

Aus der  
Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin (Department)  
Tübingen  
Abteilung I  
(Schwerpunkte: Allgemeine Pädiatrie, Hämatologie/Onkologie)  
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. R. Handgretinger

Einfluss von TGF- $\beta_1$  auf T-Zellen bei der Juvenilen  
Idiopathischen Arthritis

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von

Markus Müller

aus

Kirchheim u. Teck

2009

Dekan:	Professor Dr. I. B. Autenrieth
1. Berichterstatter:	Professor Dr. G. E. Dannecker
2. Berichterstatter:	Professor Dr. H.-G. Rammensee



---

## Abkürzungen:

<b><math>^3\text{H}</math></b>	Tritium ☛
<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>ACR</b>	American College of Rheumatology
<b>Ag</b>	Antigen
<b>AMP</b>	Anti-Müllerian Hormone
<b>APC</b>	Allophycocyanin (ein Fluoreszenzfarbstoff)
<b>APZ</b>	Antigen präsentierende Zelle
<b>BMP</b>	Bone Morphogenetic Proteins (engl.)
<b>BSA</b>	bovine serum albumine (engl.) = Rinderserumalbumin
<b>BZR</b>	B-Zell-Rezeptor
<b>Ca</b>	Chemisches Symbol für Kalzium
<b>CD</b>	Cluster of Differentiation (engl.) = Differenzierungscluster
<b>CD4+</b>	CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen , d. h. die Zellen tragen das CD4-Antigen (T-Helferzellen)
<b>CD8+</b>	CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen , d. h. die Zellen tragen das CD8-Antigen (T-Killerzellen)
<b>CFSE</b>	5(6)-Carboxyfluorescein di-acetat N-succinimidylester
<b>cpm</b>	counts per minute (engl.)
<b>CSA</b>	Cytokine Secretion Assay (engl.) = Zytokinsekretionsassay
<b>CTLA</b>	Cytotoxic T-lymphocyte Associated Antigen (engl.)
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraacetat
<b>EGF</b>	Epidermis Growth Factor (engl.)
<b>engl.</b>	englisch
<b>EOPA</b>	Early onset pauciarticular arthritis (engl.)
<b>EULAR</b>	European League against Rheumatism

---

<b>evtl.</b>	eventuell
<b>FACS</b>	Fluorescence Activated Cell Sorter/Scanner (engl.) = Durchflusszytometrie
<b>FCS</b>	Fetal Calf Serum (engl.) = Fötale Kälberserum
<b>FITC</b>	Fluorescein-isothiocyanat (ein Fluoreszenzfarbstoff)
<b>FSC</b>	Forward Scatter (engl.), im FACS ein Maß für die Zellgröße
<b>ggf.</b>	gegebenenfalls
<b>HEPES</b>	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
<b>HLA</b>	Human Leukocyte Antigen (engl.)
<b>IE</b>	Internationale Einheiten
<b>IFN</b>	Interferon
<b>Ig</b>	Immunglobulin (z. B. IgA, IgG, IgE)
<b>IL</b>	Interleukin
<b>ILAR</b>	International League of Associations for Rheumatology
<b>IS</b>	Immunocytometry Systems
<b>JIA</b>	Juvenile Idiopathische Arthritis
<b>kD</b>	kilo Dalton, Einheit für die Angabe von Teilchenmassen
<b>LOPA</b>	Late onset pauciarticular arthritis (engl.)
<b>M.</b>	Morbus (lat.) = Krankheit
<b>max.</b>	maximal
<b>Mg</b>	Chemisches Symbol für Magnesium
<b>MHC</b>	Major Histocompatibility Complex (engl.) = Haupthistokompatibilitätskomplex
<b>min.</b>	mindestens
<b>MLC</b>	Mixed Lymphocyte Culture (engl.)
<b>MLR</b>	Mixed Lymphocyte Reaction (engl.)
<b>MNZ</b>	mononukleäre Zellen

---

<b>Na</b>	Chemisches Symbol für Natrium
<b>NK-Zelle</b>	Natürliche Killerzelle
<b>NNR</b>	Nebennierenrinde
<b>NSAR</b>	nicht steroidale Antirheumatika
<b>PAMP</b>	Pathogen Associated Molecular Patterns (engl.)
<b>PBMC</b>	Peripheral Blood Mononuclear Cells (engl.) = mononukleäre Zellen aus dem periph. Blut
<b>PBS</b>	Phosphate Buffered Saline (engl.) = Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
<b>PE</b>	Phycoerythrin (ein Fluoreszenzfarbstoff)
<b>PerCP</b>	Peridin Chlorophyll (ein Fluoreszenzfarbstoff)
<b>PI</b>	Propidiumjodid
<b>PMA</b>	Phorbol-Myristate-Acetate (engl.)
<b>PRES</b>	Paediatric Rheumatology European Society (engl.)
<b>RA</b>	Rheumatoide Arthritis
<b>RF</b>	Rheumafaktor
<b>s.</b>	siehe
<b>SF</b>	Synovialflüssigkeit (gewonnen durch aseptische Gelenkpunktion)
<b>SLE</b>	Systemischer Lupus erythematosus
<b>SMAD</b>	Signalübertragungsprotein; die Abkürzung ist eine Fusion aus den Nematoden Genen SMA 2,3 und 4 sowie dem Drosophilagen MAD (mothers against decapentaplegic)
<b>SSC</b>	sideward scatter (engl.), im FACS ein Maß für die Granularität von Zellen (scatter = engl. für Streulicht)
<b>Tab.</b>	Tabelle
<b>TGF-<math>\beta</math>1</b>	Transforming growth factor- $\beta$ 1
<b>Th</b>	T-Helferzelle (Subgruppe der T-Lymphozyten, lassen sich in Th0, Th1 und Th2 unterteilen)

---

<b>TZR</b>	T-Zell-Rezeptor
<b>U</b>	Unit (engl.) = Einheit
<b>UKT</b>	Universitätsklinikum Tübingen
<b>upm</b>	Umdrehung pro Minute

# Abbildungsverzeichnis

2.1	Immunsystem [52]	3
2.2	HLA*	4
2.3	MHC I/II - Aufbau und Struktur [138]	5
2.4	Autoimmunität*	8
2.5	Zeichen der chronischen Arthritis [97]	10
2.6	Grundlagen der JIA Therapie*	12
4.1	Ficoll*	29
4.2	Schematische Darstellung FACS-Calibur <sup>+</sup>	31
4.3	Innenansicht FACS-Calibur*	31
4.4	Zytokinsekretionsassay [89]	35
4.5	Sekretion von IFN- $\gamma$ [89]	36
5.1	Verhältnis CD4 <sup>+</sup> -/ CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen*	42
5.2	Phänotypisierung CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high+</sup> -T-Zellen*	42
5.3	Phänotypisierung CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen*	43
5.4	Phänotypisierung CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen*	44
5.5	FACS Auswertung CFSE Daten*	46
5.6	CFSE-Verdünnung im zeitlichen Verlauf*	47
5.7	CFSE-Proliferationsassay (CD4 <sup>+</sup> - und CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen)*	48
5.8	CFSE-Verhältnisse der CD4 <sup>+</sup> - /CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen*	49
5.9	Phänotypisierung nach 5 Tagen Wachstum*	50
5.10	Zytokinsekretionsassay (IFN- $\gamma$ , IL-4)*	52
5.11	Empfindlichkeit von Th1- und Th2-Zellen gegenüber TGF- $\beta_1$ *	53
5.12	Ergebnisse <sup>3</sup> H-Thymidineinbau*	54
6.1	CD45RO*	60



**Quellenangaben:**

Mit \* gekennzeichnete Abbildungen wurden selbst erstellt. Bei den anderen Abbildungen wurden die entsprechenden Quellen genannt. + Abbildung 4.2 wurde der Homepage von BD Bioscience, dem Hersteller des FACS Calibur Gerätes, entnommen<sup>1</sup>.

---

<sup>1</sup>[http://www.bdbiosciences.com/immunocytometry\\_systems/support/training/online/ITF/index.htm](http://www.bdbiosciences.com/immunocytometry_systems/support/training/online/ITF/index.htm)

# Tabellenverzeichnis

2.1	Immunsystem - Angeborene und erworbene Abwehr [52] . . . . .	2
2.2	Auswahl einiger CD-Antigene [61] . . . . .	6
2.3	Divergierende Klassifikationen der „kindlichen chronischen Arthritis“ [99] .	14
2.4	T-Helferzellen* . . . . .	17
4.1	Liste der fluoreszenz-markierten Antikörper* . . . . .	24
4.2	Dichtewerte der Blutbestandteile [81] . . . . .	30
4.3	FACS: Emissionsspektren der verschiedenen Fluoreszenzen* . . . . .	32
4.4	FACS-Schema Phänotypisierung* . . . . .	33
4.5	Plattenbelegung Zytokinsekretionsassay* . . . . .	35
4.6	FACS-Schema Zytokinsekretionsassay* . . . . .	37
4.7	Plattenbelegung für den Thymidineinbau* . . . . .	38
4.8	FACS-Schema CFSE-Assay* . . . . .	39
6.1	Typische Normbereiche wesentlicher Lymphozyten-Subpopulationen [130]	59

## Quellenangaben:

Mit \* gekennzeichnete Tabellen wurden selbst erstellt. Bei den anderen Tabellen wurden die entsprechenden Quellen genannt.

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen . . . . .	iv
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>v</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>vii</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>x</b>
<b>1 Vorwort</b>	<b>1</b>
<b>2 Einleitung</b>	<b>2</b>
2.1 Das Immunsystem . . . . .	2
2.1.1 Major Histocompatiblity Complex (MHC) . . . . .	4
2.1.2 CD-Antigene . . . . .	5
2.1.3 Autoimmunkrankheiten . . . . .	6
2.1.3.1 Entstehungsmechanismen . . . . .	7
2.2 Die Juvenile Idiopathische Arthritis (JIA) . . . . .	9
2.2.1 Historische Hintergründe . . . . .	9
2.2.2 Grundlagen . . . . .	9
2.2.2.1 Definition . . . . .	10
2.2.2.2 Epidemiologie . . . . .	10
2.2.2.3 Klinische Symptomatik . . . . .	11
2.2.2.4 Therapie . . . . .	11
2.2.2.5 Prognose und Verlauf . . . . .	13
2.2.3 Einteilung in Kategorien (nach ILAR) . . . . .	13
2.2.3.1 Terminologie . . . . .	13
2.2.3.2 Einteilung . . . . .	14
2.2.4 Pathogenese und Ätiologie . . . . .	16
2.2.4.1 Transforming growth factor- $\beta$ . . . . .	17

<b>3 Zielsetzung</b>	<b>20</b>
<b>4 Material und Methoden</b>	<b>22</b>
4.1 Material . . . . .	22
4.1.1 Standardverbrauchsmaterialien . . . . .	22
4.1.2 Standardgeräte . . . . .	23
4.1.3 Antikörper . . . . .	23
4.1.4 Material für die T-Zellisolierung . . . . .	23
4.1.5 Material für die phänotypische Charakterisierung . . . . .	24
4.1.6 Material für den Zytokinsekretionsassay . . . . .	24
4.1.7 Material für den Thymidin-Proliferationsassay . . . . .	25
4.1.8 Material für den CFSE-Proliferationsassay . . . . .	25
4.1.9 Verwendete Computerprogramme und Datenauswertung . . . . .	26
4.2 Patientenproben . . . . .	26
4.3 Firmenverzeichnis . . . . .	27
4.4 Methoden . . . . .	29
4.4.1 Isolieren der T-Zellen aus den Proben . . . . .	29
4.4.2 Zellkulturmedium . . . . .	30
4.4.2.1 Herstellen des Human Pooled Serum (HPS) . . . . .	30
4.4.3 Durchflusszytometrie - FACS . . . . .	30
4.4.4 Färben der Zellen mit Antikörpern (Phänotypisierung) . . . . .	32
4.4.5 Zweifarben-Zytokinsekretionsassay . . . . .	34
4.4.6 Messen der Zellproliferation mittels Thymidinassay . . . . .	37
4.4.7 Messen der Proliferationsrate CD4 <sup>+</sup> -/ CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen mittels CFSE-Assay . . . . .	38
4.4.7.1 Phänotypische Charakterisierung der CFSE-Zellen . . . . .	40
<b>5 Ergebnisse</b>	<b>41</b>
5.1 Phänotypisierung der Zellen . . . . .	41
5.2 CFSE-Proliferationsmessung . . . . .	45
5.2.1 Optimaler Zeitpunkt der Proliferationsmessung . . . . .	46
5.2.2 CD4 <sup>+</sup> - und CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen . . . . .	47
5.2.3 Phänotypisierung der CFSE-Zellen nach 5 Tagen Wachstum . . . . .	49
5.3 Unterscheidung von Th-Zellen anhand ihres Zytokinmusters . . . . .	51
5.3.1 Empfindlichkeit von Th1- und Th2-Zellen gegenüber TGF . . . . .	53
5.4 Ergebnisse der Proliferationsmessung mittels <sup>3</sup> H-Thymidineinbau . . . . .	53

5.5	Zusammenfassung der Ergebnisse . . . . .	55
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>57</b>
6.1	Pathogenese der JIA . . . . .	57
6.2	Phänotypisierung synovialer vs. peripherer Zellen . . . . .	58
6.3	Das regulatorische Zytokin TGF- $\beta_1$ . . . . .	63
6.4	Th1- und Th2-Zellen . . . . .	65
6.5	TGF- $\beta_1$ Empfindlichkeit synovialer vs. peripherer T-Zellen . . . . .	66
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>71</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>74</b>
<b>9</b>	<b>Anhang</b>	<b>83</b>
9.1	Danksagungen . . . . .	84
9.2	Lebenslauf . . . . .	85
9.3	Veröffentlichungen . . . . .	86

# 1 Vorwort

In dieser Arbeit wurden Proben von Kindern, die an der Juvenilen Idiopathischen Arthritis erkrankt sind, untersucht. Die Proben stammten aus der Rheumaambulanz Tübingen in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Jasmin Kuemmerle-Deschner<sup>1</sup> und in Zusammenarbeit mit dem pädiatrischen Olgahospital in Stuttgart. Die Juvenile Idiopathische Arthritis ist die häufigste rheumatische Erkrankung im Kindesalter. Am häufigsten sind die Gelenke betroffen, die Krankheit befällt aber auch weitere Organe (z. B. Herz, Augen). In Deutschland sind 4000 - 5000 Kinder daran erkrankt (s. 2.2.2.2) und in Tübingen werden zur Zeit 200 Kinder mit jährlich 1500 ambulanten Kontakten und 200 stationären Aufnahmen betreut<sup>2</sup>. Die Rheumaambulanz besteht seit 1993 in Tübingen und bildet mit dem Olgahospital ein wichtiges Zentrum für Rheumaerkrankungen bei Kindern. Die enge Zusammenarbeit von Kinderreumatologen, Krankengymnasten, Lehrern, Sozialpädagogen und Ärzten aus verschiedenen Fachrichtungen ist ein wichtiges Anliegen. Dadurch bietet sich zusammen mit der Grundlagenforschung in der Kinderklinik die Möglichkeit, den Kindern eine ganzheitliche, qualifizierte, spezialisierte und mit modernsten Forschungsergebnissen gestützte Therapie zukommen zu lassen.

---

<sup>1</sup>Universitätsklinik für Kinderheilkunde und Jugendmedizin Tübingen

<sup>2</sup>Homepage der Rheumaambulanz: [http://www.medizin.uni-tuebingen.de/kinder/Abteilung\\_I/Rheuma/rheuma.html](http://www.medizin.uni-tuebingen.de/kinder/Abteilung_I/Rheuma/rheuma.html)

# 2 Einleitung

## 2.1 Das Immunsystem

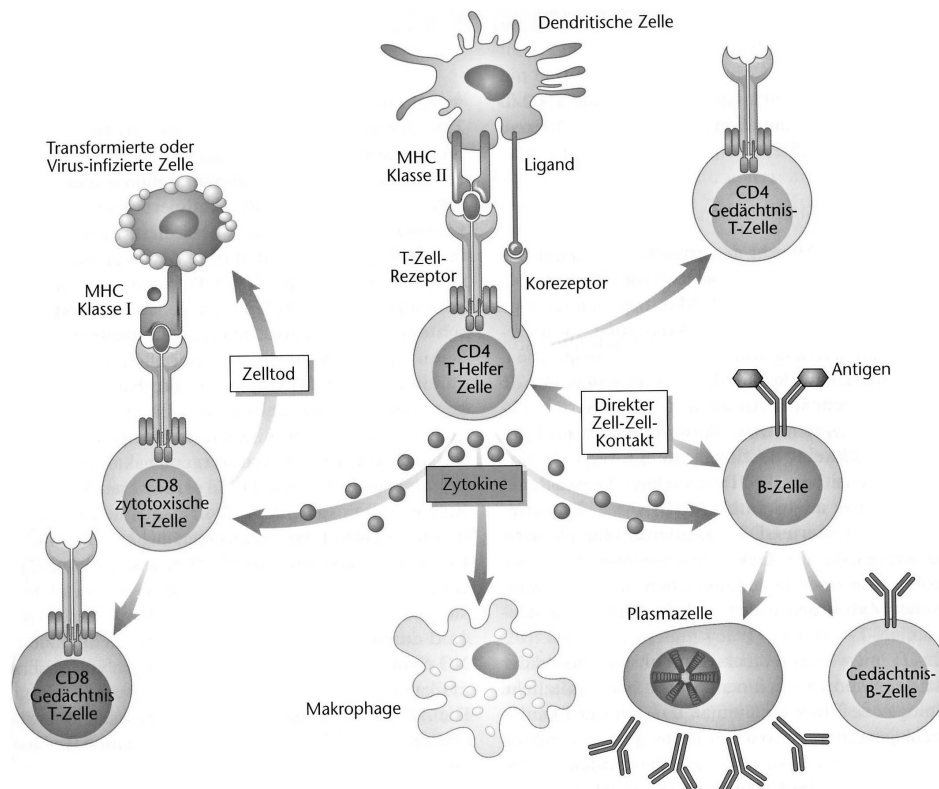
Der Begriff Immunität leitet sich von dem lateinischen Wort *immunis* (= frei, unberührt) [117] ab. Für das Überleben komplexer mehrzelliger Organismen wie dem Menschen ist es erforderlich, einen Schutz der eigenen Integrität gegenüber fremden Zellen zu besitzen. Dieses *Verteidigungssystem* muss in der Lage sein, sicher körperfremde Zellen als fremd zu erkennen und zu eliminieren. Gleichzeitig müssen körpereigene Zellen richtig erkannt und verschont werden. Bei überschießenden Reaktionen (Überempfindlichkeitsreaktionen, Allergien) oder bei der Zerstörung vermeintlich infizierter körpereigener Zellen kann sich hieraus ein eigener Krankheitswert entwickeln (Autoimmunkrankheiten, s. 2.1.3). Das Immunsystem hat eine Schutzfunktion für den Körper gegenüber verschiedenen Gefahren durch Bakterien, Viren, Pilze, Mikroorganismen, aber auch gegenüber körpereigenen entarteten Zellen. Man kann es in zwei sich ergänzende Systeme einteilen, in die *angeborene* und die *erworbene* Abwehr (s. Tab. 2.1).

**Tabelle 2.1:** Immunsystem - Angeborene und erworbene Abwehr, geändert nach [52]

	<b>angeborene Immunität</b>	<b>erworbene Immunität</b>
physikalische und chem. Barrieren	Haut und Schleimhäute	Haut- und Schleimhautassoziiertes lymphatisches Gewebe, sekretorische Antikörper (IgA)
lösliche Faktoren	Komplementsystem, Akute-Phase-Proteine, Zytokine von: Monozyten, Makrophagen u. dendritischen Zellen	Antikörper, Lymphozyten-Zytokine
zelluläre Faktoren	Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, NK Zellen, dendritische Zellen	B- und T-Lymphozyten

Nachdem die erste Linie der Immunabwehr, die physikalischen und chemischen Barrieren (z. B. niedriger pH-Wert des Magens, intakte Haut und Schleimhäute) des Körpers, durchbrochen ist, ermöglicht die angeborene Abwehr nach einfachen Regeln eine schnelle Immunantwort. Dies geschieht u. a. durch sogenannte Mustererkennungsmoleküle (Toll-ähnliche

Rezeptoren), die Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMP<sup>1</sup>) der fremden Zellen erkennen können. Als ein weiteres, sehr anpassungsfähiges System steht zusätzlich die erworbene Abwehr zur Verfügung. Dieses System (bestehend aus B-, T-Lymphozyten und Antigen präsentierenden Zellen) ist in der Lage, erworbene Antigene zu erkennen und sich diese lange Zeit über Memoryzellen zu „merken“. Dadurch kann bei einer Zweitinfektion eine sehr schnelle und gezielte Immunreaktion erfolgen. Die wesentlichen Bestandteile dieses „zellulären“ Immunsystems mit den APZ, den B- und T-Lymphozyten sowie ihrer Interaktion über Zytokine und Zell-Zell-Kontakte ist in Abbildung 2.1 dargestellt.



**Abbildung 2.1:** Schematische Darstellung eines Teils des zellulären Immunsystems, geändert nach [52].

Eine Immunantwort kann nur auftreten, wenn Antigene auch wirklich als fremd erkannt werden. Hierfür sind die Genprodukte des Major Histocompatibility Complex (MHC)<sup>2</sup> wichtig. B- und T-Zellen erkennen unterschiedliche Epitope<sup>3</sup>. B-Zellen können ihre Epitope unabhängig von der Anwesenheit von MHC-Molekülen erkennen, dagegen kann eine T-Zellantwort nur dann stattfinden, wenn die Antigene auch prozessiert und zusammen mit MHC-Molekülen präsentiert werden.

<sup>1</sup>PAMP: pathogen-associated molecular patterns

<sup>2</sup>MHC: Haupt-Histokompatibilitätskomplex

<sup>3</sup>Epitope: Antigenbereiche, an die Antikörper oder T-Zell-Rezeptoren binden



### 2.1.1 Major Histocompatibility Complex (MHC)

1996 erhielten die Wissenschaftler Zinkernagel und Doherty den Medizinnobelpreis [84] für die Erkenntnis, dass T-Zellen Antigene nur dadurch erkennen können, indem diese durch MHC-Moleküle präsentiert werden. Mit ihrer in *Nature* [30] veröffentlichten Forschung revolutionierten sie die Vorstellung des Immunsystems und erklärten damit die eigentliche Funktion des Haupthistokompatibilitätscomplex (Aufbau und Struktur s. Abb. 2.3).

Anhand von Inzuchtexperimenten mit Mäusen hatte man bereits in den 30er und 40er Jahren Gene isoliert, die für die Transplantatabstoßung verantwortlich sind. 1948 gelang es G. Snell das H-2 Antigen aufgrund der besonders schnellen Abstoßung als Haupthistokompatibilitätscomplex (MHC) zu benennen. Vier Jahre später konnte der humane MHC durch J. Dausset identifiziert werden. Für ihre Entdeckungen genetisch bestimmter zellulärer Oberflächenstrukturen, von denen immunologische Reaktionen gesteuert werden, erhielten 1980 die Wissenschaftler G. Snell<sup>4</sup>, B. Benacerraf und J. Dausset gemeinsam den Nobelpreis der Medizin [107]. Durch Versuche erhielt man nach 20 Generationen selektierte Mäuse, die bis auf die sogenannten Histokompatibilitätsgene (= MHC) zu 99,9 % ihrer Gene übereinstimmen. Diese Histokompatibilitätsgene kodieren die beim Menschen HLA-Moleküle (Humanes Leukozyten Antigen) genannten Histokompatibilitätsantigene. Der MHC spielt auch bei der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen eine wichtige Rolle und befindet sich auf dem kurzen Arm des Chromosoms Nummer 6. Er umfasst über 100 Gene, die man grob in drei Klassen einteilen kann (s. Abb. 2.2). Gene des MHC I und II sind zuständig für die Kodierung von Glykoproteinen. Diese werden an der Zelloberfläche exprimiert und haben die Aufgabe T-Zellen Antigene zu präsentieren (s. oben). Man bezeichnet diese Glykoproteine auch als HLA. Gene, die für TNF- $\alpha$  (Tumornekrosefaktor), TNF- $\beta$  und Komplementfaktoren kodieren, werden unter dem Begriff MHC III zusammengefasst [135].

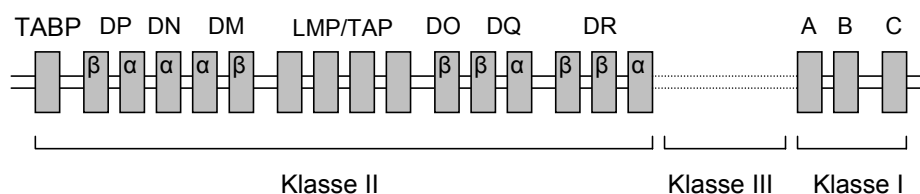
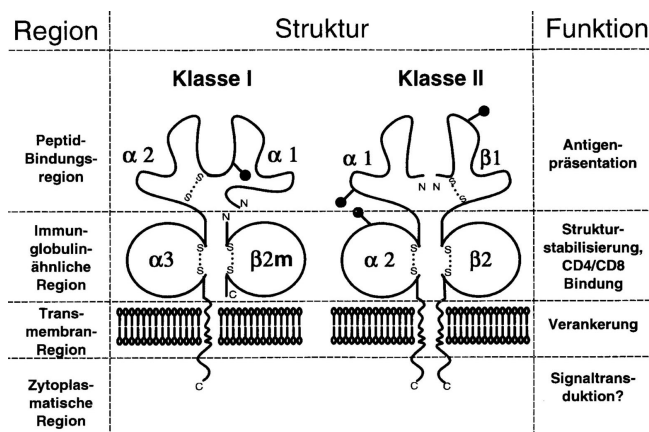


Abbildung 2.2: HLA auf Chromosom 6

Antigen präsentierende Zellen (APZ), also Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen, nehmen das fremde Antigen auf und bauen es in ihren intrazellulären Lysosomen zu Antigenfragmenten (kurzen Peptiden) ab. Diese werden von den APZ auf ihrer Oberfläche

<sup>4</sup>George Davis Snell (1903 - 1996)



**Abbildung 2.3:** MHC I/II - Aufbau und Struktur, geändert nach [138]. *HLA-Klasse-I-Moleküle:* von den Genlokalisationen HLA-A, -B, -C codiert; kommen außer auf Spermien auf allen kernhaltigen Zellen und Thrombozyten vor; dienen der Erkennung und Tötung virusinfizierter und fremder Zellen durch zytotoxische T-Lymphozyten. *HLA-Klasse-II-Moleküle:* codiert von den Genlokalisationen HLA-DR, -DQ, -DP; exprimiert auf B-Lymphozyten, Monozyten/Makrophagen, anderen APZ sowie aktivierten T-Lymphozyten; sie werden von T-Helferzellen erkannt.

zusammen mit MHC-Molekülen präsentiert. Exogene (= körperfremde) Antigene, d.h. von Bakterien oder anderen Mikroorganismen stammende Antigene werden in Assoziation mit MHC-Klasse-II Molekülen CD4<sup>+</sup>-T-Zellen präsentiert. Endogene Antigene (virusinfizierte Zellen oder neoplastische Körperzellen) werden mit MHC-Klasse-I Molekülen den CD8<sup>+</sup>-T-Zellen präsentiert (s. Abb. 2.1) und von diesen zytotoxischen T-Zellen zerstört.

### 2.1.2 CD-Antigene

Zellen tragen spezifische antigene Oberflächenstrukturen<sup>5</sup> auf ihrer Zellmembran, diese können durch gentechnologisch hergestellte hochspezifische monoklonale Antikörper erkannt werden. Um eine Systematik einzuführen, bezeichnet man diese Antigene als Cluster of Differentiation (CD) und versieht sie mit einer fortlaufenden Nummer (CD4, CD8 etc.). Besondere Bedeutung hat diese CD-Klassifikation für die Charakterisierung von Leukozyten. Je nach Zelltyp (B-Zelle, T-Zelle), Differenzierungsgrad (reife vs. unreife Zelle) und Aktivitätszustand tragen die Leukozyten verschiedene Differenzierungsantigene. Diese Tatsache kann man nutzen, um den Zelltyp zu bestimmen. Man verwendet fluoreszenz-markierte monoklonale Antikörpern, die an die entsprechenden Antigene binden, und misst anschließend deren Fluoreszenzintensität in der Durchflusszytometrie (FACS). Mit Hilfe von Antikörpern gegen spezifische CD-Antigene, beispielsweise anti-CD4- und anti-CD8-Antikörper, können T-Helferzellen von zytotoxischen T-Zellen unterschieden werden. Da T-Zellen CD3 an ihrer Oberfläche tragen, ist es möglich durch spezifische anti-CD3-Antikörper, diese T-Zellen zu charakterisieren und sie von anderen Zellen abzugrenzen. In Tabelle 2.2 sind diejenigen CD-Antigene aufgelistet, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

<sup>5</sup>membranständige Immunglobuline, Rezeptoren und andere antigene Determinanten wie etwa Glykoproteine

**Tabelle 2.2:** Auswahl einiger CD-Antigene: Exprimierende Zellen, Funktion und Verwandtschaft. Nach [61]

<b>Antigen</b>	<b>zelluläre Expression</b>	<b>Funktion</b>
<b>CD3</b>	Thymozyten, T-Zellen	assoziiert mit T-Zell-Rezeptor-Komplex, notwendig für die Signalübertragung durch TZR
<b>CD4</b>	Thymozyten, Th1- und Th2-Zellen, Makrophagen u. Monozyten	Korezeptor für MHC-Klasse-II Moleküle
<b>CD8</b>	Thymozyten, zytotoxische T-Zellen (1/3 der periph. T-Zellen)	Korezeptor für MHC-Klasse-I Moleküle
<b>CD14</b>	Myelomonozytische Z., Granulozyten	Rezeptor für Lipopolysaccharide
<b>CD19</b>	B-Zellen, dendritische Zellen	bildet Komplex (CD21 + CD81); Korezeptor für B-Zellen (reguliert Entwicklung, Differenzierung und Aktivierung)
<b>CD25</b>	aktivierte T-Zellen, T <sub>regs</sub> , B-Zellen u. Monozyten	a-Kette des IL-2 Rezeptors
<b>CD28</b>	T-Zell Subpopulationen, aktivierte B-Zellen	Aktivierung naiver T-Zellen, Rezeptor für kostimulierendes Signal, bindet CD80 + CD86
<b>CD45RO</b>	Subpopulationen von T- und B-Zellen, Monozyten, Makrophagen (Memory Zellen)	Isoform von CD45 (ohne A-, B- und C-Exon)
<b>CD69</b>	aktivierte T- und B-Zellen, aktivierte Makrophagen u. NK-Zellen	unbekannt, frühes Aktivierungsantigen: Aktivierungsmarker
<b>HLA-DR</b>	APZ (dendritische Zellen, Monozyten, B-Zellen), aktivierte T-Lymphozyten	MHC-Klasse-II Moleküle, Bindung von Antigenpeptiden

### 2.1.3 Autoimmunkrankheiten

*„Erkrankungen, bei denen durch Autoimmunisierung gegen körpereigene Substanzen (Autoantigene) gerichtete Autoantikörper bzw. spezifische sensibilisierte B- und T-Lymphozyten auftreten. Autoimmunkrankheiten treten familiär gehäuft auf; Beteiligung genetischer Faktoren wahrscheinlich, da Autoimmunkrankheiten oft mit Eigenschaften des HLA-Systems assoziiert sind.“<sup>6</sup>*

Das Immunsystem hat die schwierige Aufgabe, eine unendliche Vielzahl an unterschiedlichen Krankheitserregern zu erkennen, diese von körpereigenen Strukturen zu unterscheiden und erfolgreich zu bekämpfen. Hierbei können Fehlfunktionen wie überschießende Reaktionen gegenüber „harmlosen“ Antigenen auftreten (Allergien). Den Begriff „Allergie“ führte ein Wiener Kinderarzt, Clemens von Pirquet, 1906 im Rahmen einer Arbeit über die Serumkrankheit in die Medizin ein. Neben allergischen Reaktionen können sich Zellen des Immunsystems aber ebenso gegen gesunde, d. h. nicht infizierte körpereigene Zellen und Proteine wenden, z. B. im Rahmen einer Auto-Immun-Reaktion. Normalerweise existieren verschiedene Mechanismen (u. a. Zytokine und regulatorische T-Zellen [120]), die diese

<sup>6</sup>Pschyrembel Klinisches Wörterbuch [106]

Autoimmunreaktionen eindämmen (inhibieren) und beenden können. Bestehen sie aber unkontrolliert für längere Zeit fort, können sie zu einer permanenten Schädigung körpereigener Strukturen führen und man spricht von einer Autoimmunkrankheit.

Autoimmunkrankheiten bzw. Autoimmunphänomene sind bereits seit langem bekannt, erstmals wurde 1898 die Komplement vermittelte Hämolyse durch Jules Bordet <sup>7</sup> beschrieben [14]. Für seine Leistungen in der Immunologie erhielt er 1919 den Medizin-Nobelpreis. Sie besitzen eine besondere Relevanz, da in den Industrienationen bereits 5 % der Bevölkerung an einer Autoimmunkrankheit leiden [27, 60, 122]. Obwohl die Prävalenzen dieser Erkrankungen weiter steigen, existieren aufgrund der komplexen Entstehungsmechanismen noch immer kaum kausale Therapiemöglichkeiten. Autoimmunerkrankungen lassen sich in organ-spezifische und systemische Erkrankungen unterteilen. Zu den häufigsten organ-spezifischen Autoimmunerkrankungen gehören u.a. die Thyreoiditis (Prävalenz 1 - 2 %), die Gastritis (1 - 2 %), der M. Basedow (0,2 - 1,1 %) und der Diabetes Mellitus Typ I<sup>8</sup> (0,2 - 0,4 %) [83].

Zu den systemischen Autoimmunerkrankungen gehört neben seltenen Erkrankungen wie z. B. der Polyomyositis auch eine der häufigsten Autoimmunerkrankungen die Rheumatoide Arthritis mit einer Prävalenz von etwa einem Prozent, wobei Frauen häufiger betroffen sind als Männer [35].

