

Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
Institut für Landwirtschaftliche Botanik
und
Universität Rostock, Medizinische Fakultät
Institut für Immunologie

**Untersuchungen zur Rolle von CD95 in der Pathogenese von
Kollagen-induzierter Arthritis der Maus**

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Grades

Doktor der Ernährungs- und Haushaltswissenschaft
(Dr. oec. troph.)

der

Hohen Landwirtschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Bonn

vorgelegt am

18.05.04

von

Hoang Tu-Rapp

aus

Kühlungsborn

Referent: Prof. Dr. R. Goerlich

Koreferenten: Prof. Dr. K. Schellander

Prof. Dr. H. Köhler

Tag der mündlichen Prüfung: 19.11.2004

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Erscheinungsjahr: 2004

Kurzfassung: Untersuchungen zur Rolle von CD95 in der Pathogenese von Kollagen-induzierter Arthritis der Maus

Kollagen-induzierte Arthritis (CIA) - ein Mausmodell für rheumatoide Arthritis (RA) - ist eine chronisch entzündliche Erkrankung, die Eigenschaften aufweist, die der RA sehr ähneln. Zu diesen Ähnlichkeiten gehören u. a. Polyarthritis, Synovitis und als Folge davon Knorpel- und Knochenzerstörung. Die synoviale Hyperplasie ist dabei ein besonderes Kennzeichen der Gelenkzerstörung. Bisher sind die Auslöser für dieses Phänomen unbekannt. Es gibt jedoch Hinweise, die auf ein gestörtes Gleichgewicht von Zellproliferation und Zelltod (Apoptose) hindeuten. Apoptose wird durch die Bindung des CD95-Liganden an das Transmembranprotein CD95 (Fas) induziert. Jedoch wurde auch ein anti-apoptotischer Effekt von CD95 beobachtet. Darüber hinaus wird die lösliche Form von CD95 (sFas) als potenzieller Antagonist für CD95-vermittelte Apoptose diskutiert. So wurde sFas in hoher Konzentration im Synovium und im Serum von Patienten mit RA nachgewiesen. Diese Beobachtungen weisen auf die wichtige Rolle von Fas im Erkrankungsprozess der RA hin.

Um die Rolle von Fas in der Pathogenese von RA zu untersuchen, wurde das Mausmodell CIA eingesetzt. Dazu wurden Fas-mutante (DBA/1J-lpr/lpr) und sFas-transgene (sFas-DBA/1J) Mäuse mit Rinderkollagen II und komplettem Freund's Adjuvans immunisiert und die Suszeptibilität, CIA zu entwickeln, untersucht. Trotz verstärkter Immunantwort auf Rinderkollagen II entwickeln DBA/1J-lpr/lpr-Mäuse eine statistisch signifikant schwächer ausgeprägte Arthritis mit einer niedrigeren Inzidenz als ihre Kontrollen. sFas-DBA/1J-Mäuse zeigten dagegen einen ähnlichen Verlauf der Erkrankung wie ihre Kontrollen trotz erhöhter Immunantwort und veränderter Suszeptibilität gegenüber Fas- und Aktivierungs-induzierter Apoptose. Darüber hinaus waren die kritischen pro-inflammatorischen Zytokine wie der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und die Interleukine-6 und -1 β (IL-6, IL-1 β) in den Pfoten der DBA/1J-lpr/lpr-Mäuse zum Zeitpunkt des Krankheitsbeginns erhöht, was auf die geringe Aktivierungseffizienz dieser Zytokine bei Fas-Mangel hindeutet. Dennoch zeigte die Mausfibroblasten-Zell-Linie NIH3T3 eine geringe Empfindlichkeit gegenüber anti-Fas-Antikörper-induzierter Apoptose und eine erhöhte Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen nach Fas-Ligation. Diese Beobachtungen zeigen, dass eine gestörte Immuntoleranz nicht zu einer verstärkten Suszeptibilität für CIA führt, und dass Fas durch seine stimulierende Wirkung auf lokale Zellen, insbesondere auf die Synovialfibroblasten, eine Rolle in Zerstörungsprozessen im CIA-Synovium spielt. Darüber hinaus gibt es ein empfindliches Gleichgewicht zwischen löslichem und transmembranem Fas und zwischen dem apoptotischen und dem stimulierenden Fas-Pathway. Dessen Regulation könnte wichtig für Autoimmunerkrankungen sein.

Abstract: Studies of the role of CD95 in the pathogenesis of murine collagen-induced arthritis

Collagen-induced arthritis (CIA), the animal model of rheumatoid arthritis (RA), is a chronic inflammatory disease bearing all the hallmarks of RA like e.g. polyarthritis, synovitis, and subsequent cartilage/bone erosions. One feature of the disease thought to contribute to joint damage is synovial hyperplasia. Factors contributing to this phenomenon are unknown, however, imbalance between rates of cell proliferation and cell death (apoptosis) has been suggested. Apoptosis is induced by interaction of CD95-ligand and CD95 (Fas), a transmembrane protein. However, an anti-apoptotic effect after Fas-ligation has previously been observed. In addition, it has been discussed, that the soluble form of CD95 (sFas) has protecting features against Fas-mediated apoptosis. Increased sFas was found in synovial fluids and sera of patients with RA. These observations suggest a role of Fas in the disease process of RA.

To evaluate the role of Fas in the pathogenesis of CIA we determined the susceptibility of Fas-mutant mice (DBA/1J-lpr/lpr) and of soluble Fas transgenic mice (sFas-DBA/1J) to CIA. Disease was induced by immunizing mice with bovine type II collagen (CII) in complete Freund's adjuvant. Contrary to expectation, DBA/1J-lpr/lpr mice developed statistically significant milder disease with lower incidence than the control mice in spite of increased immune responses to CII. On the other hand, sFas-DBA/1J mice developed CIA with mean date of onset and an average score comparable to their control littermates despite increased immune response and impaired susceptibility to Fas- and activation-induced apoptosis. Furthermore, the critical pro-inflammatory cytokines like tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6, and -1 β (IL-6, IL-1 β) were increased in DBA/1J-lpr/lpr mouse paws on the onset of disease despite of milder arthritis suggesting less efficient activation through these cytokines when Fas signalling is deficient. In addition, synovial fibroblast was stimulated by interaction with anti-Fas antibody as evidenced by the expression of pro-inflammatory cytokines and less susceptibility to anti-Fas-induced apoptosis in mouse fibroblast cell line NIH3T3. These observations clearly show that tolerance impairment does not lead to enhanced susceptibility to CIA and that Fas contributes to damage in CIA synovium by inducing proliferation of local cells, in particular synovial fibroblasts. Furthermore, there is a delicate balance between the soluble and membrane form of Fas and the apoptotic and stimulatory Fas pathways. The regulation of this balance may be important to autoimmune diseases.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

II	EINLEITUNG	1
1.1	Autoimmunität.....	1
1.1.1	Rheumatoide Arthritis	3
1.1.2	Mausmodell für rheumatoide Arthritis: Kollagen-induzierte Arthritis	7
1.2	Apoptose	9
1.2.1	Physiologische Bedeutung der Apoptose	10
1.2.2	Regulation von Apoptose	10
1.2.3	Der Apoptose-Reaktionsmechanismus.....	12
1.2.4	CD95 (Fas)-induzierte Apoptose.....	14
1.2.5	Die Bedeutung der Apoptose in rheumatoider Arthritis.....	16
1.2.5.1	Der Einfluss von CD95 (Fas) auf die Entstehung von rheumatoider Arthritis und Kollagen-induzierter Arthritis.....	17
1.2.5.2	Die Bedeutung von löslichem CD95 (sFas) in der Entstehung von rheumatoider Arthritis und Kollagen-induzierter Arthritis.....	18
1.3	Ziel der Arbeit.....	19
2	MATERIAL UND METHODEN	20
2.1	Geräte	20
2.2	Reagenzien und Chemikalien	20
2.3	Zellkulturmedien und Lösungen.....	21
2.4	Antikörper.....	22
2.5	Enzyme	23
2.6	Kits und Assays.....	23
2.7	Versuchsmäuse	24
2.7.1	Fas-mutante DBA/1J-Maus (lpr-Maus).....	25
2.7.2	Transgene T-Zell-spezifische sFas-Maus (sFas-Maus).....	25

2.7.3	Isolierung chromosomaler DNA aus Mausschwanzbiopsien.....	27
2.7.4	Genotypisierung der Mäuse mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	27
2.7.5	Induktion und Dokumentation der Kollagen-induzierten Arthritis.....	29
2.8	Histologie.....	30
2.9	Zellkultur.....	31
2.9.1	Kultivierung von Zellen.....	31
2.9.2	Gewinnung von Zellen aus lymphatischen Organen.....	32
2.9.3	T-Zell Anreicherung.....	32
2.10	Immunologische Methoden.....	33
2.10.1	Apoptose (Zelltod).....	33
2.10.1.1	Fas-induzierter Zelltod.....	33
2.10.1.2	Aktivierungs-induzierter Zelltod.....	34
2.10.1.3	Propidiumiodid-Färbung.....	34
2.10.1.4	Auswertung.....	35
2.10.2	Proliferationstest.....	35
2.10.2.1	[³ H]-Thymidineinbau / Messung der DNA-Synthese.....	36
2.10.2.2	Messung der Interferon- γ Freisetzung.....	37
2.10.3	Zytotoxizitätstest.....	38
2.10.3.1	Gemischte Lymphozytenkultur.....	38
2.10.3.2	Mitogen-stimulierte Targetzellen.....	39
2.10.3.3	Zytotoxizitätstest CytoTox96 [®]	39
2.10.3.4	Auswertung.....	41
2.10.4	Durchflusszytometrie.....	41
2.10.4.1	Phänotypisierung von Zellen.....	42
2.10.5	ELISA zur Messung der B-Zellantwort.....	42
2.11	Mokularbiologische Methoden.....	43
2.11.1	Präparation von RNA.....	43
2.11.1.1	Konzentrationsbestimmung und Qualitätskontrolle der RNA.....	44
2.11.2	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR).....	44
2.11.3	TaqMan Real-Time Polymerase-Kettenreaktion.....	45
2.11.3.1	Durchführung der TaqMan Real-Time Polymerase-Kettenreaktion.....	46
2.11.3.2	Auswertung.....	48

2.12	Statistische Auswertung.....	48
3	ERGEBNISSE	49
3.1	Charakterisierung der transgenen sFas-Mäuse und der mutanten lpr-Mäuse....	49
3.1.1	Genotypisierung der sFas-Mäuse und der lpr-Mäuse mittels Polymerase-Kettenreaktion	49
3.1.2	Expression von Fas auf RNA-Ebene	51
3.1.3	Expression von Fas auf Protein-Ebene.....	52
3.2	Phänotyp der transgenen sFas-Mäuse und der mutanten lpr-Mäuse	53
3.2.1	Bestimmung der Lymphozytenpopulationen	53
3.3	Funktionalität von sFas.....	55
3.3.1	Einfluss von sFas auf den Fas-induzierten Zelltod.....	55
3.3.2	Einfluss von sFas auf den Aktivierungs-induzierten Zelltod	57
3.3.3	Einfluss von sFas auf die naiven T-Zellen und Gedächtniszellen nach Behandlung mit anti-Fas Antikörper	59
3.3.4	Einfluss von sFas auf die Zytotoxizität	61
3.4	Kollagen-induzierte Arthritis der Maus.....	62
3.4.1	Verlauf der Kollagen-induzierten Arthritis	62
3.4.2	Histopathologische Bewertung der Kollagen-induzierten Arthritis	67
3.4.3	Kollagen II-spezifische T-Zellantwort	69
3.4.4	Antigen-spezifische B-Zellantwort	71
3.5	Lokaler Einfluss von Fas.....	73
3.5.1	Einfluss von Fas auf die Zytokin-Expression im Mausgelenk.....	73
3.5.2	Einfluss von anti-Fas Antikörper auf den Zelltod von NIH3T3-Fibroblasten	75
3.5.3	Einfluss von anti-Fas Antikörper auf die Zytokin-Expression der NIH3T3-Fibroblasten	76
4	DISKUSSION	78
4.1	Transgene T-Zell-spezifische sFas-Maus	78
4.2	Suszeptibilität transgener sFas-Mäuse gegenüber Kollagen-induzierter Arthritis	81
4.3	Einfluss von Fas auf die Induktion und Entwicklung von Kollagen-induzierter Arthritis	82

4.4	Fas-vermittelte Stimulierung von gelenkspezifischen Zellen	85
4.5	Fas - ein möglicher wichtiger Aktivator im Synovium	87
4.6	Ausblick	90
5	ZUSAMMENFASSUNG	92
6	LITERATURVERZEICHNIS	95

Abkürzungsverzeichnis

AICD	Aktivierungs-induzierter Zelltod
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APC	Antigenpräsentierende Zellen
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum-Albumin
CD	Differenzierungscluster (Cluster of Differentiation)
cDNA	komplementäre DNA
CII	Rinderkollagen II
Ci	Curie
CIA	Kollagen-induzierte Arthritis (Collagen-induced arthritis)
ConA	Concanavalin A
cpm	radioaktive Zerfälle pro Minute
dATP	2'-Desoxy-Adenosin-5'-Triphosphat
dCTP	2'-Desoxy-Cytidin-5'-Triphosphat
dGTP	2'-Desoxy-Guanosin-5'-Triphosphat
DN	Doppelnegativ
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	2'-Desoxy-Nukleotid-5'-Triphosphat
DP	Doppelpositiv
dTTP	2'-Desoxy-Thymidin-5'-Triphosphat
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
FACS	Fluoreszenzaktivierter Zellsorter
Fas-L	Fas-Ligand
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
h	Stunde
HLA	Humanes Leukozytenantigen (Human Leukocyte Antigen)
HRP	Meerrettichperoxidase

IFA	Inkomplettes Freund's Adjuvans
IFN- γ	Interferon-gamma
IL-	Interleukin-
IL-1ra	Interleukin-1 Rezeptorantagonist
kD	Kilodalton
kb	Kilobase
KFA	komplettes Freund's Adjuvans
LN	Lymphknoten
M	Molar
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (Majorhistocompatibilitycomplex)
min	Minute
n	Anzahl
OD	optische Dichte
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PMA	Phorbol-Myristataacetat
RA	Rheumatoide Arthritis
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
sec	Sekunde
sFas	Lösliches Fas (soluble Fas)
SLE	Systemischer Lupus erythematoses
SP	Einfachpositiv
TCR	T-Zell Rezeptor (T-cell receptor)
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
U	Einheit (Unit)

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Klinisches Krankheitsbild einer Hand mit rheumatoider Arthritis	3
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Apoptose-Reaktionsmechanismus, modifiziert nach Beyaert et al. (90).....	13
Abbildung 3: Struktur des Gens für Fas/Fas-L und deren Mutationen, modifiziert nach Nagata et al. (97)	14
Abbildung 4: Schematische Darstellung des sFas-Transgen-Konstrukts.....	26
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Induktion der Kollagen-induzierten Arthritis	29
Abbildung 6: Einteilung des Schweregrades der Kollagen-induzierten Arthritis.	30
Abbildung 7: Gemessene Standardkurve: Optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 450 nm als Funktion der Maus-IFN- γ -Konzentration in [pg/ml].	38
Abbildung 8: Chemische Reaktion zum Nachweis von Laktatdehydrogenase	39
Abbildung 9: Prinzip der Real-Time Polymerase-Kettenreaktion mittels TaqMan [®] -Methode.....	46
Abbildung 10: Darstellung der amplifizierten DNA-Region der sFas-Maus.....	49
Abbildung 11: PCR auf sFas-Transgen.....	50
Abbildung 12: Darstellung der amplifizierten DNA-Region der lpr-Maus	51
Abbildung 13: PCR auf Fas-Mutation.....	51
Abbildung 14: mRNA-Expression von sFas in T-Zellen.....	52
Abbildung 15: Durchflusszytometrische Analyse der Fas-Expression auf Zellen der Lymphorgane.....	53
Abbildung 16: Analyse der CD4- und CD8-Expression auf Thymozyten.....	54
Abbildung 17: Analyse der Zellpopulationen in Lymphknoten.....	55
Abbildung 18: Einfluss von sFas auf den Fas-induzierten Zelltod	57
Abbildung 19: Einfluss von sFas auf den Aktivierungs-induzierten Zelltod	58
Abbildung 20: Verteilung der Gedächtniszellen vor und nach Behandlung mit anti-Fas Antikörper.....	60
Abbildung 21: Einfluss von sFas auf die Zytotoxizität	61
Abbildung 22: Darstellung des Arthritis-Index der sFas- und normalen DBA/1J-Mäuse als Funktion der Zeit	64
Abbildung 23: Darstellung des Arthritis-Index der DBA/1J-lpr/lpr-Mäuse und DBA/1J-lpr/+Mäuse als Funktion der Zeit.....	66

Abbildung 24: Histopathologische Darstellung der Mauspfoten	68
Abbildung 25: Kollagen II-spezifische T-Zellantwort der DBA/1J-lpr/lpr-Mäuse und der Kontrollmäuse	69
Abbildung 26: Kollagen II-spezifische T-Zellantwort der sFas-Mäuse und der Kontrollmäuse	70
Abbildung 27: Kollagen II-spezifische B-Zellantwort der lpr-Mäuse und der Kontrollmäuse	72
Abbildung 28: Ovalbumin-spezifische B-Zellantwort der sFas-Mäuse und der Kontrollmäuse	73
Abbildung 29: Zytokin-Expression in Mauspfoten am Krankheitsbeginn.....	74
Abbildung 30: Zytokin-Expression in Mauspfoten in der chronischen Erkrankungsphase	74
Abbildung 31: Anti-Fas Antikörper-induzierter Zelltod von NIH3T3-Fibroblasten	75
Abbildung 32: Relative Expression von TNF- α und IL-6 der NIH3T3-Fibroblasten nach Stimulierung mit anti-Fas Antikörper	77

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte	20
Tabelle 2: Reagenzien und Chemikalien	20
Tabelle 3: Zellkulturmedien und –zusätze.....	21
Tabelle 4: Lösungen und Puffer	22
Tabelle 5: Zusammensetzung der selbstangestellten Puffer	22
Tabelle 6: Zusammenfassung der verwendeten Versuchsmäuse	25
Tabelle 7: Zusammenfassung der drei CIA-Experimente der sFas-DBA/1J-Mäuse und der DBA/1J-Wildtypen.....	63
Tabelle 8: Zusammenfassung der drei CIA-Experimente der DBA/1J-lpr/lpr-Mäuse und DBA/1J-lpr/+ -Mäuse.....	65

1 EINLEITUNG

1.1 Autoimmunität

Eine Armee verschiedener Zellen und Moleküle verteidigt den Körper vor dem Eindringen schädlicher und körperfremder Organismen. Es hat sich zur Verteidigung neben dem natürlichen Immunsystem das adaptive Immunsystem entwickelt. Durch die positive und negative Selektion im Thymus lernen die T-Zellen das Erkennen der Histokompatibilitätskomplex (MHC)-Moleküle und körpereigener Antigene. In der positiven Selektion müssen die Thymozyten in der Lage sein mit ihren exprimierten T-Zell-Rezeptoren (TCR) ein MHC-Molekül zu binden. Andernfalls sterben die Zellen, wenn es ihnen nicht gelingt innerhalb von drei bis vier Tagen, einen anderen TCR zu exprimieren. Wenn diese Zellen die positive Selektion überlebt haben, so müssen sie die negative Selektion durchlaufen, wo sie körpereigene Antigene zu ignorieren lernen, um schließlich als naive T-Zellen den Thymus verlassen zu dürfen. Diese naiven T-Zellen können jedoch immer noch stark an manche Selbst-Peptid-MHC-Komplexe binden. Dies kann vorkommen, wenn diese Peptide nicht im Thymus gezeigt wurden, d.h. von Proteinen stammen, die nicht im Thymus exprimiert sind. Um zu verhindern, dass dadurch autoreaktive T-Zellen entstehen, führt eine solche starke TCR-Bindung an Selbstantigene zur Anergie der T-Zellen. Dabei teilen sich die Selbst-spezifischen T-Zellen zwar, weisen aber eine gegenüber Effektorzellen veränderte Oberflächenexpression ($CD69^+CD44^+CD25^-$) auf, produzieren kein Interferon- γ (IFN- γ), sind nicht zytotoxisch und verschwinden schließlich (1). Neben der Anergie kann es jedoch auch zur Autoimmunität kommen, wenn T-Zellen körpereigene Strukturen als Fremdartigene erkennen. Wenn diese autoreaktiven T-Zellen nicht beseitigt werden, können sie körpereigenes, gesundes Gewebe angreifen und schließlich zerstören, wie z. B. bei der rheumatoiden Arthritis.

Die Induktion von Autoimmunität ist zwar intensiv untersucht worden, trotzdem sind aber immer noch viele Details unverstanden. Es existieren zahlreiche Hypothesen, von denen

hier einige genannt werden, ohne dass sie im einzelnen erläutert werden sollen. Für eine detaillierte Übersicht siehe den Übersichtsartikel von Theofilopoulos (2):

- „self-ignorance“-Hypothese
- „molecular mimicry“-Hypothese
- „modified self“-Hypothese
- Fehler in der zentralen und peripheren Toleranz
- Polyklonaler Aktivator

Autoimmunkrankheiten können sich an den verschiedensten Organsystemen manifestieren. Einige Bereiche und Gewebe sind jedoch häufiger involviert. Bei der multiplen Sklerose z.B. werden die Myelinscheiden in Gehirn und Rückenmark angegriffen. Im Falle des systemischen Lupus erythematoses (SLE) sind Haut, Nieren und verschiedene innere Organe betroffen. Bei der Basedow-Krankheit werden die hormonbildenden Zellen in der Schilddrüse überstimuliert. In der rheumatoiden Arthritis werden Knorpel und Knochen in Gelenken zerstört.

1.1.1 Rheumatoide Arthritis

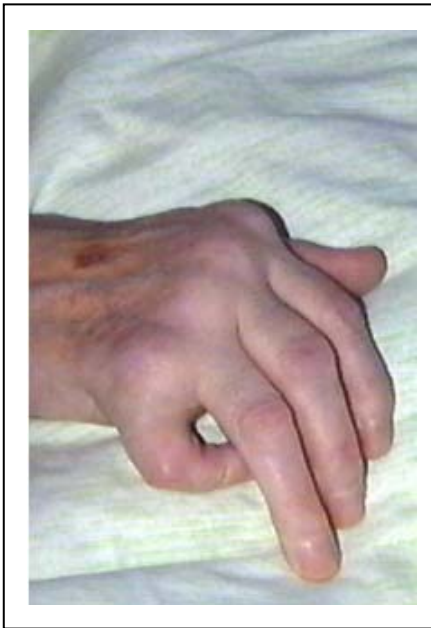


Abbildung 1: Klinisches Krankheitsbild einer Hand mit rheumatoider Arthritis

Die rheumatoide Arthritis wird auch als chronische Polyarthritits bezeichnet, da diese Krankheit normalerweise in mehreren Gelenken auftritt. Meistens sind Fingergrund- und Handwurzelgelenke, die Gelenke der Füße sowie Knie betroffen. Schon im Frühstadium treten Schmerzen in verschiedenen Gelenken, zum Beispiel in den Fingern oder auch in den Zehen auf. Hinzu kommen Gelenkschwellungen mit Rötung und Erwärmung der Haut. Im Spätstadium kommt es schließlich zur Deformation der betroffenen Gelenke als Folge von Knorpel- und Knochenzerstörung (<http://www.rheumanet.org>).

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist eine häufige chronisch entzündliche Erkrankung mit hauptsächlichlicher Gelenkbeteiligung. Die RA wird auch als chronische Polyarthritits bezeichnet, da diese Erkrankung normalerweise in mehreren Gelenken auftritt. Meistens sind Fingergrund- und Handwurzelgelenke, die Gelenke der Füße sowie der Knie betroffen. Schon im Frühstadium treten Schmerzen in verschiedenen Gelenken, zum Beispiel in den Fingern oder auch in den Zehen, auf. Hinzu kommen Gelenkschwellungen mit Rötung und Erwärmung der Haut. Im Spätstadium kommt es schließlich zur Deformation der betroffenen Gelenke als Folge von Knorpel- und Knochenzerstörung (Abbildung 1). Das Vorkommen autoreaktiver T- und B-Lymphozyten sowie von Rheumafaktoren (Autoantikörper gegen das kristallisierbare Fragment (Fc-Fragment) des Immunoglobins G (IgG)) zeichnen die RA als Autoimmunkrankheit aus. Sie wird als Prototyp einer klassischen Autoimmunkrankheit angesehen, hat eine Prävalenz von ca. 1-2% und betrifft zu 2/3 das weibliche Geschlecht. Diese unterschiedliche Geschlechtsverteilung könnte auf dem Einfluss von Geschlechtshormonen basieren. Es wurde berichtet, dass durch eine Östrogen-Ersatz-Therapie das Risiko, an RA zu erkranken, bei Frauen gesenkt werden konnte. Die Auswirkung von Schwangerschaft und Laktation auf den Krankheitsverlauf bekräftigt die Rolle von Geschlechtshormonen (3, 4).

Darüber hinaus könnte ein Polymorphismus in der IFN- γ /IL-26-Genregion für die unterschiedliche Suszeptibilität der Geschlechter verantwortlich sein (5).

Über die Ätiologie der RA ist bislang viel spekuliert worden, sie liegt aber noch immer im Dunkeln. Der Einfluss genetischer Faktoren auf die Entwicklung von RA wurde gezeigt, und es wurde eine polygene Beeinflussung der RA postuliert.

Erste Hinweise auf das Vorhandensein von Suszeptibilitätsgenen wurden 1978 von Stastny aufgezeigt (6). Er beschrieb die Assoziation von RA mit dem HLA-DR4-Locus. Es wurden auch andere HLA-Loci (HLA-DR1, HLA-DR10, HLA-DRw6, HLA-DRB1) identifiziert, die in Assoziation zur RA stehen. Ebenso gab es Untersuchungen, worin eine Assoziation von HLA-DR4 mit anderen Autoimmunerkrankungen gezeigt wurde. Gregersen et al. erklärten 1987 diese Beobachtungen mit der „shared epitope“-Hypothese (7). Sie fanden heraus, dass die identifizierten Allele alle für die Aminosäurefolgen QKRAA/QRRAA/RRRAA in der dritten hypervariablen Region der β -Kette der MHC-Klasse-II-Moleküle kodieren, die die Aminosäureposition 70 bis 74 umfassen und darüber hinaus an Antigenpräsentationen gegenüber den T-Lymphozyten beteiligt sind. Zum Beispiel weisen eineiige Zwillinge eine höhere Konkordanz auf (8). Jedoch gibt es Untersuchungen, die die „shared epitope“-Hypothese nicht bestätigten. In der Studie von McDaniel et al. (9) konnten bei 2/3 der untersuchten an RA erkrankten Afroamerikaner kein für das rheumatoide Epitop kodierendes Allel gefunden werden. Darüber hinaus gibt es Personen mit dieser genetischen Prädisposition, die trotzdem nicht an RA erkranken. Weitere Gene, die eine Assoziation mit rheumatoider Arthritis haben, sind das Gen SLC22A4 (solute carrier family 22, member 4) (10) auf dem Chromosom 5q31 und das Gen PADI4 (peptidyl arginine deiminase, type IV) (11). Beide Gene sind auf hämatologischem und RA-Synovialgewebe exprimiert. Es wurde gezeigt, dass SLC22A4 als Transporter für organische Moleküle in lymphatischen Organen dient (10). PADI4 vermag die Produktion von zitrullinierten Peptiden, welche als Autoantigene fungieren, zu verstärken, und somit das Risiko, an RA zu erkranken, zu erhöhen (11).

Umweltfaktoren können ebenso eine kritische Rolle in der Entstehung von RA spielen. Krankheitserreger wie Viren oder Bakterien könnten sich durch Nachahmung körpereigener Molekülstücke freien Zugang verschaffen und Autoimmunreaktionen

einleiten (12). Es konnte gezeigt werden, dass in der RA im Gewebe und in RA-synovialen Fibroblasten, überwiegend am Ort der Invasion das endogene retrovirale Element L1 exprimiert ist (13). Ebenso gibt es Hypothesen, die besagen, dass Retroviren die RA-synovialen Fibroblasten aktivieren können (14). Es ist aber nach wie vor unklar, was der oder die Auslöser der RA sind.

Histologisch ist die rheumatoide Arthritis gekennzeichnet durch eine chronische Entzündung der Synovialmembran und eine Zerstörung der extrazellulären Matrix. Charakteristisch für die Synovialmembran ist die Auskleidung der synovialen Innenhaut mit zwei Arten von Synoviozyten, den makrophagenartigen (Typ A) und den fibroblastenartigen (Typ B). Während der rheumatoiden Arthritis machen die fibroblastartigen Zellen eine lokale Proliferation durch (15). Diese weisen dabei Eigenschaften transformierter Zellen auf, die nur im RA-Synovium zu beobachten sind (16). Als ein weiterer besonderer Zelltyp in der RA an der Grenze zwischen Knorpel und Pannus präsentiert sich der Pannozyt, der Eigenschaften sowohl von Fibroblasten als auch von Chondrozyten aufweist (17).

Darüber hinaus enthält das rheumatoide Synovium zahlreiche Proteasen wie Serinproteasen, Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und Kathepsine, die an der Knorpel- und Knochenzerstörung des Gelenks beteiligt sind. Zu den MMPs gehören u.a. das Stromelysin (MMP3) und die Kollagenase (MMP1), die zu den wichtigsten Effektoren der Gelenkzerstörung zählen. Außer den oben genannten Enzymen und Zellen sind im rheumatoiden Synovium T-Zellen und Makrophagen vermehrt zu finden. Der Einstrom von Entzündungszellen und T-Zellen in das Synovium wird vor allem durch neugebildete Gefäße ermöglicht. Die Neubildung dieser Gefäße wird dabei durch die Überexpression von angiogenen Faktoren wie dem vaskulären Endothelwachstumsfaktor (VEGF) unterstützt, die zur Proliferation und Migration von synovialen Endothelzellen führt (16).

Die meisten synovialen Makrophagen sind in der synovialen Deckzellschicht lokalisiert, wo sie als Hauptproduzenten von Zytokinen fungieren und den größten Beitrag zur Gelenkzerstörung leisten. Sie befinden sich in einem aktiven Zustand. Ihre verstärkte Fähigkeit als antigenpräsentierende Zellen (APCs) zu dienen, wird durch die erhöhte

Expression von HLA-DR erklärt (18). Darüber hinaus besitzen synoviale Makrophagen die Eigenschaften, Th1 T-Zellen zu aktivieren und zu polarisieren (19).

Die Verwicklung von T-Zellen in die Pathogenese von RA wurde zum ersten Mal mit der Entdeckung von Suszeptibilitätsgenen und deren Assoziation mit RA deutlich (6). Darüber hinaus spricht die hohe Konzentration von T-Zellen im Synovium von RA-Patienten für eine bedeutende Rolle dieser Zellen in der Pathogenese von RA. Ein weiteres wichtiges Indiz für die Bedeutung von T-Zellen in der RA ist die selektive Akkumulation von T-Zell-Gruppen mit Aktivierungs- und Differenzierungsmarkern (CD45⁺, CD27, VLA (very late activation antigen), HLA II) bzw. mit kostimulatorischen Oberflächen-Markern (CD60, CD6, CD28) im RA-Synovium (20). Das Expressionsmuster der Aktivierungsmarker gibt dabei Auskunft über den möglichen Ort der Zellaktivierung. Es wurde beobachtet, dass synoviale CD4⁺T-Zellen im Gegensatz zu zirkulierenden T-Zellen im Blut von RA Patienten eine starke Expression des frühen Aktivierungsmarkers CD69 aufweisen (21, 22). Gegen eine große Bedeutung von T-Zellen im Synovium spricht aber die Beobachtung, dass Zytokine von T-Zellen wie die Interleukine-2 und -4 (IL-2, IL-4) und IFN- γ im Synovium in geringer Menge vertreten sind (16). Im Gegensatz dazu sind pro-inflammatorische Zytokine wie IL-1 β , IL-6 und der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), deren Quelle sowohl die Monozyten als auch die Typ A und Typ B Synoviozyten sind, im Synovium in erhöhter Konzentration vorhanden (23). Der Einfluss der Zytokine auf die Pathogenese von RA ist ebenfalls intensiv untersucht worden. Zu den wichtigsten Zytokinen zählt TNF- α . Neben der Regulation der Bildung von IL-1 und vieler anderer Zytokine (z. B. IL-6, IL-8), steigert TNF- α die Expression der intrazellulären und vaskulären Adhäsionsmoleküle (ICAM, VCAM) und aktiviert Fibroblasten sowie Chondrozyten. Eine weitere im RA-Synovium infiltrierte Zellpopulation stellen die autoreaktiven Lymphozyten dar. Diese zeigen Apoptose-resistente Eigenschaften, die entweder auf eine Überexpression der anti-apoptischen Proteine B-Zell Lymphom-2 (Bcl-2) und Bcl-x1 oder auf eine fehlende Expression des CD95-Liganden (auch als Fas-Ligand bezeichnet) zurück zu führen sind (24-28). Synoviozyten dagegen zeigen ein suszeptibles Verhalten gegenüber anti-Fas Antikörper-induzierter Apoptose, obwohl sie auch in erhöhter Menge Bcl-2 exprimieren (29). Darüber hinaus lässt die Präsenz von

apoptotischen synovialen T-Zellen im RA-Synovium auf die Bedeutung der Apoptose in RA schließen (30).

1.1.2 Mausmodell für rheumatoide Arthritis: Kollagen-induzierte Arthritis

In der Erforschung von Autoimmunerkrankungen spielen Tiermodelle, bzw. vor allem Mausmodelle, eine bedeutende Rolle. Mausmodelle zeigen klinische und histologische Analogien zu menschlichen Autoimmunerkrankungen. Sie werden insbesondere für das Studium von genetischen, immunologischen und umweltbedingten Faktoren eingesetzt.

Das heute meist eingesetzte und bekannteste Mausmodell für rheumatoide Arthritis ist die Kollagen-induzierte Arthritis (CIA). Das erste Tiermodell mit einer autoimmunen Antwort auf Kollagen Typ II, das ein wichtiger Bestandteil von Gelenkknorpel ist, wurde 1977 von Trentham et al. beschrieben (31). Diese Autoren immunisierten Ratten mit homologem und heterologem Kollagen II in KFA (komplettem Freund's Adjuvans) oder IFA (inkomplettem Freund's Adjuvans) und konnten eine Inzidenz von 40% beobachten. Jahre später konnte dieses Modell auf Mäuse (32) und schließlich auf Primaten (33) übertragen werden.

Die CIA weist der RA-ähnliche Eigenschaften wie mononukleäre Zellinfiltration, Hyperplasie der Synovialzellen, Pannusbildung, Knorpel- und Knochenzerstörung, sowie Ankylose und Deformation auf (31, 34). Im Gegensatz zur rheumatoiden Arthritis liegt bei Kollagen-induzierter Arthritis die Inzidenz bei männlichen Mäusen höher als bei weiblichen Mäusen (3, 35, 36).

Der Verlauf der Erkrankung ist vom Kollagentyp, sowie vom Stamm und vom Geschlecht des Versuchstieres abhängig (37, 38). Während allogenes Kollagen II eine milde Arthritis erzeugt, induziert xenogenes Kollagen II eine schwere bis erosive Arthritis sowohl in Mäusen als auch in Ratten. Darüber hinaus ist die dreifache helikale Struktur des nativen Kollagens essentiell für die Induktion der Autoimmunerkrankung, da die denaturierte Form zu keiner Erkrankung führt.

Wie bei RA ist die Suszeptibilität für CIA mit dem MHC-II Molekül assoziiert. Nur Mäuse mit den Haplotypen H2-A^q (z.B. DBA/1 und B10.Q) und H2-A^r (z.B. B10.RIII) sind suszeptibel für CIA (32, 34, 39). Sie unterscheiden sich in den Hauptepitopen. Während das MHC-II^q Molekül das Kollagen II- Peptid in dem Aminosäurebereich von

260-267 (IAGFKGEQ) bindet, erfolgt in H2-A^r Mäusen die Erkennung des Kollagen II - Peptids im Bereich 442-456 innerhalb der Determinanten (siehe auch den Übersichtsartikel von Brand et al., 2003 (40)). Entgegen dieser Erkenntnisse wurde jedoch in C57BL/6J (B6) Mäusen mit dem angeblich CIA-resistenten Hintergrund H2-A^b eine CIA induziert, jedoch nicht in 129/Sv Mäusen, die ebenfalls den H2-A^b Hintergrund haben (41, 42). Dies zeigt die potentielle Beteiligung von Nicht-MHC-Genen an der Entstehung von CIA (43, 44).

Die genetische Assoziation von CIA mit den MHC-II Molekülen H2-A^q und H2-A^r zeigt die Wichtigkeit der T-Zellen bei der Entstehung der Autoimmunerkrankung. Ihre kritische Rolle zeigen ebenso Untersuchungen von $\alpha\beta$ -T-Zellen in der Pathogenese von CIA. So wurde berichtet, dass Mäuse ohne $\alpha\beta$ -T-Zellen komplett resistent gegen CIA sind (45). Ferner führte eine Behandlung mit anti-TCR $\alpha\beta$ monoklonalen Antikörpern zu einer signifikant reduzierten Inzidenz von CIA (46, 47). Ebenso weisen zahlreiche Untersuchungen darauf hin, dass die Induktion von CIA von T- und B-Zellen abhängig ist (48-51). Dieses Bild wird aber durch Ergebnisse von Experimenten mit Knock-out-Mäusen in Frage gestellt, die kontroverse Schlüsse zulassen. CD4-Knock-out-Mäuse mit C57BL/10 Hintergrund (52) (nicht aber solche mit dem CIA-suszeptiblen DBA/1-Hintergrund (53)) zeigen eine erniedrigte Inzidenz und eine mildere Erkrankung. Ferner kann in RAG-/-DBA/1-Mäusen, die keine reifen T- und B-Zellen besitzen, CIA induziert werden (54).

Die Immunisierung mit Rinderkollagen II (CII) in DBA/1-Mäusen führt zur Aktivierung von CII-spezifischen T- und B-Zellen mit anschließender Produktion von anti-CII Antikörpern (35, 55). Jedoch korreliert eine erhöhte anti-CII Antikörper Konzentration nicht mit einer erhöhten Inzidenz oder einer zunehmenden Schwere der Erkrankung. Die Korrelation ist eher bestimmt durch die Affinität und den Isotyp des Antikörpers sowie durch seine Epitopspezifität (56, 57). Die Immunisierung mit Kollagen II von nicht-suszeptiblen Mausstämmen zeigt zwar eine erhöhte B-Zell-Immunantwort, diese Mäuse erkranken jedoch nicht an CIA (34, 41). In der humoralen Kollagen-spezifischen Immunantwort dominiert die Antikörper-Subklasse IgG2. Da IgG2 die Fähigkeit besitzt, die Komplementkaskade zu aktivieren (57), wurde in diesem Zusammenhang die Beteiligung von dem Komplementprotein C5 in der Pathogenese von CIA beschrieben (58).

Aktiviert T-Zellen bilden Zytokine, die direkt pro-inflammatorisch wirken oder andere Zellen wie Makrophagen und Fibroblasten stimulieren. Dabei findet man abhängig vom Gewebe und vom Stadium der Erkrankung unterschiedliche Zytokinprofile vor. In der frühen Phase der Erkrankung dominiert das Zytokin IFN- γ in den Lymphknoten, während in der späten Phase der Erkrankung Zytokine wie TNF- α , IL-6, IL-1 und IL-10 in den Gelenken überwiegen (59). Diesen wird eine kritische Rolle in der Regulation der Entzündungsprozesse im Gelenk und in der Gewebeerstörung zugeschrieben (60-62).

1.2 Apoptose

Die Apoptose ist für die Entwicklung und Aufrechterhaltung eines vielzelligen Organismus ein essentieller Mechanismus. Bis 1972 wurde der Zelltod nur durch die Nekrose erklärt, was dann von Kerr et al. mit einer neuen Form des Zelltodes ergänzt wurde (63). Für die Entwicklung des Immunsystems ist es von großer Bedeutung, dass in der positiven und negativen Selektion autoreaktive Zellen eliminiert werden. Überschüssige Zellen, die nach einer Immunantwort nicht mehr gebraucht werden, werden außerdem durch diesen Mechanismus eliminiert, um das Gleichgewicht mit den entstehenden Zellen zu gewährleisten. Kranke und entartete Zellen müssen entfernt und vernichtet werden, um den Gesamtorganismus zu schützen. Viele Zellen besitzen diese Fähigkeit der Apoptose, die auch als programmierter Zelltod bezeichnet wird. Der Begriff der Apoptose stammt aus der griechischen Sprache ($\alpha\pi\omicron\pi\tau\omega\sigma\zeta$) und heißt übersetzt: vom Baum fallendes Blatt. Diese Bezeichnung führt auf die Beobachtungen von Kerr, Wyllie und Currie (63) zurück, die die ersten morphologischen Unterschiede zwischen Apoptose und Nekrose beschrieben. Sie beobachteten die Kondensation und Fragmentierung des Zellkerns, das Anschwellen der Zellmembran und das Abschnüren von Vesikeln (*blebbing, apoptotic bodies*), welche von Makrophagen phagozytiert wurden. Im Unterschied dazu wurden bei der Nekrose Anschwellungen der Zelle und Organellen mit anschließendem Platzen beobachtet. Der nekrotische Tod kann zu inflammatorischen Prozessen führen, da das Aufplatzen absterbender Zellen zytoplasmatische Proteine an solche Orte des Körpers bringt, an denen sie normalerweise nicht anzutreffen sind (64).

