen mithilfe

von anti-CD22-Cal beginnt die Repopulation ab Tag 25 bis Tag 30 (Dunussi-Joannopoulos et al., 2005).

Um die klinischen Effekte einer B-Zelldepletion in der G6PI-induzierten Arthritis zu untersuchen, wurden B-Zellen mithilfe von CD22-Cal vor Induktion der Arthritis (Tage -6, -1) und in der Induktionsphase (Tage 3, 8) depletiert und die Inzidenz und der klinische Index über einen Zeitraum von 30 Tagen beobachtet.

Die Behandlung mit CD22-Cal führte zu einer effektiven Depletion der B-Zellen, was durch FACS-Analyse des Blutes (Abbildung 49), Milz (Abbildung 50) und Lymphknoten verifiziert wurde (Tabelle 9).

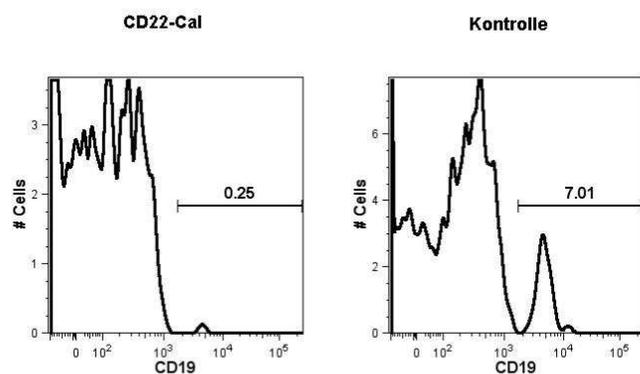


Abbildung 49: FACS-Färbung peripherer mononukleärer Blutzellen nach B-Zell-Depletion mit CD22-Cal an Tag 9

Tabelle 9: Frequenzen der B220⁺CD19⁺ B-Zellen in den Kontrollmäusen und an Tag -6 und -1 mit anti-CD22-Cal-behandelten Mäusen an Tag 9 nach Arthritisinduktion. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM von Mäusen eines beispielhaften Experimentes.

	Kontrolle	anti-CD22-Cal
Blut	9,2 \pm 1,3	1,6 \pm 0,8
Milz	23,2 \pm 1,5	11,6 \pm 4,9
Lymphknoten	15,1 \pm 4,3	4,0 \pm 1,9

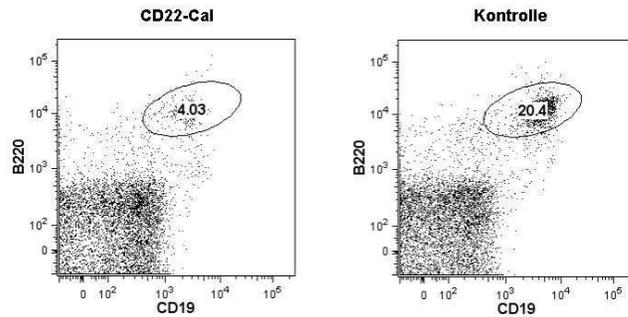


Abbildung 50: Kontrolle der Effizienz der B-Zell-Depletion: SJL Mäuse wurden an den Tagen -6 und -1 vor Arthritisinduktion mit CD22-Cal behandelt und an Tag 0 mit 400 µg G6PI/CFA immunisiert. Exemplarisch ist die FACS-Färbung mit B220 und CD19 an Tag 9 in der Milz gezeigt.

Die Depletion der B-Zellen vor der Induktion der Arthritis führt zu einer erniedrigten Inzidenz: an Tag 15 wiesen nur 30 % der B-Zell-depletierten Tiere klinische Zeichen einer Arthritis auf, während in der Kontrollgruppe 100 % der Tiere erkrankten. Bis zur beginnenden Repopulation durch B-Zellen (ab Tag 20) waren keine klinischen Zeichen einer Arthritis zu beobachten (Abbildung 54); der Unterschied im klinischen Schweregrad zwischen den beiden Gruppen war statistisch signifikant (*Man-Whitney-U-Test*: $p < 0,05$).

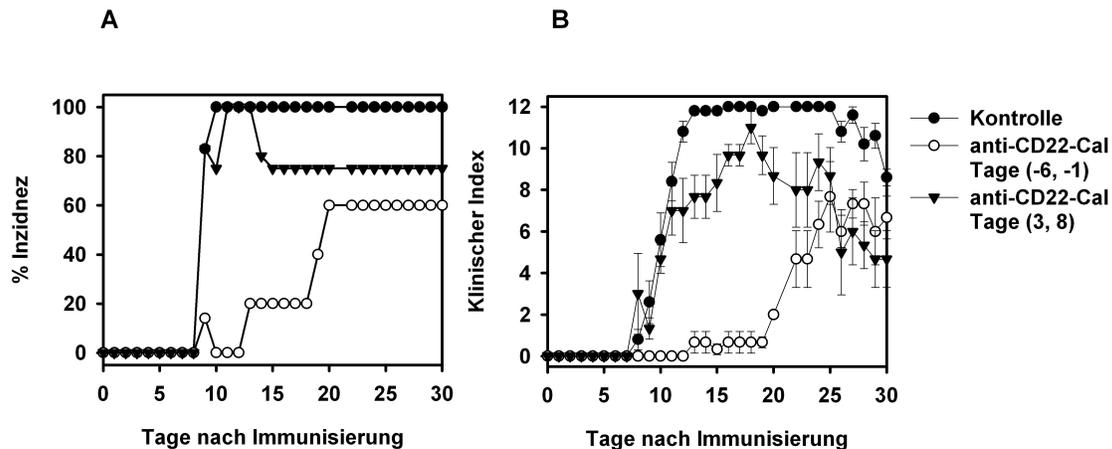


Abbildung 51: B-Zelldepletion mit CD22-Cal vor Induktion der Arthritis (Tage (-6, -1)) und in der Induktionsphase (Tage (3, 8)): 5 SJL-Mäuse wurden mit G6PI/CFA immunisiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde CD22-Cal i.p. appliziert (zur Dosis s. Material- und Methodenteil). Den Kontrolltieren wurde zum gleichen Zeitpunkt PBS appliziert. Die Inzidenz (A) und der klinische Schweregrad (B, nur erkrankte Tiere) wurden über einen Zeitraum von 30 Tagen beobachtet. Dargestellt ist der Mittelwert des klinischen Index \pm SEM eines Experimentes von dreien.

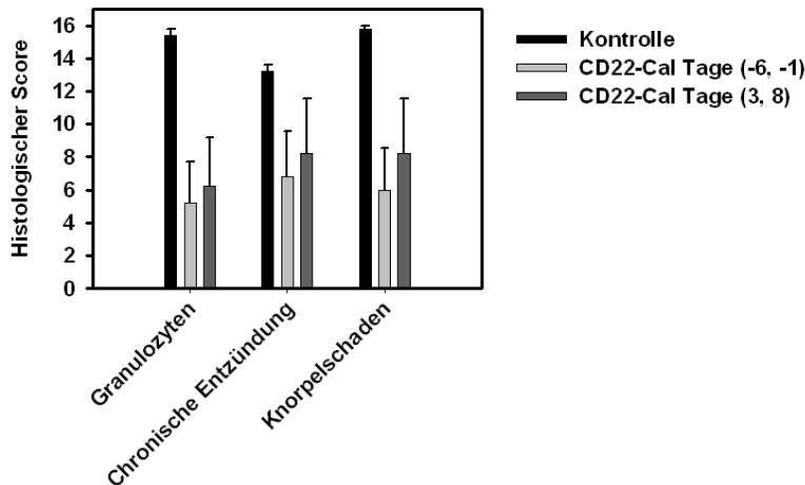


Abbildung 52: Histologischer Score nach B-Zelldepletion mit CD22-Cal vor Induktion der Arthritis (Tage (-6, -1)) und in der Induktionsphase (Tage (3, 8)): 5 SJL-Mäuse wurden mit G6PI/CFA immunisiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde CD22-Cal i.p. appliziert (zur Dosis s. Material- und Methodenteil). Den Kontrolltieren wurde zum gleichen Zeitpunkt PBS appliziert. Am Tag 30 wurden die Beine histologisch bewertet: es wurde die floride Entzündung (Granulozyten), die chronische Entzündung anhand von Makrophagen, Lymphozyten, Fibroblasten und Pannusbildung sowie die Knorpeldestruktion auf einer Skala von 0 (keine) bis 4 (maximal) bewertet. Dabei wurde jede Pfote einzeln bewertet und die Ergebnisse addiert. Die Ergebnisse der einzelnen Mäuse wurden gemittelt. Dargestellt ist der Mittelwert des histologischen Scores \pm SEM.

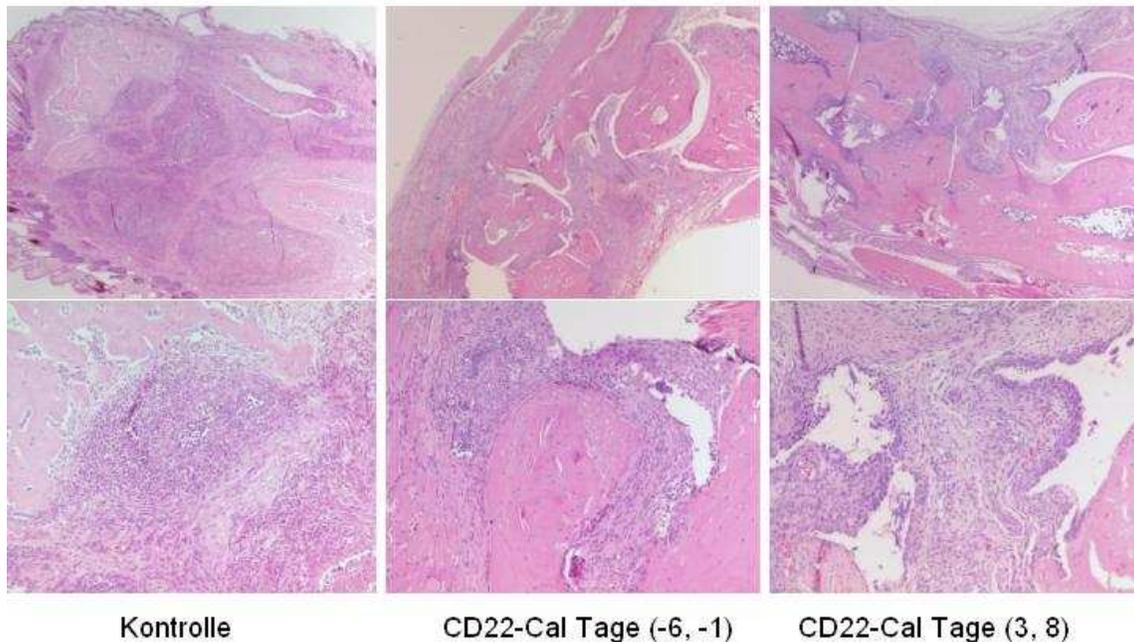


Abbildung 53: Histopathologie nach B-Zell-Depletion vor der Arthritisinduktion (Tage (-6, -1)) und in der Induktionsphase (Tage (3, 8)) der G6PI-induzierten Arthritis: 5 SJL-Mäuse wurden mit G6PI/CFA immunisiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde CD22-Cal i.p. appliziert (zur Dosis s. Material- und Methodenteil). Den Kontrolltieren wurde zum gleichen Zeitpunkt PBS appliziert. Am Tag 30 wurden die Beine histologisch analysiert. (H&E, obere Reihe 25x, untere Reihe: 100x). Die Präparate und die histopathologische Begutachtung wurden von Dr. Lars Morawietz erstellt.

Bei Tieren, bei denen die B-Zellen an Tag 3 und 8 depletiert worden waren, lag die Inzidenz ab Tag 9 bis Tag 30 zwischen 80 und 100 %. Der klinische Schweregrad war im Vergleich zur Kontrollgruppe geringer (Tag 15: Kontrolle $11,8 \pm 0,2$; CD22-Cal Tage (3, 8) $6,2 \pm 2,4$, *Man-Whitney-U-Test*: $p < 0,05$).

Auch histopathologisch sind deutliche Unterschiede zwischen den Gruppen zu beobachten.

Während in der Kontrollgruppe zumeist alle vier Extremitäten maximale Scores von Granulozyteninfiltration (akute Entzündung), chronischer Entzündung und Knorpeldestruktion zeigten, waren in den Gruppen, in denen B-Zellen depletiert worden waren, häufig einzelne Extremitäten gar nicht bzw. deutlich geringer betroffen. Auch die niedrigere Inzidenz der behandelten Tiere spiegelte sich in den histologischen Scores wider, einzelne Tiere zeigten keine Anzeichen einer Entzündung. Im Vergleich zur Kontrollgruppe war in beiden B-Zell-depletierten Gruppen vor allen Dingen die Infiltration durch neutrophile Granulozyten reduziert (*Man-Whitney-U-Test*: $p < 0,05$, s. Abbildung 52; Abbildung 53). Auch die Destruktion des Knorpels war in den mit anti-CD22-Cal-behandelten Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe statistisch signifikant reduziert (*Man-Whitney-U-Test*: $p < 0,05$, s. Abbildung 52; Abbildung 53). Die chronischen Zeichen einer Arthritis waren vor allem bei B-Zell-Depletion vor Induktion der Arthritis signifikant geringer (s. Abbildung 52; Abbildung 53).

Zusätzlich sollten die klinischen Effekte der B-Zell-Depletion mit anti-CD22-Cal in der Effektorphase untersucht werden. Dazu wurden SJL-Mäuse mit G6PI/CFA immunisiert und an den Tagen 15 und 20 nach Arthritisinduktion i.p. anti-CD22-Cal appliziert. Die Inzidenz und der klinische Schweregrad wurden über einen Zeitraum von 30 Tagen beobachtet.

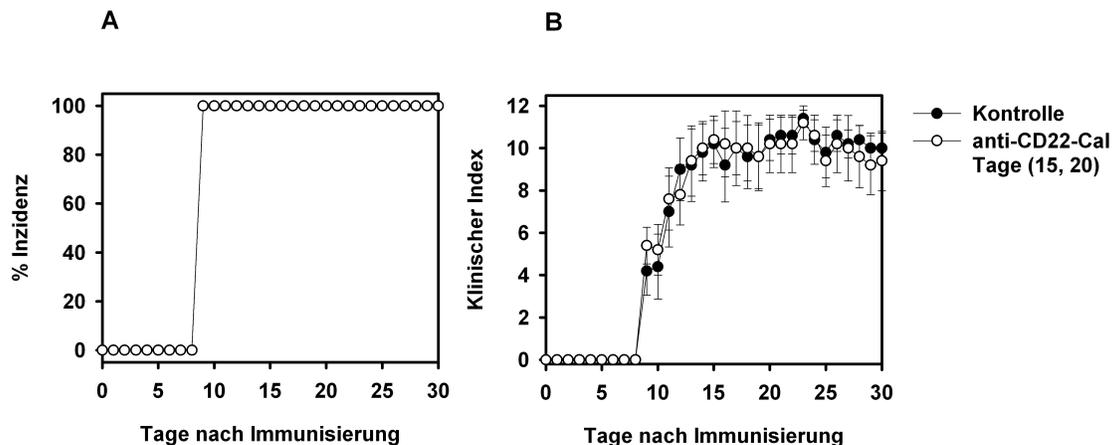


Abbildung 54: Depletion der B-Zellen in der Effektorphase der G6PI-induzierten Arthritis: 5 SJL-Mäuse wurden mit G6PI/CFA immunisiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde CD22-Cal i.p. appliziert (zur Dosis s. Material- und Methodenteil). Die Inzidenz (A) und der klinische Schweregrad wurden über einen Zeitraum von 30 Tagen beobachtet. Dargestellt ist der Mittelwert des klinischen Index der erkrankten Tiere \pm SEM. Das Experiment wurde zweimal durchgeführt.

Die Depletion der B-Zellen in der Effektorphase hatte keinerlei Auswirkungen auf die Inzidenz oder den klinischen Schweregrad. 100 % der Kontrolltiere und der behandelten Tiere entwickelten eine Arthritis, die an Tag 20 einen mittleren klinischen Index von $10,4 \pm 1$ (Kontrolle) bzw. $10,2 \pm 1,3$ (anti-CD22-Cal) aufwies.

3.4.4. G6PI-spezifische Antikörper nach Depletion der B-Zellen vor Induktion der Arthritis und in der Induktionsphase

Da Antikörper von B-Zellen gebildet werden und Antikörper-Antigen-Komplexe durch die Vernetzung von Fc γ -Rezeptoren an der Pathogenese der G6PI-induzierten Arthritis beteiligt sind, sollte die Bildung G6PI-spezifischer Antikörper nach der Depletion von B-Zellen mit anti-CD22-Cal untersucht werden.

Zu diesem Zweck wurden SJL-Mäuse mit G6PI/CFA immunisiert und an den Tagen 6 und 1 vor Arthritisinduktion bzw. an den Tagen 3 und 8 nach Arthritisinduktion mit anti-CD22-Cal behandelt. Zu den verschiedenen Zeitpunkten wurden Seren gewonnen und im ELISA auf G6PI-spezifische Antikörper untersucht.

Im Vergleich zur Kontrollgruppe waren die Titer der G6PI-spezifischen Antikörper an Tag 9 (Abbildung 55) in der Gruppe der frühen B-Zell-Depletion (Tage -6, -1) deutlich erniedrigt (IgG1: Kontrolle: $1:19200 \pm 6400$ anti-CD22-Cal Tage (-6, -1): $1:700 \pm 0$; IgG2a: Kontrolle: $1:51200 \pm 25600$ anti-CD22-Cal Tage (-6, -1): $1:1200 \pm 400$; IgG2b: Kontrolle: $1:25600 \pm 0$ anti-CD22-Cal Tage (-6, -1): $1:4800 \pm 1600$; IgG3: Kontrolle: $1:11200 \pm 7332$ anti-CD22-Cal Tage (-6, -1): $1:800 \pm 400$).

Wurden die B-Zellen in der Induktionsphase an den Tagen 3 und 8 depletiert waren die Titer der G6PI-spezifischen Antikörper an Tag 9 (Abbildung 55) vergleichbar oder sogar höher (IgG1: Kontrolle: $1:19200 \pm 6400$ anti-CD22-Cal Tage (3, 8): $1:409600 \pm 0$; IgG2a: Kontrolle: $1:51200 \pm 25600$ anti-CD22-Cal Tage (3, 8): $1:25600 \pm 0$; IgG2b: Kontrolle: $1:25600 \pm 0$ anti-CD22-Cal Tage (3, 8): $1:76800 \pm 25600$; IgG3: Kontrolle: $1:11200 \pm 7332$ anti-CD22-Cal Tage (3, 8): $1:51200 \pm 25600$).

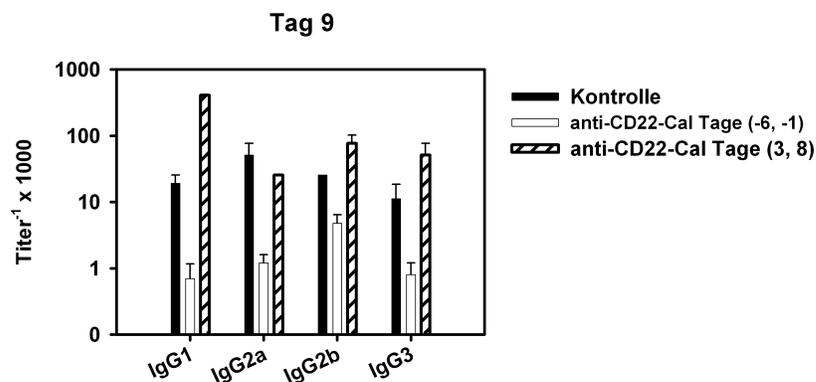


Abbildung 55: G6PI-spezifische Antikörper nach Depletion der B-Zellen vor Arthritis-Induktion und in der Induktionsphase an Tag 9: SJL-Mäuse wurden mit G6PI/CFA immunisiert. Die B-Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten mit CD22-Cal depletiert. An Tag 9 wurden von jeweils 3 Mäusen Seren gewonnen. Die Seren wurden seriell verdünnt und im ELISA auf die Anwesenheit isotypspezifischer anti-G6PI-Antikörper getestet. Dargestellt sind die Mittelwerte der Antikörpertiter der verschiedenen Isotypen \pm SEM eines repräsentativen Experimentes von dreien.

Wurden die Titer der G6PI-spezifischen Antikörper an Tag 24 (Abbildung 56) untersucht, hatten sich Titer in der Gruppe der frühen B-Zelldepletion der Kontrollgruppe angenähert (IgG1: Kontrolle: 1:409600 \pm 0 anti-CD22-Cal Tage (-6, -1): 1: 256000 \pm 153600; IgG2a: Kontrolle: 1:102400 \pm 0 anti-CD22-Cal Tage (-6, -1): 1: 16000 \pm 9600; IgG2b: Kontrolle: 1:409600 \pm 0 anti-CD22-Cal Tage (-6, -1): 1: 217600 \pm 192000; IgG3: Kontrolle: 1:102400 \pm 0 anti-CD22-Cal Tage (-6, -1): 1:16000 \pm 9600).

Die Titer der G6PI-spezifischen Antikörper in der Gruppe der B-Zelldepletion in der Induktionsphase (Abbildung 56) waren mit denen der Kontrollgruppe vergleichbar (IgG1: Kontrolle: 1:409600 \pm 0 anti-CD22-Cal Tage (3, 8): 1: 409600 \pm 0; IgG2a: Kontrolle: 1:102400 \pm 0 anti-CD22-Cal Tage (3, 8): 1: 64000 \pm 38400; IgG2b: Kontrolle: 1:409600 \pm 0 anti-CD22-Cal Tage (3, 8): 1: 256000 \pm 1153600; IgG3: Kontrolle: 1:102400 \pm 0 anti-CD22-Cal Tage (3, 8): 1:25600 \pm 0).

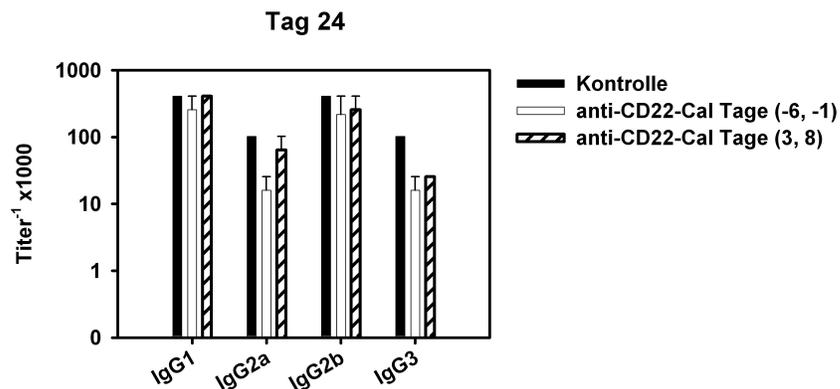


Abbildung 56: G6PI-spezifische Antikörper an Tag 24 nach B-Zell-Depletion: SJL-Mäuse wurden mit G6PI/CFA immunisiert. Die B-Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten mit CD22-Cal depletiert. An Tag 24 wurden von jeweils 3 Mäusen Seren gewonnen. Nach der seriellen Verdünnung der Seren wurde im ELISA auf die Anwesenheit isotypspezifischer anti-G6PI-Antikörper getestet. Dargestellt sind die Mittelwerte der Antikörpertiter der verschiedenen Isotypen \pm SEM eines repräsentativen Experimentes von dreien.

3.4.5. Rolle der B-Zellen als APC: Zytokinproduktion und Proliferation nach Depletion der B-Zellen in der G6PI-induzierten Arthritis

Da B-Zellen effektive Antigenpräsentierende Zellen (APC) darstellen können, sollte untersucht werden, ob das Fehlen der B-Zellen als APC einen Einfluss auf das Priming der T-Zellen hat. Dazu sollte untersucht werden inwieweit die Zytokinproduktion durch die Depletion der B-Zellen mit anti-CD22-Cal beeinflusst wird.

Dazu wurden SJL-Mäuse mit G6PI/CFA immunisiert und die B-Lymphozyten durch Applikation von anti-CD22-Cal vor der Arthritisinduktion an den Tagen -6 und -1 sowie in der Induktionsphase an den Tagen 3 und 8 depletiert. An Tag 9 wurden die Milzen und die inguinalen Lymphknoten entnommen. Die Einzelzellsuspensionen dieser Organe wurden für 48 h mit G6PI restimuliert. Die Überstände wurden im ELISA auf die Zytokine IL-17, IL-22, IFN- γ , IL-6 und IL-4 analysiert.

In der Milz war insgesamt eine höhere Zytokinproduktion im Vergleich zu den Lymphknoten zu beobachten. Auffällig war, dass in beiden B-Zell-depletierten Gruppen die Zytokinproduktion im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht war.

Im Lymphknoten war die Zytokinproduktion von IL-17, IL-22 und IFN- γ in der Gruppe der B-Zell-Depletion von Arthritisinduktion im Vergleich zur Kontrollgruppe statistisch signifikant erhöht ($p < 0,05$, *Man-Whitney-U-Test*). Auch IL-6 war im Vergleich zur Kontrollgruppe leicht erhöht (Abbildung 57). In der Gruppe der B-Zell-Depletion in der Induktionsphase konnten im Lymphknoten im Vergleich zur Kontrollgruppe höhere Werte für IL-17, IL-22, IL-6 und IFN- γ gemessen werden, allerdings waren die Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht statistisch signifikant (Abbildung 57).

