

Aus dem Fachbereich Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main  
Institut für Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie  
(Direktor: Herr Prof. Dr. med. J. Pfeilschifter)

**Regulatorische T- Lymphozyten in der  
Rheumatoiden Arthritis:**

Eine funktionelle und durchflusszytometrische Studie mit 19 Patienten

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
des Fachbereichs Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

vorgelegt von  
Björn Beutel  
Erbach im Odenwald

Frankfurt am Main, Juni 2009

Dekan: Prof. Dr. J. Pfeilschifter

Referent: Prof. Dr. H. H. Radeke

1. Koreferent: Prof. Dr. W. H. Boehncke

2. Koreferent: Prof. Dr. H. Burkhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 26.01.2010

*Phantasie haben heißt nicht, sich etwas  
auszudenken,  
es heißt,  
sich aus den Dingen etwas zu machen.*

**Thomas Mann**

dt. Schriftsteller und Nobelpreisträger für Literatur 1929

*Für meine  
Familie*

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>- 3 -</b>
<b>1.1. Krankheitsbeschreibung</b> .....	<b>- 4 -</b>
1.1.1. Artikuläre Affektionen.....	- 4 -
1.1.2. Extraartikuläre Affektionen.....	- 5 -
1.1.3. Krankheitsaktivität.....	- 6 -
<b>1.2. Ätiologische Faktoren der Rheumatoiden Arthritis</b> .....	<b>- 9 -</b>
1.2.1. Genetische Faktoren.....	- 9 -
1.2.2. Nicht-genetische Faktoren.....	- 9 -
<b>1.3. Pathologie</b> .....	<b>- 10 -</b>
1.3.1. Histologie einer gesunden Synovialmembran.....	- 10 -
1.3.2. Histologische Merkmale der Synovialmembran bei Rheumatoider Arthritis.....	- 11 -
1.3.3. Pannus.....	- 12 -
<b>1.4. Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis</b> .....	<b>- 13 -</b>
1.4.1. Charakteristika von inflammatorischen Zellen in der Rheumatoiden Arthritis.....	- 16 -
1.4.1.1. T-Lymphozyten.....	- 16 -
1.4.1.2. B-Zellen.....	- 18 -
1.4.1.3. Makrophagen und Typ A-Synoviozyten.....	- 18 -
1.4.1.4. Fibroblasten und Typ-B-Synoviozyten.....	- 19 -
1.4.1.5. Regulatorische T Zellen [CD4(+)/CD25(+)] T Zellen (Treg).....	- 19 -
<b>1.5. Zielsetzung</b> .....	<b>- 21 -</b>
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>- 22 -</b>
<b>2.1 Materialien</b> .....	<b>- 22 -</b>
<b>2.2 Zellbiologische Methoden</b> .....	<b>- 25 -</b>
2.2.1. Herstellung einer primären Zellkultur aus ex vivo Synovialgewebe.....	- 25 -
2.2.2. Separation von CD4(+) und CD8(+) PBMCs aus humanen Vollblut.....	- 26 -
2.2.3. Depletion von CD25(+) peripheren mononukleären Blutzellen.....	- 29 -
2.2.4. Durchflusszytometrische Charakterisierung PBMC und Synovialzellen.....	- 31 -
2.2.5. Bestimmung der INF- $\gamma$ bzw. IL 10 Frequenz mittels ELISPOT – Technik.....	- 34 -
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>- 38 -</b>
<b>3.1. Patientenkollektiv</b> .....	<b>- 38 -</b>
<b>3.2. Durchflusszytometrische Identifizierung und Charakterisierung der Synovialmembran von Patienten mit Rheumatoider Arthritis</b> .....	<b>- 39 -</b>
<b>3.3. Durchflusszytometrischer Nachweis von CD4(+)CD25(+) T-Zellen in der Synovialmembran</b> .....	<b>- 43 -</b>
<b>3.4. Immunhistologischer Nachweis von CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) T – Zellen</b> .....	<b>- 45 -</b>
<b>3.5. Funktionelle Charakterisierung von Synovialzellen der Rheumatoiden Arthritis</b> .....	<b>- 47 -</b>
<b>3.6. Effekt peripherer naiver T Zellen auf zytokinproduzierende Synovialmembranzellkulturen</b> .....	<b>- 49 -</b>
<b>3.7. Klinische Auswertung</b> .....	<b>- 57 -</b>
3.7.1.2 Intrasynoviale Zytokinproduktion im Bezug zum Krankheitsverlauf und Geschlecht.....	- 57 -
3.7.2 Laborchemische Parameter.....	- 59 -

3.7.3. Klinische Aktivitätsscores und Zytokinmuster .....	- 62 -
3.7.4. Klinische Aktivität und Synovialmembran Zusammensetzung .....	- 64 -
3.7.5. Therapie und Zytokinmuster .....	- 66 -
3.7.6. Multiples Regressionsmodell klinischer Parameter und intrasynovialer Zytokinproduktion .....	- 68 -
<b>4. Diskussion</b> .....	<b>- 70 -</b>
<b>4.1. CD4(+) und CD8(+) T-Zellen in der Pathologie der Rheumatoiden Arthritis</b> .....	<b>- 70 -</b>
<b>4.2. CD4(+)CD25(+) regulatorische T- Lymphozyten</b> .....	<b>- 74 -</b>
<b>4.3. Suppression durch CD4(+)CD25(+) Treg</b> .....	<b>- 76 -</b>
<b>4.4. Regulatorische CD8(+) T-Zellen in der Rheumatoiden Arthritis..</b>	<b>- 82 -</b>
<b>4.5. CD4(+)CD25(+) regulatorische T- Lymphozyten in der Rheumatoiden Arthritis</b> .....	<b>- 83 -</b>
<b>4.6. Grundlegende Mechanismen der Gewebeeinfiltration</b> .....	<b>- 86 -</b>
<b>4.7. Transmigration durch das Synovium („Pseudoemperipolesis“) ...</b>	<b>- 90 -</b>
<b>4.8. Therapeutische Implikation</b> .....	<b>- 93 -</b>
4.8.1 Modulation der Gewebeeinfiltration und Selektion von CD4(+)CD25(+) Treg ...	- 93 -
4.8.2. Steigerung der CD4(+)CD25(+) Treg Frequenz.....	- 95 -
4.8.4. DMARDs.....	- 98 -
<b>4.9. Klinische Aktivität und Zytokinproduktion innerhalb des Synoviums</b> .....	<b>- 100 -</b>
<b>5. Zusammenfassung</b> .....	<b>- 104 -</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>- 108 -</b>
<b>7. Anhang</b> .....	<b>- 120 -</b>
<b>7.1. Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>- 120 -</b>
<b>7.2. Beiträge zu wissenschaftlichen Publikationen und Konferenzen</b> .....	<b>- 121 -</b>
<b>7.3. Danksagung</b> .....	<b>- 122 -</b>
<b>7.4. Schriftliche Erklärung</b> .....	<b>- 123 -</b>

## 1. Einleitung

Die menschliche Hand ist ein komplexes Werkzeug, bestehend aus einer Knochenkette verbunden durch mehrere Gelenke und Bänder. Sie ermöglicht dem Menschen seine Umwelt zu „begreifen“ und sie durch feine und grobe Bewegungsmuster zu verändern. Krankhafte Prozesse beeinträchtigen die Funktion der Hand. Alltägliche „Handgriffe“, wie z.B. das Öffnen von Knöpfen oder Flaschen, werden unmöglich. Betroffene Menschen sind dadurch beeinträchtigt und auf Hilfsmittel oder die Hilfe von anderen Personen angewiesen. Eine häufige rheumatische Erkrankung, die sich an den Händen manifestiert, ist die Rheumatoide Arthritis. Allein in der Bundesrepublik Deutschland leiden ca. 800.000 Menschen an dieser Erkrankung. Weltweit beträgt die Prävalenz 1%. In ethnischen Subpopulationen zeigen sich jedoch signifikante Unterschiede. Nordamerikanische Indianer leiden häufiger unter einer Rheumatoiden Arthritis (Prävalenz: 5-6%) als Asiaten (Prävalenz: 0,3%) [1-3].

Die Inzidenz in der Bundesrepublik Deutschland beträgt ca. 20-40 Erkrankte pro 100.000 Einwohner. Es besteht ein ausgeprägter Geschlechtsunterschied, so dass Frauen dreimal häufiger erkranken als Männer. Die Rheumatoide Arthritis kann ab dem 10. Lebensjahr auftreten, der Altersgipfel liegt jedoch zwischen der 4.-6. Lebensdekade. Nach einer Erkrankungsdauer von 20 Jahren werden statistisch gesehen 80% der Erkrankten in ihrem Bewegungsumfang stark eingeschränkt sein [4]. Neben den sozialen und psychischen Problemen, ergeben sich dadurch auch gesundheitsökonomischen und volkswirtschaftliche Schwierigkeiten. Die jährlichen gesundheitsökonomische Kosten betragen pro Patient etwa 5.000 €. Sie entstehen durch stationäre Maßnahmen, wie z.B. Krankenhausaufenthalte, und vorwiegend durch Medikamente und Arztbesuche. Viel gravierender sind jedoch die volkswirtschaftlichen Kosten, die durch Arbeitsausfälle und Frühberentung entstehen. In Deutschland werden dadurch Kosten in Höhe von 10.000 € pro Patient und Jahr generiert [5]. Patienten mit Rheumatoider Arthritis weisen zudem eine verminderte Lebensspanne mit ansteigender Mortalität auf. Diese ist assoziiert mit einer

hohen persistierenden Krankheitsaktivität, Nachweis von Rheumafaktor, hohem Lebensalter und geringem Bildungsgrad. Die Lebenserwartung verringert sich dadurch bei den Patienten um 3-18 Jahren [6]. Auch die heutige medikamentöse Behandlung verbessert diese Prognose nicht [4].

### 1.1. Krankheitsbeschreibung

Die Rheumatoide Arthritis wird in der Gruppe der entzündlichen Bindegewebserkrankungen („connectiv tissue disease“ (CTD)) subsumiert. Diese Erkrankungen zeichnen sich durch Inflammation und/oder Degeneration des Bindegewebes aus, begleitet mit Ablagerung von fibrinösem Material. Weitere Erkrankungen dieser Gruppe sind der Systemische Lupus erythematodes (SLE), die systemisch progressive Sklerodermie, das Sjögren-Syndrom und das Sharp- Syndrom („mixed-connective tissue disease“ (MCTD)).

#### 1.1.1. Artikuläre Affektionen

Klinisch präsentiert sich die Rheumatoide Arthritis als symmetrische Polyarthrit, die hauptsächlich die kleinen Gelenke der Hände und Füße befällt. Oft wird über Arthralgien, Gelenkschwellung, Müdigkeit und Steifigkeit der Gelenke über mehrere Stunden berichtet. Affektierte Gelenke sind oft schmerzhaft bei der Palpation (Gänslen-Zeichen). Charakteristisch ist der symmetrische Befall der peripheren Interphalangeal-, Metacarpophalangealgelenke der Hände und Füße [7]. Durch zunehmende Destruktion und Funktionseinschränkung der Gelenke kommt es zu den typischen Erscheinungsbildern der Rheumatoiden Arthritis. Die Affektion der Strecksehnen an den Phalangen führt zur Ausbildung einer Schwanenhals oder Knopflochdeformität. Davon sind ebenfalls betroffen die synoviaausgekleideten Gelenke der zervikalen Wirbelsäule. Der Befall kann zu einer Instabilität führen und in einer atlanto-axialen Subluxation mit Myelon-Kompression enden, welche einen letalen Ausgang haben kann [8]. Diagnostiziert wird die RA an Hand der von der „American Rheumatism Association“ (ARA) entwickelten Kriterien [9].

Zur Diagnose einer RA müssen vier Kriterien erfüllt sein. Die Punkte 1-4 müssen seit mindestens 6 Wochen bestehen

1.	Morgensteifigkeit >1h
2.	Arthritis > 3 Gelenkregionen
3.	Arthritis der Hand und Fingergelenke
4.	symmetrische Arthritis
5.	Rheumaknoten
6.	Rheumafaktoren im Serum
7.	radiologische Veränderung

Tabelle 1.: ARA – Kriterien für die Rheumatoide Arthritis.

### 1.1.2. Extraartikuläre Affektionen

Neben den artikulären Affektionen finden sich typischerweise systemische Veränderungen, wie zum Beispiel eine Lymphadenopathie, subfebrile Temperaturen und eine erhöhte Blutsenkungsgeschwindigkeit. Eine typische extraartikuläre Manifestation der Rheumatoiden Arthritis ist der Rheumaknoten. Er wird bei 20% der Rheumafaktor positiven (seropositiven) Patienten gefunden [10]. Diese subkutanen Knoten finden sich v.a. an den Sehnen oder periartikulär, wie zum Beispiel am Ellenbogen oder an den Fingergelenken. Pathophysiologisch stellen Rheumaknoten eine Vaskulitis der kleinen Blutgefäße dar. Diese Vaskulitis führt zu einer fibrinoiden Nekrose der Gefäße mit zunehmender Proliferation von Fibroblasten und epitheloidzelligen Histiozyten [11]. Unter adäquater Therapie treten Rheumaknoten nicht auf. Weitere Manifestationen einer Rheumatoiden Arthritis können ein sekundäres Sjögren – Syndrom [12], Felty-Syndrom, Vaskulitis und eine Polyneuropathie sein.

Laborchemisch lassen sich unterschiedliche autoreaktive Antikörper im Serum nachweisen. Die bekanntesten werden unter den Rheumafaktoren subsumiert. Rheumafaktoren sind Autoantikörper, vor allem der Subklassen IgM und IgG, die gegen die Epitope des Fc- Teils von veränderten IgG-Molekülen gerichtet sind. Sie sind nicht spezifisch für die Rheumatoide Arthritis, sondern werden auch bei weiteren rheumatischen Erkrankungen sowie bei klinisch Gesunden gefunden. Spezifischer für die Rheumatoide Arthritis sind Antikörper gegen cyclisches citrulliniertes Peptid. In vivo sind

sie gegen das epitheliale Protein Filaggrin gerichtet, welches durch enzymatische Spaltung von Argininresten in der Proteinkette 20 % Citrullin enthält. Anti- CCP AK sind bei 20- 60 % der Patienten in der Frühphase der Rheumatoiden Arthritis nachweisbar. Der Nachweis korreliert mit dem Auftreten primärer Gelenkdestruktionen.

### 1.1.3.Krankheitsaktivität

Die Rheumatoide Arthritis zeichnet sich durch eine variable Symptomatik und Verlauf aus. Bei der Hälfte der Patienten beginnt sie mit indolenter Arthritis und endet mit stark geschwollen Gelenken und Arthralgien [13]. Bei dreiviertel der Patienten wechseln sich hohe Krankheitsaktivität und Remission ab [14]. Eine individuelle Vorhersage über den Krankheitsverlauf ist dadurch nicht möglich.

Zur Quantifizierung der Krankheitsaktivität werden in der klinischen Praxis „Scores“ verwendet. Ein klinischer Score ist eine Messvorschrift für ein Merkmal, der aus einer genau operationalisierten Zusammenfassung von mehreren (i.d.R. mehr als zwei) Komponenten besteht und zu einer mindestens ordinalen Bewertung führt.

Einen besser evaluierten Score für die Rheumatoide Arthritis stellt der Krankheitsaktivitäts-Score „disease activity Score“ (DAS) dar. Er berechnet sich aus der Anzahl der geschwollenen („swollen joint count“(SJC)) und druckschmerzhaften Gelenke („tender joint count“(TJC)) und jeweils aus einem laborchemischen Parameter, entweder dem C-Reaktives Protein (CRP) oder der Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) nach folgender Messvorschrift [15].

$$DAS_{28}^{3(crp)} = [0,56 \cdot \sqrt{TJC_{28}} + 0,28 \cdot \sqrt{SJC_{28}} + 0,36 \cdot \ln(CRP + 1)] \cdot 1,10 + 1,15$$

Neben den klinischen Scores existiert noch eine Vielzahl von radiologischen Scoresystemen zur Quantifizierung der im Röntgenbild erkennbaren Veränderungen. Tabelle 1.1. nach Resnick [16] zeigt, welche pathologisch-anatomischen Veränderungen der Rheumatoiden Arthritis sich im Röntgenbild darstellen.

<b>Pathologische Anatomie</b>	<b>Röntgenbefund</b>
Entzündung der Synovialis und Flüssigkeitsansammlung	Weichteilsschwellung und Gelenkspalterweiterung
Hyperämie und Knochenmineralverlust	Gelenknahe Osteoporose
Zerstörung des Knorpels durch Pannus	Gelenkspaltverschmälerung
Zerstörung des "ungeschützten" Knochens am Gelenkrand durch Pannus	marginale Erosionen
Zerstörung des subchondralen Knochens durch Pannus	Knochenerosionen und subchondrale Zyste
Fibröse und knöcherne Ankolysen	Ankolyse
Kapsel- und Bandinstabilität	Deformationen und Subluxationsfehlstellung

Tabelle 2: Pathologisch anatomischer Befund und Röntgenbefund im Vergleich nach Resnick [16]

Die semiquantitativen radiologischen Scoringmethoden erfassen insbesondere die erosiven Veränderungen. Sie zählen die Erosionen pro Gelenk (Sharp- Score), bewerten teilweise die Größe der Erosionen (modifizierter Sharp- Score nach v.d. Heijde [17]), schätzen den prozentualen Anteil der destruierten Gelenkfläche (Ratingen- Score [18]) oder bewerten die globale Gelenkzerstörung, teilweise unter Zuhilfenahme von Skizzen (Larsen- Score [19]).

Ein häufig verwendeter radiologischer Score ist der in Tabelle 1.2. dargestellte Sharp- Score [20, 21].

Erosive Veränderung *	Gelenkspaltverschmälerungsscore**
Grad 0 = Normal	0 = normal
Grad 0 + = diskrete Veränderung	0 + = fraglich oder schlechter
Grad 1 = Leicht	1 = leicht
Grad 1 + = leicht, schlechter	1 + = leicht oder schlechter
Grad 2 = Mäßig	2 = mäßig
Grad 2 + = Mäßig, schlechter	2 + = mäßig, schlechter
Grad 3 = Schwer	3 = schwer
Grad 3 + = schwer, schlechter	3 + = schwer, schlechter
	4 = Ankylose oder Dislokation

+ wird mit 0,5 Punkten bewertet

\* 14 Gelenke pro Hand werden untersucht

\*\* 13 Gelenke pro Hand werden untersucht

Tabelle 3.: Sharp- Score modifiziert nach Genant (TSS) [22]



Abbildung 1: Gelenke, die bei der Scoringmethode nach Sharp berücksichtigt werden. Grün unterlegte Gelenke werden auf Gelenkspaltverschmälerung, rot unterlegte Gelenke auf Erosionen untersucht.

Die Vorteile eines radiologischen Scores bestehen in seiner hohen Spezifität und kostengünstigen Verfügbarkeit. Nachteilig werden projektionsbedingt nur

randständige Defekte erfasst. Daneben zeigen radiologische Scores eine geringe Änderungssensitivität und führen durch ungleiche Schritte in der ordinalen Skalierung zur Überbewertung früher Veränderungen. Sie berücksichtigen dabei nicht Luxationen oder Subluxationen.

### 1.2. Ätiologische Faktoren der Rheumatoiden Arthritis

Die Ätiologie der Rheumatoiden Arthritis ist nicht bekannt. Es konnten jedoch verschiedene Faktoren identifiziert werden, die im Zusammenhang mit der Erkrankung stehen, wie zum Beispiel bestimmte genetische Konstellationen und mögliche exogene Faktoren.

#### 1.2.1. Genetische Faktoren

Ähnlich wie bei den weiteren Autoimmunerkrankungen, konnte man bei der Rheumatoiden Arthritis auch eine familiäre Häufung schwerer, destrukturierender Verläufe beobachten [23]. In Zwillingsstudien konnte eine Konkordanz von 12-30% bei eineiigen Zwillingen festgestellt werden, bei zweieiigen Zwillingen beträgt diese 4% [24]. Genanalysen zeigten eine polygenetische Suzeptibilität für die Rheumatoide Arthritis. Die häufigste findet sich in den Allelen der Klasse II Histokompatibilitätsantigene, jenen Proteinketten, welche für die Antigenpräsentation mitverantwortlich sind. Eines der bekanntesten ist die Assoziation mit HLA-DR4. Prospektive Studien zeigten, dass erkrankte HLA-DR4(+) Patienten ein höheres Risiko tragen, an Knochenerrosionen zu erkranken als HLA-DR4(-) Patienten [25]. Weitere Genloci betreffen die Proteinketten der Immunglobuline und ihre Glykolisierung [26, 27].

#### 1.2.2. Nicht-genetische Faktoren

Auf Grund der geringen Konkordanz in den Zwillingsstudien wurden weitere Faktoren postuliert, die zum Ausbruch der Erkrankung beitragen. Es wurden zwei Hypothesen in Bezug auf einen infektiösen Faktor entwickelt [28]. Die erste besagt, dass in der Synovialmembran ein unbekannter infektiöser Organismus persistiert, welcher eine chronische Entzündung unterhält. Im Mittelpunkt stehen Viren der Herpesgruppe (CMV, EBV), Retroviren (HTLV-1) und Parvoviren (Parvovirus B19). Eine destruktive Polyarthrititis wird bei

Infektionen mit HTLV-1 beschrieben [29, 30], jedoch konnte kein Beweis gefunden werden für eine HTLV-1 getriggerte RA in nicht endemischen Gebieten. In einer weiteren Hypothese wird davon ausgegangen, dass ein infektiöser Mikroorganismus in einer frühen Phase eliminiert wird. Durch die Ähnlichkeit der antigenen mikrobiellen Epitope mit Köpereigenen entsteht eine Autoimmunreaktion, welche zu einer perpetuierten Inflammation führt („molekulares Mimikry“ oder „hit and run“-Hypothese).

### 1.3. Pathologie

#### 1.3.1. Histologie der Synovialmembran

Regelrecht konfiguriertes Synovialmembrangewebe (Membrana synovialis) besteht aus einer inneren synovialen und einer subsynovialen Schicht. Sie kleidet neben den Gelenkinnenraum auch Sehnenscheiden aus. In manchen Gelenkinnenräumen bildet sie größere Falten, den Plicae synoviales oder Zotten (Villi synoviales). Die synoviale Intima besteht aus 2-4 Lagen von Deckzellen. Diese liegen auf einer subsynovialen Schicht, in der, in einer extrazellulären Matrix, Fibroblasten, Mastzellen, Dendritische Zellen und Nervenendigungen eingelagert sind. Hauptsächlich zwei Zelltypen bilden die synoviale Intima, Typ A und Typ B Synoviozyten [31]. Typ A Synoviozyten sind makrophagen-ähnliche Zellen. Sie bilden insgesamt 25% aller Zellen des Synoviums. Der Phänotyp der Synovialzelle Typ A ähnelt sehr dem der Gewebsmakrophagen. Sie exprimieren CD14, CD68 und den Komplementrezeptor Typ 1. Synoviozyten Typ B sind fibroblasten-ähnliche Zellen. An ihrer Plasmamembran findet sich die Uridyl-diphosphoglucose Dehydrogenase. Dieses ist ein Enzym, welches zur Bildung von Hyaluronsäure benötigt wird. Hyaluronsäure, ein Glykosaminglykan, findet sich in großen Mengen in der Synovia (Synovialflüssigkeit) und in der extrazellulären Matrix.

### 1.3.2. Histologische Merkmale der Synovialmembran bei Rheumatoider Arthritis

Bei der Rheumatoiden Arthritis verändert sich das histologische Bild der Synovialmembran.

Im Frühstadium kommt es zur Ödem- und Fibrinbildung. Dabei korreliert die histologische Änderung mit der klinischen feststellbaren Gelenkschwellung [32, 33]. Die Persistenz der Entzündung bewirkt eine Dickenzunahme der synovialen Intima [34]. Histologisch findet sich eine Hypertrophie und Hyperplasie der synovialen Deckzellen Typ A und Typ B. Die Proliferation der Deckzellen wirft die Synovialmembran stärker in Falten. Neben der synovialen Intima wird auch das synoviale Bindegewebe alteriert. Es kommt durch neu gebildete Blutgefäße zu einem Influx von Leukozyten. Histologisch zeichnen sich diese Blutgefäße als „Hoch-Endothialen Venulen (HEV)“ aus [32, 35]. Hoch-endothiale Venulen fördern durch Expression von spezifischen Adhäsionsproteinen die Einwanderung von Leukozyten ins Synovium [35]. Die größte Subpopulation der infiltrierenden Leukozyten stellen die CD4(+) T-Lymphozyten dar. Sie zeichnen sich phänotypisch durch die Expression von spezifischen Markerproteine, als aktivierte T-Zellen oder Gedächtniszelle aus [36]. Weitere infiltrierende Leukozyten sind CD8(+) T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und Makrophagen. Im subsynovialen Gewebe verteilen sich die mononukleären Leukozyten entweder diffus oder sie bilden sekundäre Aggregate. Diese können sich zu Keimzentren, so genannten tertiären Lymphfollikeln, umwandeln. In diesen Lymphfollikeln werden B-Zellen aktiviert und differenzieren sich dann zu Plasmazellen. Polymorphkernige Leukozyten, wie z.B. neutrophile Granulozyten, werden selten im Synovium gefunden. Man findet sie aber gehäuft in der Synovia.

a)



b)

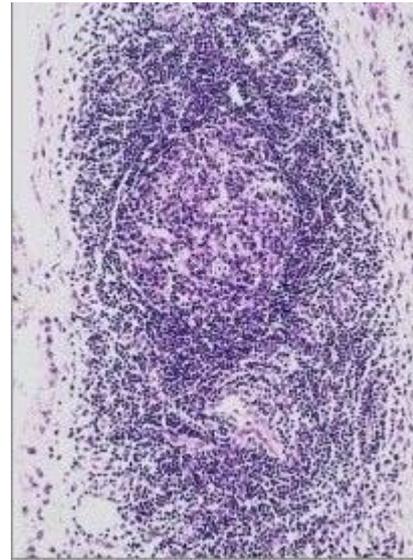


Abbildung 2: Histologie inflammatorischer Synovialmembran (HE -Färbung)

a) ausgeprägte Hyperplasie der Synovialendeckzellschicht;

b) starke inflammatorische subendotheliale Infiltration mit sekundärer Keimzentren Bildung [37]

### 1.3.3. Pannus

Das zerstörerische Element der Rheumatoiden Arthritis ist das Pannus - Gewebe. Es zerstört den Knorpel und führt zu Knochendestruktionen. Es affektiert auch extraartikuläre Gewebe wie Bänder und Sehnen. Der Pannus ist eine expandierende entzündliche Masse, bestehend aus Synovialzellen, die sich in den Knorpel bzw. Knochen ausbreitet. In der frühen Phase einer Rheumatoiden Arthritis ist Pannus zunächst avaskulär und seine Expansion nicht-entzündlich. Später führt eine Aktivierung des Gewebes zur Zerstörung von Gelenkbinnenstrukturen (z.B. Knorpel). Viele Daten lassen vermuten, dass T-Zell - vermittelte Stimuli die Zellen des Pannus aktivieren. Die Bildung von proinflammatorischen Zytokinen, Metallomatrixproteasen und anderen Faktoren bauen die extrazelluläre Matrix des Knorpels und später die Knochenstruktur ab.