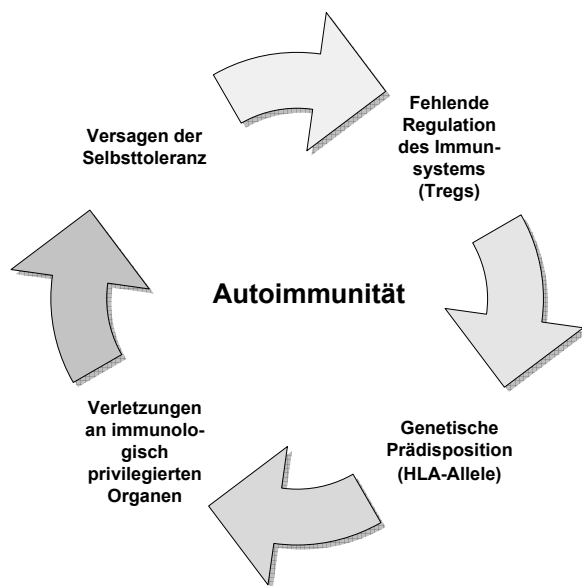
### 2.1.3.1 Entstehungsmechanismen

Abbildung 2.4 versucht, grundlegende Mechanismen in der Pathogenese von Autoimmunerkrankheiten darzustellen. Als sicher gilt für viele Autoimmunerkrankheiten eine genetische Prädisposition, so erkranken z. B. bevorzugt HLA-B27 positive Menschen am Morbus Bechterew. Neue Forschungsergebnisse zeigen allerdings, dass nur Träger einer bestimmten Variante, dem HLA-B27\*05, eine besondere Gefährdung haben. Träger der Variante \*09, die sich nur in einer Aminosäure davon unterscheidet, haben kein erhöhtes Risiko [51]. Vermutet wird, dass die besondere Konformation aus HLA-B27\*05 und körpereigenem Peptid einem fremden vermutlich von Viren stammenden Peptid so stark ähnelt, dass T-Zellen keine Unterscheidung mehr treffen können. Als Konsequenz daraus bilden sich Autoantikörper und autoaggressive Zellen. Hierdurch versagt einer der wichtigsten Eckpfeiler des Immunsystems - die Selbsttoleranz [87]. Die Reaktionen, die aus der Strukturähnlichkeit entstehen,

---

<sup>7</sup>Jules Jean Baptiste Vincent Bordet (1870 - 1961), belgischer Biologe mit Schwerpunkt Immunologie und Bakteriologie

<sup>8</sup>Diabetes Mellitus Typ I: insulinabhängiger Diabetes Mellitus mit Autoantikörpern gegen Inselzellen, Insulin und Glutamatdecarboxylase



**Abbildung 2.4:** Entstehung von Autoimmunkrankheiten - Zwillingsstudien und epidemiologische Untersuchungen sprechen dafür, dass auch genetische Ursachen [105, 134] eine Rolle spielen. Für eine „Selbsttoleranz“ wichtig ist die physiologische Elimination potentiell autoreaktiver B- und T-Zellen durch eine thymale Selektion und periphere Depletion der Zellen [118]. Diese Mechanismen können versagen und diese potentiell autoreaktiven Zellen können durch molekulares Mimikry (Kreuzreaktivität), Superantigene, Expression costimulatorischer Signale (nach Infektionen) oder durch unphysiologischen Kontakt mit dem Selbst-Antigen in immunologisch privilegierten Organen aktiviert werden. Auch eine Beteiligung von regulatorischen T-Zellen ( $CD4^+CD25^{high+}$ ) zur Aufrechterhaltung der Selbst-Toleranz [120] gilt als wahrscheinlich.

werden als molekulares Mimikry bezeichnet. Diese Mechanismen scheinen bei Autoimmunkrankheiten eine Schlüsselrolle zu spielen [7], auch wenn der Zusammenhang zwischen Viren und Autoimmunität kontrovers diskutiert wird [40, 68]. Der normale Reifungsprozess von T-Zellen findet im Thymus statt. Im Regelfall werden während dieser Reifungsphase autoreaktive T-Zellen eliminiert [118]. Entkommen allerdings einige Zellen dieser negativen Selektion, wahrscheinlich aufgrund einer zu geringen Avidität gegenüber Autoantigenen [76], können sich autoreaktive Prozesse ausbilden.

Durch regulatorische T-Zellen, wie den  $CD4^+CD25^{high+}$ -T-Zellen [34, 57, 120], können autoaggressive Reaktionen begrenzt und verhindert werden. Die regulatorische Aktivität der momentan bevorzugt betrachteten  $CD4^+CD25^{high+}$ -T-Zellen ( $T_{regs}$ ) wird dabei vermutlich von auf der Oberfläche gebundenem  $TGF-\beta_1$  vermittelt [34, 57, 95] und verhindert unter anderem die Aktivierung  $CD8^+$ -T-Zellen [102]. Es konnte gezeigt werden, dass das Ausschalten des Transkriptionsfaktors Foxp3, der die Entstehung von  $T_{regs}$  beeinflusst, eine massive Autoimmunreaktion bewirkt [38, 56, 65].

Neben den regulatorischen Zellen haben auch Zytokine (proinflammatorische und inhibitorische) einen Einfluss auf die Immunreaktion (s. 2.2.4). Immunregulatorische Zytokine wie das Zytokin  $TGF-\beta_1$  spielen eine große Rolle (s. 2.2.4.1). Wird  $TGF-\beta_1$  komplett ausgeschaltet, kann es zu einer letalen Entzündung führen. So leiden  $TGF-\beta_1$  knockout Mäuse (-/-) unter einer ausgeprägten Multisystemerkrankung [71, 121]. Als Auslöser für Autoimmunerkrankungen kommen auch Verletzungen von immunologisch privilegierten Organen in Frage. Ein Beispiel ist die Ophthalmia sympathica, bei der nach Verletzung eines Auges der unphysiologische Kontakt des Immunsystems mit Bestandteilen der Uvea zu einer

Autoimmunreaktion führt. In Folge kommt es zu einer massiven autoimmunen Entzündungsreaktion, welche bis zum Verlust des anderen gesunden Auges führen kann.

## 2.2 Die Juvenile Idiopathische Arthritis (JIA)

### 2.2.1 Historische Hintergründe

Die erste rheumatisch-entzündliche Erkrankung wurde durch den englischen Kinderarzt Sir George F. Still<sup>9</sup> 1897 beschrieben. Er beobachtete eine schwere systemische Rheumaerkrankung mit extremen Bewegungseinschränkungen, Fieber und einer hohen Mortalität. Dies ist die schwerste Verlaufsform der JIA und wird bis heute nach seinem Erstbeschreiber auch Morbus Still genannt. Es gab aber bereits vor Still bedeutende Rheumatologen, auch wenn dieser Begriff erst deutlich später geprägt wurde. Bereits im Jahre 1800, annähernd ein Jahrhundert vor Still, gelang es A. J. Landrè-Beauvais in seiner Dissertation, eine eindeutige Abgrenzung der rheumatoiden Arthritis von der Gicht und dem akuten Gelenkrheumatismus [62] zu formulieren. Er bezeichnete aber dem Zeitgeist entsprechend diese neue Krankheit als „primäre asthenische Gicht“. Dieser Begriffsbildung widersprach Jean Martin Charcot (1825 - 1893) erst ein halbes Jahrhundert später [64]. Charcot bezeichnet in seiner Dissertation (1853, Paris) dieses Krankheitsbild als „Rhumatisme articulaire chronique - forme primitive“ (primäre Form des chronischen Gelenkrheumatismus). Er bestätigte aber auch ausdrücklich Beauvais als Erstbeschreiber dieser Krankheit. Charcot hat dabei in einigen Fällen die Klinik, die Lokalisation der Beschwerden und vor allem die Schmerzqualitäten in einer bis heute nahezu unübertroffenen Qualität beschrieben.

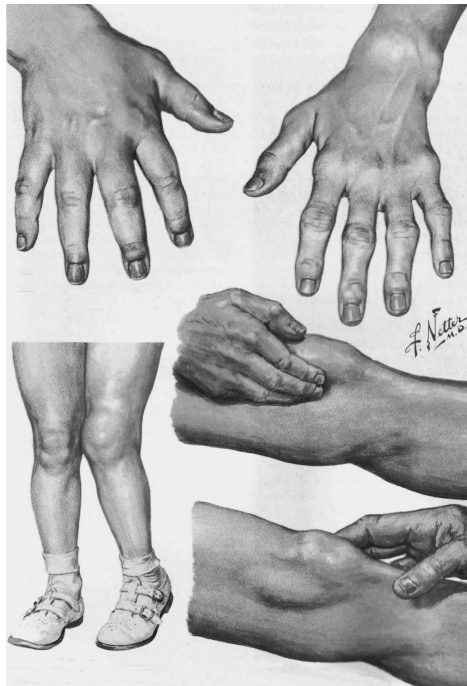
### 2.2.2 Grundlagen

Im Kindesalter kommen unterschiedliche rheumatische Erkrankungen vor. Es handelt sich um verschiedene Krankheitsbilder, deren Einordnung und Klassifikation Schwierigkeiten bereitet. Allerdings sind diese Erkrankungen bei Kindern nahezu ausschließlich entzündlich-immunologisch bedingt und somit dem Formenkreis der Autoimmunkrankheiten zuzurechnen.

Zusätzlich zu dem typischen Befall der Synovia der Gelenke treten im Verlauf der JIA abhängig von den Subtypen auch extraartikuläre Manifestationen u.a. des Bindegewebes der Haut, der Gefäße und der Sehenscheiden auf. Während bei der systemischen Verlaufsform (M. Still) beispielsweise einer der häufigsten Komplikationen die Perikarditis ist, treten bei

---

<sup>9</sup>Sir George F. Still (London, 1868 - 1941)



**Abbildung 2.5:** Zeichen der chronischen Arthritis - Dargestellt sind die typischen klinischen Erscheinungsbilder der kindlichen chronischen Arthritiden, geändert nach [97]. Links oben ist die spindelförmige Schwellung der Finger in den Frühstadien dargestellt, rechts daneben die bei einer polyartikulären Ausprägung meist geschwollenen proximalen Interphalangealgelenke, die Metakarpophalangeal und die Handgelenke. Unten links ist eine Arthritis des linken Kniegelenks dargestellt (mit einer Varusfehlstellung und Beugekontraktur). Daneben ist das so genannte *Fluktationszeichen* dargestellt. Durch Ausstreichen des Kniegelenkergusses aus dem medialen Kompartiment von proximal nach distal und anschließender schneller Kompression des lateralen Kompartiments bildet sich medial der Patella ein Wulst.

den oligoartikulären Verlaufsformen häufig Augenerkrankungen in Form einer Uveitis auf. Es handelt sich also nicht nur um lokalisierte Krankheitsbilder, welche mit lokalen Mitteln behandelt werden können. Vielmehr sind es komplexe Systemerkrankungen, bei denen die rheumatische Entzündung in den diversen Gelenken klinisch meist im Vordergrund steht. Das gesamte Krankheitsbild muss daher aggressiv behandelt werden.

### 2.2.2.1 Definition

Die Juvenile Idiopathische Arthritis ist definiert als eine Arthritis<sup>10</sup> weitgehend unbekannter Ätiologie mit einem obligaten Erkrankungsbeginn vor dem 16. Lebensjahr und einer Erkrankungsdauer von mindestens 6 Wochen. In Einzelfällen können auch akute Arthritiden eine solche Dauer haben. Die endgültige Diagnose kann deshalb oft erst im weiteren Verlauf bestätigt werden. Typische klinische Zeichen sind Funktionseinschränkungen an einem oder mehreren Gelenken, Schwellung, Überwärmung und Schmerzen (s. Abb. 2.5).

### 2.2.2.2 Epidemiologie

Mit einer Inzidenz<sup>11</sup> von circa 1:1000 Kindern/Jahr ist die akute Arthritis (z. B. die Coxitis fugax) die häufigste Arthritis bei Kindern. Aber auch die Juvenile Idiopathische Arthritis hat

<sup>10</sup>Definition (Arthritis): entzündliche Schwellung oder Bewegungseinschränkung eines Gelenkes mit Schmerzen

<sup>11</sup>Anzahl der Neuerkrankungsfälle in einem Jahr

eine recht hohe Inzidenz. Diese wird international mit jährlich 12 - 19 Erkrankungen pro 100.000 Kindern angegeben. In Deutschland ist sie wahrscheinlich niedriger und liegt im Bereich von 3,5 bis 6,6 Erkrankungen pro 100.000 Kindern jährlich. Auch die Prävalenzdaten sind extrem abhängig von der betrachteten Population, den Erfassungsmethoden und den verschiedenen Klassifikationen (und Nomenklaturen). Dies muss man beim Betrachten der Zahlen berücksichtigen. International liegt die Prävalenz<sup>12</sup> zwischen 56 und 113 pro 100.000 Kindern (unter 16 Jahren). In Deutschland liegt die Prävalenz im Bereich von 14,8 bis 20 pro 100.000 Kindern [66, 70, 116]. Anhand dieser Zahlen sind (geschätzte) 4000 - 5000 Kinder in Deutschland erkrankt und zusätzlich treten jährlich 750 - 1000 Neuerkrankungen auf.

### 2.2.2.3 Klinische Symptomatik

Die Symptomatik der Gelenkentzündung lässt sich aufgrund der autoaggressiven Immunreaktion (Produktion von Zytokinen, Prostaglandinen und Leukotrienen) erklären. Durch die Zytokinproduktion kommt es zu einer Synoviahypertrophie und aus dieser kann ein destruierend wachsender Pannus entstehen. Durch die invasiv wachsende Synoviahypertrophie mit anschließender Knorpel- und Knochenzerstörung kommt es zu der typischen Verkleinerung des Gelenkspalts. Die vielen eingewanderten Entzündungszellen bewirken die typischen Entzündungszeichen Rötung, Überwärmung, Schmerz und Schwellung (durch den Gelenkerguss). Letztlich kommt es zu Bewegungseinschränkungen der Gelenke, die bis zum völligen Funktionsverlust und zur Einsteifung (Ankylose) mit Fehlstellungen führen können. Am häufigsten ist dabei das Kniegelenk betroffen, deutlich weniger häufig besteht die Erkrankung in einem Sprunggelenk oder in einem Ellenbogengelenk. Das Hüftgelenk ist nur sehr selten entzündet [119].

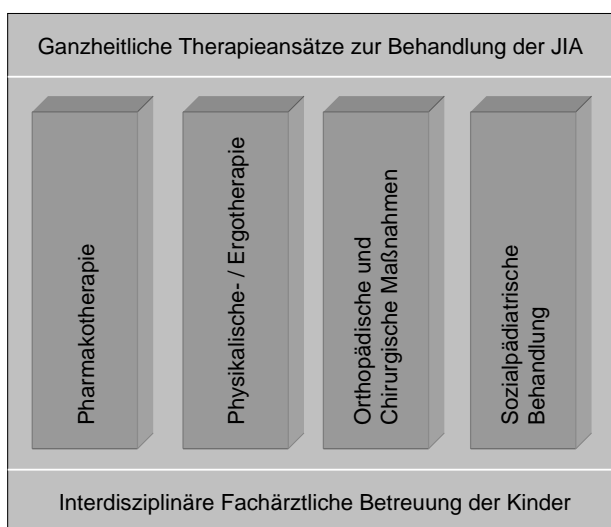
### 2.2.2.4 Therapie

Bei der JIA handelt es sich um eine heterogene Gruppe schwerwiegender Erkrankungen. Da für diese leider (noch) keine kausale Therapie möglich ist, ist es sehr wichtig, neben einer reinen Pharmakotherapie ein ganzheitliches Behandlungskonzept zu verfolgen (s. Abb. 2.6). Bei der Pharmakotherapie sind einige Punkte zu beachten. Generell stehen zwar dieselben Medikamente wie bei der Behandlung der Rheumatoiden Arthritis des Erwachsenen zur Verfügung, allerdings sind nur wenige Medikamente für den Einsatz an Kindern (Alter < 18 Jahre) getestet bzw. zugelassen. Deren Einsatz birgt besondere Risiken und muss gut überlegt sein. Auch deshalb gilt das generelle Prinzip, dass einem größtmöglichen therapeutischen Effekt ein möglichst kleines Risiko gegenüberstehen muss.

---

<sup>12</sup>Anzahl der Erkrankten zu einem bestimmten Zeitpunkt („Krankenstand“)





**Abbildung 2.6:** Ein ganzheitliches Therapiekonzept umfasst neben der notwendigen Pharmakotherapie auch eine Physiotherapie (evtl. mit Ergotherapie, Orthesenversorgung). Hierdurch sollen Bewegungseinschränkungen und dadurch bedingte Schonhaltungen vermindert werden. Primäres Ziel ist es, Gelenkfehlstellungen zu vermeiden und die volle Beweglichkeit zu erhalten. Falls Kontrakturen auftreten, müssen ggf. Schienen angepasst werden oder chirurgische Maßnahmen ergriffen werden (Synovektomie, Gelenkersatz, Arthrodesen). Auch eine sozialpädiatrische Behandlung mit einer psychologischen Betreuung der Patienten und Eltern, einer Förderung der schulischen Integration sowie verschiedener Therapien (Musik-, Mal-, Clowntherapie) ist wichtig.

Um dies zu ermöglichen, folgt die Therapie einem Stufenschema. Man beginnt mit nicht-steroidalen Antirheumatika (NSAR) zur antiphlogistischen und analgetischen Therapie (für Kinder geeignet sind: Diclofenac, Ibuprofen, Indometacin, Naproxen). Reichen dessen Wirkungen nicht, muss man frühzeitig auf Basistherapeutika zurückgreifen. Hierunter versteht man eine Medikamentengruppe, die den destruktiven Krankheitsverlauf positiv beeinflussen und bestenfalls eine Remission erreichen kann. Es sind Langzeittherapeutika, deren Einsatz aber auch großes kinderrheumatologisches Wissen und Erfahrung voraussetzt. Zum Einsatz kommen hierbei Methotrexat, Leflunomid, Azathioprin und Sulfasalazin. Chloroquin und Ciclosporin A werden nur noch sehr selten eingesetzt. Glukokortikoide (primär Kortison) können in schweren Fällen (z. B. bei einer Polyarthritis) aufgrund ihrer ausgezeichneten antiphlogistischen und antipyretischen Wirkungen systemisch als Stoßtherapie oder bei oligoartikulären Verläufen im Rahmen einer Erguss-Punktion auch intraartikulär appliziert werden. Zu beachten sind v. a. bei Kindern deren ausgeprägte Nebenwirkungen (katabole Wirkung bis zum Wachstumsstillstand, Gefahr von Hüftkopfnekrosen, sowie nach kurzer Zeit entstehende Kortisonabhängigkeit durch akute NNR-Insuffizienz).

Ein weiterer interessanter Ansatzpunkt für die Pharmakotherapie sind die an der Pathogenese beteiligten Zytokine. Unter anderem spielt das proinflammatorische Zytokin TNF- $\alpha$  eine wichtige Rolle, deshalb wurden u. a. der Zytokinhemmstoff (löslicher TNF- $\alpha$ -Rezeptor) Etanercept (Enbrel) entwickelt. Er ist seit 2000 in Deutschland zugelassen und gehört zu der Medikamentengruppe der Biologika. Als Indikation gelten alle JIA Kategorien mit mehr als 4 betroffenen Gelenken. Eine bei 69 Kindern durchgeführte kontrollierte Enbrel Studie ergab im Jahr 2000 bei 86 % der Kinder einen Therapieerfolg [80], bei 70 % immerhin eine deutliche Besserung. Auch andere TNF- $\alpha$  Antagonisten wie Infliximab (Antikörper gegen

TNF- $\alpha$ ) kommen, besonders bei therapieresistenten Arthritiden, zum Einsatz [28]. Bei therapieresistenten Verläufen (z. B. schwere Ausprägungen des M. Still) sind zunehmend auch Stammzelltransplantationen im Gespräch und in Erprobung.

### 2.2.2.5 Prognose und Verlauf

Die Prognosen bei kindlichen chronischen Arthritiden sind generell eher günstiger als bei der Rheumatoiden Arthritis des Erwachsenen. Deshalb ist es sehr wichtig, bleibende Schäden zu verhindern (Schäden an Augen und Gelenken, Kleinwuchs durch Kortison). Es werden Remissionsraten<sup>13</sup> von 23 - 88 % erzielt [82], nach 5 - 15 Jahren sind es immer noch 50 - 60 %. Die verschiedenen Kategorien der JIA haben hierbei auch unterschiedliche Komplikationsrisiken. So besteht bei der Oligoarthritis (bei frühkindlichem Beginn) primär die Gefahr der chronischen Iridozyklitis und beim M. Still vor allem die Problematik des Kleinwuchses (durch Kortisontherapie und anhaltende Krankheitsaktivität).

## 2.2.3 Einteilung in Kategorien (nach ILAR)

### 2.2.3.1 Terminologie

Obwohl sich bereits seit über zehn Jahren (1994) eine internationale Expertenkommission bemüht, eine international gültige Einteilung und Nomenklatur zu schaffen, ist dies immer noch nicht abschließend geglückt. Seit 2001 existiert die 3. Fassung dieser ILAR<sup>14</sup>-Einteilung, welche den Begriff der *Juvenilen Idiopathischen Arthritis* einführt und dessen Einteilung in Kategorien festgelegt hat.

Vor allem im amerikanischen Sprachraum konnte sich diese Einteilung noch nicht generell durchsetzen, so dass hier immer noch der Begriff der *Juvenile Rheumatoide Arthritis* (JRA) der ACR<sup>15</sup> Verwendung findet. Die europäische Einteilung der EULAR<sup>16</sup> unter dem Überbegriff *Juvenile Chronische Arthritis* wurde bereits weitgehend zugunsten der JIA aufgegeben. Tabelle 2.3 liefert einen kurzen Überblick darüber und stellt klar, dass die verschiedenen Begriffe aufgrund grundlegender Unterschiede leider nicht synonyme Verwendung finden können. So beinhaltet die JRA weder die Psoriasis-Arthritis noch Enthesitis bezogene Arthritiden. Diese sind wiederum in den Gruppen der Juvenilen Idiopathischen Arthritis (nach ILAR) enthalten. Auch für die Erhebung internationaler epidemiologischer Daten sollte des-

---

<sup>13</sup>abhängig von der Selektion des Krankengutes und der Beobachtungsdauer

<sup>14</sup>International League of Associations for Rheumatology

<sup>15</sup>American College of Rheumatology

<sup>16</sup>European League against Rheumatism

halb nur noch die aktuell gültige Fassung der ILAR Einteilung verwendet werden. Dementsprechend wurde in dieser Arbeit diese Einteilung verwendet.

**Tabelle 2.3:** Divergierende Klassifikationen der „kindlichen chronischen Arthritis“ (EOPA = early onset pauciarticular arthritis; LOPA = late onset pauciarticular arthritis) [99].

<b>Klassifikation</b>	<b>ACR</b>	<b>EULAR</b>	<b>ILAR</b>
	JRA= Juvenile Rheumatoid-Arthritis	JCA = Juvenile Chronische Arthritis	JIA = Juvenile Idiopathische Arthritis
<b>Subgruppen:</b>			
	Systemform	systemische JCA	Systemform
	polyartikuläre JRA	polyartikuläre JCA (RF-negativ) polyartikuläre JCA (RF-positiv)	polyartikuläre Form (RF-negativ) polyartikuläre Form (RF-positiv)
	pauciartikuläre JRA	Oligoarthritis ° Frühform (EOPA-Typ) ° Spätform (LOPA-Typ)	oligoartikuläre Form ° persistierend ° extendierend
		juvenile Psoriasis-Arthritis	Psoriasis-Arthritis
		juvenile ankylosierende Arthritis	Enthesitis-bezogene Arthritis
			andere Arthritiden

### 2.2.3.2 Einteilung

Definitionen der einzelnen Subtypen der JIA:

1. **Systemische Arthritis/Syn. Still-Syndrom (7 - 10 %): ICD10 = M08.2**

⇒ Arthritis in einem oder mehreren Gelenken *und* Fieber (2 Wochen lang, an mindestens 3 Tagen intermittierend  $\geq 39^\circ\text{C}$ ) *und* Exanthem, generalisierte Lymphknotenschwellung, Hepato-/Splenomegalie oder Serositis.

Charakteristika: Mädchen = Jungen; bei  $\frac{2}{3}$  Beginn im Kleinkindalter; Organmanifestationen: Polyserositis, Perikarditis, Hepatosplenomegalie, LK- Schwellungen. *Exklusionen: a, b, c, d*

2. **RF-negative Polyarthritis (10 - 15 %): M08.3**

⇒ Arthritis mit  $\geq 5$  betroffenen Gelenken

Charakteristika: Mädchen > Jungen; kein bestimmtes Alter bevorzugt; symmetrischer Gelenkbefall. *Exklusionen: a, b, c, d, e*

3. **RF-positive Polyarthritis (3 - 5 %): M08.0**

⇒ Arthritis mit  $\geq 5$  betroffenen Gelenken *und* mindestens zweimal in den ersten 6 Erkrankungsmona-

ten Rheumafaktor<sup>17</sup>-positiv getestet (im Abstand von 3 Monaten)

Charakteristika: Mädchen >> Jungen; Alter > 10 Jahren; symmetrischer Gelenkbefall; häufig HLA-DR4 positiv; aggressiver gelenkdestruierender Verlauf. *Exklusionen:* **a, b, c, e**

**4. Oligoarthritis (50 %): M08.4**

⇒ Arthritis, mit 1 - 4 betroffenen Gelenken in den ersten 6 Erkrankungsmonaten.

a.) persistierend: ⇒ im Verlauf max. 4 Gelenke betroffen.

b.) extendend: ⇒ nach den ersten 6 Monaten > 4 Gelenke betroffen.

*Exklusionen:* **a, b, c, d, e**

**5. Psoriasis-Arthritis (5 - 10 %): M09.0**

⇒ Arthritis kombiniert mit einer Psoriasis oder eine Arthritis *und* mindestens zwei Nebenkriterien (Daktylitis, Nagelauffälligkeiten (Tüpfel/Onycholyse) oder bestätigte Psoriasis bei einem Angehörigen 1. Grades). *Exklusionen:* **b, c, d, e**

**6. Enthesitis-assoziierte Arthritis (10 - 15 %): M08.1**

⇒ 1. Arthritis mit einer Enthesitis oder 2. Arthritis oder Enthesitis *und* mindestens zwei Nebenkriterien (Druckschmerz über den Iliosakralgelenken/entzündlicher Rückenschmerz im Lumbosakralbereich (aktuell oder anamnestisch), HLA-B27-Nachweis, Junge mit Erkrankungsalter > 6 Jahre, Ankyl. Spondylitis, Enthesitis-assoziierte Arthritis, Sakroiliitis bei entzündlichen Darmerkrankungen, Reiter-Syndrom oder akute anteriore Uveitis bei einem Angehörigen 1. Grades). *Exklusionen:* **a, d, e**

**7. Andere Arthritiden: M08.8**

⇒ Arthritis, bei der entweder keine oder mehrere der o. g. Kategorien zutreffen.

Die Juvenile Idiopathische Arthritis umfasst mehrere Krankheitsentitäten (Kategorien). Die Erkrankung wird innerhalb der ersten 6 Monate anhand der artikulären und extraartikulären Symptome einer dieser 7 Kategorien zugeordnet (Einteilung nach ILAR, modifiziert nach [101]). Hierbei spielen auch das Geschlecht, Anzahl und Muster der befallenen Gelenke, Beteiligung innerer Organe, Fieber, Exantheme, Psoriasis und Laborbefunde eine Rolle. Wichtig ist, dass sich die genannten Kategorien gegenseitig ausschließen und jede Kategorie auch eine Reihe von Exklusionen<sup>18</sup> aufweist:

- a** Psoriasis oder Psoriasis-Anamnese beim Patient oder Verwandten 1. Grades
- b** Beginn der Arthritis nach dem 6. Lebensjahr bei HLA-B27 positiven Jungen
- c** Erkrankungen bei einem Verwandten 1. Grades: ankylosierende Spondylitis, Enthesitis-assoziierte Arthritis, Sakroiliitis bei entzündlicher Darmerkrankung, Reiter-Syndrom od. akute Uveitis anterior
- d** IgM-Rheumafaktor mindestens 2-mal nachgewiesen im Abstand von 3 Monaten
- e** Vorliegen einer systemischen JIA beim Patienten

---

<sup>17</sup>Rheumafaktoren (RF) sind Immunglobuline (IgM), die an die Fc-Region von IgG binden.

<sup>18</sup>= Ausschlusskriterien

Weiterhin ist zu beachten, dass die JIA eine Ausschlussdiagnose ist. Aus diesem Grund müssen andere Erkrankungen mit Gelenkbeschwerden vor Diagnosestellung ausgeschlossen werden. Darunter fallen Infekt assoziierte Arthritiden (reaktive, virale, para- und postinfektiöse, Lyme-Athritis, rheumatisches Fieber), Autoimmunerkrankungen und Vaskulitiden (Systemischer Lupus-erythematoses, Dermatomyositis, Purpura Schönlein-Henoch, Kawasaki-Syndrom), aber auch Erkrankungen wie das Familiäre Mittelmeerfieber, Knochentumore, Osteomyelitiden und chronische Prozesse (Tuberkulose u. ä.).

### 2.2.4 Pathogenese und Ätiologie

Die Pathogenese und Ätiologie der Juvenilen Idiopathischen Arthritis sind noch immer weitgehend ungeklärt. Grundlage der JIA ist eine Immunreaktion der Synovia, welche wahrscheinlich T-Zell vermittelt ist [44, 143]. Man geht davon aus, dass genetische Faktoren z. B. MHC im Zusammenspiel mit exogenen Faktoren die Erkrankung verursachen. Es handelt sich hierbei vermutlich um einen komplexen genetischen Hintergrund [93], wobei sich die unterschiedlichen Subtypen (Kategorien) der JIA durchaus unterschiedlich verhalten. So ergaben Studien für den frühkindlichen Typ<sup>19</sup> der Oligoarthritis gewisse Assoziationen mit bestimmten MHC Molekülen [3]. Neben genetischen Faktoren scheint auch das Entgleisen diverser Regulationsmechanismen, welche normalerweise supprimierend auf die autoaggressiven Tendenzen des Immunsystems wirken, eine Rolle zu spielen. So kann die Immunantwort über Zytokine (z. B. TNF- $\alpha$  und TGF- $\beta_1$ ) oder auch über regulatorische T-Zellen (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high+</sup>, T<sub>regs</sub>) moduliert werden [57, 120]. Erfolgreiche Therapieansätze mit TNF- $\alpha$ -Antagonisten deuten darauf hin, dass u. a. diesem Zytokin eine Schlüsselrolle zukommt [28, 36] (s. 2.2.2.4). Auch für TGF- $\beta_1$  wurde gezeigt, dass das immuninhibitorische Zytokin eine Schlüsselrolle in der T-Zellhomöostase einnimmt. Im Mausmodell führt die systemische Applikation von TGF- $\beta_1$  zu einer deutlichen Verbesserung der Arthritis und die Verabreichung von TGF- $\beta_1$ -Antikörpern zu einer Verschlechterung des Krankheitsbildes [72, 132]. TGF- $\beta_1$  knockout Mäuse (-/-) leiden an einer ausgeprägten Multisystemerkrankung [71, 121].

Bei Patienten, die an anderen chronisch-entzündlichen Erkrankungen, wie dem M. Crohn oder der Colitis Ulzerosa, erkrankt sind, wurde in verschiedenen Arbeiten erstaunlicherweise eine Erhöhung des (immuninhibitorischen) TGF- $\beta_1$  in der Darmmukosa nachgewiesen [6, 37, 92]. Dieser erhöhte Wert kommt wahrscheinlich durch einen Defekt in der Signalkaskade des TGF- $\beta_1$  zustande (Mangel an inhibitorischen Smad7 [92], s. 2.2.4.1).

---

<sup>19</sup>gemäß EULAR Einteilung

**Tabelle 2.4:** T-Helferzellen

Zellen	Th0	Th1	Th2
Zytokine	IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5	IFN- $\gamma$ , IL-2	IL-4, IL-5

Auch T-Helferzellen spielen eine Rolle bei der Pathogenese. Sie lassen sich anhand ihres Zytokinmusters in Th1- und Th2-Zellen weiter unterscheiden (s. Tab. 2.4). Th1-Zellen produzieren vorrangig IL-2 und IFN- $\gamma$ , wohingegen Th2-Zellen IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 produzieren [79]. Anhand von T-Zellklonen wurde diese Unterteilung definiert und in vivo bei diversen Autoimmunerkrankungen (Leishmaniose der Maus, Multiple Sklerose und der Rheumatoiden Arthritis) bestätigt. Inzwischen gibt es vermehrt Hinweise darauf, dass Th1-Zellen, die das proinflammatorische Zytokin IFN- $\gamma$  sezernieren, eine Schlüsselrolle einnehmen. Momentan geht man daher eher von einer Th1-Pathogenese der JIA aus [140, 142]. Es wurde auch gezeigt, dass TGF- $\beta_1$  die Proliferation von naiven T-Zellen und von Gedächtniszellen vom Th1-Typ hemmen kann. Aktivierte T-Zellen (und Th2-Zellen) gelten dagegen allerdings als weitgehend resistent gegenüber dem inhibitorischen Effekt von TGF- $\beta_1$  [55].

#### 2.2.4.1 Transforming growth factor- $\beta$

Es sind drei unterschiedliche Formen des Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) beim Menschen bekannt (TGF- $\beta_{1-3}$  [124]), wobei die Zellen des Immunsystems vor allem TGF- $\beta_1$  bilden. TGF- $\beta$  stammt aus einer Familie mit über 40 strukturell verwandten Polypeptiden, die ursprünglich vermutlich aus einem Gen entstanden sind. Ihren Namen tragen die Faktoren, da sie Rattenfibroblasten in Zellkultur morphologisch verändern können. Entweder fördern sie das Überleben von Zellen in Kultur oder sie wirken auf Fibroblasten als Wachstumsfaktoren. Durch diese Entdeckung gelang es, ein neues Konzept für das Verständnis der autokrinen und parakrinen Stoffwechselregulation zu gewinnen. Eine der wichtigsten Eigenschaften von TGF- $\beta$  ist seine immunregulatorische Wirkung. So reguliert TGF- $\beta_1$  die Migration, Adhäsion, Proliferation, Differenzierung und Apoptose der Zellen. Nach heutigem Verständnis spielt es eine entscheidende Rolle bei der Tumorgenese und der Entstehung von Autoimmunerkrankungen. Da TGF- $\beta_1$  in den meisten Zellen als Wachstumsinhibitor wirkt, hemmt es das Tumorstadium maligner Zellen [146], kann andererseits aber auch deren Metastasierung fördern [2].

TGF- $\beta_1$  hat eine sehr entscheidende Funktion bei der T-Zell Homöostase: so leiden TGF- $\beta_1$  knockout Mäuse (-/-) unter einer ausgeprägten Multisystemerkrankung [71, 121]. TGF- $\beta_1$

wird von nahezu allen Leukozyten gebildet [77], insbesondere von Monozyten, Makrophagen, antigen-stimulierten T-Zellen sowie von regulatorischen T-Zellen. Es ist auch in großer Menge in Thrombozyten enthalten und wird bei der Blutgerinnung freigesetzt.

Spezifische membranständige Glykoproteinrezeptoren (TGF- $\beta$ -Rezeptor Typ I - III) vermitteln die Effekte von TGF- $\beta$ . Typ-III-Rezeptoren können selbst keine Signale transduzieren, aber sie können TGF- $\beta$  lokal anreichern und so die Wirkung über die Typ-I- und Typ-II-Rezeptoren modulieren. TGF- $\beta$  bindet zunächst an den Typ-II-Rezeptor, anschließend kommt es zu Wechselwirkungen zwischen dem Komplex (TGF- $\beta$ /Typ-II-Rezeptor) und dem Typ-I-Rezeptor. Hierdurch wird der Typ-I-Rezeptor aktiviert und phosphoryliert anschließend ein rezeptorreguliertes Smad<sup>20</sup>-Protein (R-Smad). Dieses R-Smad bindet an ein Co-Smad (Smad 4) und wandert als Komplex in den Zellkern [5, 29]. Dort bindet es an Transkriptionsfaktoren, welche die Genexpression regulieren [85]. Smads lassen sich nach strukturellen und funktionellen Aspekten in mehrere Klassen unterteilen:

- Rezeptorregulierte Smad-Proteine (R-Smads): Smad 1, 2, 3, 5 und 8
- Kooperative Smad-Proteine (Co-Smads): Smad 4
- Inhibitorische Smad-Proteine (I-Smads): Smad 6 und 7 [49]

Die I-Smads wirken antagonistisch zu R- und Co-Smads und können die Wirkung von TGF- $\beta_1$  abschwächen, indem sie R-Smads (2, 3) inhibieren [5]. Auch andere Proteine können die TGF- $\beta$  Signalkaskade unterbrechen, so kann beispielsweise das zytosolische Protein FKBP12<sup>21</sup> an den Typ-I-Rezeptor binden und dadurch die Phosphorylierung durch den Typ-II-Rezeptor verhindern [22].