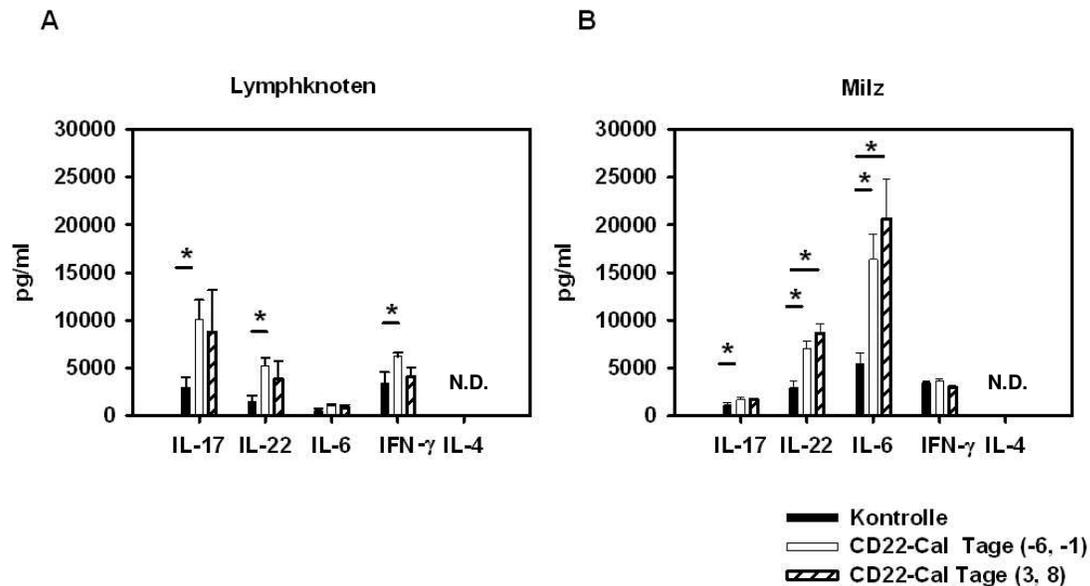


Abbildung 57: Zytokinproduktion in der G6PI-induzierten Arthritis nach Depletion der B-Zellen vor Arthritisinduktion und in der Induktionsphase der G6PI-induzierten Arthritis: SJL-Mäuse wurden mit anti-CD22-Cal an den Tagen -6 und -1 i.p. behandelt und mit 400 μg G6PI/CFA immunisiert. An Tag 9 wurden die inguinalen Lymphknoten (A) und die Milz (B) entnommen und eine Einzelzellsuspension hergestellt. Die Zellen wurden mit 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ G6PI restimuliert. Nach 48h wurden die Überstände genommen und im ELISA analysiert. Gezeigt sind die Mittelwerte ($n = 5$) \pm SEM eines Experimentes von zweien.

In der Milz wurden für die Gruppe der B-Zelldepletion an den Tagen -6 und -1 vor Arthritisinduktion statistisch signifikante höhere Werte für IL-17, IL-22 und IL-6 gemessen werden ($p < 0,05$, *Man-Whitney-U-Test*). In der Gruppe der B-Zelldepletion an den Tagen 3 und 8 waren im Vergleich zur Kontrollgruppe die Werte für IL-22 und IL-6 statistisch signifikant ($p < 0,05$, *Man-Whitney-U-Test*) erhöht (Abbildung 57).

Diese doch etwas überraschenden Ergebnisse können vermutlich dadurch erklärt werden, dass zwar gleiche Zellzahlen für die Restimulation im ELISA verwendet wurden, aber bei den B-Zell-depletierten Tieren der Anteil an T-Zellen aufgrund des Fehlens der B-Zellen höher ist und somit auch mehr T-Zell-Zytokine detektiert werden können.

Deswegen wurde als nächstes die Antigen-spezifische Zytokinproduktion der CD4⁺CD154⁺ T-Zellen analysiert. SJL-Mäuse wurden mit G6PI/CFA immunisiert und B-Zellen mit anti-CD22-Cal entweder an den Tagen -6, -1 oder an den Tagen 3, 8 depletiert. An Tag 9 wurden die Milz und die inguinalen

Lymphknoten entnommen. Die Zellen der Milz und der Lymphknoten wurden mit G6PI restimuliert und gegen CD4, CD154, IL-17, RANKL, IFN- γ und TNF- α gefärbt.

Es konnte gezeigt werden, dass in B-Zell-depletierten Mäusen die Frequenz der Gesamtzellzahl der CD4⁺CD154⁺TNF- α ⁺-T-Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant reduziert ist ($p < 0,05$ nach *Man-Whitney-U-Test*, Abbildung 58; Abbildung 59). Die Frequenzen der CD4⁺CD154⁺-T-Zellen, die IL-17, RANKL und IFN- γ produzieren, waren in den B-Zell-depletierten Mäusen und den Kontrolltieren vergleichbar (Abbildung 58).

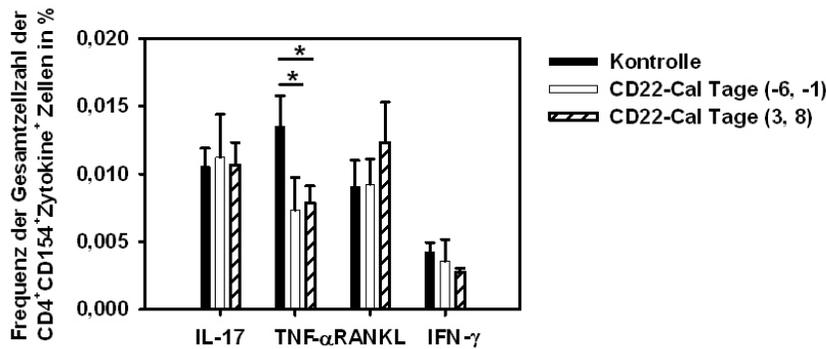


Abbildung 58: Zytokinproduktion von CD4⁺CD154⁺ T-Zellen in der G6PI-induzierten Arthritis nach Depletion der B-Zellen vor Arthritisinduktion und in der Induktionsphase: SJL-Mäuse wurden mit anti-CD22-Cal an den Tagen -6 und -1 bzw. an den Tagen 3 und 8 i.p. behandelt und mit 400 μ g G6PI/CFA immunisiert. An Tag 9 wurden die inguinalen Lymphknoten und die Milz entnommen und 6 h mit 20 μ g/ml G6PI restimuliert. Exemplarisch sind die Resultate aus der Milz dargestellt. Die Zellen wurden gegen CD4, CD154, IL-17, TNF- α , IFN- γ und RANKL gefärbt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Gesamtzellzahl CD4⁺CD154⁺Zytokin⁺ nach *progressiv gating* ($n = 5$) \pm SEM eines Experimentes von zweien.

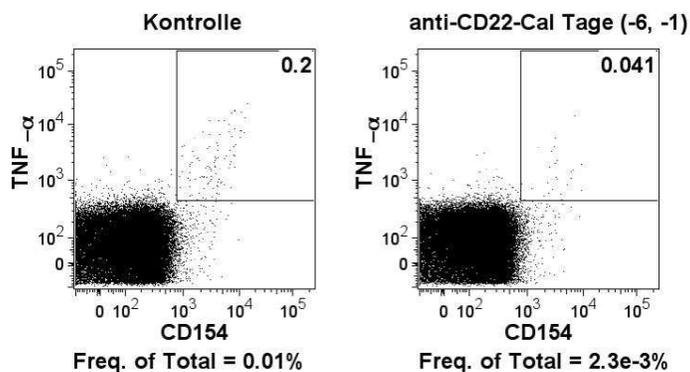


Abbildung 59: Verminderte TNF- α -Sekretion durch CD4⁺CD154⁺-T-Zellen in B-Zell-depletierten Mäusen: SJL-Mäuse wurden mit anti-CD22-Cal an den Tagen -6 und -1 i.p. behandelt und mit 400 μ g G6PI/CFA immunisiert. An Tag 9 wurden die inguinalen Lymphknoten und die Milz entnommen und 6 h mit 20 μ g/ml G6PI restimuliert. Beispielhaft ist eine FACS-Färbung der CD4⁺-T-Zellen der Milz dargestellt.

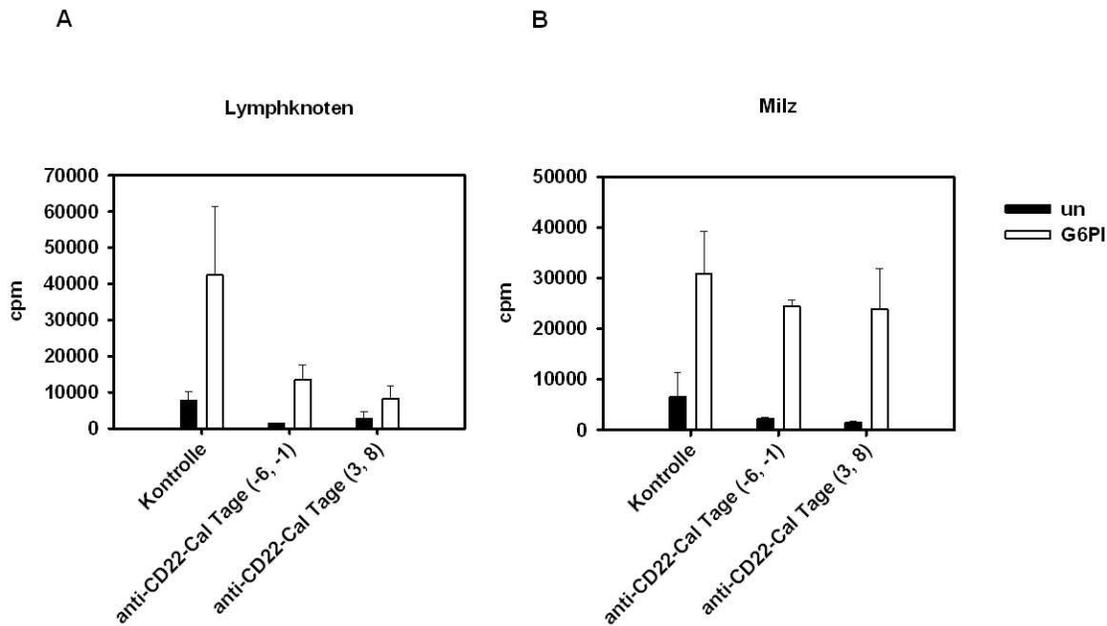


Abbildung 60: *In vitro* Proliferation nach Depletion der B-Zellen vor Arthritisinduktion und in der Induktionsphase der G6PI-induzierten Arthritis: SJL-Mäuse wurden mit anti-CD22-Cal an den Tagen -6 und -1 bzw. an den Tagen 3 und 8 i.p. behandelt und mit 400 µg G6PI/CFA immunisiert. An Tag 12 wurden die inguinalen Lymphknoten und die Milz entnommen, und ein Proliferationsassay wie im Material- und Methodenteil beschrieben durchgeführt. Es sind die Mittelwerte der cpm ($n = 3$) \pm SEM dargestellt eines repräsentativen Experimentes von zweien dargestellt.

Um einen weiteren Hinweis auf die Relevanz von B-Zellen als APC in der G6PI-induzierten Arthritis zu erhalten, wurde die *in vitro* Proliferation durch [3 H]-Thymidineinbau nach B-Zelldepletion mit anti-CD22-Cal 9 Tage nach Arthritisinduktion untersucht (Abbildung 60). Sowohl in der Milz als auch im Lymphknoten ist ein stärkerer Einbau von [3 H]-Thymidin nach Restimulation mit G6PI in der Kontrollgruppe im Vergleich zu den Gruppen, in denen die B-Zellen mit anti-CD22-Cal depletiert worden waren, zu verzeichnen. Allerdings ist auch in den Medium-stimulierten Proben (un) in der Kontrollgruppe der [3 H]-Thymidineinbau stärker als in den B-Zell-depletierten Gruppen.

Betrachtet man die Antigen-spezifische Zytokin-Produktion und die *in vitro* Proliferation der Tiere, deren B-Zellen an Tag 3 und 8 depletiert worden sind, fällt auf, dass die Ergebnisse nicht mit dem klinischen Schweregrad korrelieren. Es hat den Anschein, dass die Ergebnisse lediglich mit der An- bzw. Abwesenheit der B-Zellen korrelieren.

4. Diskussion

4.1. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Relevanz von Th17-Zellen in der Pathogenese der Glukose-6-phosphat-Isomerase induzierten Arthritis untersucht. Es wurde untersucht inwieweit eine Modulation der Erkrankung möglich ist, wenn einzelne Th17-Zytokine z.B. durch Antikörper blockiert werden. Die Blockade von IL-17, IL-23p19 und TNF- α führte zu benefiziellen Effekten in der Arthritis. RANKL konnte als ein weiteres prominentes Zytokin in der G6PI-induzierten Arthritis beschrieben werden. Ein besonderes Interesse galt auch der Relevanz polyfunktionaler Th-Zellen, also Antigen-spezifischer Th-Zellen, die mehrere Zytokine gleichzeitig produzieren, in der Pathogenese der Arthritis. So konnten Antigen-spezifische *Double-Producer* in der G6PI-induzierten Arthritis identifiziert werden, die Zytokine gleichzeitig produzierten, die für unterschiedliche T-Zelllinien, wie Th17 (IL-17) oder Th1 (IFN- γ), charakteristisch sind. Dies liefert Hinweise darauf, dass das T-Zellen *in vivo* wesentlich modularer sind als *in vitro* beschrieben.

Diese Arbeit beschreibt die Identifizierung von zwei immundominanten Peptiden (G6PI₈₅₋₉₉ und G6PI₄₆₉₋₄₈₃), abgeleitet von der Glukose-6-phosphat Isomerase, im Kontext von I-A^q restringierten Th-Zellantworten. Die Immunisierung von DBA/1 Mäusen mit dem einen oder dem anderen Peptid führt zur Entwicklung einer Arthritis. Somit ist die G6PI-induzierte Arthritis nach dem bisherigen Kenntnisstand das einzige Mausmodell, in dem eine Arthritis durch die Immunisierung mit einem autologen Peptid („*self-peptide*“) hervorgerufen werden kann, das von einem Autoantigen abgeleitet wurde. Die Identifizierung immunodominanter arthritogener Peptide ermöglicht in der Zukunft die detaillierte Analyse pathogener G6PI-spezifischer T-Zellen unabhängig von ihrem Aktivierungsstatus durch Tetramere. Außerdem unterstreicht sie erneut die pathogenetische Relevanz der Th-Zellen in der G6PI-induzierten Arthritis. Zusätzlich eröffnet sie neue therapeutische Ansätze im Hinblick auf Antigen-spezifische Therapien zur Toleranzinduktion.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden SJL-Mäuse als weiterer suszeptibler Mausstamm für die G6PI-induzierte Arthritis identifiziert und näher charakterisiert.

Zusätzlich beschäftigt sich diese Arbeit mit den B-Lymphozyten und der Art und Weise wie sie zu der Entstehung der Arthritis beitragen. Eine Depletion der B-Zellen vor Induktion der Arthritis und in der Induktionsphase führt zu einer Verbesserung der klinischen Symptome der Arthritis. In B-Zell-depletierten Tieren ist die Frequenz der CD4⁺CD154⁺TNF- α ⁺ produzierenden Th-Zellen dramatisch reduziert. Dieser Umstand ist interessant, da bereits hinreichend gezeigt werden konnte, dass TNF- α in der Pathogenese von Arthritiden unabdingbar ist. Dieser Befund liefert einen Hinweis auf die pathogenetische Relevanz von B-Zellen als Antigen-präsentierende Zellen in der Arthritis und rückt diese erneut als interessantes therapeutisches *Target* in den Mittelpunkt des Interesses.

4.2 Pathogenetische Relevanz polyfunktioneller Th-Zellen in der G6PI-induzierten Arthritis

Schubert *et al.* haben bereits demonstriert, dass CD4⁺ T-Zellen der G6PI-induzierten Arthritis pathogenetisch relevant sind: eine Depletion von CD4⁺ T-Zellen mittels CD4-spezifischer Antikörper in der Induktionsphase der Arthritis verhinderte selbige, während eine Depletion von CD4⁺ T-Zellen in der Effektorphase zu einer schnelleren Remission der Erkrankung führte (Schubert *et al.*, 2004).

Weiterhin konnten Schubert und Kollegen an den Tagen 9 und 12 in den drainierenden Lymphknoten von DBA/1-Mäusen *in vitro* durch [³H]-Thymidineinbau nach Restimulation mit G6PI eine Proliferation messen, während in nicht-suszeptiblen Mausstämmen, z.B. C57BL/6, eine deutlich geringere Proliferation gemessen werden konnte.

Um die Relevanz von CD4⁺ T-Zellen in der G6PI-induzierten Arthritis weiter zu untermauern, wurde die *in vivo* Proliferation von CD4⁺ nach Immunisierung mit G6PI/CFA in suszeptiblen DBA/1- und SJL-Mäusen im Vergleich zu nicht-suszeptiblen C57BL/6-Mäusen durch BrdU-Inkorporation gemessen. In Übereinstimmung mit den *in vitro* generierten Daten konnte in den suszeptiblen DBA/1 Mäusen eine starke Proliferation von CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zu den nicht-suszeptiblen C57BL/6 Mäusen gemessen werden. Im Vergleich zwischen den beiden suszeptiblen Mausstämmen, DBA/1 und SJL, wiesen die SJL-Mäuse an Tag 9 eine deutlich geringere Proliferation der CD4⁺ T-Zellen auf. Allerdings wiesen die SJL-Mäuse im Vergleich zu DBA/1 Mäusen auch einen verzögerten klinischen Verlauf der Arthritis auf, was die Ursache für die geringere Proliferation der CD4⁺ T-Zellen an Tag 9 in SJL-Mäusen sein könnte. Interessanterweise konnte bei beiden suszeptiblen Mausstämmen auch nach Immunisierung mit PBS/CFA eine Proliferation der CD4⁺ T-Zellen beobachtet werden. Dieser Befund spricht dafür, dass die Sensibilität der Mausstämmen für Adjuvans für die Suszeptibilität und Pathogenese der G6PI-induzierten Arthritis relevant ist (Whitehouse et al., 1974).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression von CD154 für die Identifikation G6PI-spezifischer Th-Zellen genutzt. Nach der Aktivierung von Th-Zellen über den TCR wird CD154 schnell hoch reguliert. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von CD154 ein sensibler und spezifischer Marker für Antigen-spezifische Th-Zellen ist (Chattopadhyay et al., 2005; Frensch et al., 2005; Huaman et al., 2008; Mittrucker et al., 2007; Stubbe et al., 2008). Um die G6PI-spezifische Zytokin-Antwort zu untersuchen, wurde die Frequenz der Zytokin-Produzenten unter den CD4⁺CD154⁺ Th-Zellen nach *in vitro*-Stimulation mit G6PI untersucht.

Im Fokus standen dabei die von Th17-Zellen produzierten Zytokine IL-17A, TNF- α und IL-22 sowie das Zytokin GM-CSF, welches *in vivo* die Bildung von Th17-Zellen fördert (Sonderegger et al., 2008) und auch in der CIA pathogenetisch relevant ist (Cook et al., 2001). Th17-Zellen stellen einen Teil des adaptiven Immunsystems dar, dessen Hauptaufgabe ursprünglich die Abwehr von Pathogenen ist, die nicht adäquat von Th1- oder Th2-Zellen bekämpft werden. So lösen Pathogene wie das *Propionibacterium acnes*, *Citrobacter rodentium* (Maccioni et al., 2002), *Klebsiella pneumoniae* (Ye et al., 2001), *Bacteroides* spp. (Chung et al., 2003), *Borrelia* spp. (Infante-Duarte et al., 2000) und *Mycobacterium tuberculosis* (Khader et al., 2007), aber auch *Pneumocystis carinii* (Rudner et al., 2007) und *Candida albicans* (Huang et al., 2004) eine starke Th17-Antwort im Immunsystem aus. In verschiedenen Tiermodellen für Autoimmunerkrankungen konnte gezeigt werden, dass Autoantigen-spezifische Th17-Zellen relevant für Pathogenese organspezifische Autoimmunerkrankungen sind: So entwickeln IL-17A-defiziente Mäuse eine mildere Verlaufsform der EAE dem Tiermodell für Multiple Sklerose (Aujla et al., 2008; Komiyama et al., 2006; Yang et al., 2008b) sowie auch eine schwächer ausgeprägte CIA (Nakae et al., 2003), auch die Behandlung mit einem anti-IL17A-Antikörper führt zu einem geringeren klinischen Schweregrad der EAE (Hofstetter et al., 2005), IL-23p19-knockout Mäuse entwickeln keine EAE (Cantaert et al., 2006), keine CIA (Murphy et al., 2003) und eine mildere Verlaufsform einer T-zellabhängigen Colitis (Hue et al., 2006; Kullberg et al., 2006).

Schubert *et al.* haben bereits demonstriert das CD4⁺ T-Zellen in der G6PI-induzierten Arthritis IL-17 produzieren (Schubert *et al.*, 2004). Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Kinetik der Th17-Zellen im Verlauf der G6PI-induzierten Arthritis erstellt. Als Indikator hierfür wurde die Frequenz IL-17A sekretierender G6PI-spezifischer CD4⁺ CD154⁺ Th-Zellen untersucht. Zunächst konnte festgestellt werden das IL-17 ausschließlich Antigen-spezifisch also exklusiv von CD4⁺CD154⁺ Th-Zellen exprimiert wurde. Die CD4⁺CD154⁺IL-17⁺ Th-Zellen wurden ab dem Tag 6 sowohl in den inguinalen Lymphknoten als auch in der Milz detektiert. Die höchste Frequenz an CD4⁺CD154⁺IL-17⁺ Th-Zellen war an Tag 9 nach Immunisierung vorhanden, während danach die Frequenz an Th-Zellen, die IL-17 Antigen-spezifisch exprimieren, bis zum Tag 30 abnahm. Diese Experimente klären nicht den Verbleib der Th17-Zellen: Diese gemachten Beobachtungen könnten zu der Schlussfolgerung führen, dass Th17-Zellen *in vivo* nicht stabil sind. Lee *et al.* beschreiben eine enorme Plastizität der Th17-Zellen *in vivo* (Lee *et al.*, 2009): in Gegenwart von IL-12 können Th17-Zellen leicht in Th1-Zellen konvertiert werden (Lee *et al.*, 2009). Eine weitere Erklärungsmöglichkeit ist, dass die Th17-Zellen *in vivo* zwar stabil sind, aber nach dem Tag 9 aus den drainierenden Lymphknoten und der Milz in die Gelenke emigrieren, um dort ihre Effektorwirkung zu entfalten. Um diese mögliche Erklärung zu überprüfen, könnte man, die Emigration der Th-Zellen aus den sekundär lymphatischen Organen durch FTY720 unterdrücken; dann müssten die Th17-Zellen, falls sie *in vivo* stabil sind, die den Lymphknoten und der Milz akkumulieren und so auch zu späteren Zeitpunkten durchflusszytometrisch nachweisbar sein. FTY720 wirkt immunsuppressiv, in dem es den Sphingosin-1-phosphat Rezeptor-1 (S1PR1) herunterreguliert. Der Sphingosin-1-Phosphat Rezeptor ist für die Emigration von Lymphozyten aus dem Thymus und sekundär lymphatischen Organen erforderlich (Cyster, 2005).

Als nächstes sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob weitere Zytokine, wie z.B. GM-CSF, IL-22 oder RANKL in der G6PI-induzierten Arthritis exprimiert werden. Darüber hinaus war von Interesse, ob IL-6, TNF- α und IL-2 Antigen-spezifisch auf CD4⁺CD154⁺ Th-Zellen exprimiert wurden. Zusätzlich wurde die Existenz polyfunktionaler Th-Zellen in der G6PI-induzierten Arthritis untersucht. Schließlich wurde die Zytokinproduktion in der G6PI-induzierten Arthritis von DBA/1-Mäusen und der G6PI-induzierten Arthritis von SJL-Mäusen verglichen. Im Falle der Zytokine GM-CSF, IL-6 und IL-22 wird ein größerer Anteil der Zytokine nicht Antigen-spezifisch also von CD4⁺CD154⁻ T-Zellen sezerniert. Da CD154⁺ strikt T-Zell-Rezeptor abhängig ist, könnte es sich bei diesen T-Zellen, um die T-Zellen handeln, die unspezifisch durch Endotoxine (LPS) aktiviert wurden, welche bedingt durch den Aufreinigungsprozess reichlich im prokaryotisch exprimierten G6PI vorhanden sind, welches zur Restimulation der Zellen verwendet wurde.

Wie auch von Schubert *et al.* beschrieben wird TNF- α in der G6PI-induzierten Arthritis Antigen-spezifisch auf CD4⁺CD154⁺ Th-Zellen exprimiert. In Übereinstimmung mit Schubert *et al.* konnten nur sehr wenige bis keine CD4⁺CD154⁺ Th-Zellen detektiert werden, die IFN- γ , IL-4 oder IL-10 sekretieren. Im Gegensatz dazu konnte IL-6 nur im ELISA detektiert werden. IL-6 wurde nur durch CD4⁺CD154⁻ Th-Zellen in nennenswerten Frequenzen exprimiert. Eventuell handelt es sich bei diesen Zellen, um die von Schubert *et al.* beschriebenen CD4⁺IL-6⁺ Th-Zellen. Neben IL-17 wurden in der G6PI-induzierten Arthritis auch die Zytokine IL-2, IL-22 und RANKL Antigen-spezifisch von Th-Zellen produziert.

In der vorliegenden Arbeit wurde vor allen Dingen die Expression von IL-17A untersucht. Neben IL-17A wird *in vitro* auch IL-17F von Th17-Zellen koexprimiert (Liang et al., 2007; Liang et al., 2006). Weiterführend wäre es von Interesse die Antigen-spezifische Expression von IL-17F in der G6PI-induzierten Arthritis zu untersuchen. Auch die Analyse der Expression von IL-21 in der G6PI-induzierten Arthritis wäre von besonderem Interesse. Für IL-21 wurde eine autokrine Wirkung für Th17-Zellen beschrieben (Korn et al., 2007; Nurieva et al., 2007; Nurieva et al., 2008; Zhou et al., 2007). Unter anderem wird dieses Zytokin auch von folliculären Helfer-T-Zellen sezerniert. Diese exprimieren auch ICOS auf ihrer Oberfläche. Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine Blockade des ICOS-Liganden benefizielle Effekte auf den klinischen Verlauf der G6PI-induzierten Arthritis hat (Manuskript ist eingereicht).