#### 1.4. Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis

Grundlage der Entstehung einer perpetuierten Entzündung ist das Zusammenspiel und die Verteilung der inflammatorischen Zellen. Entscheidend ist die interzelluläre Kommunikation, welche zur Aktivierung bzw. Suppression von Zellen führt. Zellen des Immunsystems bedienen sich zweier Möglichkeiten der Kommunikation. Sie können entweder durch lösliche Mediatoren oder durch direkten Zell-Zell- Kontakt in Verbindung treten. Lösliche Mediatoren sind kleine Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 5 - 50 kDa. In den meisten Fällen handelt es sich um monomere Proteine. Man bezeichnet diese Klasse der Mediatoren als Zytokine und subsumiert alle kleinen, nicht-strukturell- verwandten Glykoproteine, welche als chemische Liganden zwischen den Zellen dienen. Sie vermitteln Zellwachstum, Differenzierung, Gewebeheilung und Regulation der Immunantwort. Zytokine können von einer Vielzahl von Zellen synthetisiert werden und können unterschiedliche Zellen ansprechen. Sie fördern verschiedene Immunzellantworten und es besteht eine klare Redundanz der Funktion, die spezielle Zytokine vermitteln. Im Synovium findet man vor allem Zytokine, welche von Makrophagen und Fibroblasten produziert werden. Man kann sie mittels PCR auf mRNA- Ebene nachweisen. Th1-zell spezifische Zytokine wurden bis jetzt nicht auf Proteinebene nachgewiesen, sondern ausschließlich auf mRNA-Ebene. Möglicherweise spiegelt diese Entdeckung die späte Phase der Rheumatoiden Arthritis wider, während sich eventuell in der frühen Form T-zellgenerierte Zytokine finden, da die Zahl und Population infiltrierender Zellen zu jedem Zeitpunkt gleich sind [38].

<b>Zytokin</b>	<b>Produzent</b>	<b>Funktion</b>
IL- 1	Makrophagen/Monozyten	Proinflammatorisches Zytokin
IL- 10	CD4(+) - und CD8(+) T- Zellen, B -Zellen, Makrophagen	Inhibition der Produktion von TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$
IL- 15	Endothelzellen, Fibroblasten, Monozyten	Förderung der tranendothelialen Migration und Akkumulation von T-Zellen, Proliferation von aktivierten T- Zellen, fördert die Entwicklung von NK- Zellen und NKT- Zellen
IL- 17	Th17	Proinflammatorisches Zytokin, stimuliert Makrophagen zur Produktion von TNF- $\alpha$ und IL-1; Induktion von Metalloproteinasen
IFN- $\gamma$	aktivierte T- Zellen, NK -Zellen	Immunmodulatorisch; Aktivierung von Makrophagen/Monocyten; Stimulation von Th1- Zellen und CD8(+) T -Zellen; Inhibition von Th17- Zellen
TNF- $\alpha$	Macrophagen/Monozyten, Neutrophile, T-Zellen, NK-Zellen	Proinflammatorisches Zytokin, Aktivierung des Endothels, Induktion der Apoptose, Stimulation des angeborenen Immunsystems
TGF- $\beta$	Makrophagen/Monozyten; Fibroblasten	Pro- und Inflammatorische Effekte; Induktion von CD4(+)25(+) und Th17
RANK/ RANKL	<i>RANK</i> : dendritische Zellen, naive T - Zellen <i>RANKL</i> : aktivierte T - Zellen, Osteoblasten, Osteoklasten	Fördert die Entwicklung von T und B- Zellen aus Vorläuferzellen, Induziert T- Zellproliferation, fördert die Osteoklastendifferenzierung, Osteoklastenaktivierung

Tabelle 4: Zytokine in der Rheumatoiden Arthritis

Durch die hohe Konzentration von pro- inflammatorischen Zytokinen kommt es zur Aktivierung von Zellen, welche daraufhin Metallomatrixproteasen ausschütten und extrazelluläre Matrix und Knorpel abbauen.

Inflammatorische Zellen werden neben solublen Mediatoren, auch über direkten Zell-Zell- Kontakt beeinflusst. Aktivierte CD4(+) T-Lymphozyten stimulieren mittels CD69 und CD11 Monozyten und Fibroblasten zur Produktion von Metallomatrixproteinen und proinflammatorischen Zytokinen. Sie stimulieren zusätzlich durch die Bindung von  $\alpha_1\beta_2$  Integrinen (CD154) und CD 28 auf B-Lymphozyten die Produktion von Immunglobulinen, einschließlich der Rheumafaktoren. CD4(+) T-Lymphozyten können auch durch die Expression von Osteoprotgerin (OPGL) die Osteoklastengnese steigern.

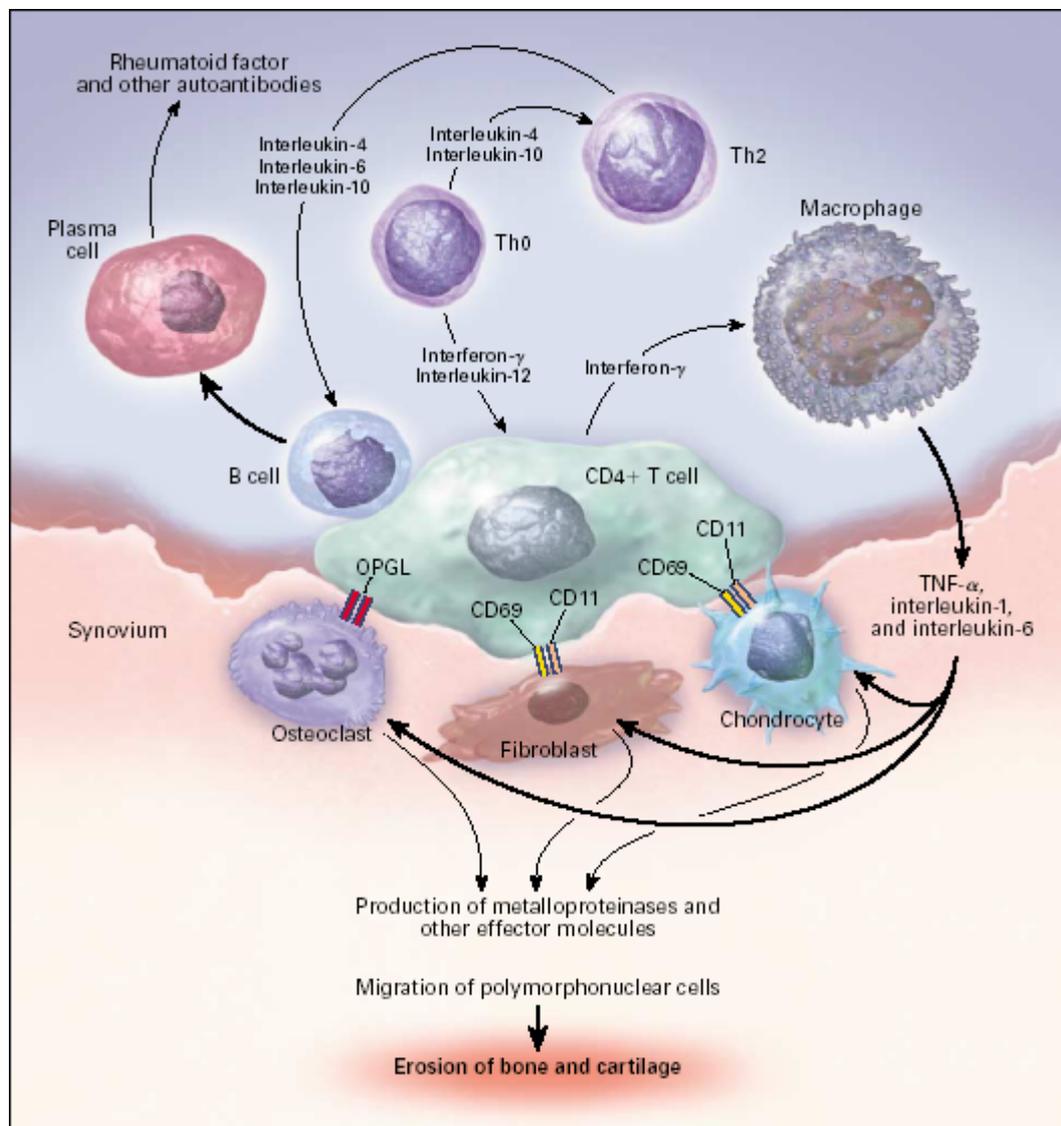


Abbildung 3.: Zusammenspiel der inflammatorischen Zellen in der Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis [39]

### 1.4.1. Charakteristika von inflammatorischen Zellen in der Rheumatoiden Arthritis

#### 1.4.1.1. T-Lymphozyten

Die größte Population der infiltrierenden Zellen bilden die T-Lymphozyten. CD4(+) T-Zellen stellen die größte Subpopulation da. Nach der aktuellen Hypothese werden die infiltrierten CD4(+) T-Zellen im pro-inflammatorischen Gewebe aktiviert und differenzieren sich zu Gedächtniszellen. Diese zeichnen sich durch die phänotypische Expression von CD45 RO, CD44, VLA-1 und HLA-DR aus. Die Menge der CD4(+)

T-Zellen in der Synovia korreliert nicht mit der des peripheren Blutes. CD4(+) T-Helferzellen beteiligen sich an der Aktivierung anderer Leukozyten, insbesondere durch die Freisetzung lokaler Mediatoren wie z. B. Zytokine.

T-Helferzellen lassen sich in drei Hauptgruppen Th1, Th2 und Th17 Zellen unterscheiden. Die einzelnen Subtypen lassen sich anhand spezifischer Transkriptionsfaktoren charakterisieren. Marker für Th1 Zellen ist der Transkriptionsfaktor Tbet, während Th17 sich durch die Expression von ROR $\gamma$ t auszeichnen. GATA3 findet sich spezifisch in Th2 differenzierten T-Zellen.

Th1 Zellen produzieren IFN- $\gamma$ , IL-2 und TNF- $\beta$ , welche eine Aktivierung von Makrophagen bewerkstelligen. Ein Markerzytokin ist IFN- $\gamma$ . Es besitzt antivirale und antiparasitäre Eigenschaften und kann inhibitorisch auf die Proliferation von Endothelzellen, glatten Muskelzellen und hämatopoetischen Progenitorzellen wirken. IFN- $\gamma$  fördert die T-Zellreifung und verstärkt die Proliferation von CTL und ihre Reaktivität auf andere Zytokine. Es stimuliert die Aktivierung von NK- Zellen, Makrophagen und Fibroblasten und erhöht deren Aktivität. Weiterhin inhibiert es die Zytokinproduktion von Th2 Zellen. Darüber hinaus induziert es die Zelloberflächenmoleküle und -rezeptoren, wie z.B. IL-2 Rezeptor und MHC Klasse- II Moleküle auf T-Zellen und Fibroblasten.

CD4(+) Th17 Zellen stellen eine weitere Subpopulation von Effektorzellen dar. Induziert werden sie aus naiven T-Zellen durch die Zytokinkombination aus IL-6, TGF- $\beta$  und IL-23. IL-23 wird zusätzlich zur Expansion der Zellen

benötigt. Th17 Zellen zeichnen sich durch die Produktion von proinflammatorischen IL-17 und IL-22 aus. Tierexperimentell konnte bei der Collagen-induzierten Arthritis gezeigt werden, dass eine Inhibition von IL-17 zur Reduktion der Gelenkdestruktion führt. Man vermutet daher eine Schlüsselrolle dieser Zellen in der Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis.

Eigenschaften	Th1	Th2	Th17
<b>Zytokinfreisetzung</b>			
IFN- $\gamma$	+++	-	+
IL-2	+++	+	-
TNF- $\alpha$	+++	+	
IL-10	+	+++	+
IL-4, IL-5	-	+++	?
IL-17	-	-	+++
<b>B-Zell Unterstützung zur IgM/IgG Synthese</b>			
bei geringer T:B Zell Ratio	+++	++	?
bei hoher T:B Zell Ratio	-	+++	?
<b>Monozytenaktivierung</b>			
	+++	-	
<b>Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten</b>			
	-	-	+++
<b>Oberflächenexpression</b>			
CD30	+/-	+/-	?
LAG-3	+++	+/-	?
IFN- $\gamma$	+++	-	?

Tabelle 5: Hauptfunktionen und Eigenschaften von humanen T - Helferzellen [40].

CD8(+) sind nicht frequent im Synovium vertreten [41]. Es gibt dennoch Beweise für eine zytotoxische T-Zell (CTL) - Funktion innerhalb der Synovialmembran. So besitzen 10-50% der T-Zellen Marker einer CTL-Funktion (z.B.: Granzyme A und Perforine) [42].

Im Synovium sind die T-Zellen assoziiert mit weiteren mononukleären Zellen und liegen dort diffus oder in Aggregaten neben der Intima zusammen. T-Zellen werden oft neben Antigen- Präsentierenden Zellen (APC), wie z.B.

Dendritische Zellen (DC) gesehen [43-45]. In der Synovialflüssigkeit sind CD4(+) und CD8(+) weitgehend gleich verteilt [46].

### 1.4.1.2. B-Zellen

Ungefähr 5% der Mononukleären Zellen im Synovium sind B-Lymphozyten und Plasmazellen [47]. Diese akkumulieren neben den Gefäßen oder in Keimzentren in Assoziation mit T-Lymphozyten. Eine signifikante Menge der B-Zellen sind B1-Zellen. Diese zeichnen sich durch die Expression von CD5 aus. Es wird auch vermutet, dass sie Antigene aufnehmen und T-Zellen präsentieren [48]. Eine große Menge, der lokal im Synovium produzierten Antikörper sind Rheumafaktoren. Neben Rheumafaktoren wird eine signifikante Menge von Antikörpern gegen extrazelluläre Matrixproteine gebildet, wie z.B. Antikörper gegen Kollagen Typ II [49].

### 1.4.1.3. Makrophagen und Typ A-Synoviozyten

Mehr als 20% der Zellen im Synovium eines Patienten mit Rheumatoider Arthritis sind Monozyten/Makrophagen. Sie werden charakterisiert durch die Expression der „cluster of differentiation“ CD14 und CD11b [50]. Viele dieser Zellen sind Synovialdeckzellen Typ A, aber eine signifikante Menge sind gewebsinfiltrierende CD14(+), CD11b(+) Makrophagen. In verschiedenen Biopsien konnte gezeigt werden, dass die Dicke der Synovia („lining layer of makrophages“) mit der Progression der Erkrankung korreliert. Diese Erkenntnis unterstützt die Aussage, dass die Zerstörung des Knorpels von nicht-lymphatischen Zellen ausgeht [51]. Makrophagen exprimieren große Mengen an HLA-DR, was möglicherweise zur Antigenpräsentation an Lymphozyten dient. Ungefähr 15 % exprimieren zusätzlich CD86, eine Costimulans für T-Lymphozyten [52]. Durch die Interaktion von Makrophagen mit B-Lymphozyten wird eine Apoptose von B-Lymphozyten verhindert und eine Differenzierung zu Plasmazellen gefördert [53, 54].

### 1.4.1.4. Fibroblasten und Typ-B-Synoviozyten

Eine große Anzahl von fibroblasten-ähnlichen Zellen befindet sich im Synovium. Rheumatoide Arthritis Synovialfibroblasten exprimieren CD40, ein Molekül das als Kosstimulans zur Aktivierung von T-Lymphozyten dient. Die Expression dieses Moleküls wird hochreguliert von INF- $\gamma$  assoziierten mit TNF- $\alpha$  und IL-1 $\alpha$ . Der Zell-Zell-Kontakt von Fibroblasten und T-Lymphozyten via CD40-CD40- Ligand führt im Fibroblasten zu einer hochregulierten Expression von CD54(ICAM-1), CD106(VCAM-1), IL-6 und einer vermehrten Fibroblasten Proliferation [55]. Die einmal aktivierte Typ-B Zelle produziert Fibronectin, welches an der Knorpel-Pannus Grenzzone und an der Oberfläche des Knorpels lokalisiert ist. Dieser Überzug des Knorpels mit Fibronectin (Matrix) bietet Entzündungszellen die Möglichkeit der Migration auf dem Knorpel [56, 57].

### 1.4.1.5. Regulatorische T-Zellen [CD4(+)CD25(+) T-Zellen (Treg)]

In einem regelgerecht konstituierten Immunsystem finden sich verschiedene Regelkreise, die primär zur Elimination eines Antigens und sekundär zur Suppression der Inflammation führen. In jüngster Zeit konnte eine neue Zellpopulation beschrieben werden, die eine solche Rolle ausfüllen könnte. Eine dieser Zellen ist die CD4(+)CD25(+)- T-Zelle (regulatorische T-Zellen (Treg)). Sie wurde primär in Mäusen entdeckt, wo sie sich durch umfängliche suppressive Eigenschaften auszeichnet. Später konnte diese Subpopulation der CD4(+) T-Lymphozyten im Menschen nachgewiesen werden. Hypothetisch könnten diese Zellen zur Toleranz beitragen, in dem sie autoreaktive Zellen unterdrücken, so dass Autoimmunerkrankungen nicht entstehen können. Zur Identifizierung der Zellen stehen unterschiedliche Oberflächenmarker zu Verfügung. Alle Oberflächenantigene sind nicht hochspezifisch für diese Zellart. Dennoch exprimieren Treg quantitativ mehr CD25 als aktivierte CD4(+) T-Lymphozyten. Zur Identifizierung von CD4(+)CD25(+)- T-Zelle dient unter anderem der Transkriptionsfaktor FoxP3.

Markerproteine	Kommentar
FoxP3	Der "forkhead transcription factor 3 (FoxP3)" wird spezifisch auf murinen CD4(+)CD25(+) T Zellen exprimiert. Er wird zur Entwicklung und zur Funktion von regulatorischen T Zellen benötigt. Zurzeit ist es der Marker für murine CD4(+)CD25(+) T Zellen. In menschlichen CD4(+)CD25(+) T Zellen ist FoxP3 weniger spezifisch als in murinen.
GITR	Nicht aktivierte CD4(+)CD25(+) T Zellen exprimieren konstitutuell GITR.
CTLA- 4	CTLA- 4 reguliert die CD4(+)CD25(+) T Zellen Funktion durch zwei Unterschiedliche Mechanismen: erstens bei der Entwicklung von CD4(+)CD25(+) T Zellen und zweitens während der Effektorphase, wenn der CTLA - 4 Signaltransduktionsweg für die suppressive Funktion benötigt wird.
4-1BB	Der 4-1BB costimulierende Rezeptor kann CD4(+)CD25(+) T Zellen zur Proliferation anregen. Die 4-1BB- expandierten CD4(+)CD25(+) T Zellen verfügen über die gleich Fähigkeit andere T- Zellen zu suppressieren wie native CD4(+)CD25(+) T Zellen.
LAG- 3	LAG-3 wird selektiv auf denen CD4(+)CD25(+) T Zellen exprimiert, welche selektiv suppressive Funktion besitzen.
Neuropillin – 1	Neuropillin-1 wird konstitutiv auf der Oberfläche von CD4(+)CD25(+) T Zellen exprimiert, unabhängig von ihrem aktivierten Status. Ihre Expression korreliert mit ihrer Suppressorfunktion <i>in vitro</i> .

GITR: glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor; CTLA-4: cytotoxic lymphocyte associated antigen-4

Tabelle 6 : Markerproteine von regulatorischen CD4(+)CD25(+) T Zellen [58]

Neben diesen zentralen Toleranzmechanismen scheinen Treg auch eine entscheidende Rolle in der peripheren Regulation einer Inflammation zu spielen. Bei Autoimmunerkrankungen ist ihre Rolle nicht schlüssig erörtert.

Experimentelle Untersuchungen konnten belegen, dass die Anzahl der Treg bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis, dem von gesunden Probanden entspricht. Es könnte sich demnach um einen funktionellen Defekt der Zellart handeln. Zurzeit existieren wenige funktionelle Studien über die Verhaltensweisen Treg und naiven T-Zellen bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis.

### 1.5. Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der funktionalen Charakterisierung Rheumatoider Arthritis Synovialmembranzellen und peripherer T-Zellen mit einem Schwerpunkt auf CD4(+)CD25(+) T-Zellen (regulatorische T-Zellen (Treg)). Es wurden folgende Punkte untersucht:

1. Phänotypische und funktionelle Beschreibung der primären Synovialmembrankultur.
2. Funktionelle Charakterisierung von Kulturen Rheumatoider Arthritis Synovialmembranzellen und peripheren T-Lymphozyten mit besonderem Hinblick auf IL-10 und IFN- $\gamma$ .
3. CD4(+)CD25(+) T-Zelle in der Synovialmembran der Rheumatoiden Arthritis. Lokalisation innerhalb der Synovialmembran und Reaktion von Rheumatoider Arthritis Synovialmembranzellen auf periphere T-Zellen und CD4(+)CD25(+) T-Zellen (regulatorische T-Zellen (Treg)).
4. Klinische Parameter und intrasynoviale IL-10 und IFN- $\gamma$  Produktion.

Übergeordnetes Ziel der vorliegenden Arbeit ist der Versuch ein Konzept der pathogenetischen Abläufe auf der Ebene von regulatorischen T-Zellen zu entwerfen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Materialien

#### *Geräte*

autoMACS	Miltenyi Biotec, Deutschland
Durchflusszytometer	Beckman Coulter
Handdipenser	Eppendorf
Mehrkanalpipette	Eppendorf
Pipetten 20-1000µl automatisch	Eppendorf
Pipettierhilfe	Eppendorf
A●EL●VIS <sup>®</sup>	A●EL●VIS <sup>®</sup> , Deutschland
Brutschrank	
Sterilwerkbank	
Wasserbad	
Zentrifuge	
Gefrierschrank	
Mikroskop	
Kühlschrank	

#### *Verbrauchsmaterialien*

96-Loch-Platte für ELISPOT (0,45 µm PVDF-Membran)	Millipore, USA
Combitips 1ml - 5ml	Eppendorf, Deutschland
Einmalkanülen 20 G	Eppendorf, Deutschland
Einmalpipetten	Eppendorf, Deutschland
Einmalskalpell	
FACS-Röhrchen	Falcon, USA

Filter 0,22 und 0,45 µm	Falcon, USA
Pasteurpipetten	Eppendorf, Deutschland
Pipettenspitzen	Eppendorf, Deutschland
Zellsieb 70µm	Falcon, USA
Zentrifugenröhrchen 50ml	Falcon, USA

### *Chemikalien*

BCIP/NBT Substrat	Mabtech, Schweden
BSA	Sigma, Aldrich
Ionomycin	Sigma, Aldrich
PMA	Sigma, Aldrich
Kollagenase	Sigma, Aldrich

### *Medien*

HAM (F10)	Invitrogen, Deutschland
PBS	PAA Laboratories, Österreich

### *Seprationsmedien*

Ficoll Hypaque	Biochrom, Deutschland
----------------	-----------------------

*Antikörper*

Immune

Rosette-technique CD4(+)

StemCell technologies, USA

Immune

Rosette-technique CD8(+)

StemCell technologies, USA

anti-CD28

BD- PharMingen, Deutschland

anti-CD3

BD- PharMingen, Deutschland

anti- CD3 - ECD

BD- PharMingen, Deutschland

anti- CD4 - PE-Cy7

BD- PharMingen, Deutschland

anti- CD8 - PE-Cy5

BD- PharMingen, Deutschland

anti- CD25 - PE

BD- PharMingen, Deutschland

anti- CD45 - FITC

BD- PharMingen, Deutschland

Magnetobeads

anti- CD25 Microbead

Miltenyi Biotech, Deutschland

anti- CD3 Microbead

Miltenyi Biotech, Deutschland

*ELISPOT-KITS*

INF- $\gamma$  Detection Kit

Mabtech AB, Schweden

IL- 10 Detection Kit

Mabtech AB, Schweden

## 2.2. Zellbiologische Methoden

### 2.2.1. Herstellung einer primären Zellkultur aus ex vivo Synovialgewebe

Patienten mit Rheumatoider Arthritis stellten sich zur elektiven Synovektomie in der Orthopädischen Universitätsklinik Stiftung Friedrichsheim vor. Operativ wurde durch Herrn PD Dr. med. S. Rehart das betroffene Gelenk rekonstruiert oder eine Arthrodesse durchgeführt. Hierbei wurde die entzündliche Synovialmembran entfernt. Die Synovialmembran wurde zum Transport steril in 25 ml Nährmedium (HAM F10) aufbewahrt. Nach der sterilen Entnahme wurde ins Gewebe eine auf 1 mg/dl steril filtrierte Kollagenaselösung injiziert. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten bei Raumtemperatur wurde das Gewebe mittels sterilem Einmalskalpell zerkleinert. Das zerkleinerte Gewebe wurde in die verdünnte Kollagenaselösung (1 mg/dl) suspendiert und 50 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die gewonnene Zellsuspension wurde durch ein 70 µm Nylonsieb filtriert. Die übrigen Gewebesfragmente wurden mechanisch zur Erhöhung der Ausbeute durch ein solches Sieb gemörsert. Das Sieb wurde nach jedem Mörsern mit PBS gespült. Die filtrierte Suspension wurde zweimal mit PBS 10 min lang bei 800 g und Raumtemperatur gewaschen. Das Zellsediment wurde in 20 ml Nährmedium (HAM F10) resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt.

Die Zellkultur wurde im Brutschrank bei 37°C und einem CO<sub>2</sub> von 5% 24 Stunden lang kultiviert.

## 2.2.2. Separation von CD4(+) und CD8(+) PBMCs aus humanem Vollblut

### Prinzip der Methode

Am ersten post operativen Tag wurde dem Patienten 50 ml Vollblut aus einer peripheren Vene entnommen. Jeweils die Hälfte des gewonnenen mit Heparin antikoagulierten Blutes wurde zur Gewinnung von CD4(+) respektiv CD8(+) T-Zellen verwendet. Zur Anreicherung der Fraktionen wurde dem Vollblut ein „Rosette Enrichment“- System (50µl/ml Vollblut) hinzugefügt und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das „Rosette Enrichment“- System der Firma StemCell technologies, USA, ist ein Antikörpergemisch, das unerwünschte mononukleäre Zellen mit Erythrozyten verbindet und damit die Dichte dieser Zellen erhöht.