Der biologische Effekt von TGF- $\beta_1$  hängt vom Zelltyp, den Wachstumsbedingungen und dem Differenzierungsgrad [43] der Zielzelle ab. So kann TGF- $\beta$  die Proliferation und Differenzierung von B-Lymphozyten, NK-Zellen und zytotoxischen T-Zellen hemmen und ebenso die Zytokinproduktion und die IL-2 abhängige T-Zellproliferation blockieren. TGF- $\beta_1$  kann auch die Proliferation von naiven T-Zellen und von Gedächtniszellen (Th1-Typ) hemmen. Aktivierte T-Zellen und Th2-Zellen dagegen sind resistent gegenüber dem inhibitorischen Effekt von TGF- $\beta_1$  [54]. Es gibt andere Forschungsgruppen, die zeigen, dass die regulatorische Aktivität der regulatorischen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high+</sup>-T-Zellen durch auf der Oberfläche gebundenes TGF- $\beta_1$  vermittelt wird [57, 95].

Auch die T-Zell abhängige Produktion von Antikörpern (durch B-Lymphozyten), die Entstehung zytotoxischer T-Zellen und die Aktivierung von Makrophagen kann durch TGF-

---

<sup>20</sup>SMAD: Signalübertragungsprotein, die Abkürzung ist eine Fusion aus den Nematoden Genen SMA 2, 3 und 4 sowie dem Drosophilagen MAD (mothers against decapentaplegic)

<sup>21</sup>FKBP12: 12-kDa großes FK506-bindendes Protein

$\beta_1$  verhindert werden [52]. Hierdurch ergeben sich Auswirkungen auf die Synthese proinflammatorischer Zytokine und die Hochregulation von MHC-II-Molekülen. Insgesamt wirkt TGF- $\beta_1$  daher der Entzündungsreaktion und der Immunantwort entgegen (= antiinflammatorischer Effekt).



## 3 Zielsetzung

In anderen Arbeiten wurde gezeigt, dass es durch eine verminderte Wirkung des inhibitorischen Zytokins TGF- $\beta_1$  bei Erkrankungen wie dem Morbus Crohn oder der Colitis Ulzerosa zu einer chronischen Entzündungsreaktion kommt. Daraus lässt sich schließen, dass ähnliche dysregulative Mechanismen auch bei der Juvenilen Idiopathischen Arthritis (JIA) eine wichtige Rolle spielen könnten. Zu diesem Zweck wird in dieser Studie die Wirkung von TGF- $\beta_1$  auf periphere und synoviale T-Zellen von Patienten, die an der Juvenilen Idiopathischen Arthritis erkrankt sind, untersucht. Hierfür werden durch therapeutische bzw. diagnostische Punktion in Tübingen (Frau Dr. Jasmin Kuemmerle-Deschner) und in Stuttgart (Herr Prof. Günther E. Dannecker) Proben von Kindern mit JIA gewonnen. Eine Genehmigung der Ethikkommission liegt vor.

### Phänotypisierung der T-Zellen

Um die Zellen hinsichtlich ihrer Art zu bestimmen, erfolgt eine phänotypische Charakterisierung. Gleichzeitig werden hierbei auch der Aktivierungszustand (CD69 und CD45RO) der Zellen, das Vorhandensein von regulatorischen T-Zellen (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high+</sup>) und die Anwesenheit des TGF- $\beta$ -Rezeptors-II bestimmt. Die T-Zellen werden mittels diskontinuierlicher Dichtegradientenzentrifugation (Ficoll) aus Blut und SF isoliert, mit fluoreszenz-markierten monoklonalen Antikörpern gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch charakterisiert (CD4, CD8, CD45RO, CD69, CD25, HLA-DR, TGF- $\beta$ -R-II).

### Zytokinsekretionsassay

T-Helferzellen lassen sich anhand ihres Zytokinmusters in Th1-, Th2- und dem Mischtyp Th0-Zellen unterscheiden. Th1-Zellen produzieren vorrangig IL-2 und IFN- $\gamma$ , wohingegen Th2-Zellen IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 produzieren. Für die Pathogenese der JIA gibt es Hinweise, dass Th1-Zellen, die u. a. das proinflammatorische Zytokin IFN- $\gamma$  sezernieren, eine Schlüsselrolle einnehmen. Um dies zu zeigen, soll die Zytokinsekretion von IL-4 und IFN- $\gamma$  bestimmt werden.

### **Effekte von TGF- $\beta_1$ auf die Proliferation**

TGF- $\beta_1$ , ein Zytokin mit pleiotropen Funktionen, kann sowohl die Proliferation naiver T-Zellen als auch die von Gedächtniszellen vom Th1-Typ hemmen, wohingegen aktivierte T-Zellen als resistent gegenüber dem inhibitorischen Effekt von TGF- $\beta_1$  gelten. Wahrscheinlich kann ebenso die Aktivität der  $T_{regs}$  durch an der Oberfläche gebundenem TGF- $\beta_1$  beeinflusst werden. Ziel ist es, die Effekte von TGF- $\beta_1$  auf die Proliferation von T-Zellen der verschiedenen Verlaufsformen der JIA zu untersuchen. Dies ist von besonderem Interesse, da die Subtypen sehr stark in ihrer Prognose variieren. Gleichzeitig soll gezeigt werden, ob sich T-Zellen des Blutes von T-Zellen der Synovialflüssigkeit hinsichtlich ihrer Proliferation mit oder ohne TGF- $\beta_1$  unterscheiden. Die Proliferationsrate soll mittels CFSE-Assay nach 5 Tagen gemessen werden. Durch Nachweis des TGF- $\beta$ -Rezeptor-II wird geklärt, ob eine Grundvoraussetzung für das Ansprechen auch TGF- $\beta_1$  gegeben ist.

# 4 Material und Methoden

## Vorbemerkungen

In dieser Arbeit werden gesetzlich geschützte Warenzeichen *ohne* besondere Kennzeichnung verwendet. Um die Übersichtlichkeit zu verbessern, werden allgemein gebräuchliche Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien ohne spezifische oder relevante Eigenschaften für diese Arbeit nicht explizit aufgeführt. Hierunter fallen Pipetten, Waagen, Wasserbad, Vortexer etc., welche bei den Firmen EPPENDORF, GILSON und HEIDOLPH erworben wurden. Ebenso wird verfahren mit Verbrauchsmaterialien wie Pipettenspitzen, Falcon-Röhrchen, EpiCups der Firmen SIGMA, BIOCHROM, MERCK und ROTH.

## 4.1 Material

### 4.1.1 Standardverbrauchsmaterialien

<b>48 Loch-Flachbodenplatte steril</b>	COSTAR (Corning Incorporated)
<b>96 Loch-Flachbodenplatte steril</b>	COSTAR (Corning Incorporated)
<b>96 Loch-Rundbodenplatte steril</b>	CELLSTAR, GREINER-BIO ONE
<b>anti-CD3 Antikörper, OKT3 Orthoclone</b>	JANSSEN-CILAG GmbH
<b>FACS Flow</b>	BECTON DICKINSON
<b>FCS, Fötale Kälberserum</b>	BIOCHROM AG
<b>HEPES (1 M)</b>	BIOCHROM AG
<b>Human Pooled Serum (HPS)</b>	Humanes Serum, eigene Herstellung im Labor - s. 4.4.2.1
<b>L-Glutamin (200 mM)</b>	BIOCHROM AG

<b>PBS Puffer (ohne Ca und Mg)</b>	BIOCHROM AG
<b>Penicillin/Streptomycin (10.000 IE , 10 mg/ml)</b>	BIOCHROM AG
<b>Propidium Iodid</b>	BD BIOSCIENCE
<b>RPMI 1640 mit 2 g/l NaHCO<sub>3</sub></b>	BIOCHROM AG
<b>Zellkulturmedium</b>	RPMI 1640 supplementiert mit Glutamin, Penicillin, Streptomycin, HEPES und 5 % Human Pooled Serum, s. 4.4.2

#### 4.1.2 Standardgeräte

<b>Beckman L8-70M Ultrazentrifuge + Rotor TI 60</b>	BECKMAN
<b>Brutschrank HeraCell, eingestellt auf 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub></b>	HERAEUS
<b>Durchflusszytometer (FACS Calibur)</b>	BECTON DICKINSON
<b>Rotixa 50RS Zentrifuge</b>	HETTICH
<b>Umkehrmikroskop LM Olympus IX50</b>	OLYMPUS

#### 4.1.3 Antikörper

In mehreren Versuchen wurden Zellen mit fluoreszenz-markierten Antikörper zur Charakterisierung mittels Durchflusszytometrie gefärbt. Informationen zu Art des Antigens, dem Klon und Hersteller sind in Tab. 4.1 enthalten.

#### 4.1.4 Material für die T-Zellisolierung

<b>Ficoll-Trennlösung (Biocoll separating solution)</b>	BIOCHROM AG
<b>Zellzählgerät COBAS Micro</b>	ROCHE DIAGNOSTICS
<b>Trypanblau</b>	ROTH

**Tabelle 4.1:** Fluoreszenz, Marker, Klon, Isotyp und Hersteller der verwendeten monoklonalen Antikörpern

<b>Fluoresz.</b>	<b>Marker</b>	<b>Klon</b>	<b>Isotyp</b>	<b>Hersteller</b>
<b>PE</b>	CD4	RPA-T4	Mouse IgG1, k	BD Pharmingen
	CD19	SJ25C1	Mouse IgG1, k	BD Pharmingen
	CD25	2A3	Mouse IgG1, k	BD IS
	CD45RO	UCHL-1	Mouse IgG2a, k	BD IS
	CD69	L78	Mouse IgG1	BD IS
	HLA-DR	L243	Mouse IgG2a	BD IS
	IgG1			BD
	TGF- $\beta$ R2	25508	Mouse IgG1	RD Systems
<b>PE/ FITC</b>	Simultest $\gamma$ 1/ $\gamma$ 2a	X39, X40	(IgG1-FITC, IgG2a-PE)	BD IS
<b>FITC</b>	CD3	UCHT1	Mouse IgG1, k	BD Pharmingen
	CD4	RPA-T4	Mouse IgG1, k	BD Pharmingen
	CD8	HIT8a	Mouse IgG1, k	BD Pharmingen
	CD14	M5E2	Mouse IgG2a, k	BD Pharmingen
<b>PerCP</b>	CD3	SK7	Mouse IgG1, k	BD IS
	CD8	SK1	Mouse IgG1, k	BD IS
	CD14	MphiP9	Mouse IgG2b, k	BD IS
<b>APC</b>	CD4	SK3	Mouse IgG1	BD IS

#### 4.1.5 Material für die phänotypische Charakterisierung

Für die Phänotypisierung wurden die AK Simultest  $\gamma$ 1/ $\gamma$ 2a (-PE/FITC), IgG1-PE, anti-CD3-FITC, anti-CD8-FITC, anti-CD14-FITC, anti-CD4-PE, anti-CD45RO-PE, anti-CD69-PE, anti-CD25-PE, anti-HLA-DR-PE, anti-TGF- $\beta$ 1-RII-PE, anti-CD19-PE, anti-CD3-PerCP (jeweils 1  $\mu$ l pro FACS-Röhrchen) und anti-CD4-APC (0,7  $\mu$ l) Antikörper verwendet.

#### 4.1.6 Material für den Zytokinsekretionsassay

Für die FACS-Analyse wurden die fluoreszenz-markierten Antikörper Simultest  $\gamma$ 1/ $\gamma$ 2a (-PE/FITC), IgG1-PE, anti-CD3-FITC, anti-CD8-FITC, anti-CD14-FITC, anti-CD4-PE, anti-CD14-PerCP (jeweils 1  $\mu$ l) und anti-CD4-APC 0,7  $\mu$ l verwendet.

**anti-CD28 Antikörper** BD Pharmingen

**BSA (Fraktion V, Proteasen frei > 98 % )** ROTH

<b>CSA Puffer</b>	D-PBS pH 7.2 + 0,5 % BSA + 2 mM EDTA
<b>D-PBS</b>	GIBCO
<b>EDTA</b>	ROTH
<b>IFN-<math>\gamma</math> Zytokinsekretionsassay, Detection Kit (FITC)</b>	MILTENYI BIOTEC
<b>IL-4 Zytokinsekretionsassay, Detection Kit (PE)</b>	MILTENYI BIOTEC
<b>MACS mix, MX001 (Typ 001202)</b>	MILTENYI BIOTEC

#### 4.1.7 Material für den Thymidin-Proliferationsassay

<b>[methyl-3H] Thymidine Aqueous solution, 925 GBq/mmol</b>	AMERSHAM BIOSCIENCE
<b>Betaplatescint</b>	WALLAC SCINTILLATION PRODUCTS
<b>Filterpapier (Printed Filtermat A, Glass fibre filter, 90 x 120 mm)</b>	WALLAC SCINTILLATION PRODUCTS
<b>Flüssigkeits-Szintillator (Betaplate Scint)</b>	WALLAC SCINTILLATION PRODUCTS
<b>Heat Sealer (1295-012)</b>	WALLAC SCINTILLATION PRODUCTS
<b>Mikrowelle</b>	SIEMENS
<b>TRILUX, 1450 Microbeta (Liquid Scintillation &amp; luminescences counter)</b>	WALLAC SCINTILLATION PRODUCTS

#### 4.1.8 Material für den CFSE-Proliferationsassay

Für die FACS-Analyse wurden die fluoreszenz-markierten Antikörper CFSE, anti-CD4-PE, anti-CD8-PerCP (jeweils 1  $\mu$ l, außer CFSE) und anti-CD4-APC 0,7  $\mu$ l verwendet.

<b>CFSE = Carboxyfluoresceindiacetatsuccinimidylester</b>	MOLECULAR PROBES
<b>DMSO = Dimethylsulfoxid</b>	MERCK
<b>TGF-<math>\beta_1</math>(humanes, rekombinantes TGF-<math>\beta_1</math>)</b>	R&D

### 4.1.9 Verwendete Computerprogramme und Datenauswertung

Die mittels Durchflusszytometrie gewonnenen Daten wurden gespeichert und anschließend mit den Programmen WinMDI (für Windows) bzw. CellQuest (für Macintosh) ausgewertet. Für die statistische Auswertung wurden die Programme GraphPad PRISM Version 4.0 (GraphPad Software, Inc.) und JMP verwendet. Die Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Tina Herberts vom Institut für Medizinische Statistik der Universität Tübingen. Zum Erstellen dieser Arbeit wurden ferner das Programm  $\LaTeX$  sowie diverse frei verfügbare Hilfsprogramme (LaTable, TeXnic Center, JabRef, MikTeX) verwendet.

## 4.2 Patientenproben

Untersucht wurden T-Zellen aus Proben (jeweils Blut und Synovialflüssigkeit) von Kindern, die an der Juvenilen Idiopathischen Arthritis (nach ILAR-Definition) erkrankt sind. Hierfür lag die Zustimmung der Ethikkommission der Universität Tübingen sowie der Patienten vor. Die einzelnen Schritte der Aufarbeitung werden unter *Methoden* genannt. Leider war es nicht immer möglich, sämtliche Untersuchungen mit einer einzigen Probe durchzuführen, da sowohl die Volumina als auch die Anzahl der darin enthaltenen Zellen (vor allem in der Synovialflüssigkeit) starken Schwankungen unterlagen.

## 4.3 Firmenverzeichnis

### **Beckmann**

Beckman Coulter GmbH  
Europark Fichtenhain B13  
D-47807 Krefeld  
Tel: 021 513335  
Fax: 021 51333633

Fax: 0800 101 2427  
CSEurope@corning.com

### **Becton Dickinson**

BD Immunocytometry Systems  
BD Pharmingen  
Tullastraße 8-12  
D-69126 Heidelberg  
Tel: 06221 305 0  
Fax: 06221 305 216

### **Eppendorf**

Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH  
Peter-Henlein-Straße 2  
D-50389 Wesseling-Berzdorf  
Tel: 02232 418 0  
Fax: 02232 418 155  
vertrieb@eppendorf.de  
www.eppendorf.de

### **Biochrom AG**

Leonorenstraße 2-6  
D-12247 Berlin  
Tel: 030 779 906 0  
Fax: 030 771 001 2

### **Gibco**

Invitrogen GmbH  
Technologiepark Karlsruhe  
Emmy-Noether Straße 10  
D-76131 Karlsruhe  
Tel: 0800 083 09 02  
Fax: 0800 083 34 35  
euroinfo@invitrogen.com

### **Cellstar, Greiner Bio-One**

Greiner Bio-One GmbH  
Maybachstraße 2  
D-72636 Frickenhausen  
Tel: 07022 948 0  
Fax: 07022 948 514

### **Gilson**

Gilson International B.V.  
Laan van 's-Gravenmade 80  
2495 AJ DEN HAAG  
The Netherlands  
Tel: +31 70 307 36 00  
Fax: +31 70 307 36 99  
gilsoninternational@gilson.com

### **Costar**

Costar (Corning Incorporated)  
Corning B.V  
Life Sciences  
Koolhovenlaan 12  
1119 NE Schiphol-Rijk  
The Netherlands  
Tel: 0800 101 1153

### **Hettich AG**

Seestraße 204a  
CH-8806 Bäch  
Tel: +41 1 786 80 20  
Fax: +41 1 786 80 21  
info@hettich-ag.ch



**Invitrogen GmbH**

Technologiepark Karlsruhe  
Emmy-Noether Straße 10  
D-76131 Karlsruhe  
Tel: 0800 083 09 02  
Fax: 0800 083 34 35  
euroinfo@invitrogen.com

euroinfo@invitrogen.com

**R&D Systems GmbH**

Borsigstrasse 7  
D-65205 Wiesbaden-Nordenstadt  
Tel: 0800 909 4455  
Fax: 06122 909819  
infogmbh@RnDSystems.co.uk

**JANSSEN-CILAG GmbH**

Raiffeisenstraße 8  
D-41470 Neuss  
Tel: 02137 9 55-0  
Fax: 02137 9 55-3 27  
jancil@jacde.jnj.com  
www.janssen-cilag.de

**Roche Diagnostics**

Hoffmann-La Roche AG  
Emil-Barell-Straße 1  
D-79639 Grenzach-Wyhlen  
Tel: 07624 14 0  
Fax: 07624 14 3366

**Merck**

MERCK BIOSCIENCES GmbH  
Ober der Roeth 4  
D-65824 Schwalbach/Ts.  
Tel: 0800 6931 000  
Fax: 0800 62361 00  
customer.service@merckbiosciences.de  
www.merckbiosciences.de

**Roth**

Carl Roth GmbH + Co. KG  
Schoemperlenstraße 3-5  
D-76185 Karlsruhe  
Tel: 0721 5606 0  
Fax: 0721 5606 149  
info@carlroth.de  
www.carl-roth.de

**Miltenyi**

Miltenyi Biotec GmbH, Germany  
Friedrich-Ebert-Straße 68  
D-51429 Bergisch Gladbach  
Tel: 02204 8306 0  
Fax: 02204 85197  
macs@miltenyibiotec.de

**Sigma**

Sigma-Aldrich Laborchemikalien  
Wunstorferstraße 40  
D-30926 Seelze  
Tel: 05137 8238 0  
Fax: 05137 8238 120  
riedel@sial.com

**Molecular Probes**

Technologiepark Karlsruhe  
Emmy-Noether Straße 10  
D-76131 Karlsruhe  
Tel: 0800 083 09 02  
Fax: 0800 083 34 35

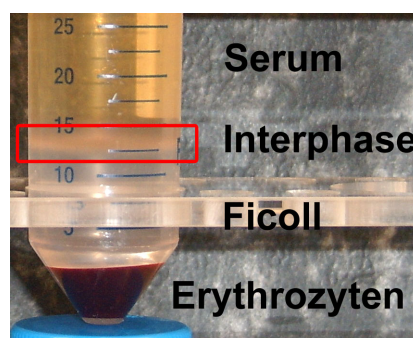
**Wallac Scintillation Products**

PerkinElmer LAS (Germany) GmbH  
Ferdinand Porsche Ring 17  
D-63110 Rodgau-Jügesheim  
Tel: 0800 1 81 00 32  
Fax: 0800 1 81 00 31  
cc.germany@perkinelmer.com

## 4.4 Methoden

### 4.4.1 Isolieren der T-Zellen aus den Proben

Mit Hilfe der diskontinuierlichen Dichtegradientenzentrifugation wurden aus den Proben die T-Lymphozyten bzw. die gesamten mononukleären Zellen (MNZ), welche zusätzlich auch B-Zellen, Monozyten, NK-Zellen und Thrombozyten enthalten, isoliert. Die Dichtegradientenzentrifugation erfolgte durch eine Ficoll-Trennlösung (Biocoll separation solution). Ficoll ist ein ungeladenes Polysaccharid, dessen Dichte (s. Tab. 4.2) so eingestellt ist, dass Erythrozytenaggregate und tote Zellen die Ficollschicht passieren. Granulozyten dringen in die Ficollphase ein, Lymphozyten sammeln sich in der Interphase (Phasengrenze zwischen Blutplasma und Ficoll) an und können dort leicht aufgenommen werden (s. Abb. 4.1).



**Abbildung 4.1:** Dichtegradientenzentrifugation mittels Ficoll

Die mit Natrium-Heparin antikoagulierte Probe (5 U/ml) wurde mit sterilem PBS 1:2 verdünnt und in ein 50 ml Falcon gegeben. Bei den Synovialflüssigkeiten erfolgte wegen der teilweise hohen Viskositäten eine höhere Verdünnung bis zu 1:4. Ansonsten wurde mit Blut und Synovialflüssigkeit (SF) gleich verfahren. In ein weiteres Falcon-Röhrchen wurden 15 ml Ficoll vorgelegt, vorsichtig und langsam mit der verdünnten Probe überschichtet und für 15 Minuten bei 2020 upm (entspricht 630 g) ohne Bremse zentrifugiert (Anlaufzeit 45 Sekunden, Raumtemperatur). Hierbei wurden die Zellen ihrer Dichte entsprechend aufgetrennt, so dass Lymphozyten vorsichtig mit einer Pipette aus der Interphase entnommen werden konnten. Aufgrund der zytotoxischen Eigenschaften des Ficolls wurde dieser in möglichst geringer Mengen mitaufgenommen. Als nächstes wurden die entnommenen Zellen mehrmals mit PBS + 2 % FCS gewaschen (1400 upm = 300 g, 6 min, Bremse auf 9) und in 10 ml PBS + 2 % FCS resuspendiert. Jetzt wurden 200  $\mu$ l der Zellsuspension entnommen, mit dem Zellzählgerät COBAS Micro (ROCHE DIAGNOSTICS) gezählt (zur Kontrolle teilweise auch manuell in der Neubauerkammer nach Trypanblau-Färbung) und die restlichen

<b>Blutbestandteile</b>	<b>Dichtebereich</b>	<b>Dichte</b>	<b>Tabelle 4.2: Dichtewerte der Blutbestandteile:</b> Deutlich erkennbar liegt der Ficoll zwischen der Dichte von Serum und Erythrozyten. Die Lymphozyten und Granulozyten liegen im Bereich der Dichte des Ficolls und sammeln sich daher in der Interphase (= Phasengrenze zwischen Blutplasma und Ficoll) an. Aus dieser Phase können sie nach der Dichtegradientenzentrifugation leicht mit einer Pipette entnommen werden. Werte in [g/cm <sup>3</sup> ] aus [81]
Plasma/Serum		1,026	
Thrombozyten	1,040 - 1,060	1,058	
Monozyten	1,059 - 1,068	1,065	
<b>Lymphozyten</b>	<b>1,066 - 1,077</b>	<b>1,070</b>	
Basophile	1,075 - 1,081	1,079	
Neutrophile	1,080 - 1,099	1,082	
Eosinophile	1,088 - 1,096	1,092	
Erythrozyten	1,090 - 1,110	1,100	
<b>Biocoll separating s. (Ficoll)</b>		<b>1,077</b>	

Zellen abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgeschüttet und die Zellpellets in PBS + 2 % FCS resuspendiert (Zellzahl eingestellt auf 10<sup>6</sup> Zellen/ml).

## 4.4.2 Zellkulturmedium

Für die T-Zellproliferationsexperimente, die Phänotypisierung und die Zytokinbestimmungen wurde ein Zellkulturmedium verwendet. Hierfür wurde RPMI 1640 mit Glutamin 2 mM, Penicillin 0,1 mg/ml, Streptomycin 0,1 mg/ml, HEPES 10 mM und 5 % Human Pooled Serum (Herstellung s. 4.4.2.1) versetzt. In diesem Medium wurden die isolierten Zellen (s. 4.4.1) für bis zu 5 Tage bei 5 % CO<sub>2</sub> und 37 °C im Brutschrank kultiviert.

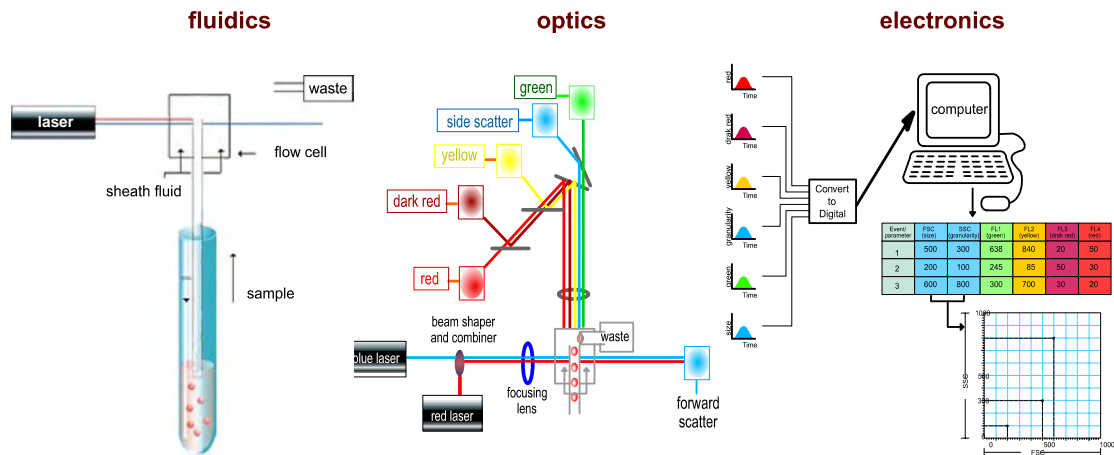
### 4.4.2.1 Herstellen des Human Pooled Serum (HPS)

Zur Gewinnung des HPS wurde von randomisierten Spendern jeweils 120 ml peripheres Blut abgenommen (ohne Zugabe von Antikoagulantien), sofort in 50 ml Falcons überführt und 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das geronnene Blut bei 3250 upm (= 1700 g) für 10 Minuten zentrifugiert, das Serum mit einer Pipette abgenommen und von allen Spendern gepoolt. Als nächstes wurde es bei 56 °C im Wasserbad für 30 Minuten durch Hitze inaktiviert, in Falcon Röhrchen aliquotiert und bei -20 °C tief gefroren. Nach Bedarf wurde es im Wasserbad zur sofortigen Verwendung aufgetaut.

## 4.4.3 Durchflusszytometrie - FACS

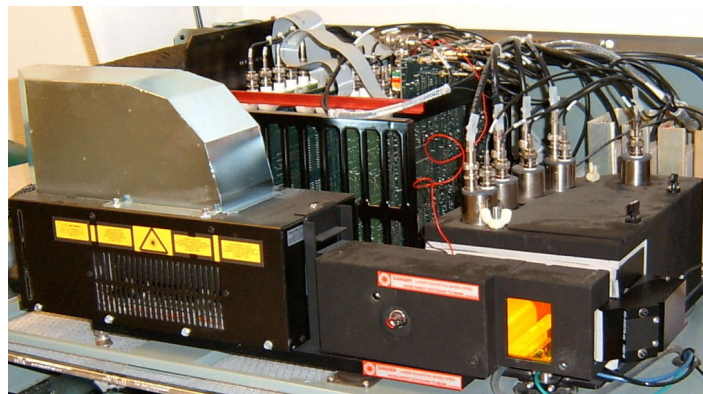
Die phänotypische Charakterisierung der T-Zellen, der Sekretionsassay und die CFSE-Proliferationsmessung erfolgte mit einem Durchflusszytometer (FACS). Eingesetzt wurde ein Vierfarbengerät (FACS Calibur), mit dem neben der Größe der Zellen (FSC) und ihrer

Granularität (SSC) gleichzeitig bis zu vier weitere Parameter über Fluoreszenzfarbstoffe bestimmt werden können.



**Abbildung 4.2: FACS-Calibur:** Dargestellt sind die drei Kernbestandteile einer Durchflusszytometrie. Die Aufnahme der flüssigen Probe mit den gelösten Zellen in einen laminaren Probenstrom, die optische zytometrische Analyse der einzelnen Zellen und die elektronische Datenverarbeitung, Speicherung und Auswertung der Daten. Quelle: [http://www.bdbiosciences.com/immunocytometry\\_systems/support/training/online/ITF/index.htm](http://www.bdbiosciences.com/immunocytometry_systems/support/training/online/ITF/index.htm)

Die fluoreszenz-markierten Zellen werden aus dem Proberöhrchen aufgenommen, in einer speziellen Flüssigkeit gelöst (FACS-Flow) und einzeln von einem Laserstrahl erfasst (s. Abb. 4.2). Hierfür wird ein komplexes optisches und elektronisches System aus Spiegeln, Filtern und einer Vielzahl an Elektronik notwendig (Abb. 4.3 liefert einen Blick in ein FACS-Calibur Gerät).



**Abbildung 4.3:** Innenansicht eines FACS-Calibur Gerät

Ein längs durch die Zelle treffender Laserstrahl liefert hierbei ein Maß für die Größe der Zelle (FSC), ein quer (90 °) auftreffender Strahl stellt ein Maß für die intrazelluläre Granularität (SSC) dar. So haben beispielsweise Granulozyten einen höheren SSC-Wert, und somit

eine höhere Granularität als T-Lymphozyten und es wird möglich, diese Zellen grob zu unterscheiden. Aus den beiden Lasern werden durch Polarisationsfilter, welche jeweils Licht einer bestimmten Wellenlänge passieren lassen, weitere Fluoreszenzkanäle gewonnen. Dadurch können die Emissionsbereiche von vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen gleichzeitig detektiert werden (Emissionsbereiche s. Tab. 4.3). In den Versuchen wurden FITC- (bzw. CFSE-), PE- (bzw. PI-), PerCP- und APC-Farbstoffe verwendet. Diese Fluoreszenzfarbstoffe sind an Antikörper gekoppelt, so dass es möglich wird Antigene mit einem Durchflusszytometer indirekt zu detektieren. Überlappungen der einzelnen Emissionsspektren wurden vor der Messung mit zusätzlich gefärbten Zellen (s. Tab. 4.4, Röhren 1 - 6) softwareunterstützt kompensiert. Die während der anschließenden Messungen gesammelten Daten wurden mit dem Computerprogramm CellQuest für eine spätere Auswertung gespeichert.

**Tabelle 4.3:** FACS: Emissionsspektren der verschiedenen Fluoreszenzen

<b>Fluoreszenzkanal</b>	<b>Farbstoff</b>	<b>Absorptionsmaximum</b>	<b>Emissionsmaximum</b>
FL 1	Fluoreszein-isothiocyanat (FITC)	495 nm	519 nm
FL 2	R-Phycoerythrin (PE)	480 / 565 nm	578 nm
FL 3	Peridinin-Chlorophyll-a (PerCP) Propidiumiodid (PI)	536 nm	617 nm
FL 4	Allophycocyanin (APC)	650 nm	660 nm

Bei dem Zytokinsekretionsassay (CSA) und dem CFSE-Proliferationsassay wurden zusätzlich tote Zellen durch eine Propidium-Iodid (PI) Färbung ausgeschlossen. Hierfür wurden unmittelbar vor der Durchflusszytometrie in jedes FACS-Röhren 1  $\mu$ l PI gegeben, mittels Vortexer durchmischt und für mindestens eine Minute auf Eis inkubiert. Da tote Zellen vermehrt PI binden, konnten diese erkannt werden und von der weiteren Auswertung ausgeschlossen werden.

#### 4.4.4 Färben der Zellen mit Antikörpern (Phänotypisierung)

Die Zellen wurden phänotypisch charakterisiert, indem sie mit fluoreszenz-markierten Antikörpern gefärbt und anschließend mit dem Durchflusszytometer untersucht wurden. Zur Phänotypisierung wurden  $10^5$  Zellen pro FACS-Röhren verwendet. Insgesamt wurden bei 6 Versuchen  $6 \times 10^5$  Zellen, jeweils aus Blut (s. Tab. 4.4, Röhren 7 - 12) und Synovialflüssigkeit (s. Tab. 4.4, Röhren 13 - 18) verwendet. Zusätzlich wurden noch ungefähr  $3 \times 10^5$  Zellen aus dem peripheren Blut für die Einstellung der FACS-Kompensation (Röhren 1 - 6) verwendet. Diese Zellen wurden in die FACS-Röhren überführt, abzentrifugiert und

**Tabelle 4.4:** FACS-Schema Phänotypisierung

		<b>FITC</b>	<b>PE</b>	<b>PerCP</b>	<b>APC</b>
<b>Einstell.</b>	<b>1</b>	IgG1	IgG2a		
	<b>2</b>		IgG1		
	<b>3</b>	CD3			
	<b>4</b>			CD3	
	<b>5</b>		CD4		
	<b>6</b>				CD4
<b>Blut</b>	<b>7</b>	CD8	CD45RO	CD3	CD4
	<b>8</b>	⋮	CD69	⋮	⋮
	<b>9</b>	⋮	CD25	⋮	⋮
	<b>10</b>	⋮	HLA-DR	⋮	⋮
	<b>11</b>	⋮	TGF- $\beta_1$ -RII	⋮	⋮
	<b>12</b>	CD14	CD19	⋮	⋮
<b>SF</b>	<b>13</b>	CD8	CD45RO	CD3	CD4
	<b>14</b>	⋮	CD69	⋮	⋮
	<b>15</b>	⋮	CD25	⋮	⋮
	<b>16</b>	⋮	HLA-DR	⋮	⋮
	<b>17</b>	⋮	TGF- $\beta_1$ -RII	⋮	⋮
	<b>18</b>	CD14	CD19	⋮	⋮

der Überstand wurde abgeschüttet. Wie in Tabelle 4.4 angegeben, wurden jeweils 1  $\mu\text{l}$  des gewünschten fluoreszenz-markierten Antikörpers hinzu gegeben (PE, FITC, PerCP) und in dem Flüssigkeitsrest resuspendiert. Da der APC Antikörper eine sehr hohe Fluoreszenz hat, wurden hiervon nur 0,7  $\mu\text{l}$  verwendet. Nach 20-minütiger Inkubation der Zellen (im Dunkeln auf Eis) wurden die Zellen mit 2 ml PBS + 2 % FCS gewaschen und abzentrifugiert (6 min, 4 °C, 1400 upm). Der Überstand wurden abgeschüttet, die Zellen durchflusszytometrisch untersucht und die Daten (30.000 Zellen pro Versuch) gespeichert. Vor Aufnahme und Speicherung der Daten erfolgte eine Kompensation der einzelnen Fluoreszenzkanäle (s. 4.4.3).