Als nächstes wurde die Antigen-spezifische Koexpression verschiedener Zytokine untersucht. Bei *in vitro* generierten Th17-Zellen findet man keine Koexpression von IL-17 und IFN- γ (Lexberg et al., 2008; Mangan et al., 2006). In Übereinstimmung mit früheren Publikationen (Betts et al., 2006; Löhning et al., 2002), konnten in der G6PI-induzierten Arthritis *ex vivo* Antigen-spezifische Th-Zellen detektiert werden, die sowohl IL-17 als auch IFN- γ exprimieren, wenn auch in einem sehr geringen Prozentsatz. Abweichend von den *in vitro* Befunden (Liang et al., 2006) konnten keine IL-17⁺IL-22⁺-Koproduzenten unter G6PI-spezifischen Th-Zellen in der G6PI-induzierten Arthritis gefunden werden. Es konnte eine hohe Frequenz von IL-17⁺TNF- α ⁺-*Double*-Produzenten sowie IL-17⁺RANKL⁺-*Double*-Produzenten detektiert werden. Sogar *Triple*- und *Quadrupel*-Produzenten wurden unter den Antigen-spezifischen Th-Zellen gefunden, allerdings in einer sehr geringen Frequenz, die einer Zellzahl von < 100 Zellen in den drainierenden Lymphknoten entspricht. Kann eine so geringe Zellzahl pathogenetisch relevant sein? Stemberger et al. konnten für CD8⁺ T-Zellen zeigen, dass nach adoptivem Transfer einer einzigen OT-1 T-Zell-Rezeptor-transgenen Zelle und Infektion der Mäuse mit Ovalbumin-exprimierenden Listerien diese transgenen CD8-T-Zellen nach 12 Tagen auf eine Frequenz von ca. 0,086 % expandiert waren (Stemberger et al., 2007). Andererseits zeigen Moon et al., dass die Frequenz naiver CD4⁺ T-Zellen für verschiedene Epitope variiert, und zwar beschreiben sie Zahlen zwischen 20 und 200 Zellen pro Maus (Moon et al., 2007). Die in dieser Arbeit gezeigten Zahlen an polyfunktionalen T-Zellen stellen sicher nur eine Momentaufnahme zu einem bestimmten Zeitpunkt in einer bestimmten Nische, dem Lymphknoten, dar. Inwieweit können polyfunktionale Th-Zellen für die Pathogenese der G6PI-induzierten Arthritis relevant sein?

Einen Hinweis darauf kann die Modulation der Erkrankung durch Blockade einzelner Zytokine *in vivo* mit Hilfe von Antikörpern liefern. Die Blockade von IL-23p19 in der Induktionsphase der Arthritis führte nur zu therapeutischen Effekten. In Übereinstimmung mit diesen Befunden entwickeln IL-23p19-defiziente Mäuse keine CIA (Murphy et al., 2003). IL-23 gehört zur IL-12 Familie und besteht aus den Untereinheiten p19 und p40. Der Rezeptor für IL-23 (IL-23R) wird auf aktivierten bzw. auf Gedächtnis-T-Zellen und nicht auf naiven T-Zellen exprimiert (Kastelein et al., 2007). Die Tatsache, dass IL-23p19-defiziente Mäuse keine EAE entwickeln und nur sehr wenige Th-Zellen besitzen, die IL-17 produzieren können, stellte einen ersten Zusammenhang zwischen IL-23 und den Th17-Zellen her (Cua et al., 2003; Langrish et al., 2005). IL-23 fördert die Sekretion von IL-17 durch aktivierte T-Zellen (Aggarwal et al., 2003). IL-23 wird von DC und Makrophagen produziert und scheint vor allem für das Überleben, die Proliferation und die Stabilität von Th17-Zellen relevant zu sein (Aggarwal et al., 2003; Happel et

al., 2003; Langrish et al., 2005). Die Blockade von IL-23p19 führte nur in der Induktionsphase der G6PI-induzierten Arthritis zu einem therapeutischen Effekt und nicht in der Effektorphase. Möglicherweise ist *in vivo* die Bedeutung von IL-23 für die finale Differenzierung von Th17-Zellen größer als *in vitro*. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass IL-23 essentiell für die terminale Differenzierung von Th17-Zellen *in vivo* ist (McGeachy et al., 2009). Außer für Th17-Zellen ist IL-23 auch zuständig für Regulation des angeborenen Immunsystems: so induziert IL-23 IL-17, IL-1, TNF- α und IL-6 in Zellen des angeborenen Immunsystems (Sutton et al., 2006; Uhlig et al., 2006). Als nächstes wurden die Effekte einer Blockade von IL-17 auf den klinischen Verlauf der G6PI-induzierten Arthritis untersucht. In IL-17-defizienten Mäuse wird eine Entwicklung der CIA teilweise unterdrückt (Nakae et al., 2003). Die Blockade von IL-17 mit dem Antikörperklon MM17F3 resultierte in einem therapeutischen Erfolg. Die Blockade von IL-17 zeigte in der EAE nur mässige klinische Effekte (Chen et al., 2006). In Übereinstimmung mit den hier gezeigten Resultaten untersuchten auch Iwanami *et al.* durch Blockade von IL-17 mit einem Antikörper die Relevanz von IL-17 in der G6PI-induzierten Arthritis (Iwanami et al., 2008a): bei einmaliger Applikation von anti-IL-17 (MAB421, IgG2a) an Tag 7 führte zu einem deutlichen therapeutischen Erfolg. Die Applikation an Tag 14 veränderte den klinischen Verlauf der Arthritis nicht. Die Relevanz von TNF- α für die Pathogenese der G6PI-induzierten Arthritis wurde bereits durch Schubert *et al.* demonstriert und im Rahmen dieser Arbeit lediglich reproduziert (Schubert et al., 2004). Die Expression von TNF- α durch G6PI-spezifische Th-Zellen gehört neben der RANKL-Expression zu den prominentesten in der G6PI-induzierten Arthritis. TNF- α ist ein äußerst wirksames proinflammatorisches Zytokin, welches bei einer Vielzahl von entzündlichen Erkrankungen pathogenetisch relevant ist und sich bereits in Tiermodellen für die rheumatoide Arthritis als relevant erwiesen hat (Feldmann, 2002; Ji et al., 2002b). TNF- α wird von vielen verschiedenen Zellpopulationen wie z.B. T-Zellen, Makrophagen, Mastzellen und neutrophilen Granulozyten ausgeschüttet. Antagonisten gegen TNF- α wie z.B. Enbrel® (Etanercept), Remicade® (Infliximab) und Humira® (Adalimumab) werden bereits erfolgreich zur Therapie der rheumatoiden Arthritis in der Klinik eingesetzt. Auf diesem Hintergrund wäre es interessant auch RANKL *in vivo* in der G6PI-induzierten Arthritis zu blockieren. Die Expression von RANKL erreicht ein ähnliches Niveau, wie die von TNF- α . Wie auch TNF- α gehört RANKL zur TNF-Familie der Zytokine. Es wird von Mesenchymzellen und aktivierten T-Zellen exprimiert und mediiert die Aktivierung von DC (Anderson et al., 1997; Wong et al., 1999). Der Rezeptor für RANKL ist RANK. Der heterotrimere Rezeptor RANK gehört zur TNF-Rezeptor Superfamilie. Er wird auf Osteoklasten-Vorläuferzellen, Trophoblasten, DC, Reifen T-Zellen und hämatopoetischen Vorläufern exprimiert. Die Expression von RANKL wird mit Th17-Zellen assoziiert. Die Expression von RANKL auf Th17-Zellen induziert die Osteoklastogenese und fördert die Knorpel- und Knochenresorption unabhängig von TNF- α und IL-1 (Koenders et al., 2005a; Koenders et al., 2005b; Koenders et al., 2006; Kotake et al., 1999; Miranda-Carus et al., 2006; Sato et al., 2006). Denosumab ist ein vollständig humanisierter Antikörper der RANKL erkennt; er befindet sich bereits in Phase 3 klinischer Studien in der Rheumatoiden Arthritis (Lonberg, 2005; Weiner, 2006). Es ist somit das Schlüsselenzym der Osteoklastogenese. Leider erkennt dieser Antikörper kein murines RANKL und ist somit nicht für die *in vivo* Blockade von RANKL in der G6PI-induzierten Arthritis geeignet.

IL-6 ist ein Zytokin mit pleiotropen Effekten: IL-6 wird von DC, Monozyten, Makrophagen, Mastzellen, B-Zellen und aktivierten T-Zellen produziert. Die Produktion von IL-6 ist Teil der Akut-Phase-Reaktion, die während einer Infektion auftritt. Es konnte gezeigt werden, dass IL-6 essentiell für die *in-vitro*-Generation von Th17-Zellen ist (Bettelli et al., 2006; Mangan et al., 2006). Erhöhte Level von IL-6 können im Serum und im Synovium von Arthritis-Patienten nachgewiesen werden (Arvidson et al., 1994; Desgeorges et al., 1997; Guerne et al., 1989; Houssiau et al., 1988; Manicourt et al., 1993). IL-6-defiziente Mäuse entwickeln eine CIA mit deutlich geringerem Schweregrad oder sind sogar gänzlich geschützt (Alonzi et al., 1998; Boe et al., 1999; Ohshima et al., 1998; Sasai et al., 1999). Iwanami *et al.* konnten zeigen, dass eine Blockade des IL-6-Rezeptors (IL-6R) mit einem Antikörper an den Tagen 0 und 3 die G6PI-induzierte Arthritis verhindert; eine Blockade an Tag 8 führte immer noch zu einem deutlichen therapeutischen Effekt, während die Applikation des Antikörpers an Tag 14 keinen Einfluss auf den klinischen Verlauf der Arthritis mehr hatte (Iwanami et al., 2008a). Die Blockade von IL-6R resultierte in der Suppression der IL-17-Expression und einer verringerten Proliferation G6PI-spezifischer Th-Zellen. Der IL-6-R rekrutiert nach der Bindung von IL-6 das Membran-Glykoprotein gp130, welches auch die Signaltransduktion vermittelt (Kallen, 2002). Das Membranprotein gp130 befindet sich auch auf Zellen, die den IL-6-Rezeptor nicht exprimieren. Der IL-6-Rezeptor kann mit gebundenem IL-6 proteolytisch abgespalten werden und an gp130 auf Zellen ohne IL-6-Rezeptor binden und dort Effekte vermitteln. Diesen Prozess bezeichnet man als *Transsignalling*. Im Modell der Antigen-induzierten Arthritis konnte durch Blockade des *Transsignallings* des IL-6R mit sgp130 ein milderer klinischer Verlauf erzielt werden (Nowell et al., 2003). Es sollte der Effekt von sgp130 in der G6PI-induzierten Arthritis untersucht werden. Der IL-6R wird nur von Hepatozyten, Monozyten, Neutrophilen und einigen B- und T-Zell-Subpopulationen exprimiert, während gp130 von allen Zellen des Körpers exprimiert wird (Kallen, 2002). Durch die Applikation von löslichem gp130 (sgp130) sollte dieses *Transsignalling* blockiert werden. Bei Applikation von sgp130 in der Induktionsphase der G6PI-induzierten Arthritis wurden marginale Effekte auf die klinischen Symptome erzielt; eine Applikation in der Effektorphase hatte keinen therapeutischen Effekt. Diese Resultate stehen im Gegensatz zu den in der CIA beobachteten Befunden (Nowell et al., 2009): im Gegensatz zu dem hier verwendeten Therapieschema begannen Nowell *et al.* an Tag 21, also bei Beginn der klinischen Symptome und applizierten jeden zweiten Tag sgp130.

IL-22 gehört zur Zytokin-Familie von IL-10. IL-22 wird von terminal differenzierten Th17-Zellen durch IL-23 induziert und exprimiert (McGeachy et al., 2007). Erst kürzlich wurde auch eine Subpopulation von NK-Zellen beschrieben, die IL-22 produzieren (Takatori et al., 2009). Der IL-22-Rezeptor (IL-22R) wird von Epithel- und Endothelzellen exprimiert (Aggarwal et al., 2001) und nicht von Zellen des Immunsystems. So können Th17-Zellen eine Wirkung auf diese Zellen entfalten. IL22-R wird von Synovialfibroblasten von Patienten mit Rheumatoider Arthritis exprimiert. IL-22 fördert so die Proliferation von Synovialfibroblasten (Ikeuchi et al., 2005). IL-22 induziert zusammen IL-17A und IL-17F antimikrobielle Peptide (Liang et al., 2006). IL-22-defiziente Mäuse sind nicht resistent gegenüber der Entwicklung einer EAE (Kreymborg et al., 2007). IL-22 wirkt nicht immer proinflammatorisch: so konnte gezeigt werden, dass IL-22 bei Entzündungen des Darms sogar protektiv wirken kann, in dem es bei Infektionen mit *Citrobacter rodentium* die Barrierefunktion des Darmepithels aufrecht erhält

(Sugimoto et al., 2008; Zheng et al., 2007). Es wäre interessant zu untersuchen, inwieweit die Blockade des Th17-Zytokins IL-22 den klinischen Verlauf der G6PI-induzierten Arthritis beeinflussen würde.

Es wurde gezeigt, dass IFN- γ die Expression von IL-17 unterdrückt, indem es den IL-23R herunterreguliert (Harrington et al., 2005; Park et al., 2005). In IFN- γ -defizienten Mäusen kommt es zur Exazerbation der CIA und AIA (Chu et al., 2003; Irmiler et al., 2007; Manoury-Schwartz et al., 1997; Vermeire et al., 1997). In Übereinstimmung mit den Resultaten von Iwanami *et al.* tendiert auch die G6PI-induzierte Arthritis bei einer *in vivo* Blockade IFN- γ zu einem klinisch schwereren Verlauf (Iwanami et al., 2008a). Der Effekt ist jedoch minimal und in Betracht der Tatsache, dass dieses Experiment nur einmal durchgeführt wurde, muss man Vorsicht bei der Interpretation der Ergebnisse walten lassen. Die *in vivo* Blockade von IL-4 keine Effekte auf die Inzidenz und den klinischen Index der G6PI-induzierten Arthritis. Das Th2-Zytokin konnte in der G6PI-induzierten Arthritis weder im FACS noch im ELISA nachgewiesen werden, was die Befunde erklären könnte.

Generell wurden nur in der Induktionsphase therapeutische Effekte erzielt und nicht, wenn sich die Arthritis klinisch schon manifestiert hatte. Besonders effektiv war eine Blockade von Zytokinen, die Differenzierung und Proliferation von Th17-Zellen beeinflussen. Somit kann Th17-Zellen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der G6PI-induzierten Arthritis zugesprochen werden. Somit stellen Th17-Zellen ein ideales Target für die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze dar, die eventuell auch TNF-*Non-Responder* erreichen könnten. Um eine Steigerung der therapeutischen Effekte zu erzielen könnte man zusätzlich noch mehrer Zytokine gleichzeitig blockieren, um auch die polyfunktionalen Th-Zellen zu blockieren.

Darrah *et al.* konnten in einem Infektionsmodell zeigen, dass die Effektivität eines Vakzins gegen *Leishmania major* mit der Frequenz von polyfunktionellen Th-Zellen, die die drei Zytokine IFN- γ , TNF- α und IL-2 gleichzeitig produzierten, korrelierte. Die Effektivität wurde nicht allein durch IFN- γ produzierende Th1-Zellen widerspiegelt (Darrah et al., 2007). Überträgt man dieses Prinzip auf die G6PI-induzierte Arthritis könnte das bedeuten, dass die Blockade eines einzelnen Th17-Zytokins nicht zwingend in einem benefiziellen therapeutischen Effekten resultieren muss.

4.3. Induktion einer Arthritis durch ein autologes Peptid abgeleitet von G6PI

Es existieren diverse Algorithmen zur Vorhersage von Bindungsmotiven von Peptiden an MHC-Komplexe (SYFPEITHI, RANKPEP, MHCpred) (Guan et al., 2006; Rammensee et al., 1999; Reche et al., 2004). Für die Identifizierung immunodominanter Peptide in der G6PI-induzierten Arthritis wurden diese nicht verwendet, da keine Vorhersagen für I-A^q restringierten T-Zellantworten möglich sind. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Peptide, die nicht mit der Konsensussequenz für HLA-DR4 übereinstimmen, dennoch in der Lage sind HLA-DR4-restringierte T-Zellen effizient zu aktivieren (Maier et al., 2000). Ähnliche Ergebnisse konnte durch die Verwendung von Peptidbibliotheken erhalten werden (Hemmer et al., 1999).

Deswegen wurde ein Ansatz gewählt, der nicht auf Annahmen basiert, sondern unvoreingenommen das Gesamtprotein G6PI abdeckt: Es wurde ein Panel von 15mer Peptiden synthetisiert, die jeweils um 11 Aminosäuren überlappen und die gesamte Sequenz der humanen G6PI abdecken. Aus *in vitro* Proliferationsassays mit zweidimensionalen Peptid-Pools wurden die fünf Peptide G6PI₆₅₋₇₉, G6PI₈₅₋₉₉,

G6PI₄₆₉₋₄₈₃, G6PI₅₁₇₋₅₃₀ und G6PI₄₉₇₋₅₁₁ als potentielle immunodominante Kandidaten abgeleitet. G6PI₈₅₋₉₉ wurde für weitere Experimente ausgewählt, da es in allen drei Experimenten als immunodominanter Kandidat aufgetreten war. Zusätzlich wurde G6PI₄₆₉₋₄₈₃ ausgewählt, da die Sequenz des Peptids für Mensch und Maus identisch ist und somit ein autologes Peptid (*engl.* „self-peptide“) darstellt. Sowohl G6PI₈₅₋₉₉ als auch G6PI₄₆₉₋₄₈₃ induzierten nach einer Immunisierung eine Arthritis in DBA/1 Mäusen. Somit ist die G6PI-induzierte Arthritis das einzige Maus-Modell, in dem eine Arthritis durch die Immunisierung mit einem Peptid induziert werden kann, das von einem Selbst-Antigen abgeleitet wurde.

Keines der beiden immunodominanten Peptide entspricht dem Bindungsmotiv von I-A^q, welches von Holm *et al.* beschrieben wurde (Holm *et al.*, 2007).

Ein möglicher Nachteil des in dieser Arbeit verwendeten Ansatzes besteht in der Vernachlässigung von posttranslationalen Modifikationen, wie Glykosylierung, Hydroxylierung und Citrullinierung, welche für die Antigen-Erkennung durch T- und B-Zellen relevant sein können. Die Glykosylierung des immunodominanten Kollagen II Epitopes CII₂₆₁₋₂₇₃ ist für die Erkennung durch T-Zellen von Bedeutung. Zusätzlich ist die Glykosylierung für einige Aspekte der Arthritis-Pathogenese sowohl in I-A^q DBA/1 Mäusen als auch in HLA-DR4-transgenen Mäusen relevant. Für die CIA konnte gezeigt werden, dass der Schweregrad der Arthritis mit dem Grad der Glykosylierung des Kollagens korreliert (Myers *et al.*, 2004). Allerdings wurden für G6PI bisher keine posttranslationalen Modifikationen wie z.B. Glykosylierung beschrieben (Sun *et al.*, 1990). Außerdem erweist sich das rekombinant in *E.coli* exprimierte G6PI als funktionell in Bezug auf die Arthritisinduktion, was gegen eine Relevanz von Glykosylierungen in der G6PI-induzierten Arthritis spricht.

Die Citrullinierung von Proteinen erfolgt durch die Peptidylarginin Deiminase im entzündeten Synovium (van Gaalen *et al.*, 2005; van Gaalen *et al.*, 2004a). Bei der Citrullinierung, die durch ein Enzym namens Peptidyl-Arginin-Deiminase (PAD) katalysiert wird, wird die positiv geladene Guanidino-Gruppe des Arginins in die ungeladene Ureido-Gruppe desiminiert. Derartige Ladungsverschiebungen können die Tertiärstruktur eines Proteins beeinflussen. Man nimmt auch an, dass die Citrullinierung zur Aufhebung der Toleranz von körpereigenen Peptiden oder Proteinen führen kann. Citrullinierte Peptide werden durch diagnostisch relevante Autoantikörper in der RA erkannt. Auch in der CIA können Immunantworten gegen citrullinierte CII Epitope detektiert werden (Kuhn *et al.*, 2006). Die Immunisierung von HLA-DR4-IE-transgenen Mäusen mit citrulliniertem Fibrinogen induziert eine Arthritis während die Immunisierung mit unmodifizierten Fibrinogen nicht zu einer Arthritis führt (Hill *et al.*, 2008). Diese Daten zeigen, dass die Citrullinierung von Proteinen nicht nur diagnostisch, sondern auch pathogenetisch relevant sind. Sowohl G6PI₈₅₋₉₉ als auch G6PI₄₆₉₋₄₈₃ enthalten in ihrer Sequenz ein Arginin, so dass sie potentiell posttranslational citrulliniert werden könnten. Geht man davon aus, dass APC modifizierte Peptide präsentieren können, nachdem Mäuse mit einem unmodifizierten Protein immunisiert wurden, wäre es im Bereich des möglichen, dass G6PI-Peptide in den APC citrulliniert und präsentiert und durch T-Zellen erkannt werden (Ireland *et al.*, 2006). Mithilfe einer Immunisierung mit citrulliniertem G6PI₈₅₋₉₉ und G6PI₄₆₉₋₄₈₃ ließe sich untersuchen inwieweit APC auch citrullinierte Peptide präsentieren können und ob der Schweregrad der Arthritis durch die Immunisierung mit citrullinierten Peptiden beeinflusst wird.

In der K/BxN-Arthritis wurde G6PI₂₈₂₋₂₉₄ als immundominantes I-A^{g7}-restringiertes Epitop identifiziert (Basu et al., 2000). Im K/BxN Modell sind für die Pathogenese der Arthritis vor allem Antikörpervermittelte Mechanismen des angeborenen Immunsystems relevant. Die T-Zellen vermitteln vor allem T-Zell-Hilfe für den Klassenwechsel der B-Zellen (Korganow et al., 1999). Über eine Krankheitsmodulierende Wirkung von G6PI₂₈₂₋₂₉₄ ist nichts bekannt. Im Gegensatz zum K/BxN Modell sind in der G6PI-induzierten Arthritis CD4⁺-T-Zellen sowohl in der Induktions- als auch in der Effektorphase essentiell (Schubert et al., 2004).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl durch eine Immunisierung mit G6PI₈₅₋₉₉ als auch durch eine Immunisierung mit G6PI₄₆₉₋₄₈₃ eine Arthritis in DBA/1 Mäusen induziert werden kann. Allerdings war der klinische Schweregrad der Arthritis nach Immunisierung mit diesen G6PI-Peptiden geringer als nach Immunisierung mit dem gesamten Protein. Deswegen wurde untersucht in wieweit die Unterschiede in den klinischen Schweregraden und dem Beginn der Erkrankung mit Unterschieden in der Zytokin-Produktion G6PI-spezifischer Th-Zellen korrelierte. Wie bereits beschrieben war die Frequenz G6PI-spezifischer Th-Zellen, die IL-17 produzieren, an Tag 9 maximal. In Peptid-immunisierten Tieren war das Maximum der Frequenz Antigen-spezifischer Th-Zellen, die IL-17 produzieren, an Tag 12 maximal; dieser Befund korreliert mit dem verzögerten Beginn der Arthritis in Peptid-immunisierten Mäusen. Das Zytokin-*Pattern* war vergleichbar zwischen Protein- und Peptid-immunisierten Mäusen: es wurden vor allen Dingen die Th17-Zytokine IL-17, TNF- α und RANKL von CD4⁺CD154⁺ exprimiert, aber auch IFN- γ . Erstaunlicherweise war die Frequenz an Antigen-spezifischen Zytokin-Produzenten nach Immunisierung mit G6PI geringer als nach Immunisierung mit G6PI₈₅₋₉₉, schien also nicht mit dem klinischen Schweregrad der Arthritis zu korrelieren. Man muss allerdings bei der quantitativen Auswertung der Daten berücksichtigen, dass das Protein zur Antigenpräsentation zunächst prozessiert werden muss, während das Peptid direkt an der Oberfläche auf das MHC-Klasse-II-Molekül geladen werden kann. Außerdem wiesen die beiden Peptide völlig unterschiedliche Löslichkeiten auf.

Iwanami *et al.* haben erst kürzlich G6PI₃₂₅₋₃₃₉ als das immundominante Epitop in der G6PI-induzierten Arthritis beschrieben (Iwanami et al., 2008b). Sie verwendeten einen völlig anderen Ansatz zur Identifikation der immundominanten Epitope in der G6PI-induzierten Arthritis: Iwanami und Kollegen analysierten bekannte I-A^q restringierte T-Zell-Epitope und leiteten von ihren Analysen potentielle Bindungsmotive für I-A^q ab. Iwanami *et al.* synthetisierten 25 unterschiedliche 20mer Peptide, die aber nicht die gesamte Sequenz von G6PI abdeckten, sondern nur 71,5 %. Somit kann dieser Ansatz dazu führen, dass potentiell relevante Epitope verpasst werden. Weder G6PI₈₅₋₉₉ noch G6PI₄₆₉₋₄₈₃ wurden durch den durch Iwanami *et al.* verwendeten Algorithmus vorhergesagt und umfassten somit nicht ihren *Screening*-Prozess. Es bleibt die Frage, warum der Ansatz, der im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde, G6PI₃₂₅₋₃₃₉ nicht als immunodominant identifizierte? G6PI₃₂₅₋₃₃₉ ist Peptid # 82 und ist somit in den Peptid-Pools 10 und 19 enthalten. Während der Pool 10 in 3/3 Experimenten positiv war, war Pool 19 nur in 1/3 Experimenten positiv. Möglicherweise enthält Pool 19 agonistische und antagonistische Peptide, die sich zueinander kompetitiv verhalten, die zu den negativen Resultaten bei der Stimulation mit diesem Peptid-Pool führten. Dennoch sind in der Vergangenheit Peptidbibliotheken erfolgreich zur Identifikation von T-Zell-Epitopen genutzt worden (Grogan et al., 1999; Hemmer et al., 1999; Maier et al., 2000; Nino-Vasquez et al., 2004). Darüber

hinaus sind Variationen der Antikörperlevel und T-Zell-Proliferation zwischen individuellen Mäusen, auch des gleichen Inzuchtstammes keine Seltenheit (Gammon et al., 1990; Perkins et al., 1991; Sette et al., 1994) und liefern eine weitere Erklärungsmöglichkeit, warum der Pool 19 nur in 1/3 Experimenten positiv war.

Im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit, die die Proliferation als *Screening*-Kriterium benutzte, nutzten Iwanami und Kollegen die Sekretion von IL-17 und IFN- γ als Kriterium für die Auswahl immunodominanter Peptide. Möglicherweise führten auch diese unterschiedlichen Kriterien zu den Diskrepanzen in den Resultaten. Gerade die Produktion von IL-17 variiert sehr stark mit der Herkunft der Mäuse und den SPF-Bedingungen der Tierhaltung.