1.2.1 Physiologische Bedeutung der Apoptose

Die Apoptose ist einer der wichtigsten Mechanismen des Immunsystems. Über diesen Mechanismus werden potentiell autoreaktive und nutzlose Immunzellen eliminiert. Neben dessen wichtiger Rolle in der positiven und negativen Selektion im Thymus werden auch Knochenmark B-Zellen mit einem nichtfunktionellen B-Zell-Rezeptor durch Apoptose beseitigt.

Bereits aktivierte Zellen, die nach einer Immunantwort nicht mehr gebraucht werden, sterben den sogenannten Aktivierungs-induzierten Zelltod (AICD) (65, 66). Eine wiederholte Stimulation der aktivierten T-Zellen durch den TCR-CD3-Komplex führt u.a. zu verstärkter Expression der CD95-Liganden (CD95-L). Diese binden dann an das Transmembranprotein CD95 und lösen dadurch die Apoptose aus (siehe Abschnitt 1.2.3.).

Um infizierte Zellen selektiv und effektiv zu töten, können zytotoxische T-Zellen die Targetzellen ebenfalls durch Apoptose eliminieren. Es existieren zwei Mechanismen: a) die CD95-vermittelte Zytotoxizität durch CD4 und CD8 T-Zellen und b) die Perforin-vermittelte Zytotoxizität durch CD8 T-Zellen (67-69).

1.2.2 Regulation von Apoptose

Die ersten wichtigen Hinweise auf Apoptose-regulierende Gene lieferten Experimente an dem Nematoden *Caenorhabditis elegans*. In dem Wurm wurden zunächst drei Gene – Ced-3, Ced-4 und Ced-9 – entdeckt, die direkt in die Regulation der Apoptose involviert sind. Die Gene Ced-3 und Ced-4 sind für den programmierten Zelltod von 131 der 1090 somatischen Zellen während der Ontogenese verantwortlich (70). Ced-4 ist essentiell für die Überführung der Vorform pro-Ced-3 in ihre katalytisch aktive Form Ced-3. Das Gen Ced-9 wirkt dagegen anti-apoptotisch, indem es die Aktivität von Ced-3 und Ced-4 blockiert (71). Als das humane Homolog zu Ced-9 wurde das Gen Bcl-2 und zu Ced-3 das Gen ICE (Interleukin-1 β -converting enzyme) identifiziert (72, 73). Später dann wurde das Homolog Apaf-1 (Apoptosis-protease-activation factor) zu Ced-4 entdeckt, das ähnlich wie Ced-4 essenziell für die Aktivierung von Caspase-3 ist (74). Die Konservierung in der

Sequenz sowie in der Funktion macht deutlich, dass es sich bei programmiertem Zelltod um einen evolutionär konservierten Mechanismus handelt, dessen sich sowohl der Nematode als auch der Mensch bedient.

Das humane Homolog Bcl-2, das in B-Zell Lymphomen verstärkt exprimiert wird (75), enthält inzwischen weitere Mitglieder, die funktionell in zwei Gruppen eingeteilt werden können: in Inhibitoren der Apoptose (z.B. Bcl-2 und Bcl-w) und in Promotoren der Apoptose (z.B. Bax und Bid) (76).

Eine zentrale Rolle in der Ausführung der Apoptose spielen die Caspasen. Sie sind eine Familie von Cystein-Proteasen, die ihre Substrate nach dem Aspartat der Position P1 schneiden. Sie werden als Proenzyme in der Größe von ca. 35 kDa synthetisiert. In der aktiven Form sind sie heterotetramere Proteine und bestehen aus zwei ca. 10 kDa und zwei ca. 20 kDa großen Untereinheiten (77, 78). Caspasen aktivieren sich autokatalytisch oder zum Teil auch gegenseitig. Sie fungieren dabei als Vermittler und Verstärker der Todessignale im Apoptose-Pathway (79). Durch die Proteolyse zahlreicher Substrate kommt es zu morphologischen Veränderungen der Zelle, die denen der Apoptose gleichen. Zu den Substraten der Caspasen gehören z. B. Proteine im Zellkern wie Laminin, das zytoskeletale Protein Fodrin, das Actin-Regulationsprotein Gelsolin, die p21-aktivierte Kinase (PAK2) und die fokale Adhäsionskinase (FAK) (80-83). Eine wichtige Rolle spielt die Caspase-3, da sie durch zahlreiche Todessignale aktiviert wird und wichtige zelluläre Proteine wie die poly(ADP-ribose)Polymerase (PARP) für die DNA-Reparatur und den DNA-Fragmentierungsfaktor (DFF) spaltet (84, 85). Sie ist in der Aktivierungskaskade in der CD95-induzierten Apoptose ein wesentlicher Bestandteil. Die Spaltung von PARP, dessen Expression durch Einzel- und Doppelstrangbrüche der DNA reguliert wird, führt zum Ausfall eines wichtigen DNA-Reparatur-Mechanismus (86, 87). Zusammen mit der durch Ca^{2+} -stimulierten Caspase-aktivierten-Deoxyribonuclease (CAD) wird die Spaltung von PARP für die Bildung der typischen DNA-Leiter verantwortlich gemacht.

1.2.3 Der Apoptose-Reaktionsmechanismus

Die Apoptose wird induziert durch die Bindung von Liganden an funktionelle Rezeptoren. Diese Rezeptor-Liganden-Bindungen sind z.B. die Interaktionen zwischen TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) und dem „Decoy“-Rezeptor (88), zwischen TWEAK (Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis) und dem „Todes“-Rezeptor (88), zwischen TNF und dem TNF-Rezeptor1 bzw. dem TNF-Rezeptor2 (89), sowie zwischen CD95-L (Fas-L) und dem CD95-Rezeptor (Fas).

Die Fas-vermittelte Apoptose wird, wie oben bereits erwähnt, ausgelöst durch die Interaktion von Fas mit seinem Liganden Fas-L, welcher nur auf bestimmten Zellen exprimiert ist (91). Dabei ist die Trimerisierung von Fas notwendig, um den Apoptose-Reaktionsmechanismus auszulösen (92). Die Polymerisierung von Fas führt zur Bildung eines als „death inducing signaling complex“ (DISC) bezeichneten Rezeptorsignalkomplexes (92). Dieser Komplex umfaßt dabei das Todesdomäne-Adaptormolekül FADD (Fas-associated death domain) und die Caspase-8. FADD bindet mit seinen Todesdomänen (DD) die Todesdomänen des Fas-Rezeptors über homophile Wechselwirkungen. Auf der anderen Seite bindet dann das Molekül pro-FLICE (FADD like-II- β -converting enzyme, auch als pro-Caspase-8 bekannt) über die Todeseffektordomäne (DED), die sowohl in pro-FLICE als auch in FADD enthalten ist. Das Rekrutieren von pro-FLICE in den DISC führt zu dessen autokatalytischer Spaltung, und aus den Untereinheiten formieren sich die aktiven Heterotetramere der Caspase-8 (93). Die aktive Caspase-8 ist dann in der Lage, die Caspasekaskade zu aktivieren, indem sie weitere pro-apoptische Caspasen (einschließlich pro-Caspase-3) spaltet, und die dann schließlich die Apoptose einleiten.

Der oben dargestellte Weg beschreibt den Apoptose-Reaktionsmechanismus Typ I, der sich vom Typ II unterscheidet. Zu Typ I-Zellen gehören beispielsweise die T-Leukämie-Zell-Linie H9 und die B-Lymphom-Zell-Linie SKW6.4. In Typ II-Zellen (T-Lymphom-Zell-Linie Jurkat und CEM) führt die Aktivierung von Caspase-8 zur Spaltung von Bid (Bcl-2 Interacting Domain), einem Mitglied der Bcl-2 Familie. Dies führt dann zur Dipolarisierung der Mitochondrienmembran und anschließend zur Freisetzung von AIF (apoptosis inducing factor), Cytochrom *c* und DIABLO/Smac (direkt IAP-binding protein with low pI/second mitochondrial activator of caspases). Zusammen mit dem Apaf-1 und

der Caspase-9 bildet das Zytochrom im Zytoplasma das sogenannte „Apoptosom“. Dabei wird die Caspase-9 durch proteolytische Spaltung aktiviert. Die aktivierte Caspase-9 ihrerseits spaltet weitere Caspasen, insbesondere Caspase-3, und leitet somit die Apoptose ein (91, 94, 95) (Abbildung 2).

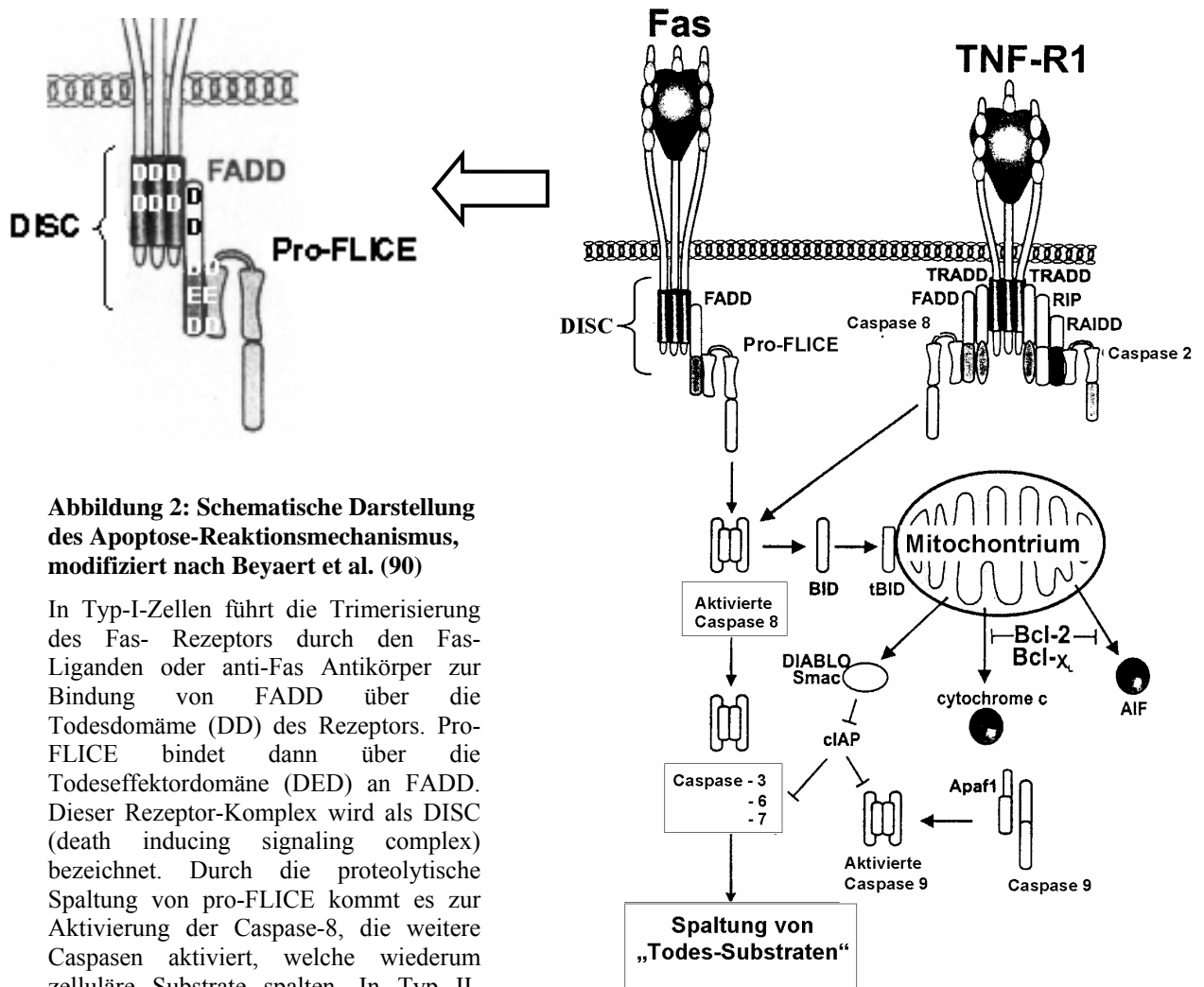


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Apoptose-Reaktionsmechanismus, modifiziert nach Beyaert et al. (90)

In Typ-I-Zellen führt die Trimerisierung des Fas- Rezeptors durch den Fas-Liganden oder anti-Fas Antikörper zur Bindung von FADD über die Todesdomäne (DD) des Rezeptors. Pro-FLICE bindet dann über die Todeseffektordomäne (DED) an FADD. Dieser Rezeptor-Komplex wird als DISC (death inducing signaling complex) bezeichnet. Durch die proteolytische Spaltung von pro-FLICE kommt es zur Aktivierung der Caspase-8, die weitere Caspasen aktiviert, welche wiederum zelluläre Substrate spalten. In Typ II-Zellen wird die Apoptose durch die Bindung des TNF-Rezeptors durch seine Liganden ausgelöst. Dabei führt die Aktivierung von Caspase-8 zur Spaltung von Bid, was zur Dipolarisierung der Mitochondrienmembran und anschließend zur Freisetzung von Cytochrom c und DIABLO/Smac führt. Zusammen mit Apaf-1 und pro-Caspase-9 bildet Cytochrom c das sogenannte Apoptosom, wodurch die pro-Caspase-9 zu Caspase-9 aktiviert wird, die wiederum weitere Caspasen zur Einleitung der Apoptose auslöst. Abkürzungen: **AIF**: apoptosis inducing factor, **Apaf-1**: apoptosis protease-activation factor-1, **Bid**: Bcl-2 interacting domain, **Bcl-2**: B-cell lymphoma-2, **DD**: death domain, **DED**: death effector domain, **DISC**: death inducing signaling complex, **FADD**: Fas-associated DD, **pro-FLICE**: pro-FADD like-II- β -converting enzyme, **RAIDD**: RIP-associated ICH-1/CED-3-homologous protein with death domain, **RIP**: receptor interacting protein, **TRADD**: TNFR1-associated death domain protein, **DIABLO/Smac**: direct IAP-binding protein with low pI/second mitochondrial activator of caspases.

Zusammen mit Apaf-1 und pro-Caspase-9 bildet Cytochrom c das sogenannte Apoptosom, wodurch die pro-Caspase-9 zu Caspase-9 aktiviert wird, die wiederum weitere Caspasen zur Einleitung der Apoptose auslöst. Abkürzungen: **AIF**: apoptosis inducing factor, **Apaf-1**: apoptosis protease-activation factor-1, **Bid**: Bcl-2 interacting domain, **Bcl-2**: B-cell lymphoma-2, **DD**: death domain, **DED**: death effector domain, **DISC**: death inducing signaling complex, **FADD**: Fas-associated DD, **pro-FLICE**: pro-FADD like-II- β -converting enzyme, **RAIDD**: RIP-associated ICH-1/CED-3-homologous protein with death domain, **RIP**: receptor interacting protein, **TRADD**: TNFR1-associated death domain protein, **DIABLO/Smac**: direct IAP-binding protein with low pI/second mitochondrial activator of caspases.

1.2.4 CD95 (Fas)-induzierte Apoptose

Fas ist ein Mitglied der TNF-R Familie. Sein Gen ist auf Chromosom 10 lokalisiert. Es ist ein 45 kDa großes Oberflächenprotein und gehört zu den Typ I-Transmembranproteinen, die im extrazellulären Bereich 2-6 Kopien einer cyteinreichen Subdomäne aufweisen, die aus ca. 40 Aminosäuren (AS) mit 6 konservierten Cysteinen besteht (96).

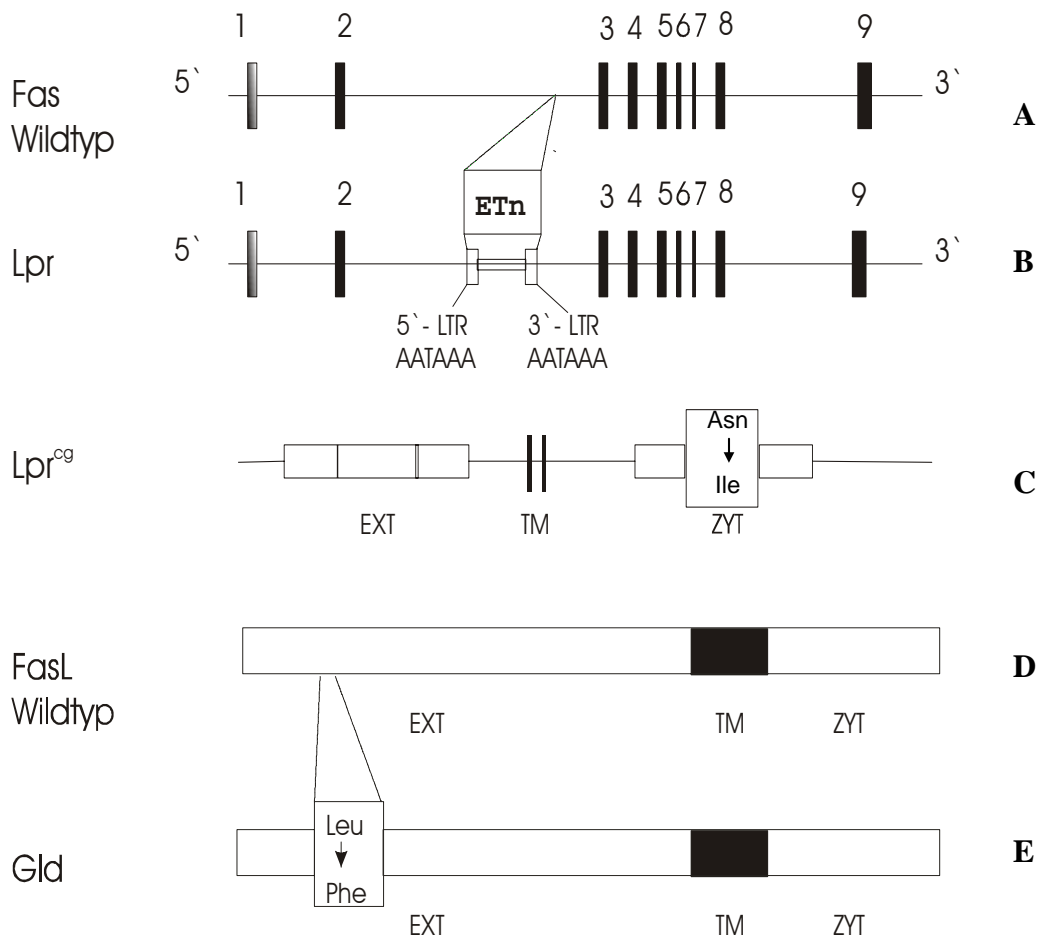


Abbildung 3: Struktur des Gens für Fas/Fas-L und deren Mutationen, modifiziert nach Nagata et al. (97)

Schematische Darstellung der DNA des Fas-Gens und der *lpr*-Mutation (A,B). Das Fas-Gen hat 9 Exons und 8 Introns. In der *lpr*-Maus enthält das Fas-Gen im Intron 2 eine Insertion eines 5,4 kb großen ETn (early transposable element) Retrotransposons. Das Long Terminal Repeat (LTR) des ETns trägt das Terminationssignal AATAAA. In der *lpr^{cg}*-Maus (C) erfolgt im zytoplasmatischen Bereich als Folge einer Punktmutation die Translation in Asparagin statt in Isoleucin. In der *gld*-Maus wird am C-Terminus der kodierenden Region für Fas-L aufgrund einer Punktmutation das Phenylalanin durch Leucin ersetzt (D,E).
 Abkürzungen: **Asn**:Asparagin, **Et**n: early transosable element, **EXT**: extrazelluläre Region, **gld**: generalized lymphoproliferative disease, **Ile**: Isoleucin, **Leu**: Leucin, **lpr**: lymphoproliferation, **lpr^{cg}**: *lpr* complementing *gld*, **LTR**: Long Terminal Repeat, **Phe**: Phenylalanin, **TM**: transmembrane Region, **ZYT**: zytoplasmatische Region.

Diese Sequenzhomologie findet sich in allen Mitgliedern der TNF-Familie, zu denen die TNF-Rezeptoren (TNF-R1 and TNF-R2), der Nervenwachstumsfaktor-Rezeptor (NGF-R), CD40, OX40, CD27, 4-1BB, CD30, der Lymphotoxin- β -Rezeptor (LT β -R), das Osteoprotegerin (OPG) und TRAIL-R1 - 4 gehören (98). Der Fas-Rezeptor besitzt ein intrazelluläres Sequenzmotiv (ca. 80 AS), das als Todesdomäne bezeichnet wird.

Im Thymus der Maus ist Fas exprimiert in CD4⁺CD8⁺ doppelpositiven (DP) unreifen T-Zellen sowie CD4⁺ oder CD8⁺ einfachpositiven (SP) und CD3⁺CD4⁻CD8⁻ doppelnegativen (DN) reifen T-Zellen. Jedoch ist eine Fas-Expression in Vorläufer-T-Zellen, CD3⁻DN, gar nicht oder nur in geringer Menge zu detektieren (99, 100). In der Milz ist eine starke Fas-Expression in T-Zellen auszumachen (100). Neben der Expression in normalen lymphoiden Zellen ist Fas ebenso in malignen lymphoiden und nicht-lymphoiden Zellen exprimiert.

Der Fas-Ligand ist ebenso ein transmembranes Molekül, das auf aktivierten lymphoiden Zellen exprimiert ist. Er ist Mitglied der korrespondierenden TNF-Familie und sein Gen ist auf Chromosom 1 lokalisiert.

Die Bedeutung des Fas/Fas-L-Systems wurde erst mit der Entdeckung der *lpr*-Mäuse klar. *Lpr*- (lymphoproliferation) und *gld*- (generalized lymphoproliferative disease) Mäuse zeigen eine spontane rezessive Mutation im Chromosom 19 bzw. im Chromosom 1 (101, 102). Das Fas-Gen der *lpr*-Maus enthält eine Insertion eines 5,4 kb (Kilobasen) großen ETn (early transposable element) Retrotransposons im Intron 2. Das Long Terminal Repeat (LTR) des ETns trägt das Terminationssignal AATAAA, wodurch eine vorzeitige Beendigung der Transkription der Fas-mRNA herbeigeführt wird. Untersuchungen mittels Northern Blots zeigen jedoch, dass *lpr*-Mäuse ein wenig Fas-mRNA exprimieren (103), was darauf hindeutet, dass die Mutation in *lpr*-Mäusen lückenhaft ist. Schließlich wird in diesem Zusammenhang eine weitere Mutation in dem *lpr*-Locus erwähnt: die *lpr*^{cg} (*lpr* complementing *gld*). Hierbei wird die Fas-mRNA in der vollen Länge wie im Wildtyp exprimiert. Jedoch trägt die Fas-mRNA in der Mitte der zytoplasmatischen Region eine Punktmutation (T zu A), was zur Folge hat, dass die Translation in Asparagin statt in Isoleucin erfolgt (103). Dies führt dazu, dass Fas nicht mehr in der Lage ist, das Todessignal weiterzuleiten.

Eine weitere Punktmutation liegt bei *gld*-Mäusen vor. Das Maus-Gen für Fas-L ist im Chromosom 1 lokalisiert. Die Punktmutation ist am C-Terminus der kodierenden Region

für Fas-L zu finden (104). Dies hat zur Folge, dass Phenylalanin durch Leucin ersetzt wird, und dadurch die Fähigkeit verloren geht, Fas zu binden (Abbildung 3).

Sowohl Fas als auch sein Ligand (Fas-L) können als lösliche Formen vorliegen (105-107). Solche Formen können auf zweierlei Wegen entstehen: erstens, durch alternatives Splicing wie bei IL-4R und IL-7R (108, 109) wird das lösliche Fas erzeugt (105). Dabei existieren drei funktionale lösliche Varianten für das humane Fas (105). Zweitens entsteht durch proteolytische Spaltung des membran-gebundenen Rezeptors wie z.B. bei IL-2R (110, 111) der lösliche humane Fas-Ligand (106, 112). Die Spaltung von transmembranem Fas-L durch Metalloproteinase führt zur Freisetzung von löslichem Fas-L (sFas-L) (106). Löslicher Fas-L kommt sowohl bei Menschen als auch bei Mäusen vor. Jedoch ist nur der humane sFas-L apoptotisch aktiv (112).

1.2.5 Die Bedeutung der Apoptose in rheumatoider Arthritis

Die Deregulation von Apoptose hat schwerwiegende Folgen. Vermehrte Apoptose führt zur Eliminierung lebensnotwendiger Zellen, während eine verminderte Apoptose zur Akkumulation autoreaktiver oder transformierter Zellen führt.

Das Acquired Immunodeficiency Syndrom (AIDS) ist durch ein apoptotisches Absterben von CD4⁺T-Helfer-Zellen gekennzeichnet. Andere Erkrankungen wie der systemische Lupus erythematoses (SLE) und die rheumatoide Arthritis sind gekennzeichnet durch eine Akkumulation von autoimmunen Zellen (64).

Die synoviale Proliferation und die exzessive mononukleäre Infiltration im RA-Synovium könnten auf einen gestörten Apoptosemechanismus zurückzuführen sein (113). In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass autoreaktive Lymphozyten, die im Synovium infiltriert sind, Apoptose-resistente Eigenschaften aufweisen, was auf die Expression von Bcl-2 und Bcl-xl oder fehlende Expression von Fas-L zurückzuführen ist (24-28). Jedoch gibt es auch widersprüchliche Ergebnisse, die zeigen, dass infiltrierte T-Zellen Apoptose-sensitiv sind (114). Catrina et al. fanden heraus, dass in der chronischen Phase verglichen mit der frühen Phase der rheumatoiden Arthritis vermehrt apoptotische Zellen vorkommen (115). Andererseits wurde gezeigt, dass Bcl-2- und Onkogen-exprimierende Synoviozyten, suszeptibel für anti-Fas Antikörper-induzierte Apoptose sind (116). Schlußfolgernd kann festgehalten werden, dass im RA-Synovium die pro- und anti-

apoptotische Mechanismen eng miteinander verbunden sind. Ein Ungleichgewicht derselben könnte verantwortlich für die Pathologie der RA sein.

1.2.5.1 Der Einfluss von CD95 (Fas) auf die Entstehung von rheumatoider Arthritis und Kollagen-induzierter Arthritis

Mäuse mit der spontanen Mutation im Fas-kodierenden Locus *lpr* und im Fas-L-kodierenden Locus *gld* weisen einen charakteristischen Phänotyp auf, der Lymphadenopathie und Splenomegalie sowie SLE-ähnliche Erkrankungen umfaßt. Ältere *lpr*-Mäuse können sogar an Arthritis erkranken. Diese Erscheinung ist auf die progressive Akkumulation von atypischen Populationen wie aus dem Thymus stammenden B220⁺-Zellen, TCRαβ⁺, CD3⁺, CD44⁺, CD28⁺, CD2⁻ und CD4⁻CD8⁻(doppelnegativ, DN)Thy1⁺-Zellen zurückzuführen (117).

Mutationen im Fas-Gen existieren ebenfalls beim Menschen. Diese leiden an dem sogenannten Canale-Smith Syndrom mit Lymphadenopathie, Hepatosplenomegalie und Hypergammaglobulinämie (97).

MRL-*lpr/lpr* Mäuse entwickeln spontan systemischen Lupus erythematodes (118) und RA-ähnliche Erkrankungen (119). Diese produzieren große Mengen an IgG und IgM Antikörpern sowie anti-DNA Autoantikörper und Rheumafaktoren (120).

Homozygote *lpr*- und *gld*-Mäuse sind resistent gegenüber experimenteller autoimmuner Enzephalomyelitis (EAE) (121, 122). Es wurde postuliert, dass Fas und Fas-L eher im Entzündungsprozess und in der Zerstörung von Myelin im Zentralnervensystem eine kritische Rolle spielen als in der peripheren T-Zellaktivierung (123, 124). Welchen Einfluss Fas auf die Entstehung von Kollagen-induzierter Arthritis hat, ist noch unbekannt. Aber die schon bereits erwähnte widersprüchliche Beobachtung der apoptotischen Zellen im RA-Synovium, sowie die Parallele von CIA zu EAE deuten auf eine Beteiligung von Fas/Fas-L hin. Sumida et al. postulierten eine nicht-ausreichende Eliminierung von Fas-L-exprimierenden autoreaktiven T-Zellen und von Synoviozyten im RA-Synovium. Die überlebenden autoreaktiven T-Zellen, die ebenso durch den blockierenden Effekt von sFas dem Tod entgangen sind, sind verantwortlich für die chronische Entzündung in RA (30). Andererseits gibt es Hinweise für anti-apoptotische Eigenschaften von Fas (125-129). Es wurde gezeigt, dass die Kreuzreaktion von Fas mit dem anti-Fas Antikörper auch zur T-

Zell-Proliferation führen kann (126, 127). Es ist daher anzunehmen, dass Fas nicht nur Apoptose induziert, sondern möglicherweise auch verantwortlich ist für bestimmte Aktivierungsvorgänge.

1.2.5.2 Die Bedeutung von löslichem CD95 (sFas) in der Entstehung von rheumatoider Arthritis und Kollagen-induzierter Arthritis

Das Vorkommen von löslichen Zelloberflächenmolekülen ist ein natürliches Phänomen. Jedoch kann das gleichzeitige Vorkommen der löslichen Formen von Fas (sFas) und Fas-L (sFas-L) das Gleichgewicht von Fas- und Fas-L-Interaktion stören, was möglicherweise zur Deregulation der Apoptose führen kann. Den löslichen Formen von Fas werden anti-apoptotische Eigenschaften zugeschrieben (130).

Erhöhtes Vorkommen von sFas und sFas-L wurde im Serum von Patienten mit SLE und RA gefunden (107, 131, 132). Hasunuma et al. (1997) wiesen sFas im humanen Synovium nach und fanden heraus, dass die Konzentration von sFas entsprechend dem Grad der „disease activity“ zunahm (gemessen an der Erythrozytensedimentationsrate und dem C-reaktivem Protein Spiegel) (133). Jedoch konnte bisher nicht geklärt werden, welche Rolle das lösliche Fas in RA oder SLE spielt. In *in vitro*-Experimenten wurde der blockierende Effekt von sFas gezeigt (130). *In vivo*-Experimente zur Klärung der Rolle von sFas sind selten. Matsuki et al. (2002) untersuchten die protektive Wirkung von sFas *in vivo*, indem Mäuse mit sFas-exprimierenden Adenoviren infiziert wurden (134). Bisher fehlen jedoch weitere *in vivo*-Untersuchungen, die dazu beitragen, die Rolle von löslichem Fas in der Entstehung von RA bzw. von CIA zu klären.

1.3 Ziel der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss von transmembranem Fas und seiner löslichen Form (sFas) auf die Entstehung der Kollagen-induzierten Arthritis der Maus untersucht werden. Die Kollagen-induzierte Arthritis ist ein häufig verwendetes Tiermodell für die rheumatoide Arthritis (s. o.).

Die Bedeutung von löslichem Fas in CIA wurde an der T-Zell-spezifischen transgenen sFas-Maus, die nach T-Zell-Stimulierung lösliches Fas exprimiert und produziert, untersucht. Insbesondere sollte die Rolle von sFas in der Regulation der Apoptose aufgezeigt werden. Dazu wurden Messungen zum Einfluss von löslichem Fas auf den Zelltod herangezogen und die Folge auf die T-Zell-Entwicklung bestimmt. Darüber hinaus wurde untersucht, ob das lösliche Fas die Suszeptibilität, eine CIA zu entwickeln, beeinflusst.

In einem weiteren Ansatz sollte die Rolle von transmembranem Fas in der Entstehung und Entwicklung von CIA untersucht werden. Es wurden dabei in CIA-suszeptiblen DBA/1J-Mäusen mit normaler Funktion von Fas und Mäusen mit einem homozygoten Fas-Gendefekt (DBA/1J-lpr/lpr) mit Rinderkollagen II und Freund's Adjuvans eine CIA induziert. Neben der Untersuchung der Toleranz sollte das Zytokinexpressionsmuster im Gelenk die potenzielle Rolle von Fas als Aktivator im Entzündungsprozess aufklären. Untersuchungen zur möglichen stimulierenden Funktion von Fas wurden in anschließenden *in vitro*-Experimenten mit der Zell-Linie der Mausfibroblasten NIH3T3 durchgeführt.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Geräte

Tabelle 1: Geräte

Gerät	Typ; Hersteller/Vertrieb/Sitz
Counter	Scintillation counter Wallace 1214 Rackbeta, LKB, Bromma, Sweden
ELISA-Reader	Titertek Multiskan Plus, Programm: Synelisa Software; Labsystem, Helsinki, Finland.
Durchflußzytometer	FACScan, Programm: Cell Quest Version 1.2.2 ; Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
PCR-Maschinen	GeneAmp, PCR System 2400; Applied Biosystems Mastercycler Gradient; Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Spektrometer	SmartSpec TM 3000 Bio-Rad, München, Deutschland
TaqMan	ABI PRISM 7700 Sequence Detector, Programm: Sequence Detector v. 1.6.3, Weiterstadt, Deutschland
Zentrifugen	Biofuge, pico; Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland Megafuge 1.0; Megafuge 1.0R, Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland

2.2 Reagenzien und Chemikalien

Tabelle 2: Reagenzien und Chemikalien

Reagenzien/Chemikalien	Hersteller	Sitz
alkalische Phosphatase-konjugiertes Streptavidin	Dianova	Hamburg, Deutschland
Concanavalin (ConA)	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
Ficollpaque, 1,077 g/ml	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
Inkomplettes und komplettes Freund's Adjuvans (IFA/KFA)	Sigma-Aldrich	Missouri, USA
Ionomycin	Calbiochem	Bad Soden, Deutschland

Mercapthoethanol	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
Methyl-[³ H]-Thymidin	Amersham Pharmacia Biotech	Freiburg, Deutschland
Natriumazid (NaN ₃)	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
Ovalbumin	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
Phenol-Chloroform-Isopropanol	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA)	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
Rekombinantes Maus Interleukin-2 (rIL-2)	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
Rekombinantes Protein G	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
Rinderkollagen Typ II (CII)	Chondrex	Washington, USA
Rinderserum Albumin (BSA)	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
Sigma Fast TM p-Nitrophenyl Phosphate Tablet Sets	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
Trypanblau (0,1%)	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
Tween-20	Sigma	Deisenhofen, Deutschland

2.3 Zellkulturmedien und Lösungen

Tabelle 3: Zellkulturmedien und –zusätze

Zellkulturmedien/-zusätze für die Zellkultur	Hersteller	Sitz
Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco-BRL	Karlsruhe, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco-BRL	Karlsruhe, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Gibco-BRL	Karlsruhe, Deutschland
RPMI 1640 Medium	Gibco-BRL	Karlsruhe, Deutschland
Trypsin-EDTA (1x)	Gibco-BRL	Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 4: Lösungen und Puffer

Lösungen/Puffer	Hersteller	Sitz
10x Annexin V Binding Buffer	PharMingen	Heidelberg, Deutschland
Erythrozyten-Lysis Puffer	Qiagen	Hilden, Deutschland
Propidium Jodid Staining Solution (PI)	PharMingen	Heidelberg, Deutschland
Szintillator	Zinsser Analytic	Frankfurt, Deutschland

Im Folgenden werden selbstangesezte Lösungen bzw. Puffer aufgelistet:

Tabelle 5: Zusammensetzung der selbstangesezten Puffer

Puffer	Zusammensetzung
ELISA-Waschpuffer	1x PBS 1% BSA 0,05% Tween 20
FACS-Puffer	1 x PBS 5% FCS 0,04% NaN ₃
Proteinase K-Puffer	100 mM NaCl 10 mM Tris-HCl 25 mM EDTA 0,5% SDS
1 x PBS	136 mM NaCl 2,7 mM KCl 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O 1,76 mM KH ₂ PO ₄ pH-Wert 7,2

2.4 Antikörper

Biotin-konjugiertes Kaninchen anti-Maus IgG

Dianova

FITC-konjugierter Hamster anti-Maus CD95 (Jo2)

PharMingen

FITC-konjugierter anti-Maus CD4 (L3T4)

PharMingen

PE-konjugierter anti-Maus CD8a (Ly-2)

PharMingen

FITC-konjugierter Ratte anti-Maus CD90.2 (30-H12)	PharMingen
PE-konjugierter Ratte anti-Maus CD45R/B220 (RA3-6B2)	PharMingen
FITC-konjugierter Ratte anti-Maus CD44 (Pgp-1, Ly-24)	PharMingen
FITC-konjugierter Ratte anti-Maus CD62L (L-Selektin, Ly-22)	PharMingen
FITC-konjugierter Ratte anti-Maus CD106 (VCAM-1)	PharMingen
FITC-konjugierter Hamster IgG (G235-2356)	PharMingen
Biotin-konjugierter Maus anti-Maus CD25	PharMingen
Biotin-konjugierter Maus anti-Maus I-A ^q	PharMingen
Gereinigter Ratten anti-Maus CD16/CD32 (Fc γ III/II Rezeptor/2.4G2)	PharMingen

Antikörper zur Induktion von Zelltod

Gereinigter Hamster anti-Maus CD95 (Jo2)	PharMingen
Gereinigter Hamster anti-Maus CD3e (145-2C11)	PharMingen

2.5 Enzyme

Deoxyribonuclease I (DNase I)	Qiagen
Proteinase K	Gibco-BRL
SUPERSCRIPT II RNase H ⁻ Reverse Transcriptase	Invitrogen
Taq-DNA-Polymerase	peqLab

2.6 Kits und Assays

Cytoscreen Immunoassay Kit (mIFN- γ)	BioSource
CytoTox 96, Non-Radioactive Cytotoxicity Assay	Promega
Mouse T Cell Enrichment Columns	R&D Systems
Qiagen RNeasy Mini Kit	Qiagen
TaqMan PCR Core Reagent Kit	Applied Biosystems
TaqMan Rodent GAPDH Control Reagents	Applied Biosystems
Assays-on-Demand TM Gene Expression Products (IL-1 β)	Applied Biosystems
Pre-Developed TaqMan Assay Reagents (IL-6, TNF- α)	Applied Biosystems

2.7 Versuchsmäuse

Zur Ermittlung der Bedeutung von Fas in der Entstehung und im Verlauf von CIA sollten Mäuse mit normaler Funktion (Wildtyp), solche mit einem heterozygoten Fas-Gendefekt (lpr/+) und Mäuse mit homozygotem Gendefekt (lpr/lpr) miteinander verglichen werden. Um die Funktion von löslichem Fas (sFas) in der Pathogenese zu untersuchen, wurde eine transgene sFas-Maus generiert. Zur Induktion von CIA in transgenen sFas-Mäusen wurden diese Versuchstiere mit DBA/1J Mäusen (MHC-2^q) gekreuzt, die suszeptibel für Kollagen-induzierte Arthritis sind. Darüber hinaus wurden Balb/c Mäuse (MHC-2^d) von Harlan-Winkelmann (Borchen, Deutschland) bezogen. Diese dienten in der gemischten Lymphozyten-Kultur als Responder.