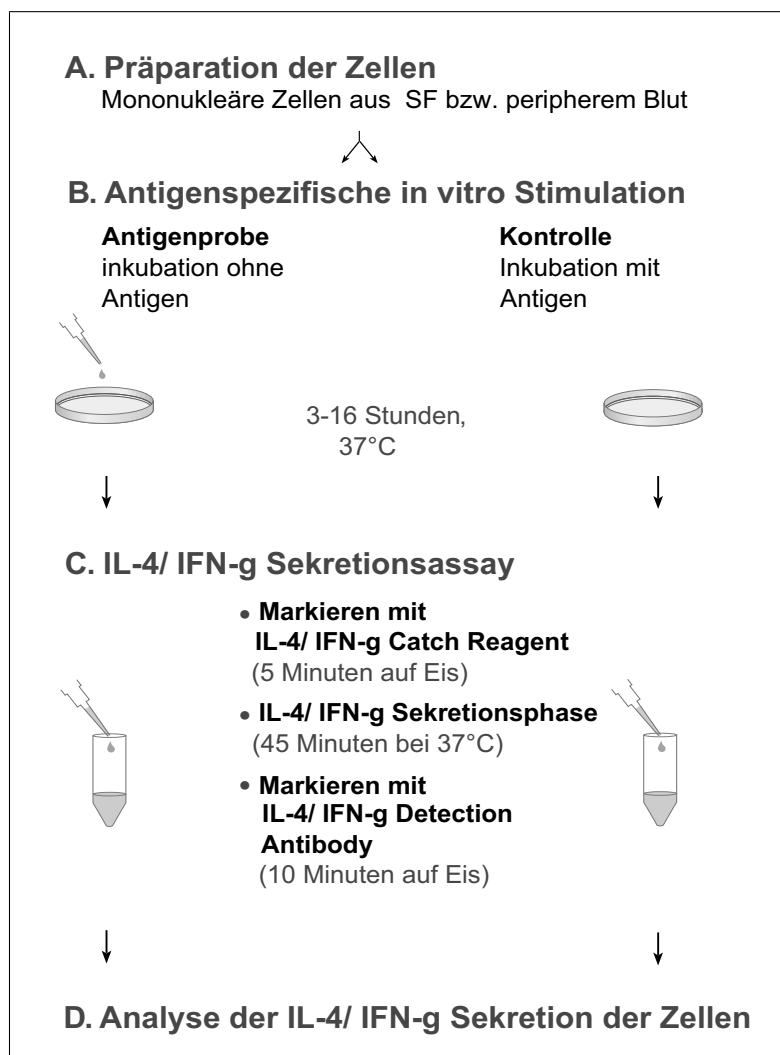
### 4.4.5 Zweifarben-Zytokinsektionsassay

Zur Bestimmung der freigesetzten Menge der Zytokine IFN- $\gamma$  und IL-4 wurde ein FACS-Zytokinsektionsassay durchgeführt. Von besonderem Interesse waren hierbei eventuelle Unterschiede zwischen T-Zellen des Blutes und der Synovialflüssigkeit, ebenso zwischen mit anti-CD3-Antikörpern stimulierten und unstimulierten Zellen (in Abb. 4.4 sind die wesentlichen Schritte des Assays dargestellt).

Die Zellen wurden aus den Proben isoliert (s. 4.4.1) und im Zellkulturmedium resuspendiert ( $10^6$  Zellen/200  $\mu\text{l}$  Medium). Auf einer 96 Loch-Flachbodenplatte wurden vier Versuche angesetzt, 2 Löcher mit 5  $\mu\text{g/ml}$  anti-CD3 als Stimulation (Blut/SF) und 2 Löcher ohne Stimulation. Pro Loch wurden eine Million Zellen verwendet. In späteren Versuchen wurden noch weitere zwei stimulierte Löcher (Blut/SF) mit zusätzlich 5 ng/ml TGF- $\beta_1$  angesetzt, um den Einfluss von TGF- $\beta_1$  auf die Zytokinsekretion zu untersuchen. Die Löcher zur Stimulation wurden für 30 Minuten mit anti-CD3 in PBS inkubiert (bei 37 °C), danach wurde die anti-CD3-Lösung abgesaugt. Zur FACS-Einstellung (Kompensation der unterschiedlichen Fluoreszenzkanäle) wurde ein weiteres Loch ohne Stimulation mit Zellen bestückt (max.  $10^6$  Zellen je nach Anzahl der zur Verfügung stehenden Zellen). Nach Aufteilen der Zellen wurden die mit anti-CD3 stimulierten Löcher zusätzlich mit 1  $\mu\text{g/ml}$  anti-CD28 zur Kostimulation versetzt. Es folgte für 16 Stunden eine Wachstumsphase im Brutschrank (5 % CO<sub>2</sub> bei 37 °C).

### Markierung der Zellen mit Zytokin Catch Reagent

Die Zellen wurden aus dem Brutschrank genommen, in den Löcher resuspendiert, in 50 ml Falcons gegeben und mit 5 ml kaltem CSA-Puffer gewaschen (Zentrifugation 8 min, 4 °C, 1400 upm). Jeweils 32  $\mu\text{l}$  (8  $\mu\text{l}/10^6$  Zellen) des IFN- $\gamma$  Catch Reagent und des IL-4

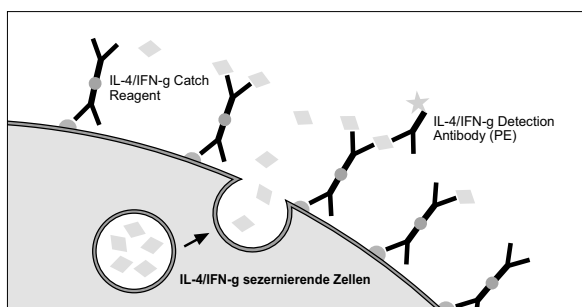


**Abbildung 4.4:** Übersicht über den IL-4/ IFN- $\gamma$  Zytokinsekretionsassay (abgewandelt nach Milteny Manual [89])

**Tabelle 4.5:** Plattenbelegung Zytokinsekretionsassay (96 Loch-Flachbodenplatte)

anti-CD3 in [ $\mu$ g/ml]	0	5	0
Blut	1.000.000	1.000.000	1.000.000
Blut + 5 ng/ml TGF- $\beta_1$		1.000.000	
SF	1.000.000	1.000.000	
SF + 5 ng/ml TGF- $\beta_1$		1.000.000	





**Abbildung 4.5:** Sekretion von IFN- $\gamma$  bzw. IL-4. Nachdem der „Catch-Reagent“ (ein bispezifischer Antikörper) an CD45-Strukturen der Zelle gebunden wurde, werden die Zellen zur Zytokinsekretion (IFN- $\gamma$ , IL-4) stimuliert. Der Catch Reagent bindet jetzt auch das Zytokin. Anschließend wird ein fluoreszenz-markierter „Detection“ Antikörper hinzu gegeben, so dass die Zytokinsekretion mittels Durchflusszytometer gemessen werden kann (nach Milteny-Manual [89]).

Catch Reagent wurden mit 256  $\mu\text{l}$  Medium vermischt und auf Eis gekühlt. Die Zellpellets wurden in jeweils 80  $\mu\text{l}$  dieser Lösung resuspendiert und für mindestens 5 Minuten auf Eis inkubiert. Der Catch Reagent ist ein bispezifischer Antikörper, der an CD45-Strukturen der Zelle bindet. Nach Stimulation der Zellen zur Zytokinsekretion bindet das Zytokin auch an diesen Antikörper (s. Abb. 4.5).

### Zytokinsekretionsphase

Nach Inkubation mit dem Catch Reagent wurde in jedes Falcon 10 ml auf 37 °C im Wasserbad vorgewärmtes Medium gegeben. Nun folgte die eigentliche Sekretionsphase, in der die Zellen Zytokine freisetzen. Hierfür wurden die Zellen in 50 ml Falcons im Brutschrank (45 min, 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) inkubiert. In der Sekretionsphase gilt es eine unspezifische Bindung der Zytokine durch benachbarte Zellen zu vermeiden. Deshalb ist es sehr wichtig, die Zellen in möglichst geringer Konzentration (Zellen haben maximalen Abstand) im Medium zu inkubieren (hier 10<sup>5</sup> Zellen/ml). Zusätzlich wurden die Falcons kontinuierlich und langsam rotiert (mittels MACSmix). Am Anfang der Versuche stand hierfür noch kein geeignetes Gerät zur Verfügung, so dass die Zellen in konstanten Zeitabschnitten (5 Minuten) kurzzeitig dem Brutschrank entnommen werden mussten, um sie manuell zu drehen.

### Markieren der Zellen mit dem Detection-Antikörper

Nach 45 Minuten wurden die Zellen abzentrifugiert (6 min, 4 °C, 1400 upm) und somit die Sekretionsphase gestoppt. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und die Zellen mit 5 ml CSA Puffer gewaschen (6 min, 4 °C, 1400 upm). Nun wurden die Detection-Antikörper (IFN- $\gamma$ , IL-4 je 32  $\mu\text{l}$ ) mit 256  $\mu\text{l}$  CSA Puffer, 4  $\mu\text{l}$  anti-CD14-PerCP und 2,8  $\mu\text{l}$  anti-CD4-APC nach Tab. 4.6 gemischt. Die Zellpellets der 4 Falcons wurden in je 80  $\mu\text{l}$  dieser Lösung resuspendiert, die Zellsuspension wurde in FACS-Röhrchen transferiert und für 10 Minuten im Dunkeln auf Eis inkubiert. Zellen zur FACS-Kompensation wurden nach entsprechendem Schema gefärbt und ebenso inkubiert.

**Tabelle 4.6:** FACS-Schema Zytokinsekretionsassay

		<b>FITC</b>	<b>PE</b>	<b>PerCP</b>	<b>APC</b>
<b>Einstell.</b>	<b>1</b>	IgG1	IgG2a		
	<b>2</b>		IgG1		
	<b>3</b>	CD4			
	<b>4</b>		CD4		
	<b>5</b>			CD8	
	<b>6</b>				CD4
<b>Blut</b>	<b>7</b>	IFN- $\gamma$ -CSA	IL-4-CSA	CD14	CD4
	<b>8</b>	⋮	⋮	⋮	⋮
<b>SF</b>	<b>9</b>	IFN- $\gamma$ -CSA	IL-4-CSA	CD14	CD4
	<b>10</b>	⋮	⋮	⋮	⋮

Anschließend wurden die Zellen mit 3 ml PBS + 2 % FCS gewaschen (6 min, 4 °C, 1400 upm), sämtliche Zellen jedes einzelnen FACS-Röhrchens durchflusszytometrisch untersucht und die Daten gespeichert. Zuvor erfolgte eine Kompensation der einzelnen Fluoreszenzkanäle (s. 4.4.3)

#### 4.4.6 Messen der Zellproliferation mittels Thymidinassay

Zur Evaluation und Plausibilitätsprüfung der CFSE-Proliferationsmessung wurde zusätzlich der seit langem etablierte Einbau des (radioaktiven  $\blacktriangle$ ) Tritium-markierten DNA Bausteins Thymidin angewandt. Gemessen wurde dabei die DNA-Syntheseleistung der Zellen, und somit indirekt die Proliferationsrate.

Die MNZs wurden entsprechend 4.4.1 isoliert und in Zellkulturmedium gelöst. Anschließend auf einer 96 Loch-Rundbodenplatte in unbehandelte oder anti-CD3 vorinkubierte Löcher (5  $\mu$ g/ml) aliquotiert und im Brutschrank (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) inkubiert. Zu Beginn der Versuche wurden Doppelwerte, später Dreifachwerte verwendet. Es wurden 10<sup>5</sup> Zellen pro Loch in 200  $\mu$ l Medium, somit insgesamt 12 Löcher (2,4 ml Medium) mit 1,2 x 10<sup>6</sup> Zellen (Plattenbelegung s. Tab. 4.7) verwendet. Nach 24 Stunden im Inkubator wurden die Zellen in den Löchern resuspendiert, auf die unbehandelte Hälfte der Platte versetzt und für weitere 60 Stunden inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte der eigentliche Thymidineinbau. Pro Loch wurden 20  $\mu$ l Thymidin-Lösung (Thymidine Aqueous solution, 37 MBq/ml im Verhältnis 1:20 in Medium gelöst) zugegeben und die Platte wurde nach ca. 6 Stunden Inkubation bei -20 °C eingefroren. Die später gemessene Proliferation fand nur in dieser Inkubationszeit

statt, im Gegensatz hierzu wird bei der CFSE Färbung die Zellteilung über den gesamten Zeitraum der Kultur (5 Tage) gemessen.

**Tabelle 4.7:** Plattenbelegung für den Thymidineinbau (96 Loch Rundbodenplatte)

anti-CD3 in [ $\mu$ l]	0	0	(0)	5	5	(5)
Blut	100.000	100.000	(100.000)	100.000	100.000	(100.000)
Blut + 5 ng/ml TGF- $\beta_1$	100.000	100.000	(100.000)	100.000	100.000	(100.000)
SF	100.000	100.000	(100.000)	100.000	100.000	(100.000)
SF + 5 ng/ml TGF- $\beta_1$	100.000	100.000	(100.000)	100.000	100.000	(100.000)

Tritium ( $^3\text{H}$ ) ist ein  $\beta$ -Strahler mit einer Halbwertszeit von 12,3 Jahren. Da die beim radioaktiven Zerfall freigesetzte Strahlung zu schwach ist, um sie direkt zu messen, z.B. über ein Geigerzählrohr, kann sie nur indirekt mit Hilfe eines Szintillationszählers gemessen werden. Hierzu wurden die Zellkulturplatten in den Harvester eingelegt, in diesem wurden die Löcher gespült und die Spüllösung anschließend durch ein mikrozellulose Filterpapier geleitet. Dieses Filterpapier hält die Zellen zusammen mit ihrem inkorporierten Thymidin zurück, ist aber durchlässig für das restliche nicht zellgebundene Thymidin. Somit ist die anschließend gemessene Strahlung proportional zu der Anzahl der proliferierten Zellen. Nach dem vollständigen Trocknen (Mikrowelle 360 W, 25 min) wurden die Filter in Folie eingeschweißt und mit 4 ml Szintillationsflüssigkeit (Betaplatescint) vollständig benetzt. Die Anzahl der Szintillationen (des radioaktiven Zerfalls) der eingeschweißten Filterpapiere wurden vollautomatisch im TRILUX 1450 Microbeta Zähler gezählt. Hierbei wurden bereits die Hintergrundstrahlung und die Überlagerungen der Strahlungswerte benachbarter Löcher weitgehend durch die Software eliminiert. Die registrierten counts per minute (cpm) entsprechen kleinen Lichtblitzen, welche in der Szintillationsflüssigkeit durch radioaktiven Zerfall entstehen.

#### 4.4.7 Messen der Proliferationsrate CD4<sup>+</sup>-/ CD8<sup>+</sup>-T-Zellen mittels CFSE-Assay

Zur Messung der isolierten Zellproliferationsrate der CD4<sup>+</sup>- sowie der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen wurde eine CFSE (5(6)-Carboxyfluorescein di-acetate N-succinimidylester) Proliferationsmessung durchgeführt. Der CFSE Farbstoff verteilt sich hierbei zu gleichen Teilen bei jeder Zellteilung auf die zwei neu entstandenen Zellen. Somit lässt die Abnahme der Fluoreszenz auf die Anzahl der Zellteilungen schließen. Durch zusätzliches Anfärben der Zellen

mit fluoreszenz-markierten Antikörpern (anti-CD4, anti-CD8) lässt sich im Gegensatz zu dem  $^3\text{H}$ -Thymidineinbau die Proliferationsrate zellspezifisch bestimmen.

Die isolierten Zellen (s. 4.4.1) wurden ein weiteres Mal mit reinem PBS gewaschen. Dies ist notwendig, da der CFSE Farbstoff ansonsten mit FCS (und anderen Proteinen) reagieren würde. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml PBS resuspendiert, zu dieser Zellsuspension wurde  $0,8 \mu\text{M}$  CFSE-Farbstoff gegeben und für *exakt* 9 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$  und  $5\%$   $\text{CO}_2$  inkubiert. Nach dieser Inkubationsphase hat der Farbstoff an die Zellmembran gebunden und die Reaktion wird durch die Zugabe von reinem FCS gestoppt. Nach weiteren 2 Minuten wurden 6 ml RPMI 1640 (mit Glutamin, Penicillin/Streptomycin und HEPES, *ohne* Serum) zugegeben, für 6 Minuten bei  $1400 \text{ upm}$  zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen im Medium (Anzahl der Löcher  $\times 200 \mu\text{l}$ ) resuspendiert. Von dieser Zellsuspension wurden jeweils  $200 \mu\text{l}$  in die Löcher ohne  $\text{TGF-}\beta_1$  ausplattiert. Zu der restlichen Zellsuspension wurde anschließend  $5 \text{ ng/ml}$   $\text{TGF-}\beta_1$  gegeben und ebenso ausplattiert.

**Tabelle 4.8:** Antikörperschema des CFSE-Assays, anti-CD3-Konzentrationen in  $\mu\text{g/ml}$

	Probe	anti-CD3	FITC	PE	PerCP	APC
<b>Einstell.</b>	<b>1</b>	0,1	ungefärbt			
	<b>2</b>	∴	CFSE			
	<b>3</b>	∴		CD4		
	<b>4</b>	∴			CD8	
	<b>5</b>	∴				CD4
<b>Blut</b>	<b>6</b>	0	CFSE		CD8	CD4
	<b>7</b>	5	∴		∴	∴
	<b>8</b>	5 + $\text{TGF-}\beta_1$	∴		∴	∴
<b>SF</b>	<b>9</b>	0	CFSE		CD8	CD4
	<b>10</b>	5	∴		∴	∴
	<b>11</b>	5 + $\text{TGF-}\beta_1$	∴		∴	∴

Nach 24 Stunden Inkubation im Brutschrank wurde die Stimulation der Zellen beendet, d. h. die Zellen wurden in den Löchern resuspendiert und auf der Platte in nicht inkubierte Löcher gegeben. Nach weiteren 4 Tagen wurden die Zellen resuspendiert, auf FACS-Röhrchen aufgeteilt und gemäß Tabelle 4.8 mit jeweils  $1 \mu\text{l}$  Antikörpern bestückt. Nach 20 Minuten Inkubation im Dunkeln auf Eis wurden die Zellen mit  $\text{PBS} + 2\%$  FCS gewaschen, der Überstand abgeschüttet und mit dem Durchflusszytometer die Verdünnung des Farbstoffes und

somit die Proliferationsrate bestimmt. Es wurden jeweils die gesamten Zellen eines Röhrchens gezählt und die Daten zur weiteren Auswertung zusammen mit den Daten der FACS-Kompensation (Röhrchen 1 - 5: je 10.000 Zellen) gespeichert.

### **4.4.7.1 Phänotypische Charakterisierung der CFSE-Zellen**

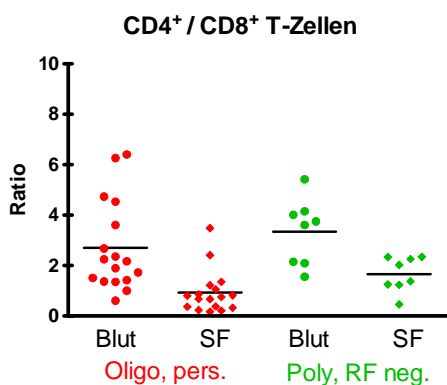
Um zu untersuchen, ob die Zellen im Vergleich zu der Eingangstypisierung nach 5 Tagen Zellkultur die Anzahl ihrer Oberflächenrezeptoren (Antigene) moduliert haben, wurde bei einem Teil der Proben eine Charakterisierung der Zellen direkt vor dem CFSE-Assay entsprechend 4.4.4 durchgeführt. Hierfür wurden zusätzliche Zellen in Kultur genommen (24 Loch Platte,  $10^6$  Zellen/Loch). Bis auf die eigentliche CFSE-Färbung wurde mit ihnen ebenso verfahren wie beim CFSE-Ansatz, d.h. es wurden jeweils ein unbehandeltes Loch, ein anti-CD3 inkubiertes (24 Stunden mit  $5 \mu\text{g/ml}$  plattengebundenem anti-CD3) ohne TGF- $\beta_1$  und ein anti-CD3 inkubiertes Loch mit TGF- $\beta_1$  angesetzt. Nach 5 Tagen Kultur wurden sie gefärbt und mittels FACS analysiert.

# 5 Ergebnisse

## 5.1 Phänotypisierung der Zellen

T-Zellen aus peripherem Blut und Synovialflüssigkeit wurden isoliert und mittels Durchflusszytometrie (FACS) phänotypisch charakterisiert (CD4, CD8, CD45RO, CD69, CD25, HLA-DR, TGF- $\beta$ -RII, siehe hierzu auch 4.4.4). Es wurden Proben von 17 Patienten mit persistierender Oligoarthritis und 8 Patienten mit einer Rheumafaktor negativen Polyarthritis untersucht.

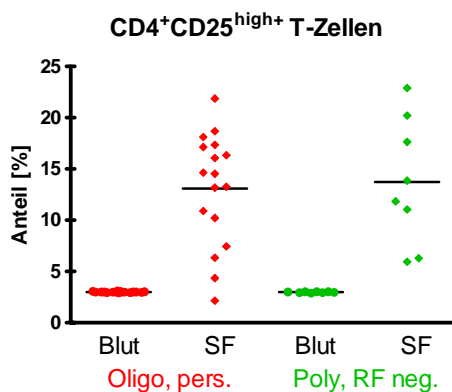
Bei Charakterisierung der Zellen hinsichtlich CD4 und CD8 wurde bei der persistierenden oligoartikulären Verlaufsform eine 2,9-fache Anreicherung (Verhältnis SF  $\frac{CD4^+}{CD8^+}$  zu Verhältnis Blut  $\frac{CD4^+}{CD8^+}$ , s. Abb. 5.1) und damit ein Überwiegen von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen ( $\frac{CD4^+}{CD8^+} = 0,930$ ) in der SF beobachtet. Zu einer schwächeren Anreicherung um den Faktor 2 kommt es bei der RF-negativen Polyarthritis, so dass CD4<sup>+</sup>-T-Zellen immer noch gering überwiegen ( $\frac{CD4^+}{CD8^+} = 1,664$ ). Wie in Abbildung 5.3 dargestellt, ergab die Charakterisierung von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen der Synovialflüssigkeit, dass es sich dabei größtenteils um aktivierte Gedächtniszellen handelt (CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>). Zwischen beiden Verlaufsformen ergibt sich bei einem Anteil von annähernd 97 % an CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>-T-Zellen kein signifikanter Unterschied. Im peripheren Blut haben die CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>-Zellen nur einen geringeren Anteil von 27,44 % bzw. 32,11 % . Bei CD8<sup>+</sup>-T-Zellen liegt ein deutlich geringerer Anteil an Gedächtniszellen im peripheren Blut vor (20,08 % bzw. 18,51 % ). Der Anteil an CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>-Zellen in der SF ist erneut deutlich höher als im peripheren Blut und bei beiden Verlaufsformen ähnlich hoch (59,49 % vs. 60,49 % ). Betrachtet man nun die regulatorischen T-Zellen (s. Abb. 5.2), fällt auf, dass der Anteil an CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high+</sup>-T-Zellen in der SF im Vergleich zu peripherem Blut bei beiden Verlaufsformen deutlich erhöht ist (*Anmerkung:* Zur Auswertung der FACS-Daten wurden die CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high+</sup>-T-Zellen im peripheren Blut auf 3 % der CD25<sup>+</sup>-T-Zellen definiert). Zwischen der persistierenden Oligoarthritis und der RF negativen Polyarthritis bestehen hingegen keine signifikanten Unterschiede (13,09 vs. 13,72 %). Wie bereits oben erwähnt ergab die phänotypische Charakterisierung eine vermehrte Anreicherung von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in der Synovialflüssigkeit gegenüber peripherem Blut (s. Abb. 5.4).



	CD4 <sup>+</sup> / CD8 <sup>+</sup>	
	Oligo pers.	Poly, RF neg.
Blut	2,700 ± 1,782	3,344 ± 1,298
SF	0,930 ± 0,858	1,664 ± 0,686

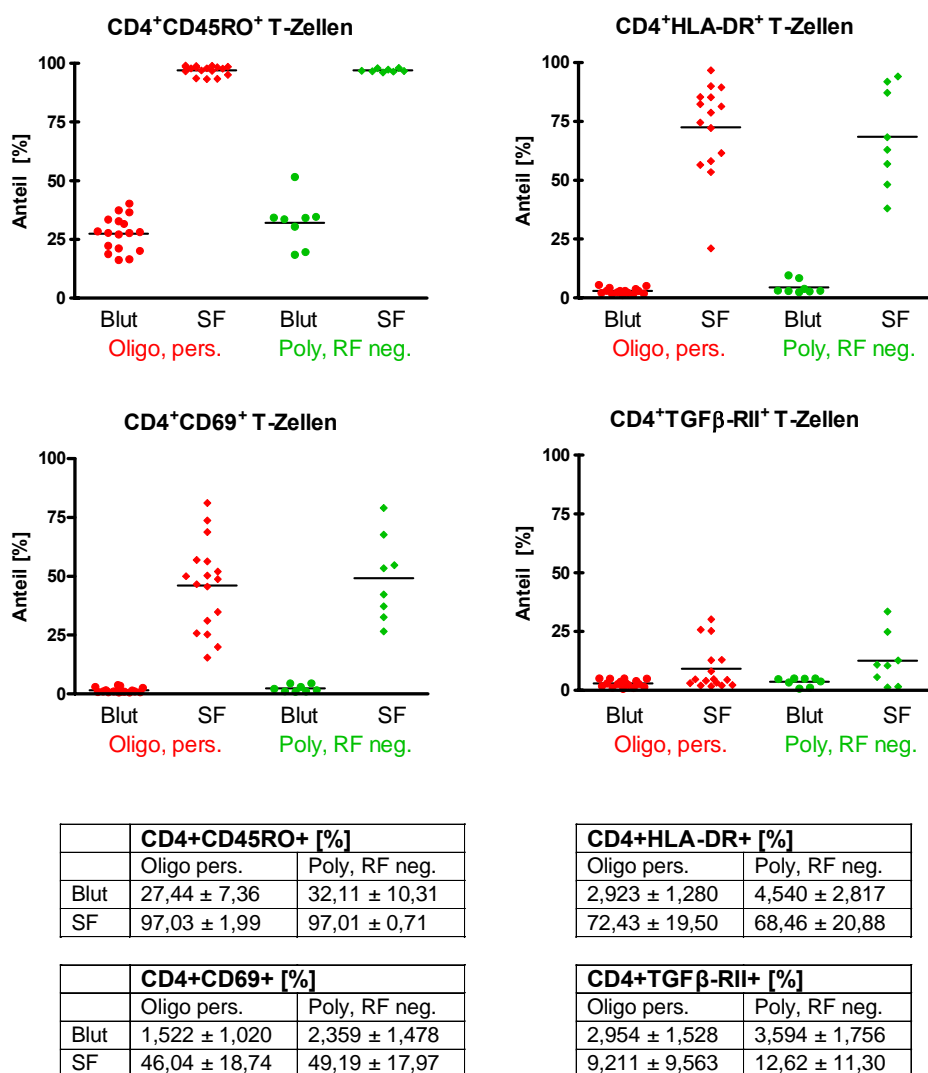
**Abbildung 5.1:** Phänotypisierung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut und Synovialflüssigkeit. Analysiert wurden CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>FSS/SSC-Lymphozyten und CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>FSS/SSC-Lymphozyten.

*Legende:* rot = persistierende Oligoarthritis, grün = RF-negative Polyarthritis, [●] = Blut, [◆] = SF. Y-Achse: Verhältnis (ratio)  $\frac{CD4^+}{CD8^+}$ . Unter den Abbildungen sind die jeweiligen Mittelwerte und Standardabweichungen aufgelistet.



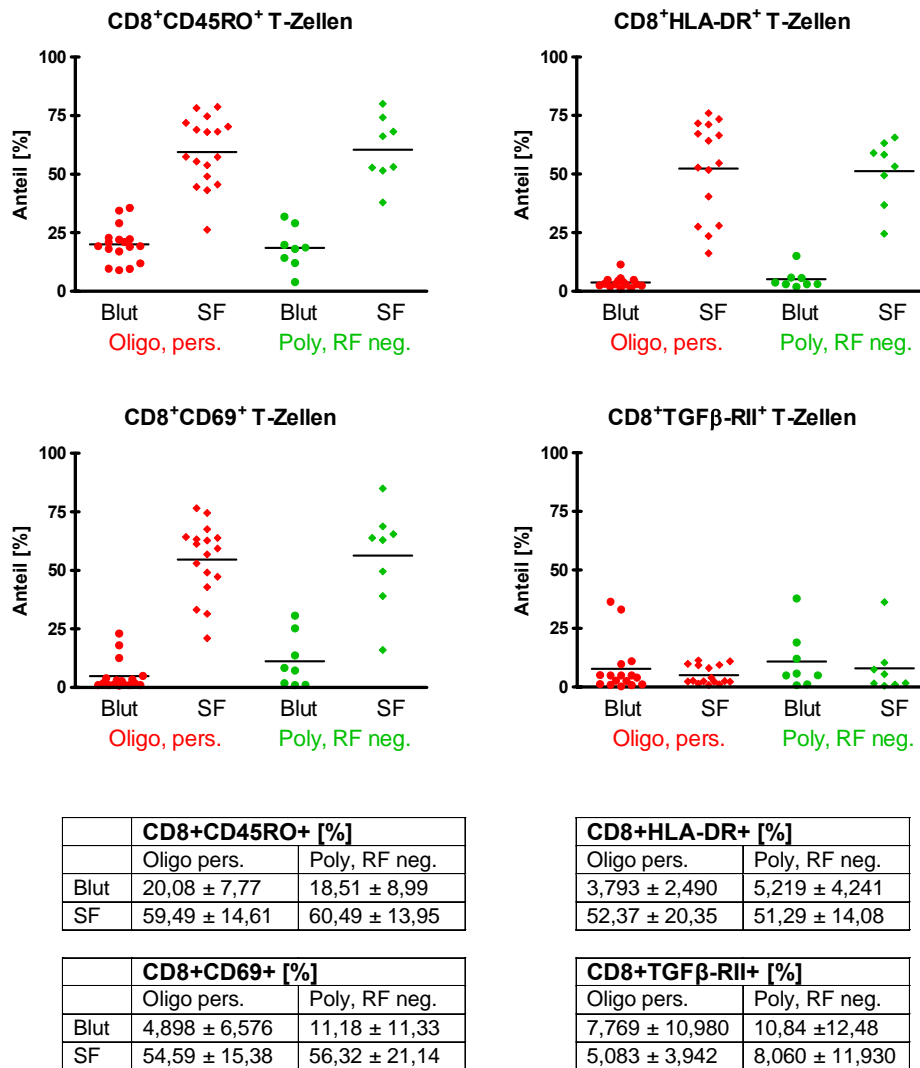
	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>++</sup> [%]	
	Oligo pers.	Poly, RF neg.
Blut	3,005 ± 0,051	2,983 ± 0,047
SF	13,09 ± 5,47	13,72 ± 6,18

**Abbildung 5.2:** Phänotypisierung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut und Synovialflüssigkeit. Analysiert wurden CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high+</sup>-Lymphozyten. *Legende:* rot = persistierende Oligoarthritis, grün = RF-negative Polyarthritis, [●] = Blut, [◆] = SF. Y-Achse: Anteil CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high+</sup>-T-Zellen an allen CD4<sup>+</sup>-T-Zellen in % . Unter den Abbildungen sind die jeweiligen Mittelwerte und Standardabweichungen aufgelistet.



**Abbildung 5.3:** Phänotypisierung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut und Synovialflüssigkeit. Analysiert wurden CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>FCS/SSC-Lymphozyten. *Legende:* rot = persistierende Oligoarthritis, grün = RF-negative Polyarthritis, [●] = Blut, [◆] = SF. Y-Achse: Anteil der untersuchten Zellen an allen CD4<sup>+</sup>-T-Zellen. Unter den Abbildungen sind die jeweiligen Mittelwerte und Standardabweichungen aufgelistet.





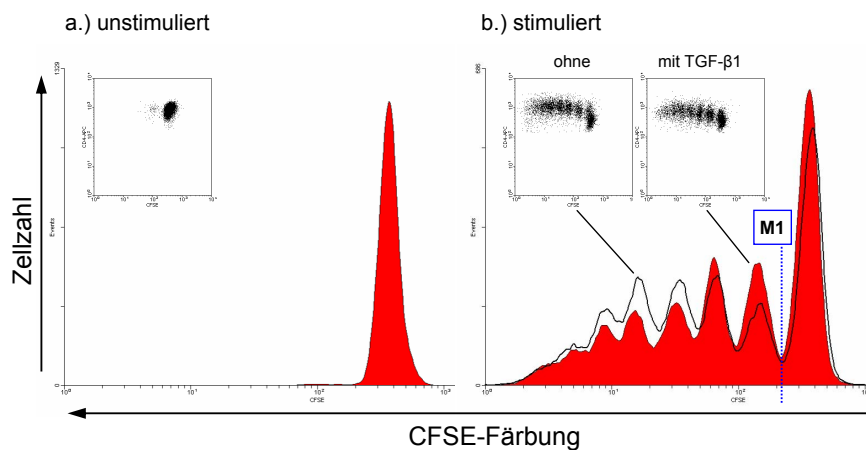
**Abbildung 5.4:** Phänotypisierung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut und Synovialflüssigkeit. Analysiert wurden CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>FSS/SSC-Lymphozyten. *Legende:* rot = persistierende Oligoarthritis, grün = RF-negative Polyarthritis, [●] = Blut, [◆] = SF. Y-Achse: Anteil der untersuchten Zellen an allen CD4<sup>+</sup>-T-Zellen. Unter den Abbildungen sind die jeweiligen Mittelwerte und Standardabweichungen aufgelistet.

Bei den Aktivierungsmarkern CD69 und HLA-DR fällt auf, dass jeweils ein deutlich größerer Anteil an Zellen der Synovialflüssigkeit im Vergleich zum Blut CD69<sup>+</sup> bzw. HLA-DR<sup>+</sup> ist (Abb. 5.3). Dies gilt sowohl für CD4<sup>+</sup>-T-Zellen als auch für CD8<sup>+</sup>-T-Zellen. Zwischen der oligoartikulären und der polyartikulären Verlaufsform besteht kein signifikanter Unterschied. Es bestehen aber durchaus Unterschiede zwischen CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (s. Abb. 5.3) und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (s. Abb. 5.4). So ist der Anteil an CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>-T-Zellen mit 1,52 % (oligoartikuläre Verlaufsform) bzw. 2,36 % (polyartikuläre Verlaufsform) von allen CD4<sup>+</sup>-T-Zellen im peripheren Blut niedriger als der Anteil CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>-T-Zellen mit 4,90 % (oligoartikuläre Verlaufsform) bzw. mit 11,18 % (polyartikuläre Verlaufsform) an allen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (s. Abb. 5.3 und 5.4). Wohingegen in der SF ähnliche Werte gemessen werden mit tendenziell höheren Werten in der CD8<sup>+</sup>-Population. Bei der Analyse der HLA-DR<sup>+</sup>-T-Zellen kann man Folgendes beobachten: Während sich im Blut der Anteil an HLA-DR<sup>+</sup>-T-Zellen (CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>) im unteren einstelligen Prozentbereich befindet, ist in der SF der Anteil an CD4<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-T-Zellen höher als bei den CD8<sup>+</sup>-T-Zellen.