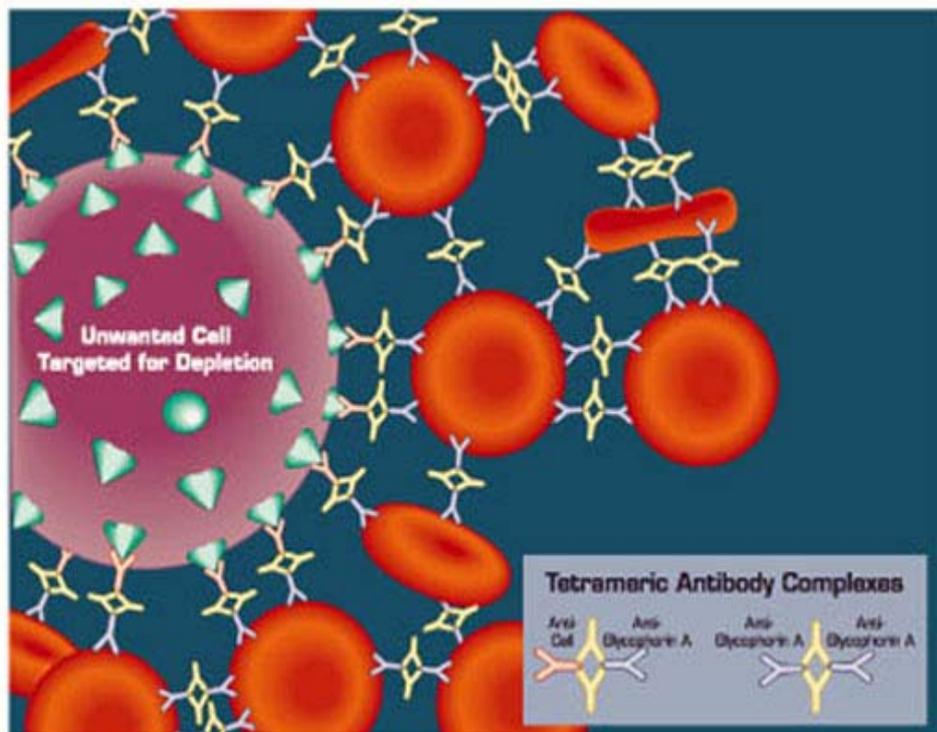


Abbildung 4 : Prinzip des „Rosette Enrichment“- System

Nach der Inkubation wurde das Gemisch mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) mit 2 % fetales Kälber- Serum (FCS) im Verhältnis 1:1 verdünnt. Die

verdünnte Lösung wurde auf 15 ml eines Separationsmediums (Ficoll) geschichtet. Das Probenmaterial wurde 10 Minuten bei 1000 g und Raumtemperatur ohne Bremse zentrifugiert. Mittels des Separationsmediums wurden die Zellen auf Grund ihrer Dichte getrennt. Periphere mononukleäre Zellen sammelten sich als Ring zwischen Medium und Plasma, während unerwünschte Zellen sedimentieren.

Nach der Zentrifugation ergibt sich folgende Schichtung:

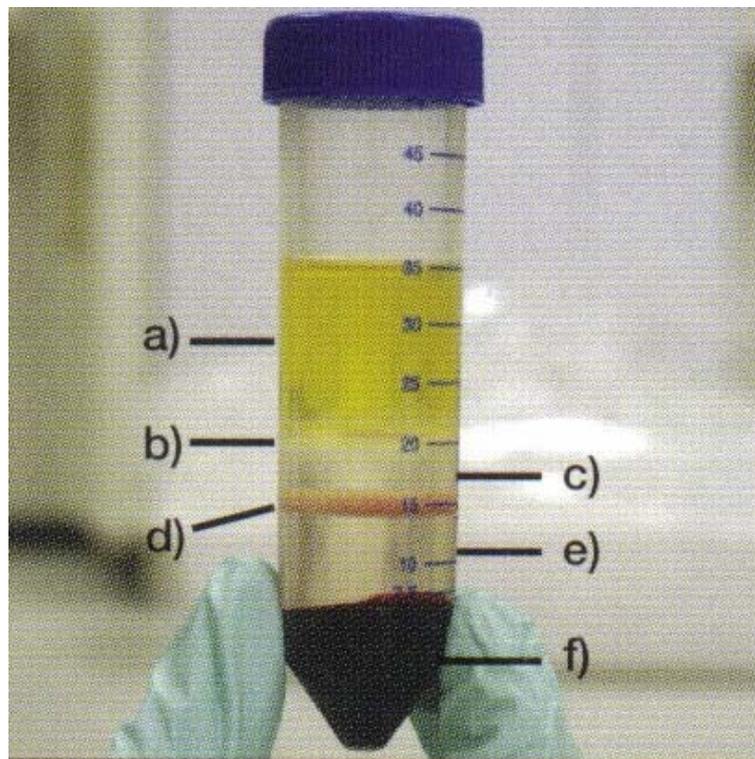


Abbildung 5: Separation von PBMCs aus peripheren Blut

a) Plasma und Thrombozyten; b) angereicherte Zellfraktion (periphere mononukleäre Zellen (PBMC)); c) u. e) Separationsmedium; d) Filter; f) Sediment (beinhaltet Erythrozyten, Granulozyten und unerwünschte mononukleäre Zellen).

Um eine Kontamination der angereicherten PBMCs mit Thrombozyten zu verhindern wurden 5 bis 10 mm Plasma abgehoben und verworfen. Die konzentrierte Zellfraktion wurde mit Hilfe einer Pasteurpipette aufgenommen.

Zur Maximierung der Zellzahl wurden neben dem sichtbaren Ring auch das Plasma und das Separationsmittel mit aufgenommen.

Die Zellsuspension wurde mit 10 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) mit 2 % fetalem Kälber- Serum (FCS) gewaschen (10 Minuten bei 250 g und Raumtemperatur). Nach erneutem Waschen wurde das Zellsediment in 5 ml PBS+2% FCS resuspendiert.

### 2.2.3. Depletion von CD25(+) peripheren mononukleären Blutzellen

#### Prinzip der Methode

Die Eigenschaft von Materialien im starken Magnetfeld magnetischen Charakter zu erwerben bezeichnet man als supramagnetisch. Partikel eines solchen Materials werden mit Polysterol beschichtet, um spezifische Antikörper an dieses binden zu können. Hierdurch können antigenpositive Zellen an die Partikel gebunden werden. Durchlaufen diese eine Säule im magnetischen Feld werden sie temporär gebunden und am Weiterfließen gehindert. Nach Entfernung aus dem Magnetfeld können die antigenpositiven Zellen diluiert werden.

Diese Separationsmethode wird dort eingesetzt, wo die Anwesenheit oder Abwesenheit der Oberflächenmarker eine Zelltrennung erlaubt. Von der Möglichkeit der positiven oder negativen Selektion ist, wenn möglich, die negative Variante zu wählen. Dadurch wird die mögliche Zellaktivierung durch die Interaktion des Partikels bzw. des Antikörpers mit dem Oberflächenmarker ausgeschlossen. Eine positive Selektion ist nur dann sinnvoll, wenn eine bestimmte Zelle mit einem spezifischen Marker separiert werden soll.

#### Durchführung

Nach der Bestimmung der Zellzahl werden die PBMCs bestimmt. Eine adäquate Menge wurde nicht weiterbehandelt und später in den ELISPOT-Assay eingesetzt.

Die zur Depletion benötigten Menge an Zellen wurde mit PBS+0,5 % FCS und 20 mM EDTA (10min bei 800g und 4°C) gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment in 80 µl PBS+0,5%+20 mM EDTA resuspendiert. Zur Zellsuspension werden nun 20 µl CD25 spezifische Magnetobeads (Microbeads, Myltneyi) hinzugefügt, um es dann als Gemisch 12-15 min bei 4-6°C zu inkubieren. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Zellsuspension von nicht gebundenen Antikörpern befreit. Die Suspension

wurde mit der 4-5 fachen Menge PBS+0,5%+20 mM EDTA verdünnt und 10 min mit 300 g bei 4°C zentrifugiert. Das gewonnene Zellsediment wurde in 200 µl Waschlösung resuspendiert.

Die Auftrennung der Zellen erfolgt durch eine automatisierte Variante der oben angeführten Methode. Mit dem autoMACS der Firma Miltenyi werden CD25(+) von CD25(-) getrennt. Die gewonnenen Zellfraktionen werden nach Bestimmung der Oberflächenmarkern und der Zellzahlen in den ELISPOT-Assay eingesetzt.

## 2.2.4. Durchflusszytometrische Charakterisierung PBMC und Synovialzellen

### Prinzip der Methode

Die Durchflußzytometrie dient in der medizinischen Forschung zur quantitativen und qualitativen Charakterisierung von physikalischen und molekularen Eigenschaften von Zellen. Zur Analyse werden Zellen einer Zellsuspension mittels einer Durchflusszelle vereinzelt und in einem laminaren Flüssigkeitsstrom an einen Laserstrahl vorbeigeführt. Diesen Vorgang bezeichnet man als hydrodynamische Fokussierung.

Aufgrund von physikalischen Vorgangs beim Auftreffen einen Laserstrahls (Beugung, Streuung), kann man Zellgröße (forward scatter, FSC) sowie intraplasmatische Einschlusskörperchen (Granula) (side scatter, SSC) bestimmen.

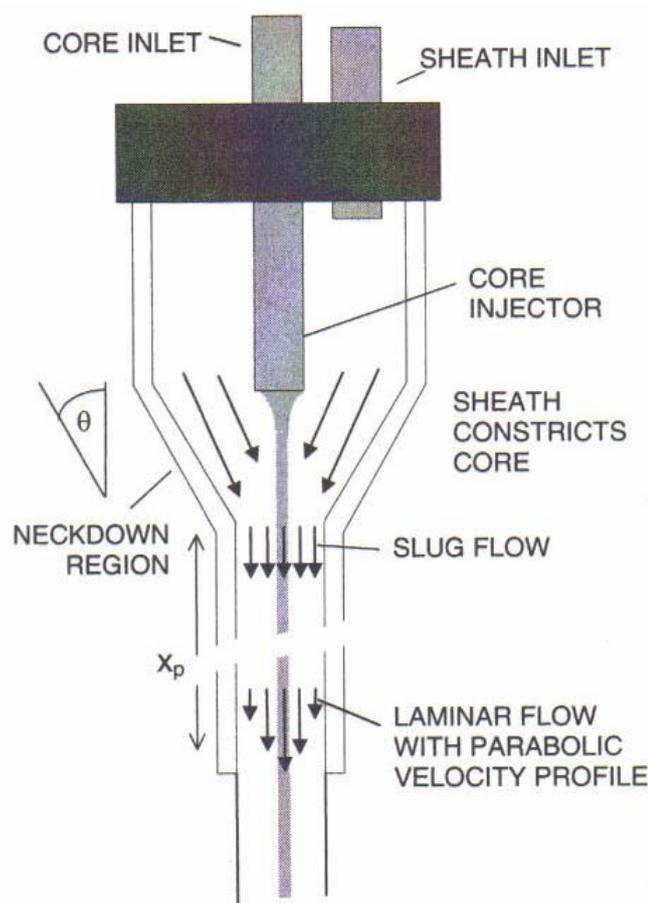


Abbildung 6: Schematische Darstellung einer Durchflusszelle

Neben der Bestimmung der physikalisch- morphologischen Eigenschaften einer Zelle ist es möglich, fluoreszenzmarkierte Zellstrukturen und Proteine mittels Durchflusszytometrie zu bestimmen. Hierfür werden fluoreszenzfarbstoffmarkierte Antikörper eingesetzt, welche an die gewünschte Struktur binden. Durch das monochromatische Licht des Laserstrahls werden die Elektronen im Molekül des Fluoreszenzfarbstoffes angeregt und auf ein höheres Energieniveau gehoben. Angeregte Elektronen gehen danach wieder in ihre energetische Ausgangslage zurück und emittieren die aufgenommene Energie in Form einer Lichtwelle (Photons). Die emittierte Lichtwelle wird über ein komplexes Netzwerk von Spiegeln und Filtern zu dem Photomultiplier geleitet, welche das optische Signal in ein elektrisches umwandeln. Eine gleichzeitige FACS-Messung mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen ist möglich, da die eingesetzten Farbstoffe zwar bei einer gemeinsamen Wellenlänge angeregt werden, aber über unterschiedliches, für den jeweiligen Farbstoff charakteristisches Emissionsspektrum verfügen.

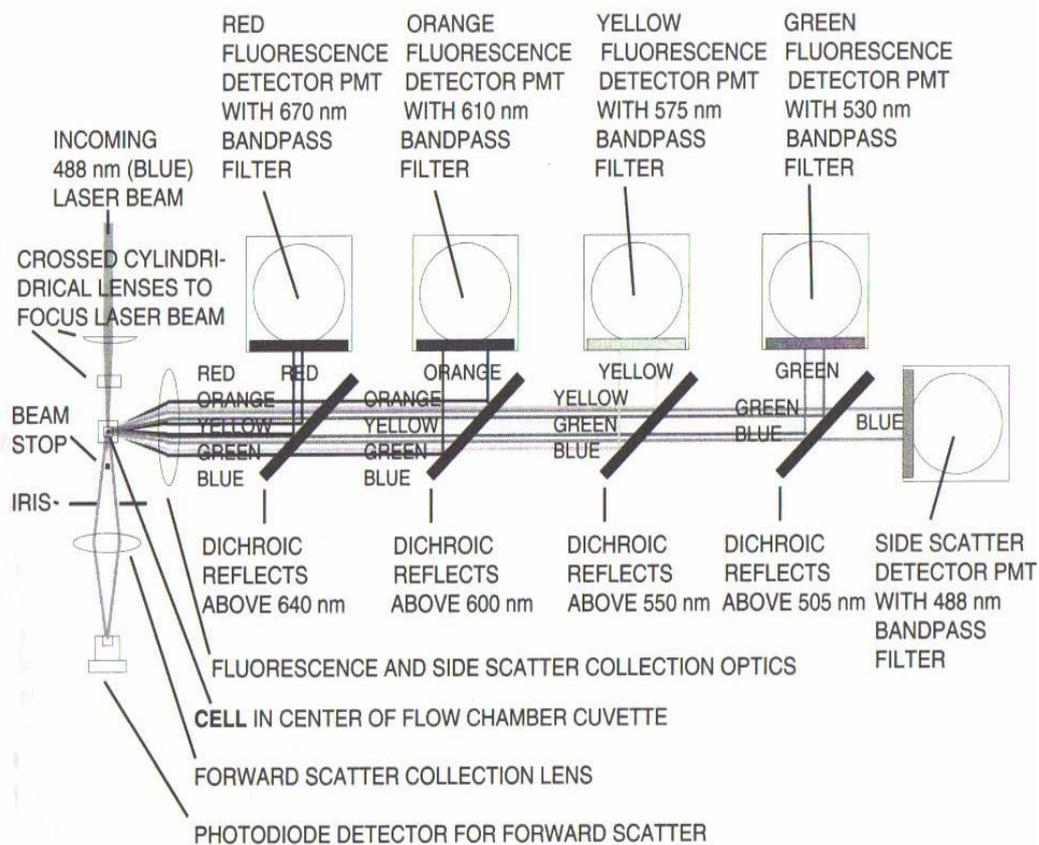


Abbildung 7: Schematischer Aufbau einer optischen Bank

### Durchführung

Nach der Separation der peripheren mononukleären Zellen und der Gewinnung von Synovialzellen aus der Zellkultur erfolgte die durchflusszytometrische Charakterisierung der Zellen. Von jeder Probe wurden 50 µl verwendet. Bestimmt wurden die Oberflächenantigene CD45-FITC, CD25 PE, CD3 ECD, CD8-PC5, CD4-PC7. Von den Antikörpern werden je 10 µL vorgesetzt, bevor die Probe hinzugefügt wurde. Das Gemisch wurde durchmischt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Um ein Ausbleichen des Farbstoffes zu verhindern erfolgte die Inkubation lichtgeschützt.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde zur Zellzahlbestimmung die äquivalente Menge „Beads“ der Probe hinzugefügt. Die Probe wurde mit 500µL phosphatgepufferter Salzlösung verdünnt bevor die Messung begonnen wurde.

### 2.2.5. Bestimmung der INF- $\gamma$ bzw. IL 10 Frequenz mittels ELISPOT – Technik

#### Prinzip der Methode

Bei dem ELISPOT-Assay handelt es sich um eine sehr sensitive Methode zur Bestimmung der Anzahl von zytokinproduzierenden Zellen. Zytokinspezifische Antikörper (so genannte capture-Antibodies) werden auf einer PVDF-Membran gebunden. Die zu untersuchende Zellfraktion inkubiert auf der Membran und die produzierten Zytokine werden an den Antikörpern gebunden. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Zytokine durch einen zweiten Antikörper detektiert (detection-antibody). Dieser Sekundärantikörper ist mit Biotin konjugiert. Streptavidin oder Avidin besitzen eine hohe Affinität zum Biotin und binden somit an den Sekundär-Antikörper. Am Streptavidin ist ein Enzym zur Farbentwicklung gekoppelt. Die Reaktion zwischen dem Enzym und dem Farbstoff entwickelt einen hydrophoben Farbstoff, der sich auf der Membran niederschlägt. Jeder Farbfleck (Spot) repräsentiert eine zytokinproduzierende Zelle. In Verbindung mit der eingesetzten Zellzahl lässt sich die Frequenz dieser Zellen bestimmen.

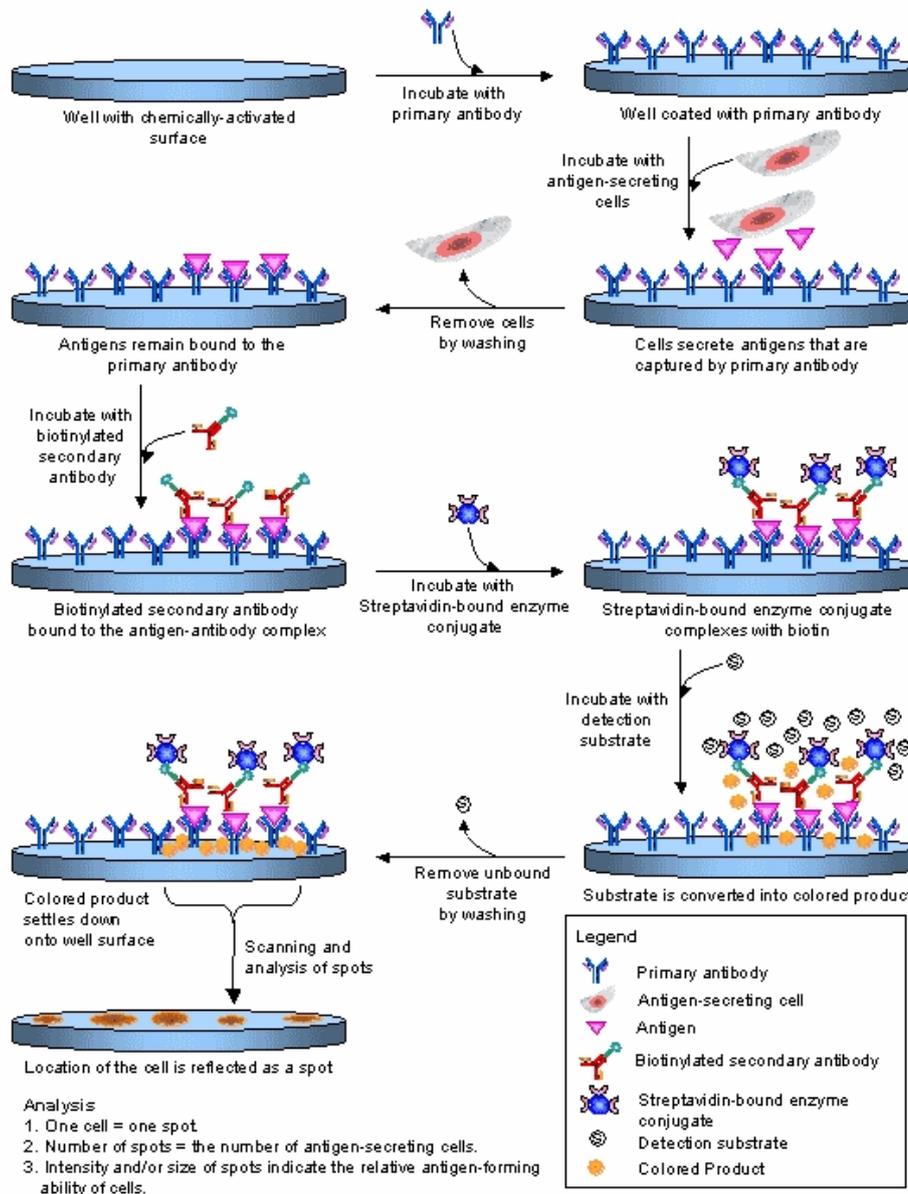


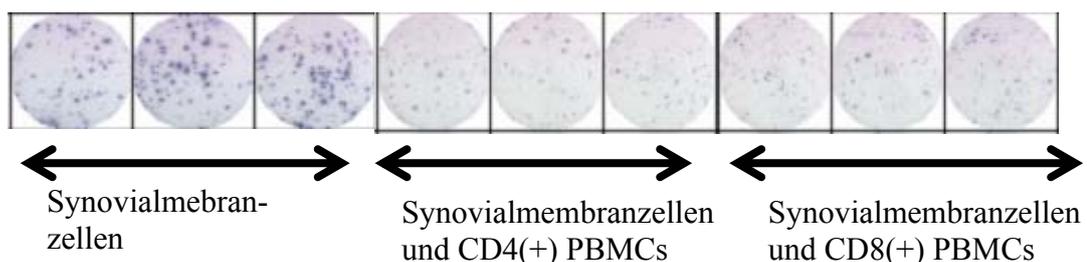
Abbildung 8: Schematische Darstellung des ELISPOT- Assay [59]

### Durchführung

Am ersten Tag eines ELISPOT-Assays wurde die Membran der Mikrotiterplatte mit dem Primär-Antikörper beschichtet. Der konzentrierte Antikörper (1 mg/mL) wurde mit PBS, welches 0,5% FCS enthält, auf eine Endkonzentration von 15 µl/ml verdünnt. Die Lösung wurde nun zu je 100 µl in die 96 Wells der Mikrotiterplatte gegeben. Über Nacht inkubiert die Platte bei 4°C. Am zweiten Tag wurde die Primärantikörperlösung von der Membran dekantiert. Ungebundene Antikörper wurden von der Membran mit

6 x 200 µl PBS gewaschen. Um eine unspezifische Bindung zu Verhindern wurde die beschichtete Membran mit PBS+1% BSA geblockt. Die Inkubationszeit dieses Vorgangs betrug 1 Stunde bei Raumtemperatur. Nach dem Blocken wurde die Membran erneut mit 6 x 200 µl PBS gewaschen. Die gewonnenen Zellsuspensionen wurden auf die gewünschte Endkonzentration von 10.000/100 µl verdünnt und in die Wells gegeben. Die Zellen können nun mit verschiedenen Chemikalien oder Antikörpern zur Zytokinproduktion angeregt werden. Die Inkubationszeit beträgt 36 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank. Während dieser Periode sollte die Platte nicht bewegt werden, um ein Verlaufen der Spots zu verhindern. Nach der Inkubationszeit werden die Zellen durch Waschen aus dem Wells entfernt. Auch hier werden die Well 6 x mit 200 µl PBS gewaschen. Der konzentrierte Sekundär-Antikörper wurde mit PBS+0,5 FCS auf eine Endkonzentration verdünnt. Die Antikörperlösung wurde zu je 100 µl pro Well auf die Platte gegeben. Die Inkubationszeit für diesen Schritt beträgt 2 Stunden. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Antikörperlösung von der Platte gewaschen. Streptavidin, welches mit dem Enzym alkalische Phosphatase konjugiert ist, wurde verdünnt und damit die Platte zu je 100 µl pro Well beschichtet. Nach einer Stunde Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde die Streptavidinlösung entfernt. Der Farbstoff wurde durch ein 0,45 µm Filter filtriert. Das Volumen pro Well beträgt 100 µl. Der Farbstoff inkubiert bis zum Erscheinen der Spots maximal aber 15 min. Zum Beenden der Entwicklung wurde der Farbstoff mit Aqua dest. (3 x 200 µl) gewaschen. Die fertige Platte trocknet über Nacht. Die Auswertung der Platte erfolgt in einem ELISPOT-Reader, der nach Subtraktion des Hintergrundes die Anzahl der entwickelten „Spots“ bestimmt.

### Beispiel der Auswertung



### 2.2.6 Statistische Methoden

Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS 11.0 für Windows und GraphPadPrism 4.0. Die gewonnenen Daten wurden durch den Mittelwert und die Standardabweichung beschrieben. Die gaphische Darstellung erfolgte für univariate Daten durch Balkendiagramme und Box-Plots, für bivariate Analysen durch Streudiagramme.

Die statistische Auswertung zur Signifikanztestung wurde mittels Mann-Wilcoxon - White U- Test für unverbundene Stichproben und Wilcoxon- White Test für verbunde Stichproben durchgeführt.

Zur Analyse von bivariaten Datenpaaren wurde die Korellation nach Spearmann mit zweiseitiger Testung verwendet und gegebenenfalls eine Regressionsanalyse nach Pearson erhoben.

Das Signifikanzniveau der Tests lag bei  $\alpha < 0,05$ .

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Patientenkollektiv

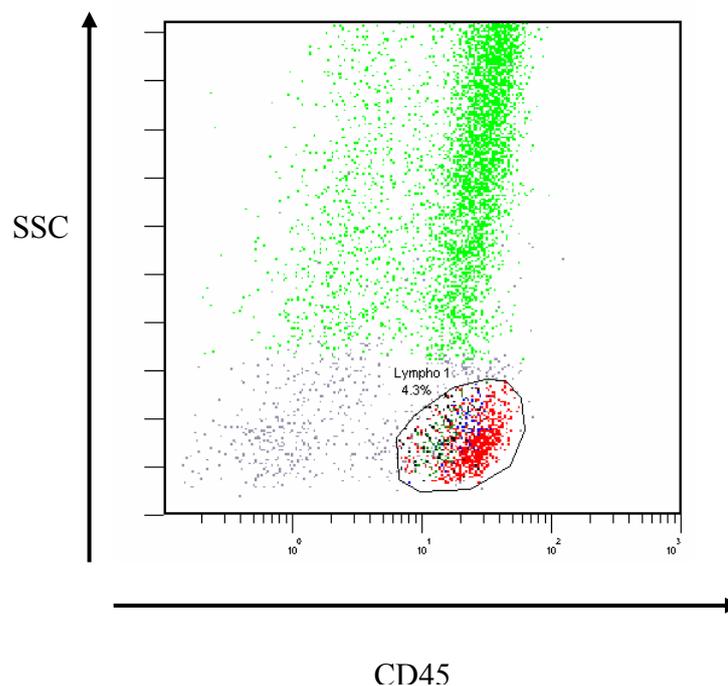
Die in dieser Dissertation vorgestellten Patienten sind Teil einer größeren Studie, die bereits von Herrn Dr. med. Behrends im Journal *Ann Rheum Dis* 2007 veröffentlicht wurde. Für diese Studie lag eine Genehmigung der Ethikkommission des Klinikums der Johann- Wolfgang- Goethe Universität Frankfurt am Main vor. Die hier vorgestellten Patienten willigten schriftlich zur Teilnahme ein. Als Vergleichskollektiv dienten fünf Synovialmembrankulturen von Patienten mit Osteoarthritis.