Die Tierhaltung erfolgte gemäß den Standardbedingungen im Tierhaus der Universität Rostock. Die Mäuse wurden in Käfigen (aus Makrolon Typ 2, EBECO, Castrop-Rauxel, Deutschland) gehalten und mit V1246-000 ssniff NM, extrudiert (ssniff Spezialitäten GmbH, Soest, Deutschland) ernährt. Das Futter wurde laut Hersteller wie folgt zusammengesetzt:

Inhaltstoffe:	Rohprotein	25%
	Rohfett	5,8%
	Rohfaser	3,7%
	Rohasche	6,7%
Zusatzstoffe:	Vit. A	18000 IE/kg
	Vit D ₃	1200 IE/kg
	Vit E	120 mg/kg
	Cu5	5 mg/kg

Sie bekamen hitzesterilisiertes Leitungswasser (97°C, 1h) aus Trinkflaschen ad libitum. Durch thorako-zervikale Dislokation wurden die Mäuse für die Experimente getötet. Die Tierversuche wurden durch die Landestierschutzkommission Mecklenburg-Vorpommern, Deutschland, genehmigt. Zusammengefasst wurden im Rahmen meiner Arbeit folgende Mausstämme verwendet:

Tabelle 6: Zusammenfassung der verwendeten Versuchsmäuse

Hintergrund	Genotyp
DBA/1J (DBA)	Wildtyp
	lpr/lpr^{-}
	$lpr/+$
	SFas
C57BL/6J (B6)	Wildtyp
	SFas
Balb/c	Wildtyp

2.7.1 Fas-mutante DBA/1J-Maus (lpr-Maus)

Die Fas-mutanten Mäuse (lpr) wurden von Bomholtgard A/S, Dänemark bezogen. Da sie nur mit dem C3H-Hintergrund (C3H-lpr) erhältlich waren, wurden sie zu dem CIA-suszeptiblen DBA/1J-Hintergrund gekreuzt. Über mehrere Generationen wurden jeweils DBA/1J Mäuse mit heterozygotem DBA/1J-lpr/+ gekreuzt. Die heterozygoten Tiere wurden dann wiederum untereinander gekreuzt. Auf diese Weise entstanden die DBA/1J-Wildtypen, die heterozygoten DBA/1J-lpr/+Mäuse und die homozygoten DBA/1J-lpr/lpr Mäuse. Zur Überprüfung des DBA-Hintergrundes wurde eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) des MHC-H2 Locus durchgeführt (135). Für Experimente wurden Mäuse ab der 6. Generation verwendet, bei denen der genetische DBA/1J-Hintergrund statistisch 98% beträgt. Die Mutation im Fas-Gen wurde mittels PCR-Analyse von Schwanz-DNA nachgewiesen (siehe Abschnitt 2.7.4.).

2.7.2 Transgene T-Zell-spezifische sFas-Maus (sFas-Maus)

Die Generierung der transgenen T-Zell-spezifischen sFas-Maus wurde von Dr. S. M. Ibrahim und Dr. D. Koczan, Institut für Immunologie, Universität Rostock, durchgeführt. Dazu wurde die transmembrane Domäne des Fas-Gens mittels PCR deletiert. Die deletierte Sequenz umfasst das Exon 6, welches für die transmembrane Domäne des Fas-Gens codiert. Das mittels Deletion erhaltene Fragment wurde in das pUC 1017-Plasmid als BamHI Fragment zwischen einem lck-Promotor und dem humanen Wachstumshormon-Minigen (hGH) kloniert (Abbildung 4). Den lck-Promotor erhielten wir von Dr. J. Marth

von der University of California in San Diego. Die transgene sFas-Maus wurde mittels DNA-Mikroinjektionsmethode hergestellt. Dazu wurde die Transgen-DNA in den männlichen Vorkern des B6D2/F1 befruchteten Eies injiziert. Die Mikroinjektion erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. J. Vanselow am Forschungsinstitut für die Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere in Dummerstorf. Es wurden transgene sFas-Mäuse mit DBA/J1-Hintergrund erzeugt.

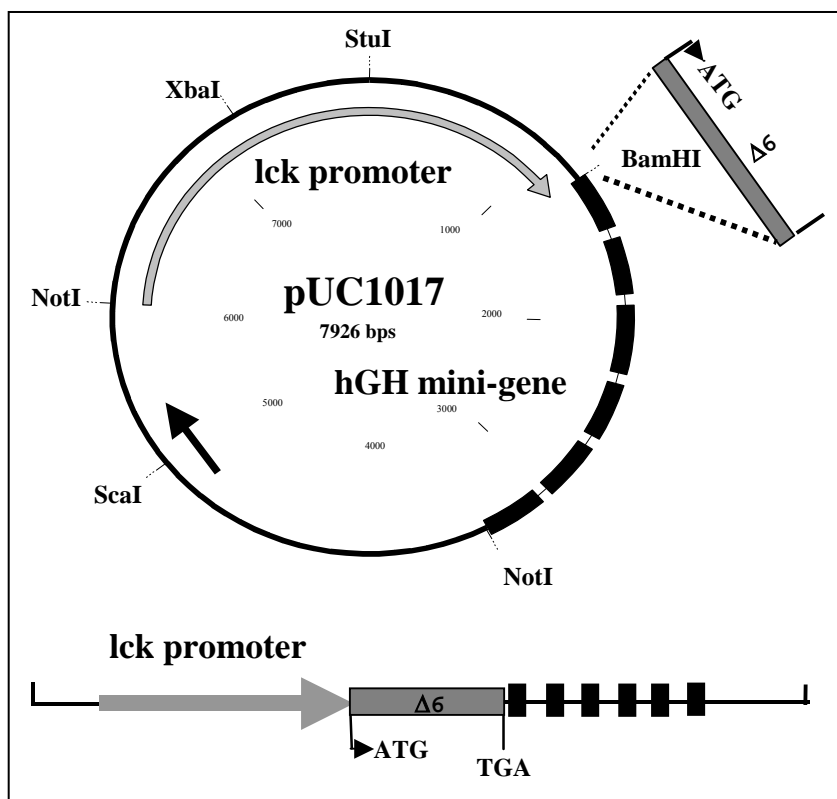


Abbildung 4: Schematische Darstellung des sFas-Transgen-Konstrukts

Die sFas-Sequenz wurde mittels PCR-Deletionsverfahren erzeugt. Dabei wurde Exon 6 entfernt. Das dann als BamHI erzeugte Fragment wurde in das Plasmid pUC1017 zwischen dem lck-Promotor und dem hGH-Minigen kloniert. Das sFas-Transgen-Konstrukt wurde von Dr. S. M. Ibrahim und Dr. D. Koczan, Institut für Immunologie, Universität Rostock, hergestellt. Den lck-Promotor erhielten wir von Dr. J. Marth von der University of California in San Diego.

2.7.3 Isolierung chromosomaler DNA aus Mausschwanzbiopsien

Chromosomale DNA zur Genotyp-Bestimmung wurde aus Mausschwanzbiopsien gewonnen. Dazu wurde mit einem sterilen Skalpell (Dahlhausen, Köln, Deutschland) ein ca. 0,5 cm großes Stück von der Schwanzspitze der Mäuse abgeschnitten und in ein 1,5 ml-Eppendorf Reaktionsgefäß überführt.

Die Schwanzprobe wurde mit 70 µg Proteinase K (Gibco-BRL, Karlsruhe, Deutschland) und 700 µl Proteinase K-Puffer bei 55°C im Wasserbad über Nacht verdaut. Zur Beseitigung von verbliebenen festen Bestandteilen wurde die verdaute Probe unter Verwendung der Zentrifuge Biofuge pico (Heraeus Instruments) bei 13000 rpm 7 min zentrifugiert und 600 µl Überstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die DNA-Extraktion erfolgte mit 600 µl eines Gemisches aus Phenol-Chloroform-Isopropanol (Roth, Karlsruhe, Deutschland) durch 100-maliges Umdrehen des Reaktionsgefäßes und anschließende 15-minütige Zentrifugation bei 13000 rpm. Aliquots (500 µl) des Überstandes wurden mit 50 µl Natriumacetat (pH-Wert: 5,2) und 300 µl Isopropanol ausgefällt und anschließend bei 13000 rpm 25 min zentrifugiert. Das dadurch erhaltene Pellet wurde luftgetrocknet und dann in 50 µl mM TRIS-HCL (pH-Wert: 8) aufgenommen. Bis zur Genotypisierung wurde die DNA bei -20°C gelagert.

2.7.4 Genotypisierung der Mäuse mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Genotypisierung wurde mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt. Dabei wurde folgender 25 µl-Ansatz eingesetzt:

PCR-H ₂ O	17,75 µl
10 x Reaktionspuffer (peqLab, Erlangen)	2,5 µl
dNTP (2,5mM, peqLab, Erlangen)	2,5 µl
Forward primer (50 µM, Sigma-Ark, Darmstadt)	0,5 µl
Reverse primer (50 µM, Sigma-Ark, Darmstadt)	0,5 µl
Taq-DNA-Polymerase (5U/µl, peqLab, Erlangen)	0,25 µl
Template DNA	1 µl

Es folgt eine Liste der verwendeten PCR-Programme inklusive der eingesetzten Primer für die Genotypisierung der Mäuse:

1. transgene sFas-Maus

a) Primer	Fas1: CCA GCA ATA CAA ACT GCA GG
	Fas2: CAG CTG GAC TTT CTG CTC AGC
b) Programm	94°C 3 min
	94°C 30 sec
	58°C 40 sec
	72°C 1 min
	} 35x
	72°C 7 min
	4°C oo
c) Produkt	Transgen: 340 bp
	Wildtyp: 6226 bp

2. lpr-Maus

a) Primer	lpr1: AAA GGT TAC AAA AGG TCA CCC A
	lpr2: TAG ACG GGG CAA AAG AAG AA
	lpr3: CAA ATC TAG GCA TTA ACA GTG
b) Programm	94°C 3 min
	94°C 30 sec
	60°C 40 sec
	72°C 45 sec
	} 35x
	72°C 7 min
	4°C oo
c) Produkt	Homozygote Maus: lpr1 + lpr2: 290 bp
	lpr1 + lpr3: > 5,4 kb
	Heterozygote Maus: lpr1 + lpr2: 290 bp
	lpr1 + lpr3: 229 bp
	Wildtyp: keine Bande mit lpr1 + lpr2

Die PCR-Ansätze wurden auf einem 1%igen Agarosegel kontrolliert.

2.7.5 Induktion und Dokumentation der Kollagen-induzierten Arthritis

Das Protokoll für die Immunisierung der Mäuse mit Rinderkollagen II ist an das Protokoll von Holmdahl et al. angelehnt (35).

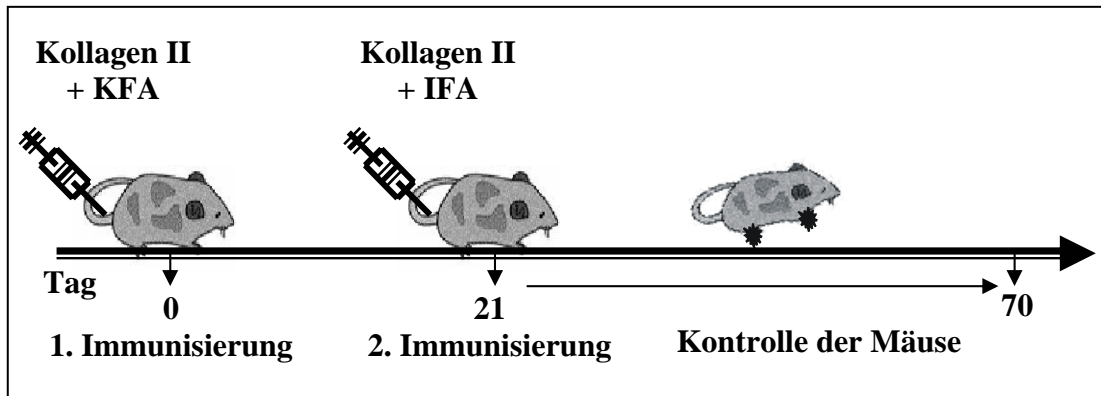


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Induktion der Kollagen-induzierten Arthritis

8-10 Wochen alte Mäuse wurden mit Kollagen II und KFA (komplettem Freund's Adjuvans) im Schwanzansatz intradermal immunisiert. Nach 21 Tagen wurde die 2. Immunisierung mit Kollagen II und IFA (inkomplettem Freund'schen Adjuvans) durchgeführt. Die Kontrolle der Mäuse erfolgte nach der 2. Immunisierung jeweils 2-3 Mal in der Woche und endete am 70. Tag.

Um die CIA auszulösen, wurden 8 - 10 Wochen alte DBA/1J-Mäuse mit 125 µg Rinderkollagen II immunisiert. Dazu wurden 2,5 mg/ml Rinderkollagen II (Chondrex, Washington) in 0,1 N Essigsäure nach der Anweisung des Herstellers gelöst und mit dem gleichen Volumen an komplettem Freund's Adjuvans (KFA) mit 2 mg/ml *Mycobacterium tuberculosis* (Difco, Karlsruhe) zwischen zwei mit einem Adapter verbundenen Einmalspritzen (1 ml, Omnifix-F, B/Braun, Melsungen, Deutschland) emulgiert. Danach wurden jeder Maus insgesamt 100 µl der Emulsion im Schwanzansatz intradermal injiziert (Einmal-Injektions-Kanüle, 0,45x25mm, B/Braun). Nach 21 Tagen wurde die Immunisierung wiederholt. Jedes Tier erhielt eine Injektion von 100 µl Emulsion mit 2,5 mg/ml Rinderkollagen II und inkomplettem Freund's Adjuvans (IFA) (Abbildung 5). Nach der zweiten Immunisierung erfolgte die Kontrolle der Mäuse jeweils 2 bis 3 Mal in der Woche. Dabei wurde jede Mauspfote einzeln bewertet. Die Schwere der Krankheitsausprägung wurde in 4 Schweregrade eingeteilt, so dass eine Maus einen Schweregrad von insgesamt maximal 12 erreichen konnte (Abbildung 6). Stufe 0 stellte

keine Erkrankung dar. War ein Zeh entzündet oder die Pfote gerötet, so wurde die Pfote in einem Schweregrad von 1 eingestuft. Bei einer Entzündung an mehr als einem Zeh erhielt die Maus für diese Pfote einen Schweregrad von 2, während bei einer Entzündung an der ganzen Pfote oder bei einer Ankylose der Schweregrad von 3 vergeben wurde.

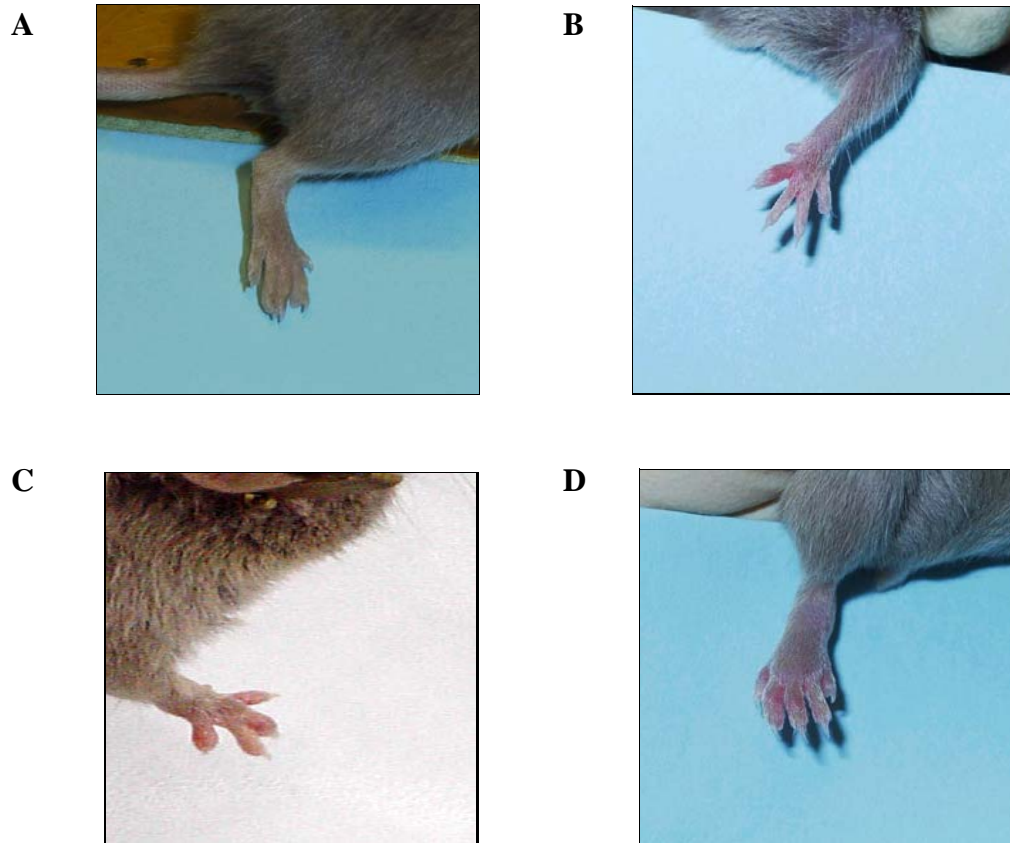


Abbildung 6: Einteilung des Schweregrades der Kollagen-induzierten Arthritis.

Die Einteilung erfolgte nach Yang et al. (136). Die Schwere der Krankheitsausprägung wurde in 4 Schweregrade eingeteilt. (A) Stufe 0 stellte keine Erkrankung dar, (B) Stufe 2 wurde für ein entzündetes Zeh oder eine gerötete Pfote vergeben. Bei einer Entzündung an mehr als einem Zeh erhielt die Maus für diese Pfote einen Schweregrad von 2 (C), während bei einer Entzündung an der ganzen Pfote oder bei einer Ankylose der Schweregrad von 3 vergeben wurde (D). Eine Maus konnte maximal einen Schweregrad von 12 erreichen.

2.8 Histologie

Um zu überprüfen, ob die klinische Bewertung der Krankheitsausprägung mit dem histologischen Krankheitsbild übereinstimmt, wurden Schnitte von gesunden und kranken Mauspfoten mit dem Grade 1-3 angefertigt und mit Hämatoxylin/Eosin gefärbt. Hierbei werden alle basophilen Zell- und Gewebestrukturen wie Chromatin der Zellkerne durch

Hämatoxylin blau gefärbt, während das Eosin alle azidophilen Bestandteile wie Zytoplasma und die meisten Interzellulärsubstanzen rosa färbt. Die Anfertigung und die Auswertung der Schnitte wurden von Dr. Kreutzer, Institut für Pathologie, Universität Rostock, durchgeführt. Die histologische Bewertung erfolgte nach Holmdahl et al. anhand folgender Skala (137):

- 1 = synoviale Hyperplasie
- 2 = einsetzende Pannusbildung
- 3 = fokale Erosionen von Knochen und Knorpel
- 4 = schwere Entzündung und Erosionen

2.9 Zellkultur

2.9.1 Kultivierung von Zellen

Die nicht-adhärenenten Zellen (Lymphozyten) wurden in RPMI 1640-Medium (Gibco-BRL, Karlsruhe, Deutschland) und die adhärenenten Zellen (NIH3T3-Fibroblasten) in DMEM-Medium (Gibco-BRL) kultiviert. Beide Kulturmedien enthielten jeweils 10% inaktives, fetales Kälberserum (FCS, Gibco-BRL) und 1% Penicillin/Streptomycin (P/St, Gibco-BRL). Für die Beschreibung der nachfolgenden Arbeitsmethoden (Abschnitt 2.9 und 2.10) werden die mit FCS und P/St zugesetzten Kulturmedien nur noch als RPMI-Medium bzw. als DMEM-Medium bezeichnet. Abweichungen von dieser Zusammensetzung werden an der entsprechenden Stelle betont.

Die Kulturen wurden in einem Inkubationsschrank in einer Wasserdampf gesättigten Atmosphäre mit einem 5%igen CO₂-Anteil bei 37°C gehalten. Diese Kulturbedingungen gelten für alle Kulturen dieser Arbeit (Abschnitt 2.9 und 2.10). Abweichungen davon werden an der entsprechenden Stelle aufgeführt.

Das Waschen der Zellen erfolgte durch Zentrifugation bei 1200 rpm und 8 min in der Zentrifuge Megafuge 1.0R (Kendro Laboratory Products, Hanau). Diese Zentrifuge wurde in allen Waschvorgängen der Zellen verwendet (Abschnitt 2.9 und 2.10). Bei Verwendung einer anderen Zentrifuge wird diese explizit beschrieben.

Die adhärennten Zellen wurden passagiert, indem das alte Kulturmedium abgenommen und der Zellrasen einmal vorsichtig mit PBS abgespült wurde. Dann wurden die Zellen durch eine 2-5 minütige Inkubation in 1x Trypsin-EDTA (Gibco-BRL) von der Oberfläche der Kulturflasche (Greiner, Frickenhausen) abgelöst und anschließend in einer geeigneten Menge DMEM Medium resuspendiert.

2.9.2 Gewinnung von Zellen aus lymphatischen Organen

Die inguinalen, axillaren sowie zervikalen Lymphknoten bzw. die Milzen wurden unter sterilen Bedingungen präpariert und in kaltem (4°C) RPMI-Medium aufgenommen. Die Organe wurden von dem Binde- und Fettgewebe befreit und vorsichtig mit einem Spritzenstempel (B/Braun, Melsungen) durch ein Nylon-Zellsieb (Becton Dickenson) gedrückt und nochmals mit Kulturmedium gespült. Die Zellsuspension wurde 8 min bei 1200 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen. Mit 2 ml Kulturmedium wurde das Pellet resuspendiert und 3 – 5 min auf Eis stehen gelassen, damit restliches Gewebe sich absetzen konnte. Anschließend wurden die Zellen dreimal durch 10-minütiges Zentrifugieren unter den oben genannten Bedingungen gewaschen. Zum Abschluß wurden die Zellen in RPMI-Medium aufgenommen. Zur Bestimmung der Zellkonzentration wurden 50 µl der Zellsuspension mit 50 µl 0,1%iger Trypanblau-Lösung gemischt und die Zellen in der Zellzählkammer nach BÜRKER (Brand, Wertheim) ausgezählt.

2.9.3 T-Zell Anreicherung

Die Maus-T-Zellen wurden mittels negativer Selektion mit „T Cell Enrichment Columns“ (R&D Systems) gewonnen. Diese Säulen enthalten Glasbeads, welche mit anti-Immunglobulin beschichtet sind. B-Zellen binden via F(ab)-Oberflächen-Immunglobulin-Interaktion an die anti-Immunglobuline auf den Glasbeads. Die Bindung der Monozyten an die Glasbeads erfolgt via Fc/FcR-Interaktion. Die Wiederfindungsrate beträgt 45% - 65%, wobei die Reinheit der CD3⁺ T-Zellen der eluierten Zellpopulation 81% - 88% beträgt.

Die Anreicherung von T-Zellen erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Die Erythrozyten in der Zellsuspension wurden mit 10 ml Erythrozyten-Lysis Puffer (Qiagen) 10 min auf Eis lysiert. Anschließend wurden 7 ml Waschpuffer hinzugefügt und bei 1200 rpm 5 min zentrifugiert. Das Pellet, resuspendiert mit 2 ml Waschpuffer, wurde auf die Säule gegeben. Die Säule wurde zuvor mit 70% Ethanol gespült, 10 min bei Raumtemperatur (RT) temperiert und viermal mit 2 ml Waschpuffer gewaschen. Es folgte danach eine 10-minütige Inkubation der Zellen in der Säule bei RT. Das Eluieren der gereinigten T-Zellen erfolgte viermal mit je 2 ml Waschpuffer. Anschließend wurden die gereinigten T-Zellen bei 1200 rpm für 5 min zentrifugiert und zweimal mit RPMI-Medium gewaschen.

2.10 Immunologische Methoden

2.10.1 Apoptose (Zelltod)

2.10.1.1 Fas-induzierter Zelltod

Der Fas-induzierte Zelltod wurde mit dem monoklonalen Hamster anti-Maus Fas-Antikörper Jo2 durchgeführt. Zur Induktion der Apoptose von Thymozyten wurden frisch präparierte Thymozyten mit Jo2 behandelt. Zur Induktion der Apoptose von T-Zellen wurden diese zunächst stimuliert, da aktivierte T-Zellen sensitiv für Antigen-induzierte Apoptose sind. Darüber hinaus sind transgene sFas-T-Zellen erst im stimulierten Zustand in der Lage, lösliches sFas zu exprimieren und zu produzieren.

Die Aktivierung der T-Zellen erfolgte mit Phorbolmyristatacetat (PMA). Das PMA hat eine analoge Struktur zu Diacylglycerol. Das Diacylglycerol ist ein allosterischer Aktivator der Protein Kinase C und des Inositolphosphates, welches Ca^{++} Ausscheidung und Mobilisierung veranlasst. Dadurch wird die Kaskade der zellulären Antwort ausgelöst und die T-Zell-Aktivierung vermittelt.

Dazu wurden 5×10^6 /ml Milzzellen mit 10 ng/ml PMA und 500 ng/ml Ionomycin in 12-Well-Platten im RPMI-Medium bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Nach 24 h wurde 1 ml RT-warmes RPMI-Medium zugegeben und weitere 24 h bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Zur Induktion der Apoptose wurden $0,5 - 1 \times 10^6$ /ml Thymozyten bzw. aktivierte T-Zellen mit 1 µg/ml Jo2 und 1 µg/ml Protein G in einem Well einer 12-Well-Platte inkubiert. Im

Falle der aktivierten T-Zellen wurde diesen zusätzlich 17 U/ml rIL-2 zugesetzt. Das Protein G hat die Funktion, die Wirksamkeit von Jo2 durch die Bindung dreier Antikörper zu steigern, was die Trimerisation des Antikörpers herbeiführt. Die Zellkultur erfolgte 24 h im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂.

2.10.1.2 Aktivierungs-induzierter Zelltod

Der Aktivierungs-induzierte Zelltod wurde mit Hilfe des anti-Maus CD3-Antikörpers induziert, da eine wiederholte Stimulierung durch die T-Zellrezeptoren zum Zelltod aktivierter T-Zellen führt. Wie beim anti-Fas-induzierten Zelltod wurden 0,5 – 1 x 10⁶/ml Thymozyten bzw. aktivierte T-Zellen mit 17 U/ml IL-2 und 1 µg/ml anti-CD3 Antikörper in einem Well einer 12-Well-Platte inkubiert. Die Zellen wurden 48 h im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach 24 h wurde 1 ml RT-warmes Medium zugefügt, um so einer hohen natürlichen Todesrate durch Nährstoffmangel entgegenzuwirken.

2.10.1.3 Propidiumiodid-Färbung

Um Zellen, die der Apoptose unterliegen, zu erfassen, wurde die Propidiumiodid-Färbung verwendet. Intakte Zellmembranen lebendiger Zellen sind in der Lage, die Zelle vor der Aufnahme von Propidiumiodid (PI) in das Zellinnere zu schützen. Die Membran toter Zellen dagegen können von PI durchbrochen werden. Die Menge diploider DNA ist direkt proportional zur Fluoreszenz-Intensität von PI (138). In Voruntersuchungen wurde zunächst die simultane Färbung mit Annexin V und PI angewandt. Annexin-V ist ein Ca²⁺-abhängiges Phospholipid-bindendes Protein, das eine hohe Affinität zu Phosphatidylserin (PS) besitzt. PS befindet sich normalerweise bei intakten Zellen auf der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran. In frühen Apoptose-Stadien, wenn die Zellmembran noch intakt ist, kommt es zur Verlagerung des PSs auf die Außenseite der Zellmembran, wo es mit Annexin interagieren kann. Annexin V wird daher zum Nachweis für Apoptose-typische Veränderungen verwendet (139), während PI für nekrotische Zellen eingesetzt wird. Unsere Voruntersuchungen mit simultaner AnnexinV/PI-Färbung und welche nur mit PI-Färbung zur Messung von Antikörper-induziertem Zelltod zeigten jedoch keine

Unterschiede, so dass mit der einfachen Färbung mit PI in weiteren Experimenten fortgefahren wurde.

Nach 2-maligem Waschen wurden $0,5 - 1 \times 10^6$ Zellen mit 100 μ l 1x Annexin-V Binding Puffer und 10 μ l Propidiumiodid aufgenommen und kurz auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 500 μ l Annexin-V Binding Puffer zugegeben und im Durchflußzytometer (FACScan, Becton Dickinson, siehe Abschnitt 2.10.4) gemessen.

2.10.1.4 Auswertung

Die Berechnung des spezifischen Zelltodes erfolgte nach der folgenden Gleichung (140):

spezifischer Zelltod (%) =

$$\frac{PI.Aufnahme(Experiment) - PI.Aufnahme(Kontrolle)}{100 - PI.Aufnahme(Kontrolle)} * 100$$

wobei:

PI = Propidiumiodid

PI.Aufnahme(Experiment) = anti-Fas- bzw. anti-CD3-induzierter Zelltod in Prozent

PI.Aufnahme(Kontrolle) = spontaner Zelltod (ohne Antikörper) in Prozent

2.10.2 Proliferationstest

In Zusammenarbeit mit Dr. Mix (Neurobiologisches Labor, Klinik für Neurologie, Universität Rostock, Deutschland) wurde der Proliferationstest durchgeführt.

Die Proliferation einer stimulierten T-Zell-Kultur wurde anhand der DNA-Synthese sowie der IFN- γ -Freisetzung gemessen.

Sieben Tage vor Entnahme der Lymphknotenzellen wurden die Mäuse mit Rinderkollagen II immunisiert. Die Aufarbeitung der Lymphknotenzellen erfolgte nach 2.9.1. Es wurden jeweils 4×10^5 Lymphknotenzellen in 200 μ l in Dreifachansätzen in die Wells der runden 96-Well-Mikrotiterplatten für folgende Ansätze gesät:

- I. Kulturmedium (RPMI) als negative Kontrolle ohne zusätzliche *in vitro*-Stimulation
- II. Kulturmedium mit 4 µg/ml Concanavalin A (ConA), einem für T-Zellen spezifischen mitogenen Lectin, zur maximalen T-Zell-Aktivierung als positive Kontrolle
- III. Kulturmedium mit 3 unterschiedlichen Rinderkollagen II-Konzentrationen (siehe Ergebnisse 3.4.3)

Die Zellen wurden für 72 h bei 37°C und in einer Wasserdampf gesättigten Atmosphäre mit einem 5%igen CO₂-Anteil kultiviert.

Sowohl die Messung der DNA-Synthese als auch die Messung der IFN-γ-Freisetzung wurden je 3-fach durchgeführt.

2.10.2.1 [³H]-Thymidineinbau / Messung der DNA-Synthese

Die Bestimmung der Zellproliferation erfolgte durch die Messung der Aktivität radioaktiver β-Strahlung nach Einbau tritiummarkierten Thymidins. Das mit Tritium markierte Thymidin wird als Baustein während der Replikationsphase in die DNA eingebaut. Die Messung der über einen bestimmten Zeitraum aufgenommenen Radioaktivität gibt indirekten Aufschluss über die proliferative Aktivität der Zellen. Die Bestimmung erfolgte dabei mit Hilfe der Flüssigkeits-Szintillations-Spektroskopie. Die Energie der vom radioaktiven Präparat emittierten β-Strahlung wird über Kollisionen auf Lösungsmittelmoleküle übertragen, die dann wiederum die Energie in Form von elektromagnetischer Strahlung der Wellenlänge 260 nm – 340 nm freigeben. Diese Strahlung wird vom primären Szintillator, der ebenfalls im Lösungsmittel enthalten ist, absorbiert. Das Absorptionsspektrum des Szintillators überlagert dabei komplett das Emissionsspektrum des Lösungsmittels. Die vom Lösungsmittel als Licht freigegebene Energie wird so vom Szintillator absorbiert und bei längerer Wellenlänge als Fluoreszenzstrahlung wieder freigesetzt. Diese kann vom Szintillationszähler über einen Photoverstärker verarbeitet und als Zählrate (cpm) angegeben werden.

Die Zellen wurden nach einer Inkubationszeit von 60 h mit 10 µl ³H-Methylthymidin/Well (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) versetzt und weitere 12 h inkubiert. Dabei entsprachen 10 µl ³H-Methylthymidin 1 µCi. Mit Hilfe des Zellharvesters

wurden die Zellen auf Titertek-Glasfaserfilter (Lierbyen, Norwegen) geerntet. Die den einzelnen Wells entsprechenden Filterstücke wurden in Szintillationsfläschen (neo-Lab, Heidelberg) überführt, mit Szintillator (Zinsser Analytic, Frankfurt) gefüllt und im Counter (Scintillation counter Wallace 1214 Rackbeta, LKB, Bromma, Sweden) gemessen.

2.10.2.2 Messung der Interferon- γ Freisetzung

Zur Bestimmung des freigesetzten Zytokins nach der Stimulierung mit Rinderkollagen II bzw. ConA wurde der Überstand der Zellkultur abgenommen und bis zur Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

Die Durchführung des IFN- γ Tests erfolgte mittels eines Cytoscreen Immunoassay Kit (BioSource, Camarillo, CA) nach dem Protokoll des Herstellers. Die Quantifizierung basierte auf der Basis der enzymatischen Reaktion von Meerrettich-Peroxidase mit Tetramethylbenzidin (TMB). Durch die von der Peroxidase katalysierte Reaktion wird das farblose Substrat (Tetramethylbenzidin) in ein blaues Produkt umgewandelt. Über die Messung der optischen Dichte wird die Konzentration von IFN- γ ermittelt.

Verdünnte Standards und 100 μl Probe wurden mit 50 μl biotinyliertem Antikörper versetzt und für 3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer 3-maligen Waschprozedur wurden zu jeder Probe 100 μl HRP-Streptavidin hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 20 min bei Raumtemperatur wurden die Zellen wieder dreimal gewaschen. Der Peroxidase wurden 100 μl TMB-Substrat zugesetzt und für 10 – 15 min zur Farbbildung inkubiert. Wenn die Höchststandardkonzentration eine dunkelblaue Färbung erreicht hatte, wurde die Reaktion mit 100 μl Stop-Reagenz (H_2SO_4) gestoppt und im ELISA-Reader bei 450 nm gemessen.

Zur Ermittlung der IFN- γ Konzentration wurde eine Kalibrierungskurve mittels des Standards Maus-IFN- γ (mIFN- γ) erstellt (Abbildung 7). Aus einer linearen Regression der Meßdaten ergab sich folgender Zusammenhang:

$$Y = 0,20586 + 0,00173 \times X$$

wobei :

X = Konzentration vom Standard (mIFN- γ)

Y = ODWert

Demnach erhielten wir:

$$\text{Konzentration}(mIFN - \gamma) = \frac{OD\text{Wert} - 0,20586}{0,00173}$$

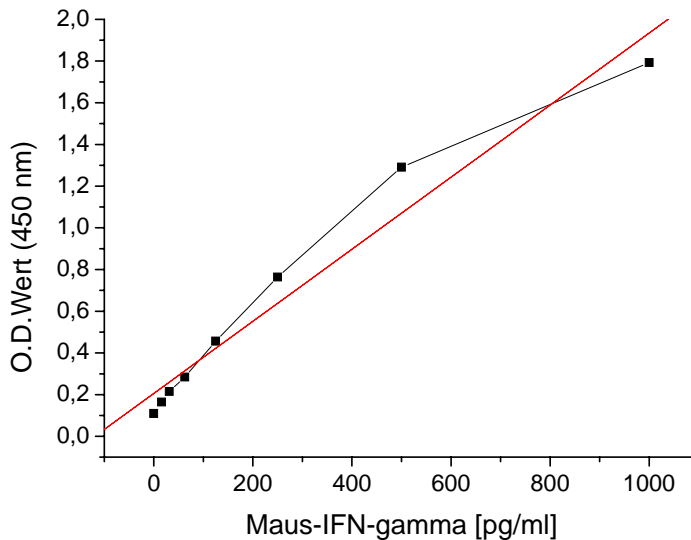


Abbildung 7: Gemessene Standardkurve: Optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 450 nm als Funktion der Maus-IFN- γ -Konzentration in [pg/ml].

Die Kalibrierungskurve wurde mittels des vom Hersteller mitgelieferten Standards (Maus-IFN- γ) erstellt. Aus einer linearen Regression der Meßdaten ergab sich der folgende Zusammenhang: $OD\text{Wert} = 0,020586 + 0,00173 \times \text{Konzentration vom Standard (Maus-IFN-}\gamma)$

2.10.3 Zytotoxizitätstest

2.10.3.1 Gemischte Lymphozytenkultur

Zur Vorstimulierung der im Zytotoxizitätstest eingesetzten Effektorzellen wurden diese für fünf Tage mit allogenen Leukozyten kokultiviert. Dabei dienen Milzzellen von C57BL/6J-Mäusen (MHC-2^b) als Responder und als Stimulator wurden Milzzellen von Balb/c Mäusen (MHC-2^d) eingesetzt. Um zu vermeiden, dass die Stimulatorzellen in der Kultur wachsen, wurden diese vor der Kultur bei 30 Gy für 300 sec β -bestrahlt.

Die Responderzellen und die bestrahlten Stimulatorzellen wurden in einem Verhältnis von 2:1 ($40 \times 10^6 : 20 \times 10^6$ Zellen) in einem Endvolumen von 30 ml RPMI-Medium mit 2×10^{-5} 50 mM Mercaptoethanol kultiviert. Die Zellsuspension wurde in stehenden 75cm²-

Kulturflaschen für 5 Tage bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Bevor die Zellen für den Zytotoxizitätstest eingesetzt wurden, wurden sie zweimal gewaschen und anschließend im RPMI-Medium ohne Zusätze aufgenommen.

2.10.3.2 Mitogen-stimulierte Targetzellen

Die im Zytotoxizitätstest eingesetzten Targetzellen wurden zunächst zur Sensibilisierung mit 2 µg ConA/ml stimuliert. 40 x 10⁶ Milzzellen wurden mit 40 µg ConA im 20 ml RPMI 1640 Medium (2 x 10⁶ / ml Kulturmedium) in 72cm²-Kulturflaschen stehend 2 Tage bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Blastzellen wurden mittels einer Dichtegradientenzentrifugation mit Ficollpaque 1,077 gewonnen. Dazu wurde mit Hilfe einer langen Serum-Kanüle die Zellsuspension mit 2 ml Ficollpaque unterschichtet und bei 1300 rpm 15 min ohne Bremse bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach der Zentrifugation war ein weißer Ring erkennbar, in dem die Zellblasten enthalten waren. Dieser Ring wurde mit einer Pipette abgezogen, die gewonnenen Zellen dreimal gewaschen und im Kulturmedium ohne Zusätze aufgenommen.

2.10.3.3 Zytotoxizitätstest CytoTox96[®]

Der CytoTox96[®] misst quantitativ die durch Zell-Lyse freigesetzte Laktatdehydrogenase (LDH). Dazu wird eine zweistufige enzymatische Reaktion ausgenutzt (Abbildung 8).

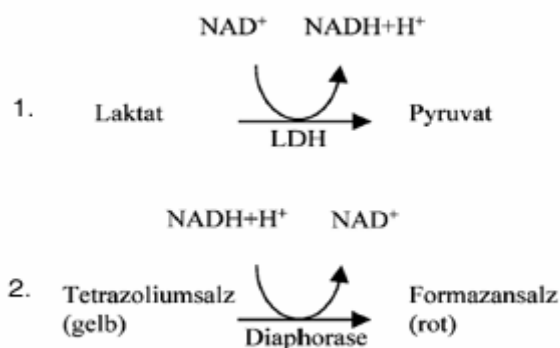


Abbildung 8: Chemische Reaktion zum Nachweis von Laktatdehydrogenase

(nach dem Manual des Herstellers Promega)

1. In dem ersten enzymatischen Schritt wird Laktat durch die Laktatdehydrogenase zu Pyruvat oxidiert, dabei wird NAD⁺ zu NADH+H⁺ reduziert.
2. In der zweiten Reaktion wird das Tetrazoliumsalz „INT“ durch das Enzym Diaphorase zu einem Formazansalz reduziert. Dabei schlägt die Färbung der Lösung von Gelb zu Rot um.

Für den Zytotoxizitätstest wurde RPMI-Medium ohne Zusätze verwendet. Im Vorversuch wurde zunächst die optimale Targetzellzahl ermittelt (1×10^6 /ml). Eine Serie von Target:Effektor-Ratios (wobei die Zahl der Targetzellen konstant mit $5 \times 10^4/50 \mu\text{l}$ blieb, siehe Ergebnisse 3.3.4) wurde jeweils dreifach in der 96-Well-Platte mit rundem Boden (Assay Plate, Greiner, Solingen) vorbereitet. Das Endvolumen betrug $100 \mu\text{l}/\text{Well}$. Darüber hinaus wurden folgende Ansätze zur Berechnung der Zytotoxizität mitgeführt:

Spontane LDH-Freisetzung der Effektorzellen (SFE)

Zahl der Effektorzellen pro Well entspricht Zahl im Target:Effektor-Ratio

Spontane LDH-Freisetzung -Targetzellen (SFT)

4×10^5 Targetzellen pro $100 \mu\text{l}$ RPMI-Medium

Maximale Freisetzung -Targetzellen (MaxT)

4×10^5 Targetzellen pro $100 \mu\text{l}$ RPMI-Medium mit $10 \mu\text{l}$ 10x Lysis-Solution lysiert.

Volumen-Korrektur-Kontrolle (VKK)

$10 \mu\text{l}$ 10x Lysis Solution und $100 \mu\text{l}$ RPMI-Medium

Kulturmedium Hintergrund (MH)

$100 \mu\text{l}$ RPMI-Medium

Die Assay Plate wurde bei 1200 rpm für 4 min zentrifugiert, um eine bessere Durchmischung zu erreichen. Im Anschluß wurde sie für 4 h bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. 45 min vor der Ernte des Überstandes wurde den Targetzellen zur Messung der maximalen Freisetzung $10 \mu\text{l}$ 10x Lysis Solution zugesetzt. Nach der 4-stündigen Inkubation wurde die Assay Plate bei 1200 für 4 min zentrifugiert und je $50 \mu\text{l}$ Überstand in eine flache 96-Well-Platte übertragen. Zur Farbbildung wurden je $50 \mu\text{l}$ Substrat-Mix den Zellen zugesetzt und für 30 min bei RT inkubiert. Um sie vor Lichteinfall zu schützen, wurde die Platte mit Folie abgedeckt. Die Reaktion wurde mit $50 \mu\text{l}$ Stop-Solution abgestoppt und im ELISA-Reader bei 490 oder 492 nm innerhalb einer Stunde nach Hinzufügen der Stop-Solution gemessen.