Es bleibt die Frage zu beantworten, ob es möglich ist, dass es mehr als ein immundominantes T-Zell-Epitop in der G6PI-induzierten Arthritis gibt: Für HEL (*hen egg lysozyme*), welches aus 129 Aminosäuren besteht, wurden 6 I-A^k-restringierte T-Zell-Epitope beschrieben; somit sollte es möglich sein, dass auch mehrere I-A^q-restringierte Epitope für G6PI existieren (Nelson et al., 1992).

Iwanami und Kollegen beschreiben keine Unterschiede im klinischen Schweregrad und Beginn der Arthritis im Vergleich zwischen Peptid- und Protein-immunisierten Mäusen, wie es im Rahmen dieser Arbeit beobachtet wurde. Abweichend von unserem Immunisierungsprotokoll verwendeten sie eine intradermale Injektion mit CFA gefolgt von zwei intraperitonealen Injektionen von Pertussistoxin an den Tagen 0 und 2. Iwanami *et al.* beschreiben, dass auch ohne die Applikation von Pertussistoxin eine Arthritis mit geringerem klinischen Schweregrad mit G6PI₃₂₅₋₃₃₉ induziert werden kann, zeigen aber keine Daten. Auch Iwanami *et al.* messen nach Immunisierung mit Peptid nur geringe Titer G6PI-spezifischer Antikörper im Vergleich zur Immunisierung mit Protein. Eine Kombination der Peptide G6PI₃₂₅₋₃₃₉ und G6PI₅₄₄₋₅₅₈, führte zu hohen Titern an G6PI-spezifischen Antikörpern. Obwohl im Rahmen dieser Arbeit und von Iwanami *et al.* unterschiedliche immunodominante I-A^q restringierte T-Zell-Epitope beschrieben wurden, bleibt die G6PI-induzierte Arthritis, das bisher einzige Tiermodell für die rheumatoide Arthritis, in der eine Arthritis durch Immunisierung mit einem Peptid induziert werden kann. Diese Tatsache unterstreicht die Relevanz von Th-Zellen für Pathogenese der G6PI-induzierten Arthritis. G6PI₄₆₉₋₄₈₃ stellt dabei ein autologes Peptide („*self-peptide*“) dar, da seine Sequenz für humane und murine G6PI identisch ist. Wie die Toleranz für dieses Peptid aufgehoben wird, bleibt allerdings ungeklärt.

4.4. Die G6PI-induzierte Arthritis in SJL-Mäusen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden SJL-Mäuse als suszeptible für die G6PI-induzierte Arthritis beschrieben und die Arthritis näher charakterisiert. Bezogen auf den klinischen Verlauf erscheint ist die Arthritis in SJL-Mäusen im Vergleich zu DBA/1-Mäusen chronisch: der klinische Index geht in einem Zeitraum von 80 Tagen nicht auf null zurück. Bei SJL-Mäusen konnten an Tag 80 deformierte Pfoten beobachtet werden, die den Deformationen bei unbehandelten Arthritiden des Menschen ähneln. Im Vergleich zu DBA/1-Mäusen war in SJL-Mäusen in einzelnen Experimenten die Inzidenz auf 50 % reduziert. Die Ursachen hierfür konnten nicht erklärt werden und könnten somit einfach Stamm spezifisch sein. Histopathologisch konnten in SJL-Mäusen auch nach Tag 30 sowohl Aspekte einer akuten als auch einer chronischen Entzündung beobachtet werden. Insgesamt schienen bei SJL-Mäusen die Knie häufiger betroffen als bei DBA/1-Mäusen. Im Allgemeinen wies die G6PI-

induzierte Arthritis in SJL-Mäusen ähnliche Charakteristika auf wie in DBA/1-Mäusen: Auch in SJL-Mäusen sind CD4⁺-Zellen und FcγR⁺-Zellen wichtig für die Pathogenese der G6PI-induzierten Arthritis. Die Zytokin-Profile für DBA/1 und SJL-Mäuse sind identisch und die Titer der G6PI-spezifischen Antikörper vergleichbar. Interessant sind SJL-Mäuse da sie den MHC-Haplotype H2-s aufweisen. Die G6PI-induzierte Arthritis in SJL-Mäusen könnte somit hilfreich sein bei der Identifizierung genetischer Faktoren die für die Entstehung der RA wichtig sind.

4.5. B-Zellen: essentielle APC in der G6PI-induzierten Arthritis?

B-Zellen sind bei einer Reihe von Erkrankungen, wie SLE, RA, MS oder auch Diabetes, an der Entstehung von Autoimmunität beteiligt (Edwards et al., 2004; Hu et al., 2007; Sfrikakis et al., 2005; Shan and Press, 1995). Dabei tragen B-Zellen zur Entstehung von Autoimmunität nicht allein dadurch bei, dass sie Autoantikörper produzieren, sondern sie sind auch in der Lage Autoantigene zu präsentieren, Zytokine zu sezernieren oder ektope Keimzentren zu bilden (Browning, 2006; Chan and Shlomchik, 1998; Chan et al., 1999a; Chan et al., 1999b, c; Martin and Chan, 2006; Wong et al., 1999). Auch in der Klinik haben sich Therapien, die B-Zellen als *Target* haben, in der RA und anderen Autoimmunerkrankungen als erfolgreich erwiesen (Leandro et al., 2002). Mit diesen Befunden wächst das Interesse an den Mechanismen, die zur Beteiligung von B-Lymphozyten an der Pathogenese der RA beitragen. Tiermodelle für die RA liefern die Basis für diese Untersuchungen.

Die Existenz von Autoantikörpern wie Rheumafaktoren oder Antikörper, die spezifisch für CII, Hitzeschockproteine oder CCP sind (Cope and Sonderstrup, 1998; Firestein, 2003; Silverman and Carson, 2003), sind diagnostisch relevant in der RA.

Auch nach Immunisierung mit G6PI werden G6PI-spezifische Antikörper sowohl in suszeptiblen als auch in nicht-suszeptiblen Mausstämmen nachweisbar (Schubert et al., 2004). Die Höhe der Antikörpertiter korreliert dabei nicht mit dem Schweregrad der Arthritis. Anders als in der CIA oder der K/Bx N-Arthritis kann in der G6PI-induzierten Arthritis die Erkrankung nicht allein durch Antikörper transferiert werden (Holmdahl et al., 1990; Korganow et al., 1999; Stuart et al., 1983). Selbst Injektionen von bis zu 10 mg IgG aus arthritischen Mäusen induziert keine Arthritis in den Empfängermausen (Schubert et al., 2004). CD4⁺ T-Zellen sind relevant für die Pathogenese der G6PI-induzierten Arthritis. Th-Zellen leisten T-Zell-Hilfe an B-Zellen für die Produktion von Antikörpern. Auch nach Depletion von CD4⁺ T-Zellen mithilfe von Antikörpern sind G6PI-spezifische Antikörper nachweisbar, obwohl keine klinischen Zeichen einer Arthritis zu beobachten sind. Die Höhe der Antikörpertiter ist mit der in unbehandelten Tieren vergleichbar (Schubert et al., 2004). Diese Befunde sprechen gegen eine pathogenetische Relevanz von Antikörpern in der G6PI-induzierten Arthritis. Allerdings scheinen Fcγ-Rezeptoren, die Mittler zwischen Antikörper-Antigen-Komplexen und Effektormechanismen des Immunsystems darstellen, wichtig zu sein in der Pathogenese der G6PI-induzierten Arthritis:

Mäuse, die keine γ-Kette und somit keine aktivierenden Fc-Rezeptoren (FcγRI, FcγRIII) besitzen, weisen eine geringere Inzidenz und einen geringeren klinischen Schweregrad nach Arthritisinduktion mit G6PI in CFA auf. In DBA/1-Mäusen, die defizient für den inhibitorischen Fc-Rezeptor (FcγRIIB) sind, kommt es zu einer Exazerbation der Arthritis (Schubert et al., 2004). Diese Befunde sprechen

dafür, dass zumindest die über Fc-Rezeptoren vermittelten Effektorfunktionen der Antikörper pathogenetisch relevant sind.

2005 beschrieben Falk Nimmerjahn und Jeffrey V. Ravetch erstmalig den Fc γ RIV (Nimmerjahn et al., 2005; Nimmerjahn and Ravetch, 2005): wie für die anderen aktivierenden Fc-Rezeptoren ist auch für seine Expression die γ -Kette erforderlich. In der Maus wird der Fc γ RIV auf Neutrophilen, Monozyten, Makrophagen und DC exprimiert. Aktivierung des Rezeptors durch inflammatorische Stimuli wie LPS und Th-Zytokine führt zu einer verstärkten Expression von Fc γ RIV; Th2-Zytokine hingegen führen zur Herunterregulation der Expression. Der Fc γ RIV bindet IgG2a und IgG2b, nicht aber IgG1 oder IgG3, mit mittlerer Affinität. Um die Relevanz des Fc γ RIV in der G6PI-induzierten Arthritis zu untersuchen, wurde dieser mit einem Antikörper blockiert. Die Blockade des aktivierenden Fc γ RIV führe zu einer Verbesserung der klinischen Symptome in der G6PI-induzierten Arthritis. Der Effekt war aber marginal. Es ist anzunehmen, dass dieser geringe klinische Effekt auf die Kompensation der Blockade durch die anderen zwei aktivierenden Fc-Rezeptoren, Fc γ RI und Fc γ RIII, zu erklären ist.

Als eine Gruppe von Fc γ R⁺ Effektorzellen und prominente Fraktion der inflammatorischen Infiltrate im arthritischen Gelenk sollte die Rolle von Neutrophilen in der Pathogenese der G6PI-induzierten Arthritis näher untersucht werden. Dazu wurden die Neutrophilen mit dem Antikörperklon RB6 8C5 depletiert. Dieser Antikörper erkennt den *Granulocyte receptor* (Gr-1) (Tepper et al., 1992), der ein Mitglied der Ly6 Genfamilie ist. Ly6G, ein Granulozytenoberflächenmarker, ist das Hauptantigen von RB6 8C5; RB6 8C5 erkennt aber auch Ly6C, welches auf Neutrophilen, DC, pDC, Monozyten, Makrophagen und Lymphozytenpopulationen exprimiert wird (Hestdal et al., 1991; Jutila et al., 1994; Jutila et al., 1988; Kung et al., 1991; Shortman and Naik, 2007). Somit werden bei der Applikation von RB6 8C5 nicht nur Neutrophile, sondern auch Monozyten, Makrophagen, DC und teilweise Lymphozyten depletiert. Durch das Fehlen von Neutrophilen-„knockout“-Mäusen bleibt diese Herangehensweise vorerst der einzige Weg die Beteiligung der Neutrophilen in der Pathogenese der G6PI-induzierten Arthritis zu untersuchen. Neben der Expression von Fc γ R ist die Untersuchung von Neutrophilen in der G6PI-induzierten Arthritis auch interessant, da im Rahmen der vorliegenden Arbeit bereits demonstriert werden konnte, dass IL-17 entscheidend an der Pathogenese der G6PI-induzierten Arthritis beteiligt ist. Auch in der Immunkomplex-vermittelten Arthritis konnte gezeigt werden, dass IL-17 Neutrophile an den Ort des Geschehens lockt und somit zur Zerstörung der Gelenke beiträgt (Grevers et al., 2009). Sowohl in DBA/1 als auch in SJL-Mäusen führte die Depletion der Neutrophilen sowohl in der Induktions- als auch in der Effektorphase zu einer deutlichen Verbesserung der klinischen Symptome. Auch in der K/BxN-Arthritis führte die Behandlung mit RB6 8C5 zu einer klinischen Verbesserung bzw. verhinderte die Arthritis völlig (Wipke and Allen, 2001). Die Granula der Neutrophilen enthalten degradierende Enzyme wie Myeloperoxidase, Elastase, Matrixmetalloproteinasen und Kollagenasen und können somit nach der Infiltration der Gelenke am Knorpel und Knochenabbau mitwirken (Witko-Sarsat et al., 2000). Zusätzlich können aktivierte Neutrophile die proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-1, IL-6 und TGF- β sezernieren (Cassatella et al., 1997) und so sowohl andere Neutrophile als auch Chondrozyten beeinflussen. Eine Depletion der Neutrophile vermag so der Inflammation und Destruktion des Gelenks entgegen zu wirken. Die Resultate zeigen, dass Neutrophile als Fc γ R⁺ Zellen an der Entstehung der Gelenkentzündung in der G6PI-induzierten Arthritis beteiligt sind.

B-Zelldefiziente μ MT-Mäuse sind resistent gegenüber der CIA (Svensson et al., 1998). Sowohl B-Zelldefiziente μ MT-Mäuse auf dem C3H.Q- oder dem B10.Q-Hintergrund sind resistent gegenüber der G6PI-induzierten Arthritis (Bockermann et al., 2005). Diese Befunde zeigen, dass sowohl in der CIA als auch in der G6PI-induzierten Arthritis autoreaktive B-Zellen und arthritogene Antikörper für die Entstehung der Arthritis relevant. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass die Architektur der sekundär lymphatischen Organen von μ MT-Mäusen empfindlich gestört ist (Tumanov et al., 2002): die Milzen von μ MT-Mäusen sind deutlich kleiner; es fehlen ihnen follikuläre dendritische Zellen und Makrophagen (Crowley et al., 1999); zusätzlich weisen sie eine verminderte Chemokinexpression (Mandik-Nayak et al., 2001) und eine anormale DC-Funktion auf (Moulin et al., 2000); es bestehen Abweichungen im Zytokin-Mikroenvironment, zusätzlich besitzen μ MT-Mäuse einen Toleranzdefekt (Gonnella et al., 2001). Somit liefern μ MT-Mäuse sicher einen Hinweis auf die Relevanz von B-Zellen in verschiedenen Arthritismodellen, diese müssen aber kritisch betrachtet werden. Vor allen Dingen, wenn man die Rolle von B-Zellen als APC untersuchen will, eignen sich μ MT-Mäuse nicht, da diese ja zum Zeitpunkt der Immunisierung mit CII oder G6PI abwesend sind.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden deswegen B-Zellen mit einem Antikörperkonjugat, anti-CD22-Cal, depletiert. Auf diese Art und Weise können die B-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten der Arthritis depletiert werden und so Rückschlüsse auf die Funktionen der B-Zellen in der Arthritis- Pathogenese gezogen werden. Anti-CD22-Cal bindet an CD22, einem Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie, dass als Adhäsionsrezeptor für Liganden mit Sialinsäure dient (Tuscano et al., 1999). In der Maus kann CD22 schon früh in der B-Zellentwicklung im Zytoplasma detektiert werden, man findet CD22 nicht auf IgM^+ B-Zellen, niedrige Expressionslevel von CD22 finden sich auf unreifen $\text{B220}^{\text{low}}\text{IgM}^{\text{high}}$ B-Zellen, auf reifen $\text{B220}^{\text{high}}\text{IgD}^+$ B-Zellen im Knochenmark findet man eine deutliche Expression (Poe et al., 2004; Symington et al., 1982). In der Peripherie findet man CD22 auf allen B-Zell-Subpopulationen einschließlich von follikulären B-Zellen und denen der *Marginal Zone* sowie peritonealen B-Zellen (Tedder et al., 1997). CD22 wird konstitutiv endozytiert und degradiert mit einer kurzen Lebensdauer auf der Zelloberfläche (Shan and Press, 1995). Bei Bindung des Antikörpers an CD22 wird dieser zusammen mit CD22 internalisiert. Somit ist CD22 ein exzellentes Zielmolekül für Calicheamicin-vermittelte Zellzytotoxizität (Shan and Press, 1995). Calicheamicin vermittelt dann DNA-Doppelstrangbrüche und führt so die Apoptose der B-Zelle herbei (Damle and Frost, 2003; Thorson et al., 2000).

Eine Behandlung der Mäuse mit anti-CD22-Cal zu effektiven Depletion der B-Zellen ($\text{B220}^+\text{CD19}^+$): während die Behandlung mit anti-CD22-Cal an Tag 15 nach der ersten Behandlung im Blut und in den Lymphknoten zu einer fast vollständigen B-Zelldepletion führte, blieb in der Milz ein größerer Prozentsatz an B-Zellen erhalten; dies lässt sich auf die Tatsache zurückführen, dass in der Milz bereits der Ausgangsprozentsatz höher ist. Dunussi-Joannopoulos *et al.* beschreiben, dass die B-Zellen nach Behandlung mit anti-CD22-Cal nach 30 Tagen wieder zurückkehren (Dunussi-Joannopoulos et al., 2005). Wurden im Model der G6PI-induzierten Arthritis die B-Zellen vor der Arthritisinduktion depletiert, konnte eine Arthritis verhindert werden. Erst ab dem Tag 20 konnten die ersten Zeichen einer Arthritis beobachtet werden; dieser Zeitpunkt entspricht Tag 26 nach der ersten Tag der Behandlung mit anti-CD22-Cal, somit beginnt nun langsam die Repopulation der B-Zellen. Auch die Depletion der B-Lymphozyten in der Induktionsphase der Arthritis führte zu einer Reduktion

der klinischen Zeichen der Arthritis. Histopathologisch sind die Zeichen einer Arthritis in den B-Zell-depletierten Mäusen reduziert. Die Infiltration durch Granulozyten ins Gelenk ist signifikant reduziert; das gleiche gilt für die Zeichen der chronischen Entzündung wie Makrohagen und Pannusbildung; auch die Knorpeldestruktion wird durch die Depletion der B-Zellen reduziert. Eine Depletion der B-Zellen in der G6PI-induzierten Arthritis nach dem Auftreten der ersten Symptome in der Effektorphase führte nicht zu einer Verbesserung der klinischen Symptome. Dunussi-Joannopoulos *et al.* untersuchten die Effekte der Behandlung mit anti-CD22-Cal in der CIA: Sie immunisierten C57BL/6 IFN- γ ^{-/-} Mäuse mit CII und applizierten anti-CD22-Cal an den Tagen 5 und 10. Die B-Zelldepletion in der CIA verhinderte fast vollständig die klinischen Zeichen einer Arthritis (Dunussi-Joannopoulos *et al.*, 2005). Dunussi-Joannopoulos *et al.* analysierten die Titer CII-spezifische Antikörper des Isotyps IgG2a, um zu analysieren, ob das Fehlen der Antikörper die Ursache für Inhibition der Arthritis ist. Nur an Tag 15 wurden weniger CII-spezifische Antikörper in den behandelten Mäusen gefunden; an den Tagen 25, 35 und 55 waren keine statistisch signifikanten Unterschiede existent (Dunussi-Joannopoulos *et al.*, 2005). Somit schienen die CII-Antikörper keine Rolle für die Entwicklung der Arthritis zu haben.

Auch in der G6PI-induzierten Arthritis sollten die Mechanismen untersucht werden, die zu einer Verbesserung der klinischen Symptome nach Depletion der B-Zellen führen. Um die Rolle der Antikörper zu untersuchen wurden die Titer G6PI-spezifischer Antikörper bestimmt: An Tag 9 waren in den Mäusen, die vor der Induktion der Arthritis mit anti-CD22-Cal behandelt worden waren, die Titer von IgG1, IgG2a, IgG2b und IgG3 im Vergleich zur Kontrollgruppe statistisch signifikant reduziert. Dies korreliert mit den klinischen Symptomen. Die Titer in den Tieren, die in der Induktionsphase mit anti-CD22-Cal behandelt wurden, sind genauso hoch wie in der Kontrollgruppe, was ebenfalls mit den klinischen Symptomen an Tag 9 korreliert. Erst später zeigen diese Mäuse im Vergleich zur Kontrollgruppe eine Verbesserung der klinischen Symptome. An Tag 24 nach Immunisierung hatten die Antikörpertiter in allen drei Gruppen ein einheitliches Niveau erreicht, obwohl die behandelten Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe eine Verbesserung des klinischen Scheregrads aufwiesen. Somit stellt sich die Frage inwieweit die G6PI-spezifischen Antikörper in der G6PI-induzierten Arthritis pathogenetisch relevant sind.

B-Zellen benötigen zur Produktion von Antikörpern T-Zell-Hilfe. Außerdem stellen sie effektive Antigen-präsentierende Zellen dar. Darum wurde die Sekretion der Th17-Zytokine IL-17, IL-22 und IL-6 sowie des Th1-Zytokine IFN- γ und des Th2-Zytokins IL-4 in den Überständen von Splenozytenkulturen mittels ELISA untersucht. Wie gehabt wurde kein IL-4 detektiert. Unerwarteterweise wurde in den Proben der B-Zell-depletierten Mäuse signifikant mehr IL-17, IL-22 und IL-6 gemessen; in den Lymphknoten wurde auch signifikant mehr IFN- γ detektiert. Die Erklärung für dieses zunächst unerwartete Resultat liegt darin, dass in der Milz der B-Zell-depletierten Tiere prozentual gesehen mehr T-Zellen vorhanden sind im Vergleich zu den Kontrollmilzen und konsequenterweise auch mehr T-Zell-Zytokine gemessen werden, wenn die gleiche Anzahl von Zellen für den ELISA in Kultur genommen werden. Deswegen sollte die Antigen-spezifische Produktion der Th17-Zytokine IL-17, TNF- α und RANKL sowie des Th1-Zytokins IFN- γ durchflusszytometrisch untersucht werden. Keine Unterschiede wurden in den Frequenzen der Gesamtzellzahl der CD4⁺CD154⁺IL-17⁺, CD4⁺CD154⁺RANKL⁺ und CD4⁺CD154⁺IFN- γ ⁺ zwischen den drei Gruppen

beobachtet. Interessanterweise war die Frequenz bezogen auf die Gesamtzellzahl der $CD4^+CD154^+TNF-\alpha^+$ in B-Zell-depletierten Mäusen statistisch signifikant reduziert. $TNF-\alpha$ wird von Makrophagen und Monozyten sowie von T-Lymphozyten, Neutrophilen und auch von Endothelzellen produziert. $TNF-\alpha$ ist zumeist das erste proinflammatorische Zytokin, das gebildet wird: bereits nach 30 Minuten ist es im Serum von Mäusen nachweisbar. $TNF-\alpha$ führt zu einer allgemeinen Aktivierung des Immunsystems: es aktiviert und differenziert Makrophagen und T-Zellen; $TNF-\alpha$ induziert die Freisetzung von Wachstumsfaktoren, Chemokinen und Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 und VCAM-1 und führt zur verstärkten Expression von MHC-Molekülen. So ist $TNF-\alpha$ in der Lage durch chemotaktische Eigenschaften zusätzliche Zellen an den Entzündungsherd zu attrahieren und so zur Destruktion des Gelenks beizutragen (Feldmann and Maini, 2001). In der CIA führt die Behandlung mit einem anti- $TNF-\alpha$ -Antikörper zu einer Verbesserung der klinischen Symptome (Piguet et al., 1992; Thorbecke et al., 1992; Williams et al., 1992). Auch in der Klinik werden anti- $TNF-\alpha$ -Antikörper oder lösliche $TNF-\alpha$ -Rezeptoren bereits erfolgreich zur Therapie der RA eingesetzt (Feldmann, 2002). Schubert *et al.* konnten zeigen, dass die Blockade von $TNF-\alpha$ in der G6PI-induzierten Arthritis benefiziell ist, was im Rahmen dieser Arbeit reproduziert werden konnte (Schubert et al., 2004). Somit kann das Fehlen des durch Th-Zellen exprimierten $TNF-\alpha$ ein entscheidender Faktor sein, für die benefiziellen Effekte der B-Zell-Depletion in der G6PI-induzierten Arthritis. Allerdings ist die $TNF-\alpha$ -Produktion gleichermaßen nach B-Zell-Depletion vor Arthritisinduktion und in der Induktionsphase reduziert, was nicht mit dem klinischen Erscheinungsbild korreliert, aber mit der An- und Abwesenheit der B-Zellen. Ist die fehlende Expression von $TNF-\alpha$ durch Th-Zellen nun darauf zurückzuführen, dass B-Zellen als APC für das Priming der T-Zellen fehlen? Um diese Frage weiter zu untersuchen wurde die Proliferation durch Einbau von [3H]-Thymidin gemessen: in den drainierenden Lymphknoten, war die Proliferation nach Stimulation mit G6PI in den B-Zell-depletierten Mäusen signifikant geringer als in der Kontrollgruppe; interessanterweise war auch beim Vergleich der unstimulierten Proben ein geringerer Einbau von [3H]-Thymidin und damit eine geringere Proliferation in den behandelten Tieren zu sehen. In der Milz waren die Effekte nicht ganz so signifikant, was mit der nicht ganz so effektiven Depletion der B-Zellen durch anti-CD22-Cal korreliert. Sind diese Resultate darauf zurückzuführen, dass anti-CD22-Cal auch die T-Zellen beeinflusst oder einen anderen T-Zell-intrinsischen Effekt oder proliferieren die T-Zellen weniger, da die B-Zellen als effektive Antigen-präsentierende Zellen fehlen und das *Priming* deswegen nicht so effektiv abläuft? Es konnte bereits gezeigt werden, dass anti-CD22-Cal T-Zellen nicht beeinflusst (Dunussi-Joannopoulos et al., 2005).

Auch Tanaka-Watanabe und Kollegen haben die Rolle der B-Zellen in der G6PI-induzierten Arthritis zu untersucht (Tanaka-Watanabe et al., 2009): Sie nutzen dazu den adoptiven Transfer von Milzzellen aus G6PI-immunisierten DBA/1-Mäusen zusammen mit G6PI in SCID-Mäuse. Beim Transfer von CD19-depletierten Milzzellen aus arthritischen Mäusen zusammen mit G6PI konnte keine Arthritis in SCID-Mäusen induziert werden und keine Produktion G6PI-spezifischer Antikörper nachgewiesen werden (Tanaka-Watanabe et al., 2009). Um die Relevanz der Antikörper in der Pathogenese der G6PI-induzierten Arthritis zu untersuchen, wurden CD19-depletierte Milzzellen zusammen mit G6PI-spezifischen Antikörpern und G6PI in SCID-Mäuse transferiert, was in der Entwicklung einer Arthritis resultierte. Wurden nur die G6PI-spezifischen Antikörper mit G6PI transferiert entwickelte sich keine

Arthritis (Tanaka-Watanabe et al., 2009). Tanaka-Watanabe und Kollegen schlussfolgern daraus, dass B-Zellen vor allen Dingen als Antikörperproduzenten an der Pathogenese der G6PI-induzierten Arthritis beteiligt sind. Weiterhin wurde die Antigen-spezifische Expression von TNF- α mittels *cytometric bead assay in vitro* untersucht. Nach Depletion der B-Zellen war die Expression von TNF- α *in vitro* leicht erhöht. Um die Rolle der Antikörper näher zu untersuchen, wurden CD19-depletierte Milzzellen zusammen mit IgG von arthritischen DBA/1 Mäusen mit und ohne Blockade von Fc-Rezeptoren *in vitro* kultiviert und die Produktion von TNF- α gemessen. IgG löste eine schwache Produktion von TNF- α aus, die durch die Blockade von Fc-Rezeptoren unterdrückt wurde. Die *in vivo* Blockade von TNF- α mit einem Antikörper führte zu einer Verbesserung der klinischen Symptome in der SCID-Arthritis (Tanaka-Watanabe et al., 2009). Um die Funktion der B-Zellen als APC zu untersuchen wurden CD4⁺ T-Zellen und CD19⁺ B-Zellen mit G6PI kokultiviert und die Produktion IL-17 und IFN- γ gemessen. Sowohl IL-17 als auch IFN- γ wurden in der Gegenwart der B-Zellen stärker exprimiert, was für die wichtige Funktion von B-Zellen als APC spricht (Tanaka-Watanabe et al., 2009). Die von Tanaka-Watanabe erhaltenen Befunde und die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen dafür, dass B-Zellen nicht allein als Antikörperproduzenten zur Entstehung der G6PI-induzierten Arthritis beitragen, sondern auch als Antigen-präsentierende Zellen wichtig für das *Priming* der T-Zellen sind.