		Absolut [Mittelwert+ SD]	Frequenz
<b>Anzahl der Patienten</b>		19	
<b><u>Klinische Daten</u></b>			
	männlich	3	3/19
	weiblich	16	16/19
Alter [Median in Jahren]		52,5	
Erkrankungsdauer [Jahre]		16 ± 9,8	
Rheumafaktor			
	negativ	3	3/19
	positiv	14	14/19
DAS28(BSG)		3,45 ± 1,18	
<b><u>Therapie</u></b>			
DMARDs			
	Konventionell	15	15/19
	Anti- TNF- $\alpha$ Therapie	3	3/19
	Kombination MTX und Anti- TNF- $\alpha$ Therapie	1	1/19
NSAIDs			
	keine Therapie	7	7/19
	nicht-selektive NSAIDs	7	7/19
	COX2 -Inhibitoren	5	5/19
Glukokortikoidäquivalent [mg]		30,33 ± 25,35	
Vitamin D Prophylaxe		8	8/19

### 3.2. Durchflusszytometrische Zusammensetzung und Charakterisierung der Synovialmembran von Patienten mit Rheumatoider Arthritis

Die inflammatorisch veränderte Synovialmembran der Rheumatoiden Arthritis besteht aus einem Konglomerat ortständiger Synovialzellen und infiltrierter Immunzellen. In diesem Konglomerat beeinflussen sich die Zellen wechselseitig.

Lymphozyten sind an diesem Prozess maßgeblich beteiligt. Zur Quantifizierung und Qualifizierung dieser Zellen wurden durchflusszytometrische Analysen vorgenommen. In Abbildung 9 erkennt man einen deutlichen Anteil von CD45(+) Zellen innerhalb der Synovialzellkultur.

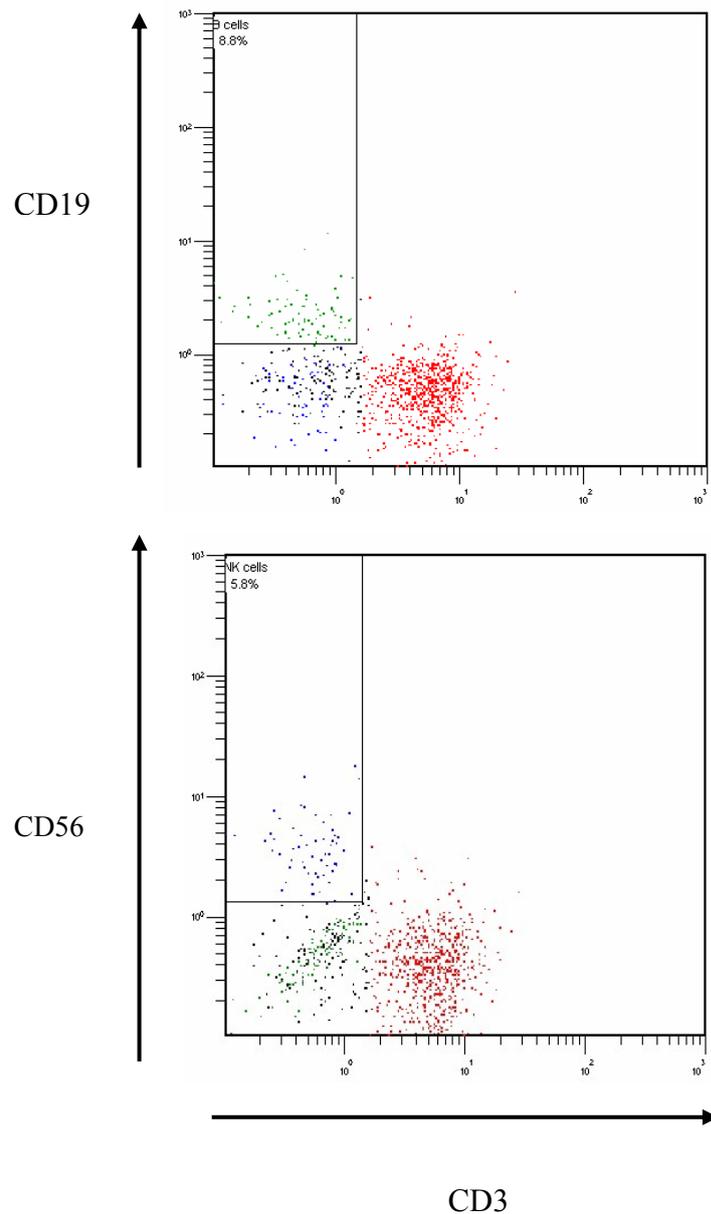


**Abbildung 9: Durchflusszytometrische Messung der Rheumatoiden Synovialmembranzellen**

Zur Charakterisierung der CD45(+)Subpopulationen wurden populationspezifische Oberflächenantigene mit spezifischen Antikörpern

markiert. Für T- Lymphozyten wurden anti-CD3 Ab, für B-Zellen anti-CD19 Ab und für NK – Zellen anti-CD16 Ab und anti-CD56 Ab verwendet.

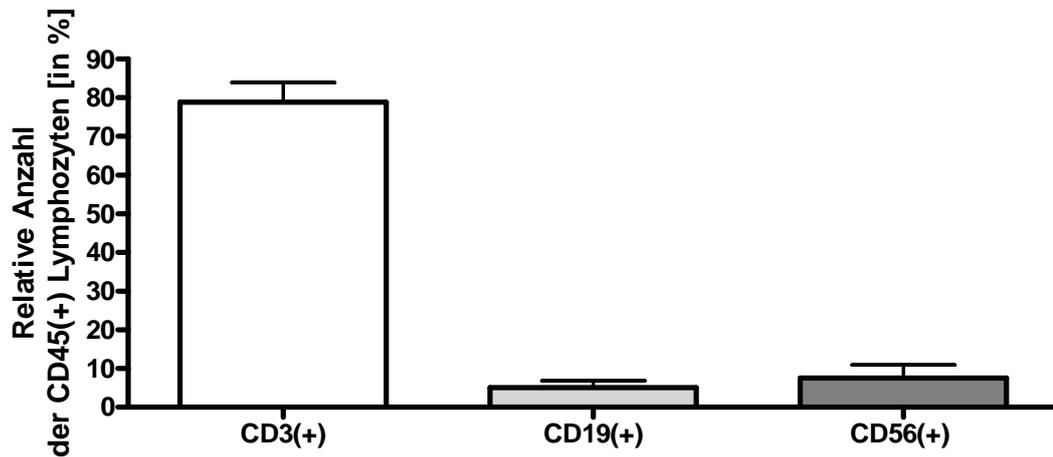
Abbildung 10 illustriert einen repräsentativen Auszug einer durchflusszytometrischen Messung.



**Abbildung 10: Durchflusszytometrische Charakterisierung der CD45(+) Zellen**

Durchflusszytometrische Messung einer Synovialmembranzellkultur eines Patienten mit Rheumatoider Arthritis. An der Abbildung erkennt man eine deutliche Anreicherung von CD3(+) Zellen. In der Kultur sind dennoch CD19 und CD56 positive Zellen nachweisbar.

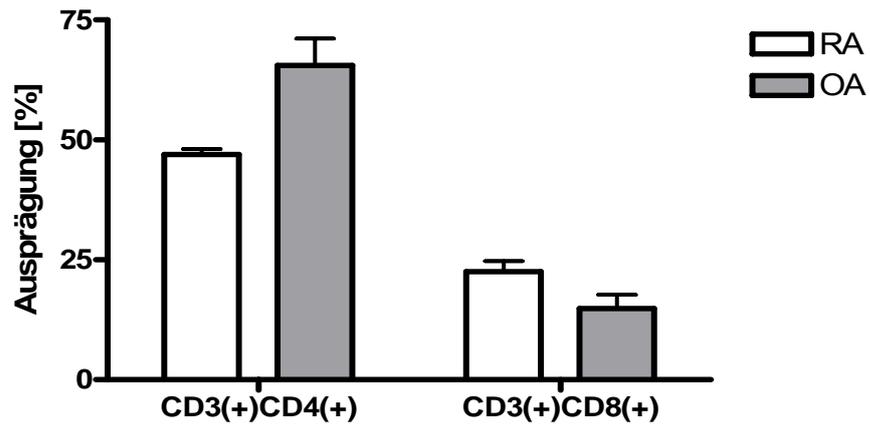
CD3(+) T-Zellen stellen den Hauptanteil der CD45(+) Zellen dar. B-Zellen und NK-Zellen sind in den untersuchten Synovialmembranen nachweisbar, treten aber nur in geringen Mengen in der Synovialmembran auf (Abbildung 11).



**Abbildung 11: Durchflusszytometrische Charakterisierung der lymphatischen Synovialmembranzellen bei Rheumatoider Arthritis.** Den größten prozentualen Anteil im Synovialmembran an lymphatischen Zellen bilden die CD3(+) ( $78,79 \pm 14,36\%$ , Spannweite: 55,22 - 98,99%) Zellen. Es findet sich nur ein geringer Anteil an CD19(+)-Zellen ( $5,073 \pm 5,098\%$ , Spannweite: 0,0900 - 13,13 %) und NK-Zellen ( $7,535 \pm 9,556\%$ ; Spannweite: 0,1800 - 29,85%).

Effektorzellen der CD3(+) Zellen sind CD4(+) T-Helferzellen (Th1 /Th2) und CD8(+) zytotoxische T-Zellen (CTL). Abbildung 12 zeigt eine durchflusszytometrische Analyse der Synovialmembran von an Rheumatoider Arthritis und Osteoarthrose erkrankter Patienten.

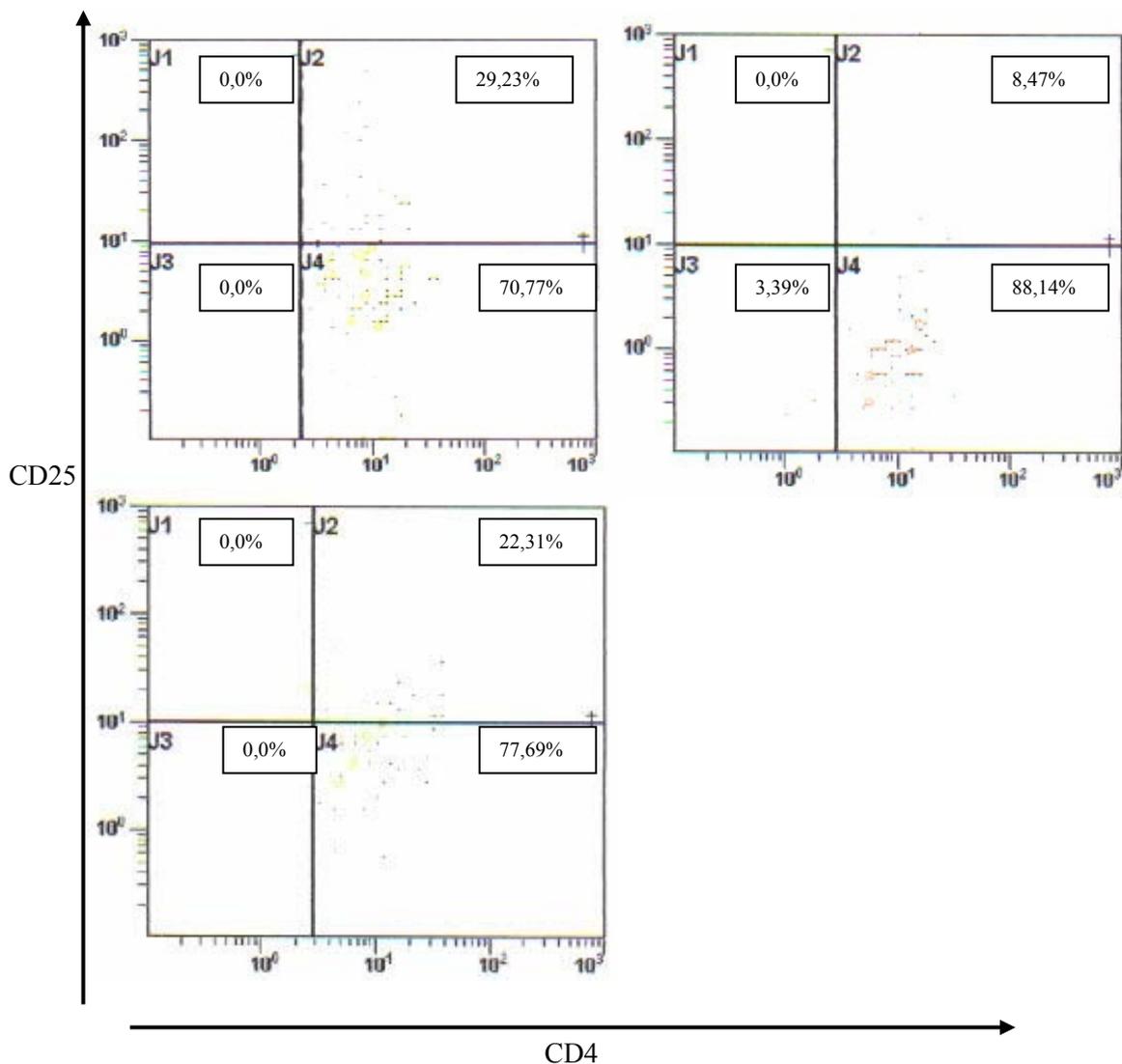
CD4(+) T-Zellen sind in beiden Synovialmembranzellkulturen gegenüber CD8(+) vermehrt vertreten. Das Verhältnis CD4/CD8 der beiden Krankheitsentitäten zeigt für die Rheumatoide Arthritis mit  $1,91 \pm 0,53$  einen höheren Anteil von CD8(+) Zellen gegenüber der Osteoarthrose mit  $4,5 \pm 0,69$  ( $p = 0,13$ )



**Abbildung 12: Durchflusszytometrische Charakterisierung der lymphatischen Synovialmembranzellen bei Rheumatoider Arthritis.** Dargestellt ist die Lymphozytenkonzentration der RA für CD4(+):  $45,85 \pm 3,2$  %, CD8(+):  $25,62 \pm 6,9$  und für die OA CD4(+):  $65,55\% \pm 7,84$ , CD8(+):  $14,85\% \pm 4,03$ .

### 3.3. Durchflusszytometrischer Nachweis von CD4(+)CD25(+) T-Zellen in der Synovialmembran

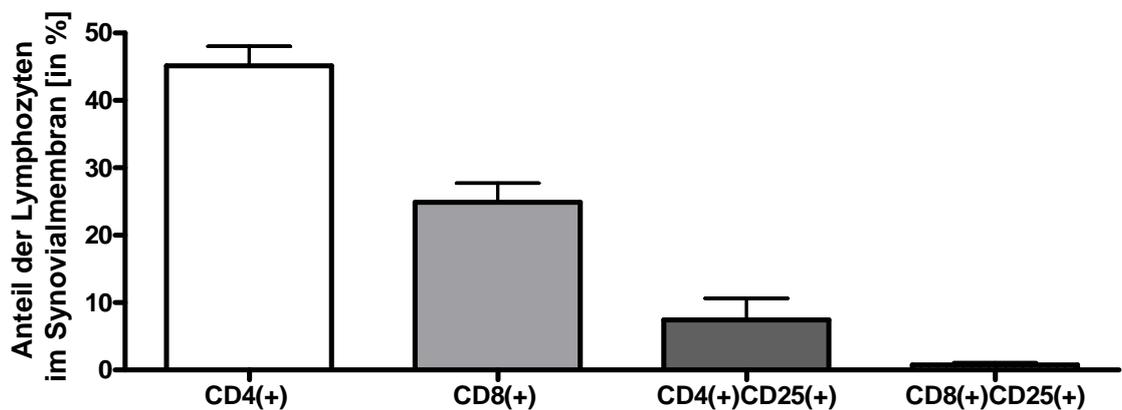
CD4(+)CD25(+) Treg wurden bei der Rheumatoiden Arthritis im Blut und in der Synovialflüssigkeit nachgewiesen. Abbildung 13 zeigt einen typischen durchflusszytometrischen Nachweis der CD4(+)CD25(+) Treg (n =4) in Synovialmembrankulturen.



**Abbildung 13: Repräsentativer durchflusszytometrischer Nachweis von CD4(+)CD25(+) T-Zellen in der Synovialmembran bei vier Patienten (n=4) mit Rheumatoiden Arthritis.**

Die CD4(+)CD25(+) Treg Proportion beträgt  $7,42 \pm 6,41$  % aller CD3(+) T-Zellen im synovialen Gewebe. Daneben findet sich auch ein geringer Anteil von CD8(+)CD25(+) Zellen, welchen ebenfalls eine regulatorische Funktion zugeschrieben wird ( $0,78 \pm 0,69\%$ ).

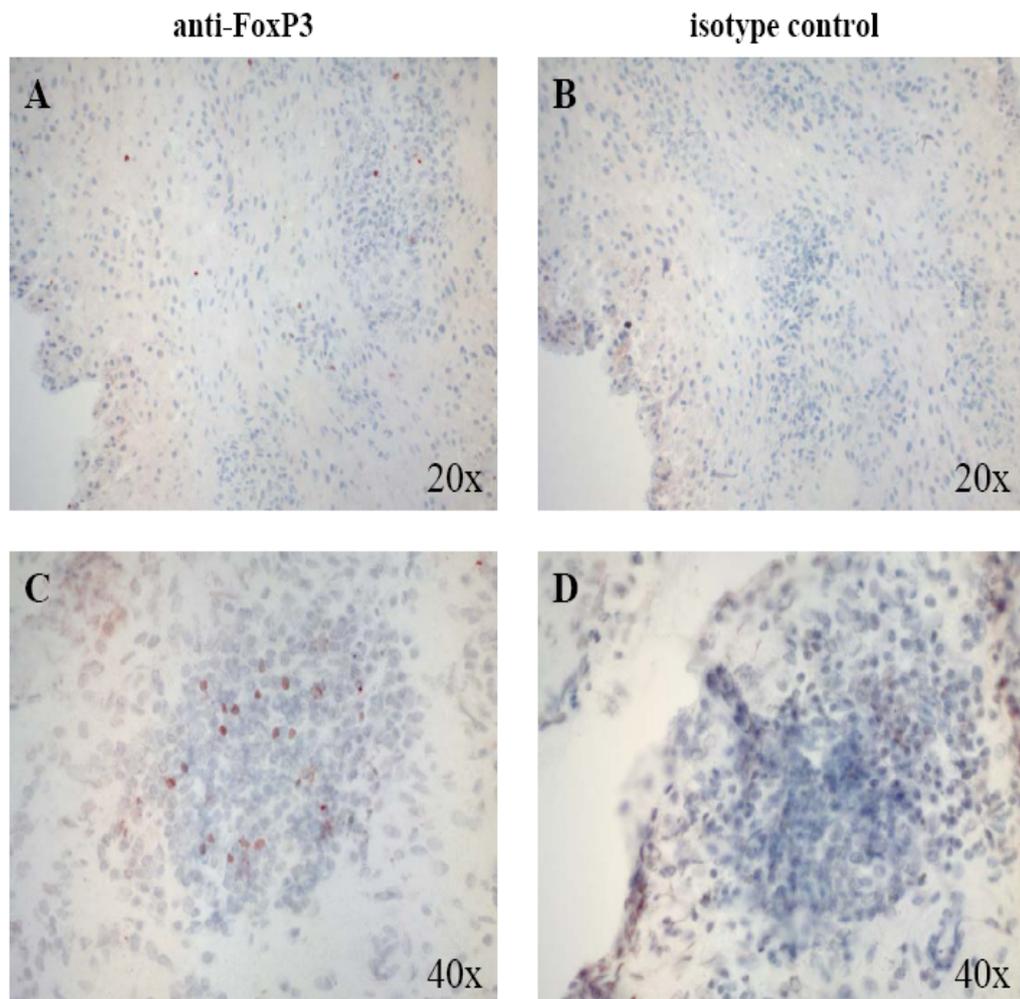
Im Vergleich dazu beträgt der CD4(+)CD25(+) Treg Anteil in der Synovialflüssigkeit  $24 \pm 2$  % und im Blut  $17 \pm 1\%$  nach van Amselfort [60]



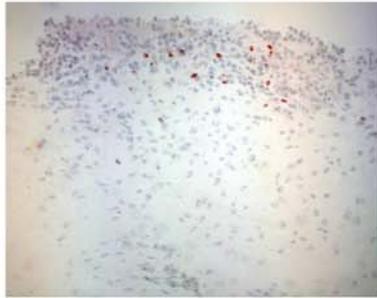
**Abbildung 14: Nachweis von regulatorischen Subpopulationen der Lymphozyten im Synovialmembran.** In der primären Synovialzellkultur ist es möglich T- Lymphozyten, die aufgrund ihrer Oberflächenstruktur regulatorischen T-Zellen entsprechen, nachzuweisen. So konnten neben den CD4(+) T -Helfer Zellen ( $45,15 \pm 5,793$  %) und CD8(+) CTL ( $24,90 \pm 5,682$  %) auch Zellen, die phänotypisch einer regulatorischen Zelle entsprechen können.

### 3.4. Immunhistologischer Nachweis von CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) T-Zellen

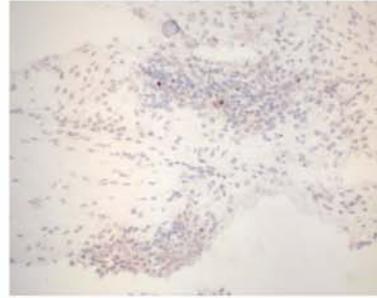
Abbildung 15 und 16. veranschaulichen die Verteilung von CD4(+)CD25(+) Treg innerhalb des Synoviums. CD4(+)CD25(+) Treg finden sich nur in geringen Mengen im synovialen Gewebe. Auffällig ist eine Akkumulation der Zellen in sekundären Lymphfollikeln und an der Synovialmembrangrenze. Die immunhistochemischen Färbungen wurden dankenswerter Weise von der Arbeitsgruppe um Herrn Prof. Dr. med. Gay angefertigt und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.



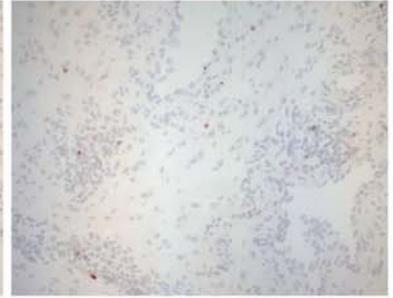
**Abbildung 15: Immunhistochemische Färbung FOXP3 – (+) T- Zellen im Synovialgewebe von Patienten mit Rheumatoider Arthritis.** Anti - FOXP3 Immunhistologische Färbung und Isotypenkontrolle



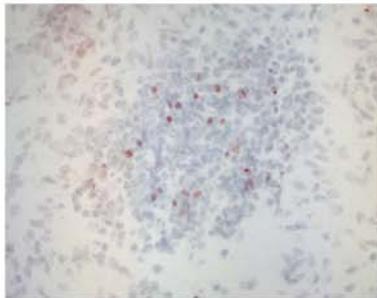
**Sample 3.** FoxP3+ at the border  
(no follicle)



**Sample 5.** FoxP3+ at the border  
and in the follicle



**Sample 9.** FoxP3+ sparsely  
distributed  
(no border, no follicle)



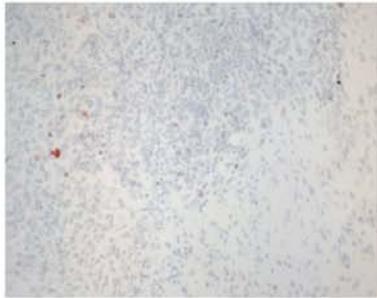
**Sample 12.** FoxP3+ in follicle  
(no border)



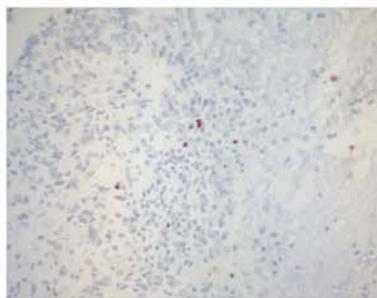
**Sample 13.** FoxP3+ sparsely  
distributed  
(no border, no follicle)



**Sample 17.** FoxP3+ sparsely  
distributed  
(no border, no follicle)



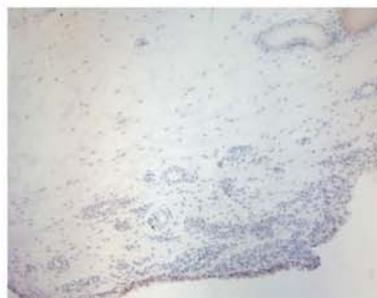
**Sample 20.** FoxP3+ sparsely  
distributed  
(no border, no follicle)



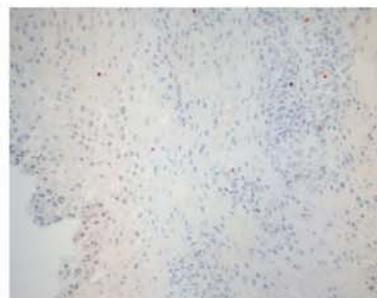
**Sample 24.** FoxP3+ sparsely  
distributed; few at the border  
(no follicle)



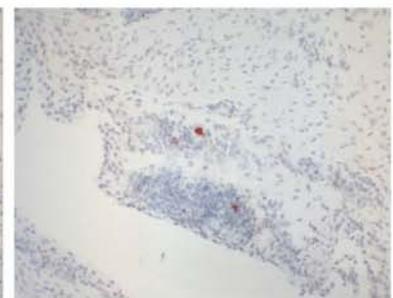
**Sample 26.** FoxP3+ at the border



**Sample 31.** FoxP3+ at the border



**Sample 35.** FoxP3+ sparsely  
distributed; few at the border  
(no follicle)



**Sample 39.** FoxP3+ in follicle; not  
at the border

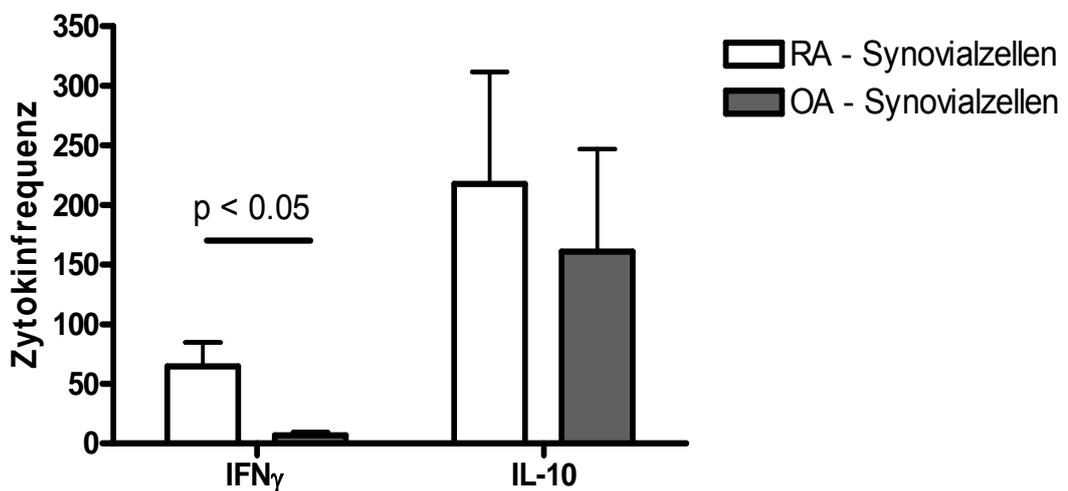
**Abbildung 16: Immunhistologische Färbungen von FOXP3(+) Zellen und Ihrer unterschiedliche Verteilung im Synovialmembran.** Auffällig ist eine erhöhte Akkumulation von FOXP3(+)- Zellen in sekundären Lymphfollikeln und an der Synovialmembrangrenze zum Gelenkbinnenraum.