2.10.3.4 Auswertung

Die Auswertung der Zytotoxizität erfolgte nach der angegebenen Gleichung des Herstellers:

$$\text{Zytotoxizität(\%)} = \frac{K_{\text{exp}} - K_{\text{SFE}} - K_{\text{SFT}}}{K_{\text{maxT}} - K_{\text{SFT}}}$$

K_{exp} =	Adsorption der Target-/Effektorzellen – Adsorption vom RPMI-Medium
K_{SFE} =	Adsorption der spontanen Freisetzung der Effektorzellen – Adsorption vom RPMI-Medium
K_{SFT} =	Adsorption der spontanen Freisetzung der Targetzellen – Adsorption vom RPMI-Medium
K_{maxT} =	Adsorption der maximalen Freisetzung der Targetzellen – Adsorption von Korrektur-Volumen

2.10.4 Durchflusszytometrie

Bei der durchflusszytometrischen Analyse werden Zellen anhand ihrer Lichtstreuungseigenschaften und bis zu fünf weiteren Parametern anhand emittierter Fluoreszenzstrahlung auf Einzelzellebene charakterisiert. Die Analyse von Zellen in einem Durchflusszytometer bietet also die Möglichkeit, sowohl die Oberflächenmoleküle als auch den Zustand einzelner Zellen zu analysieren. Dazu wurden Zellen mit spezifischen, fluoreszenzmarkierten Antikörpern markiert und durch Licht zur Fluoreszenz angeregt. Zusätzlich streuen die Zellen das auftreffende Licht. Als „Vorwärtsstreulicht“ (FSC, Forward Scatter) wird das Licht bezeichnet, das in einem geringen Winkel (3-10°) gestreut wird und dient als Maß für die Größe der Zellen. Das in einem Winkel von 90° reflektierte Licht wird als „Seitwärtsstreulicht“ (SSC, Side Scatter) bezeichnet und dient als Maß für die Granularität und Membranfaltung der Zellen. Die Fluoreszenz der an Zellen gebundenen, an FITC ($\lambda_{\text{max}} = 525 \text{ nm}$) gekoppelten Antikörper wird im Fluoreszenzkanal FL-1 des Durchflußzytometers gemessen. Die Fluoreszenzintensität der an Zellen gebundenen, an PE ($\lambda_{\text{max}} = 575 \text{ nm}$) gekoppelten Antikörper sowie die des in die DNA interkalierten Propidiumiodids ($\lambda_{\text{max}} = 620 \text{ nm}$) werden im Fluoreszenzkanal FL-2 bestimmt. Im FL-3 werden Fluoreszenzfarbstoffe mit einer Wellenlänge von mehr als 650 nm gemessen. Als Fluorochrome werden hierbei CyChrome und PerCP verwendet. Die Aquirierung der Messwerte sowie die Analyse der mit dem Durchflußzytometer

(FACScan, Becton Dickinson) erhaltenen Daten erfolgte mit der Software CellQuest, Version 1.2.2. bzw. mit WinMDI 2.8.

2.10.4.1 Phänotypisierung von Zellen

Zur Überprüfung der Oberflächenmoleküle der Lymphozyten in transgenen sFas-Mäusen wurden CD4-/CD8-Antikörper zur Identifizierung von T-Zellen und CD45-/CD90-Antikörper zum Detektieren von B-Zellen eingesetzt. Dazu wurden $0,5 - 1 \times 10^6$ Zellen in 5 ml FACS-Röhrchen (Falcon, Heidelberg) zweimal mit FACS-Puffer gewaschen (1200 rpm, 5 min). Das Pellet wurde dann in 50 μ l FACS-Puffer aufgenommen, mit 1 μ l FITC-gekoppeltem Antikörper, 2 μ l PE-gekoppeltem Antikörper und 2 μ l FC-Block versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Da das Phycoerythrin die Eigenschaft besitzt, Mauszellen an Fc γ II niedrig-Affinitäts-Rezeptoren zu binden, wurde FC-Block (anti-Maus CD16/CD32 (Fc γ III/II Rezeptor)) zugesetzt.

Die Proben wurden erneut zweimal mit FACS-Puffer gewaschen, und die mit 500 μ l FACS-Puffer resuspendierten Zellen im FACScan (Becton Dickinson) gemessen. Zur Messung des Fas-Antigens wurde 1 μ l FITC-gekoppelter anti-Fas Antikörper eingesetzt.

2.10.5 ELISA zur Messung der B-Zellantwort

Die Bestimmung von Antigen-spezifischen Antikörpern wurde mittels Sandwich-ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) durchgeführt.

Dazu wurden 96-Well ELISA-Platten (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) mit 50 μ l/Well des entsprechenden Antigens (5 μ g/ml PBS) beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die beschichtete Platte wurde dreimal jeweils mit 200 μ l ELISA-Waschpuffer (WB) gewaschen. Zur Blockierung von unspezifischen Bindungen wurde die Platten anschließend 1 h bei Raumtemperatur mit 200 μ l WB je Well inkubiert, die dann wieder dreimal gewaschen wurden. 50 μ l Serum/Well mit folgenden Verdünnungen wurden eingesetzt:

1/50 1/500 1/5000 1/50000

Die anschließende Inkubation erfolgte für 2 h und bei 37°C. Nach dreimaligem Waschen wurden 50 µl 1:20.000 verdünnter Biotin-konjugierter anti-Maus IgG hinzugegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift wurde 50 µl 1:1000 verdünntes alkalische Phosphatase-konjugiertes Streptavidin zugefügt. Nach einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde wieder dreimal gewaschen. Die Detektion der an das Antigen gebundenen Antikörper erfolgte durch Zugabe von 50 µl Substratpuffer (p-Nitrophenylphosphat, pNPP). pNPP wird von der an das Streptavidin konjugierten alkalischen Phosphatase in eine gelbe Substanz umgewandelt. War die maximale Gelbbildung erreicht, so wurde die Reaktion mit 50 µl 1 M NaOH gestoppt und bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen

Für die Quantifizierung des ELISAs wurde eine Titerbestimmung durchgeführt. Der „Titer“ einer Probe steht für die Verdünnung, bei der eine Probe noch nachgewiesen werden kann. Als Positivkontrolle diente der Überstand des anti-Kollagen-Antikörpers Hybridoma CIIC1 (Geschenk von Dr. R. Holmdahl, Lund University, Schweden), und als Negativkontrolle wurde nur der Antikörper gemessen.

2.11 Molekularbiologische Methoden

2.11.1 Präparation von RNA

Zur Gewinnung von Gesamt-RNA aus NIH3T3 Fibroblasten (Geschenk von Dr. P. Lorenz, Universität Rostock) bzw. aus Mausgelenken wurde der „RNeasy Mini Kit“ (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben verwendet. Die aufgeführten Puffer waren in diesem Kit enthalten. Es wurde die Zentrifuge Biofuge pico (Heraeus, Hanau) verwendet.

Die Mausgelenke wurden nach Entnahme sofort im flüssigen Stickstoff und RLT-Extraktionspuffer (+ 1% β-Mecarptoethanol) gemörsert.

Bei adhärennten Zellen wurde zunächst das Kulturedium abgesaugt, und die Zellen mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann mit 600 µl RLT-Extraktionspuffer lysiert.

Die lysierte Probe wurde anschließend auf die „QIAshredder“-Säule gegeben und 4 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde mit 600 µl eiskaltem 70% Ethanol versetzt. Jeweils 2 x 600 µl dieses Ansatzes wurde auf die „RNeasy mini spin“-Säule gegeben und 1 min bei 10000 rpm zentrifugiert. Nach einem Waschvorgang mit 500 µl

RW1-Puffer bei 10000 rpm für 1 min erfolgte eine DNase-Behandlung mit Deoxyribonuclease I (Qiagen), um noch vorhandene DNA zu verdauen. Dabei wurden 70 µl RDD-Puffer und 10 µl DNase I auf die Säule gegeben und bei RT 20 – 30 min inkubiert. Anschließend wurde die Säule einmal mit 500 µl RW1-Puffer und zweimal mit 500 µl RPE-Puffer bei 10000 rpm für 1 min gewaschen.

Nachdem die Säule schließlich bei 13000 rpm für 5 min trocken zentrifugiert wurde, erfolgte die Eluierung der gebundenen RNA zweimal mit jeweils 40-50 µl RNase-freiem Wasser bei 11500 rpm für 5 min.

2.11.1.1 Konzentrationsbestimmung und Qualitätskontrolle der RNA

Die Bestimmung der Konzentration der RNA erfolgte spektrophotometrisch (SmartSpecTM3000, Bio-Rad) bei einer Wellenlänge von 260 nm in einer Quarzküvette. Eine optische Dichte (OD) von 1 entspricht 40µg/ml RNA. Unter Berücksichtigung der Verdünnung der RNA-Probe wurde die Konzentration der isolierten RNA wie folgt berechnet:

$$\text{Konzentration } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \text{OD}_{260\text{nm}} \times 40 \mu\text{g/ml} \times (\text{Wasser/eingesetzte RNA})/1000$$

Die Reinheitsbestimmung erfolgte durch den Quotienten $\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{280\text{nm}}$. Bei Anwesenheit von Proteinen oder Phenol ist der Quotient $< 1,8$ und ein Quotient $> 2,0$ weist auf Verunreinigungen durch Salze oder Nukleotide hin, wie sie bei fortschreitender Degradation zu beobachten sind. Die Integrität der isolierten RNA wurde mittels Elektrophorese in einem 1,6% TBE-Agarose-Gel überprüft. An den Banden der ribosomalen RNAs ist die Qualität der RNA abzuschätzen, dabei ist im Idealfall die Intensität der 28S rRNA doppelt so hoch wie die der 18S sRNA.

2.11.2 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Bei der Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) wurde zuerst aus der RNA eine komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert (Reverse Transkription) und die cDNA als Template für die PCR verwendet. Die Umschreibung erfolgte mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase. Dabei wurde folgender 25µl- Ansatz hergestellt:

RNA	1-2 µg
5x First Strand Buffer (Invitrogen, Karlsruhe)	5 µl
dNTP (2,5 mM, peqLab, Erlangen)	8 µl
Hexamäre Primer (50µM; Sigma-Ark, Darmstadt)	1,5 µl
DTT (0,1 M, Promega, Mannheim)	1 µl
RNAse Inhibitor (40 U/µl, Promega, Mannheim)	0,5 µl
SUPERSCRIPT II (200 U/µl, Invitrogen, Karlsruhe)	1,5 µl
RNAse freies Wasser (Qiagen, Hilden)	7,5 µl

Die Reverse Transkription erfolgte durch zweistündige Inkubation bei 42°C und wurde dann auf Eis abgekühlt. Die so erhaltene cDNA wurde bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

Für die RT-PCR wurde der Ansatz aus der Reverse Transkription 1:10 verdünnt und wie unter Abschnitt 2.7.4 beschrieben die PCR durchgeführt.

2.11.3 TaqMan Real-Time Polymerase-Kettenreaktion

Die Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (Real-Time-PCR) erlaubt die Bestimmung der Kopienanzahl eines Templates (cDNA oder RNA). Bei der TaqMan Real-Time PCR wird eine Oligonukleotid-Sonde eingesetzt, die zwischen dem Forward und Reverse Primer an das Ziel-Template hybridisiert. Die Sonde ist am 5'-Ende mit einem Reporter (Fluoreszein) markiert, und am 3'-Ende trägt sie einen Quencher (Rhodamin), der das Aussenden eines Fluoreszenzsignals verhindert, solange Reporter und Quencher dicht beieinander sind. Durch die Exonukleaseaktivität der verwendeten *Taq DNA Polymerase* wird die Sonde zerstört, so dass Quencher und Fluoreszenzfarbstoff räumlich getrennt werden. Erst dann wird ein Fluoreszenzsignal emittiert, das direkt mit der Menge neu synthetisierter DNA korreliert (Abbildung 9). Da angenommen wird, dass die cDNA-Synthese aus verschiedenen RNA-Proben nicht mit gleicher Effizienz durchgeführt wird, müssen die zu vergleichenden Proben durch endogene Kontrollen "normalisiert" werden. Darüber hinaus dienen diese Kontrollen zum Ausgleich von Pipettierfehlern. Die Normalisierung erfolgt durch die Amplifikation eines Kontrollgens, für das in der Regel Housekeepinggene wie GAPDH (Glycerolaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase) oder β -Actin verwendet werden.

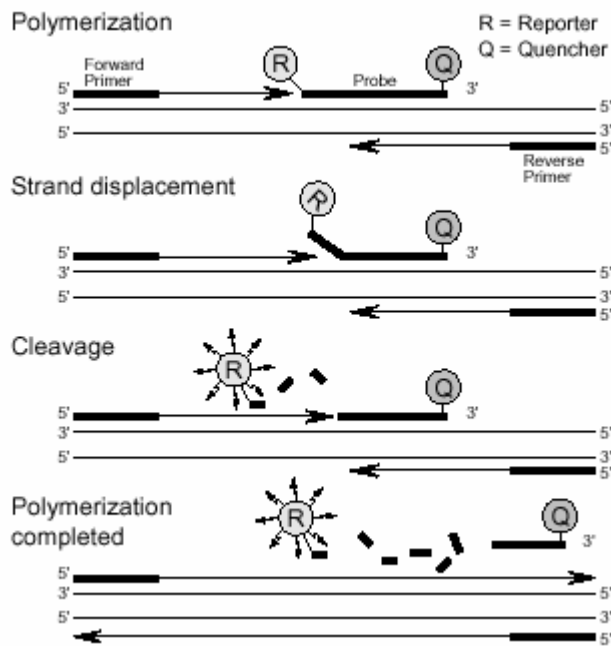


Abbildung 9: Prinzip der Real-Time Polymerase-Kettenreaktion mittels TaqMan®-Methode

Durch die Exonukleaseaktivität der verwendeten *Taq* DNA Polymerase wird die Sonde während der Amplifikation abgebaut, so dass der Reporter und der Quencher räumlich voneinander getrennt werden. Dadurch kommt es zur Aussendung des Fluoreszenzsignals, dessen Stärke mit der Anzahl amplifizierter Templates korreliert. Die vorhandene Kopienanzahl kann somit bestimmt werden (nach dem Manual des Herstellers Applied Biosystems).

2.11.3.1 Durchführung der TaqMan Real-Time Polymerase-Kettenreaktion

Die Untersuchung im Rahmen dieser Arbeit wurden mit dem Real-Time PCR-Gerät "Sequence Detection System 7700" (Applied Biosystems, Weiterstadt) durchgeführt, welches mit Hilfe des Softwareprogramms "GeneAmp 5700 SDS 1.3" (Applied Biosystems) gesteuert wurde. Die eingesetzten TaqMan-Sonden für die Ziel-Gene enthielten am 5'-Ende den Fluoreszenzfarbstoff FAM [6-Carboxyfluorescein] und am 3'-Ende den Quencher TAMRA [6-Carboxyltetramethylrhodamin] und wurden als "Pre-Developed-Assays" mit den darin enthaltenen Primern bezogen. Die Sonde für das Housekeeping-Gen (GAPDH) enthielt am 5'-Ende statt des FAMs den Fluoreszenzfarbstoff VIC und wurde als Kit mit den entsprechenden Primern von Applied Biosystems bezogen.

In einer 96-Well-Platte (MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate, Applied Biosystems, Weiterstadt) wurden pro Taq-Man-Lauf alle Proben in Dreifachansätzen in je 25 µl Volumen für das Ziel-Gen und GAPDH angesetzt. Als Negativkontrollen wurde statt cDNA Wasser mitgeführt. In Anlehnung an das Protokoll des Herstellers wurden folgende TaqMan PCR Master Mix-Ansätze (TaqMan PCR Core Reagent Kit) eingesetzt:

Master Mix mit Pre-Developed-Assays

10 x TaqMan Buffer A	2,5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	3,5 µl
dATP (10 mM)	0,5 µl
dCTP (10 mM)	0,5 µl
dGTP (10 mM)	0,5 µl
dUTP (20 mM)	0,5 µl
AmpErase UNG	0,25 µl
Pre-Developed-Assays	1,25 µl
AmpliTa [®] Gold DNA <i>Polymerase</i>	0,125µl

Zusätzlich wurden je Ansatz 50 - 100 ng RNA-Äquivalent eingesetzt und mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 25 µl aufgefüllt.

Master Mix für GAPDH

10 x TaqMan Buffer A	2,5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	3,5 µl
dATP (10 mM)	0,5 µl
dCTP (10 mM)	0,5 µl
dGTP (10 mM)	0,5 µl
dUTP (20 mM)	0,5 µl
AmpErase UNG	0,25 µl
AmpliTa [®] Gold DNA <i>Polymerase</i>	0,125 µl
GAPDH-Sonde (20µM)	0,25 µl
GADH Forward Primer (10 µM)	0,25 µl
GADH Reverse Primer (10µM)	0,25 µl

Zusätzlich wurden je Ansatz 50 - 100 ng RNA-Äquivalent eingesetzt und mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 25 µl aufgefüllt.

Die TaqMan Real-Time PCR wurde als 2-Schritt-PCR über 45 Zyklen bei für alle untersuchten Gene identischen Temperaturbedingungen durchgeführt:

	95°C	10 min	Initiale Aktivierung der DNA-Polymerase	
45 x	{	95°C	15 sec	Denaturierung
		60°C	1 min	Annealing/Polymerisation

2.11.3.2 Auswertung

Die Quantifizierung der Genexpression erfolgte über den C_T -Wert (Threshold Cycle). Der C_T -Wert ist die Nummer des ersten PCR-Zyklus, der ein Fluoreszenzsignal aussendet, der größer als der Schwellenwert ist. Je größer die Ausgangsmenge der Zielsequenz, desto kleiner ist der C_T -Wert. In der exponentiellen Phase entspricht eine Halbierung der cDNA-Ausgangsmenge einem Anstieg des C_T -Werts um einen Zyklus.

In Anlehnung an das "User Bulletin #2" des Herstellers (Applied Biosystems) wurde die relative Expression des Ziel-Gens nach folgender Gleichung errechnet:

$$\text{Relative Expression} = 2^{Ct(\text{GAPDH}) - Ct(\text{Target})}$$

2.12 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit den Programmen SPSS und Microsoft Excel 2000. Diagramme wurden mit Hilfe von Microsoft Excel 2000 und Origin 6.1 erstellt.

Bei Mehrfachmessungen wurden die Mittelwerte und die Standardabweichungen bzw. die Standardfehler mit dem Programm Excel bestimmt. Die statistische Signifikanz wurde mit SPSS untersucht, wozu folgende Testverfahren verwendet wurden: Mann-Whitney-U-Test, Student-t-Test und χ^2 -Test. Signifikante Unterschiede wurden wie folgt dargestellt:

* für $p < 0,05$, ** für $p < 0,01$ und *** für $p < 0,001$.

3 ERGEBNISSE

3.1 Charakterisierung der transgenen sFas-Mäuse und der mutanten lpr-Mäuse

3.1.1 Genotypisierung der sFas-Mäuse und der lpr-Mäuse mittels Polymerase-Kettenreaktion

Die sFas-Mäuse wurde auf das sFas-Transgen und die lpr-Mäuse auf den lpr-Genotyp hin untersucht. Zur Gewinnung von DNA wurde eine Schwanzbiopsie verarbeitet und die PCR wie in 2.8.4 angegeben durchgeführt.

Für das sFas-Transgen wurde folgendes Primer-Paar verwendet: 5'-CCA GCA ATA CAA ACT GCA GG-3' und 5'-CAG CTG GAC TTT CTG CTC AGC-3'. Der Forward Primer bindet an eine Region in Exon 5, während der Reverse Primer 6226 bp entfernt an eine Region in Exon 9 des Gens für Fas bindet (Abbildung 10A). Liegt eine transgene Maus vor, d. h. hat eine Deletion des transmembranen Fragmentes der Fas-DNA stattgefunden, so ist eine Bande bei 340 bp zu erwarten (Abbildung 10B). Bei normalen Mäusen ohne das sFas-Transgen ist keine Bande nachweisbar, da aufgrund des langen Templates keine Amplifikation stattfinden kann (Abbildung 11).

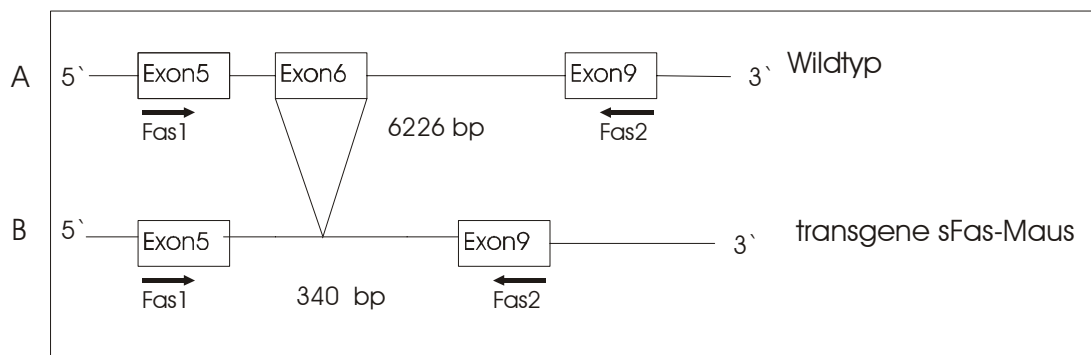


Abbildung 10: Darstellung der amplifizierten DNA-Region der sFas-Maus

Primer Fas1 bindet an Exon 5 und Fas 2 an Exon 9 der Fas-DNA. Liegt ein Wildtyp vor, so beträgt das PCR-Produkt 6625 bp (A), bei der sFas transgenen Maus ist das PCR-Produkt 340 bp lang.

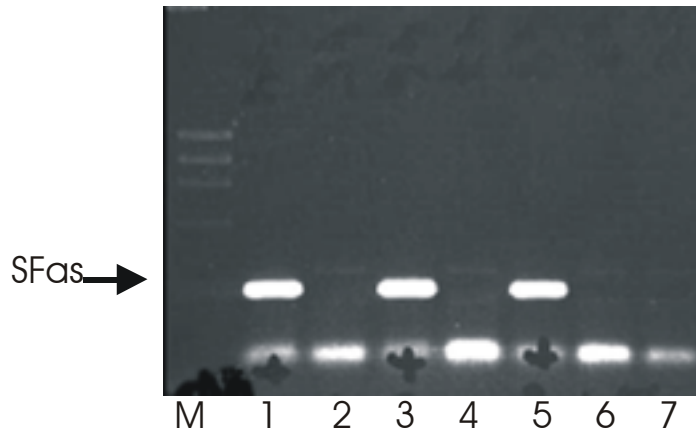


Abbildung 11: PCR auf sFas-Transgen.

Ist ein PCR-Produkt mit dem Primer-Paar Fas1 und Fas2 bei 340 bp nachweisbar, so liegt sFas-Transgen vor (Mausnummer 1, 3 und 5). M = Marker ϕ X174 RF DNA/*Hae* III Fragments (72 bp – 1352 bp).

Die Genotypisierung der *lpr*-Mäuse erfolgte mit den Primer-Paaren *lpr1* + *lpr2* (5'-AAA GGT TAC AAA AGG TCA CCC A-3' und 5'-TAG ACG GGG CAA AAG AAG AA-3') und *lpr1* + *lpr3* (5'-AAA GGT TAC AAA AGG TCA CCC A-3' und 5'-CAA ATC TAG GCA TTA ACA GTG-3'). Primer *lpr1* bindet an eine Region im Intron 2 stromaufwärts vom ETn (early transposable element) im Gen für Fas. Primer *lpr2* bindet an eine Region im Segment 3 des ETns (Abbildung 12). Im Falle einer Mutation erhält man eine Bande bei 280 bp in der Gelelektrophorese. Da bei normalen Mäusen ohne Mutation der Primer *lpr2* sich nicht anlagern kann, findet hierbei keine Amplifikation statt (Abbildung 13A). Liegt nach der Amplifikation mit dem ersten Primer-Paar eine Mutation vor, so wird eine weitere PCR mit dem Primer-Paar *lpr1* und *lpr3* zur Überprüfung der Homozygotität durchgeführt. Primer *lpr3* bindet an eine Region ebenso im Intron 2 stromabwärts vom ETn im Gen für Fas (Abbildung 12). Bei normalen Mäusen findet man eine Bande von 229 bp. Ist eine Mutation vorhanden, so ist keine Bande sichtbar. Die Mäuse waren homozygot mutiert, wenn mit beiden Primer-Paaren eine Mutation nachgewiesen wurde, andernfalls waren sie entweder heterozygot (Nachweis der Mutation nur mit Primer-Paar *lpr1* und *lpr2*) oder normal (Abbildung 13A, B).

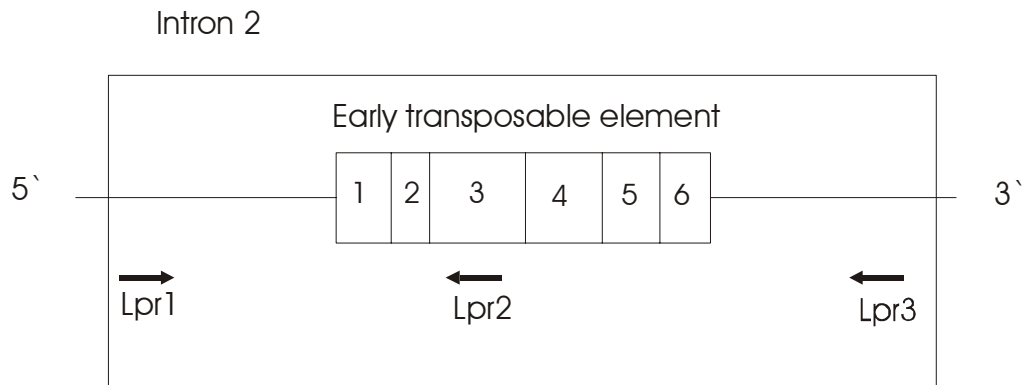


Abbildung 12: Darstellung der amplifizierten DNA-Region der lpr-Maus

Primer lpr1 bindet an eine Region stromaufwärts vom transponierbaren Element (early transposable element, ETn) der DNA, und lpr2 bindet an eine Region innerhalb des 3. Segmentes in ETn. Ein Wildtyp liegt vor, wenn das Primer-Paar lpr-1 + lpr2 keine Bande erzeugt. Bei einer Mutation findet eine Bindung im ETn statt. Primer lpr3 bindet an eine Region stromabwärts vom ETn. Homozygotität liegt vor, wenn zusätzlich mit den Primern lpr1 + lpr3 keine Bindung stattfindet, ansonsten ist die Maus heterozygot.

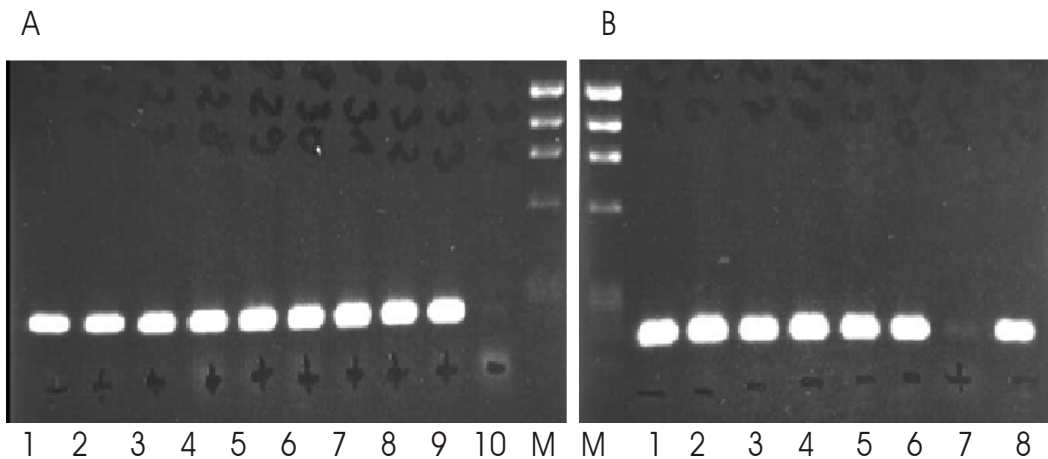


Abbildung 13: PCR auf Fas-Mutation.

PCR mit den Primern lpr1 und lpr2 (A) und mit lpr1 und lpr3 (B). Ist ein PCR-Produkt mit lpr1 und lpr2 sowie mit lpr1 und lpr3 nachweisbar (Maus 1-6 und Maus 8), so liegt Heterozygotität vor. Ist aber mit lpr1 und lpr3 kein PCR-Produkt nachweisbar (Maus 7), so liegt Homozygotität vor. M = Marker ϕ X174 RF DNA/*Hae* III Fragments (72 bp – 1352 bp).

3.1.2 Expression von Fas auf RNA-Ebene

Die Expression von Fas auf der RNA-Ebene wurde mittels RT-PCR untersucht (Abbildung 14). Dazu wurden Milz T-Zellen angereichert und mit PMA und Ionomycin aktiviert. Die aus diesen T-Zellen isolierte Gesamt-RNA wurde revers transkribiert. Die RT-PCR ergab ein cDNA-Amplifikat für das lösliche Fas (sFas) in der erwarteten Größe von 290 bp und ein für das 340 bp große transmembrane Fas (mFas). Als Kontrolle wurden außerdem T-

Zell-angereicherte Milzzellen untersucht, die nicht mit PMA und Ionomycin aktiviert wurden. Sowohl die nicht aktivierten sFas transgene als auch die nicht aktivierten normalen T-Zellen wiesen nur die mFas Bande auf. Die Integrität der untersuchten mRNA wurde anhand einer spezifischen Amplifikation des Housekeeping-Gens β -Actin überprüft (Daten nicht gezeigt).

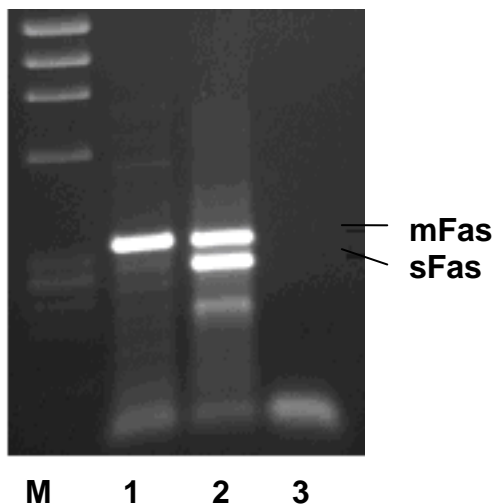


Abbildung 14: mRNA-Expression von sFas in T-Zellen.

RT-PCR mit isolierter Gesamt-RNA aus angereicherten und aktivierten Milz T-Zellen vom DBA-Wildtyp (1) und von sFas-transgener DBA-Maus (2) mit spezifischen Primern für Fas-Gen. RT-PCR ergab ein spezifisches cDNA-Amplifikat von 290 bp für sFas (untere Bande) und 340 bp (obere Bande) für mFas. Zur Kontrolle wurde eine Wasserprobe mitgeführt (3). Marker (M)= ϕ X174 RF DNA/*HaeIII* Fragments (72 – 1353 bp)

3.1.3 Expression von Fas auf Protein-Ebene

Nach der Untersuchung der sFas- und mFas-Expression auf der mRNA-Ebene wurde auf der Proteinebene die Expression des Fas-Moleküls auf der Zelloberfläche mittels Durchflusszytometer gemessen (Abbildung 15). Diese Analyse dient der Überprüfung, ob das sFas-Transgen einen Einfluss auf die Expression von mFas auf Thymus- und Lymphknotenzellen in der transgenen sFas-Maus ausübte. Dazu wurden frisch präparierte Thymus- und Lymphknotenzellen mit FITC-konjugiertem Hamster anti-Fas Antikörper markiert. Die Färbung mit der Hamster IgG2-Isotypkontrolle diente als Negativkontrolle. Die Analyse zeigt, dass es in der Expression von mFas im Wildtyp und in der transgenen sFas-Maus sowohl im Thymus als auch in den Lymphknoten keinen Unterschied gab. Die

Fas-Expression in der *lpr*-Maus war wie erwartet gering. Der normalen Fas-Expression wurde die verminderte Fas-Expression in *B6-lpr/lpr* gegenübergestellt.

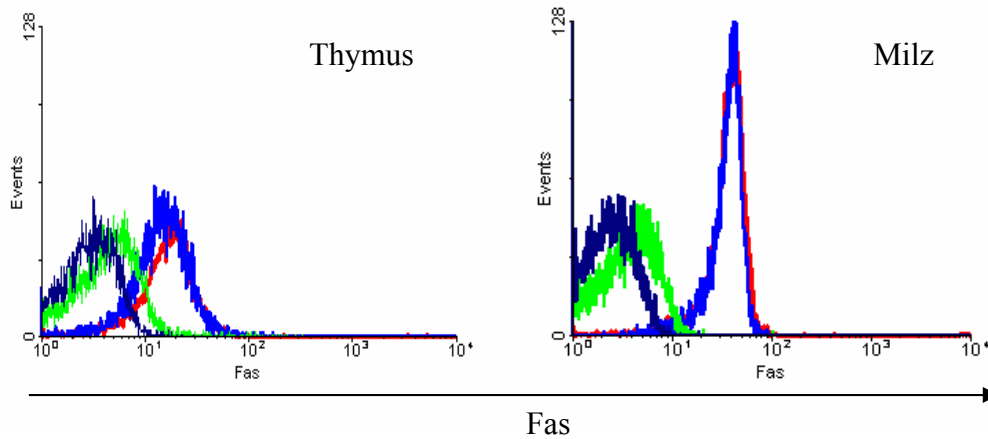


Abbildung 15: Durchflusszytometrische Analyse der Fas-Expression auf Zellen der Lymphorgane.

Markierung der Thymuszellen (links) und Milzzellen (rechts) von *B6-wt* (hell blau), *B6-sFas* (rot) und *B6-lpr/lpr* (grün) erfolgte mit monoklonalem Hamster anti-Fas Antikörper and einer IgG2 Isotypkontrolle als Negativkontrolle (dunkel blau).

3.2 Phänotyp der transgenen *sFas*-Mäuse und der mutanten *lpr*-Mäuse

3.2.1 Bestimmung der Lymphozytenpopulationen

Die Reifung der T-Zellen erfolgt im Thymus, wo sie zunächst eine positive und dann eine negative Selektion durchmachen, um anschließend als naive T-Zellen den Thymus zu verlassen (siehe Kapitel 1). In dieser Reifungsphase exprimieren die Thymozyten sowohl den Korezeptor CD4 als auch den Korezeptor CD8. Die Expression von Zelloberflächen-Antigenen lässt sich mittels durchflusszytometrischer Bestimmung (FACScan) ermitteln (Abbildung 16). Dazu wurden frisch aufgearbeitete Zellen mit CD4- bzw. CD8-Antikörpern angefärbt. Diese Zweiparameter-Analyse im FL1/FITC-CD4 und FL2/PE-CD8 Kanal zeigte, dass im Thymus 78% der analysierten Wildtyp-Zellen, 82% der transgenen *sFas*-Zellen und 84% der *lpr*-Zellen doppelpositiv waren. Die Ergebnisse decken sich mit denen, die in der Literatur bereits beschrieben wurden (141).

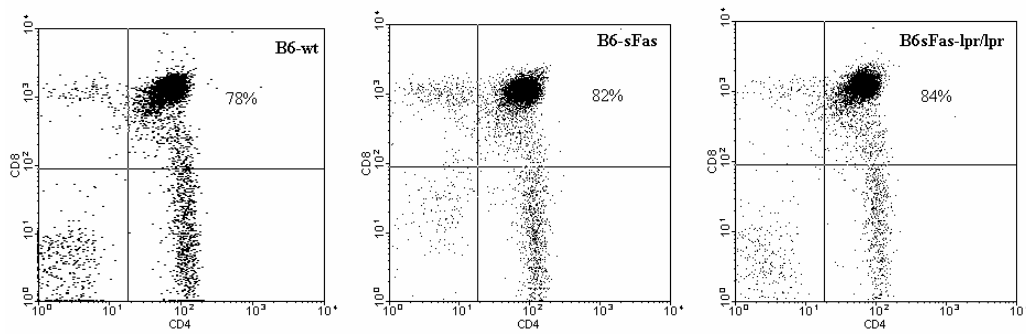


Abbildung 16: Analyse der CD4- und CD8-Expression auf Thymozyten.

Durchflusszytometrische Zweiparameteranalyse mittels FITC-CD4- und PE-CD8-Markierung von B6-Wildtyp (links), von sFas-Transgen (Mitte) und lpr-Maus (rechts). Dargestellt sind die Ergebnisse aus einer Messung. Die Konsistenz dieser Ergebnisse wurde durch Wiederholungsmessung überprüft.

Haben die gereiften naiven einfachpositiven T-Zellen den Thymus verlassen, so gelangen diese durch die Blutbahn in die Lymphknoten (LN), wo sie in Kontakt mit den antigenpräsentierenden Zellen kommen. Über die Lymphe gelangen sie zurück in den Blutkreislauf. Wie die Abbildung 17A zeigt, waren 40% der analysierten LN T-Zellen CD4 positiv und 25% CD8 positiv im Wildtyp. Die CD4/CD8-Verteilung des sFas-Transgens betrug 39% zu 34%. Die Analyse bei lpr-Mäusen ergab eine Verteilung von 11,3 % CD4 zu 2% CD8 T-Zellen. Darüber hinaus kommt in erhöhter Konzentration der typische Phänotyp der CD4⁻CD8⁻ T-Zellen in LN der lpr-Maus vor. Das CD4/CD8-Verhältnis beim Wildtyp sowie beim sFas-Transgen war mit 1,6 bzw. 1,1 fast gleich, wohingegen es bei lpr-Mäusen mit 5,65 höher als bei den obengenannten Genotypen war. Bei der Zweiparameteranalyse mit den B-Zell-Markern CD45 und CD90 waren von den gemessenen Lymphozyten des Wildtyps 24% CD45⁺ und 64% CD90⁺. In der transgenen sFas-Maus waren von den untersuchten Zellen 23% CD45⁺ und 74% CD90⁺. Der CD45⁺CD90⁺-Zell-Anteil in der lpr-Maus machte dagegen mit 67,3% die größte Zellpopulation aus (Abbildung 17). Die Messung dieser FACS-Analyse verdeutlicht, dass das integrierte lösliche Fas auf die Zellreifung und -differenzierung der T- und B-Zellen keinen Einfluss hatte.

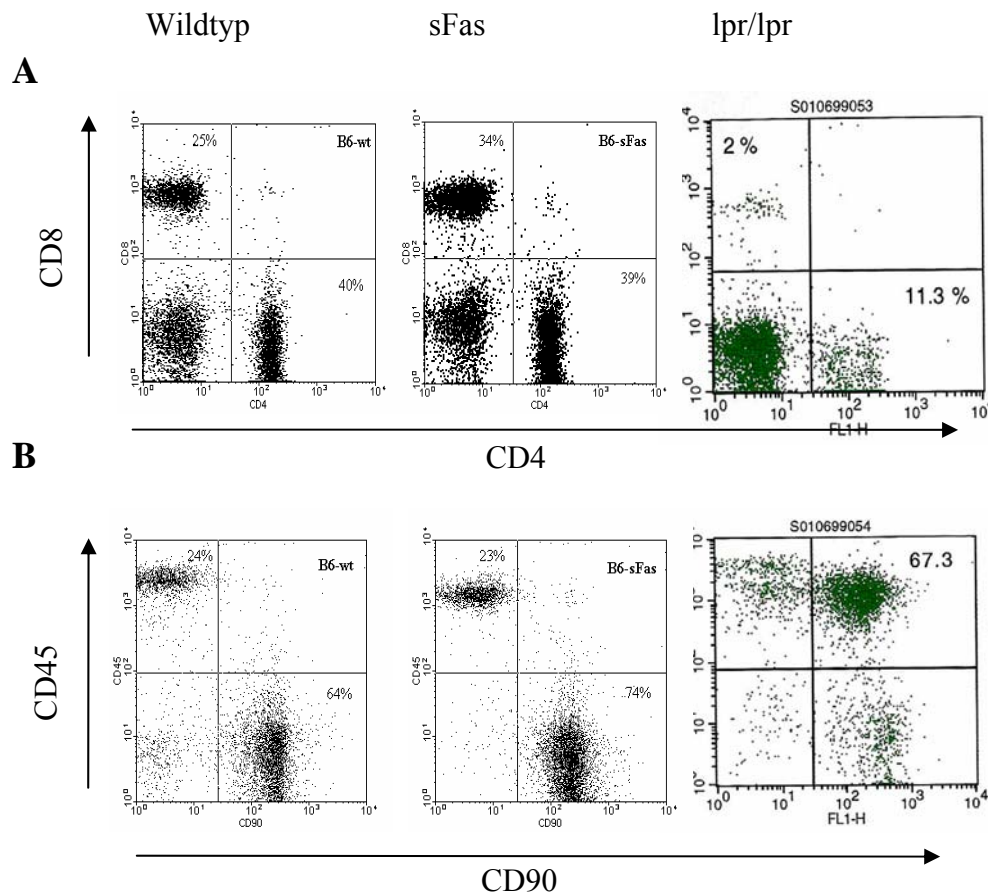


Abbildung 17: Analyse der Zellpopulationen in Lymphknoten.