4.6. Ausblick

Die rheumatoide Arthritis ist eine multifaktorielle komplexe Erkrankung mit vermutlich autoimmuner Pathogenese, die 1 % der Weltbevölkerung betrifft, und zu enormen Einschränkungen der Lebensqualität führt. Tiermodelle für die rheumatoide Arthritis stellen eine wichtige Möglichkeit dar die pathogenetischen Mechanismen zu verstehen und somit neue therapeutische Ansatzpunkte zu liefern. Ein solches Modell stellt die Glukose-6-phosphat Isomerase-induzierte Arthritis in DBA/1 Mäusen dar. Im Rahmen dieser Arbeit konnte durch die Beschreibung immunodominanter T-Zellepitope die pathogenetische Relevanz von T-Zellen in der G6PI-induzierten Arthritis unterstrichen werden. Darüber hinaus konnte Th17-Zellen eine wichtige Rolle in der Entstehung der Arthritis zugeschrieben werden. Es konnte aber auch gezeigt werden, dass die strikte Einteilung nach Th1, Th2 und Th17 *in vivo* nicht haltbar ist. Zusammengenommen mit der Tatsache, dass beinahe täglich neue Th-Subpopulation wie folliculäre Th-Zellen (Tfh) oder auch LTi-Zellen beschrieben werden, sollten weitergehende Bestrebungen dahin gehen, ein möglichst breites Spektrum an Zytokinen zu untersuchen, um die Modularität und Plastizität von T- und auch anderen Zelltypen *in vivo* vollständig zu erfassen. Auch die Rolle von $\gamma\delta$ -T-Zellen oder CD8⁺-T-Zellen ist ungeklärt in der G6PI-induzierten Arthritis.

B-Zellen und die von ihnen produzierten Antikörper sind unabdingbar für die Pathogenese der G6PI-induzierten Arthritis. Allerdings kann in der G6PI-induzierten Arthritis die Arthritis nicht allein durch Antikörper übertragen werden wie in der K/BxN-Arthritis. Obwohl erste Hinweise vorliegen, dass in der G6PI-induzierten Arthritis weniger Antikörper im Vergleich zum transgenen Modell gebildet werden, die auch weniger verschiedene Epitope mit geringerer Affinität erkennen, müssen in der Zukunft die qualitativen und quantitativen Unterschiede näher analysiert werden.

Summary

One aim of this thesis was to analyze the relevance of Th17 cells in the pathogenesis of G6PI-induced arthritis. Therefore the modulation of arthritis severity and incidence by antibodies or soluble receptors specific for different Th17 cytokines was examined in G6PI-induced arthritis. Blocking of IL-17, IL-23p19 and TNF- α showed disease mitigating effects. RANKL could be identified as an additional cytokine produced in G6PI-induced arthritis.

Another focus was the existence of polyfunctional T cells, e.g. T cells that produce more than one cytokine at the same time, representative for different T helper cell lines like Th1 and Th17 cells. IL-17 and IFN- γ double producers could be identified in G6PI-induced arthritis. A possible explanation for this finding could be that *in vivo* T cells are more flexible than *in vitro*.

In this work two immunodominant peptides (G6PI₈₅₋₉₉ and G6PI₄₆₉₋₄₈₃) derived from Glucose-6-phosphate Isomerase could be identified in context of I-A^q. Immunization of mice with one of these peptides induced arthritis. This is the first report that immunization with a self-peptide could induce arthritis in mice. These findings emphasize the pathogenetic relevance of T cells in G6PI-induced arthritis and make a detailed analysis of G6PI-specific T cells by tetramers feasible. Additionally the identification of immunodominant arthritogenic peptides opens several novel possibilities including attempts at antigen-specific therapies such as the induction of tolerance independent of their status of activation.

As part of this work SJL mice were identified to be susceptible for G6PI-induced arthritis. G6PI-induced arthritis in SJL mice was compared to G6PI-induced arthritis in DBA/1 mice.

In the current report the way B cells contribute to disease pathogenesis in G6PI-induced arthritis was examined. Depletion of B cells before disease induction or in the induction phase of G6PI-induced arthritis ameliorated clinical symptoms. Interestingly, in B cell depleted mice the frequency of CD4⁺CD154⁺TNF- α T cells was significantly reduced compared to control animals, the result correlates with the relevance of TNF- α for arthritis pathogenesis. This finding indicates that B cells contribute to disease pathogenesis as antigen-presenting cells and make B cells again an interesting target for therapies for rheumatoid arthritis.

Abkürzungsverzeichnis

ACR	<i>American College of Rheumatology</i>
Ag	Antigen
AIA	Antigen-induzierte Arthritis
Ak	Antikörper
AMF	<i>Autocrine Motility Factor</i>
AMFR	<i>Autocrine Motility Factor Receptor</i> ; Synonym: gp78
AP	Alkalische Phosphatase
APC	<i>antigen presenting cell</i> (dt; Antigen-präsentierende Zelle)
APRIL	<i>a proliferation-induced ligand</i>
BAFF	<i>B cell activating factor</i>
BMDC	<i>bone marrow derived Dendritic cell</i> (dt; Knochenmarks-generierte Dendritische Zelle)
BP	<i>bandpass</i>
BSA	<i>bovine serum albumine</i> (dt; bovines Serumalbumin)
Cal	N-Acetyl- γ -Calicheamicin Dimethylsäure
CII	<i>collagen type II</i> (dt; Kollagen Typ II)
CCP	<i>cyclic citrullinated peptides</i> (dt; zyklisch citrullinierte Peptide)
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CFA	<i>complete Freund's adjuvant</i> (dt; komplettes Freund'sches Adjuvanz)
CIA	<i>collagen induced arthritis</i> (dt; Kollagen-induzierte Arthritis)
cpm	<i>counts per minute</i>
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4</i>
d5	Tag 5 nach Immunisierung
DC	<i>dendritic cell</i> (dt; Dendritische Zelle)
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DAG	Diacylglycerol
DMARDs	<i>disease-modifying antirheumatic drugs</i> (dt; Krankheits-modifizierende anti-rheumatische Medikamente)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleinacid</i> (dt; Desoxyribonukleinsäure)
DTT	Di-thio-threitol
EAE	Experimentelle autoimmune Encephalomyelitis
EBV	<i>Epstein Barr virus</i>
EDTA	Ethylen-diamino-tetra-essigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ER	Endoplasmatisches Reticulum
Erk	<i>Extracellular regulated kinase</i> ; extrazellulär regulierte Kinase
FACS	<i>Fluorescence-activated-cell-sorting</i>
Fc	<i>Fragment cristallizable</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i> ; fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein-iso-thio-cyanat
FLS	Fibroblasten-ähnliche Synoviozyten
FSC	<i>forwardscatter</i> (dt; Vorwärtsstreulicht)
G6PI	Glukose-6-Phosphat-Isomerase
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony stimulating factor</i> (dt; Granulozyten- Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor)

gp78	Glycoprotein von 78 kDa Größe; Synonym AMFR
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCgp39	<i>human cartilage glycoprotein 39</i>
H&E	Hämatoxylin und Eosin
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethan-sulfonsäure
HLA	<i>human leukocyte antigen</i> (dt; humanes Leukozyten-Antigen)
hu	human
hsp	<i>heat shock protein</i>
ICOS	<i>inducible costimulator</i>
IFN- γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
IPTG	Isopropyl-Thio- β -D-Galactopyranosid
KCl	Kaliumchlorid
kDa	kilo Dalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
KHCO ₃	Kaliumhydrogencarbonat
LB	Luria Broth Medium
LP	<i>longpass</i>
LPS	Lipopolysaccharid
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
m	murin
mA	Milliampere
MACS	<i>Magnetic-cell-sorting</i>
MF	<i>Maturation Factor</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minute
MMP	Matrix-metallo-proteinase
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MS	Multiple Sklerose
MTX	Methotrexat
MWCO	<i>molecular weight cut off</i>
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Natriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
NLK	Neuroleukin
nm	Nanometer
NOD	<i>non obese diabetes</i>
NTA	Nickelnitilotetraacetat
p	phosphoryliert
PAD	Peptidiyl Arginin Desiminase
PBA	PBS-BSA-Azid

PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i> (dt; mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> (dt; Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PD-1	<i>programmed death-1</i>
PerCP	Peridinin Chlorophyllprotein
pi	Propidium-Iodid
PI3K	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-Myristate-13-Acetat
POD	Peroxidase
pmol	pico mol (= 1 x 10 ⁻¹² mol)
PMT	Photomultiplier
PTPN22	<i>protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22</i>
r	recombinant
R	Rezeptor
RA	Rheumatoide Arthritis
RAG	<i>recombination activating gene</i>
RANKL	<i>receptor activator of NF-κB ligand</i>
RF	Rheumafaktor
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (dt; Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
ROR	<i>retinoid acid receptor-related orphan receptor</i>
rpm	<i>rotations per minute</i>
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute-1640 (Kulturmedium)
RTX	Rituximab
S	soluble
S	Svedberg-Einheit
SA-PE	Streptavidin-Phycoerythrin
s.c.	subcutan
SCID	<i>severe combined immunodeficiency</i>
SDF-1	<i>Stromal cell-derived factor 1</i>
SDS-PAGE	<i>Sodiumdodecylsulfate polyacrylamid gelelectrophoresis</i>
SEM	<i>Standard error of mean</i>
sec	Sekunden
SLE	Systemischer Lupus Erythemathodes
SNP	Single-Nukleotid-Polymorphismen
SPF	<i>specific pathogen free</i> (dt. Spezifiziert pathogen frei)
SSC	<i>sidescatter</i> (dt; Seitwärtsstreulicht)
Tab.	Tabelle
TBS	<i>Tris-buffered saline</i> (dt; Tris-gepufferte Kochsalzlösung)
TCR	<i>T cell receptor</i>
Tg	transgen
Th	T-Helfer
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
Treg	regulatorische T-Zelle
TTBS	Tween-TBS
ÜN	über Nacht
UV	ultraviolett

V	Volt
VID	<i>viability dye</i>
v/v	<i>volume per volume</i> (dt; Volumen pro Volumen)
w/v	<i>weight per volume</i> (dt; Masse pro Volumen)

Literaturverzeichnis

Aggarwal, S., Ghilardi, N., Xie, M.H., de Sauvage, F.J., and Gurney, A.L. (2003). Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem* 278, 1910-1914.

Aggarwal, S., Xie, M.H., Maruoka, M., Foster, J., and Gurney, A.L. (2001). Acinar cells of the pancreas are a target of interleukin-22. *J Interferon Cytokine Res* 21, 1047-1053.

Alonzi, T., Fattori, E., Lazzaro, D., Costa, P., Probert, L., Kollias, G., De Benedetti, F., Poli, V., and Ciliberto, G. (1998). Interleukin 6 is required for the development of collagen-induced arthritis. *J Exp Med* 187, 461-468.

Anderson, D.M., Maraskovsky, E., Billingsley, W.L., Dougall, W.C., Tometsko, M.E., Roux, E.R., Teepe, M.C., DuBose, R.F., Cosman, D., and Galibert, L. (1997). A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* 390, 175-179.

Anthony, R.M., Rutitzky, L.I., Urban, J.F., Jr., Stadecker, M.J., and Gause, W.C. (2007). Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nat Rev Immunol* 7, 975-987.

Arnett, F.C., Edworthy, S.M., Bloch, D.A., McShane, D.J., Fries, J.F., Cooper, N.S., Healey, L.A., Kaplan, S.R., Liang, M.H., Luthra, H.S., *et al.* (1988). The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 31, 315-324.

Arvidson, N.G., Gudbjornsson, B., Elfman, L., Ryden, A.C., Totterman, T.H., and Hallgren, R. (1994). Circadian rhythm of serum interleukin-6 in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 53, 521-524.

Aujla, S.J., Chan, Y.R., Zheng, M., Fei, M., Askew, D.J., Pociask, D.A., Reinhart, T.A., McAllister, F., Edeal, J., Gaus, K., *et al.* (2008). IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nat Med* 14, 275-281.

Balint, G.P., and Balint, P.V. (2004). Felty's syndrome. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 18, 631-645.

Basu, D., Horvath, S., Matsumoto, I., Fremont, D.H., and Allen, P.M. (2000). Molecular basis for recognition of an arthritic peptide and a foreign epitope on distinct MHC molecules by a single TCR. *J Immunol* 164, 5788-5796.

Batten, M., Li, J., Yi, S., Kljavin, N.M., Danilenko, D.M., Lucas, S., Lee, J., de Sauvage, F.J., and Ghilardi, N. (2006). Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17-producing T cells. *Nat Immunol* 7, 929-936.

Bayrak, S., Holmdahl, R., Travers, P., Lauster, R., Hesse, M., Dolling, R., and Mitchison, N.A. (1997). T cell response of I-Aq mice to self type II collagen: meshing of the binding motif of the I-Aq molecule with repetitive sequences results in autoreactivity to multiple epitopes. *Int Immunol* 9, 1687-1699.

Behlke, M.A., Chou, H.S., Huppi, K., and Loh, D.Y. (1986). Murine T-cell receptor mutants with deletions of beta-chain variable region genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 767-771.

- Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T.B., Oukka, M., Weiner, H.L., and Kuchroo, V.K. (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* *441*, 235-238.
- Betts, M.R., Nason, M.C., West, S.M., De Rosa, S.C., Migueles, S.A., Abraham, J., Lederman, M.M., Benito, J.M., Goepfert, P.A., Connors, M., *et al.* (2006). HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells. *Blood* *107*, 4781-4789.
- Binstadt, B.A., Patel, P.R., Alencar, H., Nigrovic, P.A., Lee, D.M., Mahmood, U., Weissleder, R., Mathis, D., and Benoist, C. (2006). Particularities of the vasculature can promote the organ specificity of autoimmune attack. *Nat Immunol* *7*, 284-292.
- Bockermann, R., Schubert, D., Kamradt, T., and Holmdahl, R. (2005). Induction of a B-cell-dependent chronic arthritis with glucose-6-phosphate isomerase. *Arthritis Res Ther* *7*, R1316-1324.
- Boe, A., Baiocchi, M., Carbonatto, M., Papoian, R., and Serlupi-Crescenzi, O. (1999). Interleukin 6 knock-out mice are resistant to antigen-induced experimental arthritis. *Cytokine* *11*, 1057-1064.
- Brennan, F.M., Hayes, A.L., Ciesielski, C.J., Green, P., Foxwell, B.M., and Feldmann, M. (2002). Evidence that rheumatoid arthritis synovial T cells are similar to cytokine-activated T cells: involvement of phosphatidylinositol 3-kinase and nuclear factor kappaB pathways in tumor necrosis factor alpha production in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* *46*, 31-41.
- Brennan, F.M., Smith, N.M., Owen, S., Li, C., Amjadi, P., Green, P., Andersson, A., Palfreeman, A.C., Hillyer, P., Foey, A., *et al.* (2008). Resting CD4+ effector memory T cells are precursors of bystander activated effectors: a surrogate model of rheumatoid arthritis synovial T-cell function. *Arthritis Res Ther* *10*, R36.
- Browning, J.L. (2006). B cells move to centre stage: novel opportunities for autoimmune disease treatment. *Nat Rev Drug Discov* *5*, 564-576.
- Brüstle, A., Heink, S., Huber, M., Rosenplanter, C., Stadelmann, C., Yu, P., Arpaia, E., Mak, T.W., Kamradt, T., and Lohoff, M. (2007). The development of inflammatory T(H)-17 cells requires interferon-regulatory factor 4. *Nat Immunol* *8*, 958-966.
- Cantaert, T., De Rycke, L., Bongartz, T., Matteson, E.L., Tak, P.P., Nicholas, A.P., and Baeten, D. (2006). Citrullinated proteins in rheumatoid arthritis: crucial...but not sufficient! *Arthritis Rheum* *54*, 3381-3389.
- Carlsen, S., Hansson, A.S., Olsson, H., Heinegard, D., and Holmdahl, R. (1998). Cartilage oligomeric matrix protein (COMP)-induced arthritis in rats. *Clin Exp Immunol* *114*, 477-484.
- Cassatella, M.A., Gasperini, S., and Russo, M.P. (1997). Cytokine expression and release by neutrophils. *Ann N Y Acad Sci* *832*, 233-242.
- Chabaud, M., Durand, J.M., Buchs, N., Fossiez, F., Page, G., Frappart, L., and Miossec, P. (1999). Human interleukin-17: A T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum* *42*, 963-970.

- Chabaud, M., Garnero, P., Dayer, J.M., Guerne, P.A., Fossiez, F., and Miossec, P. (2000). Contribution of interleukin 17 to synovium matrix destruction in rheumatoid arthritis. *Cytokine* 12, 1092-1099.
- Chan, O., and Shlomchik, M.J. (1998). A new role for B cells in systemic autoimmunity: B cells promote spontaneous T cell activation in MRL-lpr/lpr mice. *J Immunol* 160, 51-59.
- Chan, O.T., Hannum, L.G., Haberman, A.M., Madaio, M.P., and Shlomchik, M.J. (1999a). A novel mouse with B cells but lacking serum antibody reveals an antibody-independent role for B cells in murine lupus. *J Exp Med* 189, 1639-1648.
- Chan, O.T., Madaio, M.P., and Shlomchik, M.J. (1999b). B cells are required for lupus nephritis in the polygenic, Fas-intact MRL model of systemic autoimmunity. *J Immunol* 163, 3592-3596.
- Chan, O.T., Madaio, M.P., and Shlomchik, M.J. (1999c). The central and multiple roles of B cells in lupus pathogenesis. *Immunol Rev* 169, 107-121.
- Chaput, M., Claes, V., Portetelle, D., Cludts, I., Cravador, A., Burny, A., Gras, H., and Tartar, A. (1988). The neurotrophic factor neuroleukin is 90% homologous with phosphohexose isomerase. *Nature* 332, 454-455.
- Chattopadhyay, P.K., Yu, J., and Roederer, M. (2005). A live-cell assay to detect antigen-specific CD4+ T cells with diverse cytokine profiles. *Nat Med* 11, 1113-1117.
- Chen, Y., Langrish, C.L., McKenzie, B., Joyce-Shaikh, B., Stumhofer, J.S., McClanahan, T., Blumenschein, W., Churakovsa, T., Low, J., Presta, L., *et al.* (2006). Anti-IL-23 therapy inhibits multiple inflammatory pathways and ameliorates autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest* 116, 1317-1326.
- Cho, M.L., Yoon, C.H., Hwang, S.Y., Park, M.K., Min, S.Y., Lee, S.H., Park, S.H., and Kim, H.Y. (2004). Effector function of type II collagen-stimulated T cells from rheumatoid arthritis patients: crosstalk between T cells and synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 50, 776-784.
- Chu, C.Q., Song, Z., Mayton, L., Wu, B., and Wooley, P.H. (2003). IFN γ deficient C57BL/6 (H-2b) mice develop collagen induced arthritis with predominant usage of T cell receptor V β 6 and V β 8 in arthritic joints. *Ann Rheum Dis* 62, 983-990.
- Chung, D.R., Kasper, D.L., Panzo, R.J., Chitnis, T., Grusby, M.J., Sayegh, M.H., and Tzianabos, A.O. (2003). CD4+ T cells mediate abscess formation in intra-abdominal sepsis by an IL-17-dependent mechanism. *J Immunol* 170, 1958-1963.
- Cook, A.D., Braine, E.L., Campbell, I.K., Rich, M.J., and Hamilton, J.A. (2001). Blockade of collagen-induced arthritis post-onset by antibody to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF): requirement for GM-CSF in the effector phase of disease. *Arthritis Res* 3, 293-298.
- Coffman, R.L., and Carty, J. (1986). A T cell activity that enhances polyclonal IgE production and its inhibition by interferon-gamma. *J Immunol* 136, 949-954.

- Cope, A.P., and Sonderstrup, G. (1998). Evaluating candidate autoantigens in rheumatoid arthritis. *Springer Semin Immunopathol* 20, 23-39.
- Corr, M., and Crain, B. (2002). The role of FcγR signaling in the K/B x N serum transfer model of arthritis. *J Immunol* 169, 6604-6609.
- Courtenay, J.S., Dallman, M.J., Dayan, A.D., Martin, A., and Mosedale, B. (1980). Immunisation against heterologous type II collagen induces arthritis in mice. *Nature* 283, 666-668.
- Cremer, M.A., Ye, X.J., Terato, K., Owens, S.W., Seyer, J.M., and Kang, A.H. (1994). Type XI collagen-induced arthritis in the Lewis rat. Characterization of cellular and humoral immune responses to native types XI, V, and II collagen and constituent alpha-chains. *J Immunol* 153, 824-832.
- Crowley, M.T., Reilly, C.R., and Lo, D. (1999). Influence of lymphocytes on the presence and organization of dendritic cell subsets in the spleen. *J Immunol* 163, 4894-4900.
- Cua, D.J., Sherlock, J., Chen, Y., Murphy, C.A., Joyce, B., Seymour, B., Lucian, L., To, W., Kwan, S., Churakova, T., *et al.* (2003). Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 421, 744-748.
- Cyster, J.G. (2005). Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs. *Annu Rev Immunol* 23, 127-159.
- Damle, N.K., and Frost, P. (2003). Antibody-targeted chemotherapy with immunoconjugates of calicheamicin. *Curr Opin Pharmacol* 3, 386-390.
- Darrah, P.A., Patel, D.T., De Luca, P.M., Lindsay, R.W., Davey, D.F., Flynn, B.J., Hoff, S.T., Andersen, P., Reed, S.G., Morris, S.L., *et al.* (2007). Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against *Leishmania major*. *Nat Med* 13, 843-850.
- de Jong, H., Berlo, S.E., Hombrink, P., Otten, H.G., van Eden, W., Lafeber, F.P., Heurkens, A.H., Bijlsma, J.W., Glant, T.T., and Prakken, B. (2009). Cartilage proteoglycan aggrecan epitopes induce proinflammatory autoreactive T cell responses in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*.
- de Vries, N., Tijssen, H., van Riel, P.L., and van de Putte, L.B. (2002). Reshaping the shared epitope hypothesis: HLA-associated risk for rheumatoid arthritis is encoded by amino acid substitutions at positions 67-74 of the HLA-DRB1 molecule. *Arthritis Rheum* 46, 921-928.
- Desgeorges, A., Gabay, C., Silacci, P., Novick, D., Roux-Lombard, P., Grau, G., Dayer, J.M., Vischer, T., and Guerne, P.A. (1997). Concentrations and origins of soluble interleukin 6 receptor-alpha in serum and synovial fluid. *J Rheumatol* 24, 1510-1516.
- Despres, N., Boire, G., Lopez-Longo, F.J., and Menard, H.A. (1994). The Sa system: a novel antigen-antibody system specific for rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 21, 1027-1033.
- Dörner, T., Egerer, K., Feist, E., and Burmester, G.R. (2004). Rheumatoid factor revisited. *Curr Opin Rheumatol* 16, 246-253.

- du Montcel, S.T., Michou, L., Petit-Teixeira, E., Osorio, J., Lemaire, I., Lasbleiz, S., Pierlot, C., Quillet, P., Bardin, T., Prum, B., *et al.* (2005). New classification of HLA-DRB1 alleles supports the shared epitope hypothesis of rheumatoid arthritis susceptibility. *Arthritis Rheum* 52, 1063-1068.
- Dunussi-Joannopoulos, K., Hancock, G.E., Kunz, A., Hegen, M., Zhou, X.X., Sheppard, B.J., Lamothe, J., Li, E., Ma, H.L., Hamann, P.R., *et al.* (2005). B-cell depletion inhibits arthritis in a collagen-induced arthritis (CIA) model, but does not adversely affect humoral responses in a respiratory syncytial virus (RSV) vaccination model. *Blood* 106, 2235-2243.
- Edwards, J.C., Szczepanski, L., Szechinski, J., Filipowicz-Sosnowska, A., Emery, P., Close, D.R., Stevens, R.M., and Shaw, T. (2004). Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 350, 2572-2581.
- Erickson, R.P., Tachibana, D.K., Herzenberg, L.A., and Rosenberg, L.T. (1964). A Single Gene Controlling Hemolytic Complement and a Serum Antigen in the Mouse. *J Immunol* 92, 611-615.
- Fang, S., Ferrone, M., Yang, C., Jensen, J.P., Tiwari, S., and Weissman, A.M. (2001). The tumor autocrine motility factor receptor, gp78, is a ubiquitin protein ligase implicated in degradation from the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 14422-14427.
- Feldmann, M. (2002). Development of anti-TNF therapy for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol* 2, 364-371.
- Feldmann, M., and Maini, R.N. (2001). Anti-TNF alpha therapy of rheumatoid arthritis: what have we learned? *Annu Rev Immunol* 19, 163-196.
- Firestein, G.S. (2003). Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 423, 356-361.
- Fossiez, F., Djossou, O., Chomarat, P., Flores-Romo, L., Ait-Yahia, S., Maat, C., Pin, J.J., Garrone, P., Garcia, E., Saeland, S., *et al.* (1996). T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med* 183, 2593-2603.
- Fournier, C. (2005). Where do T cells stand in rheumatoid arthritis? *Joint Bone Spine* 72, 527-532.
- Freitag, J. (2006). Expression und funktionelle Bedeutung des gp78 auf Immunzellen. In *Biologischpharmazeutische Fakultät (Jena, Friedrich-Schiller-Universität)*.
- Frentsch, M., Arbach, O., Kirchhoff, D., Moewes, B., Worm, M., Rothe, M., Scheffold, A., and Thiel, A. (2005). Direct access to CD4+ T cells specific for defined antigens according to CD154 expression. *Nat Med* 11, 1118-1124.
- Fugger, L., Rothbard, J.B., and Sonderstrup-McDevitt, G. (1996). Specificity of an HLA-DRB1*0401-restricted T cell response to type II collagen. *Eur J Immunol* 26, 928-933.
- Gammon, G., Klotz, J., Ando, D., and Sercarz, E.E. (1990). The T cell repertoire to a multideterminant antigen. Clonal heterogeneity of the T cell response, variation between syngeneic individuals, and in vitro selection of T cell specificities. *J Immunol* 144, 1571-1577.
- Genovese, M.C., Schiff, M., Luggen, M., Becker, J.C., Aranda, R., Teng, J., Li, T., Schmidely, N., Le Bars, M., and Dougados, M. (2008). Efficacy and safety of the selective co-stimulation modulator

abatacept following 2 years of treatment in patients with rheumatoid arthritis and an inadequate response to anti-tumour necrosis factor therapy. *Ann Rheum Dis* 67, 547-554.