### 3.5. Funktionelle Charakterisierung von Synovialzellen der Rheumatoiden Arthritis

Innerhalb der Synovialmembran kommunizieren Zellen unter anderem mittels löslicher Zytokine. Der Nachweis von T-zellspezifischen Zytokinen, insbesondere IFN- $\gamma$ , war unter unstimulierten Konditionen auf Proteinebene nicht zu erbringen. Abbildung 17 illustriert die IFN- $\gamma$  und Interleukin- 10 (IL-10) Produktion von  $10^4$  Zellen /  $\mu$ l im ELISPOT.

Rheumatoide Arthritis- Synovialzellen zeigen unter basalen Bedingungen eine IFN- $\gamma$  Produktion von  $64,60 \pm 72,50$ . Im Kontrast dazu produzieren Osteoarthrose- Synovialzellen geringere Mengen IFN- $\gamma$   $6,80 \pm 5,79$ .

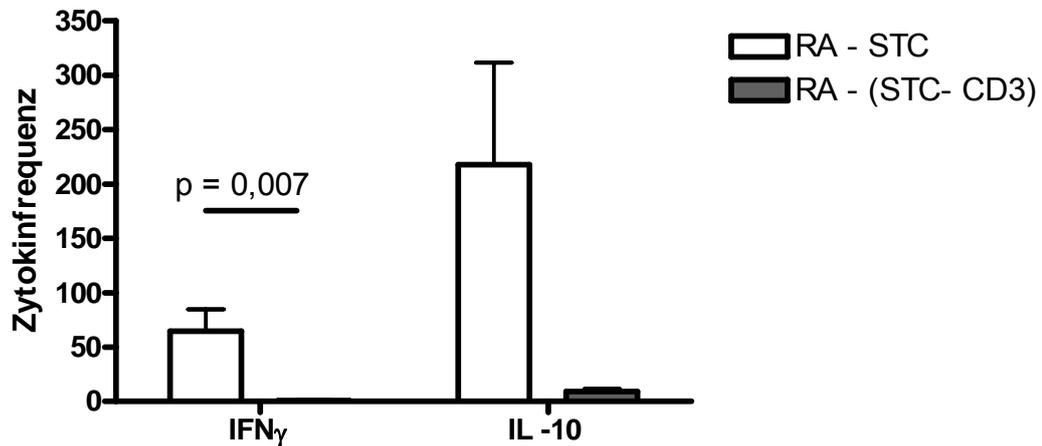
Bei beiden Krankheitsentitäten ist neben der Produktion von immunstimulatorischen Zytokinen auch die Detektion von antiinflammatorischen IL-10 möglich. Synovialzellen der Rheumatoiden Arthritis produzieren vergleichbare Mengen IL-10 wie Osteoarthrose-Synovialzellen ( $217,75 \pm 210,11$  vs.  $160,87 \pm 172,01$ ).



**Abbildung 17: Autonome Zytokinproduktion von Rheumatoiden Arthritis- Synovialzellen (STC) im Vergleich zu Osteoarthrose- Synovialzellen (Synovialzellen OA).** Dargestellt ist die Zytokinfrequenz für IL – 10 (n = 5 Patienten) und IFN -  $\gamma$  (n=12)

Um die funktionelle Abhängigkeit der Zytokinproduktion von CD3(+) T-Zellen zu zeigen, wurde aus den Synovialmembranzellkulturen CD3(+) depletiert. CD3(+) freie Synovialzellen zeigen eine geringere IFN- $\gamma$  Produktion

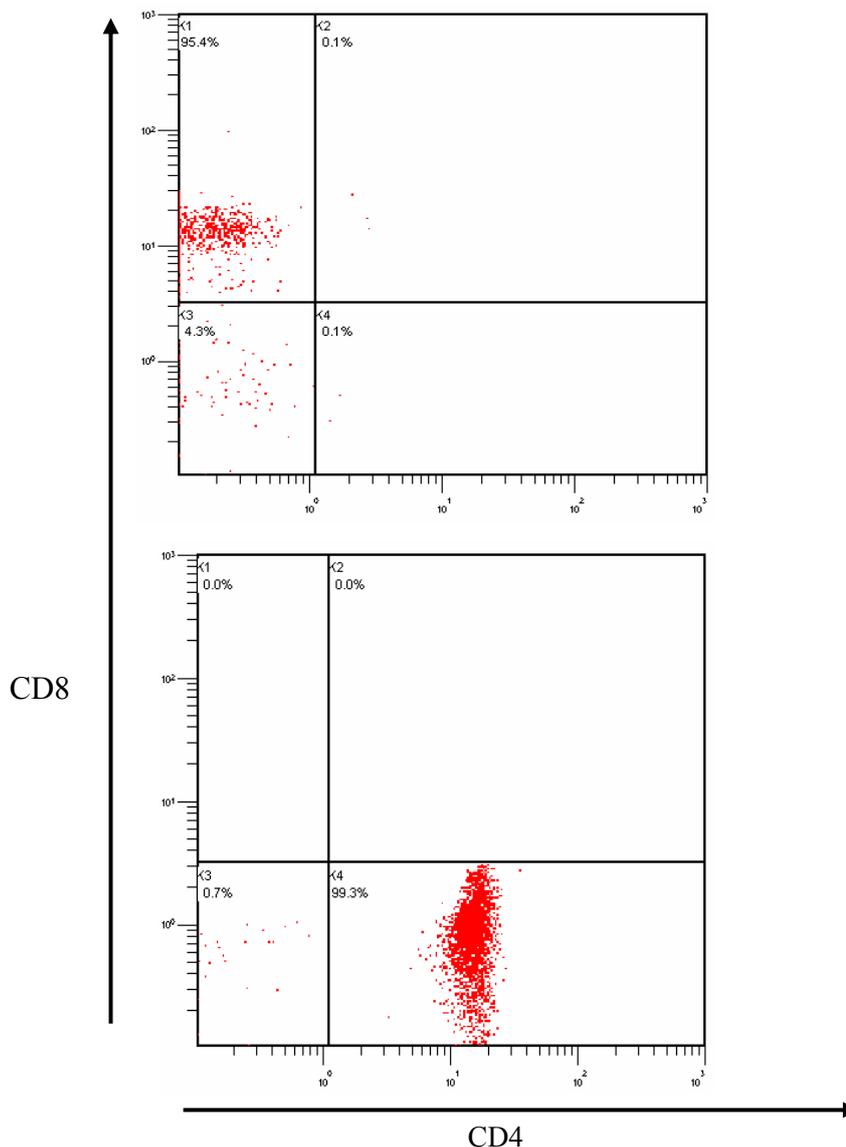
gegenüber CD3(+) haltigen Synovialzellen ( $64,60 \pm 72,50$  vs.  $0,66 \pm 0,94$ ). Interessanterweise produzieren CD3(-) Synovialzellkulturen, im gemessenen Zeitraum, auch deutlich geringere Mengen IL-10 im Vergleich zu CD3(+) haltigen ( $217,75 \pm 210,11$  vs.  $9,25 \pm 3,18$ )



**Abbildung 18: Vergleich der Zytokinproduktion zwischen einer Synovialmembranzellkultur (STC) und einer CD3 depletierten Synovialmembranzellkultur (STC- CD3).** STC – Zellkulturen (n=12) besitzen eine IFN- $\gamma$  Frequenz von  $64,60 \pm 72,50$ . Depletierte Kulturen (n=3) besitzen eine geringe IFN- $\gamma$  Frequenz  $0,66 \pm 0,94$ . Im Vergleich dazu produzieren depletierte Synovialmembranzellkultur (n=2) geringe Menge IL-10 im Vergleich zu CD3(+) haltigen Synovialzellen.

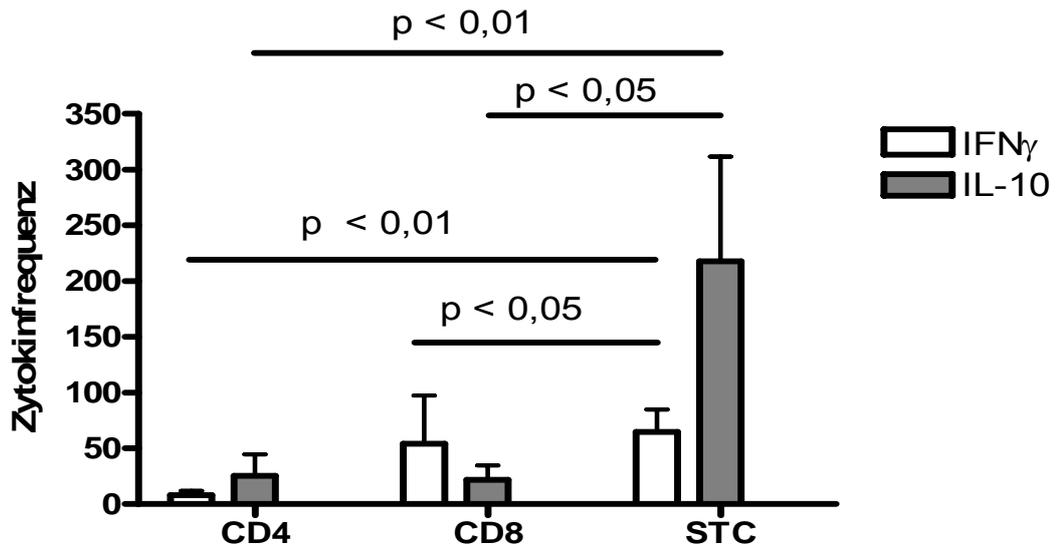
### 3.6. Effekt peripherer naiver T Zellen auf zytokinproduzierende Synovialmembranzellkulturen

Synovialmembranzellkulturen der Rheumatoiden Arthritis produzieren unter basalen Konditionen IFN- $\gamma$  und IL-10. Um den Einfluss dieses Milieus auf periphere naive T-Zellen zu zeigen, wurden beide Zellarten im Verhältnis 1:1 im ELISPOT co-kultiviert. Periphere T-Zellen wurden mittels „Rosette technique“ aus peripherem Vollblut gewonnen. Abbildung 19 veranschaulicht eine repräsentative durchflusszytometrische Messung einer solchen Extrahierung. Für beide T-Zellsubtypen, CD4(+) und CD8(+), konnte ein hoher Reinheitsgrad von >95 % erzielt werden.



**Abbildung 19: Aufgereinigte periphere T –Zellen mittels „Rosetten –Enrichment- System“**

Funktionelle Analysen solcher gewonnenen unstimulierten T- Zellfraktionen zeigen eine geringe Zytokinproduktionsaktivität im Vergleich zu Synovialmembranzellen (Abbildung 20). Eine Aktivierung der Zellen durch die Extrahierung konnte damit nicht nachgewiesen werden.

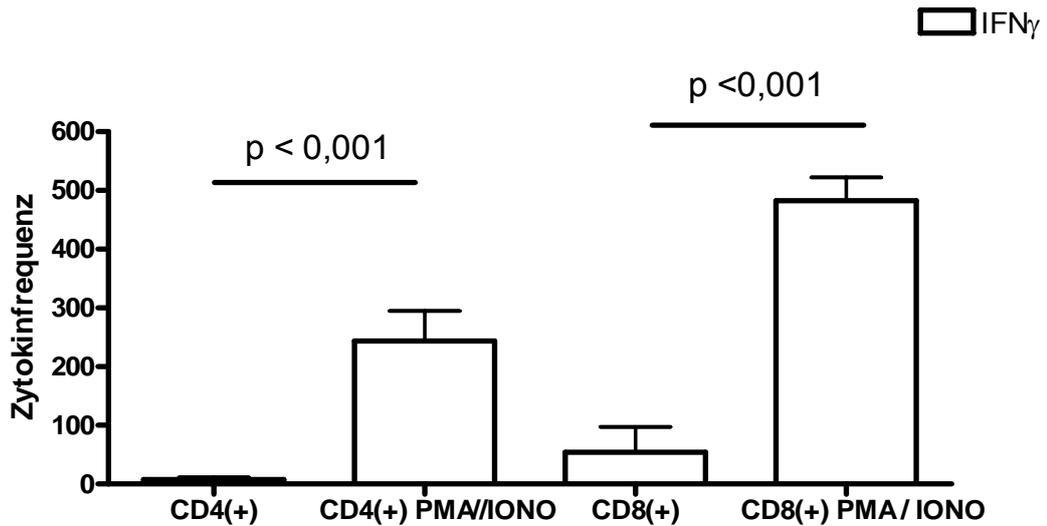


**Abbildung 20: Autonome Zytokinproduktion zwischen unstimulierten peripheren mononukleären Zellen CD4(+) und CD8(+) und der Synovialmembranzellkultur.**

Für CD4(+) Lymphozyten ermittelte Werte: IFN- $\gamma$  (n= 13):  $7,75 \pm 12,16$  und IL- 10 (n=5):  $25,10 \pm 43,12$ . CD8(+) Kulturen zeigten für IFN- $\gamma$  (n=13) eine Produktion von  $54,11 \pm 156,10$  und für IL- 10 (n=3)  $21,66 \pm 22,27$

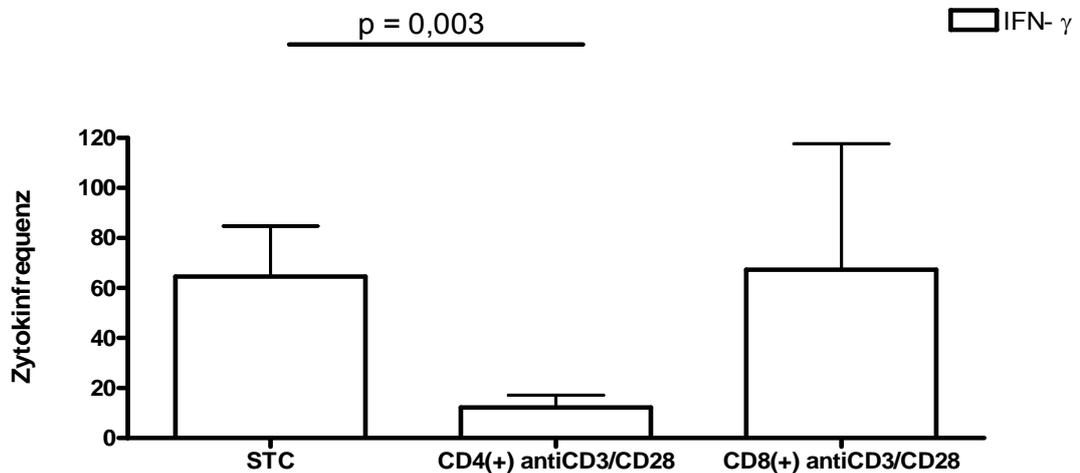
Zur Überprüfung der Funktionalität der peripheren T-Zellen wurden diese einerseits unspezifisch mit PMA (PKC Aktiator) / IONO ( $\text{Ca}^{2+}$  Inophore) und andererseits spezifisch mit anti-CD3 Ab und anti-CD28 Ab stimuliert.

Abbildung 21 verdeutlicht einen Anstieg der IFN- $\gamma$  Produktion unter PMA/IONO Stimulation im Vergleich zur unstimulierten Fraktion. Eine Steigerung der IL-10 Produktion konnte unter dieser Stimulation nicht gezeigt werden.



**Abbildung 21: Aktivierung peripherer Lymphozyten durch PMA / IONO.** IFN-  $\gamma$  Produktion von peripheren CD4(+) Lymphozyten (n= 12) 243,73  $\pm$  76,94 und CD8(+) 482,98  $\pm$  141,61 im Vergleich zur basalen Produktion.

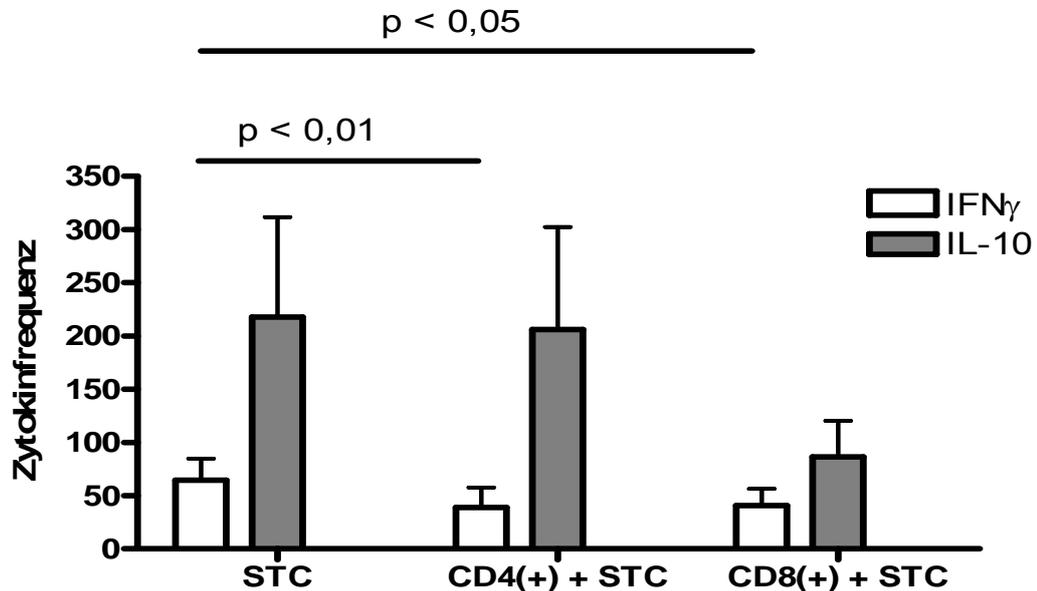
Eine periphere Stimulation mit anti-CD3 Ab und anti-CD28 Ab bewirkt nur eine marginale Steigerung der IFN- $\gamma$  Produktion der peripheren T-Zellen, welche die unstimulierte IFN- $\gamma$  Produktion der Synovialmembranzellen nicht übersteigt (Abbildung 22).



**Abbildung 22: Aktivierung periphere CD4(+) und CD8(+) Lymphozyten mit anti- CD3 Ab und anti- CD28 Ab.** IFN- $\gamma$  Produktion von aktivierten CD4(+) beträgt 12,24  $\pm$  17,78 und CD8(+) 67,37  $\pm$  181,28 im Vergleich zur basalen Produktion der Synovialmembranzellen 64,60  $\pm$  72,50.

Co-Kulturen beider peripheren T-Zellsubtypen mit Rheumatoider Arthritis Synovialmembranzellen zeigen interessanterweise eine geringere IFN- $\gamma$  Produktion im Vergleich zur Synovialzellmonokultur (STC). Am

ausgeprägtesten ist dieses Effekt in der CD4(+) STC Co-Kultur. Dieser suppressive Effekt scheint nicht auf eine Steigerung der IL-10 Produktion zu beruhen.



**Abbildung 23: Co-Kultur der Synovialen Membranzellen von Patienten mit Rheumatoider Arthritis mit autologen peripheren monokleären Zellen CD4(+) und CD8(+).**

CD4(+) und STC produzieren  $38,79 \pm 65,51$  IFN- $\gamma$  und  $206,10 \pm 215,21$  IL-10, während CD8(+) in Co-Kultur  $40,73 \pm 56,51$  IFN- $\gamma$  und  $86,33 \pm 59,08$  produzieren. Im Vergleich zur Monokultur STC (IFN- $\gamma$ :  $64,60 \pm 72,50$ ; IL-10:  $217,75 \pm 210,11$ )

CD8(+) T-Zellen in Co-Kultur mit Synovialmembranzellen zeigen ein ähnliches Phänomen, wie CD4(+) + STC Co-Kulturen. Daneben führt die CD8(+) Co-Kultivierung zur Reduktion der Interleukin-10 Produktion.

Um den suppressiven Effekt der Lymphozyten auf Synovialmembranzellen zu differenzieren, wurden regulatorische Subgruppen von CD4 und CD8 mit Synovialmembranzellen co-kultiviert.

Abbildung 24a/b illustriert den Effekt der CD4(+) Subgruppen auf die IFN- $\gamma$  Produktion der Synovialmembranzellen. CD4(+)CD25(+) Treg verfügen über die größte Kapazität Synovialzellen in der IFN- $\gamma$  Produktion einzuschränken (für  $n = 3$ ,  $3,50 \pm 4,33$ ,  $p = 0,043$ ), ohne die IL-10 Produktion signifikant zu erhöhen ( $n = 3$ ;  $279,00 \pm 154,25$ ,  $p = 0,786$ ). CD4(+)CD25(-) T-Zellen

besitzen immer noch einen regulatorischen Effekt auf die Synovialzellen. Die IFN- $\gamma$  Produktion beträgt (n=6)  $33,91 \pm 49,05$  (p = 0,084) und die IL-10 Produktion  $223,40 \pm 216,25$  (p = 1,00).

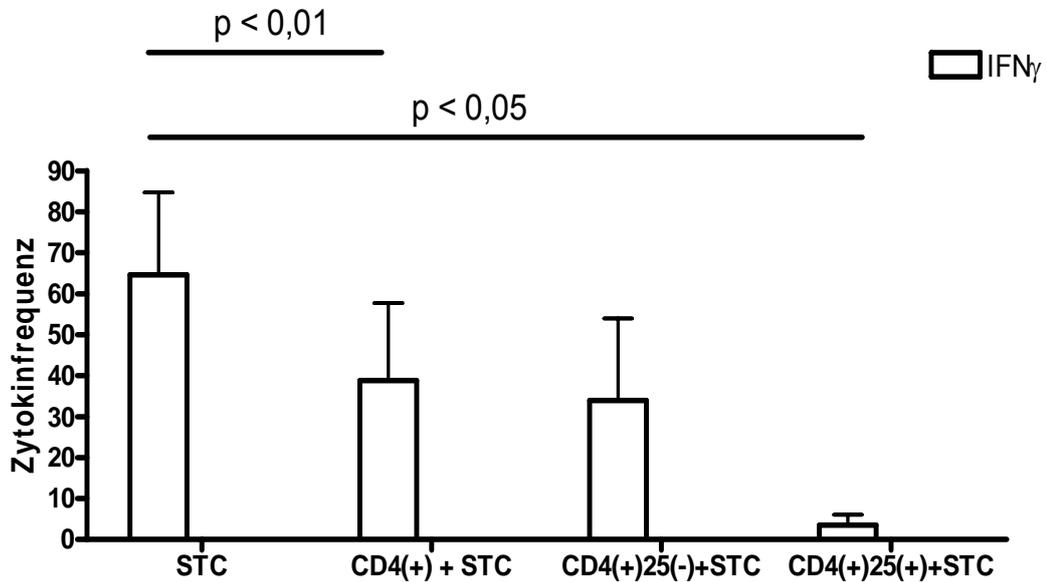
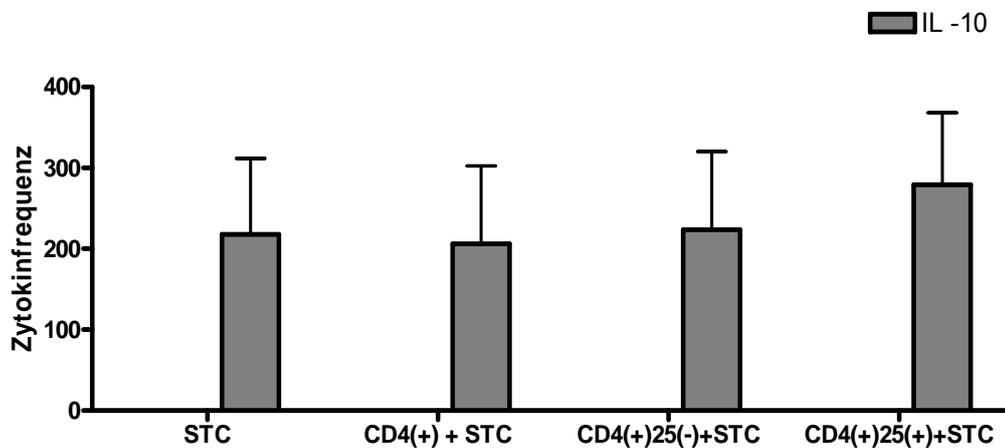


Abbildung 24a

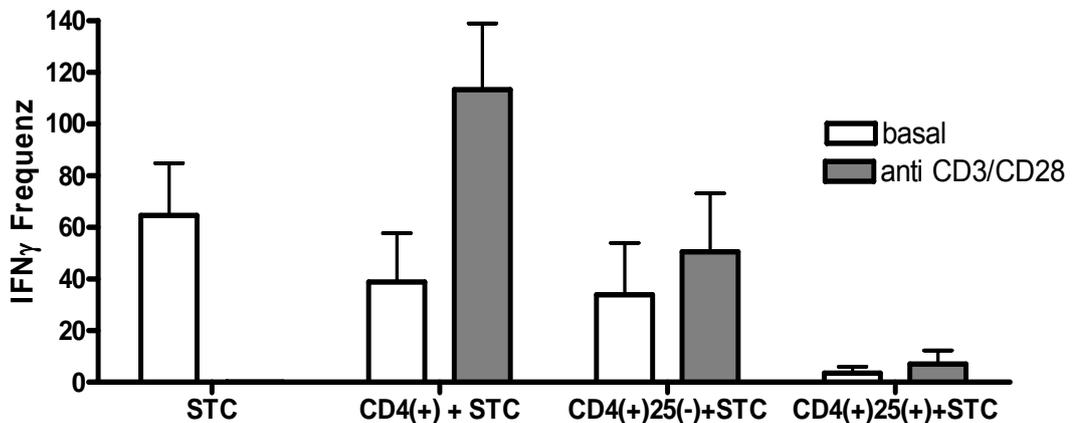


**Abbildung 24 a und b: Co-Kultur der Synovialen Membranzellen mit der CD4(+)CD25(-) Lymphozytenfraktion und der CD4(+)CD25(+) regulatorischen Lymphozytenfraktion.**

Signifikanztests bezogen auf die basale Zytokinproduktion der Synovialzellen. IFN- $\gamma$ :  $64,60 \pm 72,50$  ; IL-10:  $217,75 \pm 210,11$

Werden die Co-Kulturen mit anti-CD3 Ab und anti-CD28 Ab aktiviert, verlieren die CD4(+) (n = 12;  $113,23 \pm 88,84$ ) und CD4(+)CD25(-) T-Effektorzellen (n = 6;  $50,50 \pm 55,23$ ) ihre regulatorische Fähigkeit auf IFN- $\gamma$  produzierende Synovialmembranzellen.

Co-Kulturen mit CD4(+)CD25(+) Treg scheinen ihre Kapazität durch die Aktivierung mit einer grenzwertigen Signifikanz ( $p = 0,052$ ), nicht einzubüßen ( $n = 3$ ;  $7,00 \pm 9,12$ ).



**Abbildung 25: Co-kultivierte CD4(+) und Synovialmembranzellen unter anti-CD3 Ab und anti-CD28 Ab Aktivierung.** Untersucht wurden 12 CD4 + STC Co-Kulturen, 6 CD4(+)25(-) und 3 CD4(+)25(+) Co-Kulturen untersucht. Ein signifikanter Gruppenunterschied konnte nicht ermittelt werden.