Bei der Expression des TGF- $\beta$ -Rezeptors-II fällt auf, dass auf CD4<sup>+</sup>-T-Zellen aus SF mehr Rezeptoren anfärbbar sind als im peripheren Blut (oligo- 3,1 bzw. 3,5 mal so viele bei polyartikulärer Verlaufsform). Die beiden Verlaufsformen unterscheiden sich dabei nicht signifikant. Interessanterweise ist es bei den CD8<sup>+</sup>-T-Zellen umgekehrt. Es fällt hier bei beiden Formen eine Abnahme der Rezeptoren in der SF im Vergleich zum peripheren Blut auf. So beträgt die Expression der TGF- $\beta$ -Rezeptoren-II nur das 0,65- (oligo) bzw. 0,74-fache (poly) der Expression im Blut. Auch hier ist die Rezeptorexpression minimal höher bei der RF-negativen Polyarthrititis. Insgesamt ist die Expression von TGF- $\beta$ -Rezeptoren-II auf CD8<sup>+</sup>-T-Zellen aus peripherem Blut höher als bei CD4<sup>+</sup>-T-Zellen.

## 5.2 CFSE-Proliferationsmessung

Ziel der Untersuchung ist es, den Einfluss des immunregulatorischen Enzyms TGF- $\beta_1$  auf die Zellproliferationsrate unterschiedlicher T-Zellpopulationen zu bestimmen. Hierzu wurden mononukleäre Zellen aus peripherem Blut und SF mit CFSE-Farbstoff gefärbt. Zur Unterscheidung verschiedener T-Zellpopulationen wurden die Zellen zusätzlich mit anti-CD4- und anti-CD8-Antikörpern gefärbt (s. hierzu auch 4.4.7). Die Zellen wurden mit und ohne Zugabe von TGF- $\beta_1$  mit anti-CD3 stimuliert. Mittels Durchflusszytometrie wurde nach 5 Tagen die Dilution des Fluoreszenzfarbstoffes gemessen. Die Abnahme des CFSE-Farbstoffes entspricht dabei den Zellteilungen (s. Abb. 5.5). Tote Zellen wurden mittels PI-Färbung ausgeschlossen. Zu Beginn wurden für die Versuche anti-CD3-Konzentrationen in Höhe von 0,



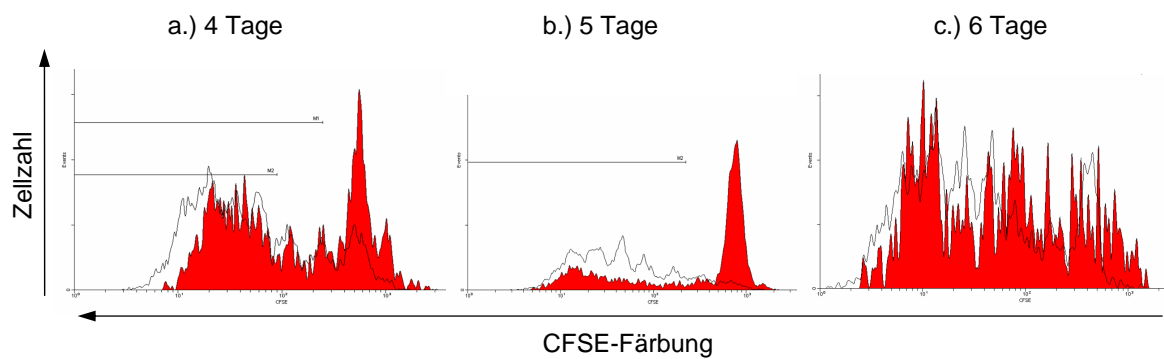
**Abbildung 5.5:** CFSE-Proliferationsmessung: aufgetragen sind  $CD4^+CD8^-$ -T-Zellen, tote Zellen wurden durch PI Färbung ausgeschlossen. In a.) wurden T-Zellen unstimuliert nach 5 Tagen Wachstum gefacet. Bei b.) erfolgte zuvor eine 24-stündige Stimulierung mit  $5 \mu\text{g/ml}$  plattengebundenem anti-CD3. Der membrangebundene Farbstoff verteilt sich gleichmäßig auf die Tochterzellen. Dadurch entspricht die Abnahme der CFSE-Konzentration (der Fluoreszenz von rechts nach links) einer Zellproliferation. Deutlich erkennbar fehlen bei den unstimulierten Zellen Zellteilungen (Gipfel). Dagegen zeigen sich bei den stimulierten Zellen mehrere Gipfel, welche jeweils einer Zellteilung entsprechen. Marker [M1] ist für die Auswertung relevant (siehe Text).  
*Legende:* Rote Fläche = mit  $5 \text{ ng/ml}$  TGF- $\beta_1$ , schwarze Linie = ohne TGF- $\beta_1$

$0,1$  und  $5 \mu\text{g/ml}$  verwendet (jeweils mit oder ohne  $5 \text{ ng/ml}$  TGF- $\beta_1$ ). Es zeigte sich aber, dass nur bei einer hohen Stimulation ( $5 \mu\text{g/ml}$ ) eine ausreichende Proliferation stattfindet. Dies ist wichtig, da sich ansonsten keine eventuell vorhandene Proliferationshemmung durch das Zytokin TGF- $\beta_1$  zeigen kann.

Da sich in den Histogrammen des CFSE-Assays nicht immer mehrere Zellteilungen darstellen lassen, wurde der erste Gipfel (in Abb. 5.5 rechts, abgegrenzt durch Marker M1) zur Auswertung herangezogen. Zellen dieses Gipfels wurden als unproliferiert angenommen und alle Gipfel links davon als proliferierte Zellen definiert. Diese Zellen haben sich mindestens einmal geteilt und wurden daher zur Auswertung in den nachfolgenden Diagrammen herangezogen. Angegeben wird in den Diagrammen der prozentuale Anteil der proliferierten Zellen an allen Zellen.

### 5.2.1 Optimaler Zeitpunkt der Proliferationsmessung

Um den optimalen Zeitpunkt der Analyse der CFSE-Färbung zu finden, erfolgte eine Untersuchung des zeitlichen Verlaufs. Hierfür wurden die Zellen zweier Proben nach 4, 5 und 6 Tagen Inkubation (Proliferation) mittels FACS analysiert. Dadurch zeigte sich, dass einzelne Zellteilungen am besten nach 5 Tagen Wachstum abgrenzbar sind (s. Abb. 5.6). Nach 6 Tagen Proliferation konnten keine Floreszenzgipfel, die einer Teilung entsprechen, abgegrenzt



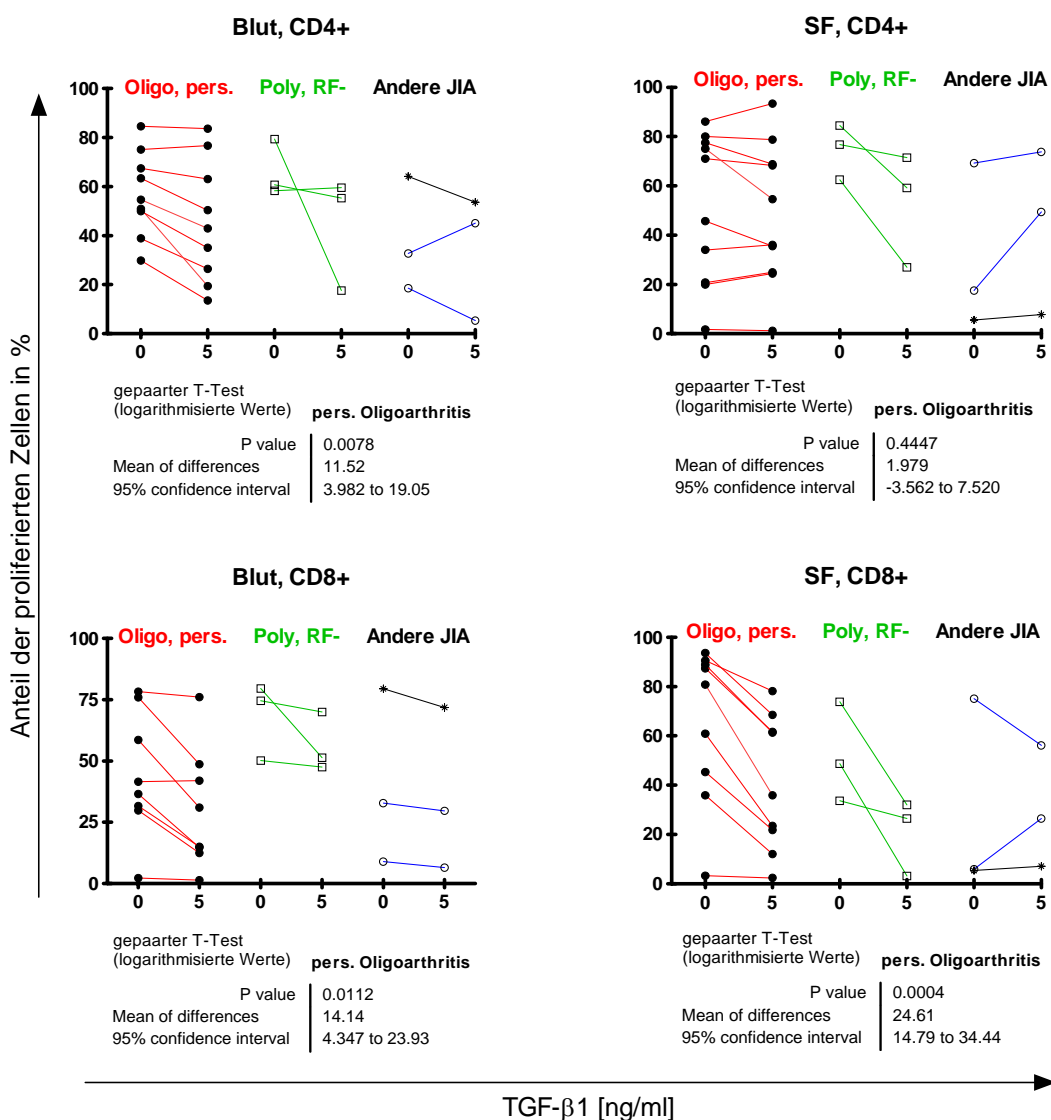
**Abbildung 5.6:** CFSE-Verdünnung im zeitlichen Verlauf. Dargestellt sind drei Histogramme mit CFSE gefärbten  $CD4^+CD8^-$ -T-Zellen. In b. (5 Tage Proliferation) zeigt sich rechts im mittleren Histogramm ein Peak bestehend aus nicht proliferierten Zellen (Mutterzellen) und einigen gut abgrenzbaren Zellteilungen (Tochterpopulationen). In a. (4 Tage Proliferation) und in c. (6 Tage Proliferation) zeigen sich zu wenige bzw. zu viele Zellteilungen, die keine klaren Analysen zulassen. *Legende:* Rote Fläche = mit 5 ng/ml TGF- $\beta_1$ , schwarze Linie = ohne TGF- $\beta_1$ . X-Achse: CFSE-Färbung. Y-Achse: Zellzahl.

werden. Bei den nachfolgenden CFSE-Versuchen wurde dieser Sachverhalt berücksichtigt und die FACS Analyse erfolgte nach 5 Tagen.

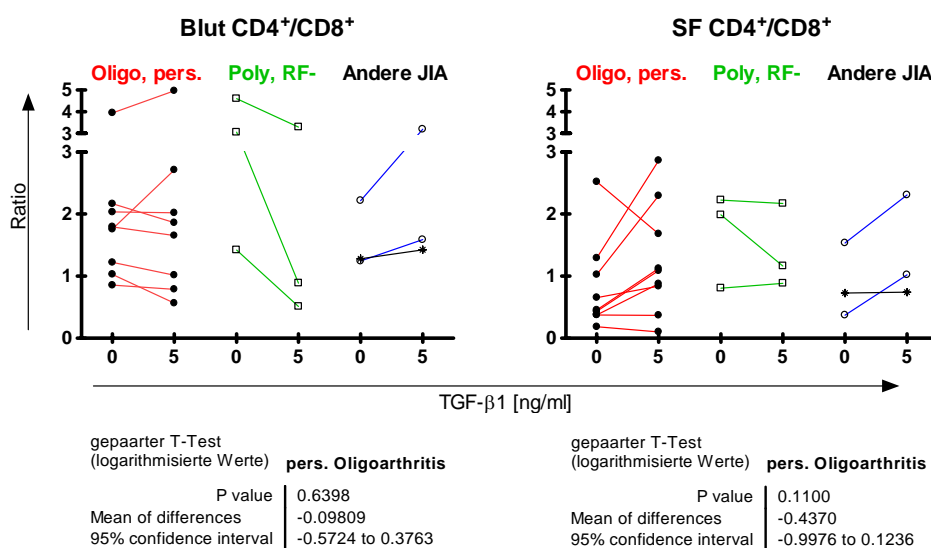
## 5.2.2 $CD4^+$ - und $CD8^+$ -T-Zellen

In Abbildung 5.7 sind die Ergebnisse der Auswertung von 15 gepaarten Proben (T-Zellen aus peripherem Blut und Synovialflüssigkeit) dargestellt. Bei der FACS-Auswertung wurde eine Region um die Lymphozytenfraktion gelegt (FSC/SSC Lymphozyten) und für die Analyse herangezogen. Durch PI-Färbung wurden tote Zellen weitgehend ausgeschlossen.

Dargestellt sind die Ergebnisse differenziert in die Subtypen persistierende Oligoarthritis, RF-negative Polyarthritis und andere JIA Arthritiden (inklusive der extended Oligoarthritis). In Abbildung 5.7 ist zu erkennen, dass  $CD4^+$ -T-Zellen sich in ihrem Verhalten von  $CD8^+$ -T-Zellen unterscheiden. Die Proliferation von  $CD8^+$ -T-Zellen wurde durch Zugabe von TGF- $\beta_1$  sowohl bei Zellen des peripheren Blutes als auch der SF deutlich gehemmt. Dieser Effekt tritt bei allen Verlaufsformen auf und ist durch die höhere Fallzahl am besten bei Zellen von Patienten, die an einer persistierenden Oligoarthritis erkrankt sind, erkennbar ( $p = 0,0112$  bei Blut bzw.  $p = 0,0004$  bei SF). Betrachtet man die  $CD4^+$ -T-Zellen, fällt auf, dass Zellen des Blutes (pers. Oligoarthritis:  $p = 0,0078$ ) ebenfalls durch Zugabe von TGF- $\beta_1$  in ihrer Proliferation gehemmt werden. Bei Zellen der Synovialflüssigkeit dagegen kann nur bei der seronegativen polyartikulären Verlaufsform eine Hemmung festgestellt werden. Synoviale  $CD4^+$ -T-Zellen von Patienten mit persistierender Oligoarthritis ( $p = 0,4447$ ) zeigen dagegen zum großen Teil keine bzw. eine geringe Proliferationshemmung durch Zugabe von TGF- $\beta_1$ .



**Abbildung 5.7:** CFSE-Proliferationsmessung CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (mit oder ohne Zugabe von TGF-β<sub>1</sub>). Mononukleäre Zellen aus peripherem Blut und SF wurden nach Dichtegradientenzentrifugation mit CFSE-Fluoreszenzfarbstoff gefärbt. Die Zellen wurden mit und ohne Zugabe von TGF-β<sub>1</sub> für 24 Stunden mit 5 μg/ml plattengebundenem anti-CD3 stimuliert. Nach 5 Tagen erfolgte die Messung der CFSE-Dilution mittels Durchflusszytometrie. Zur Differenzierung unterschiedlicher Zellpopulationen wurden die Zellen zuvor mit anti-CD4- und anti-CD8-Antikörper gefärbt. Tote Zellen wurde mittels PI-Färbung ausgeschlossen. Zur Auswertung wurden die Zellen herangezogen, die sich mindestens einmal geteilt haben (Zellen links des Markers M1 in Abbildung 5.5. *Legende:* X-Achse: TGF-β<sub>1</sub>-Zugabe in ng/ml. Y-Achse: Anteil der proliferierten Zellen an allen Zellen. Rot [●]: persistierende Oligoarthritis, blau [○]: extended Oligoarthritis, grün [□]: RF-negative Polyarthritits, schwarz [\*]: andere JIA Arthritiden.

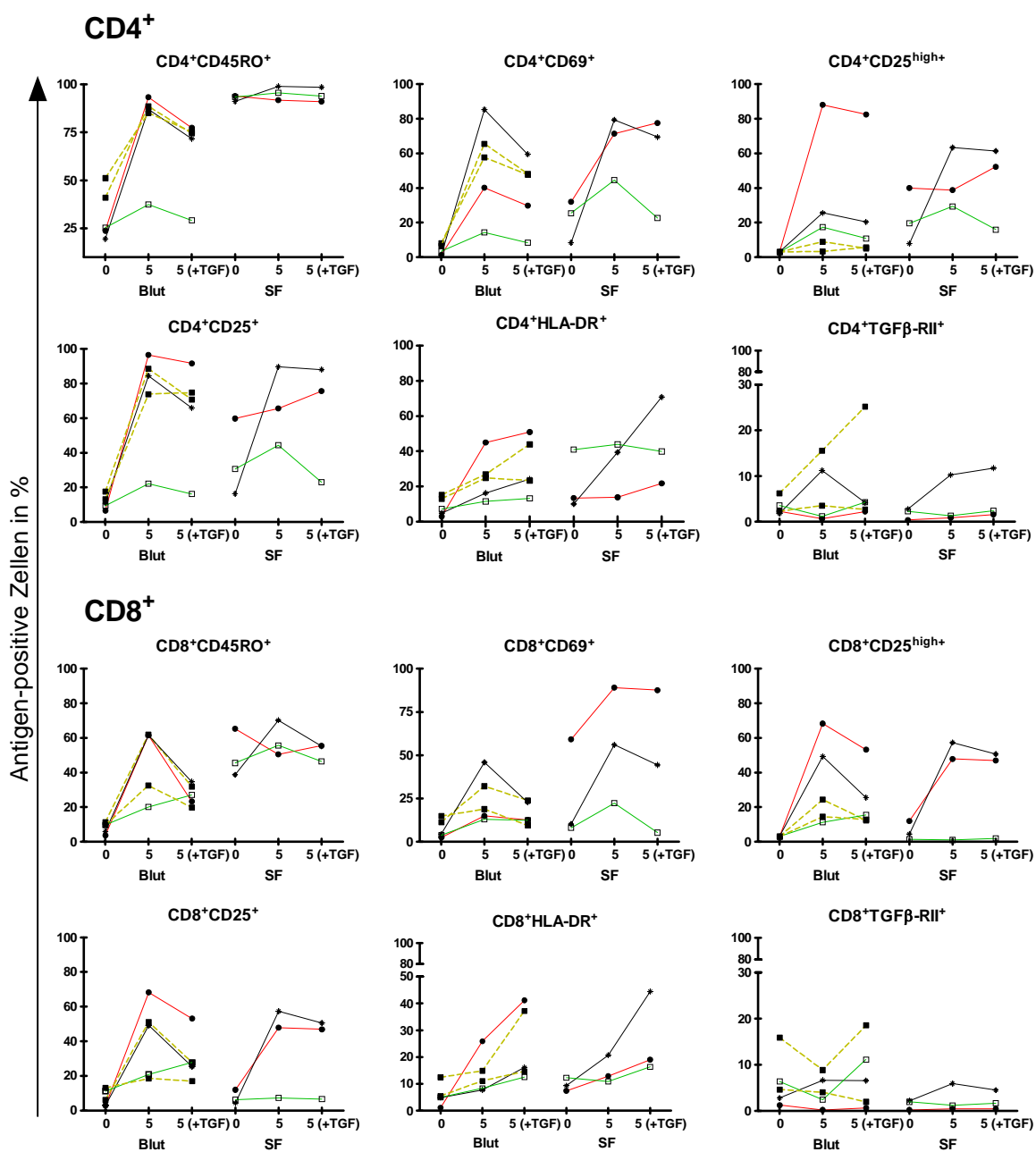


**Abbildung 5.8:** Mononukleäre Zellen aus peripherem Blut und SF wurden nach Dichtegradientenzentrifugation mit CFSE-Fluoreszenzfarbstoff gefärbt. Die Zellen wurden mit und ohne Zugabe von TGF- $\beta_1$  für 24 Stunden mit 5  $\mu\text{g/ml}$  plattengebundenem anti-CD3 stimuliert. Nach 5 Tagen erfolgte die Messung der CFSE-Dilution mittels Durchflusszytometrie. Zur Differenzierung unterschiedlicher Zellpopulationen wurden die Zellen zuvor mit anti-CD4- und anti-CD8-Antikörper gefärbt. Tote Zellen wurde mittels PI-Färbung ausgeschlossen. *Legende:* X-Achse: TGF- $\beta_1$ -Zugabe in ng/ml. Y-Achse: Anteil der proliferierten Zellen an allen Zellen. Rot [●]: persistierende Oligoarthritis, blau [○]: extended Oligoarthritis, grün [□]: RF-negative Polyarthritis, schwarz [\*]: andere JIA Arthritiden..

In Abbildung 5.8 ist erkennbar, dass der Anteil der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen in der Synovialflüssigkeit mit zunehmender TGF- $\beta_1$ -Konzentration steigt. Dieser Effekt kommt zustande, da synoviale CD8<sup>+</sup>-T-Zellen von TGF- $\beta_1$  gehemmt werden und CD4<sup>+</sup>-T-Zellen nicht bzw. nur sehr gering. Dadurch steigt insgesamt auch der Anteil der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen. Das Verhältnis  $\frac{CD4^+}{CD8^+}$  verschiebt sich zugunsten der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen.

### 5.2.3 Phänotypisierung der CFSE-Zellen nach 5 Tagen Wachstum

Anhand der Daten des CFSE-Proliferationsassays stellt sich die Frage, welche Zellen vor allem durch die Zugabe von TGF- $\beta$  beeinflusst werden. Bei der CFSE-Färbung wurden die Zellen zusätzlich nur mit anti-CD8- und anti-CD4-Antikörpern gefärbt, so dass eine weitere Differenzierung leider nicht möglich ist. Um nähere Informationen über den Aktivierungszustand und die Eigenschaften der Zellen zu erhalten, wurde daher bei einem Teil der Proben eine phänotypische Charakterisierung analog zur Eingangstypisierung durchgeführt (s. auch 4.4.4). Die durchflusszytometrische Messung wurde ebenso wie die Messung der CFSE-Dilution nach 5 Tagen durchgeführt.



**Abbildung 5.9:** Die Zellen wurden bis auf die eigentliche CFSE-Färbung identisch verarbeitet wie Zellen des CFSE-Ansatzes. Nach 5 Tagen Wachstum (24 Stunden Stimulation mit 5 µg/ml plattengebundenem anti-CD3, stimulierte Zellen mit und ohne 5 ng/ml TGF-β<sub>1</sub>) wurden die Zellen analog zur Eingangstypisierung mit Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. *Legende:* X-Achse: Stimulation mit oder ohne 5 µg/ml anti-CD3, stimulierte mit oder ohne 5 ng/ml TGF-β<sub>1</sub>. Y-Achse: Antigen-positive Zellen in %. Rot [●]: persistierende Oligoarthritis, grün [□]: RF-negative Polyarthritis, schwarz [\*]: andere JIA Arthritiden, braun gestrichelt [■]: Blut von gesunden erwachsenen Probanden

In Abbildung 5.9 sind die Ergebnisse aufgeteilt in CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen dargestellt. Zur Kontrolle wurden T-Zellen aus peripherem Blut zweier gesunder erwachsener Probanden ausgewertet. Bei stimulierten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen des Blutes fällt auf, dass sie durch alle Proben hinweg größtenteils aus Gedächtniszellen bestehen. Ist exogenes TGF- $\beta_1$  anwesend, verringert sich der Anteil an Gedächtniszellen etwas. In der SF liegt der Anteil CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> nahezu bei 100 % unabhängig von der Anwesenheit von TGF- $\beta_1$  (bei CD8<sup>+</sup>-T-Zellen deutlich niedriger). Anhand der Expression von CD69 und HLA-DR kann man den hohen Aktivierungszustand der Zellen erkennen. Die Anwesenheit von TGF- $\beta_1$  scheint außer bei synovialen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> der persistierenden Oligoarthritis bei CD69<sup>+</sup>-T-Zellen eine verminderte Expression in Blut und SF zu bewirken. Das kann einer Hemmung der Zellaktivierung durch TGF- $\beta_1$  entsprechen. Dagegen kann man eine gesteigerte Expression von HLA-DR in allen Zellgruppen beobachten, wenn TGF- $\beta_1$  vorhanden ist. Beides gilt für CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, ebenso wie für die gesunden Probanden. Sowohl der Anteil an CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> als auch der Anteil an CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high+</sup>-T-Zellen nimmt unter Stimulation mit anti-CD3 stark zu und vermindert sich unter Anwesenheit von TGF- $\beta_1$  geringfügig. Dies geschieht nicht bei synovialen Zellen der persistierenden Oligoarthritis. Hierbei nimmt der Anteil an CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high+</sup>-T-Zellen mit der TGF- $\beta$ -Konzentration zu. Bei den gesunden Probanden führt die Stimulierung in Kombination mit TGF- $\beta_1$  zu keiner vermehrten Expression von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high+</sup>-T-Zellen.

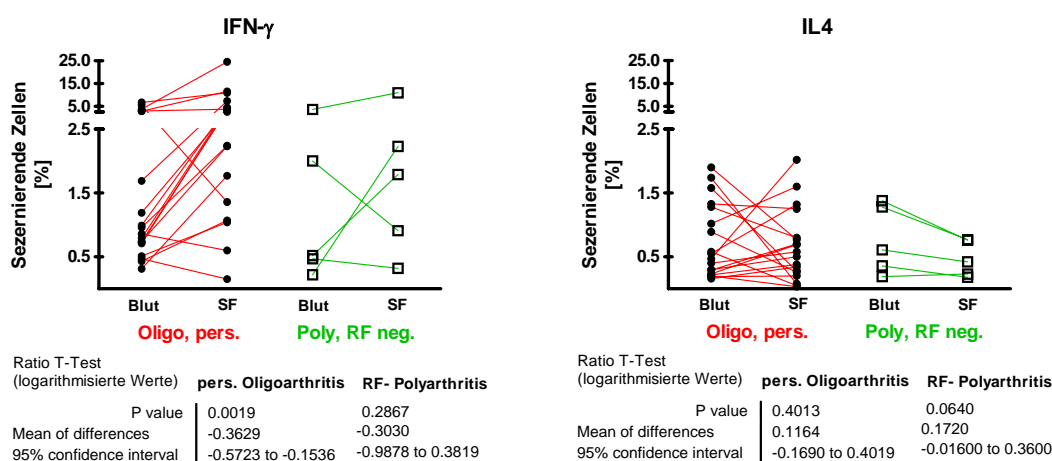
Die Expression des TGF- $\beta$ -Rezeptors-II ist uneinheitlich. Bei den CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zeigt sich im Blut bei 2 Proben (Polyarthritis, pers. Oligoarthritis) ein Abfall der Expression bei Stimulation mit anti-CD3. Die Zugabe von TGF- $\beta_1$  bewirkt wieder eine verstärkte Expression des Rezeptors. Im peripheren Blut sinkt der Anteil an CD8<sup>+</sup>TGF- $\beta$ -Rezeptor-II<sup>+</sup>-Zellen durch anti-CD3-Stimulation zunächst ab, steigt aber unter Anwesenheit von TGF- $\beta_1$ , insbesondere bei der seronegativen Polyarthritis, erneut an. Bei synovialen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen kommt es zu keiner eindeutigen Reaktion. Bei der persistierenden Oligoarthritis zeigt sich aber ein tendenziell ähnliches Verhalten wie im Blut.

### 5.3 Unterscheidung von Th-Zellen anhand ihres Zytokinmusters

T-Helferzellen lassen sich anhand ihres Zytokinmusters in Th1- und Th2-Zellen weiter unterscheiden, da Th1-Zellen vorrangig IFN- $\gamma$ , Th2-Zellen dagegen vorrangig IL-4 produzieren. Hierfür wurden mononukleäre Zellen mittels Ficoll isoliert und für 16 Stunden mit plat-



tengebundenem anti-CD3 und anti-CD28 im Brutschrank inkubiert. Nachdem der „Catch-Reagent“ (ein bispezifischer Antikörper) an CD45 Strukturen der Zelle gebunden hat, wurden die Zellen in einer 45-minütigen Sekretionsphase zur Zytokinsekretion stimuliert. Der bispezifische Antikörper bindet dabei an einer zweiten Bindungsstelle das freigesetzte Zytokin (spezifisch für IL-4 oder IFN- $\gamma$ ). In einer letzten Inkubationsphase (auf Eis) wurden zytokinspezifische fluoreszierende „Detection-Antibodies“ hinzugegeben und die Zytokinsekretion mittels FACS-Analyse bestimmt (s. auch 4.4.5).

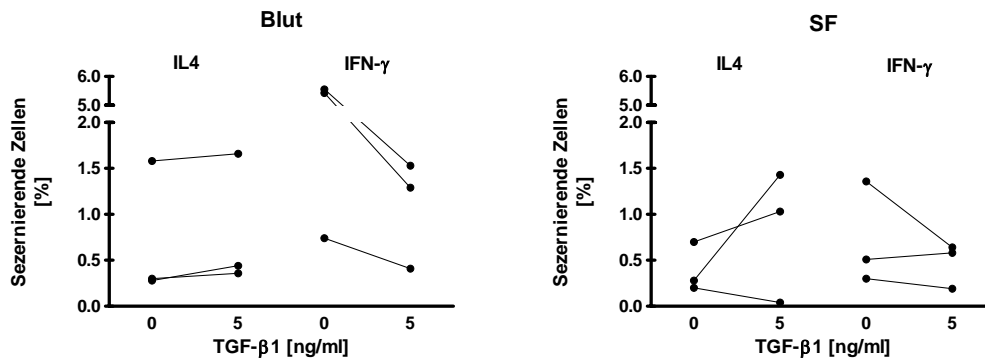


**Abbildung 5.10:** Analyse der Zytokinsekretion (IFN- $\gamma$ , IL-4) mononukleärer Zellen aus peripherem Blut und SF. Nach Dichtegradientenzentrifugation wurden die Zellen 16 Stunden im Brutschrank stimuliert (mit 5  $\mu$ g/ml plattengebundenem anti-CD3 und 1  $\mu$ g/ml anti-CD28). Danach wurden die sezernierte Zytokine mittels bispezifischer Antikörper an die Zellen gebunden. Durch zytokinspezifische fluoreszierende AK wurde anschließend die Zytokinsekretion bestimmt. Tote Zellen wurden durch PI-Färbung ausgeschlossen. Betrachtet wurden die CD4<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup>-T-Zellen. *Legende:* Y-Achse: Anteil der zytokinsezernierenden Zellen an allen Zellen in %. Rot [●]: persistierende Oligoarthritis, grün [□]: RF-negative Polyarthritis.

Die Analyse der in vitro Sekretion von IFN- $\gamma$  und IL-4 hat gezeigt, dass vor allem in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit einer oligoartikulären Arthritis IFN- $\gamma$  sezernierende Zellen einen signifikant höheren Anteil als im peripheren Blut haben ( $p = 0,0019$  s. Abb. 5.10). Dieser Effekt lässt sich auf niedrigerem Niveau auch bei der RF-negativen polyartikulären Verlaufsform beobachten. Betrachtet man hingegen IL-4-sezernierende Zellen, kann man kein eindeutiges Verhalten erkennen. Vor allem bei der oligoartikulären Arthritis ergibt sich ein sehr gemischtes Bild, eine Tendenz ist nicht sicher zu erkennen. Bei der seronegativen Polyarthritis scheinen IL-4-sezernierende Zellen im peripheren Blut im Vergleich zur SF zu überwiegen ( $p = 0,0640$ ). Insgesamt ist der Anteil IL-4-sezernierender Zellen (maximal 2 %) gegenüber IFN- $\gamma$  sezernierenden Zellen (maximal 24 %) deutlich niedriger.

### 5.3.1 Empfindlichkeit von Th1- und Th2-Zellen gegenüber TGF

Um zu untersuchen, ob Th1- und Th2-Zellen unterschiedlich auf TGF- $\beta_1$  reagieren, wurden zusätzlich Zellen mit 5 ng/ml TGF- $\beta_1$  in Kultur genommen und ebenso verarbeitet (Ergebnisse s. Abb. 5.11).



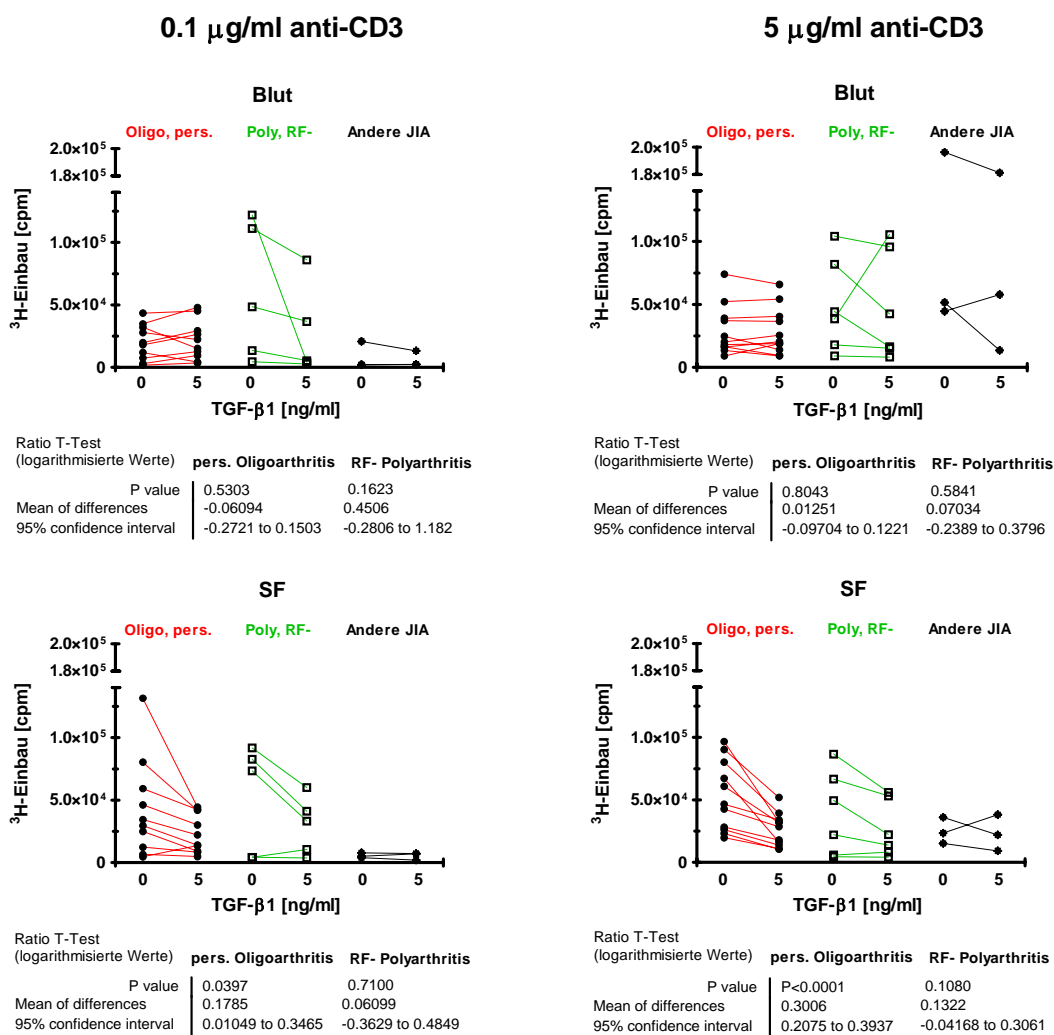
**Abbildung 5.11:** Analyse der Zytokinsekretion (IFN- $\gamma$ , IL-4) mononukleärer Zellen aus peripherem Blut und SF unter Einfluss von TGF- $\beta_1$  von Patienten mit persistierender Oligoarthritis. Nach Dichtegradientenzentrifugation wurden die Zellen 16 Stunden im Brutschrank stimuliert (mit 5  $\mu$ g/ml plattengebundenem anti-CD3 und 1  $\mu$ g/ml anti-CD28). Bei der Hälfte der Zellen erfolgte dabei die Zugabe von 5 ng/ml TGF- $\beta_1$ . Danach wurden die sezernierten Zytokine mittels bispezifischer Antikörper an die Zellen gebunden. Durch zytokinspezifische fluoreszierende AK wurden anschließend die Zytokinsekretion bestimmt. Tote Zellen wurden durch PI-Färbung ausgeschlossen. *Legende:* X-Achse: Konzentration an TGF- $\beta_1$  in ng/ml. Y-Achse: Anteil der sezernierenden Zellen an allen Zellen in %.