Glant, T.T., Finnegan, A., and Mikecz, K. (2003). Proteoglycan-induced arthritis: immune regulation, cellular mechanisms, and genetics. *Crit Rev Immunol* 23, 199-250.

Goeb, V., Thomas-L'Otellier, M., Daveau, R., Charlionet, R., Fardellone, P., Le Loet, X., Tron, F., Gilbert, D., and Vittecoq, O. (2009). Candidate autoantigens identified by mass spectrometry in early rheumatoid arthritis are chaperones and citrullinated glycolytic enzymes. *Arthritis Res Ther* 11, R38.

Goldberg, M., Nativ, O., Luknar-Gabor, N., Agar, G., Beer, Y., and Katz, Y. (2009). Synergism between tumor necrosis factor alpha and interleukin-17 to induce IL-23 p19 expression in fibroblastlike synoviocytes. *Mol Immunol*.

Gonnella, P.A., Waldner, H.P., and Weiner, H.L. (2001). B cell-deficient (μ MT) mice have alterations in the cytokine microenvironment of the gut-associated lymphoid tissue (GALT) and a defect in the low dose mechanism of oral tolerance. *J Immunol* 166, 4456-4464.

Gourraud, P.A., Boyer, J.F., Barnetche, T., Abbal, M., Cambon-Thomsen, A., Cantagrel, A., and Constantin, A. (2006). A new classification of HLA-DRB1 alleles differentiates predisposing and protective alleles for rheumatoid arthritis structural severity. *Arthritis Rheum* 54, 593-599.

Gran, B., Chu, N., Zhang, G.X., Yu, S., Li, Y., Chen, X.H., Kamoun, M., and Rostami, A. (2004a). Early administration of IL-12 suppresses EAE through induction of interferon-gamma. *J Neuroimmunol* 156, 123-131.

Gran, B., Zhang, G.X., and Rostami, A. (2004b). Role of the IL-12/IL-23 system in the regulation of Tcell responses in central nervous system inflammatory demyelination. *Crit Rev Immunol* 24, 111-128.

Gran, B., Zhang, G.X., Yu, S., Li, J., Chen, X.H., Ventura, E.S., Kamoun, M., and Rostami, A. (2002). IL-12p35-deficient mice are susceptible to experimental autoimmune encephalomyelitis: evidence for redundancy in the IL-12 system in the induction of central nervous system autoimmune demyelination. *J Immunol* 169, 7104-7110.

Grevers, L.C., van Lent, P.L., Koenders, M.I., Walgreen, B., Sloetjes, A.W., Nimmerjahn, F., Sijf Verbeek, J., and van den Berg, W.B. (2009). Different amplifying mechanisms of interleukin-17 and interferon-gamma in Fcgamma receptor-mediated cartilage destruction in murine immune complex-mediated arthritis. *Arthritis Rheum* 60, 396-407.

Grogan, J.L., Kramer, A., Nogai, A., Dong, L., Ohde, M., Schneider-Mergener, J., and Kamradt, T. (1999). Cross-reactivity of myelin basic protein-specific T cells with multiple microbial peptides: experimental autoimmune encephalomyelitis induction in TCR transgenic mice. *J Immunol* 163, 3764-3770.

Guan, P., Hattotuwigama, C.K., Doytchinova, I.A., and Flower, D.R. (2006). MHCpred 2.0: an updated quantitative T-cell epitope prediction server. *Appl Bioinformatics* 5, 55-61.

- Guerne, P.A., Zuraw, B.L., Vaughan, J.H., Carson, D.A., and Lotz, M. (1989). Synovium as a source of interleukin 6 in vitro. Contribution to local and systemic manifestations of arthritis. *J Clin Invest* **83**, 585-592.
- Gurney, M.E., Heinrich, S.P., Lee, M.R., and Yin, H.S. (1986). Molecular cloning and expression of neuroleukin, a neurotrophic factor for spinal and sensory neurons. *Science* **234**, 566-574.
- Happel, K.I., Zheng, M., Young, E., Quinton, L.J., Lockhart, E., Ramsay, A.J., Shellito, J.E., Schurr, J.R., Bagby, G.J., Nelson, S., *et al.* (2003). Cutting edge: roles of Toll-like receptor 4 and IL-23 in IL-17 expression in response to *Klebsiella pneumoniae* infection. *J Immunol* **170**, 4432-4436.
- Harrington, L.E., Hatton, R.D., Mangan, P.R., Turner, H., Murphy, T.L., Murphy, K.M., and Weaver, C.T. (2005). Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* **6**, 1123-1132.
- Hemmer, B., Gran, B., Zhao, Y., Marques, A., Pascal, J., Tzou, A., Kondo, T., Cortese, I., Bielekova, B., Straus, S.E., *et al.* (1999). Identification of candidate T-cell epitopes and molecular mimics in chronic Lyme disease. *Nat Med* **5**, 1375-1382.
- Her, M., Kim, D., Oh, M., Jeong, H., and Choi, I. (2009). Increased expression of soluble inducible costimulator ligand (ICOSL) in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* **18**, 501-507.
- Herve, C.A., Wait, R., and Venables, P.J. (2003). Glucose-6-phosphate isomerase is not a specific autoantigen in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* **42**, 986-988.
- Hestdal, K., Ruscetti, F.W., Ihle, J.N., Jacobsen, S.E., Dubois, C.M., Kopp, W.C., Longo, D.L., and Keller, J.R. (1991). Characterization and regulation of RB6-8C5 antigen expression on murine bone marrow cells. *J Immunol* **147**, 22-28.
- Hill, J.A., Bell, D.A., Brintnell, W., Yue, D., Wehrli, B., Jevnikar, A.M., Lee, D.M., Hueber, W., Robinson, W.H., and Cairns, E. (2008). Arthritis induced by posttranslationally modified (citruinated) fibrinogen in DR4-IE transgenic mice. *J Exp Med* **205**, 967-979.
- Hoet, R.M., Boerbooms, A.M., Arends, M., Ruiters, D.J., and van Venrooij, W.J. (1991a). Antiperinuclear factor, a marker autoantibody for rheumatoid arthritis: colocalisation of the perinuclear factor and profilaggrin. *Ann Rheum Dis* **50**, 611-618.
- Hoet, R.M., Voorsmit, R.A., and Van Venrooij, W.J. (1991b). The perinuclear factor, a rheumatoid arthritis-specific autoantigen, is not present in keratohyalin granules of cultured buccal mucosa cells. *Clin Exp Immunol* **84**, 59-65.
- Hofstetter, H.H., Ibrahim, S.M., Koczan, D., Kruse, N., Weishaupt, A., Toyka, K.V., and Gold, R. (2005). Therapeutic efficacy of IL-17 neutralization in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cell Immunol* **237**, 123-130.
- Holm, L., Frech, K., Dzhambazov, B., Holmdahl, R., Kihlberg, J., and Linusson, A. (2007). Quantitative structure-activity relationship of peptides binding to the class II major histocompatibility complex molecule Aq associated with autoimmune arthritis. *J Med Chem* **50**, 2049-2059.

- Holmdahl, R., Bockermann, R., Backlund, J., and Yamada, H. (2002). The molecular pathogenesis of collagen-induced arthritis in mice--a model for rheumatoid arthritis. *Ageing Res Rev* 1, 135-147.
- Holmdahl, R., Jansson, L., Andersson, M., and Larsson, E. (1988). Immunogenetics of type II collagen autoimmunity and susceptibility to collagen arthritis. *Immunology* 65, 305-310.
- Holmdahl, R., Jansson, L., Larsson, A., and Jonsson, R. (1990). Arthritis in DBA/1 mice induced with passively transferred type II collagen immune serum. Immunohistopathology and serum levels of antitype II collagen auto-antibodies. *Scand J Immunol* 31, 147-157.
- Holmdahl, R., Klareskog, L., Rubin, K., Larsson, E., and Wigzell, H. (1985). T lymphocytes in collagen II-induced arthritis in mice. Characterization of arthritogenic collagen II-specific T-cell lines and clones. *Scand J Immunol* 22, 295-306.
- Houssiau, F.A., Devogelaer, J.P., Van Damme, J., de Deuxchaisnes, C.N., and Van Snick, J. (1988). Interleukin-6 in synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritides. *Arthritis Rheum* 31, 784-788.
- Hu, C.Y., Rodriguez-Pinto, D., Du, W., Ahuja, A., Henegariu, O., Wong, F.S., Shlomchik, M.J., and Wen, L. (2007). Treatment with CD20-specific antibody prevents and reverses autoimmune diabetes in mice. *J Clin Invest* 117, 3857-3867.
- Huaman, M.C., Martin, L.B., Malkin, E., Narum, D.L., Miller, L.H., Mahanty, S., and Long, C.A. (2008). Ex vivo cytokine and memory T cell responses to the 42-kDa fragment of Plasmodium falciparum merozoite surface protein-1 in vaccinated volunteers. *J Immunol* 180, 1451-1461.
- Huang, W., Na, L., Fidel, P.L., and Schwarzenberger, P. (2004). Requirement of interleukin-17A for systemic anti-Candida albicans host defense in mice. *J Infect Dis* 190, 624-631.
- Hue, S., Ahern, P., Buonocore, S., Kullberg, M.C., Cua, D.J., McKenzie, B.S., Powrie, F., and Maloy, K.J. (2006). Interleukin-23 drives innate and T cell-mediated intestinal inflammation. *J Exp Med* 203, 2473-2483.
- Ikeuchi, H., Kuroiwa, T., Hiramatsu, N., Kaneko, Y., Hiromura, K., Ueki, K., and Nojima, Y. (2005). Expression of interleukin-22 in rheumatoid arthritis: potential role as a proinflammatory cytokine. *Arthritis Rheum* 52, 1037-1046.
- Infante-Duarte, C., Horton, H.F., Byrne, M.C., and Kamradt, T. (2000). Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. *J Immunol* 165, 6107-6115.
- Ireland, J., Herzog, J., and Unanue, E.R. (2006). Cutting edge: unique T cells that recognize citrullinated peptides are a feature of protein immunization. *J Immunol* 177, 1421-1425.
- Irmler, I.M., Gajda, M., and Brauer, R. (2007). Exacerbation of antigen-induced arthritis in IFN gamma-deficient mice as a result of unrestricted IL-17 response. *J Immunol* 179, 6228-6236.
- Ivanov, I.I., McKenzie, B.S., Zhou, L., Tadokoro, C.E., Lepelletier, A., Lafaille, J.J., Cua, D.J., and Littman, D.R. (2006). The orphan nuclear receptor RORgamma directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 126, 1121-1133.

- Iwanami, K., Matsumoto, I., Tanaka-Watanabe, Y., Inoue, A., Mihara, M., Ohsugi, Y., Mamura, M., Goto, D., Ito, S., Tsutsumi, A., *et al.* (2008a). Crucial role of the interleukin-6/interleukin-17 cytokine axis in the induction of arthritis by glucose-6-phosphate isomerase. *Arthritis Rheum* *58*, 754-763.
- Iwanami, K., Matsumoto, I., Tanaka, Y., Inoue, A., Goto, D., Ito, S., Tsutsumi, A., and Sumida, T. (2008b). Arthritogenic T cell epitope in glucose-6-phosphate isomerase-induced arthritis. *Arthritis Res Ther* *10*, R130.
- Ji, H., Gauguier, D., Ohmura, K., Gonzalez, A., Duchatelle, V., Danoy, P., Garchon, H.J., Degott, C., Lathrop, M., Benoist, C., *et al.* (2001). Genetic influences on the end-stage effector phase of arthritis. *J Exp Med* *194*, 321-330.
- Ji, H., Ohmura, K., Mahmood, U., Lee, D.M., Hofhuis, F.M., Boackle, S.A., Takahashi, K., Holers, V.M., Walport, M., Gerard, C., *et al.* (2002a). Arthritis critically dependent on innate immune system players. *Immunity* *16*, 157-168.
- Ji, H., Pettit, A., Ohmura, K., Ortiz-Lopez, A., Duchatelle, V., Degott, C., Gravallesse, E., Mathis, D., and Benoist, C. (2002b). Critical roles for interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha in antibodyinduced arthritis. *J Exp Med* *196*, 77-85.
- Jirholt, J., Lindqvist, A.B., and Holmdahl, R. (2001). The genetics of rheumatoid arthritis and the need for animal models to find and understand the underlying genes. *Arthritis Res* *3*, 87-97.
- Jovanovic, D.V., Di Battista, J.A., Martel-Pelletier, J., Jolicoeur, F.C., He, Y., Zhang, M., Mineau, F., and Pelletier, J.P. (1998). IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages. *J Immunol* *160*, 3513-3521.
- Jutila, D.B., Kurk, S., and Jutila, M.A. (1994). Differences in the expression of Ly-6C on neutrophils and monocytes following PI-PLC hydrolysis and cellular activation. *Immunol Lett* *41*, 49-57.
- Jutila, M.A., Kroese, F.G., Jutila, K.L., Stall, A.M., Fiering, S., Herzenberg, L.A., Berg, E.L., and Butcher, E.C. (1988). Ly-6C is a monocyte/macrophage and endothelial cell differentiation antigen regulated by interferon-gamma. *Eur J Immunol* *18*, 1819-1826.
- Kallen, K.J. (2002). The role of transsignalling via the agonistic soluble IL-6 receptor in human diseases. *Biochim Biophys Acta* *1592*, 323-343.
- Kamradt, T., and Schubert, D. (2005). The role and clinical implications of G6PI in experimental models of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* *7*, 20-28.
- Kannan, K., Ortmann, R.A., and Kimpel, D. (2005). Animal models of rheumatoid arthritis and their relevance to human disease. *Pathophysiology* *12*, 167-181.
- Kaplan, R.A., Curd, J.G., Deheer, D.H., Carson, D.A., Pangburn, M.K., Muller-Eberhard, H.J., and Vaughan, J.H. (1980). Metabolism of C4 and factor B in rheumatoid arthritis. Relation to rheumatoid factor. *Arthritis Rheum* *23*, 911-920.
- Kassahn, D., Kolb, C., Solomon, S., Bochtler, P., and Illges, H. (2002). Few human autoimmune sera detect GPI. *Nat Immunol* *3*, 411-412; author reply 412-413.

Kastelein, R.A., Hunter, C.A., and Cua, D.J. (2007). Discovery and biology of IL-23 and IL-27: related but functionally distinct regulators of inflammation. *Annu Rev Immunol* 25, 221-242.

Katz, Y., Nativ, O., and Beer, Y. (2001). Interleukin-17 enhances tumor necrosis factor alpha-induced synthesis of interleukins 1,6, and 8 in skin and synovial fibroblasts: a possible role as a "fine-tuning cytokine" in inflammation processes. *Arthritis Rheum* 44, 2176-2184.

Khader, S.A., Bell, G.K., Pearl, J.E., Fountain, J.J., Rangel-Moreno, J., Cilley, G.E., Shen, F., Eaton, S.M., Gaffen, S.L., Swain, S.L., *et al.* (2007). IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge. *Nat Immunol* 8, 369-377.

Kim, H.R., Kim, H.S., Park, M.K., Cho, M.L., Lee, S.H., and Kim, H.Y. (2007). The clinical role of IL-23p19 in patients with rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 36, 259-264.

Kim, K.W., Cho, M.L., Park, M.K., Yoon, C.H., Park, S.H., Lee, S.H., and Kim, H.Y. (2005). Increased interleukin-17 production via a phosphoinositide 3-kinase/Akt and nuclear factor kappaB-dependent pathway in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 7, R139-148.

Klareskog, L., Catrina, A.I., and Paget, S. (2009). Rheumatoid arthritis. *Lancet* 373, 659-672.

Koenders, M.I., Kolls, J.K., Oppers-Walgreen, B., van den Bersselaar, L., Joosten, L.A., Schurr, J.R., Schwarzenberger, P., van den Berg, W.B., and Lubberts, E. (2005a). Interleukin-17 receptor deficiency results in impaired synovial expression of interleukin-1 and matrix metalloproteinases 3, 9, and 13 and prevents cartilage destruction during chronic reactivated streptococcal cell wall-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 52, 3239-3247.

Koenders, M.I., Lubberts, E., Oppers-Walgreen, B., van den Bersselaar, L., Helsen, M.M., Kolls, J.K., Joosten, L.A., and van den Berg, W.B. (2005b). Induction of cartilage damage by overexpression of T cell interleukin-17A in experimental arthritis in mice deficient in interleukin-1. *Arthritis Rheum* 52, 975-983.

Koenders, M.I., Lubberts, E., van de Loo, F.A., Oppers-Walgreen, B., van den Bersselaar, L., Helsen, M.M., Kolls, J.K., Di Padova, F.E., Joosten, L.A., and van den Berg, W.B. (2006). Interleukin-17 acts independently of TNF-alpha under arthritic conditions. *J Immunol* 176, 6262-6269.

Komiyama, Y., Nakae, S., Matsuki, T., Nambu, A., Ishigame, H., Kakuta, S., Sudo, K., and Iwakura, Y. (2006). IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 177, 566-573.

Kong, E.K., Prokunina-Olsson, L., Wong, W.H., Lau, C.S., Chan, T.M., Alarcon-Riquelme, M., and Lau, Y.L. (2005). A new haplotype of PDCD1 is associated with rheumatoid arthritis in Hong Kong Chinese. *Arthritis Rheum* 52, 1058-1062.

Korganow, A.S., Ji, H., Mangialaio, S., Duchatelle, V., Pelanda, R., Martin, T., Degott, C., Kikutani, H., Rajewsky, K., Pasquali, J.L., *et al.* (1999). From systemic T cell self-reactivity to organ-specific autoimmune disease via immunoglobulins. *Immunity* 10, 451-461.

- Korn, T., Bettelli, E., Gao, W., Awasthi, A., Jager, A., Strom, T.B., Oukka, M., and Kuchroo, V.K. (2007). IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature* *448*, 484-487.
- Kotake, S., Nanke, Y., Mogi, M., Kawamoto, M., Furuya, T., Yago, T., Kobashigawa, T., Togari, A., and Kamatani, N. (2005). IFN-gamma-producing human T cells directly induce osteoclastogenesis from human monocytes via the expression of RANKL. *Eur J Immunol* *35*, 3353-3363.
- Kotake, S., Udagawa, N., Hakoda, M., Mogi, M., Yano, K., Tsuda, E., Takahashi, K., Furuya, T., Ishiyama, S., Kim, K.J., *et al.* (2001). Activated human T cells directly induce osteoclastogenesis from human monocytes: possible role of T cells in bone destruction in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum* *44*, 1003-1012.
- Kotake, S., Udagawa, N., Takahashi, N., Matsuzaki, K., Itoh, K., Ishiyama, S., Saito, S., Inoue, K., Kamatani, N., Gillespie, M.T., *et al.* (1999). IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J Clin Invest* *103*, 1345-1352.
- Kouskoff, V., Korganow, A.S., Duchatelle, V., Degott, C., Benoist, C., and Mathis, D. (1996). Organspecific disease provoked by systemic autoimmunity. *Cell* *87*, 811-822.
- Kremer, J.M., Genant, H.K., Moreland, L.W., Russell, A.S., Emery, P., Abud-Mendoza, C., Szechinski, J., Li, T., Teng, J., Becker, J.C., *et al.* (2008). Results of a two-year followup study of patients with rheumatoid arthritis who received a combination of abatacept and methotrexate. *Arthritis Rheum* *58*, 953-963.
- Kreymborg, K., Etzensperger, R., Dumoutier, L., Haak, S., Rebollo, A., Buch, T., Heppner, F.L., Renaud, J.C., and Becher, B. (2007). IL-22 is expressed by Th17 cells in an IL-23-dependent fashion, but not required for the development of autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* *179*, 8098-8104.
- Kuhn, K.A., Kulik, L., Tomooka, B., Braschler, K.J., Arend, W.P., Robinson, W.H., and Holers, V.M. (2006). Antibodies against citrullinated proteins enhance tissue injury in experimental autoimmune arthritis. *J Clin Invest* *116*, 961-973.
- Kullberg, M.C., Jankovic, D., Feng, C.G., Hue, S., Gorelick, P.L., McKenzie, B.S., Cua, D.J., Powrie, F., Cheever, A.W., Maloy, K.J., *et al.* (2006). IL-23 plays a key role in *Helicobacter hepaticus*-induced T cell-dependent colitis. *J Exp Med* *203*, 2485-2494.
- Kung, J.T., Castillo, M., Heard, P., Kerbacher, K., and Thomas, C.A., 3rd (1991). Subpopulations of CD8+ cytotoxic T cell precursors collaborate in the absence of conventional CD4+ helper T cells. *J Immunol* *146*, 1783-1790.
- Kurki, P., Aho, K., Palosuo, T., and Heliövaara, M. (1992). Immunopathology of rheumatoid arthritis. Antikeratin antibodies precede the clinical disease. *Arthritis Rheum* *35*, 914-917.
- Langrish, C.L., Chen, Y., Blumenschein, W.M., Mattson, J., Basham, B., Sedgwick, J.D., McClanahan, T., Kastelein, R.A., and Cua, D.J. (2005). IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* *201*, 233-240.

- Laurence, A., Tato, C.M., Davidson, T.S., Kanno, Y., Chen, Z., Yao, Z., Blank, R.B., Meylan, F., Siegel, R., Hennighausen, L., *et al.* (2007). Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity* *26*, 371-381.
- Leandro, M.J., Edwards, J.C., and Cambridge, G. (2002). Clinical outcome in 22 patients with rheumatoid arthritis treated with B lymphocyte depletion. *Ann Rheum Dis* *61*, 883-888.
- Lee, D.M., Friend, D.S., Gurish, M.F., Benoist, C., Mathis, D., and Brenner, M.B. (2002). Mast cells: a cellular link between autoantibodies and inflammatory arthritis. *Science* *297*, 1689-1692.
- Lee, D.M., and Weinblatt, M.E. (2001). Rheumatoid arthritis. *Lancet* *358*, 903-911.
- Lee, Y.K., Turner, H., Maynard, C.L., Oliver, J.R., Chen, D., Elson, C.O., and Weaver, C.T. (2009). Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage. *Immunity* *30*, 92-107.
- Lexberg, M.H., Taubner, A., Forster, A., Albrecht, I., Richter, A., Kamradt, T., Radbruch, A., and Chang, H.D. (2008). Th memory for interleukin-17 expression is stable in vivo. *Eur J Immunol* *38*, 2654-2664.
- Li, M.O., Wan, Y.Y., Sanjabi, S., Robertson, A.K., and Flavell, R.A. (2006). Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol* *24*, 99-146.
- Liang, S.C., Long, A.J., Bennett, F., Whitters, M.J., Karim, R., Collins, M., Goldman, S.J., Dunussi-Joannopoulos, K., Williams, C.M., Wright, J.F., *et al.* (2007). An IL-17F/A heterodimer protein is produced by mouse Th17 cells and induces airway neutrophil recruitment. *J Immunol* *179*, 7791-7799.
- Liang, S.C., Tan, X.Y., Luxenberg, D.P., Karim, R., Dunussi-Joannopoulos, K., Collins, M., and Fouser, L.A. (2006). Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med* *203*, 2271-2279.
- Lin, S.C., Yen, J.H., Tsai, J.J., Tsai, W.C., Ou, T.T., Liu, H.W., and Chen, C.J. (2004). Association of a programmed death 1 gene polymorphism with the development of rheumatoid arthritis, but not systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* *50*, 770-775.
- Liotta, L.A., Guirguis, R.A., and Schiffmann, E. (1986). Tumor autocrine motility factor. *Prog Clin Biol Res* *212*, 17-24.
- Löhning, M., Richter, A., and Radbruch, A. (2002). Cytokine memory of T helper lymphocytes. *Adv Immunol* *80*, 115-181.
- Lonberg, N. (2005). Human antibodies from transgenic animals. *Nat Biotechnol* *23*, 1117-1125.
- Lubberts, E., Joosten, L.A., Oppers, B., van den Bersselaar, L., Coenen-de Roo, C.J., Kolls, J.K., Schwarzenberger, P., van de Loo, F.A., and van den Berg, W.B. (2001). IL-1-independent role of IL-17 in synovial inflammation and joint destruction during collagen-induced arthritis. *J Immunol* *167*, 1004-1013.
- Lubberts, E., Joosten, L.A., van de Loo, F.A., van den Gersselaar, L.A., and van den Berg, W.B. (2000). Reduction of interleukin-17-induced inhibition of chondrocyte proteoglycan synthesis in intact murine articular cartilage by interleukin-4. *Arthritis Rheum* *43*, 1300-1306.