Markierung der T-Zellen mit FITC-konjugiertem CD4-Antikörper und PE-konjugiertem CD8-Antikörper (A) und der B-Zellen mit FITC-konjugiertem CD90-Antikörper und PE-konjugiertem CD45-Antikörper (B) von Wildtyp (links), sFas-Transgen (Mitte) und lpr-Maus (rechts). Dargestellt sind die Ergebnisse aus einer Messung. Die Konsistenz dieser Ergebnisse wurde durch Wiederholungsmessung überprüft. Daten teilweise entnommen aus (183).

3.3 Funktionalität von sFas

3.3.1 Einfluss von sFas auf den Fas-induzierten Zelltod

Cheng et al. haben gezeigt, dass lösliches Fas (sFas) den Fas-induzierten Zelltod blockieren kann (130). Um dies zu überprüfen, wurden transgene sFas-T-Zellen isoliert, zur Produktion von sFas aktiviert und anschließend mit anti-Fas Antikörper zur Apoptose induziert. Dazu wurde zur Induktion des Fas-induzierten Zelltodes ein Hamster Hypridoma Antikörper (Jo2) eingesetzt. Es wurde bereits gezeigt, dass der anti-Fas Antikörper Jo2 in Fas-exprimierenden Zellen Apoptose auslöst, aber nicht in lpr-Zellen (99). Hierbei verstärkt der Zusatz von Cycloheximid (einem Proteinsyntheseinhibitor) (99) oder von

rekombinantem Protein G (unterstützt die Trimerisierung der Fas-Rezeptoren) die Effizienz von Jo2. Wir untersuchten zunächst die Sensibilität der Thymozyten des sFas-Transgens und des Wildtyps gegenüber dem Fas-induzierten Zelltod (Abbildung 18A). Dazu haben wir Thymozyten gewonnen und sie mit Jo2 in unterschiedlicher Konzentration in Anwesenheit von Cycloheximid bei 37°C und 24 h inkubiert. Wie Abbildung 18A zeigt, wirkte der Antikörper dosisabhängig. Bei beiden Phänotypen konnte beobachtet werden, dass der Anteil toter Zellen mit der Konzentration des anti-Fas Antikörpers steigt. Jedoch konnte bei den Wildtypen bei allen drei Konzentrationen ein statistisch signifikant höherer Anteil toter Thymozyten ($p = 0,01$ bzw. $p = 0,006$) beobachtet werden. Bei der Antikörperkonzentration von 0,01 µg/ml betrug der Anteil toter Zellen beim Wildtyp 48%, während der beim sFas-Transgen 35% betrug. Mit einer Erhöhung der Konzentration auf 1 µg/ml nahm der Anteil toter Zellen beim Wildtyp bis zu 80% und beim Transgen bis zu 70% zu. Der spontane Tod (der Tod, der nicht durch anti-Fas Antikörper induziert wird) wurde bei 28% der Wildtyp-Zellen und bei 32% der sFas-Zellen beobachtet.

Für die *in vitro*-Induktion vom Zelltod von peripheren T-Zellen durch anti-Fas Antikörper wurden T-Zellen aus Lymphknoten und der Milz mittels der „Mouse T cell enrichment Columns“ angereichert. Zur Aktivierung der T-Zellen wurden diese mit Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA) und Ionomycin stimuliert. Die *in vitro*-Stimulierung führt zu einer rapiden Transkription von Fas-Genen, IL-12 Genen sowie andere Genen. Nach der Inkubationszeit von 24 h mit PMA und Ionomycin wurden den aktivierten T-Zellen anti-Fas Antikörper unterschiedlicher Konzentration und Cycloheximid zugefügt. Eine Blockierung des Zelltodes durch das von aktivierten T-Zellen produzierte lösliche Fas konnte nicht beobachtet werden (Abbildung 18B). Jedoch konnte gemessen werden, dass der Anteil toter transgener sFas-T-Zellen bei den anti-Fas Antikörper-Konzentrationen von 0,2 und 2 µg/ml statistisch signifikant höher ist als der Anteil toter Wildtyp-T-Zellen ($p = 0,009$). Der Anteil der „spontan toten“ Zellen war bei beiden Genotypen mit 63% (bei der sFas-Maus) und mit 64% (beim Wildtyp) fast gleich.

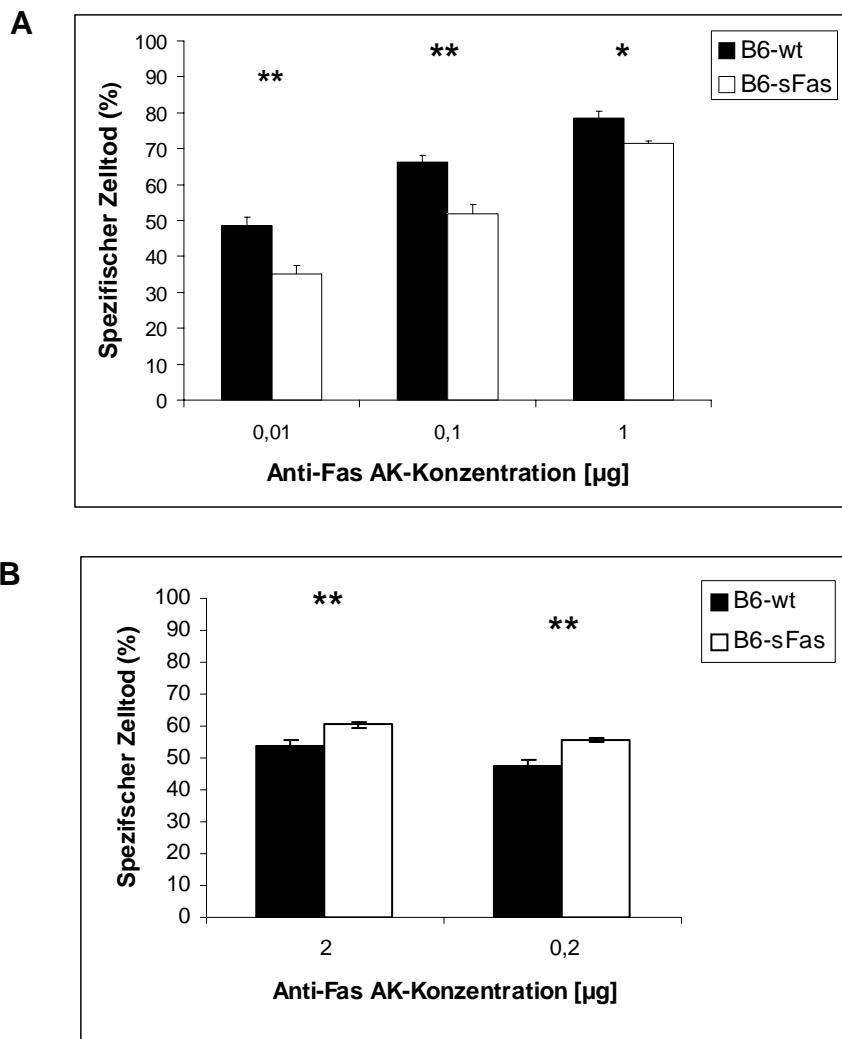


Abbildung 18: Einfluss von sFas auf den Fas-induzierten Zelltod

Durchflusszytometrische Messung zum Fas-induzierten Zelltod von Thymozyten (A) und aktivierten T-Zellen (B) des B6-Wildtyps und der transgenen sFas-B6-Maus. Der Zelltod wurde durch Färbung mit Propidiumiodid bestimmt. Die Messung wurde dreimal wiederholt. Dargestellt sind hier die Ergebnisse aus einer Messung mit Dreifachbestimmung. Die Balken stellen den Mittelwert aus einer Dreifachbestimmung und die Fehlerbalken die Standardabweichung dar. Die statistische Signifikanz wurde mit dem t-Test bestimmt. Signifikante Unterschiede zwischen zwei Gruppen sind gekennzeichnet mit * bei $p < 0,05$ und ** bei $p < 0,01$.

3.3.2 Einfluss von sFas auf den Aktivierungs-induzierten Zelltod

Nach einer wiederholten antigenen Stimulierung unterliegen periphere aktive T-Zellen einem Aktivierungs-induzierten Zelltod (91). Die Stimulierung von „long-term“ aktivierten T-Zellen durch den T-Zell-Rezeptor-(TCR)/CD3 Komplex induziert eine vermehrte Fas-L-

Produktion, welche dann durch eine parakrine/autokrine Bindung an Fas den Apoptose-Pathway aktiviert (140). Um zu untersuchen, ob sFas einen Einfluss auf den Aktivierungs-induzierten Zelltod ausübt, wurden Thymozyten und aktivierte T-Zellen mit anti-CD3 Antikörpern behandelt (Abbildung 19). Die Zellen wurden mit unterschiedlichen anti-CD3 Antikörper-Konzentrationen bei 37°C und 5% CO₂ 48 h inkubiert, wobei nach 24 h RT-warmes RPMI-Medium zugegeben wurde.

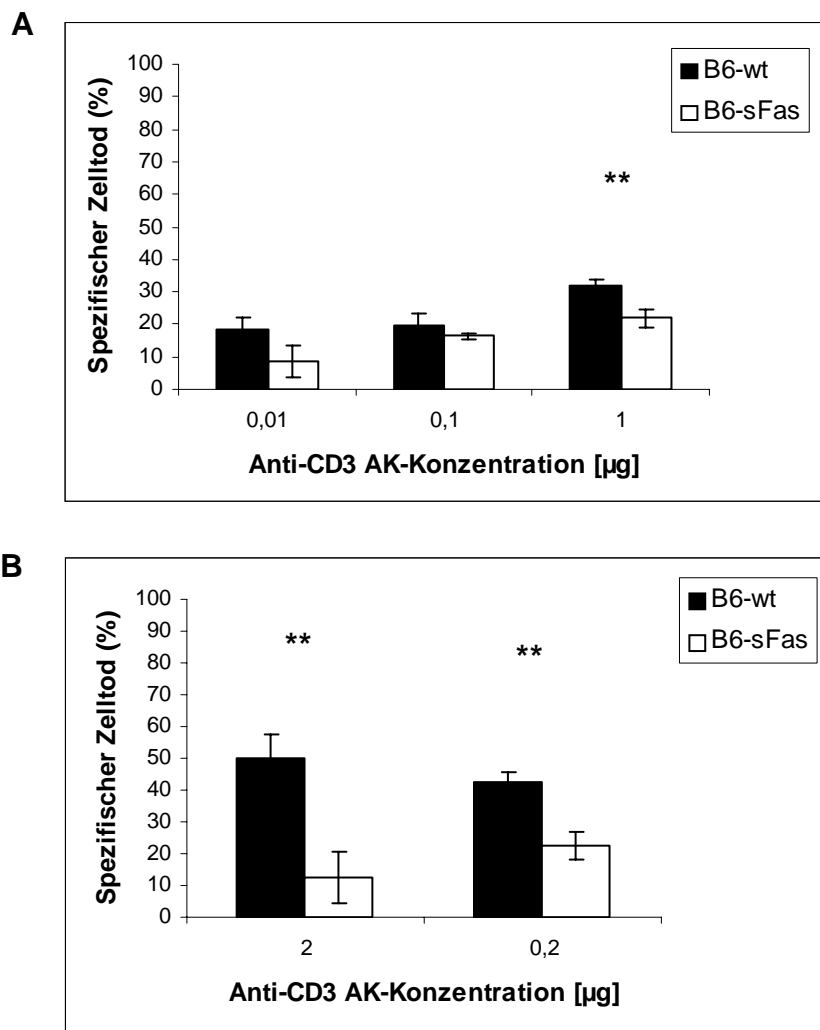


Abbildung 19: Einfluss von sFas auf den Aktivierungs-induzierten Zelltod

Durchflusszytometrische Messung zum Aktivierungs-induzierten Zelltod von Thymozyten (A) und aktivierten T-Zellen (B) vom B6-Wildtyp und der transgenen sFas-B6-Maus. Der Zelltod wurde bestimmt durch Färbung mit Propidiumiodid. Die Messung wurde dreimal wiederholt. Dargestellt sind hier die Ergebnisse aus einer Messung mit Dreifachbestimmung. Die Balken stellen den Mittelwert aus einer Dreifachbestimmung und die Fehlerbalken die Standardabweichung dar. Die statistische Signifikanz wurde mit dem t-Test bestimmt. Signifikante Unterschiede zwischen zwei Gruppen sind gekennzeichnet mit ** bei $p < 0,01$.

Wie man der Abbildung 19A entnehmen kann, lag der Prozentsatz toter Thymozyten nach der Inkubation mit dem anti-CD3 Antikörper verglichen mit anti-Fas Antikörper insgesamt niedriger (zwischen 9% bis 20% bei der transgenen sFas-Maus und zwischen 19% bis 38% bei dem Wildtyp). Der Anteil toter Zellen stieg zwar bei beiden Genotypen mit zunehmender Konzentration von anti-CD3 Antikörpern an, jedoch war zu sehen, dass die transgenen sFas-T-Zellen einen niedrigeren Anteil an toten Zellen aufwiesen. Dieses Phänomen konnte man ebenso bei aktivierten T-Zellen beobachten (Abbildung 19B). Der Aktivierungs-induzierte Zelltod traf die Wildtypen statistisch signifikant stärker als die transgenen sFas-Mäuse ($p = 0,01$). Der Anteil toter Zellen des Wildtyps stieg mit der Konzentration von anti-Fas Antikörper an, während der der transgenen sFas-Maus mit zunehmender Konzentration abnahm. Während 47% Thymozyten beider Genotypen spontan starben (nicht mit Antikörper induziert), konnte bei den aktivierten T-Zellen 28% (Wildtyp) bzw. 63% (sFas-Maus) tote Zellen, die spontan gestorben waren, beobachtet werden.

3.3.3 Einfluss von sFas auf die naiven T-Zellen und Gedächtniszellen nach Behandlung mit anti-Fas Antikörper

Das periphere T-Zell-Repertoire ist sehr heterogen, es existieren verschiedene T-Zell-Subpopulationen mit unterschiedlichen Phänotypen und Funktionen. Um die Verteilung der Subpopulationen (naive T-Zellen und Gedächtniszellen) unter den aktivierten T-Zellen zu bestimmen, wurden die T-Zellen zunächst mit PMA/Ionomycin stimuliert und mit CD44-/CD62L-Antikörper (-AK) sowie mit CD4-/CD8-AK mittels FACS-Analyse phänotypisiert. Den größten Anteil machten die aktivierten T-Zellen ($CD44^{\text{high}}CD62L^{\text{high}}$) aus. Der Wildtyp wies einen Anteil von 63% auf, ähnlich hoch war der prozentuale Anteil bei der sFas-Maus mit 56% (Abbildung 20A, unten). Die Gedächtniszellen ($CD44^{\text{high}}CD62L^{\text{low}}$) waren mit 26% beim Wildtyp und mit 30% bei der sFas-Maus vertreten. Der Anteil an naiven T-Zellen betrug 3% bzw. 6%. Nach einer 24-stündigen Inkubation mit anti-Fas-AK sank der prozentuale Anteil an $CD44^+CD62L^+$ -Zellen beim Wildtyp auf 23% und bei der sFas-Maus auf 18%.

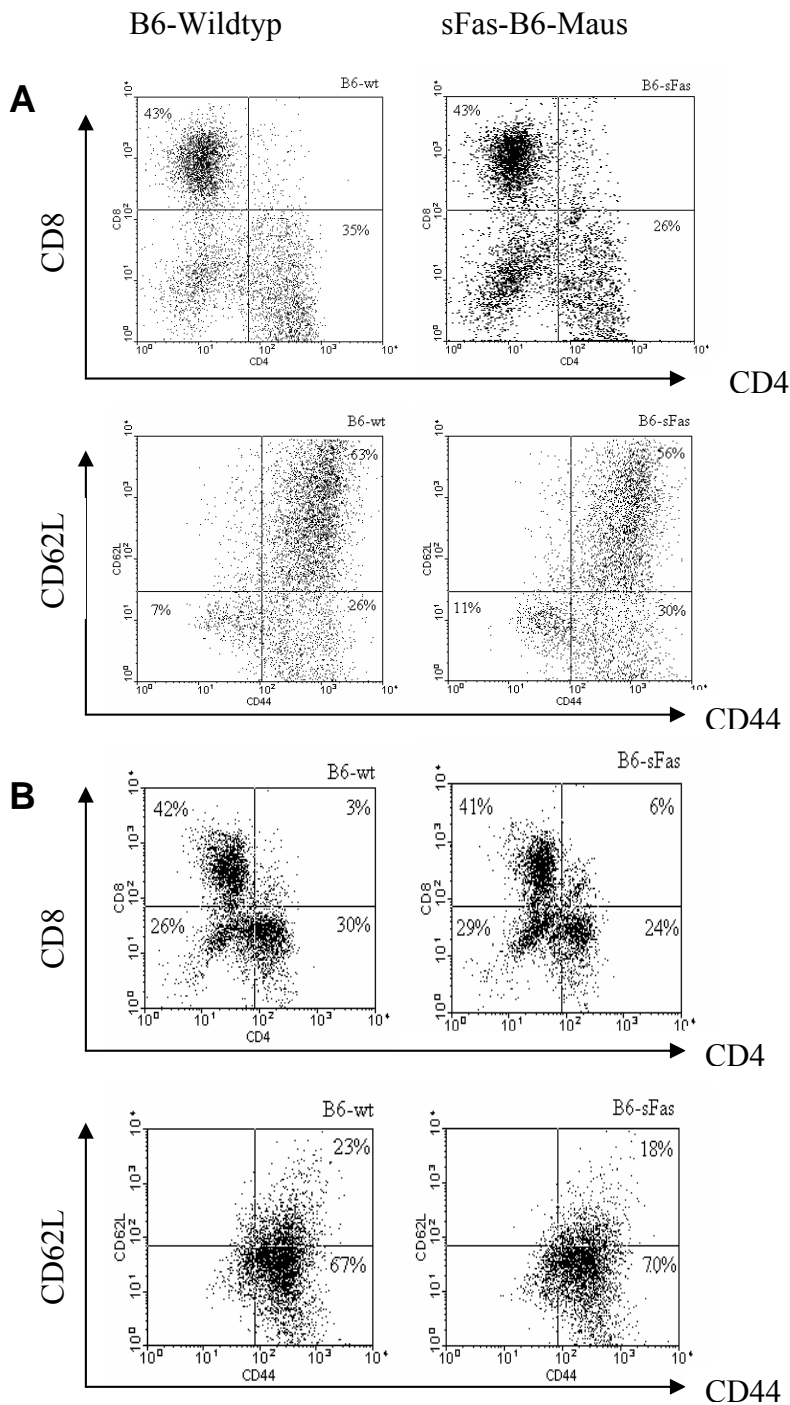


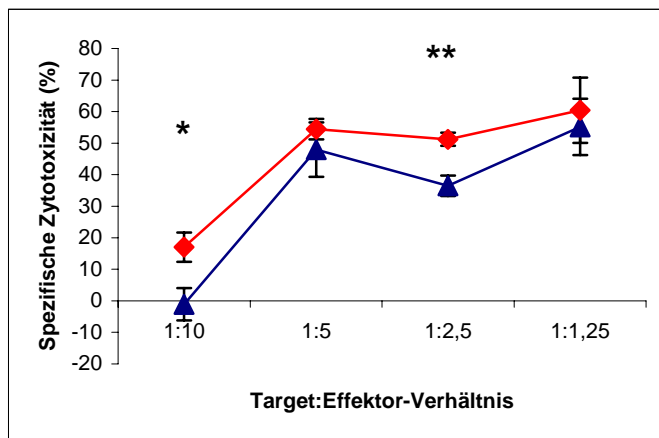
Abbildung 20: Verteilung der Gedächtniszellen vor und nach Behandlung mit anti-Fas Antikörper

Durchflusszytometrische Messung zur Verteilung von Gedächtniszellen ($CD44^{\text{high}}CD62L^{\text{low}}$), naiven T-Zellen ($CD62L^{\text{high}}$) und aktivierten T-Zellen ($CD44^{\text{high}}CD62L^{\text{high}}$) sowie CD4/CD8 T-Zellen von B6-Wildtyp und sFas-B6-Maus. Die angereicherten T-Zellen wurden mit PMA/Ionomycin aktiviert und (A) vor und (B) nach Inkubation mit anti-Fas Antikörper mit FITC-markiertem CD44- bzw. CD4-Antikörper und PE-markiertem CD62L- bzw. CD8-Antikörper gemessen.

Dagegen nahm der Anteil an CD44⁺-Zellen beim Wildtyp von 26% auf 67% und bei der sFas-Maus von 30% auf 70% zu (Abbildung 20B, unten). Die Inkubation mit anti-Fas-Ak hatte keinen Einfluss auf das Verhältnis der CD4⁺/CD8-T-Zellen (Abbildung 20A und B, jeweils oben).

3.3.4 Einfluss von sFas auf die Zytotoxizität

A



B

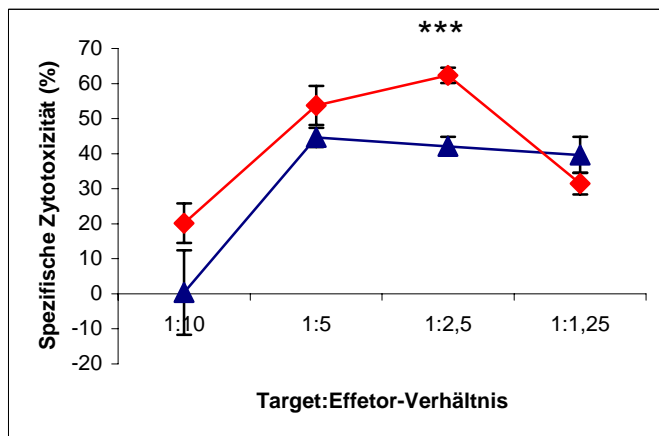


Abbildung 21: Einfluss von sFas auf die Zytotoxizität

Messung der Zytotoxizität von transgenen sFas-Zellen (Raute) und normalen Zellen (Dreieck). Effektorzellen (sFas-B6-Maus) und Targetzellen (Balb/c) wurden zu unterschiedlichen Verhältnissen 4 h inkubiert. Die Inkubation erfolgte ohne (A) und mit (B) Zusatz von PMA/Ionomycin. Die Zytotoxizität wurde unter Verwendung eines Lactat-Dehydrogenase-Aktivität-Assays (Non-Radioactive Cytotoxicity Assay von Promega) bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte (n=3) in Prozent und ihre Standardabweichung. Die statistische Signifikanz wurde mit dem t-Test bestimmt. Signifikante Unterschiede zwischen zwei Gruppen sind gekennzeichnet mit * bei $p < 0,05$, ** bei $p < 0,01$ und *** bei $p < 0,001$.

Zur Bestimmung der Zytotoxizität wurde die Farbreaktion mittels im Zellüberstand angereicherter Lactatdehydrogenase (LDH) photometrisch bei einer Wellenlänge von 490 nm gemessen. Die LDH-Freisetzung wurde nach vierstündiger Inkubation von Effektorzellen der sFas-B6-Maus (H-2^b) mit Targetzellen der Balb/c-Maus (H-2^d) bestimmt. Als Positivkontrolle diente die Behandlung der Targetzellen mit Triton X-100. Zur Bestimmung der zytotoxischen Aktivität der sFas-exprimierenden T-Zellen wurden Ansätze verschiedener Effektor:Target-Verhältnisse eingesetzt, wobei die Zahl der Targetzellen konstant blieb, während die der Effektorzellen abnahm. Die Skala reichte von einem Target:Effektor-Verhältnis von 1:10 bis 1:0,03. Die maximale LDH-Freisetzung erreichten die Zellen beider Haplotypen bei einem Target:Effektor-Verhältnis von 1:5 bis 1:1,25 und nahm in beiden Richtungen ab. Abbildung 21A zeigt, dass die Zytotoxizität der transgenen sFas-T-Zellen bei allen Target:Effektor-Verhältnissen höher ist als bei den normalen Zellen. Die zytotoxische Aktivität der transgenen sFas-T-Zellen war in ihrem Maximum der LDH-Freisetzung (bei Verhältnis 1:2,5) statistisch signifikant höher als bei den normalen T-Zellen. Eine zusätzliche Aktivierung mit PMA/Ionomycin während der vierstündigen Inkubation der Target- mit Effektorzellen führte bei den sFas-T-Zellen zu einer Zunahme der Zytotoxizität von 51% auf 62% bei einem Verhältnis von 1:2,5. Ein starker Anstieg der Zytotoxizität ist ebenso bei allen Verhältnissen bei den normalen Zellen zu beobachten. Die Zunahme bei den transgenen sFas-Zellen zu entsprechenden Verhältnissen fiel dagegen geringer aus (Abbildung 21B).

3.4 Kollagen-induzierte Arthritis der Maus

3.4.1 Verlauf der Kollagen-induzierten Arthritis

Um den Einfluss von sFas und Fas auf die Suszeptibilität, eine Kollagen-induzierte Arthritis zu entwickeln, zu untersuchen, wurden normale DBA/1J Mäuse und solche mit dem sFas-Tragen bzw. mit einer Fas-Mutation (lpr) im Alter von 8-10 Wochen mit Rinderkollagen II, wie unter 2.7.5. beschrieben, immunisiert. Die Immunisierung mit xenogenem verglichen mit autologem Kollagen II induziert einen früheren Beginn der Arthritis sowie eine schwerere Erkrankung. Darüber hinaus löst das xenogene Kollagen II sowohl bei männlichen als auch bei weiblichen Mäusen Arthritis aus, während die

Immunisierung mit autologem Kollagen II nur bei männlichen Mäusen Arthritis auszulösen vermag (35). Die Kontrolle der Mäuse fand nach der Immunisierung und dreimal in der Woche nach Beginn der Erkrankung statt. Die Einteilung der Schwere der Erkrankung wurde wie unter Abschnitt 2.7.5. beschrieben durchgeführt.

Tabelle 7: Zusammenfassung der drei CIA-Experimente der sFas-DBA/1J-Mäuse und der DBA/1J-Wildtypen.

Geschlecht	Mausstamm	Anzahl der Mäuse	Inzidenz (%) ¹	Durchschnittlicher Score am Tag 63 ²	Krankheitsbeginn ³
Männchen + Weibchen	DBA-Wildtyp	46	63 (29/46)	3 ± 0,52	41,3 ± 9
	sFas-DBA	53	62 (33/53)	2,5 ± 0,48	42 ± 10
Männchen	DBA-Wildtyp	26	73 (19/26)	3,8 ± 0,69	41 ± 9,7
	sFas-DBA	32	72 (23/32)	3,4 ± 0,7	39,7 ± 9,3
Weibchen	DBA-Wildtyp	20	50 (10/20)	1,95 ± 0,72	43,7 ± 11,7
	sFas-DBA	21	47,6 (10/21)	1,14 ± 0,43	47,6 ± 9,5

¹ Anzahl der erkrankten Mäuse dividiert durch die Gesamtzahl der Mäuse

² Score der erkrankten Mäuse dividiert durch die Zahl aller Mäuse am Tag 63 ± Standardfehler

³ Tag des Krankheitsbeginns der erkrankten Mäuse dividiert durch die Zahl der erkrankten Mäuse ± Standardabweichung

Es wurden drei unabhängige Experimente zum Einfluss von sFas-Transgen auf die CIA durchgeführt, die zur Auswertung gepoolt wurden. Die Zusammenfassung dieser drei Experimente sowie die geschlechtlich getrennte Analyse sind in der Tabelle 7 dargestellt. Es konnte weder hinsichtlich der Inzidenz noch hinsichtlich des Krankheitsbeginns Unterschiede zwischen den zwei Genotypen beider Geschlechter festgestellt werden. Der klinische Verlauf der CIA bei den transgenen sFas-Mäusen war ähnlich wie der Krankheitsverlauf der normalen Mäuse (Abbildung 22A). Da Männchen und Weibchen eine unterschiedliche Ausprägung der Symptome in der CIA aufweisen, wurden diese getrennt betrachtet. Die männlichen DBA/1J-Wildtypen und die männlichen sFas-DBA/1J-Mäuse zeigten einen ähnlichen Krankheitsverlauf (Abbildung 22B), ebenso unterschieden sich Inzidenz (durchschnittlich 72,5%) und Krankheitsbeginn (durchschnittlich 40. Tag) nur geringfügig (Tabelle 7).

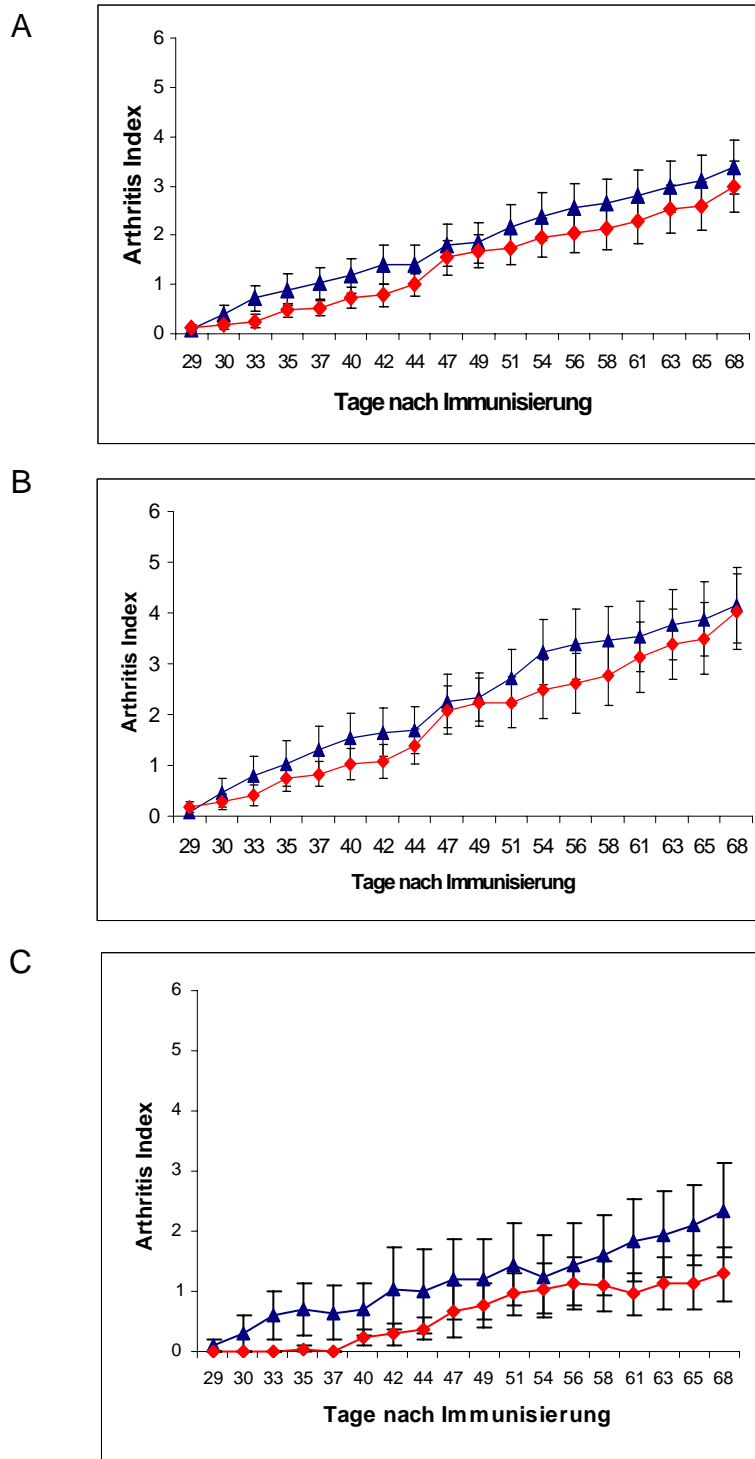


Abbildung 22: Darstellung des Arthritis-Index der sFas- und normalen DBA/1J-Mäuse als Funktion der Zeit

Krankheitsverlauf der CIA bei den sFas-DBA/1J-Mäusen (Raute, n=53, [Männchen: n=32, Weibchen: n=21]) und normalen DBA/1J-Mäusen (Dreieck, n=46, [Männchen: n=26, Weibchen: n=20]). Der Arthritis-Index errechnet sich aus dem Durchschnitt der Schweregrade aus einer Gruppe, wobei alle Mäuse beider Geschlechter (A), nur männliche Mäuse (B) und nur weibliche Mäuse (C) berücksichtigt wurden. Der Fehlerbalken stellt den Standardfehler dar. Die statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test bestimmt.

Unter den weiblichen Tieren war der klinische Verlauf der CIA bei den transgenen sFas-Mäusen im Vergleich zu den normalen Mäusen milder, wenn der Unterschied auch keine statistische Signifikanz erlangte (Abbildung 22C). In der Inzidenz mit durchschnittlichen 49% und im Krankheitsausbruch am 45. Tag konnten ebenfalls keine Unterschiede ausgemacht werden (Tabelle 7).

Tabelle 8: Zusammenfassung der drei CIA-Experimente der DBA/1J-lpr/lpr-Mäuse und DBA/1J-lpr/+Mäuse.

Geschlecht	Mausstamm	Anzahl der Mäuse	Inzidenz (%) ¹	Durchschnittlicher Score am Tag 63 ²	Krankheitsbeginn ³
Männchen + Weibchen	DBA1/J-lpr/+	33	73 (24/33)	4,9 ± 0,7 * ⁵	43 ± 12,3
	DBA1/J-lpr/lpr	34	56 (19/34)	2,9 ± 0,7	43,7 ± 17
Männchen	DBA1/J-lpr/+	24	70 (17/24)	4,8 ± 0,9	41 ± 12
	DBA1/J-lpr/lpr	25	60 (15/25))	2,9 ± 0,8	43 ± 17
Weibchen	DBA1/J-lpr/+	9	77 (7/9) * ⁴	5,3 ± 1,9	38 ± 5
	DBA1/J-lpr/lpr	9	44 (4/9)	2,8 ± 1,4	41 ± 7

¹ Anzahl der erkrankten Mäuse dividiert durch die Gesamtzahl der Mäuse.

² Score der erkrankten Mäuse dividiert durch die Zahl aller Mäuse am Tag 63 ± Standardfehler.

³ Tag des Krankheitsbeginns der erkrankten Mäuse dividiert durch die Zahl der erkrankten Mäuse ± Standardabweichung.

⁴ Die statistische Signifikanz wurde mit dem χ^2 -Test bestimmt. Signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen sind gekennzeichnet mit * bei $p < 0,05$.

⁵ Die statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test bestimmt. Signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen sind gekennzeichnet mit * bei $p < 0,05$.

Abbildung 23 zeigt die Krankheitsverläufe der CIA bei den homozygoten DBA-lpr/lpr Mäusen im Vergleich zu den heterozygoten DBA-lpr/+ Mäusen, die aus drei unabhängigen Experimenten zusammengefasst wurden. Tabelle 8 dokumentiert zusammenfassend die Anzahl der Mäuse in den Experimenten, die Inzidenz, den Krankheitsbeginn sowie den durchschnittlichen Score am Tag 63. Abbildung 23A macht deutlich, dass der Krankheitsverlauf der CIA bei den homozygoten DBA-lpr/lpr Mäusen beider Geschlechter im Vergleich zu den heterozygoten DBA-lpr/+ Mäusen ebenfalls beider Geschlechter milder war. Die statistische Signifikanz wurde ab dem 50. Tag erreicht. Bei beiden Genotypen traten die ersten klinischen Symptome fast zeitgleich auf.

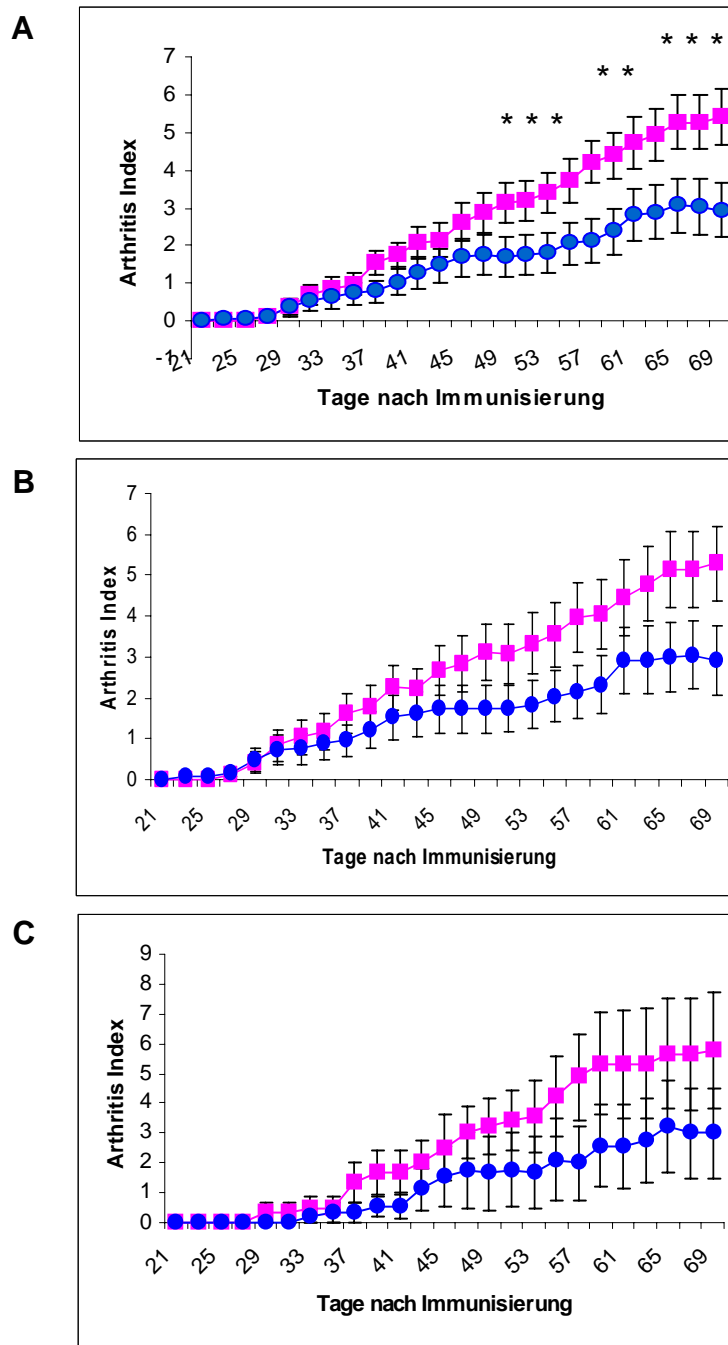


Abbildung 23: Darstellung des Arthritis-Index der DBA/1J-lpr/lpr-Mäuse und DBA/1J-lpr/+Mäuse als Funktion der Zeit

Krankheitsverlauf der DBA/1J-lpr/lpr Mäuse (Kreise, n=34, [Männchen: n=25, Weibchen: n=9]) und ihren heterozygoten Kontrollen (Quadrate, n=33, [Männchen: n=24, Weibchen: n=9]) von beiden Geschlechtern (A,), nur von Männchen (B) und Weibchen (C). Der Arthritis-Index errechnete sich aus dem Durchschnitt der Schweregrade aus einer Gruppe, dabei wurden alle Mäuse berücksichtigt. Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar. Die statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test bestimmt. Signifikante Unterschiede zwischen zwei Gruppen sind gekennzeichnet mit * bei $p < 0,05$. Daten teilweise entnommen aus (142).

Jedoch war die Inzidenz bei den homozygoten Mäusen mit 56% niedriger als bei den heterozygoten Mäusen mit 73% (Tabelle 8).

Trennt man bei der Analyse die Geschlechter voneinander, so zeigten sich sowohl die homozygoten männlichen Fas-Mutanten, als auch die homozygoten weiblichen Fas-Mutanten weniger suszeptibel gegenüber CIA (Abbildung 23B, C). Ebenfalls war die Inzidenz bei den homozygoten Mäusen niedriger als bei den heterozygoten Mäusen, wobei der Unterschied bei den Weibchen statistisch signifikant war (Tabelle 8). Der durchschnittliche Score, beispielsweise am Tag 63, war bei den homozygoten Tieren mit 2,9 statistisch signifikant niedriger als bei den heterozygoten Tieren mit 4,9 (Tabelle 8).