Ein ähnliches Phänomen lässt sich für CD8(+) T-Zellen in Co-Kultur zeigen. CD8(+)CD25(+) Treg zeigen auch hier die größte regulatorische Kapazität der CD8(+) Zellen ( $n = 3$ ;  $3,33 \pm 4,93$ ) auf die IFN- $\gamma$  Produktion. Im Gegensatz zu CD4(+) T-Zellen nimmt bei CD8(+) Subtypen in Co-Kultur mit Synovialmembranzellen die IL-10 Produktion ab.

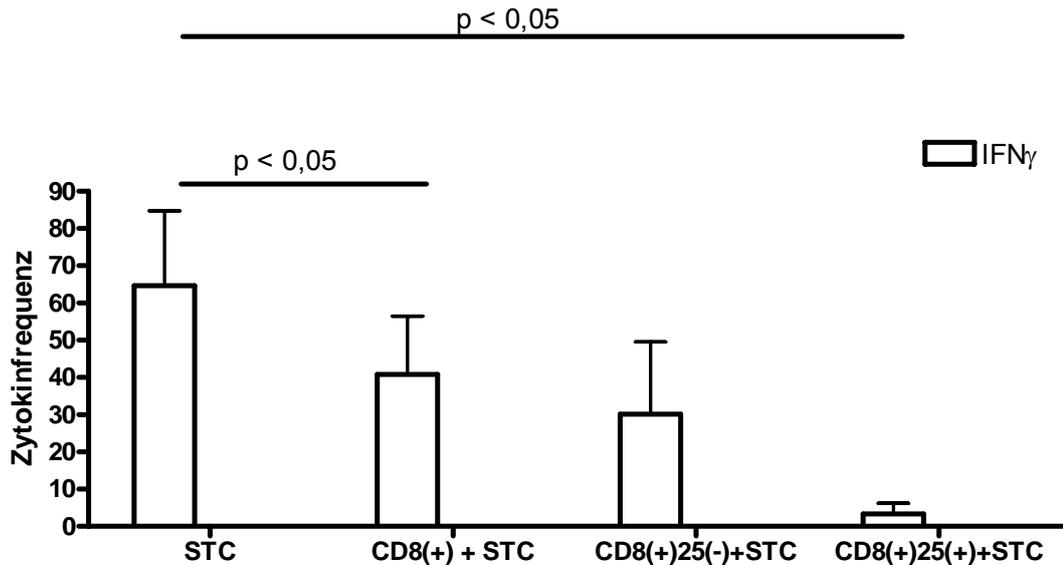
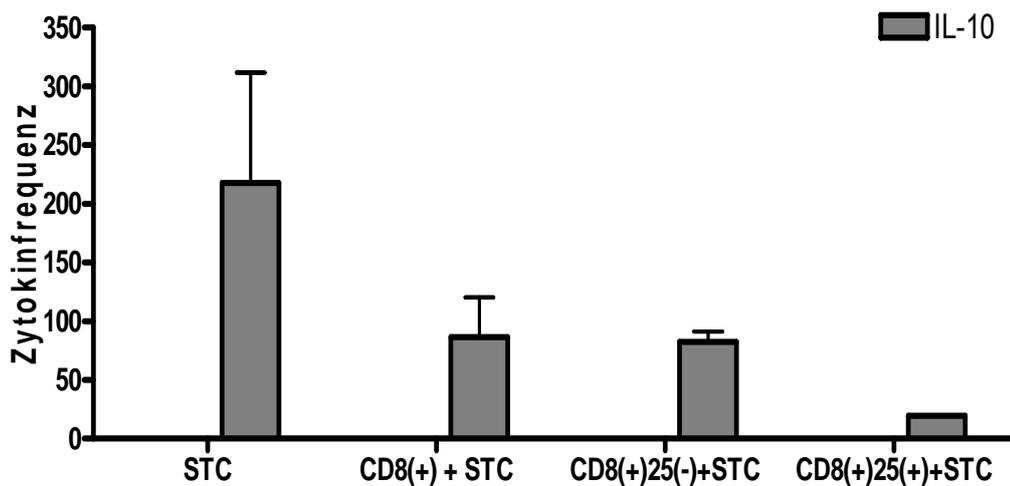
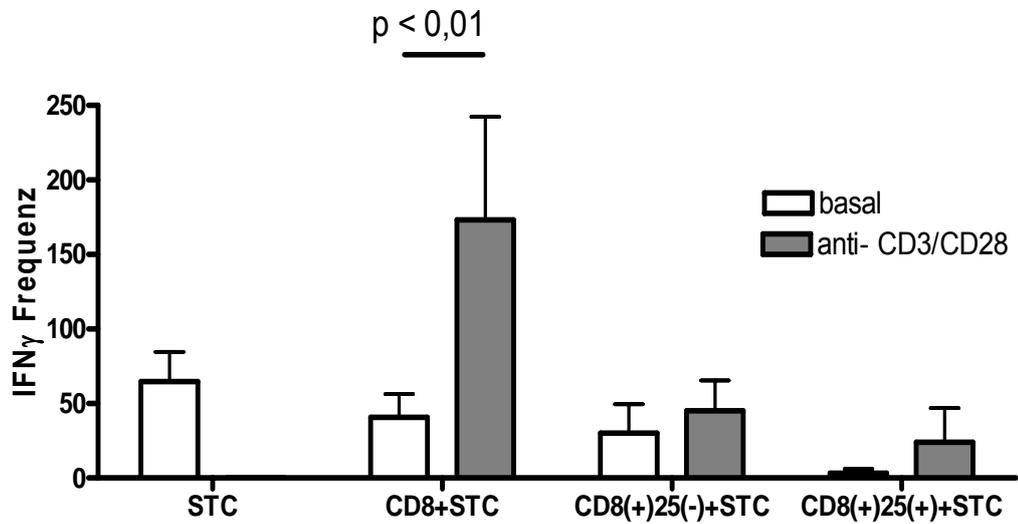


Abbildung 26 a



**Abbildung 26 a und b: Co- Kultivierung von CD8(+) Lymphozyten Subpopulation und Synovialmembranzellen** CD8(+)CD25(-) Co – Kulturen produzieren (n=6)  $30,08 \pm 47,58$  IFN- $\gamma$  und (n=3)  $82,5 \pm 14,73$  IL- 10

Bei Aktivierung der CD8(+) Co-Kulturen verschwindet die suppressive Fähigkeit aller CD8(+) Subtypen (Abbildung 27). Die Co- Kultur aus CD8(+) und Synovialmembranzellen produziert bei n =13,  $173,13 \pm 240,20$  IFN- $\gamma$ , während eine Co-Kultur mit CD8(+)CD25(-) (n =6)  $53,50 \pm 50,81$  produziert. CD8(+)CD25(+) Treg sind anscheinend nicht resistent gegenüber einer Aktivierung mit anti-CD3 Ab und anti-CD28 Ab (n =2;  $24,0 \pm 32,52$ )



**Abbildung 27: CD8(+) Co- Kulturen und anti- CD3 Ab und anti- CD28 Ab Aktivierung.**  
 Untersucht wurden 12 CD8(+) + STC Co-Kulturen, 6 CD8(+)+25(+) und 3 CD8(+)+25(+) Cokulturen.  
 Es zeigte sich ein signifikanter Gruppenunterschied bei den CD8(+) + STC Co-Kulturen.

### 3.7. Klinische Auswertung

#### 3.7.1. Intrasynoviale Zytokinproduktion im Bezug zum Krankheitsverlauf und Geschlecht

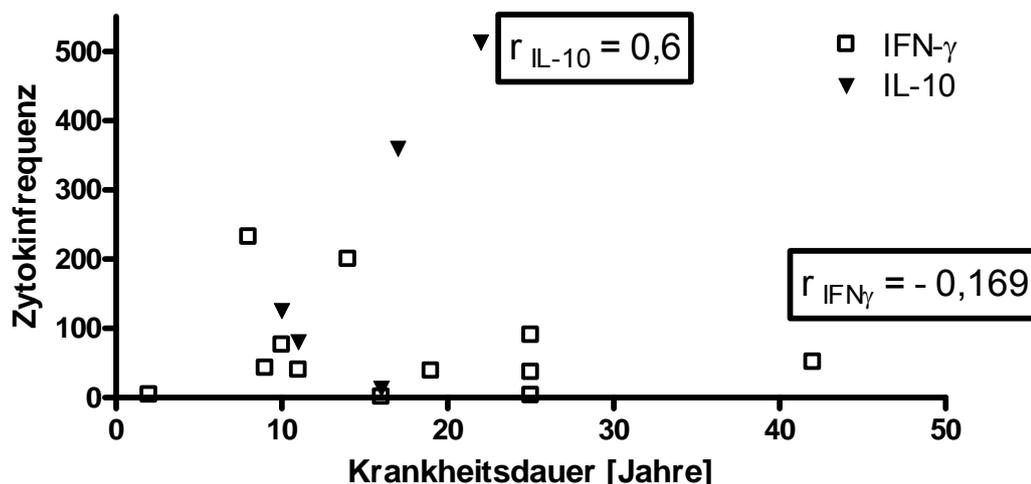
Die synoviale Inflammation der Rheumatoiden Arthritis kann über Jahrzehnte perpetuieren. Der klinische Verlauf der sich daraus ergibt, ist heterogen.

Bei einigen Patienten kann es zu einer Abnahme der inflammatorischen Konstellation kommen, was klinisch als „Ausbrennen“ bezeichnet wird.

Welche immunologischen Mechanismen für diesen Verlauf verantwortlich sind, ist unbekannt. Maßgebend scheint jedoch der Faktor „Zeit“ zu sein.

Zwischen der Krankheitsdauer und der intrasynovialen IFN-  $\gamma$  Produktion zeigt sich eine negative Korrelation ( $r_{\text{IFN-}\gamma} = -0,16$ ). Der kumulative Beobachtungszeitraum erstreckt sich über 40 Jahren (Spannweite: 2 – 42 Jahren, Median 16 Jahre).

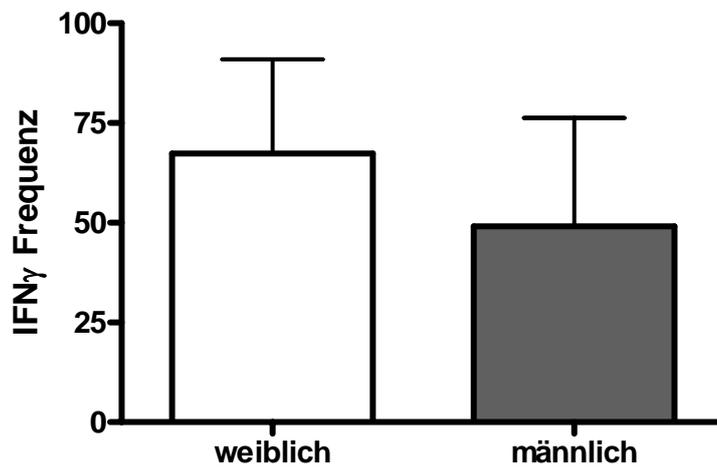
Im Vergleich dazu findet man über einen Beobachtungszeitraum von 6 Jahren (Spannweite: 16 – 22 Jahren, Median 16 Jahren) eine positive Korrelation zwischen der Erkrankungsdauer und der Interleukin- 10 Produktion ( $r_{\text{IL-10}} = 0,600$ ).



**Abbildung 28: Zytokinfrequenz der Synovialmembranzellkultur in Bezug zur Krankheitsdauer.** Dargestellt ist die Zytokinfrequenz für IL – 10 ( $n = 5$  Patienten) mit einem Korrelationskoeffizient von  $r_s = 0,60$  und für IFN -  $\gamma$  ( $n=12$ )  $r_s = -0,169$

Epidemiologische Daten zeigen, dass die Rheumatoide Arthritis häufiger Frauen als Männer betrifft. Ein Vergleich zwischen den erhobenen

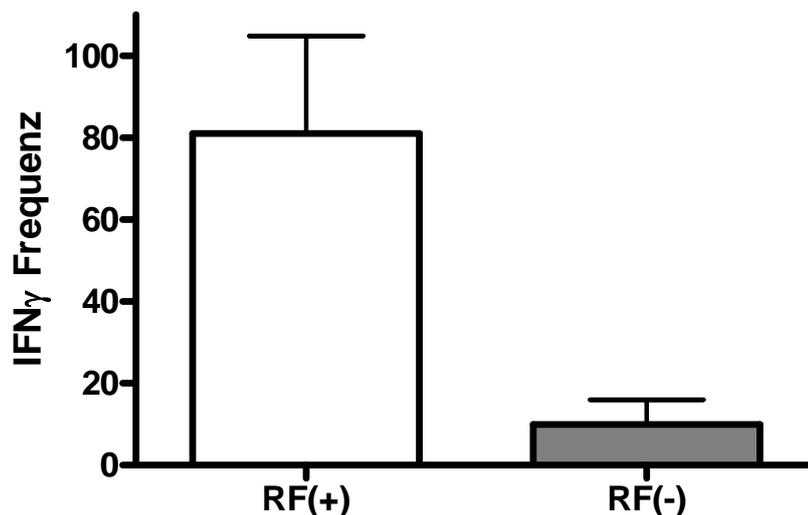
Zytokinfrequenzen und dem Geschlecht zeigen keine Unterschiede in der Produktion.



**Abbildung 29: Beziehung zwischen dem Geschlecht und der IFN- $\gamma$  Produktion des Synovialmembrans.** Patientinnen (n= 11) zeigen eine IFN- $\gamma$  Frequenz von 67,40  $\pm$  78,30, während Patienten (n= 2) eine Frequenz von 49,17 $\pm$  38,42 zeigen. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Geschlechtern.

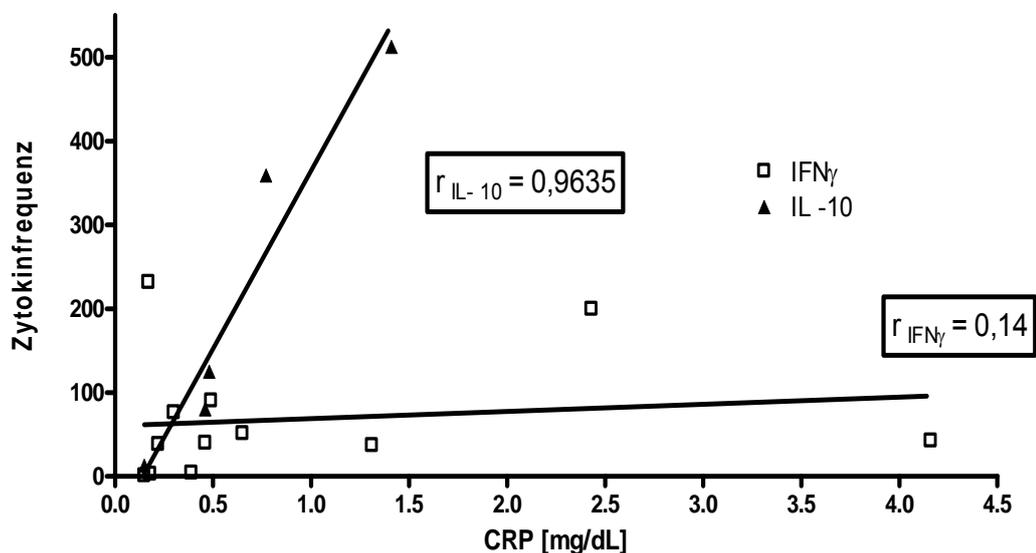
### 3.7.2 Laborchemische Parameter

Laborparameter dienen hauptsächlich zur Stratifizierung der Rheumatoiden Arthritis. Der Rheumafaktor findet sich bei bis zu 60% der Patienten. Klinisch finden sich Unterschiede zwischen den beiden Patientenkollektiven. Rheumafaktor positive Patienten haben oft einen schwereren Verlauf als Rheumafaktor negative Patienten. Ein Vergleich zwischen den beiden Kollektiven bezogen auf die intrasynoviale Zytokinproduktion zeigt eine höhere IFN- $\gamma$  Frequenz im Rheumafaktor positivem Kollektiv als im negativen. Das Rheumafaktor positive Kollektiv (n= 8 Patienten) besitzt eine IFN- $\gamma$  Frequenz von  $47,25 \pm 27,06$  (CI: 24,63 - 69,87), während die Rheumafaktor negative (n=3) eine Frequenz von  $9,917 \pm 10,48$  (CI: -16,12 - 35,96) aufweist. Statistisch ergibt sich kein signifikanter Gruppenunterschied (p= 0,0848), welcher womöglich bedingt ist durch die geringe Gruppenanzahl. Ein Vergleich zwischen den beiden Kollektiven in Bezug auf die Interleukin- 10 Frequenz konnte nicht bestimmt werden, da nur Rheumafaktor positive Patienten in die Bestimmung eingeschlossen wurden .



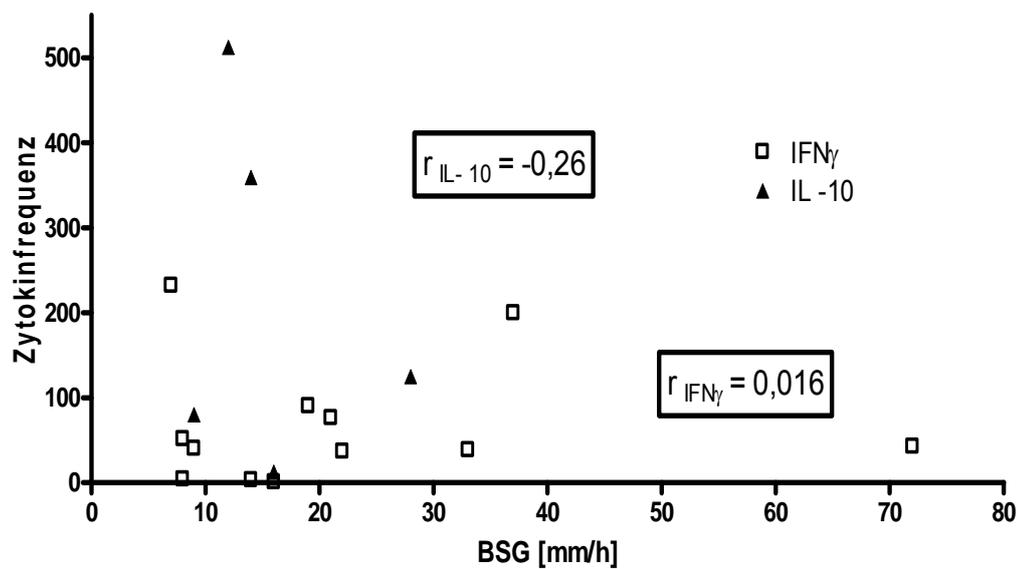
**Abbildung 30: Vergleich der IFN- $\gamma$  Produktion zwischen Rheumafaktor positiven (RF(+)) und Rheumafaktor negativen (RF(-)) Patienten.** Dargestellt sind die IFN- $\gamma$  Frequenzen von RF(-) n=3 Patienten und RF(+) n=8. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen. RF(+)- Patienten besitzen eine IFN- $\gamma$  Frequenz von  $47,25 \pm 27,06$ , RF(-) von  $9,917 \pm 10,48$ .

Unspezifische Entzündungsmarker werden zur Stratifizierung der Aktivität einer Rheumatoiden Arthritis verwendet. Häufig bestimmte Parameter sind das C reaktive Protein (CRP) und die Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG). Ein Vergleich dieser extrasynovialen Parameter mit der intrasynovialen Zytokinproduktion zeigt eine lineare Korrelation zwischen den beiden Determinanten. CRP korreliert schwach positiv mit der IFN- $\gamma$  Frequenz des Synoviums  $r = 0,1390$ , (CI:  $-0,4727 - 0,6603$ ), jedoch findet sich ein starker linearer Zusammenhang mit IL-10  $r = 0,9635$  (CI:  $0,5414 - 0,9977$ ,  $r^2 = 0,9283$ ,  $p = 0,0083$ ).



**Abbildung 31: CRP in Beziehung zur intrasynovialen Zytokinproduktion.** Dargestellt ist die IFN- $\gamma$  Produktion für  $n = 12$  und IL-10 für  $n = 5$  Patienten.

Die intrasynoviale Zytokinproduktion korreliert nur schwach mit der gemessenen Blutsenkungsgeschwindigkeit. Für IFN- $\gamma$  ergibt sich ein Korrelationskoeffizient von  $r = 0,016$  und für  $r = -0,26$ .



**Abbildung 32: BSG in Beziehung zur intrasynovialen Zytokinproduktion.** Dargestellt ist die IFN- $\gamma$  Produktion für  $n = 12$  und IL -10 für  $n = 5$  Patienten.

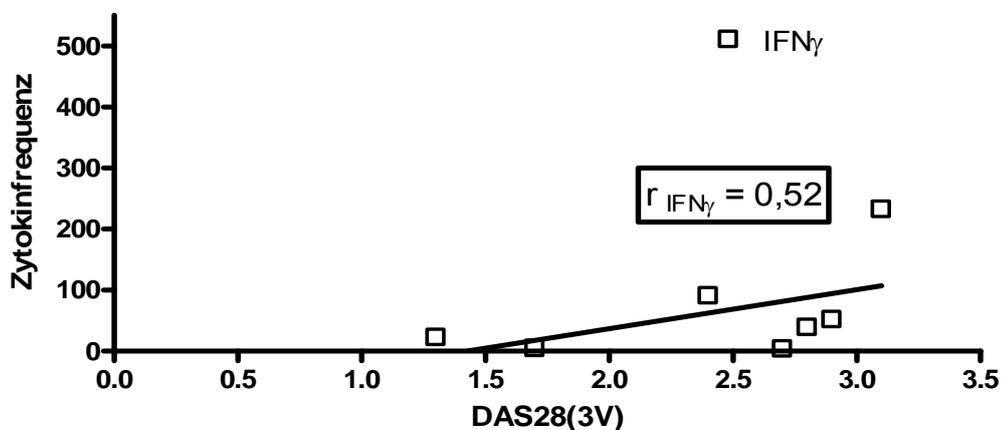
### 3.7.3. Klinische Aktivitätsscores und Zytokinmuster

Eine spezifische Stratifizierung der Aktivität der Rheumatoiden Arthritis ist durch die Erhebung des „disease activity Scores“ (DAS28 (BSG)) möglich.

DAS28 ist ein validierter Punktescore, der je nach ermitteltem Wert die Aktivität in „remission“, „low“ und „high“ klassifiziert.

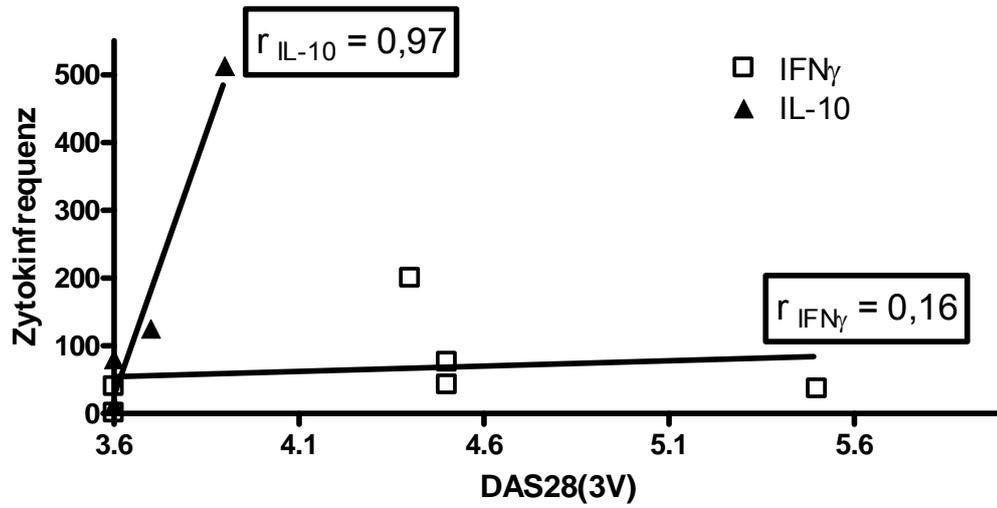
Synovialmembranzellen aus Patienten mit geringer Aktivität (DAS28 < 3,6) zeigen einen positiven linearen Zusammenhang mit ihrer intrasynovialen IFN- $\gamma$  Produktion ( $r = 0,52$ ). Von ihrer Aktivität höhergradig klassifizierte Synovialmembranzellen zeigen eine schwächere Korrelation mit der intrasynovialen IFN- $\gamma$  Produktion ( $r = 0,16$ ).

Die intrasynoviale IL-10 Produktion zeigt bei Synovialmembranzellen aus Patienten mit hohem DAS28 einen starken linearen Zusammenhang ( $r = 0,96$ )



**Abbildung 33: Intrasynoviale Zytokinproduktion in Beziehung zu geringen DAS28 Scores.**

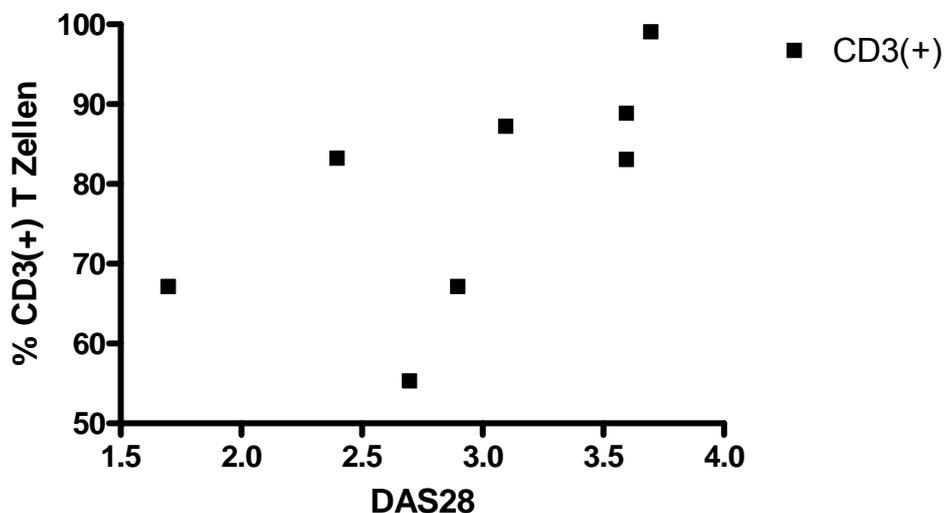
Dargestellt ist die IFN- $\gamma$  Produktion von 7 Patienten ( $r = 0,52$ ,  $p = 0,20$ )



**Abbildung 34: Hohe DAS28 Scores in Bezug zur intrasynovialen Zytokinproduktion.**  
 Dargestellt sind die IL- 10 Produktion von 4 Patienten ( $r = 0,97$ ,  $p = 0,02$ ) und für IFN- $\gamma$  von 6 Patienten ( $r = 0,16$ ,  $p = 0,76$ )

### 3.7.4. Klinische Aktivität und Synovialmembran Zusammensetzung

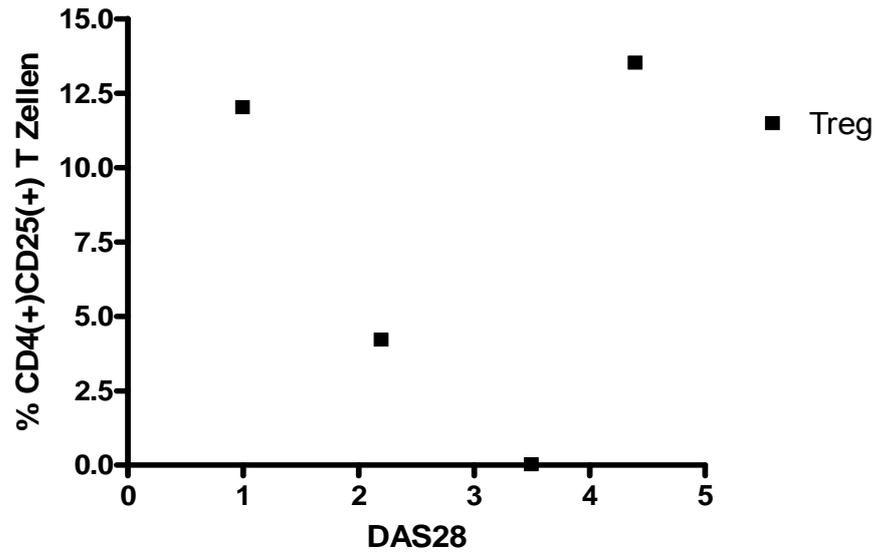
Die klinische Aktivität der Rheumatoiden Arthritis, quantifiziert durch den DAS28, korreliert schwach mit der intrasynovialen Zytokinproduktion. Bezieht man den durchflusszytometrisch bestimmten Anteil an CD3(+)- Zellen auf die Aktivität, so zeigt sich eine positive, jedoch nicht signifikante Korrelation zwischen den beiden Parametern ( $n = 8$ ;  $r = 0,31$ ;  $p = 0,08$ ).