- Lubberts, E., Koenders, M.I., and van den Berg, W.B. (2005). The role of T-cell interleukin-17 in conducting destructive arthritis: lessons from animal models. *Arthritis Res Ther* 7, 29-37.
- Lundberg, K., Nijenhuis, S., Vossenaar, E.R., Palmblad, K., van Venrooij, W.J., Klareskog, L., Zendman, A.J., and Harris, H.E. (2005). Citrullinated proteins have increased immunogenicity and arthritogenicity and their presence in arthritic joints correlates with disease severity. *Arthritis Res Ther* 7, R458-467.
- Maccioni, M., Zeder-Lutz, G., Huang, H., Ebel, C., Gerber, P., Hergueux, J., Marchal, P., Duchatelle, V., Degott, C., van Regenmortel, M., *et al.* (2002). Arthritogenic monoclonal antibodies from K/BxN mice. *J Exp Med* 195, 1071-1077.
- Maier, B., Molinger, M., Cope, A.P., Fugger, L., Schneider-Mergener, J., Sonderstrup, G., Kamradt, T., and Kramer, A. (2000). Multiple cross-reactive self-ligands for *Borrelia burgdorferi*-specific HLA-DR4-restricted T cells. *Eur J Immunol* 30, 448-457.
- Mandik-Nayak, L., Huang, G., Sheehan, K.C., Erikson, J., and Chaplin, D.D. (2001). Signaling through TNF receptor p55 in TNF-alpha-deficient mice alters the CXCL13/CCL19/CCL21 ratio in the spleen and induces maturation and migration of anergic B cells into the B cell follicle. *J Immunol* 167, 1920-1928.
- Mangan, P.R., Harrington, L.E., O'Quinn, D.B., Helms, W.S., Bullard, D.C., Elson, C.O., Hatton, R.D., Wahl, S.M., Schoeb, T.R., and Weaver, C.T. (2006). Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 441, 231-234.
- Mangialaio, S., Ji, H., Korganow, A.S., Kouskoff, V., Benoist, C., and Mathis, D. (1999). The arthritogenic T cell receptor and its ligand in a model of spontaneous arthritis. *Arthritis Rheum* 42, 2517-2523.
- Manicourt, D.H., Triki, R., Fukuda, K., Devogelaer, J.P., Nagant de Deuxchaisnes, C., and Thonar, E.J. (1993). Levels of circulating tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 in patients with rheumatoid arthritis. Relationship to serum levels of hyaluronan and antigenic keratan sulfate. *Arthritis Rheum* 36, 490-499.
- Manoury-Schwartz, B., Chiochia, G., Bessis, N., Abehsira-Amar, O., Batteux, F., Muller, S., Huang, S., Boissier, M.C., and Fournier, C. (1997). High susceptibility to collagen-induced arthritis in mice lacking IFN-gamma receptors. *J Immunol* 158, 5501-5506.
- Martin, F., and Chan, A.C. (2006). B cell immunobiology in disease: evolving concepts from the clinic. *Annu Rev Immunol* 24, 467-496.
- Matsumoto, I., Lee, D.M., Goldbach-Mansky, R., Sumida, T., Hitchon, C.A., Schur, P.H., Anderson, R.J., Coblyn, J.S., Weinblatt, M.E., Brenner, M., *et al.* (2003). Low prevalence of antibodies to glucose-6-phosphate isomerase in patients with rheumatoid arthritis and a spectrum of other chronic autoimmune disorders. *Arthritis Rheum* 48, 944-954.

- Matsumoto, I., Maccioni, M., Lee, D.M., Maurice, M., Simmons, B., Brenner, M., Mathis, D., and Benoist, C. (2002). How antibodies to a ubiquitous cytoplasmic enzyme may provoke joint-specific autoimmune disease. *Nat Immunol* 3, 360-365.
- Matsumoto, I., Staub, A., Benoist, C., and Mathis, D. (1999). Arthritis provoked by linked T and B cell recognition of a glycolytic enzyme. *Science* 286, 1732-1735.
- McGeachy, M.J., Bak-Jensen, K.S., Chen, Y., Tato, C.M., Blumenschein, W., McClanahan, T., and Cua, D.J. (2007). TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. *Nat Immunol* 8, 1390-1397.
- McGeachy, M.J., Chen, Y., Tato, C.M., Laurence, A., Joyce-Shaikh, B., Blumenschein, W.M., McClanahan, T.K., O'Shea, J.J., and Cua, D.J. (2009). The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo. *Nat Immunol*.
- Michaelsson, E., Andersson, M., Engstrom, A., and Holmdahl, R. (1992). Identification of an immunodominant type-II collagen peptide recognized by T cells in H-2q mice: self tolerance at the level of determinant selection. *Eur J Immunol* 22, 1819-1825.
- Michaud, K., Messer, J., Choi, H.K., and Wolfe, F. (2003). Direct medical costs and their predictors in patients with rheumatoid arthritis: a three-year study of 7,527 patients. *Arthritis Rheum* 48, 2750-2762.
- Miranda-Carus, M.E., Benito-Miguel, M., Balsa, A., Cobo-Ibanez, T., Perez de Ayala, C., Pascual-Salcedo, D., and Martin-Mola, E. (2006). Peripheral blood T lymphocytes from patients with early rheumatoid arthritis express RANKL and interleukin-15 on the cell surface and promote osteoclastogenesis in autologous monocytes. *Arthritis Rheum* 54, 1151-1164.
- Mittrucker, H.W., Steinhoff, U., Kohler, A., Krause, M., Lazar, D., Mex, P., Miekley, D., and Kaufmann, S.H. (2007). Poor correlation between BCG vaccination-induced T cell responses and protection against tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 12434-12439.
- Moon, J.J., Chu, H.H., Pepper, M., McSorley, S.J., Jameson, S.C., Kedl, R.M., and Jenkins, M.K. (2007). Naive CD4(+) T cell frequency varies for different epitopes and predicts repertoire diversity and response magnitude. *Immunity* 27, 203-213.
- Moseley, T.A., Haudenschild, D.R., Rose, L., and Reddi, A.H. (2003). Interleukin-17 family and IL-17 receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 14, 155-174.
- Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., and Coffman, R.L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136, 2348-2357.
- Moulin, V., Andris, F., Thielemans, K., Maliszewski, C., Urbain, J., and Moser, M. (2000). B lymphocytes regulate dendritic cell (DC) function in vivo: increased interleukin 12 production by DCs from B cell-deficient mice results in T helper cell type 1 deviation. *J Exp Med* 192, 475-482.
- Murphy, C.A., Langrish, C.L., Chen, Y., Blumenschein, W., McClanahan, T., Kastelein, R.A., Sedgwick, J.D., and Cua, D.J. (2003). Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J Exp Med* 198, 1951-1957.

- Myers, L.K., Myllyharju, J., Nokelainen, M., Brand, D.D., Cremer, M.A., Stuart, J.M., Bodo, M., Kivirikko, K.I., and Kang, A.H. (2004). Relevance of posttranslational modifications for the arthritogenicity of type II collagen. *J Immunol* 172, 2970-2975.
- Nakae, S., Nambu, A., Sudo, K., and Iwakura, Y. (2003). Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *J Immunol* 171, 6173-6177.
- Nelson, C.A., Roof, R.W., McCourt, D.W., and Unanue, E.R. (1992). Identification of the naturally processed form of hen egg white lysozyme bound to the murine major histocompatibility complex class II molecule I-Ak. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 7380-7383.
- Nepom, G.T., Byers, P., Seyfried, C., Healey, L.A., Wilske, K.R., Stage, D., and Nepom, B.S. (1989). HLA genes associated with rheumatoid arthritis. Identification of susceptibility alleles using specific oligonucleotide probes. *Arthritis Rheum* 32, 15-21.
- Neumann, E., Barnum, S.R., Turner, I.H., Echols, J., Fleck, M., Judex, M., Kullmann, F., Mountz, J.D., Scholmerich, J., Gay, S., *et al.* (2002). Local production of complement proteins in rheumatoid arthritis synovium. *Arthritis Rheum* 46, 934-945.
- Nienhuis, R.L., and Mandema, E. (1964). A New Serum Factor in Patients with Rheumatoid Arthritis; the Antiperinuclear Factor. *Ann Rheum Dis* 23, 302-305.
- Nimmerjahn, F., Bruhns, P., Horiuchi, K., and Ravetch, J.V. (2005). FcγRIV: a novel FcR with distinct IgG subclass specificity. *Immunity* 23, 41-51.
- Nimmerjahn, F., and Ravetch, J.V. (2005). Divergent immunoglobulin g subclass activity through selective Fc receptor binding. *Science* 310, 1510-1512.
- Nino-Vasquez, J.J., Allicotti, G., Borrás, E., Wilson, D.B., Valmori, D., Simon, R., Martin, R., and Pinilla, C. (2004). A powerful combination: the use of positional scanning libraries and biometrical analysis to identify cross-reactive T cell epitopes. *Mol Immunol* 40, 1063-1074.
- Nowell, M.A., Richards, P.J., Horiuchi, S., Yamamoto, N., Rose-John, S., Topley, N., Williams, A.S., and Jones, S.A. (2003). Soluble IL-6 receptor governs IL-6 activity in experimental arthritis: blockade of arthritis severity by soluble glycoprotein 130. *J Immunol* 171, 3202-3209.
- Nowell, M.A., Williams, A.S., Carty, S.A., Scheller, J., Hayes, A.J., Jones, G.W., Richards, P.J., Slinn, S., Ernst, M., Jenkins, B.J., *et al.* (2009). Therapeutic targeting of IL-6 trans signaling counteracts STAT3 control of experimental inflammatory arthritis. *J Immunol* 182, 613-622.
- Nurieva, R., Yang, X.O., Martinez, G., Zhang, Y., Panopoulos, A.D., Ma, L., Schluns, K., Tian, Q., Watowich, S.S., Jetten, A.M., *et al.* (2007). Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature* 448, 480-483.
- Nurieva, R.I., Chung, Y., Hwang, D., Yang, X.O., Kang, H.S., Ma, L., Wang, Y.H., Watowich, S.S., Jetten, A.M., Tian, Q., *et al.* (2008). Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages. *Immunity* 29, 138-149.
- O'Dell, J.R. (2004). Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 350, 2591-2602.

- Ohshima, S., Saeki, Y., Mima, T., Sasai, M., Nishioka, K., Nomura, S., Kopf, M., Katada, Y., Tanaka, T., Suemura, M., *et al.* (1998). Interleukin 6 plays a key role in the development of antigen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 8222-8226.
- Okamoto, T., Saito, S., Yamanaka, H., Tomatsu, T., Kamatani, N., Ogiuchi, H., Uchiyama, T., and Yagi, J. (2003). Expression and function of the co-stimulator H4/ICOS on activated T cells of patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* *30*, 1157-1163.
- Oppmann, B., Lesley, R., Blom, B., Timans, J.C., Xu, Y., Hunte, B., Vega, F., Yu, N., Wang, J., Singh, K., *et al.* (2000). Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* *13*, 715-725.
- Park, H., Li, Z., Yang, X.O., Chang, S.H., Nurieva, R., Wang, Y.H., Wang, Y., Hood, L., Zhu, Z., Tian, Q., *et al.* (2005). A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* *6*, 1133-1141.
- Perkins, D.L., Berriz, G., Kamradt, T., Smith, J.A., and Geftter, M.L. (1991). Immunodominance: intramolecular competition between T cell epitopes. *J Immunol* *146*, 2137-2144.
- Pierer, M., Kaltenhauser, S., Arnold, S., Wahle, M., Baerwald, C., Hantzel, H., and Wagner, U. (2006). Association of PTPN22 1858 single-nucleotide polymorphism with rheumatoid arthritis in a German cohort: higher frequency of the risk allele in male compared to female patients. *Arthritis Res Ther* *8*, R75.
- Piguet, P.F., Grau, G.E., Vesin, C., Loetscher, H., Gentz, R., and 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*, 510-514.
- Plows, D., Kontogeorgos, G., and Kollias, G. (1999). Mice lacking mature T and B lymphocytes develop arthritic lesions after immunization with type II collagen. *J Immunol* *162*, 1018-1023.
- Poe, J.C., Fujimoto, Y., Hasegawa, M., Haas, K.M., Miller, A.S., Sanford, I.G., Bock, C.B., Fujimoto, M., and Tedder, T.F. (2004). CD22 regulates B lymphocyte function in vivo through both liganddependent and ligand-independent mechanisms. *Nat Immunol* *5*, 1078-1087.
- Prokunina, L., Padyukov, L., Bennet, A., de Faire, U., Wiman, B., Prince, J., Alfredsson, L., Klareskog, L., and Alarcon-Riquelme, M. (2004). Association of the PD-1.3A allele of the PDCD1 gene in patients with rheumatoid arthritis negative for rheumatoid factor and the shared epitope. *Arthritis Rheum* *50*, 1770-1773.
- Puppo, F., Murdaca, G., Ghio, M., and Indiveri, F. (2005). Emerging biologic drugs for the treatment of rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* *4*, 537-541.
- Rammensee, H., Bachmann, J., Emmerich, N.P., Bachor, O.A., and Stevanovic, S. (1999). SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* *50*, 213-219.
- Ranges, G.E., Sriram, S., and Cooper, S.M. (1985). Prevention of type II collagen-induced arthritis by in vivo treatment with anti-L3T4. *J Exp Med* *162*, 1105-1110.

- Rantapaa-Dahlqvist, S., de Jong, B.A., Berglin, E., Hallmans, G., Wadell, G., Stenlund, H., Sundin, U., and van Venrooij, W.J. (2003). Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* *48*, 2741-2749.
- Reche, P.A., Glutting, J.P., Zhang, H., and Reinherz, E.L. (2004). Enhancement to the RANKPEP resource for the prediction of peptide binding to MHC molecules using profiles. *Immunogenetics* *56*, 405-419.
- Rosloniec, E.F., Brand, D.D., Myers, L.K., Esaki, Y., Whittington, K.B., Zaller, D.M., Woods, A., Stuart, J.M., and Kang, A.H. (1998). Induction of autoimmune arthritis in HLA-DR4 (DRB1*0401) transgenic mice by immunization with human and bovine type II collagen. *J Immunol* *160*, 2573-2578.
- Rosloniec, E.F., Brand, D.D., Myers, L.K., Whittington, K.B., Gumanovskaya, M., Zaller, D.M., Woods, A., Altmann, D.M., Stuart, J.M., and Kang, A.H. (1997). An HLA-DR1 transgene confers susceptibility to collagen-induced arthritis elicited with human type II collagen. *J Exp Med* *185*, 1113-1122.
- Ruddy, S., and Austen, K.F. (1970). The complement system in rheumatoid synovitis. I. An analysis of complement component activities in rheumatoid synovial fluids. *Arthritis Rheum* *13*, 713-723.
- Ruddy, S., Britton, M.C., Schur, P.H., and Austen, K.F. (1969). Complement components in synovial fluid: activation and fixation in seropositive rheumatoid arthritis. *Ann N Y Acad Sci* *168*, 161-172.
- Rudner, X.L., Happel, K.I., Young, E.A., and Shellito, J.E. (2007). Interleukin-23 (IL-23)-IL-17 cytokine axis in murine *Pneumocystis carinii* infection. *Infect Immun* *75*, 3055-3061.
- Sacks, D., and Noben-Trauth, N. (2002). The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol* *2*, 845-858.
- Sasai, M., Saeki, Y., Ohshima, S., Nishioka, K., Mima, T., Tanaka, T., Katada, Y., Yoshizaki, K., Suemura, M., and Kishimoto, T. (1999). Delayed onset and reduced severity of collagen-induced arthritis in interleukin-6-deficient mice. *Arthritis Rheum* *42*, 1635-1643.
- Sato, K., Suematsu, A., Okamoto, K., Yamaguchi, A., Morishita, Y., Kadono, Y., Tanaka, S., Kodama, T., Akira, S., Iwakura, Y., *et al.* (2006). Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J Exp Med* *203*, 2673-2682.
- Schaller, M., Burton, D.R., and Ditzel, H.J. (2001). Autoantibodies to GPI in rheumatoid arthritis: linkage between an animal model and human disease. *Nat Immunol* *2*, 746-753.
- Schellekens, G.A., Visser, H., de Jong, B.A., van den Hoogen, F.H., Hazes, J.M., Breedveld, F.C., and van Venrooij, W.J. (2000). The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum* *43*, 155-163.
- Schubert, D., Maier, B., Morawietz, L., Krenn, V., and Kamradt, T. (2004). Immunization with glucose-6-phosphate isomerase induces T cell-dependent peripheral polyarthritis in genetically unaltered mice. *J Immunol* *172*, 4503-4509.
- Schubert, D., Schmidt, M., Zaiss, D., Jungblut, P.R., and Kamradt, T. (2002). Autoantibodies to GPI and creatine kinase in RA. *Nat Immunol* *3*, 411; author reply 412-413.

- Sebbag, M., Simon, M., Vincent, C., Masson-Bessiere, C., Girbal, E., Durieux, J.J., and Serre, G. (1995). The antiperinuclear factor and the so-called antikeratin antibodies are the same rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest* *95*, 2672-2679.
- Senshu, T., Akiyama, K., Kan, S., Asaga, H., Ishigami, A., and Manabe, M. (1995). Detection of deiminated proteins in rat skin: probing with a monospecific antibody after modification of citrulline residues. *J Invest Dermatol* *105*, 163-169.
- Senshu, T., Kan, S., Ogawa, H., Manabe, M., and Asaga, H. (1996). Preferential deimination of keratin K1 and filaggrin during the terminal differentiation of human epidermis. *Biochem Biophys Res Commun* *225*, 712-719.
- Sette, A., Alexander, J., Ruppert, J., Snoke, K., Franco, A., Ishioka, G., and Grey, H.M. (1994). Antigen analogs/MHC complexes as specific T cell receptor antagonists. *Annu Rev Immunol* *12*, 413-431.
- Sfikakis, P.P., Boletis, J.N., and Tsokos, G.C. (2005). Rituximab anti-B-cell therapy in systemic lupus erythematosus: pointing to the future. *Curr Opin Rheumatol* *17*, 550-557.
- Shan, D., and Press, O.W. (1995). Constitutive endocytosis and degradation of CD22 by human B cells. *J Immunol* *154*, 4466-4475.
- Shaw, M.H., Boyartchuk, V., Wong, S., Karaghiosoff, M., Ragimbeau, J., Pellegrini, S., Muller, M., Dietrich, W.F., and Yap, G.S. (2003). A natural mutation in the Tyk2 pseudokinase domain underlies altered susceptibility of B10.Q/J mice to infection and autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 11594-11599.
- Shortman, K., and Naik, S.H. (2007). Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat Rev Immunol* *7*, 19-30.
- Silletti, S., and Raz, A. (1996). Regulation of autocrine motility factor receptor expression in tumor cell locomotion and metastasis. *Curr Top Microbiol Immunol* *213 (Pt 2)*, 137-169.
- Silman, A.J., and Pearson, J.E. (2002). Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* *4 Suppl 3*, S265-272.
- Silverman, G.J., and Carson, D.A. (2003). Roles of B cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* *5 Suppl 4*, S1-6.
- Simon, M., Girbal, E., Sebbag, M., Gomes-Daudrix, V., Vincent, C., Salama, G., and Serre, G. (1993). The cytokeratin filament-aggregating protein filaggrin is the target of the so-called "antikeratin antibodies," autoantibodies specific for rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* *92*, 1387-1393.
- Sonderegger, I., Iezzi, G., Maier, R., Schmitz, N., Kurrer, M., and Kopf, M. (2008). GM-CSF mediates autoimmunity by enhancing IL-6-dependent Th17 cell development and survival. *J Exp Med* *205*, 2281-2294.
- Stamp, L.K., James, M.J., and Cleland, L.G. (2004). Interleukin-17: the missing link between T-cell accumulation and effector cell actions in rheumatoid arthritis? *Immunol Cell Biol* *82*, 1-9.

- Stemberger, C., Huster, K.M., Koffler, M., Anderl, F., Schiemann, M., Wagner, H., and Busch, D.H. (2007). A single naive CD8+ T cell precursor can develop into diverse effector and memory subsets. *Immunity* *27*, 985-997.
- Stuart, J.M., Tomoda, K., Yoo, T.J., Townes, A.S., and Kang, A.H. (1983). Serum transfer of collagen-induced arthritis. II. Identification and localization of autoantibody to type II collagen in donor and recipient rats. *Arthritis Rheum* *26*, 1237-1244.
- Stubbe, M., Vanderheyde, N., Pircher, H., Goldman, M., and Marchant, A. (2008). Characterization of a subset of antigen-specific human central memory CD4+ T lymphocytes producing effector cytokines. *Eur J Immunol* *38*, 273-282.
- Stumhofer, J.S., Silver, J.S., Laurence, A., Porrett, P.M., Harris, T.H., Turka, L.A., Ernst, M., Saris, C.J., O'Shea, J.J., and Hunter, C.A. (2007). Interleukins 27 and 6 induce STAT3-mediated T cell production of interleukin 10. *Nat Immunol* *8*, 1363-1371.
- Sugimoto, K., Ogawa, A., Mizoguchi, E., Shimomura, Y., Andoh, A., Bhan, A.K., Blumberg, R.S., Xavier, R.J., and Mizoguchi, A. (2008). IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis. *J Clin Invest* *118*, 534-544.
- Sun, A.Q., Yuksel, K.U., Jacobson, T.M., and Gracy, R.W. (1990). Isolation and characterization of human glucose-6-phosphate isomerase isoforms containing two different size subunits. *Arch Biochem Biophys* *283*, 120-129.
- Sutton, C., Brereton, C., Keogh, B., Mills, K.H., and Lavelle, E.C. (2006). A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* *203*, 1685-1691.
- Svendsen, P., Andersen, C.B., Willcox, N., Coyle, A.J., Holmdahl, R., Kamradt, T., and Fugger, L. (2004). Tracking of proinflammatory collagen-specific T cells in early and late collagen-induced arthritis in humanized mice. *J Immunol* *173*, 7037-7045.
- Svensson, L., Jirholt, J., Holmdahl, R., and Jansson, L. (1998). B cell-deficient mice do not develop type II collagen-induced arthritis (CIA). *Clin Exp Immunol* *111*, 521-526.
- Symington, F.W., Subbarao, B., Mosier, D.E., and Sprent, J. (1982). Lyb-8.2: A new B cell antigen defined and characterized with a monoclonal antibody. *Immunogenetics* *16*, 381-391.
- Tada, Y., Ho, A., Koh, D.R., and Mak, T.W. (1996). Collagen-induced arthritis in CD4- or CD8-deficient mice: CD8+ T cells play a role in initiation and regulate recovery phase of collagen-induced arthritis. *J Immunol* *156*, 4520-4526.
- Takatori, H., Kanno, Y., Watford, W.T., Tato, C.M., Weiss, G., Ivanov, II, Littman, D.R., and O'Shea, J.J. (2009). Lymphoid tissue inducer-like cells are an innate source of IL-17 and IL-22. *J Exp Med* *206*, 35-41.
- Takemura, S., Klimiuk, P.A., Braun, A., Goronzy, J.J., and Weyand, C.M. (2001). T cell activation in rheumatoid synovium is B cell dependent. *J Immunol* *167*, 4710-4718.

- Tanaka-Watanabe, Y., Matsumoto, I., Iwanami, K., Inoue, A., Goto, D., Ito, S., Tsutsumi, A., and Sumida, T. (2009). B cells play a crucial role as antigen-presenting cells and collaborate with inflammatory cytokines in glucose-6-phosphate isomerase-induced arthritis. *Clin Exp Immunol* 155, 285-294.
- Taubner, A. (2005). G6PI ein Zytokin aktivierte T-Zellen? In Biologische Pharmazeutische Fakultät (Jena, Friedrich-Schiller Universität).
- Tedder, T.F., Tuscano, J., Sato, S., and Kehrl, J.H. (1997). CD22, a B lymphocyte-specific adhesion molecule that regulates antigen receptor signaling. *Annu Rev Immunol* 15, 481-504.
- Tepper, R.I., Coffman, R.L., and Leder, P. (1992). An eosinophil-dependent mechanism for the antitumor effect of interleukin-4. *Science* 257, 548-551.
- Terato, K., Arai, H., Shimozuru, Y., Fukuda, T., Tanaka, H., Watanabe, H., Nagai, Y., Fujimoto, K., Okubo, F., Cho, F., *et al.* (1989). Sex-linked differences in susceptibility of cynomolgus monkeys to type II collagen-induced arthritis. Evidence that epitope-specific immune suppression is involved in the regulation of type II collagen autoantibody formation. *Arthritis Rheum* 32, 748-758.
- Terato, K., Hasty, K.A., Reife, R.A., Cremer, M.A., Kang, A.H., and Stuart, J.M. (1992). Induction of arthritis with monoclonal antibodies to collagen. *J Immunol* 148, 2103-2108.
- Thorbecke, G.J., Shah, R., Leu, C.H., Kuruvilla, A.P., Hardison, A.M., and Palladino, M.A. (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, 7375-7379.
- Thorson, J.S., Sievers, E.L., Ahlert, J., Shepard, E., Whitwam, R.E., Onwueme, K.C., and Ruppen, M. (2000). Understanding and exploiting nature's chemical arsenal: the past, present and future of calicheamicin research. *Curr Pharm Des* 6, 1841-1879.
- Tran, C.N., Davis, M.J., Tesmer, L.A., Endres, J.L., Motyl, C.D., Smuda, C., Somers, E.C., Chung, K.C., Urquhart, A.G., Lundy, S.K., *et al.* (2007). Presentation of arthritogenic peptide to antigenspecific T cells by fibroblast-like synoviocytes. *Arthritis Rheum* 56, 1497-1506.
- Trentham, D.E., Townes, A.S., and Kang, A.H. (1977). Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis. *J Exp Med* 146, 857-868.
- Tumanov, A., Kuprash, D., Lagarkova, M., Grivennikov, S., Abe, K., Shakhov, A., Drutskaya, L., Stewart, C., Chervonsky, A., and Nedospasov, S. (2002). Distinct role of surface lymphotoxin expressed by B cells in the organization of secondary lymphoid tissues. *Immunity* 17, 239-250.
- Tuscano, J.M., Riva, A., Toscano, S.N., Tedder, T.F., and Kehrl, J.H. (1999). CD22 cross-linking generates B-cell antigen receptor-independent signals that activate the JNK/SAPK signaling cascade. *Blood* 94, 1382-1392.
- Uhlig, H.H., McKenzie, B.S., Hue, S., Thompson, C., Joyce-Shaikh, B., Stepankova, R., Robinson, N., Buonocore, S., Tlaskalova-Hogenova, H., Cua, D.J., *et al.* (2006). Differential activity of IL-12 and IL-23 in mucosal and systemic innate immune pathology. *Immunity* 25, 309-318.