Trotz weniger Daten zeigte sich dennoch, dass nur die Sekretion von IFN- $\gamma$  unter der Anwesenheit von TGF- $\beta_1$  abnimmt (s. Abb. 5.11). Am besten ist dieser Effekt bei Zellen aus dem peripheren Blut erkennbar. Das bedeutet, dass TGF- $\beta_1$  scheinbar vor allem eine hemmende Wirkung auf Th1-Zellen hat. Gegensätzlich verhalten sich Th2-Zellen. Sie scheinen nicht gehemmt zu werden. Die IL-4 Sekretion steigt eher an unter dem Einfluss von TGF- $\beta_1$ . D. h. TGF- $\beta_1$  führt zu einer Favorisierung von Th2-Zellen.

## 5.4 Ergebnisse der Proliferationsmessung mittels $^3\text{H}$ -Thymidineinbau

Mononukleäre Zellen wurden durch Dichtegradientenzentrifugation aus peripherem Blut und Synovialflüssigkeit isoliert und für 3 Tage inkubiert. Anschließend wurde anhand des  $^3\text{H}$ -Thymidineinbaus die Proliferation gemessen.

Wie in Abbildung 5.12 ersichtlich, lässt sich bei Zellen aus peripherem Blut bei niedrigen und hohen anti-CD3-Konzentrationen keine hemmende Wirkung von TGF- $\beta_1$  belegen.



**Abbildung 5.12:** Mononukleäre Zellen wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation aus peripherem Blut und SF isoliert und für 24 Stunden nach Beschichtung mit 0,1 bzw. 5 µg/ml plattengebundenem anti-CD3 (mit und ohne Zugabe von 5 ng/ml exogenem TGF-β<sub>1</sub>) stimuliert. Nach weiteren 48 Stunden erfolgte durch Zugabe von <sup>3</sup>H-Thymidin die Proliferationsmessung. *Legende:* rot [●]: persistierende Oligoarthritis, grün [□]: RF-negative Polyarthritis, schwarz [\*]: andere JIA Arthritiden.

Weder bei der oligoartikulären noch bei der RF-negativen polyartikulären Verlaufsform ergab sich eine statistisch signifikante proliferationshemmende Wirkung. Anders stellt es sich bei Zellen der SF dar. Vor allem Zellen von Patienten mit einer oligoartikulären Verlaufsform zeigen eine ausgeprägte (hochsignifikante) Proliferationshemmung unter der Anwesenheit von TGF- $\beta_1$ . Dieser Effekt ist bei Zellen, die mit einer hohen anti-CD3-Konzentration stimuliert wurden, am ausgeprägtesten. Bei synovialen Zellen von Patienten mit einer RF-negativen Polyarthrititis ist das Bild inhomogen, aber es scheint zumindest bei den hoch stimulierten Zellen eine hemmende Wirkung von TGF- $\beta_1$  vorzuliegen. Bei niedriger Stimulation ist das Ergebnis aufgrund der niedrigen Fallzahl bei der seronegativen Polyarthrititis nicht eindeutig.

Da bei dieser Analyse alle CD3<sup>+</sup>-Zellen erfasst sind, kann nicht zwischen CD4<sup>+</sup>-T-Zellen und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen unterschieden werden. Zusammen mit den vorhergehenden Untersuchungen scheint die Hemmung aber vor allem durch den Effekt auf CD8<sup>+</sup>-T-Zellen zustande zu kommen.

### 5.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Isolierte T-Zellen aus peripherem Blut und Synovialflüssigkeit wurden mittels Durchflusszytometrie (FACS) phänotypisch charakterisiert (CD4, CD8, CD45RO, CD69, CD25, HLA-DR, TGF- $\beta$ -RII) und auf ihre Empfindlichkeit gegenüber TGF- $\beta_1$  sowie ihre Zytokinsekretion (IFN- $\gamma$  und IL-4) untersucht.

In der Synovialflüssigkeit dominierten aktivierte Gedächtniszellen (CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>) bei allen Patienten. Dabei zeigten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen die höchste Expression (97 %). Neben der hohen Expression der Aktivierungsmarker HLA-DR und CD69 fällt bei synovialen T-Zellen eine starke Zunahme regulatorischer CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high+</sup>-T-Zellen auf. Ebenfalls zeigte sich bei der Phänotypisierung (vor allem bei der oligoartikulären Verlaufsform) eine Zunahme an CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in SF gegenüber peripherem Blut.

Die Analyse der Zytokinsekretion ergab, dass es vor allem bei Patienten mit einer oligoartikulären Arthritis zu einer starken Akkumulation IFN- $\gamma$ -sezernierender Th1-Zellen in der Synovialflüssigkeit kommt. Bei den IL-4-sezernierenden Th2-Zellen zeigte sich dagegen ein indifferentes Bild. Bei Patienten mit seronegativer Polyarthrititis scheinen sogar IL-4-sezernierende Th2-Zellen im peripheren Blut zu überwiegen. Unter Anwesenheit von TGF- $\beta_1$  kommt es zu einer Abnahme von IFN- $\gamma$  (Th1-Zellen), d.h TGF- $\beta_1$  führt zu einer Favorisierung von Th2-Zellen.

Der Einfluss von TGF- $\beta_1$  auf die Proliferation mononukleärer Zellen wurde mittels  $^3\text{H}$ -Thymidineinbau und CFSE-Färbung analysiert. Beim Thymidineinbau zeigte sich eine deutliche Hemmung synovialer Zellen unter Anwesenheit von TGF- $\beta_1$  (bei oligo- und polyartikulärer Verlaufsform). Durch CFSE-Färbung gelang eine Differenzierung zwischen CD4 $^+$ - und CD8 $^+$ -T-Zellen. CD8 $^+$ -T-Zellen wurden sowohl aus peripherem Blut als auch aus SF von Patienten mit oligoartikulärer JIA durch TGF- $\beta_1$  deutlich gehemmt, während bei CD4 $^+$ -T-Zellen eine eindeutige Proliferationshemmung nur im peripheren Blut nachzuweisen war. Lediglich synoviale Zellen von Patienten mit seronegativer Polyarthritiden zeigten eine Hemmung durch exogenes TGF- $\beta_1$ . Dabei konnte gezeigt werden, dass bei peripheren wie auch synovialen CD4 $^+$ - und CD8 $^+$ -T-Zellen der TGF- $\beta$ -Rezeptor-II ausreichend vorhanden ist und somit auch eine Grundvoraussetzung für eine Sensitivität gegenüber TGF- $\beta_1$  gegeben ist.

# 6 Diskussion

## 6.1 Pathogenese der JIA

Die Juvenile Idiopathische Arthritis (JIA) ist eine heterogene Gruppe entzündlicher Erkrankungen der Gelenke im Kindesalter, deren Pathogenese und Ätiologie noch immer weitgehend ungeklärt sind. Grundlage der JIA ist eine Immunreaktion der Synovia, welche wahrscheinlich T-Zell vermittelt ist [44, 143].

Man geht davon aus, dass genetische Faktoren (bestimmte MHC-Moleküle [53, 88]) im Zusammenspiel mit exogenen Faktoren die Erkrankung verursachen. Es handelt sich hierbei vermutlich um einen komplexen genetischen Hintergrund [93], wobei sich die unterschiedlichen Subtypen der JIA unterschiedlich verhalten. So ergaben Studien für den frühkindlichen Typ<sup>1</sup> der Oligoarthritis Assoziationen mit bestimmten MHC Molekülen [3]. Vor allem drei unterschiedliche Regionen des HLA-Systems (s. auch Abb. 2.2) scheinen damit assoziiert zu sein. Erstens: HLA-A2, zweitens: HLA-DR8, -DR11 und -DR12 und drittens: HLA-DQA1\*0401, -DQA1\*0501, -DQA1\*0601 sowie -DPB1\*0201. Detaillierte Untersuchungen zur Klärung der HLA-Assoziationen einzelner Subtypen der JIA ergaben beispielsweise für die persistierende und die extended oligoartikuläre Form eine Assoziation mit HLA-DRB1\*08-DQA1\*0401-DQB1\*0402 und -DRB1\*11-DQA1\*05-DQB1\*03 [131].

Offensichtlich erkranken aber nicht alle Menschen mit demselben genetischen Hintergrund an einer Autoimmunkrankheit. Vermutlich ist deshalb selbst bei einer genetischen Disposition ein Entgleisen diverser Regulationsmechanismen für einen Ausbruch der Erkrankung erforderlich. Diese verschiedenen Regulationsmechanismen wirken normalerweise supprimierend auf die autoaggressiven Tendenzen des Immunsystems.

Die Immunantwort kann durch Zytokine oder über regulatorische Zellen moduliert werden [57, 120]. Beispielsweise führt die systemische Applikation von TGF- $\beta_1$  im Mausmodell zu einer deutlichen Besserung der Arthritis, während sich das Krankheitsbild durch die Gabe von TGF- $\beta_1$ -Antikörpern verschlechtert [72, 132]. Beobachtungen an TGF- $\beta_1$  knockout

---

<sup>1</sup>gemäß EULAR Einteilung

Mäusen (-/-), die an einer ausgeprägten Multisystemerkrankung leiden [71, 121], erhärten die Hinweise darauf, dass TGF- $\beta$  eine Schlüsselrolle in der T-Zellhomöostase einnimmt. Eventuell liegen auch Parallelen zwischen den chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen, dem M. Crohn und der Colitis ulcerosa und der chronisch-entzündlichen JIA vor. Interessant ist dies, da in verschiedenen Arbeiten [6, 37] erstaunlicherweise eine Erhöhung des (immuninhibitorischen) TGF- $\beta_1$  in der Darmmukosa dieser Patienten nachgewiesen wurde. Wahrscheinlich ist diese erhöhte TGF- $\beta$ -Konzentration durch einen Defekt in der TGF- $\beta_1$ -Signalkaskade verursacht. Insbesondere gibt es Hinweise auf einen Mangel an inhibitorischem Smad7 [92], welcher so eine suffiziente Funktion des TGF- $\beta_1$  verhindert (s. hierzu auch 2.2.4.1 der Einleitung).

Auch T-Helferzellen spielen eine Rolle bei dem Krankheitsgeschehen. Sie lassen sich anhand ihres Zytokinmusters in Th1- und Th2-Zellen unterscheiden (s. Tab. 2.4). Th1-Zellen produzieren vorrangig IL-2 und IFN- $\gamma$ , Th2-Zellen dagegen vor allem IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 [79]. Inzwischen mehren sich die Hinweise, dass IFN- $\gamma$ -sezernierende Th1-Zellen eine Schlüsselrolle einnehmen und es sich daher wahrscheinlich um eine Th1-Pathogenese der JIA handelt [140, 142]. Dabei ist vor allem erwähnenswert, dass TGF- $\beta_1$  die Proliferation von naiven T-Zellen und von Gedächtniszellen vom Th1-Typ hemmen kann. Aktivierte T-Zellen und Th2-Zellen zeigen sich dagegen als weitgehend resistent gegenüber dem inhibitorischen Effekt von TGF- $\beta_1$  [55].

## 6.2 Phänotypisierung synovialer vs. peripherer Zellen

Die zellulären Elemente des Blutes entstehen aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks. Diese teilen sich in eine lymphatische-Zelllinie, aus dieser entstehen die NK-, B- und T-Zellen, und in eine myeloetische-Zelllinie (Granulozyten, Monozyten, Megakaryozyten und Erythrozyten) auf. Nachdem im Thymus das T-Zellrezeptor Rearrangement der Thymozyten ( $CD2^+CD7^+CD3^-$ ) stattgefunden hat, kommt es während der weiteren Ausreifung zur T-Zell-Selektion, der sogenannten negativen Selektion. Nach ihrer Reifung im Thymus treten die T-Lymphozyten in die Blutbahn über und werden fortan als naiv bezeichnet. Sie tragen das Oberflächenantigen CD45RA. Durch eine phänotypische Charakterisierung der Zellen ist es möglich, Aussagen über den Entwicklungszustand der Zelle, die Funktion und den Aktivitätszustand zu treffen [125]. Frühere Studien haben gezeigt, dass die Wirkung von TGF- $\beta_1$  abhängig ist von dem Aktivierungs- und Differenzierungsstatus der Zellen [43].

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass es zu einem Überwiegen von  $CD8^+$ -T-Zellen

**Tabelle 6.1:** Typische Normbereiche der wesentlichen Lymphozyten-Subpopulationen im Blut von Erwachsenen (modifiziert nach [130]). Im peripheren Blut sind nur 2 % des gesamten Lymphozytenpools des Menschen enthalten. Pro Tag werden die Lymphozyten circa 50 mal ausgetauscht. Dadurch passieren insgesamt täglich  $500 \times 10^9$  Lymphozyten den Blutkreislauf. Neben exogenen Faktoren, wie beispielsweise Medikamenten, haben auch viele physiologische Faktoren (Stress, körperliche Anstrengung, Alter, circadianer Rhythmus) einen Einfluss auf die Lymphozytenverteilung im Blut.

Zelltyp	Oberflächenmarker	Anteil an gesamter Lymphozytenpopulation
Reife T-Zellen	$CD3^+$	69 - 93 %
T-Helferzellen	$CD4^+$	35 - 72 %
Zytotoxische T-Zellen	$CD8^+$	7 - 33 %
Naive T-Zellen	$CD4^+CD45RA^+$	14 - 43 %
Aktivierte T-Zellen	$CD3^+CD25^+$	1 - 7 %
	$CD3^+HLA - DR^+$	1 - 11 %
Reife B-Zellen	$CD19^+$	3 - 13 %

in der Synovialflüssigkeit gegenüber peripherem Blut kommt. So ergab sich bei der persistierenden oligoartikulären Verlaufsform durch eine 2,9-fache Anreicherung sogar ein Überwiegen von  $CD8^+$ -T-Zellen ( $\frac{CD4^+}{CD8^+} = 0,93$ ). Dies ist bemerkenswert, da nur sehr wenige Daten zur Wirkung von  $TGF-\beta_1$  auf  $CD8^+$ -T-Zellen vorliegen [46]. Zu einer schwächeren Anreicherung kommt es bei der RF-negativen Polyarthrit, so dass  $CD4^+$ -T-Zellen hier immer noch gering überwiegen ( $\frac{CD4^+}{CD8^+} = 1,66$ ). Diese Ergebnisse bestätigen frühere Untersuchungen [94], die zeigten, dass das  $\frac{CD4^+}{CD8^+}$ -Verhältnis bei der oligoartikulären Verlaufsform signifikant niedriger ist als bei der polyartikulären Verlaufsform. Betrachtet man die Rheumatoide Arthritis, eine verwandte Erkrankung, so scheint dort eine persistierende Aktivierung autoreaktiver  $CD4^+$ -T-Zellen eine wichtige Rolle zu spielen [114]. Aber es wurde auch, im Einklang mit den eigenen Daten, eine Anreicherung von  $CD8^+$ -T-Zellen in der SF von RA Patienten beobachtet [39, 45]. Das  $\frac{CD4^+}{CD8^+}$ -Verhältnis lag dabei in der SF bei Patienten mit RA bei diesen Untersuchungen bei  $1,1 \pm 0,5$  [39]. Die in Kap. 5.1 vorgestellten Ergebnisse zeigten dagegen ein  $\frac{CD4^+}{CD8^+}$ -Verhältnis von  $0,93 \pm 0,86$  (pers. Oligoarthrit) bzw.  $1,66 \pm 0,69$  (RF- Polyarthrit). Eine verstärkte Anreicherung  $CD8^+$ -T-Zellen ist bei der JIA eher mit einem oligoartikulären Verlauf assoziiert, während bei der RA ein polyartikulärer Verlauf vorliegt. Bei der RA ist das Überwiegen von  $CD8^+$ -T-Zellen auf eine Akkumulation von  $CD8^+$ -T-Zellklone zurückzuführen [86]. Auch für die JIA scheinen synoviale T-Zellen ein oligoklonales Muster zu besitzen [23].

Es scheint so, dass bei der RA am Ablauf der Gelenkdestruktion  $CD8^+$ -T-Zellen unmittelbar beteiligt sind. Interessant ist, dass es gerade bei der gutartigeren oligoartikulären Ver-



laufsform der JIA zu einer stärkeren Anreicherung mit CD8<sup>+</sup>-T-Zellen kommt als bei der seronegativen polyartikulären Verlaufsform. Bemerkenswert ist, dass sich auch im peripheren Blut von JIA Patienten ein ähnlicher Trend beobachten lässt. Das  $\frac{CD4^+}{CD8^+}$ -Verhältnis lag bei der oligoartikulären Verlaufsform bei  $2,70 \pm 1,78$  und bei der seronegativen Polyarthriti-  
tis bei  $3,34 \pm 1,30$ . Bei der zuvor erwähnten Untersuchung an Patienten mit Rheumatoider Arthritis zeigte sich ein  $\frac{CD4^+}{CD8^+}$ -Verhältnis von  $2,4 \pm 0,3$  [39]. Wiederum scheint der immunologische Zellstatus der RA eher der oligoartikulären Form der JIA zu ähneln. Insgesamt deuten die Untersuchungen auf unterschiedliche Pathomechanismen bei den Untergruppen der autoimmunen Gelenkentzündungen hin.

Die synovialen und peripheren Zellen wurden auf weitere Oberflächenantigene untersucht, die im Folgenden kurz dargestellt werden.

## CD45RO

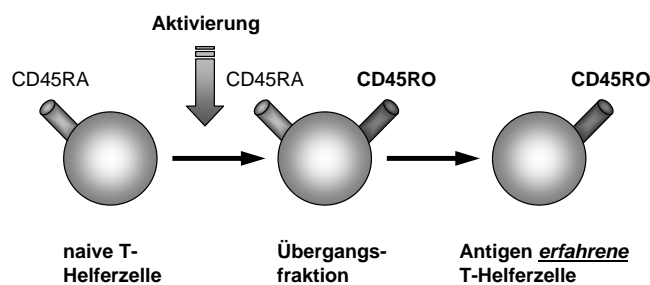


Abbildung 6.1: naive Th-Zellen vs. Antigen-erfahrene Th-Zellen

Bei Antigenkontakt interagieren T-Zellen mit antigenpräsentierenden Zellen (APZ). Diese APZ verarbeiten das Fremdan-  
tigen und präsentieren es durch MHC-Klasse-II-Moleküle auf ihrer Oberfläche. Nachdem eine spezifische T-Zelle das gebundene Antigen erkannt hat, wird ein Komplex aus T-Zellrezeptor (TZR), Antigen-Peptid und MHC-Molekül gebildet. Hierfür muss auch ein kostimulatorisches Signal zwischen dem B7-Molekül der APZ und CD28 der T-Zelle vorhanden sein. Durch intrazelluläre Signaltransduktion kommt es zu einer Gen-Aktivierung u. a. zur Transkription des Interleukin-2-Gens. Es entwickeln sich nun aus den naiven T-Zellen zytokinproduzierende Effektorzellen. Ein Teil dieser Zellen treten in einen Pool ruhender Gedächtniszellen ein (CD45RO<sup>+</sup>-T-Zellen, siehe Abb. 6.1) und können bei einem zweiten Antigenkontakt erneut Effektorzellen werden. Dies geschieht sehr schnell und sorgt für eine Boosterung der Immunantwort durch beschleunigte Proliferation und Zytokinproduktion. Daneben besitzen Gedächtniszellen auch die Eigenschaft, verstärkt auf Aktivitätsstimuli reagieren zu können [1, 113, 125]. Die getroffenen Aussagen sind so

nur gültig für CD4<sup>+</sup>-T-Zellen. Bei CD8<sup>+</sup>-T-Zellen ist es leider nicht möglich, mittels Expression von CD45RA bzw. CD45RO ausreichend gut zwischen naiven und Antigen erfahrenen Zellen zu unterscheiden [98]. CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>-T-Zellen sind bereits gereifte Zellen. Die CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>-T-Zellen lassen sich in CD27<sup>+</sup> naive T-Zellen und in CD27<sup>-</sup> reife zytotoxische T-Zellen weiter unterteilen [47].

### CD69

CD69 ist das früheste Glykoprotein, das nach Aktivierung von T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und NK-Zellen auf der Zelloberfläche exprimiert wird. Die Expression von CD69 wird dabei durch Aktivierung der Proteinkinase C induziert [73]. Des Weiteren zeigt CD69 auch eine gesteigerte Zytokinproduktion der Zelle an [103]. CD69 besteht aus 27 kD und 33 kD großen Polypeptiduntereinheiten und ist ein heterodimerer Proteinkomplex [123]. Der Hauptkomplex besteht aus einer Reihe von Homodimeren, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind und ebenso aus Untereinheiten gleicher Core-Proteine bestehen. Diese sind unterschiedlich glykosyliert [10]. CD69 ist auch als Aktivierung induziertes Molekül (AIM) [17], Early Activation Antigen (EA-1) [48], Leu-23 [73] oder als MLR-3 Antigen [26] bekannt.

Die Expression von CD69 erfolgt *in vivo* kurz nach Expression der Antigene CD2 und CD7. CD69 wird nach allogener Aktivierung primär von aktivierten T-Zellen aber auch von B-Zellen und NK-Zellen exprimiert. Andere Aktivierungsmarker wie u. a. CD25 oder HLA-DR werden erst später exprimiert [74, 129]. Nach der Zellaktivierung ist CD69 das früheste induzierbare Glykoprotein auf der Zelloberfläche [26, 48, 73]. Es ist an der Lymphozytenproliferation und der Zytokinsynthese beteiligt [74] und besitzt mehrere Funktionen eines Signalübertragenden Rezeptors für T-Lymphozyten, NK-Zellen und Thrombozyten.

Anhand von Proteinsequenzanalysen konnte gezeigt werden, dass CD69 ein Mitglied der Calcium abhängigen Transmembranrezeptoren vom Typ II ist und der Superfamilie der C-Typ Lektine angehört [128]. Zwischen CD69 und anderen Typ II Lektin-Rezeptoren gibt es auch strukturelle Ähnlichkeiten. So ähnelt es u.a. CD23, dem IgE Rezeptor (CD23) von aktivierten B-Zellen und Monozyten [8, 9, 59, 67, 75] oder auch dem T-Zellantigen Ly4 bei Mäusen [18, 144] und dem hepatozytären Asialoglykoproteinrezeptor [31]. In Verbindung mit PMA<sup>2</sup> oder anti-CD3 Antikörpern kann CD69 aber auch als kostimulatorisches Molekül fungieren [145].

---

<sup>2</sup>PMA: Phorbol-Myristate-Acetate

## HLA-DR

T-Lymphozyten besitzen die Fähigkeit, kurze Peptide zu erkennen, wenn diese (nicht-kovalent) in der zentralen Grube bestimmter Proteine gebunden sind. Gemeinsam bilden diese Proteine den Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC, Aufbau s. Abb. 2.1.1). Durch Bindung des TZR an das Oberflächenepitop, welches vom MHC-Molekül in Verbindung mit dem passenden Peptid gebildet wird, wird die T-Zellaktivierung initiiert. MHC-Klasse-II Moleküle sind Heterodimere und bestehen aus zwei transmembranösen Ketten. Unter dem Einfluss von  $\text{IFN-}\gamma$  kommt es zur Expression von MHC II Molekülen auf vielen Zellen. Ihre Aufgabe ist es, Peptide zu binden, die lysosomal oder endosomal aus extrazellulären Proteinen abgebaut wurden. Der MHC-Klasse-II-Komplex (s. auch Einleitung Punkt 2.1.1) besteht aus 4 Genfamilien: HLA-D, -DR, -DQ und -DP. HLA-DR wird neben B-Zellen und Monozyten vor allem auch auf aktivierten T-Zellen exprimiert. Durch den Nachweis von HLA-DR kann somit indirekt eine Analyse der T-Zellaktivierung erfolgen.

Die genauere Analyse ergab, dass in der SF aktivierte hochdifferenzierte Gedächtniszellen mit hoher Expression von CD45RO dominieren. Wie bei früheren Studien [11] konnte auch eine starke Zunahme der Aktivierungsmarker CD69 und HLA-DR in der SF gegenüber peripherem Blut beobachtet werden. Auffällig ist dabei vor allem das unterschiedliche Verhalten von  $\text{CD4}^+$ -T-Zellen und  $\text{CD8}^+$ -T-Zellen. Der Anteil an  $\text{CD4}^+\text{HLA-DR}^+$ -T-Zellen war deutlich höher als der von  $\text{CD8}^+\text{HLA-DR}^+$ -T-Zellen. Dagegen war der Anteil an  $\text{CD8}^+\text{CD69}^+$ -T-Zellen höher als bei  $\text{CD4}^+\text{CD69}^+$ -T-Zellen.

CD69 ist das früheste Glykoprotein, das nach Aktivierung exprimiert wird. Es repräsentiert daher eine frische Aktivierung. HLA-DR dagegen kann als Langzeitaktivitätsmarker angesehen werden. Die gegensätzliche Konstellation von  $\text{CD4}^+\text{HLA-DR}^+$ - und  $\text{CD4}^+\text{CD69}^+$ -T-Zellen bzw.  $\text{CD8}^+\text{HLA-DR}^+$ - und  $\text{CD8}^+\text{CD69}^+$ -T-Zellen könnte daher auf unterschiedliche Aktivierungszeitpunkte der T-Zellen zurückzuführen sein. Zwischen den beiden Verlaufsformen der persistierenden Oligoarthritis und der seronegativen polyartikulären Verlaufsform zeigen sich keine deutlichen Unterschiede.

## CD25

Einer der bedeutsamsten physiologischen Faktoren für die Aktivierung von T-Zellen ist Interleukin 2 (IL-2). Der spezifische Rezeptor für IL-2 besteht aus einer alpha-Kette (p55, CD25) und einer beta-Untereinheit (p75). Diese sind über nicht kovalente Bindungen miteinander verbunden. Isoliert ist die alpha-Kette nur ein Rezeptor mit niedriger Affinität für IL-2 und die beta-Kette ein Rezeptor mit mittlerer Affinität. Aktivierte T-Zellen, aber auch B-

Zellen, Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen exprimieren den hochaffinen IL-2 Rezeptor [137]. Eine Blockade des IL-2 Rezeptors kann durch Bindung an CD25 (alpha-Kette des Rezeptors) erfolgen. Hierdurch wird die T-Zellaktivierung durch IL-2 verhindert. In der Transplantationsmedizin, in der die Supprimierung der T-Zellaktivierung notwendig ist, konnte dieses Prinzip erstmals angewandt werden. Zur Blockade des CD25 stehen u. a. die Substanzen Basiliximab und Daclizumab zur Verfügung [16, 100].

Eine bestimmte Gruppe, die  $CD4^+CD25^{high+}$ -T-Zellen, bezeichnet man auch als regulatorische T-Zellen ( $T_{regs}$ ). Ihre Rolle bei autoimmunen Krankheiten wie der JIA und der Rheumatoiden Arthritis wird intensiv untersucht. So kann bei erwachsenen Patienten, die an einer Rheumatoiden Arthritis leiden, eine Zunahme an  $CD4^+CD25^{high+}$ -T-Zellen beobachtet werden [15]. Bemerkenswert ist, dass diese Zellen eine gesteigerte Suppressoraktivität gegenüber T-Zellen zeigten [4]. Noch fraglich ist das exakte Zusammenspiel von TGF- $\beta_1$  und  $CD4^+CD25^{high+}$ -T-Zellen. Es gibt auch Hinweise darauf, dass TGF- $\beta_1$  die Induktion von regulatorischen T-Zellen fördert [20]. Da TGF- $\beta_1$  auch sehr wichtig für die Expansion von  $CD4^+CD25^{high+}$ -T-Zellen in vivo ist [57, 58], wirken diese beiden Regulationsmechanismen eng zusammen. Die Ergebnisse in 5.1 zeigten keine unterschiedliche Anreicherung von  $CD4^+CD25^{high+}$ -T-Zellen bei der prognostisch günstigeren oligoartikulären und der ungünstigeren polyartikulären Verlaufsform. Daher kann durch eine Analyse der  $T_{regs}$  keine direkte Aussage über den Krankheitsverlauf getroffen werden. Der Anteil der  $CD4^+CD25^{high+}$ -T-Zellen war aber in der SF im Vergleich zum peripheren Blut deutlich erhöht. Dies bestätigen auch frühere Untersuchungen, bei denen sich kein Unterschied zwischen der persistierenden Oligoarthritis und der ungünstigeren extended Oligoarthritis hinsichtlich der Zahl synovialer  $T_{regs}$  ( $CD4^+CD25^{high+}$ -T-Zellen) zeigte [69]. Auch die Zunahme der regulatorischen Zellen in der SF gegenüber peripherem Blut stimmt mit dieser Studie gut überein. In der Studie zeigten sich mehr  $T_{regs}$  im peripherem Blut bei der polyartikulären Verlaufsform. Dies ist aber aufgrund der Definition (3 % = hochpositive) eine schwierige Aussage, da es interindividuell sehr unterschiedlich ist. Deshalb wurde der Schwerpunkt in der vorliegenden Arbeit auf den Vergleich peripheres Blut vs. SF gelegt.

### 6.3 Das regulatorische Zytokin TGF- $\beta_1$

Die TGF- $\beta$ -Superfamilie umfasst viele verschieden Proteine, die neben dem TGF auch Activin, BMP<sup>3</sup> und AMP<sup>4</sup> beinhalten [63]. Obwohl sie für die Signaltransduktion [50] verschie-

---

<sup>3</sup>Bone Morphogenetic Proteins

<sup>4</sup>Anti-Müllerian Hormone

dene Typen von Rezeptorregulierten-Smads<sup>5</sup> [90, 109] verwenden, ist immer das Co-Smad 4 beteiligt [91]. Von den drei bekannten Formen (TGF- $\beta_{1-3}$ , [124]) des Transforming growth factor- $\beta$  bilden Zellen des Immunsystems wiederum vor allem TGF- $\beta_1$ , dessen wichtigste Eigenschaft seine immunregulatorische Wirkung ist, mit der es u. a. die Proliferation und Differenzierung der Zellen reguliert [12, 85]. Der Aufbau der TGF- $\beta$ -Rezeptoren und die TGF- $\beta$ -Signalkaskade ist ausführlich in der Einleitung unter 2.2.4.1 erklärt.

TGF- $\beta_1$  wird eine entscheidende Rolle bei der Tumorgenese und der Entstehung von Autoimmunerkrankungen zugeschrieben. Aus Studien, bei denen TGF- $\beta_1$  knockout Mäuse (-/-) unter einer ausgeprägten Multisystemerkrankung [71, 121] litten, lässt sich schließen, dass TGF- $\beta_1$  ebenfalls eine entscheidende Funktion bei der T-Zell Homöostase einnimmt.

Paradoxerweise kann aktiviertes TGF- $\beta$  zwei gegensätzliche Einflüsse auf die T-Zellfunktion ausüben: hemmende und stimulierende Wirkungen [19, 136]. Der eigentliche biologische Effekt von TGF- $\beta_1$  hängt dabei stark vom Zelltyp, den Wachstumsbedingungen und dem Differenzierungsgrad [43] der Zielzelle ab. Lösliches TGF- $\beta_1$  kann direkt inhibierend auf die T-Zellfunktion wirken, die Makrophagenaktivierung verhindern und die Funktion von dendritischen Zellen durch seine immunregulatorischen Eigenschaften verändern. Ein Defekt dieses Zytokins führt zu einer tödlichen Immundysregulation und zu einem Multiorganversagen [24, 71]. Der proliferationshemmende Effekt von TGF- $\beta_1$  wurde vor allem für naive T-Zellen sowie Th1-Zellen (Gedächtniszellen) gezeigt, aktivierte T-Zellen oder Th2-Zellen sind weitgehend resistent gegenüber diesem inhibitorischen Effekt [54]. TGF- $\beta_1$  zeigt durch Hemmung der T-zellabhängigen Produktion von Antikörpern und der Entstehung zytotoxischer T-Zellen überwiegend antiinflammatorische Effekte [52].

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass bei CD4<sup>+</sup>-T-Zellen und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen ausreichend TGF- $\beta$ -Rezeptoren vorhanden sind und somit eine Sensitivität gegenüber TGF- $\beta_1$  möglich sein muss. Auffallend ist, dass bei CD4<sup>+</sup>-T-Zellen die Expression des TGF- $\beta$ -Rezeptors-II in der SF im Mittel dreimal höher ist als im peripheren Blut. Dabei scheint es zwei verschiedene Gruppen zu geben. Eine Gruppe mit 6 Patienten, bei der die Expression des TGF- $\beta$ -Rezeptors-II steigt, und eine Gruppe mit 10 Patienten, bei der die Expression nahezu unverändert bleibt. Dagegen ist bei CD8<sup>+</sup>-T-Zellen die Expression in der SF etwas geringer als im Blut. In beiden Fällen zeigten Zellen von Patienten mit seronegativer polyartikulärer Verlaufsform eine höhere Expression des Rezeptors als Patienten mit einer persistierenden Oligoarthritis.

---

<sup>5</sup>SMAD: Signalübertragungsprotein, Smad leitet sich ab von mad, einem Drosophila-Protein (mothers against decapentaplegic) und von sma (smaller worms), einem Gen aus *Caenorhabditis elegans*.

Fraglich bleibt dabei, wie CD4<sup>+</sup>-T-Zellen auf TGF- $\beta$ <sub>1</sub> ansprechen. Denkbar wäre einerseits, dass durch die erhöhte Rezeptorenexpression synoviale CD4<sup>+</sup>-T-Zellen besser auf TGF- $\beta$ <sub>1</sub> ansprechen können. TGF- $\beta$ <sub>1</sub> könnte also seine immuninhibitorische Wirkung besser entfalten. Die erhöhte Expression des TGF- $\beta$ -R-II kann aber auch darauf hinweisen, dass CD4<sup>+</sup>-T-Zellen schlechter auf TGF- $\beta$ <sub>1</sub> ansprechen und dadurch mehr Rezeptoren für die gleiche Wirkung notwendig sind. Um diese konträren Fragestellung zu klären, wurden Proliferationsversuche mit und ohne Zugabe von TGF- $\beta$ <sub>1</sub> durchgeführt (s. 6.5).