**Abbildung 35: DAS28 in Bezug zum CD3(+) Anteil des Synovialmembrans**

Bei 8 Patienten konnte eine positive nicht signifikante Korrelation zwischen beiden Parametern nachgewiesen werden.

Die Erhöhung der klinischen Aktivität scheint nicht mit einer Erhöhung der CD4(+)CD25(+) Treg ( $n=4$ ) in der Synovialmembran einherzugehen. Abbildung 3.8.4.2. veranschaulicht die Beziehung zwischen beiden Größen ( $r = 0,20$ ;  $p = 0,80$ ).

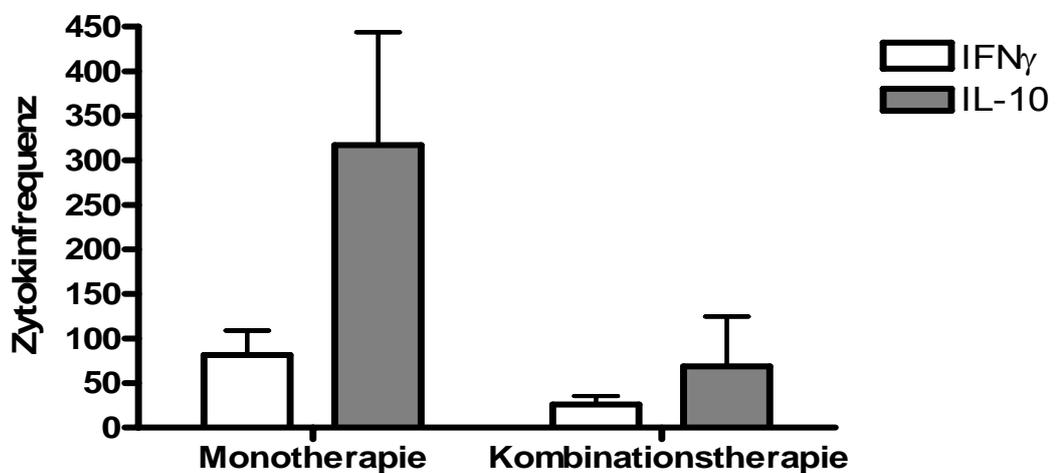


**Abbildung 36: Treg Anteil im Synoviums im Bezug zur klinischen Aktivierung (DAS28)**

Bei 4 Patienten (n= 4) konnte keine Korrelation zwischen den beiden Parametern gefunden werden ( $r = 0,20$ ;  $p = 0,80$ ).

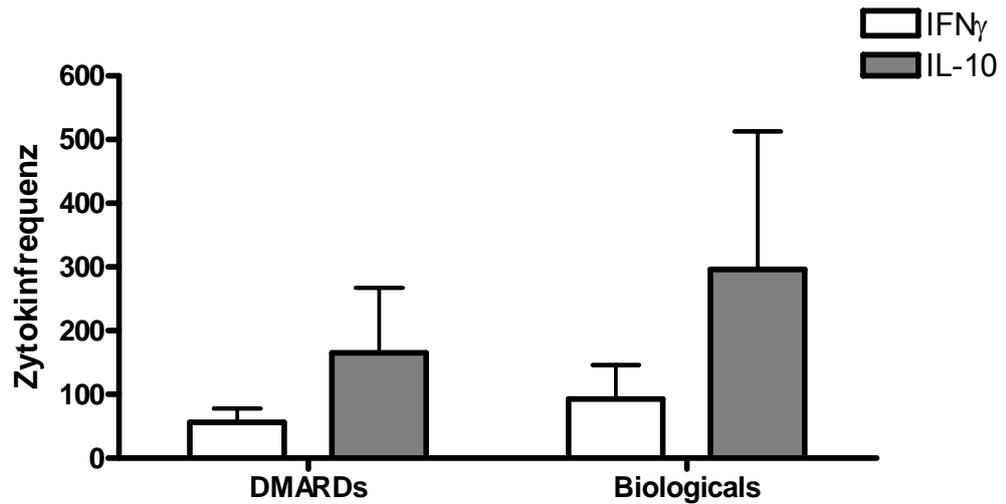
### 3.7.5. Therapie und Zytokinmuster

Basistherapeutika der Rheumatoiden Arthritis sind die „disease modifying antirheumatic drugs“ (DMARDs). Sie beeinflussen das Immunsystem auf unterschiedliche Weise. Sie werden in der Therapie einzeln oder in Kombination miteinander verwendet. Synovialmembranzellen aus Patienten mit Kombinationstherapie zeigen eine niedrigere Produktion der Zytokine IL-10 und IFN- $\gamma$ .



**Abbildung 37: Vergleich der DMARD Therapie und der Zytokinfrequenz in RA – Synovialmembranzellkulturen.** Dargestellt für die Monotherapie: IFN- $\gamma$  (n= 9):  $81,72 \pm 81,71$ ; IL-10 (n= 3):  $317,16 \pm 219,26$  und für die Kombinationstherapie: IFN -  $\gamma$  (n= 4)  $26,06 \pm 18,95$  und IL-10 (n=2)  $68,65 \pm 79,37$

Neuere Medikamente in der Gruppe der Rheuma – Basisttherapeutika sind die TNF- $\alpha$  Inhibitoren (sogenannte „biologicals“). Ein Vergleich zwischen den beiden Gruppen zeigt für die konventionellen DMARDs eine IFN- $\gamma$  Produktion (n=10) von  $56,10 \pm 68,92$  und IL-10 (n = 3) von  $165,41 \pm 176,79$ . Mit „Biologicals“ behandelte Patienten zeigen eine intrasynoviale IFN- $\gamma$  Produktion (n =3) von  $92,91 \pm 92,74$  und IL-10 (n=2)  $296,25 \pm 305,82$ . In dieser Gruppe scheint es zur Erhöhung der IL-10 Produktion zu kommen. Ein signifikanter Gruppenunterschied zwischen den unterschiedlichen Therapien konnte nicht ermittelt werden.



**Abbildung 38: Zytokinfrequenz in Beziehung zur Konventionellen und biologischen**

**DMARD – Therapie.**

In der Abbildung sind die IFN- $\gamma$  und IL-10 Zytokinfrequenzen in Abhängigkeit von der Medikation der Patienten aufgezeigt. In die DMARDs –Gruppe wurden für das IFN- $\gamma$  10 Patienten, für die IL-10 Frequenz 3 Patienten untersucht. In der Biologicals- Gruppe wurden für die IFN- $\gamma$  Frequenz 3, für die IL-10 Frequenz 2 Patienten eingeschleust. Ein signifikanter Gruppenunterschied ergibt sich nicht.

### 3.7.6 Multiples Regressionsmodell klinischer Parameter und intrasynovialer Zytokinproduktion

Pathogenetische und therapeutische Implikationen beeinflussen die intrasynoviale Zytokinproduktion. Um den Zusammenhang der einzelnen Faktoren zu ermitteln, wurde ein multiples Regressionsmodell für die Faktoren erstellt.

Für ein IFN- $\gamma$  Modell wurden die Faktoren Erkrankungsdauer, DMARD Kombinations- vs. Monotherapie, Konventionelle vs. Biologicals, Rheumafaktor, Hoher vs. Niedriger DAS28 Score berücksichtigt (Methode Einschluss).

Der Zusammenhang im Modell ergab  $r = 0,78$  ( $r^2 = 0,61$  ( $p = 0,23$ ))

	Koeffizienten Beta	T	Signifikanz
Erkrankungsdauer	-0,50	-1,71	0,14
Anzahl der DMARD	-0,53	-1,96	0,10
Konventionelle DMARD vs. Biological	0,07	0,25	0,81
Rheumafaktor	0,80	2,48	0,05
DAS28 high/low	-0,44	-1,40	0,21

Unter Berücksichtigung der verschiedenen Faktoren kann man mit Hilfe des Modells 61% der IL-10 Produktion klären. Es besteht keine große Abweichung der einzelnen bestimmten Signifikanzen im Vergleich zum erhobenen Modell. Man erkennt, dass die IFN- $\gamma$  Frequenz absinkt, je länger der Patient an der Erkrankung leidet und wie konsequent er therapiert wird. Beide Parameter liegen über dem Signifikanzniveau, könnte aber durch die geringe Patientenzahl bedingt sein. Rheumafaktor positive Patienten haben eine hohe IFN- $\gamma$  Produktion, während höhere DAS28 zu niedriger IFN- $\gamma$  Produktion tendiert.

Mittels des multiplen linearen Regressionsmodell (Methode: Schrittweise) wurde auch die IL-10 Produktion in Abhängigkeit der einzelnen Faktoren

geprüft, welche den gefundenen Zusammenhang zwischen CRP und IL-10 bestätigte ( $r = 0,963$ ,  $r^2 = 0,928$ ;  $p = 0,008$ ).

## 4. Diskussion

### 4.1. CD4(+) und CD8(+) T-Zellen in der Pathologie der Rheumatoiden Arthritis

T-Lymphozyten spielen eine zentrale Rolle bei der Rheumatoiden Arthritis. Sie können durch Ausschüttung von Zytokinen und mittels Zell-Zell-Kontakt die Inflammation vorantreiben. Die größte Subpopulation der synovialen T-Lymphozyten charakterisieren sich durch die Oberflächenexpression von CD4(+)CD45(+)RO. Weitere typische Charakteristika sind die Expression von CCR5 und die Produktion von IFN- $\gamma$ . Dieser Phänotyp entspricht einer Th1-Zelle. Th1-Zellen aktivieren Typ B Synoviozyten, welche dadurch Matrix Metalloproteasen (MMPs) und Prostaglandine ausschütten und infolgedessen die Knorpelstrukturen destruieren. Typ B Synoviozyten sind wiederum in der Lage, durch IL-7, IL-15 und IL-18 Th1 Zellen zu aktivieren. Hierdurch kann ein positiver Regelkreis entstehen, welcher zu einer perpetuierten Inflammation führen kann.

Experimentell ist der Nachweis von Th1/Th17 charakterisierenden Zytokinen (IFN- $\gamma$ , IL-17) in der Synovialmembran schwierig. Dieser gelingt am zuverlässigsten auf mRNA- Ebene und nach mitogener Stimulation der T-Zellen auf Proteinebene. Ungefähr 1 % der T-Lymphozyten im Synovium produzieren IFN- $\gamma$ . Dabei besitzen periphere CD4(+) T-Zellen eines Patienten mit Rheumatoider Arthritis eine höhere basale Produktion von IFN- $\gamma$ , als Lymphozyten einer Kontrollgruppe [61]. Dennoch sind diese Zellen nicht die alleinigen Produzenten von IFN- $\gamma$ . So besitzen CD8(+) T-Zellen, Th17 -Zellen, „natural killer cells“ (NK- Zellen) und B-Lymphozyten ebenfalls die Fähigkeit zur IFN- $\gamma$  Synthese. Eine Untersuchung von Morita et al. konnte mittels FACS-Analyse die Produktion von IFN- $\gamma$  in synovialen T-Lymphozyten auf Einzel- Zellebene nachweisen. Interessanterweise zeigte sich eine höhere Frequenz von IFN- $\gamma$  in der Gruppe der synovialen CD8(+) T-Zellen, als in der CD4(+) Gruppe [62]. Die Fähigkeit beider T-Lymphozytenpopulationen zur IFN- $\gamma$ - Produktion könnte funktionell innerhalb der Syovialmembran unterschiedliche Auswirkungen haben. CD4(+) T-Zellen und Makrophagen

liegen in der Synovialmembran dicht beieinander und stehen histologisch im engen Zell-Zell-Kontakt. Makrophagen haben die Möglichkeit CD4(+) T-Zellen zu aktivieren. Umgekehrt haben CD4(+) T-Zellen die Fähigkeit Makrophagen zu aktivieren und sie in ihrer Aktivität zu modulieren. Für diese Aktivierung spielt IFN- $\gamma$  eine besondere Rolle.

Ein anderer funktioneller Aspekt könnte die Produktion von IFN- $\gamma$  durch CD8(+) T-Zellen haben. Diese Zellen spielen eine besondere Rolle im histologischen Aufbau der inflammatorisch veränderten Synovialmembran. Experimentell ergeben sich Hinweise, dass diese Zellen an der Bildung von Lymphfollikel beteiligt sind. Innerhalb dieser Follikel bilden sich sekundäre Keimzentren (germinal centers (GC)), in denen es zur Bildung von Autoimmunantikörpern durch Plasmazellen kommen kann. CD8(+) T-Zellen sind für die Bildung solcher GC verantwortlich. Durch die Entfernung der CD8(+) T-Zellen zerfallen diese Follikel. Zusätzlich nimmt die Frequenz der follikulären dendritischen Zellen ab und die Immunglobulinproduktion wird signifikant gesenkt. Follikuläre CD8(+) T-Zellen werden charakterisiert durch die Produktion von IFN- $\gamma$ . Perifollikulär lässt sich nur ein geringer Anteil von IFN- $\gamma$ (+)CD8(+) T-Zellen nachweisen.

Welcher der beiden Zelltypen den größten Anteil der in dieser Arbeit gemessenen spontanen IFN- $\gamma$ - Produktion zeigte, konnte mit diesem Versuchsaufbau nicht beantwortet werden. Es konnte jedoch in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der Gehalt von CD8(+)- T-Zellen von Rheumatoiden Arthritis- Synovialmembranzellen höher ist als der von Osteoarthrose. Daher könnte die autonome IFN- $\gamma$  Produktion der Synovialmembranzellen durch CD8(+) T-Zellen zustande kommen [63].

Neben proinflammatorischen Zytokinen finden sich auch konstitutiv antiinflammatorische Zytokine in der Synovialmembran, wie zum Beispiel IL-10. IL-10 wird von vielen anderen hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Zellen produziert. Die Empfindlichkeit auf inflammatorische Zellen wird durch die Expression der IL-10 Rezeptoren bestimmt. Aktivierte T-Zellen regulieren diesen Rezeptor herunter und werden somit resistent gegenüber IL-10. Monozytäre Zellen zeigen im Vergleich dazu eine erhöhte Expression der IL-10 Rezeptoren. IL-10 führt zur

verminderten Expression von co-stimulatorische Molekülen unter anderem von CD86, CD80 MHC II, welches grundlegend für die Antigen-Präsentation auf APCs und aktivierten T-Zellen ist. Im Gegensatz dazu sind dendritische Zellen (DC) aus RA Patienten resistent gegenüber immunsuppressiven Effekten von IL-10, da bei diesen eine insuffiziente Expression des IL-10 Rezeptors vorliegt.

Histologisch konnte gezeigt werden, dass die Produktion von IL-10 an der Membran-Flüssigkeitsgrenze und in der Nähe von Blutgefäßen stattfindet. An der Membran- Flüssigkeitsgrenze produzieren vor allem monozytäre Zellen IL-10, während in der Nähe von Blutgefäßen CD3(+) T-Zellen das Zytokin produzieren [64]. Interessanterweise konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine Depletion von CD3(+) Zellen aus der Zellkultur zu einer signifikanten Verminderung der IL-10 Produktion führt. Daher könnte die Hauptproduktion von IL-10 durch CD3(+) T-Zellen erfolgen.

Ungefähr 10% aller CD3(+)CD4(+) T-Zellen produzieren hohe Mengen an IL-10, TGF- $\beta$  und geringe Mengen an IFN- $\gamma$  und IL-5. Sie werden als Tr1 Zelle bezeichnet. Tr1 Zellen produzieren sehr schnell große Mengen an IL-10, welche schon nach vier Stunden im Überstand gefunden werden können. Die größte Produktion wird nach 12-24 Stunden erreicht. Im Gegensatz dazu produzieren Th2 Zellen erst nach 10 Stunden IL-10, mit einem Gipfel nach 36-48 Stunden. Vermutlich könnte die Produktion des IL-10 aufgrund des Studiendesigns durch Tr1 Zellen bedingt sein.

Im Ruhestadium exprimieren Tr1 Zellen Zytokinrezeptoren, die einerseits auf Th1 Zellen (CXCR3, CCR5) und andererseits auf Th2 Zellen (CCR2, CCR4 und CCR8) gefunden werden. Tr1 Zellen proliferieren in vitro unter polyklonalen Bedingungen nur spärlich. Sie expandieren signifikant langsamer im Gegensatz zu weiteren T-Zellpopulationen. Die geringe Proliferation der Zellen liegt vermutlich in der autokrinen Wirkung von IL-10. Eine Blockade der IL-10 Wirkungen steigert die Proliferation der Zellen wieder. R. Bachetta konnten zeigen, dass IL-15 die Proliferation der Zellen auch ohne Aktivierung über den TCR steigert. Die Präferenz zu IL-15 zeigt sich auch in der Oberflächenexpression von IL2/IL-15R  $\beta$  und  $\gamma$  Ketten im Gegensatz zu den weiteren T-Helferzellen. Tr1 können sich aus peripheren CD4(+) Zellen

differenzieren. Rheumatoide Arthritis Patienten besitzen signifikant weniger Tr1 Zellen im peripheren Blut [65]. Bei dieser Konstellation könnte die chronische Inflammation der Synovialmembran nicht signifikant eingedämmt werden. Daneben könnte auch die histologische Verteilung innerhalb der Synovialmembran eine Rolle spielen. CD3(+)IL10(+) T-Zellen halten sich in der Nähe der Blutgefäße auf. IL-10 könnte somit nur Zellen in unmittelbarer Umgebung inhibieren. Eine Inhibition in formierten histologischen Gebilden (Lymphfollikel) könnte somit nicht möglich sein. Zu dem könnte die autokrine Wirkung von IL-10 durch die Ansammlung von Tr1 Zellen ein funktionelles Defizit derselbigen bewirken.

Nicht bekannt war die Reaktion von Synovialmembranzellen auf peripheren CD4(+) und CD8(+) T-Zellen. Experimentell bedingt wurden in dieser Arbeit feste histologische Grenzen aufgelöst, um die Reaktion der Zellen zu messen. Beide naive Zellarten sollten die Produktion von proinflammatorische Zytokinen bei der Cokultiveringung mit aktivierten Synovialzellen fördern. Es zeigte sich jedoch eine signifikante proinflammatorische Aktivitätsminderung, nachgewiesen anhand der IFN- $\gamma$  Frequenz. Eine mögliche Erklärung dieses Sachverhalts könnte durch die Zusammensetzung der CD4(+) und der CD8(+) T-Zellen erklärt werden. In beiden Subpopulationen könnten regulatorische Fraktionen enthalten sein, welche zur Verminderung der proinflammatorischen Aktivität beitragen. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Verwischung von anatomischen Grenzen und histologischen Strukturen. Zur weiteren Evaluation dieses Sachverhalts wurden Co-Kulturen der Subpopulationen in diesem Experiment angelegt. Hier zeigt sich die größte inhibitorische Qualität in der Fraktion der CD25(+) T- Zellen. Dennoch scheinen auch CD25(-) T-Zellen in der Lage zu sein antiinflammatorische Effekte zu betreiben.

#### 4.2. CD4(+)CD25(+) regulatorische T- Lymphozyten

Regulatorische T-Zellen wurden erstmalig von Papiernik et al. in der Thymusdrüse beschrieben [66]. Ungefähr 5% der CD4(+)CD8(-) Thymozyten exprimieren die IL-2R-alpha Kette (CD25) und zeigen regulatorische Qualitäten. Die im Thymus gefundenen CD25(+) Thymocyten sind funktionell identisch mit den peripheren CD4(+)CD25(+) Lymphozyten. Fluorochrome markierte CD4(+)CD25(+) T-Zellen zeigten eine Emigration aus dem Thymus in die Peripherie. Medulläre dendritische Zellen differenzieren CD4(+)CD8(-) Thymozyten zu Tregs. Die Hassall Körperchens sind bei der Induktion dieser dendritischen Zellen beteiligt. Sie produzieren das Protein „thymic stromal lymphopietin“ (TSLP), welches CD11c(+) dendritische Zellen aktiviert. Diese DC exprimieren CD80 und CD86 und besitzen die Fähigkeit CD4(+)CD8(-)CD25(-) Thymozyten zu CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) Tregs zu differenzieren. Abhängig ist diese Induktion von MHC II –Interaktionen und der Präsenz von CD80, CD86 und Interleukin 2 [67].

Neben der Schulung durch Dendritische Zellen spielt die Interaktion mit dem T- Zellrezeptor (TCR) auf Thymozyten eine bestimmende Rolle für die Entwicklung von CD4(+)CD25(+) Treg. CD4(+)CD25(+)Treg unterlaufen eine positive Selektion im Kortex des Thymus. Sie interagieren mit Selbst-Antigenen, präsentiert auf Thymozyten. Die Bindung zwischen Selbstantigen und T- Zellrezeptor (TCR) ist hoch affin. Das daraus entstehende Signal führt zu einem anergen Zustand der Treg und veranlasst sie zur Bildung von anti-apoptotischen Molekülen. Diese verhindern, dass Treg negativ selektiert werden. Nach der Mauserung exprimieren sie FoxP3, GITR-mRNA und die Oberflächenproteine CCR8, TNFR2 sowie zytoplasmatisches CTLA-4. Nach ihrer Aktivierung kommt es zu keiner Proliferation von Treg [68-71].

Nach der Mauserung gelangen Treg in den Blutkreislauf und wandern in sekundäres lymphatisches Gewebe. Tregs reichern sich primär in den T-Zellzonen eines Lymphknotens an. Sie folgen chemotaktisch Chemokinen unter anderem CCL19. Nach Migration in diese Zone besitzen sie die Fähigkeit die Expression von Chemokinrezeptoren (CXCR5 und CCR7) zu ändern und können nun in B-zellreiche Keimzentren wandern. Sie besitzen die Fähigkeit beide Antworten des adaptiven Immunsystems im

Lymphknoten zu unterdrücken [72] [73]. Tregs werden ebenfalls vermehrt im Knochenmark gefunden.

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass CD4(+)CD25(+) Tregs in der Peripherie induzierbar sind [74, 75]. Für diesen Sachverhalt könnte man ein Ruhestadium für Treg definieren, bei denen sie kein CD25 exprimieren. Diese Zellen weisen in ihrem Zytoplasma FoxP3 auf und stellen ein peripheres Reservoir von Treg da und werden im Ruhestadium als CD4(+)CD25(-)FoxP3(+) T-Zellen identifiziert [76].

In der Peripherie sind Treg anergisch und können unter physiologischen Bedingungen sowie unter experimentell physiologischer Stimulation nicht expandieren [77, 78]. Gelingt es doch, Treg zur Proliferation zu bringen, ist dies meist mit einem Verlust der Suppressoreigenschaft verbunden. Nur unter bestimmten Kautelen kann man „in vitro“ die Zellen züchten. CD4(+)CD25(+) Treg sind sehr kompetent in ihren suppressiven Eigenschaften. Im peripheren Blut sind 5-10% aller CD4(+) T-Zellen CD4(+)CD25(+) Treg [78].

### 4.3. Suppression durch CD4(+)CD25(+) Treg

CD4(+)CD25(+) T-Zellen können die Aktivierung und die Proliferation von CD4(+) und CD8(+) T-Zellen in einen nicht antigenspezifischen Mechanismus hemmen [79, 80]. Murine CD4(+)CD25(+) T-Zellen vermitteln ihre Suppression „in vitro“ und „in vivo“ über verschiedene Mechanismen, die einerseits Zell-Zell-Kontakt abhängig sind [81, 82] und andererseits die Produktion von immunsuppressive Zytokine beinhaltet.

Für die regulatorischen Eigenschaften der T-Lymphozyten sind unterschiedliche Transkriptionsfaktoren verantwortlich. Einer dieser Transkriptionsfaktoren ist der „forkhead/winged helix transkription factor 3 (Foxp3)“. Im Mausmodell ist er spezifisch für die Entwicklung regulatorischer CD25(+) Lymphozyten. Eine wichtige Beobachtung ist, dass FoxP3-defiziente Mäuse eine letale Autoimmunerkrankung entwickeln und nur der Transfer von CD4(+)CD25(+) T-Zellen diese verhindert. Leider ist die Expression von FoxP3-mRNA nicht spezifisch für humane CD4(+)CD25(+) Treg [83]. Er findet sich auch bei regulatorischen Lymphozyten mit den Oberflächenmarkern CD8(+)CD25(+), CD8(+)CD28(-)[84, 85]. Weitere Transkriptionsfaktoren, die eine Rolle in regulatorischen Lymphozyten spielen, sind NFATc2 und NFATc3. Bei Abwesenheit beider Transkriptionsfaktoren verlieren regulatorische T-Zellen ihre Fähigkeit zur Proliferationshemmung von Effektorzellen und es kommt zur Ausbildung von lymphoproliferativen Erkrankungen bei Mäusen [86]. Auch die „nuclear-factor  $\kappa$ B induzierende Kinase“ (NIK) spielt eine entscheidende Rolle in Tregs. NIK ist essentiell für die regelrechte Produktion von Tregs im Thymus. Fehlt das NIK- Protein bei Mäusen, kommt es bei der Aktivierung mit GITR ebenfalls zu einer lymphoproliferativen Erkrankung [87].

Für ihre Funktion benötigen CD4(+)CD25(+) Tregs IL-2, IL-4 und TGF- $\beta$  [88, 89]. Ihre regulatorische Leistung wird, bei selektiver Blockierung der IL-2 Rezeptoren, während einer Co-Kultivierung mit Empfänger T-Zellen vollständig aufgehoben. Auch die Produktion anti-inflammatorischer Zytokinen durch Treg wird durch sekundäre Stimulation von IL-2 erhöht [90, 91]. Peripher induzierbare CD4(+)CD25(+) Treg benötigen für ihre suppressive Tätigkeit IL-2 von CD25(-) oder von antigen-stimulierten

T-Zellen in peripheren Lymphknoten [92, 93].