- van Boekel, M.A., Vossenaar, E.R., van den Hoogen, F.H., and van Venrooij, W.J. (2002). Autoantibody systems in rheumatoid arthritis: specificity, sensitivity and diagnostic value. *Arthritis Res* 4, 87-93.
- van Boxel, J.A., and Paget, S.A. (1975). Predominantly T-cell infiltrate in rheumatoid synovial membranes. *N Engl J Med* 293, 517-520.
- van den Berg, W.B., Joosten, L.A., and van Lent, P.L. (2007). Murine antigen-induced arthritis. *Methods Mol Med* 136, 243-253.
- van Gaalen, F., Ioan-Facsinay, A., Huizinga, T.W., and Toes, R.E. (2005). The devil in the details: the emerging role of anticitrulline autoimmunity in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 175, 5575-5580.
- van Gaalen, F.A., Linn-Rasker, S.P., van Venrooij, W.J., de Jong, B.A., Breedveld, F.C., Verweij, C.L., Toes, R.E., and Huizinga, T.W. (2004a). Autoantibodies to cyclic citrullinated peptides predict progression to rheumatoid arthritis in patients with undifferentiated arthritis: a prospective cohort study. *Arthritis Rheum* 50, 709-715.
- van Gaalen, F.A., Toes, R.E., Ditzel, H.J., Schaller, M., Breedveld, F.C., Verweij, C.L., and Huizinga, T.W. (2004b). Association of autoantibodies to glucose-6-phosphate isomerase with extraarticular complications in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 50, 395-399.
- van Oene, M., Wintle, R.F., Liu, X., Yazdanpanah, M., Gu, X., Newman, B., Kwan, A., Johnson, B., Owen, J., Greer, W., *et al.* (2005). Association of the lymphoid tyrosine phosphatase R620W variant with rheumatoid arthritis, but not Crohn's disease, in Canadian populations. *Arthritis Rheum* 52, 1993-1998.
- van Venrooij, W.J., Hazes, J.M., and Visser, H. (2002). Anticitrullinated protein/peptide antibody and its role in the diagnosis and prognosis of early rheumatoid arthritis. *Neth J Med* 60, 383-388.
- Vang, T., Congia, M., Macis, M.D., Musumeci, L., Orru, V., Zavattari, P., Nika, K., Tautz, L., Tasken, K., Cucca, F., *et al.* (2005). Autoimmune-associated lymphoid tyrosine phosphatase is a gain-of-function variant. *Nat Genet* 37, 1317-1319.
- Veldhoen, M., Hirota, K., Christensen, J., O'Garra, A., and Stockinger, B. (2009). Natural agonists for aryl hydrocarbon receptor in culture medium are essential for optimal differentiation of Th17 T cells. *J Exp Med* 206, 43-49.
- Veldhoen, M., Hocking, R.J., Atkins, C.J., Locksley, R.M., and Stockinger, B. (2006). TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 24, 179-189.
- Vermeire, K., Heremans, H., Vandeputte, M., Huang, S., Billiau, A., and Matthys, P. (1997). Accelerated collagen-induced arthritis in IFN-gamma receptor-deficient mice. *J Immunol* 158, 5507-5513.
- Voorhuis, J.A., Uitdehaag, B.M., De Groot, C.J., Goede, P.H., van der Meide, P.H., and Dijkstra, C.D. (1990). Suppression of experimental allergic encephalomyelitis by intraventricular administration of interferon-gamma in Lewis rats. *Clin Exp Immunol* 81, 183-188.

- Vossenaar, E.R., Despres, N., Lapointe, E., van der Heijden, A., Lora, M., Senshu, T., van Venrooij, W.J., and Menard, H.A. (2004a). Rheumatoid arthritis specific anti-Sa antibodies target citrullinated vimentin. *Arthritis Res Ther* 6, R142-150.
- Vossenaar, E.R., Radstake, T.R., van der Heijden, A., van Mansum, M.A., Dieteren, C., de Rooij, D.J., Barrera, P., Zendman, A.J., and van Venrooij, W.J. (2004b). Expression and activity of citrullinating peptidylarginine deiminase enzymes in monocytes and macrophages. *Ann Rheum Dis* 63, 373-381.
- Wan, B., Nie, H., Liu, A., Feng, G., He, D., Xu, R., Zhang, Q., Dong, C., and Zhang, J.Z. (2006). Aberrant regulation of synovial T cell activation by soluble costimulatory molecules in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 177, 8844-8850.
- Watson, W.C., Brown, P.S., Pitcock, J.A., and Townes, A.S. (1987). Passive transfer studies with type II collagen antibody in B10.D2/old and new line and C57Bl/6 normal and beige (Chediak-Higashi) strains: evidence of important roles for C5 and multiple inflammatory cell types in the development of erosive arthritis. *Arthritis Rheum* 30, 460-465.
- Weiner, L.M. (2006). Fully human therapeutic monoclonal antibodies. *J Immunother* 29, 1-9.
- West, J.D., Flockhart, J.H., Peters, J., and Ball, S.T. (1990). Death of mouse embryos that lack a functional gene for glucose phosphate isomerase. *Genet Res* 56, 223-236.
- Whitehouse, M.W., Orr, K.J., Beck, F.W., and Pearson, C.M. (1974). Freund's adjuvants: relationship of arthritogenicity and adjuvanticity in rats to vehicle composition. *Immunology* 27, 311-330.
- Willenborg, D.O., Fordham, S.A., Staykova, M.A., Ramshaw, I.A., and Cowden, W.B. (1999). IFN γ is critical to the control of murine autoimmune encephalomyelitis and regulates both in the periphery and in the target tissue: a possible role for nitric oxide. *J Immunol* 163, 5278-5286.
- Williams, R.O., Feldmann, M., and Maini, R.N. (1992). Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 9784-9788.
- Wipke, B.T., and Allen, P.M. (2001). Essential role of neutrophils in the initiation and progression of a murine model of rheumatoid arthritis. *J Immunol* 167, 1601-1608.
- Wipke, B.T., Wang, Z., Kim, J., McCarthy, T.J., and Allen, P.M. (2002). Dynamic visualization of a joint-specific autoimmune response through positron emission tomography. *Nat Immunol* 3, 366-372.
- Wipke, B.T., Wang, Z., Nagengast, W., Reichert, D.E., and Allen, P.M. (2004). Staging the initiation of autoantibody-induced arthritis: a critical role for immune complexes. *J Immunol* 172, 7694-7702.
- Witko-Sarsat, V., Rieu, P., Descamps-Latscha, B., Lesavre, P., and Halbwachs-Mecarelli, L. (2000). Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest* 80, 617-653.
- Wong, B.R., Josien, R., and Choi, Y. (1999). TRANCE is a TNF family member that regulates dendritic cell and osteoclast function. *J Leukoc Biol* 65, 715-724.
- Wooley, P.H., Luthra, H.S., Stuart, J.M., and David, C.S. (1981). Type II collagen-induced arthritis in mice. I. Major histocompatibility complex (I region) linkage and antibody correlates. *J Exp Med* 154, 688-700.

- Wordsworth, B.P., Lanchbury, J.S., Sakkas, L.I., Welsh, K.I., Panayi, G.S., and Bell, J.I. (1989). HLADR4 subtype frequencies in rheumatoid arthritis indicate that DRB1 is the major susceptibility locus within the HLA class II region. *Proc Natl Acad Sci U S A* *86*, 10049-10053.
- Xu, W., Seiter, K., Feldman, E., Ahmed, T., and Chiao, J.W. (1996). The differentiation and maturation mediator for human myeloid leukemia cells shares homology with neuroleukin or phosphoglucose isomerase. *Blood* *87*, 4502-4506.
- Yang, J., Yang, M., Htut, T.M., Ouyang, X., Hanidu, A., Li, X., Sellati, R., Jiang, H., Zhang, S., Li, H., *et al.* (2008a). Epstein-Barr virus-induced gene 3 negatively regulates IL-17, IL-22 and RORgamma t. *Eur J Immunol* *38*, 1204-1214.
- Yang, X.O., Chang, S.H., Park, H., Nurieva, R., Shah, B., Acero, L., Wang, Y.H., Schluns, K.S., Broaddus, R.R., Zhu, Z., *et al.* (2008b). Regulation of inflammatory responses by IL-17F. *J Exp Med* *205*, 1063-1075.
- Yang, X.O., Panopoulos, A.D., Nurieva, R., Chang, S.H., Wang, D., Watowich, S.S., and Dong, C. (2007). STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. *J Biol Chem* *282*, 9358-9363.
- Yang, X.O., Pappu, B.P., Nurieva, R., Akimzhanov, A., Kang, H.S., Chung, Y., Ma, L., Shah, B., Panopoulos, A.D., Schluns, K.S., *et al.* (2008c). T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma. *Immunity* *28*, 29-39.
- Yao, Z., Fanslow, W.C., Seldin, M.F., Rousseau, A.M., Painter, S.L., Comeau, M.R., Cohen, J.I., and Spriggs, M.K. (1995). Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor. *Immunity* *3*, 811-821.
- Ye, P., Rodriguez, F.H., Kanaly, S., Stocking, K.L., Schurr, J., Schwarzenberger, P., Oliver, P., Huang, W., Zhang, P., Zhang, J., *et al.* (2001). Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J Exp Med* *194*, 519-527.
- Yoo, T.J., Kim, S.Y., Stuart, J.M., Floyd, R.A., Olson, G.A., Cremer, M.A., and Kang, A.H. (1988). Induction of arthritis in monkeys by immunization with type II collagen. *J Exp Med* *168*, 777-782.
- Zheng, Y., Danilenko, D.M., Valdez, P., Kasman, I., Eastham-Anderson, J., Wu, J., and Ouyang, W. (2007). Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. *Nature* *445*, 648-651.
- Zhou, L., Ivanov, I., Spolski, R., Min, R., Shenderov, K., Egawa, T., Levy, D.E., Leonard, W.J., and Littman, D.R. (2007). IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol* *8*, 967-974.
- Ziolkowska, M., Koc, A., Luszczkiewicz, G., Ksiezopolska-Pietrzak, K., Klimczak, E., Chwalinska Sadowska, H., and 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*, 2832-2838.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vergleich zwischen einem normalen Gelenk und einem rheumatischen Gelenk ...	9
Abbildung 2: Darstellung der verschiedenen T-Helfer-Zell-Subpopulation	22
Abbildung 3: Analyse der G6PI-spezifischen Zytokinproduktion von Th-Zellen am Beispiel von IL-17.	39
Abbildung 4: Darstellung der <i>progressive gating</i> -Strategie	40
Abbildung 5: Auswertung der <i>in-vivo</i> -Proliferation.....	41
Abbildung 6: FACS-Analyse eines CD4 ⁺ MACS-Sorts.....	42
Abbildung 7: <i>In vivo</i> Proliferation von CD4 ⁺ T-Zellen in suszeptiblen und nicht-suszeptiblen Mausstämmen.....	45
Abbildung 8: Kinetik des Expressionsprofils von IL-17A in der G6PI-induzierten Arthritis	46
Abbildung 9: G6PI-spezifische Produktion der Th17-Zytokine, IL-17 und TNF- α in der G6PI-induzierten Arthritis	47
Abbildung 10: G6PI-spezifische Produktion des Th17-Zytokins IL-22 in der G6PI-induzierten Arthritis.....	48
Abbildung 11: G6PI-spezifische Produktion von GM-CSF in der G6PI-induzierten Arthritis	48
Abbildung 12: Antigen-spezifische Produktion von IFN- γ und RANKL	49
Abbildung 13: Antigen-spezifische Produktion von IL-6 und IL-10	50
Abbildung 14: Antigen-spezifische Produktion von IL-4 und IL-2	51
Abbildung 15: Polyfunktionale T-Zellen in der G6PI-induzierten Arthritis	52
Abbildung 16: Polyfunktionale T-Zellen in der G6PI-induzierten Arthritis	54
Abbildung 17: Polyfunktionale T-Zellen in der G6PI-induzierten Arthritis	54
Abbildung 18: <i>In vivo</i> Blockade von IL-23p19 in der Induktionsphase der G6PI-induzierten Arthritis.....	55
Abbildung 19: <i>In vivo</i> Blockade von IL-23p19 in der Effektorphase	56
Abbildung 20: <i>In vivo</i> Blockade von IL-17 mit MM17F3	56
Abbildung 21: <i>In vivo</i> Blockade von TNF- α in der Induktions- und der Effektorphase der G6PI-induzierten Arthritis	57
Abbildung 22: Blockade des <i>Transsignalling</i> des IL-6R mit löslichem gp130 (sgp130).....	58
Abbildung 23: <i>In vivo</i> Blockade von IFN- γ und IL-4 bei der G6PI-induzierten Arthritis	59
Abbildung 24: <i>Epitop-Mapping</i> in der G6PI-induzierten Arthritis.....	60
Abbildung 25: Beispiel <i>Epitop-Mapping</i> in der G6PI-induzierten Arthritis.....	61
Abbildung 26: <i>In vitro</i> Proliferation der immunodominanten Peptide G6PI ₈₅₋₉₉ und G6PI ₄₆₉₋₄₈₃ ..	62
Abbildung 27: Arthritisinduktion in DBA/1 Mäusen durch Immunisierung mit G6PI ₈₅₋₉₉ und G6PI ₄₆₉₋₄₈₃	62
Abbildung 28: Histopathologie nach der Induktion der Arthritis mit G6PI ₈₅₋₉₉ oder G6PI ₄₆₉₋₄₈₃ ..	63
Abbildung 29: Messung der Zytokine IL-17, IFN- γ , IL-6 und IL-22 nach Stimulation mit G6PI, G6PI ₈₅₋₉₉ bzw. G6PI ₄₆₉₋₄₈₃ im ELISA	64
Abbildung 30: Antigen-spezifische Zytokin-Produktion in der Peptid-induzierten Arthritis.....	65
Abbildung 31: G6PI-spezifische Antikörper nach Immunisierung mit G6PI, G6PI ₈₅₋₉₉ oder G6PI ₄₆₉₋₄₈₃	66

Abbildung 32: Chronischer Verlauf der G6PI-induzierten Arthritis in SJL-Mäusen	68
Abbildung 33: Histopathologie bei SJL Mäusen an Tag 30.	68
Abbildung 34: G6PI-induzierte Arthritis in SJL-RAG ^{-/-} -Mäusen	69
Abbildung 35: <i>In vivo</i> Proliferation von CD4 ⁺ T-Zellen nach Immunisierung mit G6PI in SJL-Mäusen	70
Abbildung 36: Exemplarische Darstellung der BrdU-Färbung zur Messung der <i>in vivo</i> Proliferation von CD4 ⁺ T-Zellen nach Immunisierung mit G6PI in SJL-Mäusen.....	70
Abbildung 37: <i>In vivo</i> Depletion von CD4 ⁺ T-Zellen in der Induktionsphase der G6PI-induzierten Arthritis bei SJL-Mäusen	71
Abbildung 38: <i>In vivo</i> Depletion von CD4 ⁺ T-Zellen in der Effektorphase der G6PI-induzierten Arthritis bei SJL-Mäusen	71
Abbildung 39: Depletion von Neutrophilen in der G6PI-induzierten Arthritis von SJL-Mäusen.	72
Abbildung 40: G6PI-spezifische Antikörper in der G6PI-induzierten Arthritis im Vergleich zwischen DBA/1- und SJL-Mäusen an Tag 30	73
Abbildung 41: Zytokinproduktion in der G6PI-induzierten Arthritis im Vergleich zwischen DBA/1- und SJL-Mäusen.....	74
Abbildung 42: Frequenz der Antigen-spezifischen Zytokin-produzierenden CD4 ⁺ -T-Zellen im Vergleich zwischen DBA/1- und SJL-Mäusen in den drainierenden Lymphknoten und der Milz.....	74
Abbildung 43: Exemplarische Darstellung der Antigen-spezifischen Zytokin-Produktion in der G6PI-induzierten Arthritis im Vergleich zwischen DBA/1- und SJL-Mäusen.	75
Abbildung 44: Frequenz von CD4 ⁺ T-Zellen in DBA/1- und SJL-Mäusen	76
Abbildung 45: Zytokinproduktion von CD4 ⁺ CD154 ⁺ T-Zellen in der G6PI-induzierten Arthritis im Vergleich zwischen DBA/1- und SJL-Mäusen in den drainierenden Lymphknoten und der Milz.....	76
Abbildung 46: Neutrophilendepletion in der Induktionsphase der G6PI-induzierten Arthritis ...	77
Abbildung 47: Depletion der Neutrophilen in der Effektorphase der G6PI-induzierten Arthritis	78
Abbildung 48: Klinische Effekte der <i>in vivo</i> Blockade des FcγRIV in der G6PI-induzierten Arthritis.....	79
Abbildung 49: FACS-Färbung peripherer mononukleärer Blutzellen nach B-Zell-Depletion mit CD22-Cal an Tag 9	80
Abbildung 50: Kontrolle der Effizienz der B-Zell-Depletion.	81
Abbildung 51: B-Zelldepletion mit CD22-Cal vor Induktion der Arthritis (Tage (-6, -1)) und in der Induktionsphase (Tage (3, 8)).....	81
Abbildung 52: Histologischer Score nach B-Zelldepletion mit CD22-Cal vor Induktion der Arthritis (Tage (-6, -1)) und in der Induktionsphase (Tage (3, 8))	82
Abbildung 53: Histopathologie nach B-Zell-Depletion vor der Arthritisinduktion (Tage (-6, -1)) und in der Induktionsphase (Tage (3, 8)) der G6PI-induzierten Arthritis.....	82
Abbildung 54: Depletion der B-Zellen in der Effektorphase der G6PI-induzierten Arthritis.....	83
Abbildung 55: G6PI-spezifische Antikörper nach Depletion der B-Zellen vor Arthritis-Induktion und in der Induktionsphase an Tag 9.....	84
Abbildung 56: G6PI-spezifische Antikörper an Tag 24 nach B-Zell-Depletion	85

Abbildung 57: Zytokinproduktion in der G6PI-induzierten Arthritis nach Depletion der B-Zellen vor Arthritisinduktion und in der Induktionsphase der G6PI-induzierten Arthritis	86
Abbildung 58: Zytokinproduktion von CD4⁺CD154⁺ T-Zellen in der G6PI-induzierten Arthritis nach Depletion der B-Zellen vor Arthritisinduktion und in der Induktionsphase.....	87
Abbildung 59: Verminderte TNF-α-Sekretion durch CD4⁺CD154⁺-T-Zellen in B-Zell-depletierten Mäusen	87
Abbildung 60: <i>In vitro</i> Proliferation nach Depletion der B-Zellen vor Arthritisinduktion und in der Induktionsphase der G6PI-induzierten Arthritis	88

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Revidierte Kriterien des <i>American College of Rheumatology (ACR)</i> zur Klassifizierung der RA	8
Tabelle 2: Übersicht über Mausmodelle für die Rheumatoide Arthritis	14
Tabelle 3: Suszeptibilität für die G6PI-induzierte Arthritis von unterschiedlichen Mausstämmen	19
Tabelle 4: Antikörper für die Durchflusszytometrie	25
Tabelle 5: Antikörper und Proteine für in vivo Experimente	26
Tabelle 6: Antikörper für ELISA: Zur Bestimmung der Zytokine verwendete Primär- und Sekundär-Antikörper und zugehörige Puffer.	33
Tabelle 7: Setup des verwendeten verwendeten Durchflusszytometers BD LSR II und die Fluorochrome, die gemessen werden können	36
Tabelle 8: Frequenz (bezogen auf die Gesamtzellzahl, <i>Frequency of Total</i>) der CD4⁺CD154⁺Zytokin⁺ T-Zellen in den inguinalen Lymphknoten und die Gesamtzellzahl der CD4⁺CD154⁺Zytokin⁺ T-Zellen an Tag 9	53
Tabelle 9: Frequenzen der B220⁺CD19⁺ B-Zellen in den Kontrollmäusen und an Tag -6 und -1 mit anti-CD22-Cal-behandelten Mäusen an Tag 9 nach Arthritisinduktion.	80

Wissenschaftliche Beiträge**PUBLIKATIONEN**

Bruns L., Frey O., Morawietz L., Landgraf C., Volkmer R., Kamradt T (2009). Immunization with an immunodominant peptide derived from glucose-6-phosphate isomerase induces arthritis in DBA/1 mice. *Arthritis Research & Therapy* 11, R117

Frey O., Meisel J, Hutloff A., Bonhagen K., **Bruns L.**, Krozcek R.A., Morawietz L., Kamradt T. (2009). Blockade of inducible costimulator inhibits accumulation of polyfunctional T helper cells and autoimmunity.[*submitted*]

POSTER

Frey O., Meisel J., **Bruns L.**, Hutloff A., Morawietz L., Kamradt T.: Blockade of inducible Costimulator (ICOS) inhibits accumulation of polyfunctional Th1/Th17 cells and prevents autoimmune arthritis. Oktober, 2008, San Francisco, ACR/ARHP Scientific Meeting 2008

Bruns L., Frey O., Landgraf C., Volkmer R., Kamradt T.: Peptides derived from Glucose-6-Phosphate Isomerase induce arthritis upon immunization. September, 2008, Berlin, 36. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie

Bruns L., Frey O., Dunussi-Joannopoulos K., Kamradt.: B cell depletion with anti-CD22-Cal immunoconjugate ameliorates Glucose-6-phosphate Isomerase (G6PI) induced arthritis. Septmeber, 2008, Wien, Joint Annual Meeting of the German Austrian Societies of Immunology

Bruns L., Frey O., Landgraf C., Volkmer R., Kamradt T.: Mapping of T cell epitopes in Glucose-6-phosphate-Isomerase-induced arthritis. September, 2007, Heidelberg; 37. Annual Meeting of the German Society for Immunology

Frey O., Reichel A., **Bruns L.**, Morawietz L., Krenn V., Kamradt T.: Short term depletion of regulatory T cells converts self limiting arthritis into a chronic disease. September, 2007, Heidelberg; 37. Annual Meeting of the German Society for Immunology

Bruns L., Frey O., Schubert D., Reichel A., Morawietz L., Krenn V., Kamradt T: Pathogenic and protective role of T cells in glucose-6-phosphate-isomerase-induced arthritis. März, 2006 Breckenridge, Colorado; Keystone Symposia "Tolerance, Autoimmunity and Immune Regulation"

Frey O., **Bruns L.**, Schubert D., Lee Y., Bockermann, R., Morawietz L., Krenn V., Kamradt T: Anti-G6PI antibodies alone are not sufficient to induce disease in a nontransgenic model of arthritis. März, 2006, Breckenridge, Colorado; Keystone Symposia "Tolerance, Autoimmunity and Immune Regulation"

Essl M., **Bruns L.**, Müller C.A., Kalbacher H., Klein G.: Characterization of functional epitopes of human laminin α chains interacting with hematopoietic stem cells. März, 2004, Jena; Annual Meeting of the German Connective Tissue Society

VORTRÄGE

Bruns L., Frey O., Morawietz L., Landgraf C., Volkmer R., Kamradt T.: Mapping of T cell epitopes in Glucose-6-Phospahte-Isomerase induced arthritis. September, 2008, Dresden, 46. Wissenschaftliche Tagung der Gesellschaft für Versuchstierkunde, GV-Solas

Bruns L., Frey O., Schubert D., Reichel A., Morawietz L., Krenn V., Kamradt T.: Pathogenic and protective role of T cells in glucose-6-phosphate-isomerase induced arthritis, Oktober, 2006, Wiesbaden, "34. Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie"

Danksagung

„Last but not least“ möchte ich allen Danken, die zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen haben:
Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Thomas Kamradt für die interessante Themenstellung und die wissenschaftliche Betreuung.

Mein herzlicher Dank gilt allen Mitarbeitern des Instituts für Immunologie!

Annett Krause möchte ich für effektive Problemlösungen in allen Lebenslagen danken!

Mein Dank gilt Christine Beier, Karin Müller, Christine Schulze, Freya Rost, Olga Rudeschko und Manuela Neumann als gute Geister des Instituts, die dafür sorgten, dass G6PI, Plastik, Antikörper und PBS nie ein Ende nahmen.

Sylvia Heink, Anne Taubner, Jenny Freitag, Luciana Berod, Birgit Lehmann, Oliver Frey, Sebastian Berg und Ingo Irmeler danke ich für die Unterstützung bei Wochenend-Diensten im Maushaus, die vielen helfenden Hände beim Verarbeiten unzähliger Milzen und Lymphknoten und kompetente Vertretung im Falle von Sehnenscheidenentzündungen.

Sylvia möchte ich insbesondere für die Beratung bei molekularbiologischen Fragestellungen danken.
Anne danke ich für Chauffeur-Dienste zu früher Morgenstunde (du hast noch ein Frühstück gut!); danke, Jenny, dass du Besichtigung meiner Wohnung möglich gemacht hast, auch wenn die Besichtigenden etwas merkwürdig waren (da ist wohl auch ein Frühstück fällig).

Ingo Irmeler danke ich für die Beratung in Sachen ELISA.

Maria Eschke möchte ich für ihr Engagement und Initiative im IL-27-Projekt danken. Claudia Lück danke ich für das unverdrossene Klonieren.

Sebastian Drube und Frederike Schmitz möchte ich für den **exzellenten Kaffee** danken, den ich jeden Nachmittag genießen durfte.

Den TA-Schülern Kai Kaufmann, Caroline Bocklisch und Caroline Grosse danke ich für ihre unverdrossene Hilfe beim ELISA, auch bei defektem ELISA-*Washer*!

Ich möchte mich bei allen Mitarbeitern des IVTK für die gute Zusammenarbeit und aufopferungsvolle Pflege der Mäuse bedanken.

Gabriele Fernahl danke ich für die Anfertigung unzähliger Gewebeschnitte und Lars Morawietz für deren kompetente Beurteilung.

Bei Falk Nimmerjahn bedanke ich mich für den Antikörper gegen FcR γ IV. Vielen Dank Wenjun Ouang für den anti-IL-22-Antikörper für die *in vivo* Experimente.

Martin Auer möchte ich für die Aufklärung über das „Sumpfmonster-Syndrom“ danken.

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mich bei allen Problemen rund um meinen Umzug unterstützt haben.

Meinen neuen Kollegen der TA AIID möchte ich für die tägliche Erinnerung danken, dass ich „da noch ne Kleinigkeit“ zu erledigen habe.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die während meines gesamten Studiums nie müde wurden, mich zu unterstützen!

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

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

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

Jena, den _____ .