## 6.4 Th1- und Th2-Zellen

Die Differenzierung zu Th1- und Th2-Zellen wird durch das Zytokinumfeld und durch andere Faktoren bestimmt. So ist die Anwesenheit kostimulatorischer Moleküle, die Antigenkonzentration und die Interaktion zwischen dem antigenpräsentierenden MHC-II-Molekül und dem T-Zellrezeptor von Bedeutung [110, 111, 127]. Inzwischen häufen sich die Hinweise, dass Th1-Zellen, die das proinflammatorische Zytokin IFN- $\gamma$  sezernieren, eine Schlüsselrolle in der JIA Pathogenese einnehmen [140, 142].

Frühere Untersuchungen an T-Zellen haben gezeigt, dass sie zur optimalen Aktivierung und Zytokinproduktion einen kostimulatorischen Faktor benötigen. Vor allem Th2-Zellen benötigten die Anwesenheit von anti-CD28 Antikörpern [54]. Deshalb erfolgte auch bei diesen Versuchen die Stimulation zur Zytokinsekretion mit anti-CD3- und anti-CD28-Antikörpern. Die Analyse der *in vitro* Sekretion von IFN- $\gamma$  und IL-4 hat gezeigt, dass vor allem in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit einer oligoartikulären Arthritis IFN- $\gamma$ -sezernierende Zellen einen signifikant höheren Anteil als im peripheren Blut haben (s. Abb. 5.10). Dieser Effekt lässt sich auf niedrigerem Niveau auch bei der RF-negativen polyartikulären Verlaufsform beobachten. IL-4-sezernierende Th2-Zellen zeigten kein eindeutiges Verhalten. Vor allem bei der oligoartikulären Arthritis ergibt sich ein sehr gemischtes Bild, eine Tendenz ist nicht sicher zu erkennen. Bei der seronegativen Polyarthritiden scheinen IL-4-sezernierende Zellen im peripheren Blut im Vergleich zur SF vermehrt vorzuliegen. Insgesamt ist der Anteil IL-4-sezernierender Th2-Zellen gegenüber IFN- $\gamma$ -sezernierenden Zellen deutlich niedriger. Insgesamt kann man daher von einer Beteiligung der Th1-Zellen bei der Pathogenese der JIA ausgehen. Dies bestätigen auch frühere Analysen einzelner synovialer T-Zellklone. Bei insgesamt 44 synovialen T-Zellklonen von Patienten mit JIA ergab sich 27-mal ein Th1- und 17-mal ein Th0-Phänotyp. Ein Th2-Phänotyp konnte in keinem der Fälle beobachtet werden [41].

Bei der Rheumatoiden Arthritis deuten aktuelle Daten ebenfalls auf eine Th1-Pathogenese

hin [35, 42]. Des Weiteren wurde bereits gezeigt, dass das proinflammatorische Zytokin IFN- $\gamma$  auch bei anderen autoaggressiven Erkrankungen wie beispielsweise dem Diabetes mellitus Typ 1 [78] eine wichtige Rolle spielt. Auch der seit Jahren erfolgreiche klinische Einsatz des löslichen TNF- $\alpha$ -Rezeptors Etanercept bei therapieresistenter JIA spricht für eine Schlüsselrolle von Th1-Zellen bei der Pathogenese der JIA [80]. Geht man von der führenden Rolle von Th1-Helferzellen aus, so ist es interessant, dass gerade diese Zellen in ihrer Proliferation von TGF- $\beta_1$  gehemmt werden. Sie zeigen ebenso wie naive T-Zellen und Gedächtniszellen eine Empfindlichkeit gegenüber TGF- $\beta_1$ . Dagegen gelten aktivierte T-Zellen und Th2-Helferzellen als weitgehend resistent gegenüber dem inhibitorischen Effekt von TGF- $\beta_1$  [55].

Zur Evaluation dieser Daten wurden zusätzlich Versuche auch unter Zugabe von TGF- $\beta_1$  durchgeführt. Dabei zeigte sich trotz weniger Daten, dass der Anteil IFN- $\gamma$ -sezernierender Th1-Zellen bei Anwesenheit von TGF- $\beta_1$  sowohl bei Zellen aus peripherem Blut als auch aus SF deutlich abnimmt. IL-4-sezernierende Th2-Zellen zeigten dagegen erwartungsgemäß keinen hemmenden Effekt von TGF- $\beta_1$  (s. Abb. 5.11). Dies bestätigt die o. g. Hypothese, dass TGF- $\beta_1$  vor allem auf Th1-Zellen eine hemmende Wirkung besitzt. Anders ausgedrückt, TGF- $\beta_1$  führt zu einer Favorisierung von Th2-Zellen und könnte dadurch indirekt anti-inflammatorisch wirken.

## 6.5 TGF- $\beta_1$ Empfindlichkeit synovialer vs. peripherer T-Zellen

Da mit dem positiven Nachweis der TGF- $\beta$ -II-Rezeptorenexpression die Grundvoraussetzung für ein Ansprechen auf TGF- $\beta_1$  gegeben war, konnte durch Zugabe von exogenem TGF- $\beta_1$  dessen Wirkung auf die Proliferation der isolierten Zellen aus peripherem Blut und SF untersucht werden.

Bei Patienten mit JIA und RA ist das Krankheitsbild durch Hyperplasie und Entzündung der Synovia geprägt. Neben einer erhöhten Konzentration an TGF- $\beta_1$  in der Synovialflüssigkeit [32] kann auch eine erhöhte TGF- $\beta_1$ -Konzentration in der Synovia von RA-Patienten nachgewiesen werden [25]. In Mausmodellen für arthritische Erkrankungen konnten diese Beobachtungen bestätigt werden. Die systemische Gabe von TGF- $\beta_1$  führt zu einer deutlichen Besserung des Krankheitsbildes. Damit im Einklang führt die Applikation von Antikörpern gegen TGF- $\beta_1$  zu einer Verschlechterung der Krankheit [72, 132]. Im Widerspruch dazu steht aber die Beobachtung, dass die Injektion von TGF- $\beta_1$  in die Gelenke gesunder

Ratten zu einer Synovitis mit einer schnellen Leukozyteninfiltration und einer massiven Hyperplasie der Synovia führt [33]. Obwohl die Rolle von TGF- $\beta_1$  in der Pathogenese der JIA noch weitgehend unbekannt ist, ergab eine Studie bereits, dass alle isolierten synovialen T-Zellklone (n = 10) von JIA-Patienten TGF- $\beta_1$  exprimierten [41].

In verschiedenen Arbeiten wurde bei anderen chronisch-entzündlichen Erkrankungen, wie dem M. Crohn oder der Colitis Ulzerosa, erstaunlicherweise eine Erhöhung des (immuninhibitorischen) TGF- $\beta_1$  in der Darmmukosa nachgewiesen [6, 37]. Dieser erhöhte Wert kommt wahrscheinlich durch einen Defekt in der Signalkaskade des TGF- $\beta_1$  zustande (Mangel an inhibitorischem Smad7 [92], s. 2.2.4.1). Trotz dieser hohen Konzentration des eigentlich immunsupprimierend wirkenden Zytokins TGF- $\beta_1$  bestand die Entzündungsreaktion fort. Denkbar wäre es daher, dass in der Pathogenese der JIA ähnliche Defekte eine Rolle spielen. Es könnte sein, dass synoviale T-Zellen schlecht auf TGF- $\beta_1$  ansprechen, obwohl sie den TGF- $\beta$ -Rezeptor-II in ausreichendem Maße exprimieren. Durch phänotypische Charakterisierung konnte gezeigt werden, dass der TGF- $\beta_1$ -Rezeptor-II exprimiert wird. Zu klären bleibt daher die TGF- $\beta_1$ -Empfindlichkeit der synovialen und peripheren Zellen und ob Unterschiede zwischen den verschiedenen Verlaufsformen bestehen.

Bei der Proliferationsmessung zeigen die Ergebnisse des  $^3\text{H}$ -Thymidineinbaus (5.4), dass synoviale T-Zellen einer deutlichen Proliferationshemmung unter Anwesenheit von exogenem TGF- $\beta_1$  unterliegen. Am deutlichsten waren diese Effekte bei der oligoartikulären Verlaufsform zu beobachten. Bei der seronegativen Polyarthritits fand sich nur eine schwache Hemmung bzw. ein indifferentes Bild. Besonders interessant sind diese Daten, wenn man die Ergebnisse zusammen mit den Ergebnissen der Phänotypisierung betrachtet. Hier ergab sich gerade in der SF bei oligoartikulärem Verlauf eine fast 3-fache Anreicherung CD8<sup>+</sup>-T-Zellen gegenüber peripherem Blut. Berechnet man aus diesen Werten das  $\frac{\text{CD4}^+}{\text{CD8}^+}$ -Verhältnis, so beträgt es  $0,93 \pm 0,86$  und zeigt hierdurch ein Überwiegen von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen an. Bei der seronegativen Polyarthritits, welche keine eindeutige Proliferationshemmung nach Zugabe von TGF- $\beta_1$  zeigte, fand sich nur eine deutlich schwächere Anreicherung von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen. Damit überwogen weiterhin CD4<sup>+</sup>-T-Zellen. Es ist also anzunehmen, dass der gemessene proliferationshemmende Effekt von TGF- $\beta_1$  vor allem durch Hemmung von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen zustande kommt. Zur Bestätigung dieser Hypothese wurde zusätzlich auch eine Messung der T-Zellproliferation mit einer CFSE-Färbung durchgeführt (5.2.2). Hierbei erfolgte durch weitere Anfärbung der Zellen mit anti-CD4- und anti-CD8-Antikörpern eine getrennte Analyse der Proliferation von CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen. So konnte nachgewiesen werden, dass CD8<sup>+</sup>-T-Zellen des peripheren Blutes ebenso wie synoviale Zellen deutlich durch TGF- $\beta_1$  gehemmt werden. Im Einklang mit den o. g. Daten konnte dies erneut



am deutlichsten bei der persistierenden Oligoarthritis beobachtet werden.  $CD4^+$ -T-Zellen zeigten dagegen erwartungsgemäß ein indifferentes Verhalten. Nur synoviale Zellen von Patienten mit seronegativer Polyarthritis zeigten eine Proliferationshemmung.  $CD4^+$ -T-Zellen von JIA-Patienten mit pers. Oligoarthritis waren gegenüber  $TGF-\beta_1$  resistent.

Ein Grund dafür, warum gerade bei der günstigeren oligoartikulären Verlaufsform die  $CD4^+$ -T-Zellen nicht durch  $TGF-\beta_1$  gehemmt werden, kann darin liegen, dass sie auch die  $CD4^+CD25^{high+}$ -T-Zellen, die sogenannten regulativen T-Zellen, enthalten. Es könnte sein, dass durch den verminderten antiproliferativen Effekt auch die  $CD4^+CD25^{high+}$ -T-Zellen weniger gehemmt werden und so ihre immunregulative Funktion besser ausüben können. Für diese Hypothese spricht die deutliche Anreicherung von  $CD4^+CD25^{high+}$ -T-Zellen in der SF im Vergleich zum peripheren Blut (siehe Abb. 5.2). Eine neuere Studie konnte zeigen, dass im peripheren Blut bei der oligoartikulären Verlaufsform gegenüber der polyartikulären Verlaufsform ein deutlich höherer Prozentsatz an  $CD4^+CD25^{high+}$ -T-Zellen vorliegt [141]. Noch fraglich ist aber das exakte Zusammenspiel von  $TGF-\beta_1$  und  $CD4^+CD25^{high+}$ -T-Zellen. Es gibt Hinweise darauf, dass  $TGF-\beta_1$  die Induktion von regulativen T-Zellen fördert [20]. Da  $TGF-\beta_1$  andererseits auch sehr wichtig ist für die Expansion von  $CD4^+CD25^{high+}$ -T-Zellen in vivo [58, 57], wirken diese beiden Regulationsmechanismen eng zusammen. Bei der phänotypischen Charakterisierung zeigte sich eine erhöhte Expression des  $TGF-\beta$ -Rezeptor-II in der SF im Vergleich zum peripheren Blut nur bei  $CD4^+$ -T-Zellen. Bei  $CD8^+$ -T-Zellen war die Expression sogar im peripheren Blut höher als in der SF. Wie oben bereits erläutert, könnte der  $TGF-\beta_1$ -Rezeptor-II aufgrund des schlechteren Ansprechens der Zellen höher exprimiert werden.

Über intrazelluläre Defekte der Signalkaskade kann dadurch natürlich keine Aussage getroffen werden. Einen Ansatz hierfür liefern Studien zu anderen chronisch entzündlichen Erkrankungen. So wurde in der chronisch entzündeten Mukosa von Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa eine paradoxe Erhöhung von  $TGF-\beta_1$  festgestellt [6, 37]. Genaue Untersuchungen zeigten, dass dabei eine erhöhte Konzentration von Smad7, einem intrazellulären Inhibitor der  $TGF-\beta$ -Signalkaskade, vorliegt [92]. Ein solcher Zusammenhang konnte für die JIA noch nicht gefunden werden. Aber, obwohl auf allen Zellen der  $TGF-\beta$ -Rezeptor-II vorhanden ist, zeigen sie eine unterschiedliche  $TGF-\beta_1$  Empfindlichkeit. Dafür könnten bei den verschiedenen Verlaufsformen durchaus Unterschiede im intrazellulären  $TGF-\beta_1$ -Signalweg, eventuell durch erhöhte Expression von Smad7, verantwortlich sein.

Eine sinnvolle Fortführung dieser Studie könnte daher darin bestehen, die Signaltransduktion von  $TGF-\beta_1$  im Detail zu untersuchen. Abzuklären ist, ob es durch eine lokale Dysregulation zu einer Autoimmunreaktion kommt. Von besonderem Interesse ist dabei, ob eine

erhöhte intrazelluläre Konzentration des inhibitorischen Smad7 in CD4<sup>+</sup>-T-Zellen vorliegt. Ein tieferes Verständnis der Pathogenese der JIA könnte sich auch aus weiteren Experimenten mit synovialen und peripheren Zellen ergeben. Beispielsweise wäre ein interessanter Ansatz Zellen aus SF mit CFSE zu markieren, hierzu Zellen aus peripherem Blut hinzuzugeben und anschließend die Proliferation zu bestimmen. Dadurch könnten sich weitere interessante Aspekte, u. a. über die Zell-Interaktion, ergeben.

Auch die genaue Rolle der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high+</sup> regulatorischen T-Zellen könnte von weiterem Interesse sein. Neben der zuvor beschriebenen Wechselwirkung zwischen TGF-β<sub>1</sub> und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high+</sup>-T-Zellen existieren noch viele weitere Wechselwirkungen, die die Expression oder die Effekte von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high+</sup>-T-Zellen beeinflussen können. So konnte beispielsweise im Mausmodell gezeigt werden, dass CTLA-4<sup>6</sup> (entspricht CD152) die hemmende Wirkung von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high+</sup> aufheben bzw. sogar umkehren kann [108, 126] und CTLA-4 in vivo blockieren kann. Diese anti-CTLA-4 Behandlung kann dazu führen, dass (im Mausmodell) bei Diabetes mellitus oder bei entzündlichen Darmerkrankungen die protektiven Effekte der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high+</sup>-T-Zellen aufgehoben werden [115, 126]. CTLA-4 knockout Mäuse (-/-) beispielsweise entwickeln eine schwere autoimmunähnliche Erkrankung und versterben daran innerhalb des ersten Lebensmonats [133, 139]. Letztlich konnte gezeigt werden, dass der Grad der Expression von CTLA-4 bei humanen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high+</sup> Zellklonen korreliert mit deren hemmenden Wirkung [13, 112]. Auch die Produktion von TGF-β durch CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (Th1- und Th2-Zellen) wird durch Wechselwirkungen mit CTLA-4 induziert [21]. Eine wichtige Rolle spielt hierfür auch der T-Zellrezeptor (TZR). Die Stimulation des CD3-T-Zellrezeptorkomplexes bewirkt zwar keine unabhängige Produktion von TGF-β, sie ist aber erforderlich für eine optimale CTLA-4 vermittelte Produktion von TGF-β.

Schwierig ist nach wie vor die exakte Identifizierung der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high+</sup>-T-Zellen. Erst vor wenigen Jahren gelang der Nachweis von Foxp3. Hierbei handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der spezifisch in diesen Zellen exprimiert wird und für deren Entwicklung wichtig ist [38, 56, 65]. Diese Entdeckung ermöglicht es, durch Nachweis von Foxp3, etwa durch einen Westernblot, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high+</sup> regulatorische T-Zellen mit hoher Spezifität nachzuweisen. Bei anderen Autoimmunerkrankungen, wie dem Systemischen Lupus erythematosus (SLE), konnte bereits gezeigt werden, dass ein Defekt bei CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen eine entscheidende Rolle spielt. Bei unbehandelten Patienten erreichte die Gesamtzahl der regulatorischen Zellen nur die Hälfte der von gesunden Probanden [96]. Nach einer immunsuppressiven Behandlung (mit Methylprednisolon und Cy-

---

<sup>6</sup>Cytotoxic T-lymphocyte Associated Antigen

clophosphamid) fand sich ein signifikanter Anstieg an  $CD4^+CD25^{high}+Foxp3^+$  regulatorischen Zellen bei diesen Patienten, der Ausgangswert Gesunder wurde aber nicht erreicht. In einer experimentellen Therapiestudie, mit Patienten die an einer Rheumatoiden Arthritis leiden, konnte ein weiterer interessanter Effekt beobachtet werden. Diese Patienten wurden für 6 Monate mit dnaJP1 behandelt. DnaJP1 ist ein Peptid, das bei unbehandelten RA-Patienten eine proinflammatorische T-Zellantwort induziert. Hier zeigte sich ein Anstieg der  $CD4^+CD25^{high}+Foxp3^+$  Zellen und legt daher die Vermutung nahe, dass die Behandlung den Anstieg von regulatorischen T-Zellen induziert [104]. Dies erhärtet den Verdacht, dass bei der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen wie der JIA nicht ein spezifischer Defekt vorliegt. Vielmehr kommt die Erkrankung durch ein Versagen mehrerer Regulationsmechanismen, u. a. vermutlich auch der regulativen T-Zellen im Zusammenspiel mit  $TGF-\beta_1$ , zustande.

## 7 Zusammenfassung

Die Juvenile Idiopathische Arthritis (JIA) ist eine heterogene Gruppe entzündlicher Erkrankungen der Gelenke im Kindesalter. Grundlage der JIA ist eine Immunreaktion der Synovia, welche wahrscheinlich T-Zell vermittelt ist [44, 143]. Wahrscheinlich liegt der Erkrankung ein komplexer genetischer Hintergrund zugrunde [53, 88, 93]. Auch wenn sich das Bild der JIA weiter vervollständigt, bleiben grundlegende Fragen zur Pathogenese und Ätiologie weiterhin unklar.

Durch eine phänotypische Charakterisierung von Zellen ist es möglich, Aussagen über deren Entwicklungszustand, Funktion und Aktivitätszustand zu treffen [125]. Da frühere Studien gezeigt haben, dass die Wirkung von TGF- $\beta_1$  von dem Aktivierungs- und Differenzierungsstatus der Zellen [43, 55] abhängig ist, wurden in dieser Arbeit die isolierten T-Zellen aus peripherem Blut und Synovialflüssigkeit (SF) zunächst mittels Durchflusszytometrie (FACS) phänotypisch charakterisiert. Es zeigte sich, dass es bei der JIA, ähnlich wie bei der Rheumatoiden Arthritis (RA) [39, 45], zu einer Anreicherung von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in der SF im Vergleich zum peripheren Blut kommt. Während in der SF bei der pers. Oligoarthritis CD8<sup>+</sup>-T-Zellen überwiegen, scheinen bei der seronegativen Polyarthritis weiterhin CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zu dominieren. Insgesamt dominierten aktivierte Gedächtniszellen (CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>) bei allen Patienten.

Wie in früheren Studien [11] konnte eine starke Zunahme der Aktivierungsmarker CD69 und HLA-DR in der SF gegenüber peripherem Blut beobachtet werden. Auffällig ist dabei das unterschiedliche Verhalten von CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen. Der Anteil an CD4<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-T-Zellen war deutlich höher als an CD8<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-T-Zellen. Dagegen war der Anteil an CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>-T-Zellen höher als bei CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>-T-Zellen. Diese gegensätzliche Konstellation von HLA-DR und CD69 könnte auf unterschiedliche Aktivierungszeitpunkte der CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen zurückzuführen sein. Während CD69 die frische Aktivierung repräsentiert, in diesem Fall würden also die CD8<sup>+</sup>-T-Zellen vor den CD4<sup>+</sup> aktiviert, kann HLA-DR als Langzeitaktivitätsmarker angesehen werden.

Auffallend war auch eine starke Zunahme CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high+</sup>-T-Zellen (T<sub>regs</sub>). Ihre Rolle bei autoimmunen Krankheiten wie der JIA und der RA ist Gegenstand vieler Untersuchun-

gen. Bei erwachsenen RA-Patienten konnte eine Zunahme an  $T_{regs}$  beobachtet werden [15]. Im Einklang mit anderen Studien [69] zeigte sich keine unterschiedliche Anreicherung von  $CD4^+CD25^{high+}$ -T-Zellen in der SF bei der prognostisch günstigeren oligo- und der ungünstigeren polyartikulären Verlaufsform. Dabei war der Anteil an  $T_{regs}$  in der SF im Vergleich zum peripheren Blut aber deutlich erhöht. Offene Fragen gibt es auch noch in Bezug auf das Zusammenspiel von  $T_{regs}$  und  $TGF-\beta_1$ .

Bei anderen chronisch-entzündlichen Erkrankungen, wie dem M. Crohn oder der Colitis Ulzerosa, konnte erstaunlicherweise eine Erhöhung des (immuninhibitorischen)  $TGF-\beta_1$  in der Darmmukosa nachgewiesen werden [6, 37]. Dieser erhöhte Wert kommt wahrscheinlich durch einen Defekt in der Signalkaskade des  $TGF-\beta_1$  zustande (Mangel an inhibitorischen Smad7 [92]). Obwohl dieses immunsupprimierend wirkende Zytokin vorhanden war, bestand die Entzündungsreaktion fort. Denkbar ist auch, dass in der Pathogenese der JIA ähnliche Defekte eine Rolle spielen. Es könnte sein, dass synoviale T-Zellen schlecht auf  $TGF-\beta_1$  ansprechen, obwohl sie den  $TGF-\beta$ -Rezeptor-II in ausreichendem Maße exprimieren. Die durchgeführten Versuche konnten bestätigen, dass sowohl periphere als auch synoviale  $CD4^+$ - und  $CD8^+$ -T-Zellen diesen Rezeptor ausreichend exprimieren. Die  $TGF-\beta_1$  Empfindlichkeit synovialer Zellen im Vergleich zu peripheren Zellen wurde anschließend mittels  $^3H$ -Thymidineinbau und CFSE-Färbung analysiert. Während sich bei dem Thymidineinbau eine deutliche Hemmung synovialer Zellen unter Anwesenheit von  $TGF-\beta_1$  zeigte (bei oligo- und polyartikulärer Verlaufsform), ergab sich bei der CFSE-Färbung aufgrund der Unterscheidung von  $CD4^+$ - und  $CD8^+$ -T-Zellen ein differenzierteres Bild. Synoviale und periphere  $CD8^+$ -T-Zellen wurden durch  $TGF-\beta_1$  deutlich gehemmt, während bei  $CD4^+$ -T-Zellen eine eindeutige Proliferationshemmung nur im peripheren Blut nachzuweisen war. Lediglich synoviale  $CD4^+$ -Zellen von Patienten mit oligoartikulärer JIA zeigten keine Proliferationshemmung durch exogenes  $TGF-\beta_1$ .

Die Differenzierung der  $CD4^+$ -T-Zellen in Th1- und Th2-Zellen erfolgte anhand ihrer Zytokinsekretion. Die Analyse ergab, dass es vor allem bei Patienten mit einer oligoartikulären Arthritis zu einer starken Akkumulation  $IFN-\gamma$ -sezernierender Th1-Zellen in der Synovialflüssigkeit kommt. Bei den  $IL-4$ -sezernierenden Th2-Zellen zeigte sich dagegen ein indifferentes Bild. Bei der seronegativen Polyarthritis scheinen sogar  $IL-4$ -sezernierende Th2-Zellen im peripheren Blut zu überwiegen. Unter Anwesenheit von  $TGF-\beta_1$  nimmt die Sekretion von  $IFN-\gamma$  ab, d. h.  $TGF-\beta$  führt zu einer Favorisierung von Th2-Zellen.

In weiteren Studien bleibt zu klären, ob durch einen Defekt in der  $TGF-\beta_1$ -Signalkaskade (Smad7) eine lokale Dysregulation und schließlich die Autoimmunreaktion entsteht. Besonders interessant ist sicher auch die Funktion der  $CD4^+CD25^{high+}$ -T-Zellen in der JIA-

Pathogenese. Am wahrscheinlichsten kommt die Erkrankung aber durch ein Versagen verschiedener Regulationsmechanismen zustande, bei denen neben TGF- $\beta_1$  auch weitere Zytokine eine führende Rolle einnehmen.

## 8 Literaturverzeichnis

- [1] AKBAR, A. N. ; SALMON, M. ; JANOSSY, G.: The synergy between naive and memory T cells during activation. In: *Immunol Today* 12 (1991), Jun, Nr. 6, S. 184–188
- [2] AKHURST, R. J. ; DERYNCK, R.: TGF-beta signaling in cancer—a double-edged sword. In: *Trends Cell Biol* 11 (2001), Nov, Nr. 11, S. S44–S51
- [3] ALBERT, E. D. ; SCHOLZ, S.: Juvenile arthritis: genetic update. In: *Baillieres Clin Rheumatol* 12 (1998), May, Nr. 2, S. 209–18
- [4] AMELSFORT, Jocea M R. ; JACOBS, Kim M G. ; BIJLSMA, Johannes W J. ; LAFEBER, Floris P J G. ; TAAMS, Leonie S.: CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in rheumatoid arthritis: differences in the presence, phenotype, and function between peripheral blood and synovial fluid. In: *Arthritis Rheum* 50 (2004), Sep, Nr. 9, S. 2775–2785
- [5] ATTISANO, Liliana ; WRANA, Jeffrey L.: Signal transduction by the TGF-beta superfamily. In: *Science* 296 (2002), May, Nr. 5573, S. 1646–1647
- [6] BABYATSKY, M. W. ; ROSSITER, G. ; PODOLSKY, D. K.: Expression of transforming growth factors alpha and beta in colonic mucosa in inflammatory bowel disease. In: *Gastroenterology* 110 (1996), Apr, Nr. 4, S. 975–984
- [7] BARNETT, L. A. ; FUJINAMI, R. S.: Molecular mimicry: a mechanism for autoimmune injury. In: *FASEB J* 6 (1992), Feb, Nr. 3, S. 840–844
- [8] BETTLER, B. ; HOFSTETTER, H. ; RAO, M. ; YOKOYAMA, W. M. ; KILCHHERR, F. ; CONRAD, D. H.: Molecular structure and expression of the murine lymphocyte low-affinity receptor for IgE (Fc epsilon RII). In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 (1989), Oct, Nr. 19, S. 7566–7570
- [9] BETTLER, B. ; MAIER, R. ; RÜEGG, D. ; HOFSTETTER, H.: Binding site for IgE of the human lymphocyte low-affinity Fc epsilon receptor (Fc epsilon RII/CD23) is confined to the domain homologous with animal lectins. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 (1989), Sep, Nr. 18, S. 7118–7122
- [10] BJORND AHL, J. M. ; NAKAMURA, S. ; HARA, T. ; JUNG, L. K. ; FU, S. M.: The 28-kDa/32-kDa activation antigen EA 1. Further characterization and signal requirements for its expression. In: *J Immunol* 141 (1988), Dec, Nr. 12, S. 4094–4100
- [11] BLACK, Antony P B. ; BHAYANI, Hansha ; RYDER, Clive A J. ; GARDNER-MEDWIN, Janet M M. ; SOUTHWOOD, Taunton R.: T-cell activation without proliferation in juvenile idiopathic arthritis. In: *Arthritis Res* 4 (2002), Nr. 3, S. 177–183
- [12] BLOBE, Gerard C. ; SCHIEMANN, William P. ; LODISH, Harvey F.: Role of Transforming Growth Factor beta in Human Disease. In: *N Engl J Med* 342 (2000), Nr. 18, S. 1350–1358
- [13] BLUESTONE, Jeffrey A.: Is CTLA-4 a master switch for peripheral T cell tolerance? In: *J Immunol* 158 (1997), S. 1989–1993
- [14] BORDET, Jules: Sur l'agglutination et la dissolution des globules rouges par le serum d'animaux injectes de sang defibrine. In: *Ann. De l'Inst. Pasteur* 12 (1898), S. 688–695
- [15] CAO, D. ; MALMSTROM, V. ; BAECHER-ALLAN, C. ; HAFLER, D. ; KLARESKOG, L. ; TROLLMO, C.: Isolation and functional characterization of regulatory CD25brightCD4+ T-cells from the target organ of patients with rheumatoid arthritis. In: *Eur J Immunol* 33 (2003), S. 215–223

- [16] CARSWELL, C. I. ; PLOSKER, G. L. ; WAGSTAFF, A. J.: Daclizumab: a review of its use in the management of organ transplantation. In: *BioDrugs* 15 (2001), Nr. 11, S. 745–773
- [17] CEBRIÁN, M. ; YAGÜE, E. ; RINCÓN, M. ; LÓPEZ-BOTET, M. ; LANDÁZURI, M. O. ; SÁNCHEZ-MADRID, F.: Triggering of T cell proliferation through AIM, an activation inducer molecule expressed on activated human lymphocytes. In: *J Exp Med* 168 (1988), Nov, Nr. 5, S. 1621–1637
- [18] CHAN, P. Y. ; TAKEI, F.: Molecular cloning and characterization of a novel murine T cell surface antigen, YE1/48. In: *J Immunol* 142 (1989), Mar, Nr. 5, S. 1727–1736
- [19] CHEN, W ; WAHL, SM: TGF-beta: the missing link in CD4+CD25+ regulatory T cell-mediated immunosuppression. In: *Cytokine Growth Factor Rev* 14 (2003), S. 85–89
- [20] CHEN, WanJun ; JIN, Wenwen ; HARDEGEN, Neil ; LEI, Ke-Jian ; LI, Li ; MARINOS, Nancy ; MCGRADY, George ; WAHL, Sharon M.: Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. In: *J Exp Med* 198 (2003), Dec, Nr. 12, S. 1875–1886
- [21] CHEN, Wanjun ; JIN, Wenwen ; WAHL, Sharon M.: Engagement of Cytotoxic T Lymphocyte-associated Antigen 4 (CTLA-4) Induces Transforming Growth Factor beta (TGF-beta ) Production by Murine CD4+ T Cells. In: *J. Exp. Med.* 188 (1998), Nr. 10, S. 1849–1857
- [22] CHEN, Y. G. ; LIU, F. ; MASSAGUÉ, J.: Mechanism of TGFb receptor inhibition by FKBP12. In: *EMBO J.* 16 (1997), S. 3866 – 3876.
- [23] CHINI, L. ; BARDARE, M. ; CANCRINI, C. ; ANGELINI, F. ; MANCIA, L. ; CORTIS, E. ; FINOCCHI, A. ; RICCARDI, C. ; ROSSI, P.: Evidence of clonotypic pattern of T-cell repertoire in synovial fluid of children with juvenile rheumatoid arthritis at the onset of the disease. In: *Scand J Immunol* 56 (2002), Nov, Nr. 5, S. 512–517
- [24] CHRIST, M ; MCCARTNEY-FRANCIS, NL ; KULKARNI, AB ; WARD, JM ; MIZEL, DE ; MACKALL, CL ; GRESS, RE ; HINES, KL ; TIAN, H ; KARLSSON, S: Immune dysregulation in TGF-beta 1-deficient mice. In: *J Immunol* 153 (1994), S. 1936–1946
- [25] CHU, C. Q. ; FIELD, M. ; ALLARD, S. ; ABNEY, E. ; FELDMANN, M. ; MAINI, R. N.: Detection of cytokines at the cartilage/pannus junction in patients with rheumatoid arthritis: implications for the role of cytokines in cartilage destruction and repair. In: *Br J Rheumatol* 31 (1992), Oct, Nr. 10, S. 653–661
- [26] COSULICH, M. E. ; RUBARTELLI, A. ; RISSO, A. ; COZZOLINO, F. ; BARGELLESI, A.: Functional characterization of an antigen involved in an early step of T-cell activation. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 84 (1987), Jun, Nr. 12, S. 4205–4209
- [27] DAVIDSON, A. ; DIAMOND, B.: Autoimmune diseases. In: *N Engl J Med* 345 (2001), Aug, Nr. 5, S. 340–350
- [28] DEKKER, L. ; ARMBRUST, W. ; RADEMAKER, C. M A. ; PRAKKEN, B. ; KUIS, W. ; WULFFRAAT, N. M.: Safety of anti-TNFalpha therapy in children with juvenile idiopathic arthritis. In: *Clin Exp Rheumatol* 22 (2004), Nr. 2, S. 252–258
- [29] DERYNCK, R. ; ZHANG, Y. ; FENG, X. H.: Smads: transcriptional activators of TGF-beta responses. In: *Cell* 95 (1998), Dec, Nr. 6, S. 737–740
- [30] DOHERTY, P. C. ; ZINKERNAGEL, R. M.: Enhanced immunological surveillance in mice heterozygous at the H-2 gene complex. In: *Nature* 256 (1975), Jul, Nr. 5512, S. 50–52
- [31] DRICKAMER, K.: Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. In: *J Biol Chem* 263 (1988), Jul, Nr. 20, S. 9557–9560
- [32] ERTENLI, I. ; KIRAZ, S. ; CALGÜNERI, M. ; CELIK, I. ; ERMAN, M. ; HAZNEDAROGLU, I. C. ; KIRAZLI, S.: Synovial fluid cytokine levels in Behcet's disease. In: *Clin Exp Rheumatol* 19 (2001), Nr. 5 Suppl 24, S. S37–S41