3.4.2 Histopathologische Bewertung der Kollagen-induzierten Arthritis

Um zu überprüfen, ob die klinischen Beobachtungen mit der Histologie von CIA übereinstimmen, wurde eine pathohistologische Untersuchung an den Gelenken von Mäusen mit den klinischen Schweregraden von 0 bis 3 durchgeführt. Abbildung 24 zeigt die Histologie am Beispiel der heterozygoten und homozygoten *lpr*-Maus im Stadium 0 und 3. Im Stadium 0 wies das Gelenk beider Genotypen ein histologisch unauffälliges Bild auf (Abbildung 24A, C). Bei fortgeschrittener Erkrankung (Stadium 3) kam es bei der DBA-*lpr/lpr* Maus zur synovialen Hyperplasie und somit zur Bildung einer synovialen Deckschicht (Abbildung 24B). Die histopathologische Untersuchung des Gelenks der heterozygoten Maus im Stadium 3 zeigte neben der synovialen Hyperplasie eine Pannusbildung. Darüber hinaus waren eine schwere Entzündung und Erosionen, die zu Knorpel- und Knochenzerstörungen führten, sichtbar (Abbildung 24D). Die Histologie zeigte einerseits, dass die Entwicklung der Kollagen-induzierten Arthritis in beiden Genotypen klinisch gleich verlaufen war, und sie die typischen Zeichen der CIA aufwies, aber andererseits, dass das Gelenk der heterozygoten Maus im Stadium 3 histopathologisch eine schwerere Entzündung als bei der homozygoten Maus aufwies.

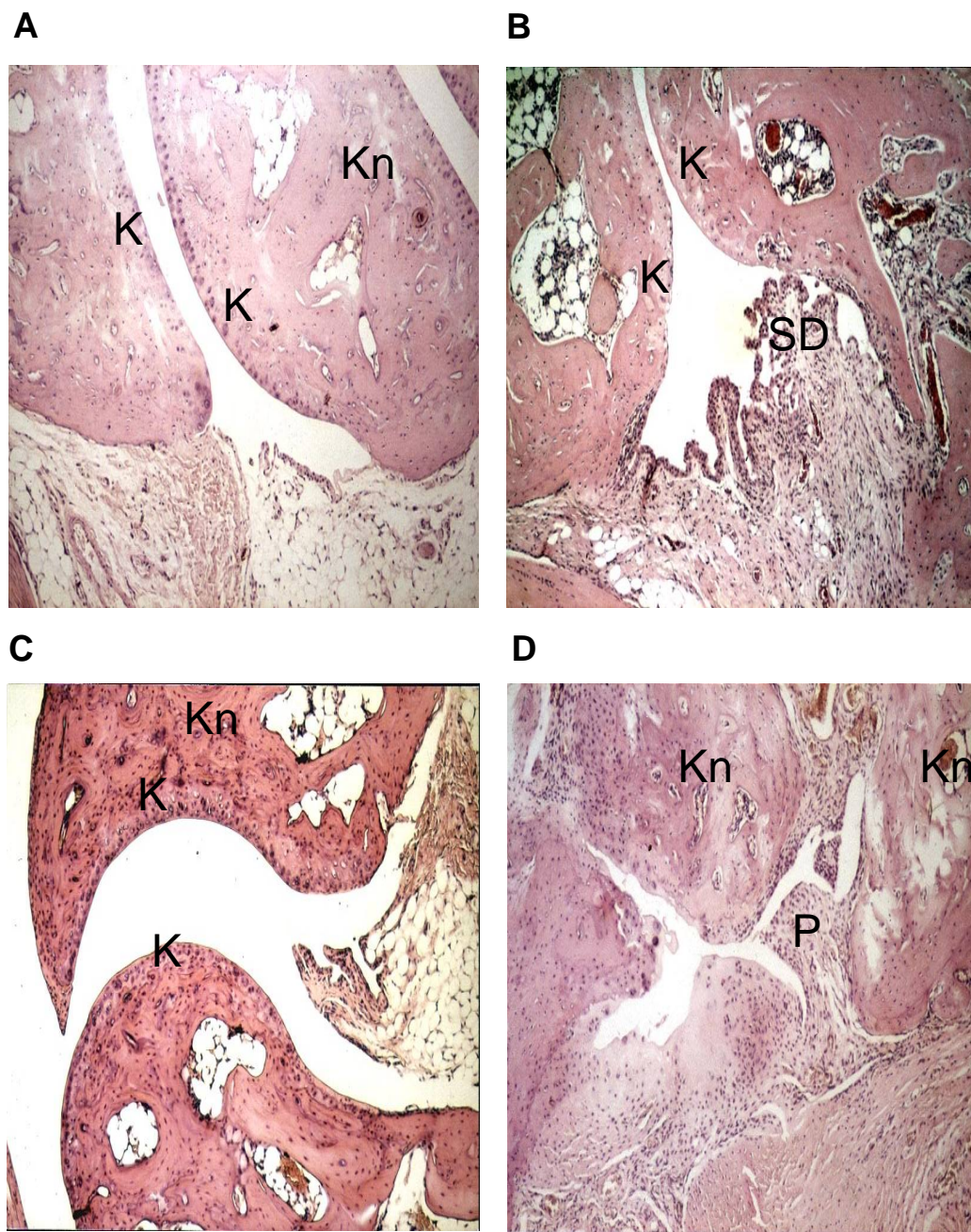


Abbildung 24: Histopathologische Darstellung der Mauspfoten

Histopathologie der Mauspfoten der DBA-lpr/lpr Maus (A,B) und der DBA-lpr/+ Maus (C,D) mit dem Schweregrad 0 (A,C) und 3 (B,D). Abkürzungen: Kn = Knochen, K = Knorpel, SD = Synoviale Deckschicht, P = Pannus. Vergrößerung x200. Daten teilweise entnommen aus (142).

3.4.3 Kollagen II-spezifische T-Zellantwort

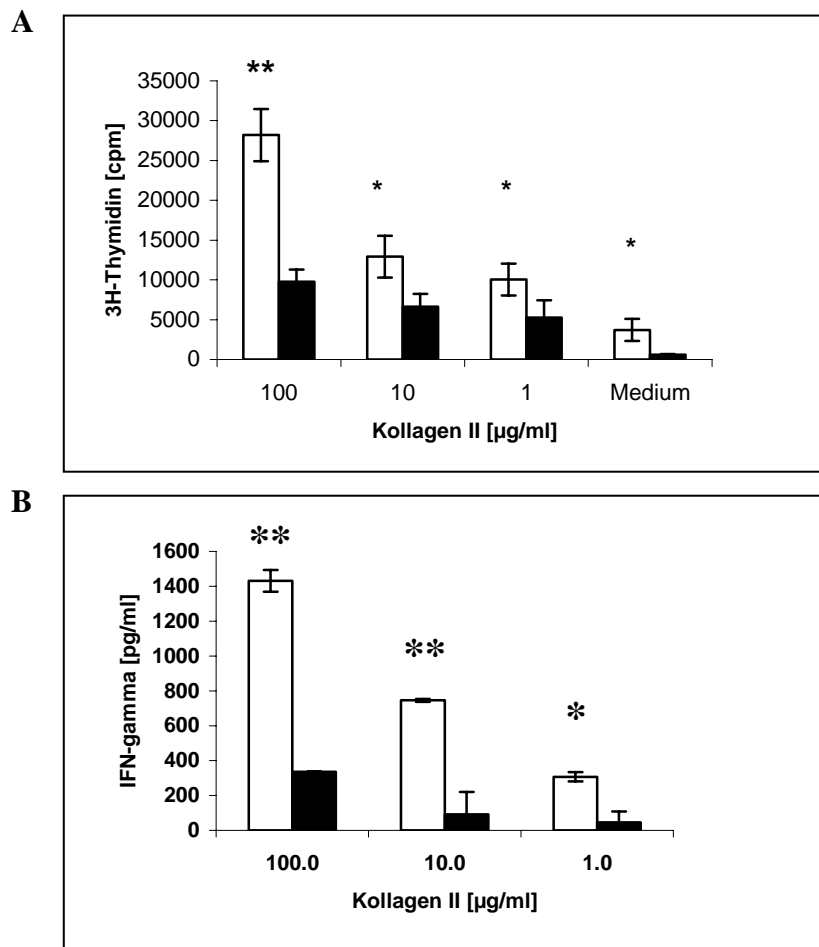


Abbildung 25: Kollagen II-spezifische T-Zellantwort der DBA/1J-lpr/lpr Mäuse und der Kontrollmäuse

Messung der T-Zellantwort auf Rinderkollagen II bei DBA-lpr/lpr (n=3, weiss) und DBA-Wildtyp (n=3, schwarz). T-Zellen wurden mit 1 µg/ml, 10 µg/ml und 100 µg/ml Rinderkollagen II stimuliert. (A) Die Proliferation wurde mittels ^3H -Thymidin-Einbau ermittelt (B). Die IFN- γ Konzentration im Überstand wurde mittels ELISA (Cytoscreen Immunoassay Kit, Biosource, Camarillo, CA) gemessen. Die Säulen präsentieren den Mittelwert aus einer Dreifachbestimmung und die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. Die statistische Signifikanz wurde mit dem t-Test bestimmt. Signifikante Unterschiede zwischen zwei Gruppen sind gekennzeichnet mit * bei $p < 0,05$ und ** bei $p < 0,01$. Daten entnommen aus (183).

Um zu untersuchen, ob die niedrigere Inzidenz bzw. der niedrigere Arthritis-Index bei den DBA/1J-lpr/lpr Mäusen auf eine mangelnde Immunantwort auf Kollagen II zurückzuführen ist, wurde die T-Zellantwort auf Rinderkollagen II untersucht. Dazu wurde die DNA-Synthese als Parameter für die proliferative Aktivität (Abbildung 25A) und die Zytokinfreisetzung von T-Zellen (Abbildung 25B) als Antwort auf Rinderkollagen II gemessen. Die Proliferation der T-Zellen wurde mittels [^3H]-Thymidin-Einbau gemessen. Dazu wurden 8 Wochen alte Mäuse mit Rinderkollagen II, emulgiert mit KFA,

immunisiert. Nach 7 Tagen wurden die Lymphknoten präpariert, nach Abschnitt 2.9.2. aufgearbeitet, und die Lymphknoten-Zellen mit Kollagen II unterschiedlicher Konzentrationen (1, 10 und 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) stimuliert.

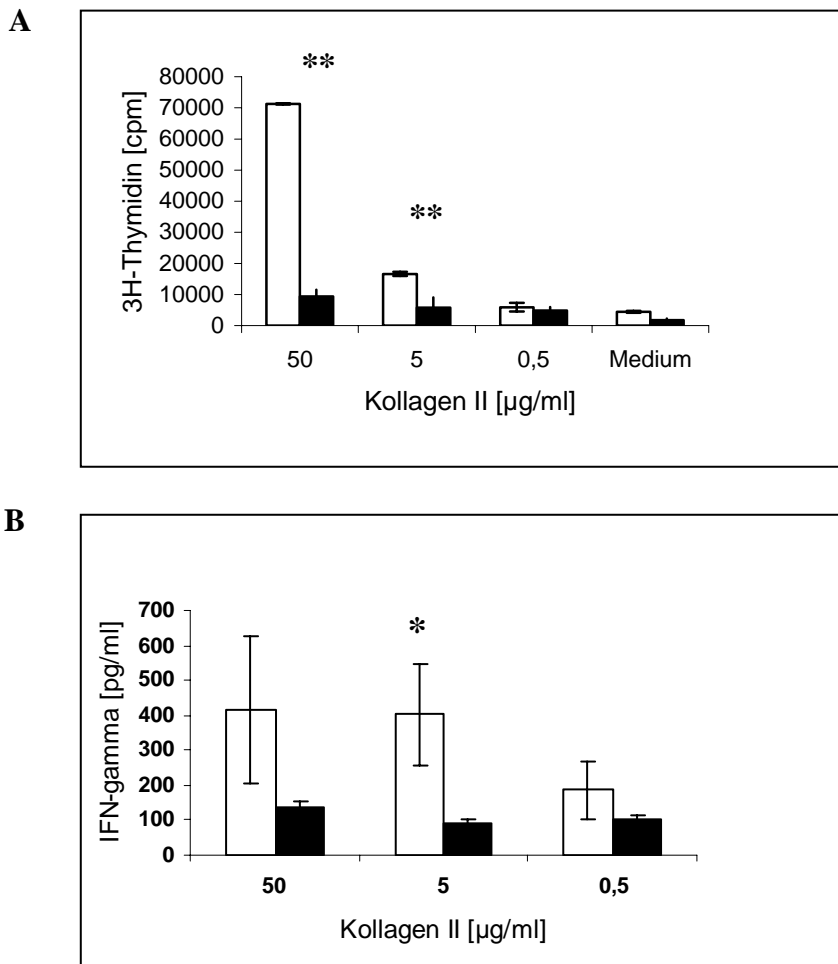


Abbildung 26: Kollagen II-spezifische T-Zellantwort der sFas-Mäuse und der Kontrollmäuse

Messung der T-Zellantwort auf Rinderkollagen II bei transgenen sFas-DBA/1J Mäusen ($n=3$, weiss) und DBA/1J Wildtyp ($n=3$, schwarz). T-Zellen wurden mit 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Rinderkollagen II stimuliert. (A) Die Proliferation wurde mittels ^3H -Thymidin Einbau ermittelt (B) Die IFN- γ Konzentration im Überstand wurde mittels ELISA (Cytoscreen Immunoassay Kit, Biosource, Camarillo, CA) gemessen. Die Säulen präsentieren den Mittelwert aus einer Dreifachbestimmung und die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. Die statistische Signifikanz wurde mit dem t-Test bestimmt. Signifikante Unterschiede zwischen zwei Gruppen sind gekennzeichnet mit * bei $p < 0,05$ und ** bei $p < 0,01$.

Die Messung der Proliferation erfolgte nach Abschnitt 2.10.2.1. Abbildung 25 macht deutlich, dass die T-Zellen der homozygoten DBA/1J-lpr/lpr Maus sehr stark auf das Kollagen II reagierten. Die proliferative Aktivität ist doppelt so hoch ist wie die der T-Zellen der Wildtyp-Maus. Bei der Stimulierung mit 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ist der Unterschied

statistisch signifikant ($p < 0,05$), bei der Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ und 1 $\mu\text{g/ml}$ konnte ebenfalls ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen beobachtet werden ($p < 0,01$). Die Stärke der Antwort nahm bei beiden Gruppen mit der Zunahme der Konzentration des Antigens zu. Die erhöhte Immunantwort spiegelt sich auch in der IFN- γ Freisetzung wider. Die T-Zellen der homozygoten DBA-lpr/lpr Maus produzierten mehr als das Zweifache an IFN- γ als die T-Zellen des Wildtyps. Auch hier führte eine erhöhte Konzentration an Antigen zur Zunahme der Zytokinmenge im Überstand. Der Unterschied war bei allen Konzentrationen statistisch signifikant.

Die transgenen sFas-T-Zellen zeigten ebenfalls eine signifikant höhere Immunantwort als der Wildtyp (Abbildung 26). Bei einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ Kollagen II konnten bei den Zellen der sFas-Maus 71298 cpm im Vergleich zu 9367 cpm bei den Zellen des Wildtyps gemessen werden. Bei der Stimulation mit 5 $\mu\text{g/ml}$ Kollagen II ist die DNA-Synthese ebenso höher als beim Wildtyp. Die starke Aktivität der transgenen sFas-T-Zellen spiegelte sich auch in der IFN- γ -Freisetzung wider. Auch hierbei zeigte sich eine signifikant höhere Zytokinfreisetzung bei transgenen sFas-T-Zellen als bei den T-Zellen der Wildtypen in allen Kollagen II-Konzentrationen

3.4.4 Antigen-spezifische B-Zellantwort

Um zu testen, ob der mildere Verlauf der Erkrankung auf die fehlende B-Zellantwort zurückzuführen war, wurden die Kollagen II-spezifische IgG Antikörper mittels ELISA bestimmt. Am Tag vor der Immunisierung, sowie am Tag des Krankheitsbeginns und in der chronischen Erkrankungsphase wurde den Mäusen am Schwanzende Blut abgenommen. Das Serum wurde dann mittels Zentrifugation vom Plasma getrennt und abgenommen.

Das Ergebnis für Tag 0 zeigt, dass der Kollagen II-spezifische IgG-Spiegel bei homozygoten lpr-Mäusen statistisch signifikant höher ($p < 0,05$) war als bei den heterozygoten Mäusen, was die Ergebnisse früherer Untersuchungen bestätigt (143). Es konnte zwar bei allen Genotypen beobachtet werden, dass der Kollagen II-spezifische Antikörper im Verlauf der Erkrankung (Krankheitsbeginn und chronische Phase) anstieg, jedoch war kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen zu den beiden Untersuchungszeitpunkten zu verzeichnen (Abbildung 27).

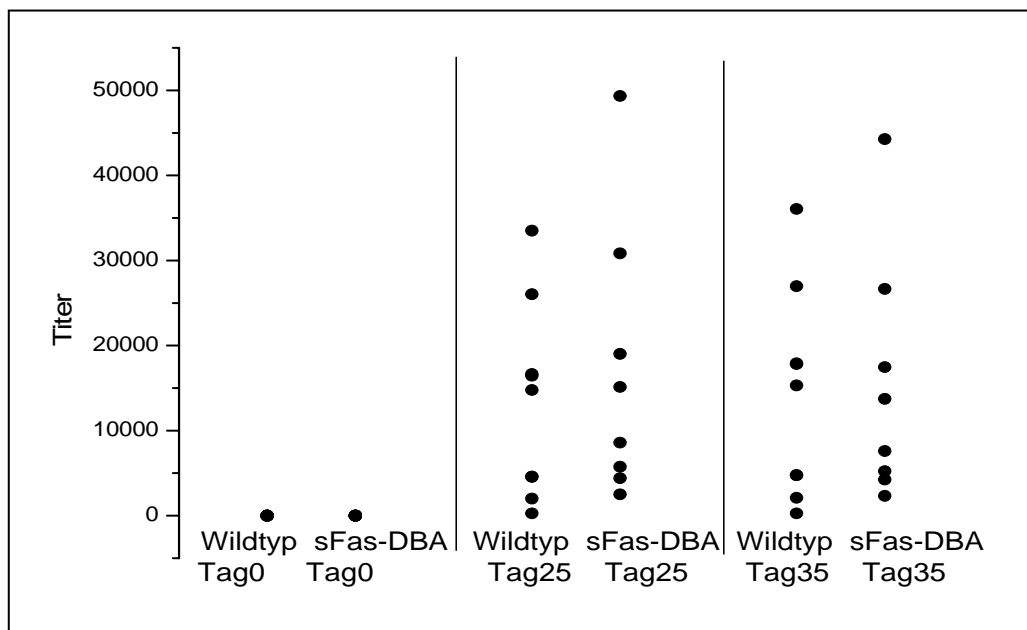


Abbildung 28: Ovalbumin-spezifische B-Zellantwort der sFas-Mäuse und der Kontrollmäuse

Titer der Ovalbumin-spezifischen IgG Antikörper im Serum der transgenen sFas-DBA/1J Mäuse (n=10) und der Kontrollmäuse (n=10) vor der Immunisierung (Tag 0), am Tag 25 und am Tag 35 nach der Immunisierung mit Ovalbumin.

3.5 Lokaler Einfluss von Fas

3.5.1 Einfluss von Fas auf die Zytokin-Expression im Mausgelenk

TNF- α , IL-6 und IL-1 β gehören zu den pathogenetisch relevanten Zytokinen und sind wichtige Indikatoren für Entzündungsprozesse. Dabei spielt IL-1 β eine wichtige Rolle in der Gewebszerstörung im Gelenk, während TNF- α an der Zellinfiltration beteiligt ist. Die Freisetzung von IL-6 erfolgt durch mononukleäre Phagozyten nach Stimulierung u.a. durch IL-1 β (siehe Kapitel 1).

Die Zytokinexpression in den Mausgelenken wurde untersucht. Dafür wurden die Mausgelenke von den homozygoten DBA/1J-lpr/lpr-Mäusen und ihren Kontrollen zum Zeitpunkt des ersten Auftretens von klinischen Symptomen (4-7 Wochen nach Immunisierung) und zum Zeitpunkt der chronischen Erkrankung (10-12 Wochen nach Immunisierung) untersucht.

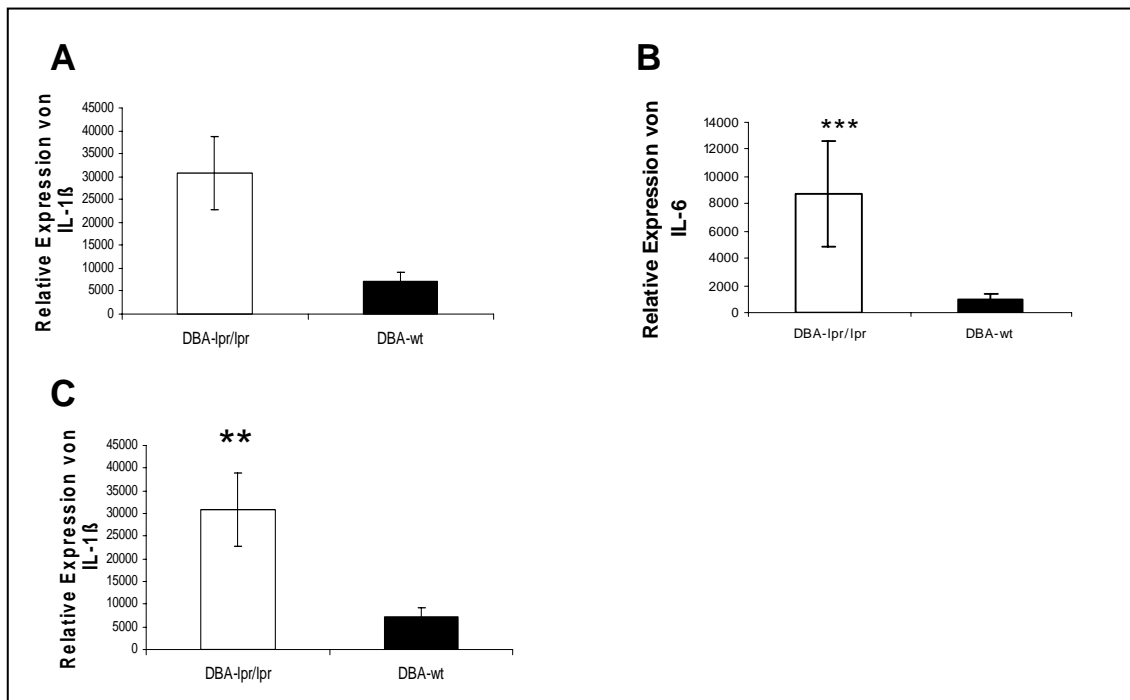


Abbildung 29: Zytokin-Expression in Mauspfoten am Krankheitsbeginn

Darstellung der relativen mRNA-Expression von TNF- α (A), IL-6 (B) und IL-1 β (C) in CIA-Mauspfoten von homozygoten DBA-lpr/lpr-Mäusen (n=19) und DBA-Wildtypen (-wt, n=15) am Krankheitsbeginn. Die Balken repräsentieren den Mittelwert und die Fehlerbalken den Standardfehler. Die statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney U-Test bestimmt. Signifikante Unterschiede zwischen zwei Gruppen sind gekennzeichnet mit ** bei $p < 0,01$ und *** bei $p < 0,001$. Daten entnommen aus (142, 183).

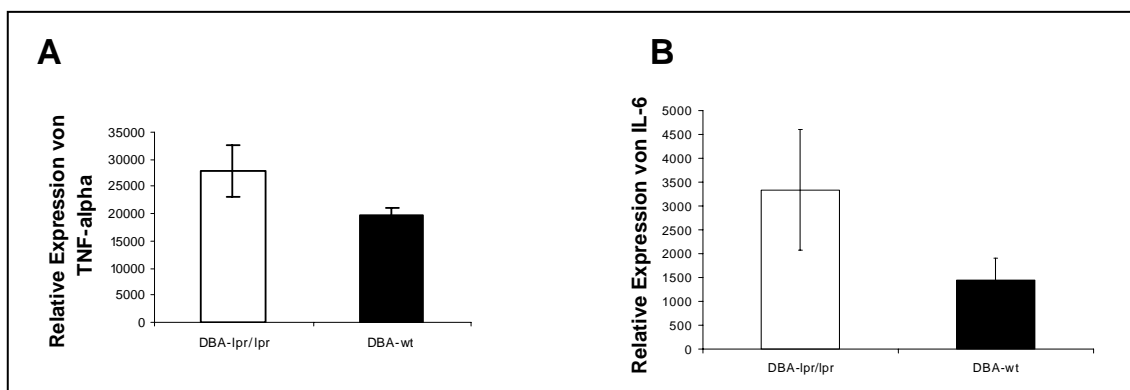


Abbildung 30: Zytokin-Expression in Mauspfoten in der chronischen Erkrankungsphase

Darstellung der relativen mRNA-Expression von TNF- α (A) und IL-6 (B) in CIA-Mauspfoten von homozygoten DBA-lpr/lpr-Mäusen (n=9) und DBA-Wildtypen (-wt, n=10) in der chronischen Erkrankungsphase. Die Balken repräsentieren den Mittelwert und die Fehlerbalken den Standardfehler. Die statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney U-Test bestimmt. Daten entnommen aus (183).

Die Messung erfolgte wie unter Abschnitt 2.11.4 beschrieben mittels Real-Time PCR. Zum Zeitpunkt des Krankheitsbeginns konnte eine erhöhte Expression aller drei untersuchten

Zytokine (TNF- α , IL-6 und IL-1 β) in den homozygoten Mauspfoten verglichen mit den Kontrollpfoten nachgewiesen werden (Abbildung 29A, B, C). Der Unterschied war statistisch signifikant ($p < 0,01$ und $p < 0,001$). Die RNA-Expression der CIA-relevanten Zytokinen in den homozygoten *lpr*-Mäusen war dabei mehr als doppelt so hoch wie die der Kontrollmäuse.

In der chronischen Phase der Erkrankung, also 10 -12 Wochen nach der Immunisierung, konnte eine gleich erhöhte Expression von TNF- α und IL-6 in beiden Genotypen nachgewiesen werden (Abbildung 30A, B).

3.5.2 Einfluss von anti-Fas Antikörper auf den Zelltod von NIH3T3-Fibroblasten

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, sind im Synovium neben vielen mononukleären Zellen insbesondere die lokalen Synoviozyten wie z.B. die fibroblasten- und makrophagenähnlichen Synoviozyten in der Pathogenese von CIA involviert. Da im Synovium eine sehr heterogene Zellpopulation vorliegt, bedarf es der selektiven Betrachtung von bestimmten Zellen.

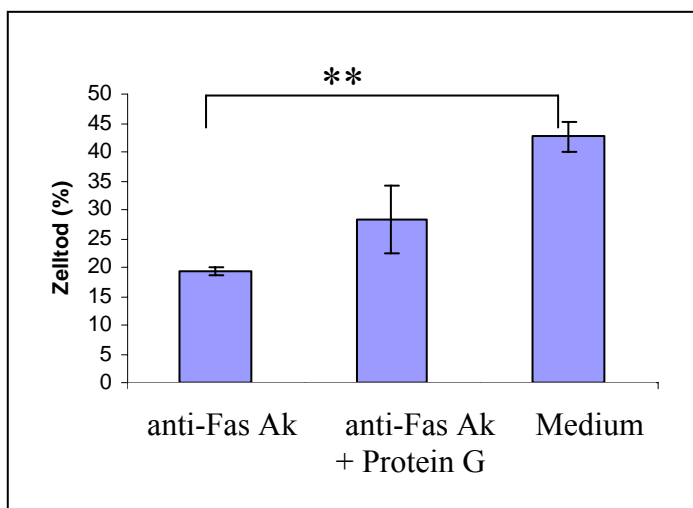


Abbildung 31: Anti-Fas Antikörper-induzierter Zelltod von NIH3T3-Fibroblasten

Durchflusszytometrische Messung des Zelltodes durch Färbung mit Propidiumiodid von NIH3T3-Fibroblasten ohne Behandlung (Kulturmedium) und nach Behandlung mit 0,05 μg anti-Fas Antikörper/ml und mit/ohne 1 μg Protein G. Die Säulen stellen den Mittelwert einer Dreifachbestimmung dar, die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. Die statistische Signifikanz wurde mit dem t-Test bestimmt. Signifikante Unterschiede zwischen zwei Gruppen sind gekennzeichnet mit ** bei $p < 0,01$. Daten entnommen aus (183).

Hinweise auf die kritische Rolle von synovialen Fibroblasten in RA wurden hierfür weiterverfolgt. Dabei wurde die Zell-Linie der Mausfibroblasten NIH3T3 für weitere Untersuchungen verwendet. Es sollte der Einfluss von Fas auf die Aktivität der Fibroblasten untersucht werden. Die Expression von Fas in NIH3T3-Fibroblasten wurde mittels einer Reverse-Transkriptase PCR untersucht, und es konnte eine Bande von 340 bp in der Elektrophorese nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). NIH3T3-Fibroblasten wurden 24 h bei 37°C mit 0,05 µg anti-Fas Antikörper (Jo2)/ml und ein Teil zusätzlich mit 1 µg Protein G inkubiert. Der Zelltod wurde mittels Propidiumiodid-Färbung im Durchflusszytometer gemessen. Die Inkubation mit anti-Fas Antikörper führte zu einem verringerten Anteil toter Zellen um fast 25%, von 45% auf 20%. Der durch anti-Fas und Protein G herbeigeführte Zelltod traf 30% der Zellen (Abbildung 31).

3.5.3 Einfluss von anti-Fas Antikörper auf die Zytokin-Expression der NIH3T3-Fibroblasten

Um zu untersuchen, ob Fas eine aktivierende Wirkung auf die NIH3T3-Fibroblasten ausübte, wurden die Fibroblasten wie im Abschnitt 3.5.2 beschrieben mit Jo2 bzw. mit Jo2 und Protein G kokultiviert und die RNA-Expression der CIA-relevanten Zytokine TNF- α und IL-6 bestimmt. Die Zytokinexpression wurde mittels Real-Time PCR gemessen. Die Ergebnisse unterstreichen den aktivierenden Einfluss von Fas auf die NIH3T3-Fibroblasten. Der anti-Fas Antikörper bewirkte eine Erhöhung der TNF- α - und IL-6-Expression um fast das Doppelte. Die Zytokinexpression in den NIH3T3-Fibroblasten nach der Inkubation mit anti-Fas Antikörper und Protein G war der Expression der NIH3T3-Fibroblasten ohne Behandlung ähnlich (Abbildung 32).

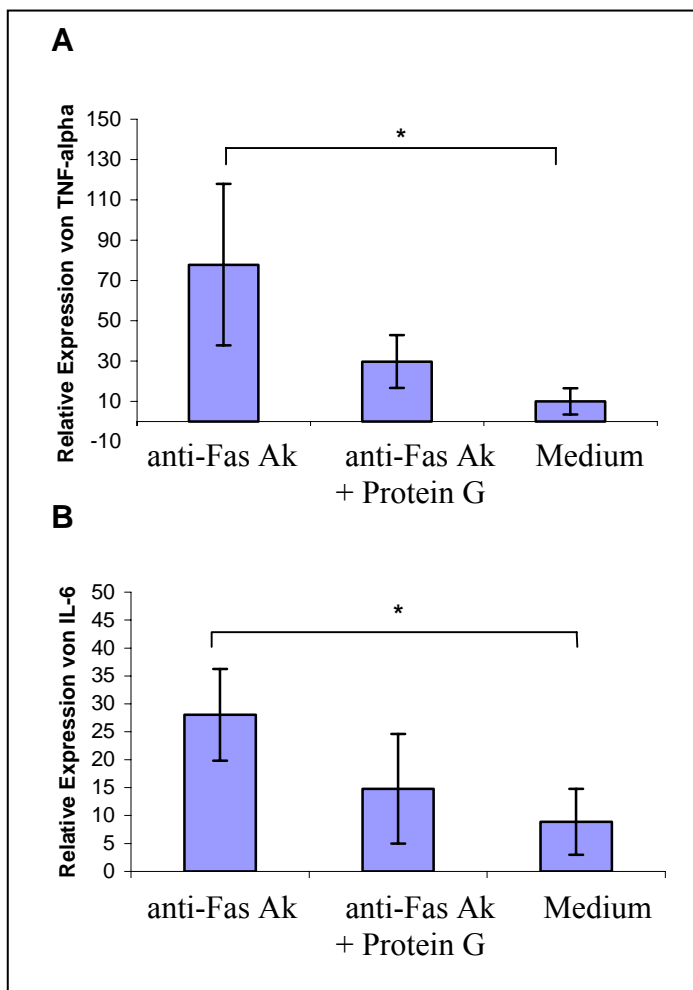


Abbildung 32: Relative Expression von TNF- α und IL-6 der NIH3T3-Fibroblasten nach Stimulierung mit anti-Fas Antikörper

Darstellung der relativen Expression von TNF- α (A) und IL-6 (B) in NIH3T3-Fibroblasten. Die Fibroblasten wurden 24 h mit 0,05 μg anti-Fas AK/ml und mit/ohne 1 μg Protein G bei 37°C stimuliert. Die Säulen stellen den Mittelwert einer Dreifachbestimmung dar, die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. Die statistische Signifikanz wurde mit dem t-Test bestimmt. Signifikante Unterschiede zwischen zwei Gruppen sind gekennzeichnet mit * bei $p < 0,05$. Daten entnommen aus (183).

4 DISKUSSION

4.1 Transgene T-Zell-spezifische sFas-Maus

Um die Rolle von löslichem Fas (sFas) zu untersuchen, wurde eine transgene T-Zell-spezifische sFas-Maus erzeugt. Das DNA-Fragment, welches das sFas codiert, wurde unter der Kontrolle des lck-Promotors kloniert. Das Gen für lck codiert die Tyrosinkinase, p56^{lck}, ein Mitglied der src-Familie. Lck ist assoziiert mit dem cytoplasmatischen Teil des TCRs. Es ist während der ganzen Lymphozyten-Entwicklung sowie in reifen T-Zellen exprimiert. Eine Stimulierung über den TCR-CD3 führt zur gesteigerten Aktivität der Tyrosinkinase p56^{lck}, die die Aktivierung von reifen T-Zellen auslöst. Um zu zeigen, dass das lösliche Fas erst nach einem Aktivierungssignal exprimiert wird, stimulierten wir in einem *in vitro*-Versuch T-Zell angereicherte Milzzellen mit Phorbolmyristatacetat (PMA) und dem Kalziumionophor Ionomycin. Phorbolster aktiviert dabei auf direktem Weg die Protein Kinase C. Seine Wirkung wird gesteigert durch den Zusatz von Ionomycin, da eine vollständige Aktivierung erst durch die physiologische Kalziumkonzentration erreicht wird (144). Es konnte gezeigt werden, dass die Stimulierung mit PMA und Ionomycin erfolgreich war, da auf der RNA-Ebene neben der Bande mit einer Größe von 340 bp eine zweite kleinere Bande von 290 bp bei den stimulierten sFas-transgenen T-Zellen zu sehen war. Der Nachweis für die sFas-Expression auf Protein-Ebene wurde mittels Western Blot erbracht (Daten nicht gezeigt). Die durchflusszytometrische Messung zeigte, dass die Fas-Expression in der transgenen sFas-Maus intakt war. Die oben genannten Ergebnisse belegen, dass das sFas-Transgen auf die Expression des transmembranenen Fas-Rezeptors auf Thymozyten sowie auf die Lymphozytenpopulation (CD4/CD8) keinen Einfluss hatte.

Im Einklang mit den Ergebnissen von Cheng et al. (130), konnte die protektive Wirkung von sFas auf den Fas-vermittelten Zelltod in Thymozyten nachgewiesen werden (Abbildung 18A). Thymozyten kommen je nach Reifestadium als DP (doppelpositive) und SP (einfachpositive) Zellen vor (145). Die potentielle Zytotoxizität des anti-Fas Antikörpers (Jo2) gegen Thymozyten konnte von Wu et al. (146) nachgewiesen werden. Jedoch scheinen die DP und SP Thymozyten unterschiedliche Suszeptibilität gegenüber

Jo2 aufzuweisen. Während die DP Thymozyten anti-Fas sensitiv waren, zeigten die SP Thymozyten eine Resistenz gegenüber dem anti-Fas Antikörper. Dieser Unterschied war nicht auf die unterschiedliche Fas-Dichte zurückzuführen, da sich die Fas-Expression zwischen den beiden Zellpopulationen nicht unterschieden. Diese selektive Apoptose von DN T-Zellen durch Jo2 konnte auch von der Arbeitsgruppe von Ogasawara et al. nachgewiesen werden (99). Andererseits zeigte die Messung von Drappa et al., dass die höchste Fas-Expression bei den DP Thymozyten vorlag (147). Die Sensibilität könnte somit doch abhängig von „Fas-Dichte“ sein. Während Fas in dimerisierter Form keine Wirkung zeigt, vermag der Jo2 Antikörper in bivalenter Form als Antagonist und in polyvalenter Form als Agonist zu wirken. Wenn Zellen exzessiv Fas exprimieren, so fungiert Jo2 als Auslöser des Zelltodes durch Einleiten des Todessignals. Liegt eine niedrige Fas-Expression vor, so wirkt Jo2 nicht als Todesbote dieser Fas-exprimierenden Zellen (148).

Da die Fas-Expression der Thymozyten bei der transgenen sFas-Maus und bei der normalen Maus ähnlich war, ist die Fas-Dichte-abhängige Wirkung des Antikörpers Jo2 auszuschließen. Darüber hinaus sind im Thymus der transgenen sFas-Maus genau so viele CD4⁺CD8⁺ T-Zellen vorhanden wie im Thymus der normalen Maus. Dies schließt ebenfalls die Hypothese der selektiven Apoptose durch Jo2 aus. Daher liegt die Vermutung nahe, dass die verminderte spezifische Apoptose der Thymozyten auf die blockierende Fähigkeit des sFas-Moleküls zurückzuführen war. Für eine partielle Blockierung durch lösliches Fas, sezerniert von den transgenen Thymozyten, spricht außerdem die Antikörperkonzentrations-abhängige Apoptose, die auch in der CD3-induzierten Aktivierungs-induzierten Apoptose zu beobachten war.

Die Differenzierung der T-Zellen der transgenen sFas-Maus verlief wie erwartet. Eine Akkumulation von CD4⁻CD8⁻T-Zellen, sowie CD45⁺CD90⁺ T-Zellen wie im Falle der lpr-Maus (Abbildung 17) konnte nicht beobachtet werden. Dies ist auch nicht verwunderlich, da sie einen intakten Fas-Rezeptor besitzen. Dass ein intaktes Fas notwendig ist, um die abnormale Subpopulation von CD45⁺CD90⁺ Zellen in der lpr-Maus zu eliminieren, zeigte die Arbeitsgruppe von Wu et al. (146). Andererseits führte die Applikation von sFas durch Injektion in die Maus zur veränderten Entwicklung der Lymphozyten (130). Es kam zu

einer gesteigerten Anzahl von Milzzellen, die hauptsächlich durch die Zunahme von B-Zellen hervorgerufen wurde.

Die T-Zellen der transgenen sFas-Maus zeigten gegenüber Apoptose in der Peripherie eine unterschiedliche Sensibilität. Die Aktivierung von T-Zellen mit PMA/Ionomycin sollte eine Steigung der Expression von Fas und Fas-Liganden bewirken, sowie die Aktivierung der Tyrosinkinase p56^{lck} einleiten, was die Produktion und Freisetzung von löslichem Fas zur Folge haben sollte. Eine Reaktivierung mit anti-CD3 Antikörper leitete die Aktivierungs-induzierte Apoptose ein, die bei der transgenen sFas-Maus vermutlich durch die sFas-Moleküle blockiert werden konnte. Die Kreuzreaktion der peripheren mit PMA/Ionomycin aktivierten T-Zellen der transgenen sFas-Maus mit anti-Fas Antikörper führte jedoch zu einer erhöhten Apoptose verglichen mit dem Wildtyp (Abbildung 18B).