- [33] FAVA, R. A. ; OLSEN, N. J. ; POSTLETHWAITE, A. E. ; BROADLEY, K. N. ; DAVIDSON, J. M. ; NANNNEY, L. B. ; LUCAS, C. ; TOWNES, A. S.: Transforming growth factor beta 1 (TGF-beta 1) induced neutrophil recruitment to synovial tissues: implications for TGF-beta-driven synovial inflammation and hyperplasia. In: *J Exp Med* 173 (1991), May, Nr. 5, S. 1121–1132
- [34] FEHÉRVARI, Zoltán ; SAKAGUCHI, Shimon: CD4+ Tregs and immune control. In: *J Clin Invest* 114 (2004), Nov, Nr. 9, S. 1209–1217
- [35] FELDMANN, M. ; BRENNAN, F. M. ; MAINI, R. N.: Rheumatoid arthritis. In: *Cell* 85 (1996), May, Nr. 3, S. 307–310
- [36] FELDMANN, M. ; MAINI, R. N.: Anti-TNF alpha therapy of rheumatoid arthritis: what have we learned? In: *Annu Rev Immunol* 19 (2001), S. 163–196
- [37] FIOCCHI, C.: Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. In: *Gastroenterology* 115 (1998), Jul, Nr. 1, S. 182–205
- [38] FONTENOT, Jason D. ; GAVIN, Marc A. ; RUDENSKY, Alexander Y.: Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. In: *Nat Immunol* 4 (2003), Apr, Nr. 4, S. 330–336
- [39] FOX, R. I. ; FONG, S. ; SABHARWAL, N. ; CARSTENS, S. A. ; KUNG, P. C. ; VAUGHAN, J. H.: Synovial fluid lymphocytes differ from peripheral blood lymphocytes in patients with rheumatoid arthritis. In: *J Immunol* 128 (1982), Jan, Nr. 1, S. 351–354
- [40] FUJINAMI, Robert S. ; HERRATH, Matthias G. ; CHRISTEN, Urs ; WHITTON, J. L.: Molecular mimicry, bystander activation, or viral persistence: infections and autoimmune disease. In: *Clin Microbiol Rev* 19 (2006), Jan, Nr. 1, S. 80–94
- [41] GATTORNO, M. ; FACCHETTI, P. ; GHIOTTO, F. ; VIGNOLA, S. ; BUONCOMPAGNI, A. ; PRIGIONE, I. ; PICCO, P. ; PISTOIA, V.: Synovial fluid T cell clones from oligoarticular juvenile arthritis patients display a prevalent Th1/Th0-type pattern of cytokine secretion irrespective of immunophenotype. In: *Clin Exp Immunol* 109 (1997), Jul, Nr. 1, S. 4–11
- [42] GERLI, R. ; BISTONI, O. ; RUSSANO, A. ; FIORUCCI, S. ; BORGATO, L. ; CESAROTTI, M. E F. ; LUNARDI, C.: In vivo activated T cells in rheumatoid synovitis. Analysis of Th1- and Th2-type cytokine production at clonal level in different stages of disease. In: *Clin Exp Immunol* 129 (2002), Sep, Nr. 3, S. 549–555
- [43] GORELIK, Leonid ; FLAVELL, Richard A.: Transforming growth factor-beta in T-cell biology. In: *Nat Rev Immunol* 2 (2002), Jan, Nr. 1, S. 46–53
- [44] GROM, A. A. ; HIRSCH, R.: T-cell and T-cell receptor abnormalities in the immunopathogenesis of juvenile rheumatoid arthritis. In: *Curr Opin Rheumatol* 12 (2000), Sep, Nr. 5, S. 420–424
- [45] GULAN, Gordan ; RAVLIC-GULAN, Jagoda ; STRBO, Natasa ; SOTOSEK, Vlatka ; NEMEC, Boris ; MATOVINOVIC, Damir ; RUBINIC, Dusan ; PODACK, Eckhard R. ; RUKAVINA, Daniel: Systemic and local expression of perforin in lymphocyte subsets in acute and chronic rheumatoid arthritis. In: *J Rheumatol* 30 (2003), Apr, Nr. 4, S. 660–670
- [46] GUNNLAUGSDOTTIR, Brynja ; MAGGADOTTIR, Solrun M. ; LUDVIKSSON, Björn R.: Anti-CD28-induced co-stimulation and TCR avidity regulates the differential effect of TGF-beta1 on CD4+ and CD8+ naïve human T-cells. In: *Int Immunol* 17 (2005), Jan, Nr. 1, S. 35–44
- [47] HAMANN, D. ; BAARS, P. A. ; REP, M. H. ; HOOIBRINK, B. ; KERKHOF-GARDE, S. R. ; KLEIN, M. R. ; LIER, R. A.: Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8+ T cells. In: *J Exp Med* 186 (1997), Nov, Nr. 9, S. 1407–1418
- [48] HARA, T. ; JUNG, L. K. ; BJORND AHL, J. M. ; FU, S. M.: Human T cell activation. III. Rapid induction of a phosphorylated 28 kD/32 kD disulfide-linked early activation antigen (EA 1) by 12-o-tetradecanoyl phorbol-13-acetate, mitogens, and antigens. In: *J Exp Med* 164 (1986), Dec, Nr. 6, S. 1988–2005

- [49] HAYASHI, H. ; ABDOLLAH, S. ; QIU, Y. ; CAI, J. ; XU, Y. Y. ; GRINNELL, B. W. ; RICHARDSON, M. A. ; TOPPER, J. N. ; GIMBRONE, M. A. ; WRANA, J. L. ; FALB, D.: The MAD-related protein Smad7 associates with the TGFbeta receptor and functions as an antagonist of TGFbeta signaling. In: *Cell* 89 (1997), Jun, Nr. 7, S. 1165–1173
- [50] HELDIN, C-H ; MIYAZANO, K ; DIJKE, P ten: TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. In: *Nature* 390 (1997), S. 465–471
- [51] HÜLSMEYER, Martin ; FIORILLO, Maria T. ; BETTOSINI, Francesca ; SORRENTINO, Rosa ; SAENGER, Wolfram ; ZIEGLER, Andreas ; UCHANSKA-ZIEGLER, Barbara: Dual, HLA-B27 subtype-dependent conformation of a self-peptide. In: *J Exp Med* 199 (2004), Jan, Nr. 2, S. 271–281
- [52] HOLLÄNDER, Georg A.: *Immunologie. Grundlagen für Klinik und Praxis*. Elsevier, 2005
- [53] HOLZER, U. ; NEPOM, G. T. ; BURT, R. K. (Hrsg.) ; MARMONT, A. (Hrsg.): *MHC autoimmune genes. In Stem cell therapy for autoimmune disease*. Georgetown, USA : Biosciences/ Eurekah, 2003
- [54] HOLZER, Ursula ; KWOK, William W. ; NEPOM, Gerald T. ; BUCKNER, Jane H.: Differential antigen sensitivity and costimulatory requirements in human Th1 and Th2 antigen-specific CD4+ cells with similar TCR avidity. In: *J Immunol* 170 (2003), Feb, Nr. 3, S. 1218–23
- [55] HOLZER, Ursula ; RIECK, Mary ; BUCKNER, Jane H.: Lineage and signal strength determine the inhibitory effect of transforming growth factor beta1 (TGF-beta1) on human antigen-specific Th1 and Th2 memory cells. In: *J Autoimmun* 26 (2006), Jun, Nr. 4, S. 241–251
- [56] HORI, Shohei ; NOMURA, Takashi ; SAKAGUCHI, Shimon: Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. In: *Science* 299 (2003), Feb, Nr. 5609, S. 1057–1061
- [57] HUBER, Samuel ; SCHRAMM, Christoph: TGF-beta and CD4+CD25+ regulatory T cells. In: *Front Biosci* 11 (2006), S. 1014–1023
- [58] HUBER, Samuel ; SCHRAMM, Christoph ; LEHR, Hans A. ; MANN, Amrit ; SCHMITT, Steffen ; BECKER, Christoph ; PROTSCHKA, Martina ; GALLE, Peter R. ; NEURATH, Markus F. ; BLESSING, Manfred: Cutting edge: TGF-beta signaling is required for the in vivo expansion and immunosuppressive capacity of regulatory CD4+CD25+ T cells. In: *J Immunol* 173 (2004), Dec, Nr. 11, S. 6526–6531
- [59] IKUTA, K. ; TAKAMI, M. ; KIM, C. W. ; HONJO, T. ; MIYOSHI, T. ; TAGAYA, Y. ; KAWABE, T. ; YODOI, J.: Human lymphocyte Fc receptor for IgE: sequence homology of its cloned cDNA with animal lectins. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 84 (1987), Feb, Nr. 3, S. 819–823
- [60] JACOBSON, D. L. ; GANGE, S. J. ; ROSE, N. R. ; GRAHAM, N. M.: Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune diseases in the United States. In: *Clin Immunol Immunopathol* 84 (1997), Sep, Nr. 3, S. 223–243
- [61] JANEWAY, Charles A. ; TRAVERS, Paul ; WALPOERT, Mark ; SHLOMCHIK, Mark: *Immunobiologie*. Spektrum Akademischer Verlag, 2002
- [62] KAISER, H: A. J. Landré-Beauvais (1772-1840) der wirkliche Erstbeschreiber der rheumatoiden Arthritis. In: *Zeitschrift für Rheumatologie* 63 (2004), Nr. 5, S. 430–435
- [63] KAWABATA, M. ; MIYAZANO, K ; CANALIS, E. (Hrsg.): *Bone morphogenetic proteins*. Bd. Skeletal Growth Factors. Lippincott Williams & Wikins, 2000. – 269–290 S
- [64] KEITEL, W. ; KAISER, H: Der Zauberer von Paris (Jean Martin Charcot 1825-1893). In: *Zeitschrift für Rheumatologie* 63 (2004), Nr. 6, S. 504–509
- [65] KHATTRI, Roli ; COX, Tom ; YASAYKO, Sue-Ann ; RAMSDELL, Fred: An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. In: *Nat Immunol* 4 (2003), Apr, Nr. 4, S. 337–342
- [66] KIESSLING, U ; DÖRING, E ; LISTING, J ; MEINCKE, J ; SCHÖNTUBE, M ; STRANGFELD, A ; ZINK, A: Incidence and prevalence of juvenile chronic arthritis in East Berlin 1980-88. In: *J Rheumatol* 25 (1998), Sep, Nr. 9, S. 1837–43

- [67] KIKUTANI, H. ; INUI, S. ; SATO, R. ; BARSUMIAN, E. L. ; OWAKI, H. ; YAMASAKI, K. ; KAISHO, T. ; UCHIBAYASHI, N. ; HARDY, R. R. ; HIRANO, T.: Molecular structure of human lymphocyte receptor for immunoglobulin E. In: *Cell* 47 (1986), Dec, Nr. 5, S. 657–665
- [68] KIM, Bumseok ; KAISTHA, Shilpa D. ; ROUSE, Barry T.: Viruses and autoimmunity. In: *Autoimmunity* 39 (2006), Feb, Nr. 1, S. 71–77
- [69] KLEER, Ismé M. ; WEDDERBURN, Lucy R. ; TAAMS, Leonie S. ; PATEL, Alka ; VARSANI, Hemlata ; KLEIN, Mark ; JAGER, Wilco de ; PUGAYUNG, Gisela ; GIANNONI, Francesca ; RIJKERS, Ger ; ALBANI, Salvatore ; KUIS, Wietse ; PRAKKEN, Berent: CD4+CD25bright regulatory T cells actively regulate inflammation in the joints of patients with the remitting form of juvenile idiopathic arthritis. In: *J Immunol* 172 (2004), May, Nr. 10, S. 6435–6443
- [70] KOSKULL, S von ; TRUCKENBRODT, H ; HOLLE, R ; HÖRMANN, A: Incidence and prevalence of juvenile arthritis in an urban population of southern Germany: a prospective study. In: *Ann Rheum Dis* 60 (2001), Oct, Nr. 10, S. 940–945
- [71] KULKARNI, A. B. ; HUH, C. G. ; BECKER, D. ; GEISER, A. ; LYGHT, M. ; FLANDERS, K. C. ; ROBERTS, A. B. ; SPORN, M. B. ; WARD, J. M. ; KARLSSON, S.: Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (1993), Jan, Nr. 2, S. 770–774
- [72] KURUVILLA, A. P. ; SHAH, R. ; HOCHWALD, G. M. ; LIGGITT, H. D. ; PALLADINO, M. A. ; THORBECKE, G. J.: Protective effect of transforming growth factor beta 1 on experimental autoimmune diseases in mice. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 (1991), Apr, Nr. 7, S. 2918–2921
- [73] LANIER, L. L. ; BUCK, D. W. ; RHODES, L. ; DING, A. ; EVANS, E. ; BARNEY, C. ; PHILLIPS, J. H.: Interleukin 2 activation of natural killer cells rapidly induces the expression and phosphorylation of the Leu-23 activation antigen. In: *J Exp Med* 167 (1988), May, Nr. 5, S. 1572–1585
- [74] LAUZURICA, P. ; SANCHO, D. ; TORRES, M. ; ALBELLA, B. ; MARAZUELA, M. ; MERINO, T. ; BUREN, J. A. ; MARTÍNEZ-A, C. ; SÁNCHEZ-MADRID, F.: Phenotypic and functional characteristics of hematopoietic cell lineages in CD69-deficient mice. In: *Blood* 95 (2000), Apr, Nr. 7, S. 2312–2320
- [75] LÜDIN, C. ; HOFSTETTER, H. ; SARFATI, M. ; LEVY, C. A. ; SUTER, U. ; ALAIMO, D. ; KILCHHERR, E. ; FROST, H. ; DELESPESE, G.: Cloning and expression of the cDNA coding for a human lymphocyte IgE receptor. In: *EMBO J* 6 (1987), Jan, Nr. 1, S. 109–114
- [76] LEE, D. S. ; AHN, C. ; ERNST, B. ; SPRENT, J. ; SURH, C. D.: Thymic selection by a single MHC/peptide ligand: autoreactive T cells are low-affinity cells. In: *Immunity* 10 (1999), Jan, Nr. 1, S. 83–92
- [77] LETTERIO, J. J. ; ROBERTS, A. B.: Regulation of immune responses by TGF-beta. In: *Annu Rev Immunol* 16 (1998), S. 137–161
- [78] LIBLAU, R. S. ; SINGER, S. M. ; MCDEVITT, H. O.: Th1 and Th2 CD4+ T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases. In: *Immunol Today* 16 (1995), Jan, Nr. 1, S. 34–38
- [79] LOHOFF, M. ; GESSNER, A. ; BOGDAN, C. ; RÖLLINGHOFF, M.: The Th1/Th2 paradigm and experimental murine leishmaniasis. In: *Int Arch Allergy Immunol* 115 (1998), Mar, Nr. 3, S. 191–202
- [80] LOVELL, D. J. ; GIANNINI, E. H. ; REIFF, A. ; CAWKWELL, G. D. ; SILVERMAN, E. D. ; NOCTON, J. J. ; STEIN, L. D. ; GEDALIA, A. ; ILOWITE, N. T. ; WALLACE, C. A. ; WHITMORE, J. ; FINCK, B. K.: Etanercept in children with polyarticular juvenile rheumatoid arthritis. Pediatric Rheumatology Collaborative Study Group. In: *N Engl J Med* 342 (2000), Mar, Nr. 11, S. 763–9
- [81] LUTTMANN, W. ; BRATKE, K. ; KÜPPER, M. ; MYRTEK, D.: *Der Experimentator Immunologie*. Elsevier Spektrum Akademischer Verlag, Mai 2004
- [82] MANGER, B. ; HÄFNER, R. ; HELLMICH, B. ; SCHULZE-KOOPS, H. ; TILLMANN, K. ; TRUCKENBRODT, H.: *Checkliste XXL Rheumatologie*. 3. Elsevier, 2005

- [83] MARRACK, P. ; KAPPLER, J. ; KOTZIN, B. L.: Autoimmune disease: why and where it occurs. In: *Nat Med* 7 (2001), Aug, Nr. 8, S. 899–905
- [84] MASOOD, E. ; WEISS, U.: Nobel goes to T-cell pioneers whose work 'changed face of immunology'. In: *Nature* 383 (1996), Oct, Nr. 6600, S. 465
- [85] MASSAGUÉ, J. ; WOTTON, D.: TGF-beta signal transduction. In: *Annu. Rev. Biochem.* 67 (1998), S. 753–791
- [86] MASUKO-HONGO, K. ; SEKINE, T. ; UEDA, S. ; KOBATA, T. ; YAMAMOTO, K. ; NISHIOKA, K. ; KATO, T.: Long-term persistent accumulation of CD8+ T cells in synovial fluid of rheumatoid arthritis. In: *Ann Rheum Dis* 56 (1997), Oct, Nr. 10, S. 613–621
- [87] MATZINGER, Polly: The danger model: a renewed sense of self. In: *Science* 296 (2002), Apr, Nr. 5566, S. 301–305
- [88] MCDEVITT, H. O.: The role of MHC class II molecules in susceptibility and resistance to autoimmunity. In: *Curr Opin Immunol* 10 (1998), Dec, Nr. 6, S. 677–681
- [89] Miltenyi Biotec GmbH: *IL-4 / IFN-g Secretion Assay, Detection Kit human*. Order No. 130-054-102
- [90] MIYAZONO, K ; DIJKE, P ten ; HELDIN, CH: TGF-beta signaling by Smad proteins. In: *Adv Immunol* 75 (2000), S. 115–157
- [91] MIYAZONO, Kohei ; KUSANAGI, Kiyoshi ; INOUE, Hirofumi: Divergence and convergence of TGF-beta/BMP signaling. In: *J Cell Phys* 187 (2001), S. 265–276
- [92] MONTELEONE, G. ; KUMBEROVA, A. ; CROFT, N. M. ; MCKENZIE, C. ; STEER, H. W. ; MACDONALD, T. T.: Blocking Smad7 restores TGF-beta1 signaling in chronic inflammatory bowel disease. In: *J Clin Invest* 108 (2001), Aug, Nr. 4, S. 601–609
- [93] MURRAY, K. ; THOMPSON, S. D. ; GLASS, D. N.: Pathogenesis of juvenile chronic arthritis: genetic and environmental factors. In: *Arch Dis Child* 77 (1997), Dec, Nr. 6, S. 530–534
- [94] MURRAY, K. J. ; LUYRINK, L. ; GROM, A. A. ; PASSO, M. H. ; EMERY, H. ; WITTE, D. ; GLASS, D. N.: Immunohistological characteristics of T cell infiltrates in different forms of childhood onset chronic arthritis. In: *J Rheumatol* 23 (1996), Dec, Nr. 12, S. 2116–2124
- [95] NAKAMURA, K. ; KITANI, A. ; STROBER, W.: Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)/CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. In: *J Exp Med* 194 (2001), Sep, Nr. 5, S. 629–644
- [96] NASONOV, E. L. ; BYKOVSKAIA, S. N.: The role of regulatory T-cells in autoimmune rheumatic diseases. In: *Vestn Ross Akad Med Nauk* (2006), Nr. 9-10, S. 74–82
- [97] NETTER, Frank H.: *NETTERS Pädiatrie*. Thieme, Stuttgart, 2001
- [98] OKUMURA, M. ; FUJII, Y. ; INADA, K. ; NAKAHARA, K. ; MATSUDA, H.: Both CD45RA+ and CD45RA- subpopulations of CD8+ T cells contain cells with high levels of lymphocyte function-associated antigen-1 expression, a phenotype of primed T cells. In: *J Immunol* 150 (1993), Jan, Nr. 2, S. 429–437
- [99] OPPERMANN, Joachim: Therapie rheumatischer Erkrankungen im Kindesalter. In: *Novartis* (2000)
- [100] PASCUAL, J. ; MARCÉN, R. ; ORTUÑO, J.: Anti-interleukin-2 receptor antibodies: basiliximab and daclizumab. In: *Nephrol Dial Transplant* 16 (2001), Sep, Nr. 9, S. 1756–1760
- [101] PETTY, R. E. ; SOUTHWOOD, T. R. ; BAUM, J. ; BHETTAY, E. ; GLASS, D. N. ; MANNERS, P. ; MALDONADO-COCCO, J. ; SUAREZ-ALMAZOR, M.: Revision of the proposed classification criteria for juvenile idiopathic arthritis. In: *J Rheumatol* 25 (1998), S. 1991–1994
- [102] PICCIRILLO, C. A. ; SHEVACH, E. M.: Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells. In: *J Immunol* 167 (2001), Aug, Nr. 3, S. 1137–1140

- [103] PICKER, L. J. ; SINGH, M. K. ; ZDRAVESKI, Z. ; TREER, J. R. ; WALDROP, S. L. ; BERGSTRESSER, P. R. ; MAINO, V. C.: Direct demonstration of cytokine synthesis heterogeneity among human memory/effector T cells by flow cytometry. In: *Blood* 86 (1995), Aug, Nr. 4, S. 1408–1419
- [104] PRAKKEN, BJ ; SAMODAL, R ; LE, TD ; GIANNONI, F ; YUNG, GP ; SCAVULLI, J ; AMOX, D ; ROORD, S ; KLEER, I de ; BONNIN, D: Epitope-specific immunotherapy induces immune deviation of proinflammatory T cells in rheumatoid arthritis. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 101 (2004), S. 4228–4233
- [105] PRIORI, R. ; MEDDA, E. ; CONTI, F. ; CASSARA, E. A M. ; DANIELI, M. G. ; GERLI, R. ; GIACOMELLI, R. ; FRANCESCHINI, F. ; MANFREDI, A. ; PIETROGRANDE, M. ; STAZI, M. A. ; VALESINI, G.: Familial autoimmunity as a risk factor for systemic lupus erythematosus and vice versa: a case-control study. In: *Lupus* 12 (2003), Nr. 10, S. 735–740
- [106] PSCHYREMBEL, Willibald: *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch*. 260. de Gruyter, 2004
- [107] RAJU, T. N.: The Nobel chronicles. 1980: George Davis Snell (1903-96); Jean Baptiste Dausset (b 1916); Baruj Benacerraf (b 1920). In: *Lancet* 354 (1999), Nov, Nr. 9191, S. 1738
- [108] READ, S. ; MALMSTRÖM, V. ; POWRIE, F.: Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25+CD4+ regulatory cells that control intestinal inflammation. In: *J Exp Med* 192 (2000), S. 295–302
- [109] ROBERTS, A.B.: TGF-beta signaling from receptors to the nucleus. In: *Microbes Infect* 1 (1999), S. 1265–1273
- [110] ROGERS, P. R. ; CROFT, M.: Peptide dose, affinity, and time of differentiation can contribute to the Th1/Th2 cytokine balance. In: *J Immunol* 163 (1999), Aug, Nr. 3, S. 1205–1213
- [111] ROTH, Sabine ; WILLCOX, Nicholas ; RZEPKA, Rita ; MAYER, Matthias P. ; MELCHERS, Inga: Major differences in antigen-processing correlate with a single Arg71<->Lys substitution in HLA-DR molecules predisposing to rheumatoid arthritis and with their selective interactions with 70-kDa heat shock protein chaperones. In: *J Immunol* 169 (2002), Sep, Nr. 6, S. 3015–3020
- [112] SAKAGUCHI, S.: Natural arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune response. In: *Annu Rev Immunol* 22 (2004), S. 531–562
- [113] SALLUSTO, F. ; LENIG, D. ; FÖRSTER, R. ; LIPP, M. ; LANZAVECCHIA, A.: Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. In: *Nature* 401 (1999), Oct, Nr. 6754, S. 708–712
- [114] SALMON, M. ; GASTON, J. S.: The role of T-lymphocytes in rheumatoid arthritis. In: *Br Med Bull* 51 (1995), S. 332–345
- [115] SALOMON, B ; LENSCHOW, DJ ; RHEE, L ; ASHOURIAN, N ; SINGH, B ; SHARPE, A ; BLUESTONE, JA: B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. In: *Immunity* 12 (2000), S. 431–440
- [116] SCHNEIDER, Rayfel ; PASSO, Murray H.: Juvenile rheumatoid arthritis. In: *Rheum Dis Clin North Am* 28 (2002), Aug, Nr. 3, S. 503–30
- [117] SCHOLZE-STUBENRECHT, W ; EICKHOFF, Birgitt ; DUDENREDAKTION, Wissenschaftlicher R. (Hrsg.): *Duden, das große Fremdwörterbuch : Herkunft und Bedeutung der Fremdwörter*. Bibliographisches Institut & F. A. Brockhaus AG, 2007
- [118] SEBZDA, E. ; WALLACE, V. A. ; MAYER, J. ; YEUNG, R. S. ; MAK, T. W. ; OHASHI, P. S.: Positive and negative thymocyte selection induced by different concentrations of a single peptide. In: *Science* 263 (1994), Mar, Nr. 5153, S. 1615–1618
- [119] SHARMA, S. ; SHERRY, D. D.: Joint distribution at presentation in children with pauciarticular arthritis. In: *J Pediatr* 134 (1999), May, Nr. 5, S. 642–643
- [120] SHEVACH, E. M.: Regulatory T cells in autoimmunity. In: *Annu Rev Immunol* 18 (2000), S. 423–449

- [121] SHULL, M. M. ; ORMSBY, I. ; KIER, A. B. ; PAWLOWSKI, S. ; DIEBOLD, R. J. ; YIN, M. ; ALLEN, R. ; SIDMAN, C. ; PROETZEL, G. ; CALVIN, D.: Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. In: *Nature* 359 (1992), Oct, Nr. 6397, S. 693–699
- [122] SINHA, A. A. ; LOPEZ, M. T. ; MCDEVITT, H. O.: Autoimmune diseases: the failure of self tolerance. In: *Science* 248 (1990), Jun, Nr. 4961, S. 1380–1388
- [123] SÁNCHEZ-MATEOS, P. ; SÁNCHEZ-MADRID, F.: Structure-function relationship and immunochemical mapping of external and intracellular antigenic sites on the lymphocyte activation inducer molecule, AIM/CD69. In: *Eur J Immunol* 21 (1991), Oct, Nr. 10, S. 2317–2325
- [124] SPORN, MB ; ROBERTS, AB ; ROBERTS, AB (Hrsg.) ; SPORN, MB (Hrsg.): *The transforming growth factor-betas. Peptide Growth Factors and their Receptors part I*. Springer Verlag, 1990. – 419–472 S
- [125] SWAIN, S. L. ; CROFT, M. ; DUBEY, C. ; HAYNES, L. ; ROGERS, P. ; ZHANG, X. ; BRADLEY, L. M.: From naive to memory T cells. In: *Immunol Rev* 150 (1996), Apr, S. 143–167
- [126] TAKAHASHI, T. ; TAGAMI, T. ; YAMAZAKI, S. ; UEDE, T. ; SHIMIZU, J. ; SAKAGUCHI, N. ; MAK, TW ; SAKAGUCHI, S: Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. In: *J Exp Med* 192 (2000), S. 303–310
- [127] TAO, X. ; GRANT, C. ; CONSTANT, S. ; BOTTOMLY, K.: Induction of IL-4-producing CD4+ T cells by antigenic peptides altered for TCR binding. In: *J Immunol* 158 (1997), May, Nr. 9, S. 4237–4244
- [128] TESTI, R. ; D'AMBROSIO, D. ; MARIA, R. D. ; SANTONI, A.: The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells. In: *Immunol Today* 15 (1994), Oct, Nr. 10, S. 479–483
- [129] TESTI, R. ; PHILLIPS, J. H. ; LANIER, L. L.: T cell activation via Leu-23 (CD69). In: *J Immunol* 143 (1989), Aug, Nr. 4, S. 1123–1128
- [130] THOMAS, Lothar: *Labor und Diagnose*. 5. TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, Frankfurt/ Main, 1998. – 758 S
- [131] THOMSON, W. ; BARRETT, J. H. ; DONN, R. ; PEPPER, L. ; KENNEDY, L. J. ; OLLIER, W. E. ; SILMAN, A. J. ; WOO, P. ; SOUTHWOOD, T.: Juvenile idiopathic arthritis classified by the ILAR criteria: HLA associations in UK patients. In: *Rheumatology* 41 (2002), Nr. 10, S. 1183–1189
- [132] THORBECKE, G. J. ; SHAH, R. ; LEU, C. H. ; KURUVILLA, A. P. ; HARDISON, A. M. ; PALLADINO, M. A.: Involvement of endogenous tumor necrosis factor alpha and transforming growth factor beta during induction of collagen type II arthritis in mice. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (1992), Aug, Nr. 16, S. 7375–7379
- [133] TIVOL, E.A. ; BORRIELLO, F. ; SCHWEITZER, A.N. ; LYNCH, W.P. ; BLUESTONE, J.A. ; A.H., Sharpe: Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. In: *Immunity* 3 (1995), S. 541–547
- [134] TOMER, Yaron: Genetic dissection of familial autoimmune thyroid diseases using whole genome screening. In: *Autoimmun Rev* 1 (2002), Aug, Nr. 4, S. 198–204
- [135] TROWSDALE, J. ; RAGOSSIS, J. ; CAMPBELL, R. D.: Map of the human MHC. In: *Immunol Today* 12 (1991), Dec, Nr. 12, S. 443–446
- [136] WAHL, SM ; CHEN, W: TGF-beta: how tolerant can it be? In: *Immunol Res* 28 (2003), S. 167–179
- [137] WALDMANN, T. A.: The multi-subunit interleukin-2 receptor. In: *Annu Rev Biochem* 58 (1989), S. 875–911
- [138] WASSMUTH, R: *Einführung in das HLA-System*. Landsberg : ecomed verlagsgesellschaft, 1995
- [139] WATERHOUSE, P. ; PENNINGER, JM ; TIMMS, E. ; WAKEHAM, A. ; SHAHINIAN, A. ; LEE, K.P. ; THOMPSON, C.B. ; GRIESSER, H. ; MAK, T.W.: Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in CTLA-4. In: *Science* 270 (1995), S. 985–988

- [140] WEDDERBURN, L. R. ; WOO, P.: Type 1 and type 2 immune responses in children: their relevance in juvenile arthritis. In: *Springer Semin Immunopathol* 21 (1999), Nr. 3, S. 361–374
- [141] WEI, CM ; LEE, JH ; WANG, LC ; YANG, YH ; CHANG, LY ; CHIANG, BL: Frequency and phenotypic analysis of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in children with juvenile idiopathic arthritis. In: *J Microbiol Immunol Infect* 41 (2008), S. 78–87
- [142] WOO, P.: The cytokine network in juvenile chronic arthritis. In: *Rheum Dis Clin North Am* 23 (1997), Aug, Nr. 3, S. 491–498
- [143] WOO, P. ; WEDDERBURN, L. R.: Juvenile chronic arthritis. In: *Lancet* 351 (1998), Mar, Nr. 9107, S. 969–973
- [144] YOKOYAMA, W. M. ; JACOBS, L. B. ; KANAGAWA, O. ; SHEVACH, E. M. ; COHEN, D. I.: A murine T lymphocyte antigen belongs to a supergene family of type II integral membrane proteins. In: *J Immunol* 143 (1989), Aug, Nr. 4, S. 1379–1386
- [145] ZIEGLER, S. F. ; RAMSDELL, F. ; ALDERSON, M. R.: The activation antigen CD69. In: *Stem Cells* 12 (1994), Sep, Nr. 5, S. 456–465
- [146] ZUGMAIER, G. ; ENNIS, B. W. ; DESCHAUER, B. ; KATZ, D. ; KNABBE, C. ; WILDING, G. ; DALY, P. ; LIPPMAN, M. E. ; DICKSON, R. B.: Transforming growth factors type beta 1 and beta 2 are equipotent growth inhibitors of human breast cancer cell lines. In: *J Cell Physiol* 141 (1989), Nov, Nr. 2, S. 353–361

## **9 Anhang**



## 9.1 Danksagungen

Ich möchte mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Günther E. Dannecker und bei Frau Dr. Ursula Holzer bedanken.

Nicht nur für die ausgezeichnete Betreuung, Unterstützung und wissenschaftliche Hilfe während dieser Arbeit, sondern auch für die freundschaftliche Atmosphäre, in der dies geschah.

Mein besonderer Dank gilt insbesondere auch

Carsten P. Schepp

Markus Haug

Luciana Dannecker

Nikolay Tzaribachev

Anton Hospach

Jasmin Kuemmerle-Deschner

Susanne Viebahn

Sandra Kordowich

ALLEN nicht genannten Mitarbeitern der AG Holzer und der AG Müller und besonders dem Team der Rheumaambulanz und allen beteiligten Kindern aus Stuttgart und Tübingen.

## 9.2 Lebenslauf

### **Markus Müller**

geboren am 04.04.1979 in Kirchheim unter Teck

#### **Schulbildung**

1989 - 1994	Hauptschule in Ötlingen (Kirchheim / Teck)
1994 - 1996	Zwei-jährige Berufsfachschule für Elektrotechnik in Kirchheim / Teck
1996 - 1999	Technisches Gymnasium in Kirchheim / Teck

#### **Universitäre Ausbildung**

04 / 2000 - 05 / 2007	Humanmedizinstudium an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen
04 / 2002	Ärztliche Vorprüfung (Physikum)
08 / 2003	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04 / 2006	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04 / 2006 - 05 / 2007	Praktisches Jahr am Klinikum Esslingen (Wahlfach: Anästhesie)
Seit 09 / 2004	Promotion an der Universitätskinderklinik Tübingen (bei Herrn Professor Dannecker und Frau Dr. med. Holzer)
25 / 05 / 2007	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und Approbation zum Arzt
10 / 2007 - 03 / 2008	Masterstudium Biomedizinische Technik an der HTW Saarbrücken

#### **Berufserfahrung im Rahmen der Ausbildung**

08 / 2001 - 09 / 2001	Pflegepraktikum: Allgemein Chirurgie und Pädiatrie
2003 - 2005	Famulaturen: Unfallchirurgie, Radiologie, Rheumaambulanz, Pädiatrie, Anästhesie

#### **Beruflicher Werdegang**

Seit 04 / 2008	Assistenzarzt in der Radiologie (Klinikum Esslingen)
----------------	--

#### **Sonstiges**

2000 - 2004	Stipendium der Wilhelm Narr Stiftung
-------------	--------------------------------------

## 9.3 Veröffentlichungen

### Anträge

Schepp, C. P., **Müller, M.**, Haug, M., Dannecker, G. E., Holzer, U. Phänotypisierung von T-Zellen aus Blut und Synovialflüssigkeit von Patienten mit Juveniler Idiopathischer Arthritis und deren Empfindlichkeit gegenüber dem immunregulatorischen Zytokin TGF- $\beta_1$ . *Antrag auf Förderung durch die Wolfgang Schulze Stiftung. Dezember 2004*

### Posterpräsentationen und Abstracts

Schepp C. P., **Mueller, M.**, Haug, M., Kuemmerle-Dechner, J., Hospach, A., Dannecker, G. E., Holzer, U. Effect of TGF- $\beta_1$  on T cells in Juvenile Idiopathic Arthritis. *Posterpräsentation auf dem Joint Annual Meeting of the German and Dutch Societies for Immunology (JAMI), Maastricht, The Netherlands, 20.-23.10.2004*

**Müller, M.**, Schepp, C. P., Haug, M., Tzaribachev, N., Kuemmerle-Deschner, J., Hospach, A., Dannecker, G. E., Holzer, U. Phenotyping of T-Cells from Peripheral Blood and Synovial Fluid from Patients with Juvenile Idiopathic Arthritis and their Response to the Cytokine TGF- $\beta_1$ . *12th European Pediatric Rheumatology Congress (PRES), Paris 12.- 15. September 2005* Abstract in: *Clinical and Experimental Rheumatology* **176:P-084**

**Müller M**, Schepp C, Haug M, Tzaribachev N, Kümmerle-Deschner J, Hospach A, Dannecker GE and Holzer U (2005). Phenotyping of T-cells from peripheral blood and synovial fluid from patients with juvenile idiopathic arthritis and their response to the cytokine TGF- $\beta_1$ . *Joint Annual Meeting of the German and Scandinavian Societies for Immunology, Kiel, Germany, 21.- 24.09.2005* *Immunobology* **210:423**

**Müller, M.**, Schepp, C. P., Holzer U. (2005). Einfluss von TGF- $\beta_1$  in der Juvenilen Idiopathischen Arthritis. *Forschungskolloquium der Medizinischen Fakultät, Tübingen, Germany, 28.10.2005* **fortüne-25**