Zahlreiche Studien berichten, dass Gedächtniszellen resistenter gegenüber Fas-induzierter Apoptose sind als naive T-Zellen (149). Die erhöhte Fas-induzierte Apoptose der aktivierten T-Zellen könnte also auf einen geringeren Anteil der Gedächtniszellen im peripheren T-Zell Repertoire der Wildtypen zurückgeführt werden. Mittels FACS-Analyse mit CD44- und CD62L-Antikörpern wurde die Verteilung von naiven T-Zellen und Gedächtniszellen unter den aktivierten T-Zellen untersucht. Die Inkubation von ca. 24 h mit anti-Fas Antikörpern führte bei beiden Genotypen zur Eliminierung von aktivierten T-Zellen zu gleichen Prozentsätzen. Die Menge der Gedächtniszellen sowie der naiven T-Zellen unterschieden sich in der transgenen sFas-Maus nicht von der normalen Maus. Die erhöhte Fas-induzierte Apoptose konnte also nicht dem erhöhten Vorkommen von naiven T-Zellen in der transgenen sFas-Maus zugeschrieben werden.

Die Interaktion von TNF-Liganden der Effektorzelle mit dem Rezeptor der Zielzelle löst eine Signalkaskade auf der Zielzelle aus. In der sogenannten „reverse signaling“, das bereits schon bei vielen Mitgliedern der TNF-Familie beobachtet wurde, fungiert der transmembrane Ligand als Rezeptor, und der transmembrane oder lösliche Rezeptor übernimmt die Funktion des Liganden (150-152). Der Mechanismus für diesen umgekehrten Signalweg ist jedoch nicht bekannt. Prossakova et al. haben nachgewiesen,

dass lösliche Fas-Antigene *in vivo* auch in oligomerer Form vorkommen können, und dass diese zytotoxische Aktivität zeigen (153).

Der erhöhte spezifische anti-Fas-induzierte Zelltod der aktivierten T-Zellen könnte also auf die zytotoxische Aktivität des löslichen oligomeren Fas zurückgeführt werden. Darüber hinaus könnten die Fas-exprimierenden T-Zellen durch die Kreuzreaktion mit anti-Fas Antikörpern lysiert worden sein und teilweise sogar durch sFas blockiert.

Die in der gemischten Lymphozytenkultur aktivierten T-Zellen der transgenen sFas-Maus erwiesen sich aggressiver als die Lymphozyten der normalen Maus. Eine Steigerung der lytischen Aktivität konnte in beiden Genotypen durch zusätzliche Stimulierung durch PMA/Ionomycin erreicht werden. Möglicherweise ließ sich diese Eigenschaft der Lymphozyten der transgenen sFas-Maus ebenfalls auf die Fähigkeit der sFas-Moleküle, oligomere Formen zu bilden, zurückführen.

4.2 Suszeptibilität transgener sFas-Mäuse gegenüber Kollagen-induzierter Arthritis

Um zu untersuchen, ob sFas einen Einfluss auf die Entstehung und Entwicklung von CIA hat, wurden die transgenen sFas-Mäuse sowie normale Mäuse mit Rinderkollagen II immunisiert. Das Experiment wurde dreimal durchgeführt und anschließend gepoolt. Es konnte bei beiden Gruppen klinische Symptome, die auf CIA hindeuten, beobachtet werden. Dabei ergab sich ein geringfügig milderer Krankheitsverlauf bei den transgenen sFas-Mäusen als bei den normalen Mäusen, jedoch mit zeitgleichem Ausbruch der ersten klinischen Symptome und gleicher Inzidenz. Hierbei umfassen die Gruppen sowohl weibliche als auch männliche Tiere. Die geschlechtsgetrennte Analyse zeigte, dass die Arthritis-Index-Differenz zwischen den transgenen sFas-Mäusen und Kontrollmäusen bei den weiblichen Mäusen größer war als bei den männlichen Tieren, wobei die mildere Erkrankung jeweils bei den transgenen sFas-Mäusen bei beiden Geschlechtern zu beobachten war. Eine stärkere Suszeptibilität der männlichen Mäuse gegenüber CIA als bei weiblichen Tieren wurde bereits berichtet (3, 36, 38). Das verzögerte Auftreten der ersten klinischen Symptome, sowie der niedrigere durchschnittliche Score bei den weiblichen transgenen sFas-Mäusen verglichen mit den männlichen transgenen sFas-

Tieren lässt auf einen Einfluss der sFas-Expression auf den Verlauf von CIA in geschlechtsspezifischer Weise vermuten. Eine statistische Signifikanz wurde allerdings an keinem Tag erreicht.

Obwohl der Verlauf der Kollagen-induzierten Arthritis bei transgenen sFas-Mäusen milder war, konnte eine viel stärkere Kollagen-spezifische Immunantwort bei den T-Zellen der transgenen sFas-Mäusen nachgewiesen werden.

Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit der Beobachtung von Cheng et al., die eine erhöhte proliferative Aktivität der T-Zellen einer mit löslichem Maus-Fas injizierten Maus zeigen konnten (130). In der Antikörperbildung zeigte sich in beiden Genotypen jedoch ein vergleichbares Bild. Dies deckt sich ebenfalls mit Messungen an Patienten mit RA, die zeigten, dass es keine Korrelation zwischen der sFas-Konzentration und der IgG-Menge im Serum gibt (133).

4.3 Einfluss von Fas auf die Induktion und Entwicklung von Kollagen-induzierter Arthritis

In Einklang mit anderen Tierexperimenten konnten wir zeigen, dass Mäuse mit einem Defekt am Fas-Gen weniger suszeptibel gegenüber Autoimmunerkrankungen waren als normale Mäuse (121, 122, 124),

Der Krankheitsverlauf der Mäuse ohne und mit Fas-Gendefekt nach der Immunisierung mit Rinderkollagen II zeigt, dass Fas bei der Induktion der Kollagen-induzierten Arthritis keine Rolle spielt. Vielmehr ist es in der Progression der Erkrankung involviert: es verstärkt die Kollagen-induzierte Arthritis in der DBA/1J-Maus. Das Auftreten der ersten klinischen Symptome erfolgte fast zeitgleich, jedoch ergaben sich ein milderer Krankheitsverlauf und eine niedrigere Inzidenz bei der Mausgruppe mit Defekt am Fas-Gen (Tabelle 3). Der Arthritis-Index zeigte ab dem 50. Tag einen statistisch signifikanten Unterschied (Abbildung 23A). Dabei ist der Arthritis-Index der Durchschnitt aller Scores einer Mausgruppe. Einzeln betrachtet erstrecken sich die Erkrankungsschweregrade der Mäuse in beiden Gruppen von 0 bis 3, wobei die Krankheitsstufe 0 bei den homozygoten *lpr*-Mäusen überwiegt (Daten nicht gezeigt).

Histopathologische Untersuchungen von kranken Gelenken (Stadium 3) zeigten ein histologisch auffälligeres Bild bei den heterozygoten als bei den homozygoten Mäusen (Abbildung 24).

Eine besondere Rolle kommt den CD4 T-Zellen in der Pathogenese von CIA zu. Es gibt Hinweise dafür, dass die Induktion von CIA mit der dominanten Expression von Th1 Zytokinen assoziiert ist, was darauf hindeutet, dass CD4 T-Zellen eine bedeutende Rolle spielen (154). Taneja et al. zeigten, dass CD4 T-Zellen in DQ8 transgenen Mäusen für die Initiation von CIA wichtig und nötig sind, während CD8 T-Zellen in der DQ8 transgenen Maus einen regulatorischen oder/und protektiven Effekt haben (51). Dem widerspricht aber die Untersuchung, dass CD4 T-Zellen-defiziente Mäuse keine veränderte Inzidenz und Schwere der Erkrankung verglichen mit Wildtypen zeigten. CD8 T-Zellen-defiziente Mäuse dagegen zeigten eine erniedrigte Inzidenz, aber einen unveränderten Krankheitsgrad (53). Die Rolle von CD4 und CD8 T-Zellen in der Pathogenese von CIA wird kontrovers diskutiert. Dies ist u. a. darauf zurückzuführen, dass der genetische Hintergrund für die Induktion von CIA einen Einfluss auf die Erkrankung und das Krankheitsbild hat (52). DBA1/J und B10.Q (beide Stämme sind suszeptibel für CIA) haben ein unterschiedliches CD4/CD8 T-Zellen Verhältnis in Lymphknoten, insbesondere nach der Aktivierung mit T-Zell Mitogenen (155). Die von uns auf den DBA/1J-Hintergrund gekreuzten *lpr*-Mäuse verglichen mit dem DBA/1J-Widtyp zeigten im CD4/CD8 Repertoire keinen Unterschied.

Da CIA eine T-Zell-vermittelte Erkrankung ist, lag es nahe, die Kollagen-spezifische Immunantwort zu messen. Dabei zeichnete sich eine stärkere Proliferation der T-Zellen der homozygoten DBA/1J-*lpr/lpr*-Mäuse verglichen mit denen des Wildtyps schon vor der erneuten *in vitro*-Stimulierung ab (Abbildung 25). Das deutet darauf hin, dass eine kleine T-Zellpopulation autoreaktive Eigenschaften zeigt, da diese keine Reaktivierung benötigen, um sich zu teilen. Das Vorkommen von autoreaktiven T-Zellen in einem normalen peripheren T-Zellrepertoire wurde gezeigt (156, 157). Normalerweise befinden sich diese autoreaktiven T-Zellen in einem Zustand der Anergie. Jedoch konnte nachgewiesen werden, dass autoreaktive T-Zellen in der MRL-*lpr/lpr* Maus spontan aktiviert werden (158). Eine umfassende Untersuchung über das proliferative Verhalten und die daraus resultierende Zytokinausschüttung nach der Stimulierung in CH3-*lpr*-T-Zellen wurde von Davidson et al. durchgeführt (159). Unser Ergebnis zeigte

überraschenderweise eine mehr als zweifache Zunahme in der Proliferation der Lymphozyten der homozygoten DBA-lpr/lpr Maus nach einer erneuten Stimulierung mit Kollagen II verglichen mit den Lymphozyten der normalen Maus. Die proliferative Aktivität der lpr-T-Zellen ist zwar konsistent mit den Beobachtungen von Davidson et al. (159), aber korreliert nicht mit dem milderen Krankheitsverlauf der Gruppe der lpr-Mäusen. Die Arbeitsgruppe von Davidson et al. wies darüber hinaus nach, dass die unfractionierten Lymphozyten der DBA-lpr/lpr Maus mit einer 5-10-fachen Verminderung an CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen eine stärkere Immunantwort nach einer Kreuzreaktion mit dem TCR-Komplex in der Anwesenheit von PMA, mit daraus resultierenden hohen Freisetzung von Zytokinen wie TNF- α und IFN- γ , zeigte. Sie stellten dabei fest, dass die proliferierende Fraktion unter den Lymphozyten nicht die DN T-Zellen sind, obwohl diese 75% der Lymphozyten in der lpr-Maus ausmachen. Auch wir konnten nachweisen, dass in dem Überstand der mit Kollagen II stimulierten lpr-Lymphozyten mehr Zytokine (z. B. IFN- γ) enthalten waren als im Überstand der Kontrollgruppe. Die Zunahme der Zytokinproduktion korrelierte mit der vermehrten DNA-Synthese nach der Stimulierung.

Den oben genannten Beobachtungen ist zu entnehmen, dass 1.) die CD4- und CD8-T-Zellen der lpr-Maus, die bezogen auf das Gesamtrepertoire der T-Zellen verhältnismäßig gering vertreten waren, ein hohes proliferierendes Potential besitzen, und dass 2.) die Toleranzinduktion in lpr-Mäusen gestört und dadurch die Proliferation durch die spontane Selbstaktivierung oder/und Autoreaktivität begünstigt wurde.

Die erhöhte Immunantwort der lpr-T-Zellen auf das Kollagen II könnte das Resultat des Primings sein. Die erste *in vivo*-Stimulierung bewirkte die Aktivierung dieser T-Zellen, deren proliferative Aktivität durch eine Reaktivierung *in vitro* sensibilisiert wird. Die ohnehin schon hypersensiblen lpr-Lymphozyten durchlaufen keine Aktivierungs-induzierte Apoptose, da ihnen das funktionstüchtige Fas zum Auslösen der Apoptose fehlt. So kommt es im Gegensatz zu normal Fas-exprimierenden Lymphozyten zur Akkumulation dieser Zellen. Widersprüchlich waren jedoch die Messungen von anderen Autoren. Okuda et al. und Waldner et al. konnten zwar eine proliferative Antwort auf MOG35-55 bei B6-Wildtyp sowie bei B6-lpr nachweisen, aber einen Unterschied zwischen den beiden Gruppen konnten sie nicht feststellen (121, 124).

Um nach weiteren Ursachen für die erhöhte proliferative Immunantwort der T-Zellen der lpr-Maus zu suchen, analysierten wir die Verteilung der naiven und Gedächtniszellen

innerhalb der Lymphozytenpopulation der lpr-Maus und ihrer Kontrolle mittels Durchflußzytometer. Es konnte nachgewiesen werden, dass das T-Zell-Repertoire der lpr-Maus mehr CD44^{high} T-Zellen als das der Kontrolle aufwies, jedoch gab es bei der lpr-Maus keine Zunahme dieser Zellen nach der Stimulierung mit Kollagen II (183).

Nachdem auszuschließen ist, dass der mildere Verlauf der CIA der lpr-Mäuse der mangelnden T-Zellantwort zuzuschreiben war, wurde die Kollagen II-spezifische B-Zell-Antwort untersucht. Es ist bekannt, dass das lpr-Gen eine abnormale B-Zell-Aktivierung induziert, was zum auffälligen Anstieg von Immunoglobulinen im Serum, insbesondere IgG, führte (160). Es sind mehr CII-spezifische IgG-Antikörper im Serum von lpr-Mäusen am Tag vor der Immunisierung als bei der Kontrollgruppe nachweisbar. Die CII-spezifischen IgG-Antikörper nahmen bei beiden Gruppen am Tag des Krankheitsbeginns, sowie in der chronischen Phase zu, jedoch gab es keinen Unterschied zwischen der lpr-Mausgruppe und der Kontrollgruppe. Daher ist auszuschließen, dass die schwerere Erkrankung der DBA/1J-Wildtypen auf eine höhere B-Zellantwort als die der Kontrollgruppe zurückzuführen ist.

4.4 Fas-vermittelte Stimulierung von gelenkspezifischen Zellen

RA ist gekennzeichnet durch die synoviale Hyperplasie. Das Zustandekommen der synovialen Hyperplasie ist jedoch bisher nicht verstanden. Es wurde angenommen, dass T-Zellen das Gewebe unterhalb der synovialen Deckzellschicht ("Sublining") und die Synovialflüssigkeit infiltrieren, so dass es im Synovialgewebe zur Akkumulation von T-Zellen kommt. Ihre Assoziation mit antigenpräsentierenden Zellen (APCs) führte zur Aktivierung von B-Zellen mit daraus resultierender Immunoglobulin-Produktion. Diese Beobachtung ließ die rheumatoide Arthritis anfangs als atypische "Immune disorder" erklären (161). Eine weitere mögliche Erklärung ist das gestörte Gleichgewicht von Proliferation und Absterben der synovialen Zellen. Die geringe Apoptose-Rate im RA-Synovium ließ eine reduzierte Apoptose der synovialen Zellen für die Hyperplasie vermuten (162). Für die Hyperplasie spricht daher ebenso eine erhöhte Proliferationsrate der Synoviozyten im RA-Synovium. Jedoch wurde auch gezeigt, dass apoptotische Synovialzellen häufiger im RA-Synovium vorkommen als im Synovium von Patienten mit Osteoarthritis (OA) (116). Die Osteoarthritis ist eine häufige Gelenkerkrankung vor allem

älterer Menschen, die sich vom Knochen ausgehend entwickelt und viele Gemeinsamkeiten mit der rheumatoiden Arthritis aufweist. Im Gegensatz zu RA weist das Synovium von Patienten mit OA kaum Lymphozyten auf. Die starke Infiltration von Fas-L-exprimierenden Lymphozyten ins RA-Synovium könnte die Apoptose Fas-exprimierender Synoviozyten durch Fas/Fas-L -Interaktion ausgelöst haben (116, 163-165). Andererseits deuten einige Studien darauf hin, dass die parenchymalen Zellen, wie RA-synoviale Fibroblasten, eine abnehmende Apoptose, aber eine Hyperplasie durchmachen (166). Sowohl die makrophagenartigen Synoviozyten in der synovialen Deckschicht ("Lining layer") als auch die fibroblastenähnlichen Synoviozyten in der unteren synovialen Deckschicht ("Sublining") expandieren im Synovialgewebe von RA-Patienten. Es konnte nachgewiesen werden, dass auf Synoviozyten und synovialen T-Zellen im rheumatoiden Synovium funktionierende Fas-Antigene exprimiert sind. Ebenso findet man im RA-Synovium infiltrierende aktivierte T-Zellen vor, welche Fas exprimieren. Diese sind aber in zwei Gruppen der Fas-sensitiven T-Zellen mit einer Überexpression von Fas-L, und der Fas-resistenten T-Zellen ohne Fas-L Expression unterteilt (30). Chou et al. detektierten Fas im Sublining und konnten nachweisen, dass die Mehrheit der Fas-exprimierenden Zellen fibroblastähnlichen Synoviozyten waren. Darüber hinaus konnte eine starke Korrelation der Apoptose mit der Fas-Expression im Sublining gezeigt werden (167). Die Fas/Fas-L Interaktion aktiviert einerseits den Apoptosepathway und andererseits besitzt Fas eine stimulierende Funktion. Einige Studien zeigten, dass eine Fas-Kreuzreaktion mit spezifischen Antikörpern die CD3 Ligation-induzierte T-Zell-Proliferation kostimulierte (126, 127). Andere Gruppen wiesen nach, dass die Fas-Ligation direkt die Proliferation von mehreren transformierten und nicht-transformierten Zell-Linien auslösten (129, 168). Da unser Experiment zeigte, dass die Fas-mutanten Mäuse trotz erhöhter T-Zell-Immunantwort eine leichtere Arthritis-erkrankung als die normalen Mäuse entwickelten, vermuten wir, dass die mögliche regulatorische Rolle von Fas in der Entstehung der CIA auf das Synovium beschränkt ist. Das reziproke Verhältnis der Krankheitsverläufe der homozygoten und heterozygoten DBA/1J-Mäuse verglichen mit ihrer Kollagen-spezifischen Immunantwort deutet auf eine stimulierende Eigenschaft des Fas-Moleküls hin und könnte somit möglicherweise für die synoviale Hyperplasie verantwortlich sein. Um die Rolle von Fas auf synovialen Fibroblasten zu untersuchen, wurden in *in vitro*-Versuchen die Suszeptibilität von NIH3T3-Fibroblasten gegenüber anti-

Fas Antikörper (Jo2) untersucht. Eine RT-PCR sowie eine durchflusszytometrische Messung bewiesen, dass diese Fibroblasten Fas exprimieren (Daten nicht gezeigt). Eine 20-stündige Inkubation mit Jo2 führte zur Abnahme der Anzahl toter Zellen um ca. 25% verglichen mit den Zellen, welche nur im Kulturmedium waren. Der Zusatz von Protein G zu Jo2, welche die apoptotische Aktivität von Jo2 erhöhen sollte, erhöhte zwar den Anteil toter Zellen um ca. 18%, blieb aber noch unter dem Anteil der Zellen, die eines spontanen Todes starben. Um zu zeigen, dass eine Aktivierung der NIH3T3-Fibroblasten stattgefunden hatte, wurde eine durchflusszytometrische Analyse mit den Aktivierungsmarkern CD25, ICAM und MHC II^q durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Expression aller drei Marker nachgewiesen werden. Die Messung der pro-inflammatorischen Zytokinen auf mRNA-Ebene zeigte, dass die Expression von TNF- α und IL-6 in den Fibroblasten nach einer anti-Fas Behandlung am höchsten war. Der mildere CIA-Verlauf der lpr-Mäuse und die eben beschriebene *in vitro*-Beobachtung der Apoptose-Resistenz mit einer daraus resultierenden erhöhten Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen nach der Behandlung mit anti-Fas, lassen auf eine wichtige Rolle von Fas als Stimulator in der Pathogenese von CIA schließen.

4.5 Fas - ein möglicher wichtiger Aktivator im Synovium

Die wesentliche Beteiligung von Zytokinen am Krankheitsbild der RA bzw. CIA gilt als unbestritten. Im Synovium von RA-Patienten sind die fibroblasten- und makrophagenabstammende Zytokine (wie IL-1, IL-6 und TNF- α) in großer Menge vertreten. (23, 169, 170). Die regulatorische Funktion von TNF- α und IL-1 in der Gelenkentzündung und Gewebszerstörung in der RA ist bekannt (61, 62). TNF- α und IL-1 bewirken eine verstärkte Genexpression von knorpelschädigenden Matrixmetalloproteinasen (MMP, Kollagenase und Stromelysin), sowie Serinproteasen und Kathepsine, die die Mediatoren der Gewebedestruktion in der RA darstellen. Sie sind zum Großteil Produkte fibroblastähnlicher Synoviozyten. Gleichzeitig exprimieren sie die Inhibitoren "Tissue Inhibitors of Metalloproteinases" (TIMP). In der RA verschiebt sich das Verhältnis von MMP und TIMP zugunsten der MMPs, da die TIMP in konstant gleichen Mengen gebildet wird.

TNF- α und IL-1 sind außerdem an der Induktion der Proliferation der Synovialzellen (171), sowie an der Infiltration von Entzündungszellen beteiligt (172, 173). Im Gegensatz zur sonst zellarmen Synovialflüssigkeit des Gesunden ist die Synovialflüssigkeit der RA-Patienten sehr stark zellulär infiltriert, vor allem mit neutrophilen Granulozyten und auch Makrophagen. Ebenso ist die Synovialmembran angereichert mit aktivierten Makrophagen und T-Zellen, sowie aktivierten Fibroblasten, Plasmazellen und dendritischen Zellen. Die Makrophagen fungieren als Hauptproduzent von Zytokinen und leisten den größten Beitrag zur Gelenkzerstörung. Ihre verstärkte Fähigkeit, als APCs zu dienen, wird durch die erhöhte Expression von HLA-DR erklärt (18). Darüber hinaus besitzen synoviale Makrophagen die Eigenschaften Th1 T-Zellen zu aktivieren und zu polarisieren (19).

IL-6 ist indirekt an der Rekrutierung von Leukozyten in Entzündungsstellen beteiligt (174). Darüber hinaus induziert es die Proliferation von synovialen Fibroblasten (175), sowie Formation und Aktivierung von Osteoklasten (176). Es wird von mononuklearen Phagozyten nach der Stimulierung durch TNF- α und IL-1 ausgeschüttet. Der Einfluss der Zytokine im Synovium ist jedoch sehr komplex. Sie lösen auf autokrine und/oder parakrine Weise vielfältige Wirkungen aus, die sich oft überlappen und sogar ergänzen. Die Komplexität ist u.a. einerseits auf das Zusammenspielen der Th1- und Th2-Zytokine zurückzuführen und andererseits auf ihre Wirkung auf die unterschiedlichen im Synovium vorkommenden Zelltypen. Es wurden Antagonisten zu IL-1, nämlich IL-1ra, im gesunden Synovium nachgewiesen, die in gleicher Menge vorliegen wie IL-1. Im RA-Synovium ist dagegen das Verhältnis zu Ungunsten von IL-1ra verschoben. Wie bei IL-1 existiert auch ein Gegenspieler zu TNF- α (löslicher TNF- α R). Neben den pro-inflammatorischen Zytokinen konnten ferner im Synovium anti-inflammatorische Zytokine wie IL-4 und IL-10 nachgewiesen werden (16). IL-4 vermag u. a. die Synthese von IL-1, TNF- α und IL-6 zu verhindern. Darüber hinaus stimuliert es die Synthese von mehreren Zytokininhibitoren wie IL-1ra and TNF-Rezeptoren (177). Diese Beobachtungen deuten auf eine gestörte Balance zwischen Agonisten und Antagonisten im Entzündungsprozess in RA hin (16).

Die Synergie von TNF- α mit IL-1 wurde von Probert et al. beschrieben (178). *In vitro*-Versuche mit TNF- α neutralisierenden Antikörpern zeigten, dass der IL-1 Spiegel in Synovialkulturen von RA-Patienten innerhalb kurzer Zeit abfiel. Ebenso konnte ein Abfall weiterer pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-6 und IL8, sowie GM-CSF beobachtet

werden (179-181). Der destruktive Gelenkprozess bei transgenen Mäusen mit erhöhter TNF- α Aktivität konnte nach Gabe von spezifischen Antikörpern gegen IL-1 zum Stillstand gebracht werden, ohne den TNF- α -Spiegel zu senken (182). Diese Beobachtung verdeutlicht die Komplexität, mit der Zytokine untereinander agieren.

Unsere *in vivo*-Experimente zeigten, dass trotz milderer Erkrankung an CIA die Expression von TNF- α , IL-6 und IL-1 β im Gelenk Fas-mutanter Mäuse am Krankheitsbeginn hochreguliert wurde. Da Makrophagen zu den Hauptproduzenten von Zytokinen gehören, ist es möglich, dass die erhöhte Expression von TNF- α , IL-6 und IL-1 β im Gelenk der Fas-mutanten Mäuse überwiegend auf die Makrophagen zurückzuführen ist. Die Messung von pro-inflammatorischen Zytokinen dient als etablierter Parameter zur Bestimmung von Entzündungsreaktionen. Da das Gelenk ein heterogenes Zellrepertoire aufweist, wurde den Fibroblasten besondere Aufmerksamkeit geschenkt. Synoviale Fibroblasten zeigen in der RA eine starke Proliferation, was darauf hindeutet, dass diese eine Hyperplasie durchmachen, die sich im Zuge der RA-Entstehung vollzieht. In einem *in vitro*-Versuch mit einer Fibroblasten Zell-Linie konnte nachgewiesen werden, dass die Bindung von anti-Fas Antikörper an Fas-exprimierenden NIH3T3-Fibroblasten zur Hochregulation von TNF- α - und IL-6-Genen führte (Abbildung 32). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Fas-Ligation durch den anti-Fas Antikörper zur Aktivierung der Fibroblasten führte.

Das IL-1 β , das ebenfalls in den homozygoten DBA-lpr/lpr-Mäusen am Krankheitsbeginn hochreguliert war, erwies sich in der chronischen Erkrankungsphase bei diesen Mäusen als effizienterer Aktivator für die IL-6 Expression als bei den Kontrollmäusen (142). In dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass die Ligation von Fas durch seine Fas-Liganden in Makrophagen zur verstärkten Aktivierung dieser Zellen führt. Die Aktivierungsinduktion erfolgte dabei über den IL-1R/TLR-4-Weg (142).

Trotz der erhöhten Zytokinexpression am Krankheitsbeginn und der starken Immunantwort bei den Mäusen mit einem Defekt im Fas-Gen verlief die CIA milder als bei den normalen Mäusen mit niedrigerer Zytokinexpression und einer schwächeren Immunantwort. Entgegen der bisherigen Annahmen, wurde in der chronischen Krankheitsphase in den Pfoten der homozygoten DBAlpr/lpr-Mäusen trotz eines mildereren Krankheitsverlaufes ähnlich starke Zytokinexpression nachgewiesen wie bei Kontrollmäusen mit schwerer

Erkrankung. Diese Beobachtung zeigt deutlich, dass über den Fas-Rezeptor ein aktivierendes Signal geleitet wird, das sowohl in der Induktionsphase als auch in der Unterhaltung der Entzündungsreaktion seine Wirkung zeigt. Die Untersuchung dieses „Aktivierungsweges“ ist Gegenstand zukünftiger Forschungsarbeiten.

4.6 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Fas die CIA verstärkt. Dabei konnte aufgezeigt werden, dass die Fas-Expression vor allem im Gelenk, also am Ort der Entzündung, eine kritische Rolle spielt. Anhand des Zytokinprofils in den Mausgelenken sowie anhand von Experimenten mit der Zell-Linie NIH3T3-Fibroblasten wurden Rückschlüsse auf den Einfluss von Fas auf die Entzündungsprozesse gezogen. Es konnte indirekt gezeigt werden, dass über den Fas-Rezeptor ein Signal geleitet wird, das die Fibroblasten stimuliert. Hierbei bedarf es weiterer Untersuchungen u.a. zum aktivierten Zustand der Fibroblasten, zum Beispiel mittels eines Luciferase-Tests. Darüber hinaus sollten Untersuchungen entlang des Apoptose-Wirkungsmechanismus zur Klärung der tatsächlichen Funktion von Fas auf Fibroblasten durchgeführt werden. Von wichtiger Bedeutung sind hier vor allem Versuche mit Primärzellen. Dazu wurden am Institut für Immunologie bereits synoviale Fibroblasten aus Mauspfoten isoliert, die für weitere Experimente verwendet werden sollen.

Über den Fas-Apoptose-Pathway hinaus ist es außerdem von Bedeutung, die Verbindung von Fas/Fas-L zu Toll-like Rezeptoren in synovialen Fibroblasten aufzuzeigen, was die Hypothese der „molekularen Mimikry“ unterstützen würde. In unserer erst kürzlich veröffentlichten Studie haben wir gezeigt, dass in Makrophagen die Fas/Fas-L-Interaktion die Aktivierung durch den IL-1 β /TLR-4 Pathway verstärkt, welcher eine wichtige Rolle in der Pathogenese von CIA bzw. RA spielen könnte (142).

Zum Einfluss von sFas auf die CIA müssten weitere Untersuchungen durchgeführt werden, die im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich waren. Es konnte im Mausmodell CIA kein signifikanter Unterschied im Krankheitsverlauf zwischen der sFas-Transgen und dem Wildtyp gezeigt werden. Dennoch gibt es starke Hinweise für einen wichtigen Betrag von löslichem Fas in der Pathogenese von RA. Es sollte in weiteren Arbeiten gezeigt werden,

welchen Effekt das lösliche Fas in Gelenken ausübt. Eine solche Untersuchung könnte mittels Zytokinexpression und Apoptose-Messung von synovialen Fibroblasten transgener sFas-Mäuse im Vergleich zu Kontrollmäusen erfolgen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist eine häufige chronisch entzündliche Krankheit mit hauptsächlichlicher Gelenkbeteiligung. Über ihre Ätiologie ist bislang viel spekuliert worden, sie liegt aber noch immer im Dunkeln. Die Komplexität der ablaufenden Autoimmunprozesse ist der Hauptgrund dafür. Die potentielle Rolle von CD95 (Fas), einem Zelloberflächenmolekül der Familie der TNF-R, in der Autoimmunität ist seit der Entdeckung der Fas-mutanten *lpr*-Mäuse bzw. Fas-Ligand-mutanten *gld*-Mäuse bekannt. Diese leiden unter Lymphoproliferation und Nephritis, haben ein hohes Vorkommen von Autoantikörpern und anti-DNA-Antikörpern. Fas löst Apoptose (programmierten Zelltod) aus, die für die Entwicklung und Aufrechterhaltung von einzelligen Organismen essentiell ist. Fas hat ebenso eine anti-apoptotische Wirkung. Die Kreuzreaktion mit Fas führt zur Proliferation von SLE T-Zellen. Eine Splicing Form des Fas-Moleküls, das lösliche Fas, wurde in Synovialflüssigkeit von Patienten mit RA entdeckt, dessen Funktion – anti-apoptotisch oder apoptotisch – ebenso noch nicht geklärt ist.

In dieser Arbeit sollte geklärt werden, welche Rolle Fas in der Pathogenese von RA spielt. Als experimentelles System für RA diente das Mausmodell Kollagen II-induzierte Arthritis (CIA). Dazu wurden CIA-suszeptible DBA/1J-Mäuse mit Rinderkollagen Typ II und komplettem Freund's Adjuvans (KFA) immunisiert. Um die Bedeutung von Fas in der Entstehung und im Krankheitsverlauf von CIA zu ermitteln, wurden Mäuse mit einem Defekt im Fas-Gen (*lpr*) verwendet. Der Einfluss von löslichen Fas auf die Suszeptibilität gegenüber RA sollte am Mausmodell CIA in transgenen sFas-Mäusen gezeigt werden. Unter Verwendung der Zell-Linie NIH3T3-Fibroblasten in *in vitro*-Versuchen sollte versucht werden, den Fas-Wirkungsmechanismus im Synovium aufzuzeigen.

Sowohl bei den homozygoten *lpr*-Mäusen als auch bei den heterozygoten *lpr*-Mäusen mit dem CIA-suszeptiblen Hintergrund DBA/1J wurden klinische Symptome der CIA nach der Immunisierung mit Kollagen II und KFA beobachtet. Die Beurteilung der Erkrankung basierte auf klinischen Veränderungen der Mausengelenke. Dazu wurde die Schwere der Krankheitsausprägung in 4 Schweregraden eingestuft.

Wir haben gezeigt, dass Fas die Erkrankung verstärkt, aber für die Induktion von CIA nicht wichtig ist. Die geringere Suszeptibilität gegenüber CIA bei den homozygoten lpr-Mäusen bestätigte sich in der kleineren Inzidenz sowie im niedrigeren durchschnittlichen Score verglichen mit den heterozygoten lpr-Mäusen. Obwohl die homozygoten lpr-Mäuse eine höhere Kollagen II-spezifische Immunantwort als die heterozygoten lpr-Mäuse zeigten, was mittels [³H]-Thymidineinbau und der Freisetzung des pro-inflammatorischen Zytokins Interferon- γ nachgewiesen wurde, war die Erkrankung bei den homozygoten lpr-Mäusen milder. Der drastische Anstieg der DNA-Synthese der stimulierten T-Zellen von homozygoten lpr-Mäusen wurde auf die massive zelluläre Akkumulation in Lymphknoten zurückgeführt, wo aufgrund mangelnden Fas-Moleküls die Eliminierung der potentiellen autoreaktiven Zellen oder der „verbrauchten“ Zellen gestört war. Ferner wurde keine erhöhte Menge an Apoptose-resistenten Gedächtniszellen in Lymphknoten der homozygoten lpr-Mäusen verglichen mit der Menge in den Kontrollmäusen nachgewiesen. Die Kollagen-spezifische B-Zellantwort nach der Immunisierung mit Rinderkollagen Typ II wies dagegen keinen Unterschied zwischen den beiden Gruppen auf, obwohl der Titer bei den lpr-Mäusen vor der Immunisierung signifikant höher war als bei den Kontrollmäusen. Knochen- und Knorpelzerstörung korrelieren mit dem Entzündungsgrad bei beiden Gruppen. Die Messungen der pro-inflammatorischen Zytokine IL1 β , IL-6 und TNF- α in den Mausengelenken der normalen und der Fas-defekten Mäuse am Krankheitsbeginn und in der chronischen Erkrankungsphase zeigten, dass Fas diese Zytokine herunterreguliert. Die Abnahme der Zytokinproduktion hatte entgegen bisherigen Beobachtungen eine verstärkte Ausprägung der CIA zur Folge. Dieses Ergebnis läßt den Schluß zu, dass über die Fas-Rezeptoren der Synoviozyten in einer bisher unbekannt Form eine Aktivierungskaskade ausgelöst wird, was zur Hyperplasie im Gelenk führt. Dabei nehmen die pro-inflammatorischen Zytokine möglicherweise in diesem „Fas-Pathway“ eine minder relevante Rolle ein. Die Fas-exprimierenden Synoviozyten können z.B. synoviale Fibroblasten sein, die an dem Gewebszerstörungsprozess im Gelenk beteiligt sind. *In vitro*-Experimente bestätigten die Blockierung des Zelltodes durch die Behandlung von NIH3T3-Fibroblasten mit anti-Fas Antikörpern. Die mögliche stimulierende Wirkung nach einer Fas/Fas-L-Ligation wurde durch die erhöhte Expression von Zytokinen (TNF- α und IL-6) unterstrichen.

Weiterhin wurde der Einfluss von löslichem Fas auf die Suszeptibilität gegenüber CIA untersucht. Es zeigte sich, dass sFas den Fas-vermittelten Zelltod von Thymuszellen sowie den Aktivierungs-vermittelten Zelltod von Thymuszellen und PMA-aktivierten T-Zellen blockiert. Diese Blockierung führte möglicherweise zur Akkumulation von autoreaktiven Lymphozyten. Dies hatte eine drastische Proliferation sFas-exprimierender T-Zellen zur Folge. Eine anti-apoptische Wirkung durch sFas auf den Fas-induzierten Zelltod in aktivierten T-Zellen konnte nicht gezeigt werden, obwohl eine solche Wirkung von anderen Autoren berichtet wurde. Ein erhöhter Anstieg von Apoptose-resistenten Gedächtniszellen innerhalb der aktivierten sFas-transgenen T-Zellen konnte nicht festgestellt werden. Die Lymphozyten der transgenen sFas-Maus zeigten eine höhere zytotoxische Aktivität als normale Lymphozyten. Nach Immunisierung mit Kollagen II und KFA zeigte sich eine geschlechtsabhängige Suszeptibilität gegenüber CIA. Während weibliche transgene sFas-Mäuse eine mildere Ausprägung der Erkrankung als ihre Kontrollmäuse zeigten, war die Suszeptibilität gegenüber CIA bei den männlichen Mäusen beider Genotypen ähnlich. Auch hier verhielt sich die Entwicklung der Krankheit der transgenen sFas-Mäuse reziprok zur Stärke der Kollagen-spezifischen T-Zell Immunantwort. Der Titer der Kontrollmäuse war leicht höher als der der transgenen sFas-Mäuse nach der Immunisierung.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit kann gefolgert werden, dass Fas in CIA einen stimulierenden Einfluss auf die im Gelenk residierenden Zellen ausübt. Die Unterbindung der Fas/Fas-L-Interaktion führt zur Abnahme der Entzündung im Gelenk, jedoch nicht zur Abnahme der Expression pro-inflammatorischer Zytokine. Dies deutet auf die geringe Effizienz der Aktivierung durch diese Zytokine bei Fas-Mangel hin.

Lösliches Fas blockiert die Interaktion von Fas/Fas-L und könnte somit die Induktion der Apoptose oder die Aktivierung der synovialen Fibroblasten durch Fas unterbinden.

Darüber hinaus gibt es ein empfindliches Gleichgewicht zwischen löslichem und transmembranem Fas und zwischen dem apoptotischen und dem stimulierenden Fas-Pathway. Dessen Regulation könnte wichtig für Autoimmunerkrankungen sein.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Hernandez, J., Aung, S., Redmond, W.L. and Sherman, L.A. 2001. Phenotypic and functional analysis of CD8(+) T cells undergoing peripheral deletion in response to cross-presentation of self-antigen. *Journal of Experimental Medicine* 194:707
2. Theofilopoulos, A.N. 1995. The basis of autoimmunity: Part I . Mechanisms of aberrant self-recognition. *Immunology Today* 16:90
3. Jansson, L., and Holmdahl, R. 1998. Estrogen-mediated immunosuppression in autoimmune diseases. *Inflammation Research* 47:290
4. Spector, T.D., Roman, E., and Silman, A.J. 1990. The pill, parity, and rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 33:782
5. Vandebroek, K., Cunningham, S., Goris, A., Alloza, I., Heggarty, S., Graham, C., Bell, A., and Rooney, M. 2003. Polymorphisms in the interferon-gamma/interleukin-26 gene region contribute to sex bias in susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism* 48:2773
6. Stastny, P. 1978. Association of the B-cell alloantigen DRw4 with rheumatoid arthritis. *New England Journal of Medicine* 298:869
7. Gregersen, P.K., Silver, J., and Winchester, R.J. 1987. The shared epitope hypothesis. *Arthritis & Rheumatism* 30:1205
8. Bernhard, J., and Villiger, P.M. 2001. Rheumatoid Arthritis: Pathogenese und Pathologie. http://www.medicalforum.ch/pdf_d/2001/2001-08/2001-08-264.PDF
9. McDaniel, D., Alarcon, G.S., Pratt, P.W., and Reveille, J.D. 1995. Most African-American patients with rheumatoid arthritis do not have the rheumatoid antigenic determinant (epitope). *Annals of Internal Medicine* 123:181
10. Tokunishi, S., Yamada, R., Chang, X., Suzuki, A., Kochi, Y., Sawada, T., Suzuki, M., Nagasaki, M., Ohtsuki, M., Ono, M., Furukawa, H., Nagashima, M., Yoshino, S., Mabuchi, A., Sekine, A., Saito, S., Takahashi, A., Tsunoda, T., Nakamura, Y., and Yamamoto, K. 2003. An intronic SNP in a RUNX1 binding site of SLC22A4, encoding an organic cation transporter, is associated with rheumatoid arthritis. *Nature Genetics* 35:341
11. Suzuki, A., Yamada, R., Chang, X., Tokunishi, S., Sawada, T., Suzuki, M., Nagasaki, M., Nakayama-Hamada, M., Kawaida, R., Ono, M., Ohtsuki, M., Furukawa, H., Yoshino, S., Yukioka, M., Tohma, S., Matsubara, T., Wakitani, S., Teshima, R., Nishioka, Y., Sekine, A., Iida, A., Takahashi, A., Tsunoda, T., Nakamura, Y., and Yamamoto, K. 2003. Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. *Nature Genetics* 34:395
12. Steinman, L. 1997. Autoimmunerkrankungen. In *Spektrum der Wissenschaft, Spezial: Das Immunsystem*, Vol. 2, p. 60
13. Neidhart, M., Rethage, J., Kuchen, S., Kunzler, P., Crowl, R.M., Billingham, M.E., Gay, R.E., and Gay, S. 2000. Retrotransposable L1 elements expressed in rheumatoid arthritis synovial tissue: association with genomic DNA hypomethylation and influence on gene expression. *Arthritis & Rheumatism* 43:2634
14. Muller-Ladner, U., Gay, R.E., and Gay, S. 1998. Retroviral sequences in rheumatoid arthritis synovium. *International Reviews of Immunology* 17:273

15. Qu, Z., Garcia, C.H., O'Rourke, L.M., Planck, S.R., Kohli, M., and Rosenbaum, J.T. 1994. Local proliferation of fibroblast-like synoviocytes contributes to synovial hyperplasia. Results of proliferating cell nuclear antigen/cyclin, c-myc, and nucleolar organizer region staining. *Arthritis & Rheumatism* 37:212
16. Cunnane, G., Hummel, K.M., Muller-Ladner, U., Gay, R.E., and Gay, S. 1998. Mechanism of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 46:1
17. Firestein, G. 1996. Invasive fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. Passive responders or transformed aggressors? *Arthritis & Rheumatism* 39:1781
18. Ridley, M.G., Kingsley, G., Pitzalis, C., and Panayi, G.S. 1990. Monocyte activation in rheumatoid arthritis: evidence for in situ activation and differentiation in joints. *British Journal of Rheumatology* 29:84
19. Frucht, D.M., Aringer, M., Galon, J., Danning, C., Brown, M., Fan, S., Centola, M., Wu, C.Y., Yamada, N., El Gabalawy, H., and O'Shea, J.J. 2000. Stat4 is expressed in activated peripheral blood monocytes, dendritic cells, and macrophages at sites of Th1-mediated inflammation. *Journal of Immunology* 164:4659
20. Hasunuma, T., Kato, T., Kobata, T., and Nishioka, K. 1998. Molecular mechanism of immune response, synovial proliferation and apoptosis in rheumatoid arthritis. *Springer Seminars in Immunopathology* 20:41
21. Black, A., Bhayani, H., Ryder, C.A., Gardner-Medwin, J.M., and Southwood, TR. 2002. T-cell activation without proliferation in juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Research* 4:177
22. Afeltra, A., Galeazzi, M., Ferri, G.M., Amoroso, A., De Pita, O., Porzio, F., and Bonomo, L. 1993. Expression of CD69 antigen on synovial fluid T cells in patients with rheumatoid arthritis and other chronic synovitis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 52:457
23. Firestein, G.S., Alvaro-Gracia, J.M., and Maki, R. 1990. Quantitative analysis of cytokine gene expression in rheumatoid arthritis. *Journal of Immunology* 144:3347
24. Asahara, H., Hasunuma, T., Kobata, T., Inoue, H., Muller-Ladner, U., Gay, S., Sumida, T., and Nishioka, K. 1997. In situ expression of protooncogenes and Fas/Fas ligand in rheumatoid arthritis synovium. *Journal of Rheumatology* 24:430
25. Sugiyama, M., Tsukazaki, T., Yonekura, A., Matsuzaki, S., Yamashita, S., and Iwasaki, K. 1996. Localisation of apoptosis and expression of apoptosis related proteins in the synovium of patients with rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 55:442
26. Hoa, T., Hasunuma, T., Aono, H., Masuko, K., Kobata, T., Yamamoto, K., Sumida, T., and Nishioka, K. 1996. Novel mechanisms of selective apoptosis in synovial T cells of patients with rheumatoid arthritis. *Journal of Rheumatology* 23:1332
27. Salmon, M., Scheel-Toellner, D., Huissoon, A.P., Pilling, D., Shamsadeen, N., Hyde, H., D'Angeac, A.D., Bacon, P.A., Emery, P., and Akbar, A.N. 1997. Inhibition of T cell apoptosis in the rheumatoid synovium. *Journal of Clinical Investigation* 99:439
28. Cantwell, M., Hua, T., Zvaifler, N.J., and Kipps, T.J. 1997. Deficient Fas ligand expression by synovial lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 40:1644
29. Hasunuma, T., Hoa, T.T., Aono, H., Asahara, H., Yonehara, S., Yamamoto, K., Sumida, T., Gay, S., and Nishioka, K. 1996. Induction of Fas-dependent apoptosis

- in synovial infiltrating cells in rheumatoid arthritis. *International Immunology* 8:1595
30. Sumida, T., Hasunuma, T., Asahara, H., Meada, T., and Nishioka, K. 1998. Rheumatoid Arthritis and Apoptosis. *Internal Medicine* 37:184
 31. Trentham, D.E., Townes, A.S., and Kang, A.H. 1977. Autoimmunity to type 2 collagen: an experimental model of arthritis. *Journal of Experimental Medicine* 146:857
 32. Courtenay, J.S., Dallmann, M.J., Dayan, A.D., Martin, A., and Mosedale, B. 1980. Immunisation against heterologous type II collagen induces arthritis in mice. *Nature* 283:666
 33. Cathcart, E.S., Hayes, K.C., Gonnerman, W.A, Lazzari, A.A., and Franzblau, C. 1986. Experimental arthritis in a nonhuman primate. I. Induction by bovine type II collagen. *Laboratory Investigation* 54:26
 34. 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. *Journal of Experimental Medicine* 154:688
 35. Holmdahl, R., Jansson, L., Gullberg, D., Rubin, K., Forsberg, P.O., and Klareskog, L. 1985. Incidence of arthritis and autoreactivity of anti-collagen antibodies after immunization of DBA/1 mice with heterologous and autologous collagen II. *Clinical and Experimental Immunology* 62:639
 36. Jansson, L., and Holmdahl, R. 1989. Oestrogen induced suppression of collagen arthritis. IV: Progesterone alone does not affect the course of arthritis but enhances the oestrogen-mediated therapeutic effect. *Journal of Reproductive Immunology* 15:141
 37. Holmdahl, R., Jansson, L., Andersson, M., and Jonsson, R. 1992. Genetic, hormonal and behavioural influence on spontaneously developing arthritis in normal mice. *Clinical and Experimental Immunology* 88:467
 38. Holmdahl, R., Jansson, L., and Anderson, M. 1986. Female sex hormones suppress development of collagen-induced arthritis in mice. *Arthritis & Rheumatism* 29:1501
 39. Wooley, P.H., Dillon, A.M., Luthra H.S., 1983. Genetic control of type II collagen-induced arthritis in mice. Factors influencing disease susceptibility and evidence for multiple MHC-associated gene control. *Transplantation Proceedings* 15:180
 40. Brand, D.D., Kang, A.H., and Rosloniec, E.F. 2003. Immunopathogenesis of Collagen-induced arthritis. *Springer Seminars in Immunopathology* 25:3
 41. Guedez, Y.B., Whittington, K.B., Clayton, J.I., Joosten, L.A., van de Loo F.A., van den Berg, W.B., and Rosloniec, E.F. 2001. Genetic ablation of interferon-gamma up-regulates interleukin-1beta expression and enables the elicitation of collagen-induced arthritis in a nonsusceptible mouse strain. *Arthritis & Rheumatism* 44:2413
 42. Campbell, I.K., Hamilton, J.A., and Wicks, I.P. 2000. Collagen-induced arthritis in C57BL/6 (H-2^b) Mice: new insights into an important disease model of rheumatoid arthritis. *European Journal of Immunology* 30:1568
 43. Backlund, J., Nandakumar, K.S., Bockermann, R., Mori, L., and Holmdahl R. 2003. Genetic control of tolerance to type II collagen and development of arthritis in an autologous collagen-induced arthritis model. *Journal of Immunology* 171:3493
 44. McIndoe, R., Bohlman, B., Chi, E., Schuster, E., Lindhardt, M., and Hood, L. 1999. Localization of non-Mhc collagen-induced arthritis susceptibility loci in DBA/1j

- mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:2210
45. Corthay, A., Johansson, A., Vestberg, M., and Holmdahl, R. 1999. Collagen-induced arthritis development requires alpha beta T cells but not gamma delta T cells: studies with T cell-deficient (TCR mutant) mice. *International Immunology* 11:1065
 46. Maeda, T., Saikawa, I., Hotokebuchi, T., Sugioka, Y., Eto, M., Murakami, Y., and Nomoto, K. 1994. Exacerbation of established collagen-induced arthritis in mice treated with an anti-T cell receptor antibody. *Arthritis & Rheumatism* 37:406
 47. Moder, K., Luthra, H.S., Kubo, R., Griffiths, M., and David, C.S. 1992. Prevention of collagen induced arthritis in mice by treatment with an antibody directed against the T cell receptor alpha beta framework. *Autoimmunity* 11:219
 48. Kadowaki, K., Matsuno, H., Tsuji, H., and Tunru, I. 1994. CD4+ T cells from collagen-induced arthritic mice are essential to transfer arthritis into severe combined immunodeficient mice. *Clinical and Experimental Immunology* 97:212
 49. Svensson, L., Jirholt, J., Holmdahl, R., and Jansson, L. 1998. B cell-deficient mice do not develop type II collagen-induced arthritis (CIA). *Clinical and Experimental Immunology* 111:521
 50. Stoop, R., Kotani, H., McNeish, J.D., Otterness, I.G., and Mikecz K. 2001. Increased resistance to collagen-induced arthritis in CD44-deficient DBA/1 mice. *Arthritis & Rheumatism* 44:2922
 51. Taneja, V., Taneja, N., Paisansinsup, T., Behrens, M., Griffiths, M., Luthra, H., and David, CS. 2002. CD4 and CD8 T cells in susceptibility/protection to collagen-induced arthritis in HLA-DQ8-transgenic mice: implications for rheumatoid arthritis. *Journal of Immunology* 168:5867
 52. Ehinger, M., Vestberg, M., Johansson, AC., Johannesson, M., Svensson, A., and Holmdahl, R. 2001. Influence of CD4 or CD8 deficiency on collagen-induced arthritis. *Immunology* 103:281
 53. Tada, Y., Ho, A., Koh, DR., and Mak, TW. 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. *Journal of Immunology* 156:4520
 54. Plows, D., Kontogeorgos, G., and Kollias, G. 1999. Mice Lacking Mature T and B Lymphocytes Develop Arthritic Lesions after Immunization with Type II Collagen. *Journal of Immunology* 162:1018
 55. Holmdahl, M., Vestberg, M., and Holmdahl, R. 2002. Primed B Cells Present Type-II Collagen to T Cells. *Scandinavian Journal of Immunology* 55:382
 56. Brand, D.D., Marion, T.N., Myers, L.K., Rosloniec, E.F., Watson, W.C., Stuart, J.M., and Kang, A.H. 1996. Autoantibodies to murine type II collagen in collagen-induced arthritis: a comparison of susceptible and nonsusceptible strains. *Journal of Immunology* 157:5178
 57. Watson, W.C., and Townes, A.S. 1985. Genetic susceptibility to murine collagen II autoimmune arthritis. Proposed relationship to the IgG2 autoantibody subclass response, complement C5, major histocompatibility complex (MHC) and non-MHC loci. *Journal of Experimental Medicine* 162:1878
 58. Wang, Y., Kristan, J., Hao, L., Lenkoski, C.S., Shen, Y., and Matis, L.A. 2000. A role for complement in antibody-mediated inflammation: C5-deficient DBA/1 mice are resistant to collagen-induced arthritis. *Journal of Immunology* 164:4340

59. Luross, J.A., and Williams, N.A. 2001. The genetic and immunopathological processes underlying collagen-induced arthritis. *Immunology* 103:407
60. 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. *Journal of Experimental Medicine* 187:461
61. Müssener, A., Litton, M.J., Lindroos, E., and Klareskog, L. 1997. Cytokine production in synovial tissue of mice with collagen-induced arthritis (CIA). *Clinical and Experimental Immunology* 107:485
62. Stasiuk, L.M., Abehsira-Amar, O., and Fournier, C. 1996. Collagen-induced arthritis in DBA/1 mice: Cytokine gene activation following immunization with type II collagen. *Cellular Immunology* 173:269
63. Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* 26:239
64. Thompson, C.B. 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267:1456
65. Green, D.R., and Scott, D.W. 1994. Activation-induced apoptosis in lymphocytes. *Current Opinion in Immunology* 6:476
66. Nagata, S., and Golstein, P. 1995. The Fas death factor. *Science* 267:1449
67. Kägi, D., Vignaux, F., Ledermann, B., Bürki, K., Depraetere, V., Nagata, S., Hengartner, H., and Golstein, P. 1994. Fas and Perforin Pathways as Major Mechanisms of T Cell-Mediated Cytotoxicity. *Science* 265:528
68. Lowin, B., Hahne, M., Mattmann, C., and Tschopp, J. 1994. Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin and Fas lytic pathway. *Nature* 370:650
69. Russell, J.H., and Ley T.J. 2002. Lymphocyte-mediated Cytotoxicity. *Annual Review of Immunology* 20:323
70. Hengartner, M.O., and Horvitz, H.R. 1994. Programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Current Opinion in Genetics & Development* 4:581
71. Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Lane, B.R., Dixit, V.M. 1997. Interaction of CED-4 with CED-3 and CED-9: a molecular framework for cell death. *Science* 275:1122
72. Hengartner, M., and Horvitz, H.R. 1994. *C. elegans* cell survival gene *ced-9* encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene *bcl-2*. *Cell* 76:665
73. Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H.M., and Horvitz, H.R. 1993. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* 75:641
74. Zou, H., Henzel, W.J., Liu, X., Lutschg, A., Wang, X. 1997. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90:389
75. Tsujimoto, Y., Finger, L.R., Yunis, J., Nowell, P.C., Croce, C.M. 1984. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* 226:1097
76. Peter, M.E., Heufelder, A.E., Hengartner, M.O. 1997. Advances in apoptosis research. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:12736

-
77. Han, Z., Hendrickson, E.A., Bremner, T.A., Wyche, J.H. 1997. A sequential two-step mechanism for the production of the mature p17:p12 form of caspase-3 in vitro. *Journal of Biological Chemistry* 272:13432
 78. Alnemri, E.S. 1997. Mammalian cell death proteases: a family of highly conserved aspartate specific cysteine proteases. *Journal of Cellular Biochemistry* 64:33
 79. Slee, E.A., Harte, M.T., Kluck, R.M., Wolf, B.B., Casiano, C.A., Newmeyer, D.D., Wang, H.G., Reed, J.C., Nicholson, D.W., Alnemri, E.S., Green, D.R., Martin, S.J. 1999. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *Journal of Cellular Biochemistry* 144:281
 80. Janicke, R.U., Ng, P., Sprengart, M.L., Porter, A.G. 1998. Caspase-3 is required for -fodrin cleavage but dispensable for cleavage of other death substrates in apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 273:15540
 81. Kothakota, S., Azuma, T., Reinhard, C., Klippel, A., Tang, J., Chu, K., McGarry, T.J., Kirschner, M.W., Kohts, K., Kwiatkowski, D.J., Williams, L.T. 1997. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* 278:294
 82. Rudel, T., and Bokoch, G.M. 1997. Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2. *Science* 276:1571
 83. Wen, L.P., Fahrni, J.A., Troie, S., Guan, J.L., Orth, K., Rosen, G.D. 1997. Cleavage of focal adhesion kinase by caspases during apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 272:26056
 84. Liu, X., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X. 1997. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 89:175
 85. Cryns, V., Bergeron, L., Zhu, H., Li, H., and Yuan, J. 1996. Specific cleavage of alpha-fodrin during Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis is mediated by an interleukin-1beta-converting enzyme/Ced-3 protease distinct from the poly(ADP-ribose) polymerase protease. *Journal of Biological Chemistry* 271:31277
 86. Fernandes-Alnemri, T., Litwack, G., and Alnemri, E. S. 1995. Mch2, a new member of the apoptotic Ced-3/Ice cysteine protease gene family. *Cancer Research* 55:2737
 87. Lippke, J.A., Gu, Y., Sarnecki, C., Caron, P.R., and Su, M.S.S. 1996. Identification and Characterization of CPP32/Mch2 Homolog 1, a Novel Cysteine Protease Similar to CPP32. *Journal of Biological Chemistry* 271:1825
 88. Ashkenazi, A., and Dixit, V.M. 1999. Apoptosis control by death and decoy receptors. *Current Opinion in Cellular Biology* 11:255
 89. Baker, S., and Reddy, E.P. 1996. Transducers of life and death: TNF receptor superfamily and associated proteins. *Oncogene* 12:1
 90. Beyaert, R., Van Loo, G., Heyninck, K., and Vandenabeele, P. 2002. Signaling to Gene Activation and Cell Death by Tumor Necrosis Factor Receptors and Fas. In *International Review of Cytology, A Survey of Cell Biology*, Vol. 214. K. W. Jeon, ed. Academy Press: 225
 91. Krammer, P.H. 2000. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407:789

92. Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P.H., Peter, M.E. 1995. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO Journal* 14:5579
93. Muzio, M., Chinnaiyan, A.M., Kischkel, F.C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J.D., Zhang, M., Gentz, R., Mann, M., Krammer, P.H., Peter, M.E., Dixit, V.M. 1996. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death--inducing signaling complex. *Cell* 85:817
94. Hengartner, M.O. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407:770
95. Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K.M., Krammer, P.H., Peter, M.E. 1998. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO Journal* 17:1675
96. Smith, C.A., Farrah, T., and Goodwin, R.G. 1994. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* 76:959
97. Nagata, S. 1998. Human autoimmune lymphoproliferative syndrome, a defect in the apoptosis-inducing Fas receptor: A lesson from the mouse model. *Journal of Human Genetics* 43:2
98. Krammer, P.H. 1997. Apoptose. *Deutsches Ärzteblatt* 25
99. Ogasawara, J., Suda, T., and Nagata, S. 1995. Selective apoptosis of CD4⁺CD8⁺ Thymocytes by the anti-Fas antibody. *Journal of Experimental Medicine* 181:485
100. Nishimura, Y., Ishii, A., Kobayashi, Y., Yamasaki, Y., and Yonehara, S. 1995. Expression and function of mouse Fas antigen on immature and mature T cells. *Journal of Immunology* 154:4395
101. Watanabe, T., Sakai, Y., Miyawaki, S., Shimizu, A., Koiwai, O., and Ohno, K. 1991. A molecular genetic linkage map of mouse chromosome 19, including the lpr, Ly-44, and Tdt genes. *Biochemical Genetics* 29:325
102. Roths, J., Murphy, E.D., and Eicher, E.M. 1984. A new mutation, gld, that produces lymphoproliferation and autoimmunity in C3H/HeJ mice. *Journal of Experimental Medicine* 159:1
103. Watanabe-Fukunaga, R., Brannan, C.I., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., and Nagata, S. 1992. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 356:314
104. Takahashi, T., Tanaka, M., Brannan, C.I., Jenkins, N.A., and Nagata, S. 1994. Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell* 76:969
105. Cascino, I., Fiucci, G., Papoff, G., and Ruberti, G. 1995. Three functional soluble forms of the human apoptosis-inducing Fas molecule are produced by alternative splicing. *Journal of Immunology* 154:2706
106. Kayagaki, N., Kawasaki, A., Ebata, T., Ohmoto, H., Ikeda, S., Inoue, S., Yoshino, K., Okumura K., and Yagita, H. 1995. Metalloproteinase-mediated Release of Human Fas Ligand. *Journal of Experimental Medicine* 182:1777
107. Nozawa, K., Kayagaki, N., Tokano, Y., Yagita, H., Okumura, K., and Hasimoto, H. 1997. Soluble Fas (APO-1, CD95) and soluble Fas Ligand in rheumatic diseases. *Arthritis & Rheumatism* 40:1126
108. Goodwin, R.G., Friend, D., Ziegler, S.F., Jerzy, R., Falk, B.A., Gimpel, S., Cosman, D., Dower, S.K., March, C.J., Namen, A.E., and Park, L.S. 1990. Cloning

- of the human and murine interleukin 7 receptors: demonstration of a soluble form and homology to a new receptor superfamily. *Cell* 60:941
109. Mosley, B., Beckmann, M.P., March, C.J., Idzerda, R.L., Gimpel, S.D., VandenBos, T., Friend, D., Alpert, A., Anderson, D., Jackson, J., Wignall, J.M., Smith, C., Gallis, B., Sims, J.E., Urdal, D., Widmer, M.B., Cosman, D., and Park, L.S. 1989. The murine interleukin-4 receptor molecular cloning and characterization of secreted and membrane bound forms. *Cell* 59:335
 110. Josimovic-Alasevic, O., Herrmann, T., and Diamastein, T. 1988. Demonstration of two distinct forms of released low-affinity type interleukin 2 receptors. *European Journal of Immunology* 18:1855
 111. Rubin, L.A., Kurman, C.C., Fritz, M.E., Biddison, W.E., Bantin, B., Yarchoan, R., and Nelson, D.L. 1985. Soluble interleukin-2 receptors are released from activated human lymphoid cells in vitro. *Journal of Immunology* 135:3172
 112. Tanaka, M., Suda, T., Takahashi, T., Nagata, S. 1995. Expression of the functional soluble form of human fas ligand in activated lymphocytes. *EMBO Journal* 14:1129
 113. Nishioka, K., Hasunuma, T., Kato, T., Sumida, T., and Kobata, T. 1998. Apoptosis in rheumatoid arthritis: a novel pathway in the regulation of synovial tissue. *Arthritis & Rheumatism* 41:1
 114. Hasunuma, T., Hoa, T.T.M., Aono, H., Asahara, H., Yonehara, S., Yamamoto, K., Sumida, T., Gay, S., and Nishioka, K. 1996. Induction of Fas-dependent apoptosis in synovial infiltrating cells in rheumatoid arthritis. *International Immunology* 8:1595
 115. Catrina, A.I., Ulfgren, A.K., Lindblad, S., Grondal, L., and Klareskog, L. 2002. Low levels of apoptosis and high FLIP expression in early rheumatoid arthritis synovium. *Annals of the Rheumatic Diseases* 61:934
 116. Firestein, G.S., Yeo, M., and Zvaifler, N.J. 1995. Apoptosis in rheumatoid arthritis synovium. *Journal of Clinical Investigation* 96:1631
 117. Zhou, T., Bluethmann, H., Eldridge, J., Berry, K., and Mountz, J.D. 1993. Origin of CD4⁺CD8⁻B220⁺ T cells in MRL-lpr/lpr mice. Clues from a T cell receptor β transgenic mouse. *Journal of Immunology* 150:3651
 118. Theofilopoulos, A.N., and Dixon, F.J. 1985. Murine models of systemic lupus erythematosus. *Advanced Immunology* 37:269
 119. Hang, L., Theofilopoulos, A.N., and Dixon, F.J. 1982. A spontaneous rheumatoid arthritis-like disease in MRL/1 mice. *Journal of Experimental Medicine* 155:1690
 120. Cohen, P.L., and Eisenberg, R.A. 1991. Lpr and gld: Single Gene Models of Systemic Autoimmunity and Lymphoproliferative Disease. *Annual Review of Immunology* 9:243
 121. Waldner, H., Sobel, R.A., Howard, E., and Kuchroo, V.K. 1997. Fas- and Fas-L-deficient mice are resistant to induction of Autoimmune Encephalomyelitis. *Journal of Immunology* 159:3100
 122. Sabelko, K.A., Kelly, K.A., Nahm, M.H., Cross, A.H., and Russell, J.H. 1997. Fas and Fas Ligand enhanced the pathogenesis of Experimental Allergic Encephalomyelitis, but are not essential for immune privilege in the central nervous system. *Journal of Immunology* 159:3096
 123. Quallet, J.C., Baumann, N., Marie, Y., and Villarroya, H. 1999. Fas system up-regulation in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of the Neurological Sciences* 170:96

124. Okuda, Y., Bernard, C.C.A., Fujimura, H., Yanagihara, T., and Sakoda, S. 1998. Fas has a crucial role in the progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Molecular Immunology* 35:317
125. Sakata, K.M., Sakata, A., Vela-Roch, N., Espinosa, R., Escalante, A., Kong, L., Nakabayashi, T., Cheng, J., Talal, N., and Dang, H. 1998. Fas (CD95)-transduced signal preferentially stimulates lupus peripheral T lymphocytes. *European Journal of Immunology* 28:2648
126. Alderson, M.R., Armitage, R.J., Maraskovsky, E., Tough, T.W., Roux, E., Schooley, K., Ramsdell, F., and Lynch, D.H. 1993. Fas transduces activation signals in normal human T lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine* 178:2231
127. Alderson, M.R., Tough, T.W., Braddy, S., Davis-Smith, T., Roux, E., Schooley, K., Miller, R.E., and Lynch, D.H. 1994. Regulation of apoptosis and T cell activation by Fas-specific mAb. *International Immunology* 6:1799
128. Freiberg, R.A., Spencer, D.M., Choate, K.A., Duh, H.J., Schreiber, S.L., Crabtree, G.R., and Khavari, P.A. 1997. Fas signal transduction triggers either proliferation or apoptosis in human fibroblasts. *Journal of Investigative Dermatology* 108:215
129. Mapara, M.Y., Bargou, R., Zugck, C., Döhner, H., Ustaoglu, F., Jonker, R.R., Krammer, P.H., and Dörken, B. 1993. APO-1-mediated apoptosis or proliferation in human chronic B lymphocytic leukemia: correlation with bcl-2 oncogene expression. *European Journal of Immunology* 23:702
130. Cheng, J., Zhou, T., Liu, C., Shapiro, J.P., Brauer, M.J., Kiefer, M.C., Barr, P.J., Mountz, J.D. 1994. Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science* 263:1759
131. Jodo, S., Kobayashi, S., Kayagaki, N., Ogura, N., Feng, Y., Amasaki, Y., Fujisaku, A., Azuma, A., Yagita, H., Okumura, K., and Koike, T. 1997. Serum levels of soluble Fas/APO-1 (CD95) and its molecular structure in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and other autoimmune diseases. *Clinical and Experimental Immunology* 107:89
132. Hashimoto, H., Tanaka, M., Suda, T., Tomita, T., Hayashida, K., Takeuchi, E., Kaneko, M., Takano, H., Nagata, S., and Ochi, T. 1998. Soluble Fas Ligand in the Joints of Patients with Rheumatoid Arthritis and Osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism* 41:657
133. Hasunuma, T., Kayagaki, N., Asahara, H., Motokawa, S., Kobata, T., Yagita, H., Aono, H., Sumida, T., Okumura, K., and Nishioka, K. 1997. Accumulation of soluble Fas in inflamed joints of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 40:80
134. Matsuki, Y., Li, L., Hsu, H.C., Yang, P.A., Zheng, R., Edwards III, C.K., Chaudry, I.H., Zhang, H.G., and Mountz, J.D. 2002. Soluble Fas gene therapy protects against Fas-mediated apoptosis of hepatocytes but not the lethal effects of Fas-induced TNF-alpha production by Kupffer cells. *Cell Death and Differentiation* 9:626
135. Saha, B. K. 1996. Typing of murine major histocompatibility complex with a microsatellite in class II Eb gene. *Journal of Immunological Methods* 194:77
136. Yang, H., Jirholt, J., Svensson, L., Sundvall, M., Jansson, L., Pettersson, U., and Holmdahl, R. 1999. Identification of genes controlling collagen-induced arthritis in mice: striking homology with susceptibility loci previously identified in the rat. *Journal of Immunology* 163:2916

137. Holmdahl, R., Jansson, L., Larsson, A., Jonsson, R. 1990. Arthritis in DBA/1 mice induced with passively transferred type II collagen immune serum. *Scandinavian Journal of Immunology* 31:147
138. Verhaegen, S., Coyle, S., Connolly, L.M., O'Loughlin, C., and Clynes, M. 1998. Analysis of Cell Cycle and Cell Death Mechanisms. In *Animal Cell Culture Techniques*. M. Clynes, ed. Springer Lab Manual, Berlin Heidelberg New York, p. 170
139. Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., and Reutelingsperger, C. 1995. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *Journal of Immunological Methods* 184:39
140. Dhein, J., Walczak, H., Baumler, C., Debatin, K.M., and Krammer, P.H. 1995. Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). *Nature* 373:438
141. Singer, P.A., and Theofilopoulos A. N. 1990. Novel Origin of lpr and gld Cells and Possible Implications in Autoimmunity. *Journal of Autoimmunity* 3:123
142. Ma, Y., Liu, H., Tu-Rapp, H., Thiesen, H.J., Ibrahim, S.M., Cole, S.M., Zander, C.J., Perlman, H., and Pope, R.M. 2004. Fas ligation on macrophages enhances IL-1R1/Toll-Like Receptor 4 signalling and promotes chronic inflammation. *Nature Immunology* 5:380
143. Mountz, J.D., Zhou, T., Eldridge, J., Berry, K., and Blüthmann, H. 1990. Transgenic rearranged T cell receptor gene inhibits lymphadenopathy and accumulation of CD4⁺CD8⁻B220⁺ T cells in lpr/lpr Mice. *Journal of Experimental Medicine* 172:1805
144. Kikkawa, U., and Nishizuka, Y. 1986. The role of protein kinase C in transmembrane signalling. *Annual Review of Cellular Biology* 2:149
145. Janeway, C. A., und Travers, P. 1997. *Immunologie, 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford: 213*
146. Wu, J., Zhou, T., Zhang, J., He, J., Gause, W.C., and Mountz, J.D. 1994. Correction of accelerated autoimmune disease by early replacement of the mutated lpr gene with the normal Fas apoptosis gene in the T cells of transgenic MRL-lpr / lpr mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91:2344
147. Drappa, J., Brot, N., and Elkon, K.B. 1993. The Fas protein is expressed at high levels on CD4⁺CD8⁺ thymocytes and activated mature lymphocytes in normal mice but not in the lupus-prone strain, MRL lpr/lpr. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90:10340
148. Takashi, S., Tanaka, M., Miwa, K., and Nagata, S. 1996. Apoptosis of Mouse Naive T Cells Induced by Recombinant Soluble Ligand and Activation-Induced Resistance of Fas Ligand. *Journal of Immunology* 157:3918
149. Desbarats, J., Wade, T., Wade, W.F., and Newell, M.K. 1999. Dichotomy between naive and memory CD4⁺ T cell responses to Fas engagement. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:8104
150. Desbarats, J., Duke, R.C., and Newell, M.K. 1998. Newly discovered role for Fas ligand in the cell-cycle arrest of CD4⁺ T cells. *Nature Medicine* 4:1377
151. Suzuki, I., and Fink, P.J. 1998. Maximal proliferation of cytotoxic T lymphocytes requires reverse signalling through Fas ligand. *Journal of Experimental Medicine* 187:123

152. Newell, M.K., and Desbarats, J. 1999. Fas ligand: receptor or ligand? *Apoptosis* 4:311
153. Proussakova, O.V., Rabaya, N.A., Moshnikova, A.B., Telegina, E.S., Turanov, A., Nanazashvili, M.G., and Beletsky, I.P. 2003. Oligomerization of soluble Fas-antigen induces its cytotoxicity. *Journal of Biological Chemistry* 278:36236
154. Mauri, C., Williams, R.O., Walmsley, M., and Feldmann, M. 1996. Relationship between Th1/Th2 cytokine patterns and the arthritogenic response in collagen-induced arthritis. *European Journal of Immunology* 26:1511
155. Johansson, A., Vestberg, M., and Holmdahl, R. 2000. Non-major histocompatibility complex dependent variations in lymphocyte activity between inbred mouse strains susceptible to various autoimmune diseases. *Scandinavian Journal of Immunology* 52:21
156. Bouneaud, C., Kourilsky, P., and Bousso, P. 2000. Impact of negative selection on the T cell repertoire reactive to a self-peptide: a large fraction of T cell clones escape clonal deletion. *Immunity* 13:829
157. Anderson, A.C., Nicolson, L.B., Legge, K.L., Turchin, V., Zaghoulani, H., and Kuchroo, V.K. 2000. High frequency of autoreactive myelin proteolipid protein-specific T cells in the periphery of naive mice: mechanism of selection of the self-reactive repertoire. *Journal of Experimental Medicine* 191:761
158. Yan, J., and Mamula, J. 2002. Autoreactive T cells revealed in the normal repertoire: escape from negative selection and peripheral tolerance. *Journal of Immunology* 168:3188
159. Davidson, W.F., Calkins, C., Hügin, A., Giese, T., and Holmes, K.L. 1991. Cytokine secretion by CH3-lpr and -gld T cells. *Journal of Immunology* 146:4138
160. Andrews, B.S., Eisenberg, R.A., Theofilopoulos, A.N., Izui, S., Wilson, C.B., McConahey, P.J., Murphy, E.D., Roths, J.B., and Dixon, F.J. 1978. Spontaneous murine lupus-like syndromes. Clinical and immunopathological manifestation in several strains. *Journal of Experimental Medicine* 148:1198
161. Goronzy, J.J., and Weyand, C.M. 1995. T and B cell-dependent pathways in rheumatoid arthritis. *Current Opinion in Rheumatology* 7:214
162. Matsumoto, S., Mueller-Ladner, U., Gay, R.E., Nishioka, K., and Gay, S. 1996. Ultrastructural demonstration of apoptosis, fas and bcl-2 expression of rheumatoid synovial fibroblasts. *Journal of Rheumatology* 23:1345
163. Kawakami, A., Eguchi, K., Matsuoka, N., Tsuboi, M., Kawabe, Y., Aoyagi, T., and Nagataki, S. 1996. Inhibition of Fas antigen-mediated apoptosis of rheumatoid synovial cells in vitro by transforming growth factor beta 1. *Arthritis & Rheumatism* 39:1267
164. Nakajima, T., Aono, H., Hasunuma, T., Yamamoto, K., Shirai, T., Hirohata, K., and Nishioka, K. 1995. Apoptosis and functional Fas antigen in rheumatoid arthritis synoviocytes. *Arthritis & Rheumatism* 38:485.
165. Tsuboi, M., Eguchi, K., Kawakami, A., Matsuoka, N., Kawabe, Y., Aoyagi, T., Maeda, K., and Nagataki, S. 1996. Fas antigen expression on synovial cells was down-regulated by interleukin-1 beta. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 218:280
166. Mountz, J.D., and Zhang, H.G. 2001. Regulation of apoptosis of synovial fibroblasts. *Current Direction in Autoimmunity* 3:216

167. Chou, C.T., Yang, J.S., and Lee, M.R. 2001. Apoptosis in rheumatoid arthritis-expression of Fas, Fas-L, p53, and Bcl-2 in rheumatoid synovial tissues. *Journal of Pathology* 193:110
168. Owen-Schaub, L.B., Radinsky, R., Kruzel, E., Berry, K., and Yonehara, S. 1994. Anti-Fas on nonhematopoietic tumors: levels of Fas/APO-1 and bcl-2 are not predictive of biological responsiveness. *Cancer Research* 54:1580
169. Steiner, G., Tohidast-Akrad, Witzmann, G., Vesely, M., Studnicka-Benke, A., Gal, A., Kunaver, M., Zenz, P., and Smolen, J.S. 1999. Cytokine production by synovial T cells in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 38:202
170. Brennan, F.M., Field, M., Chu, C.Q., Feldmann, M., and Maini, R.N. 1991. Cytokine expression in rheumatoid arthritis. *British Journal of Rheumatology* 30
171. Fenner, H. 1995. TNF inhibitors: a new therapeutic perspective in chronic inflammatory diseases in rheumatology? *Zeitschrift für Rheumatologie* 54:158
172. Klareskog, L., and McDevitt, H.O. 1999. Rheumatoid arthritis and its animal models: the role of TNF-alpha and the possible absence of specific immune responses. *Current Opinion in Immunology* 11:657
173. Hom, J.T., Bendele, A.M., and Carlson, D.G. 1988. In vivo administration with IL-1 accelerates the development of collagen-induced arthritis in mice. *Journal of Immunology* 141:834
174. Romano, M., Sironi, M., Toniatti, C., Polentarutti, N., Fruscella, P., Ghezzi, P., Faggioni, R., Luini, W., van Hinsbergh, V., Sozzani, S., Bussolino, F., Poli, V., Ciliberto, G., and Mantovani, A. 1997. Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity* 6:315
175. Mihara, M., Moriya, Y., Kishimoto, T., and Ohsugi Y. 1995. Interleukin-6 (IL-6) induces the proliferation of synovial fibroblastic cells in the presence of soluble IL-6 receptor. *British Journal of Rheumatology* 34:321
176. Tamura, T., Udagawa, N., Takahashi, N., Miyaura, C., Tanaka, S., Yamada, Y., Koishihara, Y., Ohsugi, Y., Kumaki, K., and Taga, T. 1993. Soluble interleukin-6 receptor triggers osteoblast formation by interleukin 6. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90:11924
177. Joosten, L.A.B., Lubberts, E., Helsen, M.M.A., Saxne, T., Coenen-de Roo, C.J.J., Heinegard, D., and van den Berg, W.B. 1999. Protection against cartilage and bone destruction by systemic interleukin-4 treatment in established murine type II collagen-induced arthritis. *Arthritis Research* 1:81
178. Probert, L., Plows, D., Kontogeorgos, G., and Kollias, G. 1995. The type 1 interleukin-1 receptor acts in series with tumor necrosis factor (TNF) to induce arthritis in TNF transgenic mice. *European Journal of Immunology* 25:1794
179. Feldmann, M., Brennan, F.M., and Maini, R.N. 1996. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annual Review of Immunology* 14:397
180. Haworth, C., Brennan, F.M., Chantry, D., Turner, M., Maini, R.N., and Feldmann, M. 1991. Expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in rheumatoid arthritis: regulation by tumor necrosis factor-alpha. *European Journal of Immunology* 21:2575
181. Kong, Y.Y., Yoshida, H., Sarosi, I., Tan, H.L., Timms, E., Capparelli, C., Morony, S., Oliveira-dos-Santos, A.J., Van, G., Itie, A., Khoo, W., Wakeham, A., Dunstan, C.R., Lacey, D.L., Mak, T.W., Boyle, W.J., and Penninger, J.M. 1999. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 397:315

-
182. Van den Berg, W.B., and Bresnihan, B. 1999. Pathogenesis of joint damage in rheumatoid arthritis: evidence of a dominant role for interleukin-1. *Baillieres Best Practice and Research. Clinical Rheumatology* 13:577
183. Tu-Rapp, H., Hammermüller, A., Mix, E., Kreutzer, H. J., Goerlich, R., Köhler, H., Nizze, H., Thiesen, H. J., and Ibrahim, S. M. 2004. A proinflammatory role for Fas in joints of mice with collagen-induced arthritis. *Arthritis Research and Therapy*, 6:R404

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Immunologie der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock unter Betreuung von Herrn Dr. Saleh Ibrahim (Rostock) und Herrn Prof. Dr. Roland Goerlich (Bonn) angefertigt.

Mein Dank gilt:

...Herrn Dr. Saleh M. Ibrahim für die Bereitstellung des Themas und für das in mich gesetzte Vertrauen. Sein persönliches Engagement sowie seine hilfreichen Ratschläge und seine ständige Diskussionsbereitschaft waren mir bei der Durchführung der Arbeit eine unersetzliche Hilfe.

...Herrn Prof. Dr. Roland Goerlich für die externe Betreuung meiner Arbeit und für seine Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

...Herrn Prof. Dr. Hansjürgen Köhler für seine Hilfsbereitschaft und seine konstruktive Beurteilung des Manuskripts sowie für die Übernahme des Koreferates.

...Herrn Prof. Dr. Karl Schellander für die Übernahme des zweiten Koreferates.

...Herrn Prof. Dr. Hans-Jürgen Thiesen für Nutzung seiner Räumlichkeiten am Institut für Immunologie der Universität Rostock.

...Herrn Dr. Peter Lorenz und Herrn Dr. Dirk Koczan für ihre Hilfsbereitschaft bei allen Laborangelegenheiten und für ihre immer freundliche Umgangsweise.

...den Mitarbeiterinnen des Institutes für Immunologie: Frau Ilona Klamfuß für ihre immer bereitwillige Hilfe bei der Durchführung meiner Experimente und für ihre immer aufmunternde und offene Art sowie Frau Eva Lorbeer, Frau Rica Waterstraat und Frau Ildiko Toth für ihre Unterstützung im Labor.

...den Kollegen und Kolleginnen des Institutes für Immunologie für viele wissenschaftliche Diskussionen und persönliche Gespräche sowie eine sehr angenehme Zeit im Labor.

...Herrn Dr. Kreuzer, Institut für Pathologie, Universität Rostock für die Anfertigung und Bewertung der histopathologischen Schnitte der Mauspfoten.

...Herrn Dr. Mix, Neurologisches Labor der Klinik für Neurologie, Universität Rostock für seine Hilfe bei der Durchführung des Proliferationstests ($[^3\text{H}]$ -Thymidineinbau und ELISA).

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie:

...Meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben.

...Familie Koudelka für ihre Hilfe und Unterstützung.

...Meinem Mann Markus, der in meiner Dissertationsschrift mühselig nach Rechtschreibfehlern und besseren Formulierungen gesucht hat und mich während der Promotionszeit immer wieder aufbaute.