Eine Hypothese über den regulatorischen Mechanismus postuliert die Konkurrenz von CD25(-) Effektor T-Zellen mit CD4(+)CD25(+) Treg um IL-2. IL-2 wird als sekundäres Signal von Effektor T-Zellen benötigt. Erhält eine Effektor T-Zelle kein sekundäres Signal wird sie anerg. Zusätzlich destabilisieren Treg die Expression von IL-2-mRNA in Effektorzellen, woraufhin es der Zelle nicht möglich ist, in einen aktivierten Zustand über zu gehen [94].

CD4(+)CD25(+) Treg zeichnen sich durch die Expression unterschiedlicher regulatorische Moleküle an ihrer Membranoberfläche aus. Unglücklicherweise sind diese Membranproteine nicht spezifisch, da sie auch von aktivierten Effektorzellen exprimiert werden. Ein solches Protein ist der „Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor“ (GITR). Durch eine quantitative und konstitutive Expression supprimieren CD4(+)CD25(+) Treg Effektor T-Zellen [95, 96]. Diese CD25(-) Effektor T-Zellen sind vor allem für ein solches Signal empfänglich, wenn sie durch pro-inflammatorische Zytokine vermittelte verminderte GITR-Expression aufweisen. Eine Erhöhung des GITR würde die Effektorzelle resistent gegenüber dem suppressiven Signal der Treg machen [97].

Ein weiteres Protein mit regulatorischen Eigenschaften ist das „cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4“ (CTLA-4). Birebent B. et al. konnten zeigen, dass die regulatorische Funktion der CD4(+)CD25(+) Treg von der Menge dieses intrazellulär gespeicherten Proteins abhängt [98]. CTLA-4 wird einerseits in der Entwicklung der Treg und andererseits während der Effektorphase der Regulation benötigt [99]. Neben CTLA-4 spielt CD28 und CD7 eine Rolle in der Vermittlung des suppressiven Signals. CD7 und CD28 benutzen einen gemeinsamen Signaltransduktionsweg. Sempokoski et al. konnten zeigen, dass CD28 defiziente Mäuse eine geringere Anzahl an CD4(+)CD25(+) in der Milz bilden als der Wildtyp [100]. CD7/CD28 defiziente Mäuse haben im Thymus und in der Milz weniger Treg im Vergleich zum Wildtyp. Die natürlichen Liganden für CD28 und CTLA-4 sind CD80 und CD86. Beide Rezeptoren, welche auf dendritischen Zellen (DC) exprimiert werden, können die suppressive Kapazität von Treg beeinflussen.

Während der Generierung der T-Zellantwort kommt es bei der Blockade von CD86 zu einer Steigerung der suppressiven Kapazität der Tregs. Im Kontrast dazu wird die Proliferation von diesen Zellen durch die Blockade von CD80 gesteigert, jedoch die Suppressionsfähigkeit vermindert. Der relative Expressionsgrad von CD80 bzw. CD86 auf DC wird während der Mauserung von DC bestimmt [101]. CD4(+)CD25(+) Tregs können DCs bezüglich der Expression von CD80 und CD86 umgekehrt auch beeinflussen. Tregs sind in der Lage die mRNA von CD80 zu destabilisieren [102].

Das Co-Stimulationsmolekül 4-1BB, welches die Proliferation und das Überleben von CD8(+) T-Zellen fördert, findet sich ebenfalls auf CD4(+)CD25(+) Treg. Die Aktivierung bewirkt eine Induktion und Proliferation von Treg [103]. Choi et al. konnten zeigen, dass eine Blockierung des Signals über 4-1BB zu einer Inhibition der Suppression von CD4(+)CD25(+) führt. Interessanterweise ist die Inhibition nach Aktivierung von Treg potenter, als die Inhibition durch anti-GITR [104].

Ein weiteres Protein scheint auf Treg konstitutiv auf der Oberfläche exprimiert zu werden. Neuropilin-1 ist ein Protein, welches hauptsächlich bei der Neuritenaussprossung, bei der Angiogenese und auf aktivierten T-Zellen gefunden wird. Die Expression auf Tregs ist unabhängig von dem Aktivierungsstatus der Zelle. Es korreliert mit der suppressiven Aktivität „in vitro“ [105].

Neben Membranoberflächenmolekülen spielen auch membrangebundene Zytokine eine entscheidende Rolle in der Regulation durch murine Treg.

TGF- $\beta$  wird membrangebunden auf Treg gefunden. Es vermittelt Suppression und ist für die Expansion verantwortlich [106].

Die Wirkung von Treg auf Effektor CD4(+) T-Lymphozyten ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht ganz geklärt. CD4(+)CD25(+) Treg können sich eines Mechanismus bedienen, der vor allem für zytotoxische CD8(+) T-Zellen (CTL) beschrieben wurde. Es ist ihnen möglich, in Effektor- Zellen via Zell-Zell Kontakt, die Apoptose mittels Granzyme B zu induzieren. Anders als bei CTL bedienen sich die Zellen nicht dem Protein Perforin [107].

Experimentelle Studien konnten zeigen, dass die Transmission eines suppressiven Signals durch Tregs eine Erweiterung der B7 Expression auf

Empfängerzellen benötigt [108, 109]. Die genaue Reaktion und der Mechanismus auf Effektor T-Zellen bleibt Gegenstand der Forschung. Neben der direkten Hemmung der Treg an den Effektorzellen besitzen sie die Möglichkeit, weitere Helferzellen vom Typ Tr1 und Th3 aus naiven T-Zellen zu induzieren [110, 111]. Diesen Vorgang bezeichnet man als „Infectious tolerance“. Welche Art von Suppressorzelle durch Treg gebildet wird, hängt von ihrem Integrinbesatz an der Oberfläche ab. So können Treg mit dem Integrinmolekül  $\alpha 4\beta 7$  Tr1-ähnliche Zellen und  $\alpha 4\beta 1$  Th3-ähnliche Zellen induzieren [112]. Zytokine besitzen eine weitere Möglichkeit induzierbare Treg zu aktivieren. TGF- $\beta$  spielt hier eine Schlüsselrolle. Es ist ein Regulator im Signalweg von FoxP3 und induziert hierdurch einen regulatorischen Phänotyp in CD4(+)CD25(-) T-Zellen. Unterhalten wird diese Induktion durch eine positive Rückkopplung im Signaltransduktionsweg [113]. TGF- $\beta$  initiiert und unterhält die suppressive Funktion [114].

Die suppressiven Effekte von diesen sekundären CD4(+)CD25(+) T-Zellen wird unter anderem durch IL-10 vermittelt [115]. Neben den genannten Oberflächenmarkern finden sich noch weitere, die in den Regulationsprozess involviert sein könnten und die zur Beschreibung der Treg herangezogen werden. Meist handelt es sich um weitere Rezeptoren der „tumor necrosis factor related gene“ Familie, wie zum Beispiel GITR und OX40. OX40 findet sich an der Zellmembran von aktivierten T-Zellen und aktivierten Treg. [116] Eine Aktivierung von OX40 auf CD4(+)CD25(+) T-Zellen führt zur einer Inhibition ihrer suppressiven Kapazität im Mausmodell [117].

Die suppressiven Mechanismen der Treg führen zu einer Proliferationshemmung von T-Zellen und einer Minderung in der Zytokinproduktion. Neben der Inhibition von CD4(+)CD25(-) T-Zellen sind Treg in der Lage „Natürliche Killerzellen“ (NK-Zellen) und CD8(+) T-Zellen in ihrer zytotoxischen Aktivität zu inhibieren [118]. Auch diese Inhibition wird durch direkte Zell-Zell Interaktion vermittelt [119]. Die physiologische Bedeutung von natürlichen regulatorischen CD4(+)CD25(+) T-Zellen liegt, dem Anschein nach, in einer Minimierung des Gewebes Schadens auf Kosten der Immunreaktion. So konnte im Tierversuch gezeigt werden, dass CD25(+) defiziente Tiere schwerer an Infektionskrankheiten und deren Folgen leiden

als die Kontrollgruppe [120]. Tregs kontrollierten nicht nur die antigenspezifischen T Zellen, sondern auch die weiteren Entzündungszellen. Im Magen-Darm-Trakt reguliert die natürliche Treg auch die Entzündungsreaktion durch den *Helicobacter pylori*. Eine Defizienz in der CD25(+) Population führt zwar zu einer verstärkten Eradikation des Erregers, jedoch ist der Schaden am Gewebe viel höher als mit Treg [121]. Es besteht die Möglichkeit, dass Tregs direkt von bakteriellen Produkten aktiviert werden. Im Mausmodell exprimieren diese Treg Zellen selektiv den Toll-like Rezeptor (TLR) -4,-5,-7 und -8. Die Aktivierung über den TLR 4 führt zu einem gesteigerten Überleben und Proliferation der Zellen. Für diesen Vorgang benötigen die murinen Treg nicht die Hilfe von Antigen präsentierenden Zellen (APC) oder anderen Zellen. Die Aktivierung erhöht den suppressiven Faktor um das zehnfache [122].

In weiteren Versuchen konnte gezeigt werden, dass Tregs in verschiedenen Organen den Schaden einer Entzündung auf Kosten der Abwehr minimieren. So könnte in der frühen Phase eine Entzündung die T-Zellen in die Infektion kontrollieren und in der zweiten Phase die Treg den Schaden an dem Gewebe minimieren. Tregs scheinen durch ihr Gleichgewicht eine wichtige Funktion in dem Entzündungsereignis einzunehmen. Neben der gewünschten Balance zwischen der Entzündung und der Hemmung durch CD25(+) Zellen, führt eine Depletion im Tiermodell zu einer besseren Immunität gegenüber viralen Infektionen. Treg können auch eine adäquate Antwort auf virale Erkrankungen verhindern, indem sie die Effizienz der CD8(+) Zellen beeinflussen. Bei HIV infizierten Mäusen zeigt sich eine Progression der Erkrankung assoziiert mit einer Zunahme der peripheren CD25(+) Zellen.

Beim Menschen scheint eine Immunität gegenüber dem HI- Virus unter der Kontrolle von CD25(+) Zellen zu liegen. Durch AIDS sinkt die CD4(+) Population und es kommt zu einer zunehmenden Immundysfunktion. Die Zugabe von CD25(+) Treg führt zu einem Anstieg der anti-HIV CD4(+) T-Zell Antwort. Die Suppression der Zellen ist abhängig von einem Zell-Zell-Kontakt und nicht von einem zytokinabhängigen Weg.

Nach der jetzigen experimentellen Datenlage spielen CD4(+)CD25(+) Tregs eine entscheidende Rolle in der Regulation von Immunreaktionen. Die

offenen Fragen, die sich aus dem Sachverhalt ergeben lauten: wieso kommt es zu einem Zusammenbruch der peripheren Toleranz und damit zu einer Entwicklung einer Autoimmunerkrankung? Und welche Faktoren tragen zu einer anscheinend fehlenden Suppression bei der Rheumatoiden Arthritis bei?

#### 4.4. Regulatorische CD8(+) T-Zellen in der Rheumatoiden Arthritis

Neben den überwiegend CD4(+) regulatorischen Lymphozyten findet man auch eine Population von CD8(+) regulatorischen Lymphozyten. Die Gruppierung ist sehr heterogen. Ähnlich wie CD4(+) Tregs werden sie im Thymus geschult und zeigen suppressive Fähigkeiten ähnlich den CD4(+) Treg und exprimieren an ihrer Oberfläche ebenfalls CD25[123].

Im peripheren Blut findet sich ebenfalls eine CD8(+)CD25(+) regulatorische T-Zelle.

Die regulatorischen CD8(+) T-Zellen besitzen keine zytolytische Funktion. Sie exprimieren konstitutiv CD69 und sind assoziiert mit CTLA-4 und FOXP3.

CD8(+)CD69(+)CTLA-4(+)FOXP3(+)Treg sind in der Lage die Produktion von IFN- $\gamma$  und die Proliferation von Lymphozyten zu suppressieren. Die Suppression wird über einen Zellkontakt abhängigen Mechanismus vollzogen. In dem Versuchsaufbau dieser Arbeit konnte auch gezeigt werden, das CD8(+)CD25(+) suppressiv in die kumulative IFN- $\gamma$  Frequenz eingreifen. Der suppressive Effekt kann nicht mit einer Erhöhung von IL-10 erklärt werden und könnte ähnlich wie für den für CD4(+)CD25(+) Treg beschriebenen Mechanismus auf Zellkontakt Inhibition beruhen.

Warum es bei den kompetenten Inhibitoren zu einer perpetuierten Entzündung kommt ist ungeklärt. Die Möglichkeit bestände, dass es sich um einen funktionellen Defekt der CD8(+) Treg handelt, oder dass es zu einer pathologischen Distribution zwischen Blut, Membran und Flüssigkeit kommt. Man findet CD8(+)CD69(+) Lymphozyten, die die phänotypischen Charakteristik der CD8(+) Treg erfüllen, später in der SF wieder. Eventuell findet man in dieser Population einen großen funktionellen Anteil der regulatorischen CD8(+) Population [124, 125]. Eine weitere Population von CD8(+) Treg finden sich bei „in vitro“ Versuchen. Sie zeichnen sich durch die Oberflächenmarker CD8(+)CD28(-)CD56(+) aus. Sie sind befähigt, Antigen-Präsentierende Zellen zu hemmen, und verhindern dadurch die Aktivierung von CD4(+) T-Lymphozyten. Suppressiv CD8(+) T-Lymphozyten verhindern die Produktion von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  und sorgen für die „down-regulation“ von costimulatorischen Molekülen auf Fibroblasten [126].

#### 4.5. CD4(+)CD25(+) regulatorische T- Lymphozyten in der Rheumatoiden Arthritis

Autoimmunerkrankungen entstehen nach heutiger Auffassung aus einem Zusammenbruch zentraler und peripherer Toleranzmechanismen. Es kommt zum Auftreten von selbst-reaktiven T-Zellen. Bezogen auf die periphere Regulation durch regulatorische Zellen müsste bei diesen Erkrankungen eine numerische oder funktionelle Defizienz vorliegen. Danke et al. konnten zeigen, dass eine Depletion der Treg zu einer Erhöhung von autoreaktiven T-Zellen „in vitro“ führt [127]. Eine Minderung der Anzahl von regulatorischen T-Zellen konnte „in vivo“ nicht bestätigt werden. Bei der multiplen Sklerose, der häufigsten neurologischen Erkrankung, findet sich kein Unterschied in der Frequenz der Treg im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe [128]. Es läge daher Nahe nach einem funktionellen Defekt der Treg zu fänden, der den Zusammenbruch der peripheren Toleranz erklärte. Untersuchungen an Patienten mit Rheumatoider Arthritis zeigten ein heterogenes Bild Betreff der Anzahl der Tregs im Blut. Einige Arbeitsgruppen konnten keinen Unterschied im Vergleich zu einem gesunden Kollektiv nachweisen [129], während andere eine Erhöhung der Treg Frequenz im Blut fanden [60].

Eine hohe Frequenz an Treg findet man in der Synovialflüssigkeit von affektierten Gelenken [60, 129]. Extrahierte Zellen zeigen volle Kompetenz in ihrem suppressiven Verhalten. Dennoch perpetuiert die Entzündung in den Gelenken.

In dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass autologe Treg aus peripherem Blut in der Lage sind, entzündungsfördernde Zytokine in ihrer Frequenz signifikant zu senken. Auch die an der Suppression in den Co- Kulturen CD4(+)CD25(-) und STC könnten induzierbare CD4(+)CD25(-) Treg beteiligt sein.

Des weiteren konnte nachgewiesen werden, dass ein geringer Anteil der CD4(+)CD25(+) Zellen sich in der Synovialmembran befindet und ein großer Anteil außerhalb der Membran. Nach den erhobenen Befunden müssten diese Zellen die rheumatische Inflammation unterbinden. Dennoch scheint die

Regulation inadäquat zu sein. Die Faktoren, die hier eine maßgebliche Rolle zu spielen scheinen, sind die Anzahl der Treg, die Funktion und ihre histologische anatomische Verteilung. Um diese Frage zu klären, müsste man zunächst feststellen oder postulieren, wo sich der Fokus der Inflammation in der Synovialmembran befindet. Würde man davon ausgehen, dass sich die Entzündung im Inneren der Membran abspielt, so würde die histologisch gesicherte, geringe numerische Menge an Treg nichts zu einer peripheren Toleranz beitragen können. Würde der Entzündungsschauplatz sich an der Membran-Flüssigkeitsgrenze befinden, könnte eine Verdichtung von Treg, seitens der Membran und der Synovialflüssigkeit, zu einer Minimierung der Inflammation führen. Eine weitere Hypothese ist, dass Tregs im Synovium durch inflammatorische Mediatoren inaktiviert werden. Ehrenstein et al. konnten zeigen, dass Treg in ihrer Funktion durch TNF- $\alpha$  eingeschränkt werden [130]. Diese Einschränkung in der Zytokinproduktion erklärt nur bedingt die regulatorische Defizienz. Die Blockade von TNF- $\alpha$  mittels anti- TNF- $\alpha$  IgG (Bsp. Adalimumab) führt zu einer Wiederherstellung der regulatorischen Funktion der Zellen. Diese Arbeit und einige weitere stehen im Widerspruch mit dieser Beobachtung [60, 129, 131, 132]. Hier konnte gezeigt werden, dass, unabhängig von der Behandlung des Patienten, Treg in der Lage sind, Zytokininhibition zu betreiben. Der funktionelle Unterschied könnte durch die Anzahl der Tregs im Synovium limitiert sein. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Treg in äquivalenten Mengen regulatorisch tätig sind. Das Verhalten dieser Zellen in geringer Konzentration zu Synovialzellen ist unbekannt. „In vivo“ könnten Zytokine in der Hemmung von Treg eine wichtige Rolle spielen. Im Bezug auf ihre histologische Verteilung könnte dieser Aspekt der Zytokinhemmung eine entscheidende Rolle spielen. Vorallem an jenen Strukturen, in denen die Konzentration von Zytokinen am höchsten sein kann, wie zum Beispiel in GCs durch CD8(+) und an der Membran-Synovialflüssigkeitsgrenze durch monozytäre Produzenten. CD4(+)CD25(+) Treg könnten in ihrer regulatorischen Kompetenz gehemmt werden, sprich ihre Fähigkeit der Inhibition der Zytokinproduktion partiell verlieren.

Eine weitere Regulation besteht über den T-Zellrezeptor (TCR) von CD4(+)CD25(+) Treg. Werden die Zellen mit einem starken Antigen aktiviert, sind sie höchstens 15 Stunden suppressiv aktiv. Eine Stimulation mit einem schwächeren Antigen erhöht ihre Aktivität auf 60 Stunden. Im Kontrast dazu besitzen Treg volle suppressive Kompetenz in Co-Kulturen mit stark aktivierten T Zellen, während sie in schwächer aktivierten Kulturen nur eine Dauer von 38- 60 Stunden regulatorisch aktiv sind [133]. Es besteht die Möglichkeit, dass dieser Mechanismus in der Rheumatoiden Arthritis einen weiteren Faktor darstellt, weshalb es zu einem peripheren Toleranzverlust kommt.

Nach der jetzigen erarbeiteten These besteht bei der Erkrankung der Rheumatoiden Arthritis nicht nur ein Zusammenhang zwischen Menge und Funktion von Th1 bzw. Treg, sondern auch zwischen ihrer Verteilung im Gelenk bzw. ihrer Lokalisation in der Synovialmembran. Eine Hypothese für eine perpetuierte Entzündung läge damit in der „pathologischen“ Distribution der Teilnehmer.

#### 4.6. Grundlegende Mechanismen der Gewebeeinfiltration

Die Leukozyten- Extravasion ist ein Prozess bestehend aus mehreren Schritten. Dieser Prozess beinhaltet die Interaktion mit adhäsions- und chemotaktischen Molekülen. Er gliedert sich in zufälligen Kontakt, sequenzielles Rolling, Adhäsion und Diapedese.

Bei fokalen Entzündungsreaktionen beginnen sich die am Gefäßendothel entlang rollenden Leukozyten abzuflachen, auszubreiten und fest an dem Endothel zu haften. In der weiteren Folge wandern die adhärennten Leukozyten zwischen den Endothelzellen hindurch aus dem Gefäß (Diapedese) und weiter chemotaktisch zum Ort der Entzündung.

Eingeleitet wird dieser Prozess durch die Freisetzung von Mediatoren (z.B. Sauerstoffradikale, TNF- $\alpha$ , IL-1) mit Aktivierung des Endothels im Bereich des entzündeten Gewebes. Die primäre Aktivierung des Endothels besteht aus der Expression von P-Selektinen und E-Selektinen. Bei Selektinen handelt es sich um Glykoproteine mit einer gemeinsamen Lektin-Domäne, welches Kohlenhydratketten der Glykokalix erkennen. P-Selektine und E-Selektine binden locker an Sialyl-Lewis<sup>x</sup>, ein Molekül, das konstitutiv an Leukozyten exprimiert wird. Dieser Prozess ermöglicht dem Leukozyt an der Gefäßwand entlang zu rollen.

In der zweiten Phase der Leukozytenrekrutierung kommt es dann unter dem Einfluss von den im geschädigten Gewebe produzierten Zytokinen (z.B. TNF- $\alpha$ , IL-1, IFN- $\gamma$ ) zu einer De-novo Expression von Adhäsionsmolekülen aus der Immunglobulinfamilie ICAM-1 /-2 und VCAM-1 am Endothel. Es kommt zusätzlich zur Aktivierung der Leukozyten, welche zur Expression von Leukozytenintegrinen führt (z.B. CD11/CD18) und die die Bindungspartner der Endothelintegrine darstellen. Die Bindung durch Integrine ist stabiler als die durch Selektine. Leukozyten können dadurch nicht mehr vom Blutfluss weg geschwemmt werden. Die Bindung wird in Gegenwart weiterer Zytokine und Chemokine verstärkt.

In der dritten Phase der Leukozyten- Endothel- Interaktion erfolgt dann die Diapedese der Leukozyten zwischen den Endothelzellen, unter Auflösung der Basalmembran. Leukozyten migrieren positiv chemotaktisch zum Ort der Entzündung [134].

Die Tatsache, dass in der Synovialmembran überwiegend Th1-Lymphozyten gefunden werden, lässt eine differente Rekrutierung vermuten.

Der initiale Beweis für die unterschiedliche Rekrutierung von T-Helferzellen gelang in der Studie von Austrup [135]. Er dokumentierte die unterschiedliche Expression von Selektinen auf den T-Helferzellen. Inflammatorische Th1 Zellen exprimieren mehr Selektine als Th2 Zellen, sodass Th1 Zellen leichter in inflammatorisches Gewebe infiltrieren können als Th2 Zellen. Die Möglichkeit, dass Th2 Zellen in entzündliches Gewebe eindringen ist begrenzt. Anders ist dies bei Th2 vermittelten allergischen Reaktionen, die charakterisiert sind durch Vasodilatation und Plasmaexsudation. Diese Bedingungen könnten den weniger affinen Selektinen der Th2 Zellen ein besseres Rolling auf dem Endothel ermöglichen. Neben den Selektinen spielt die Chemokinrezeptor- Verteilung eine entscheidende Rolle. CD4(+) T-Effektorzellen generieren in „in vitro“ Studien eine Vielzahl von Chemokinrezeptoren.

Präferentiell exprimieren Th1 Zellen CXCR3 und CCR5, während Th2-Zellen vor allem CCR3, CCR4 und CCR8 exprimieren. Unter Chemokinen subsumiert man eine Gruppe von chemotaktischen Zytokinen. Sie bilden eine Superfamilie von sekretorischen Proteinen mit einem Molekulargewicht unter 50 kDA. Das Charakteristikum von Chemokinen ist ihre Fähigkeit chemotaktisch auf Leukozyten zu wirken. Ihre Nomenklatur leitet sich aus dem Arrangement von Cystein (C) in der Proteinkette ab. Folgen zwei Cystein- Moleküle in der Proteinkette aufeinander, so gehört dieses Zytokin zur CC-Familie, liegt eine Aminosäure zwischen den Cystein- Molekülen, gehört das Zytokin zur CXC- Familie. Folgt CC oder CXC ein R, so handelt es sich um einen Chemokinrezeptor, folgt ein L handelt es sich um einen Ligand. Chemokinrezeptoren bestehen aus einem heptohelikalen Molekül, welches mit einem heterotrimeren G-Protein gekoppelt ist. Viele Rezeptoren akzeptieren mehrere Chemokine als Liganden. Die biologische Bedeutung ist unbekannt, jedoch garantiert die Überlappung eine schnellere Rekrutierung von Leukozyten. Im Allgemeinen rekrutieren Chemokine der CXC Familie Neutrophile. Chemokine der CC-Familie hingegen sind verantwortlich für die Anlockung von Lymphozyten und Basophile. In der Synovialmembran findet

man eine hohe Anzahl von T-Lymphozyten mit dem Phänotyp CCR5(+) und CXCR3(+), welche einem Th1 – Zellmuster entsprechen. Diese T-Lymphozyten müssen von Chemokinliganden am Endothel aktiviert worden sein, um ins inflammatorische Gewebe zu gelangen.

IL-10 produzierende Tr1 Lymphozyten exprimieren dieselben Chemokinrezeptoren wie Th1 Zellen. Sie sind CCR5 und CXCR3 positiv und können dadurch den inflammatorischen Th1 Zellen ins entzündete Gewebe folgen. Auf Grund dieser Tatsache könnten Tr1 Zellen die physiologischen Gegenspieler der Th1 Zelle sein. Tr1 Zellen könnten die Inflammation, nach Beseitigung des Antigens, eindämmen, indem sie durch die IL-10 Produktion die inflammatorische Zytokinproduktion von Th1 eindämmen.

Über den Chemokinbesatz von regulatorischen CD8(+) T-Zellen gibt es keine Literaturangaben. Sie könnten aber denselben Besatz besitzen wie zytotoxische CD8(+) T-Zellen (CTL) und diesen in die entzündete Membran folgen. Regulatorische CD4(+)CD25(+) T-Zellen besitzen auf ihrer Oberfläche die Rezeptoren CCR2, CCR8 und CXCR4. CXCR4 scheint in der Homöostase der CD4(+)CD25(+) Treg Verteilung eine besondere Rolle zu spielen. Im Knochenmark findet man ein großes Reservoir an CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) Treg. Die Einlagerung bzw. Freigabe der Treg beruht auf einem Gleichgewicht zwischen CXCL 12 und G-CSF. Produzieren die Stromazellen des Knochenmarks eine erhöhte Menge an CXCL12, werden Treg aus dem peripheren Blut in die Knochenmarksspeicher eingelagert. Kommt es im Markraum dagegen zu einer Erhöhung von G-CSF, werden die Speicher der Treg entleert [136]. Die unterschiedlichen Messergebnisse einiger Arbeitsgruppen über die Anzahl der Treg im peripheren Blut könnten mit der Kapazität der Knochenmarksspeicher in Verbindung stehen. Bei der RA findet man große Mengen an G-CSF im peripheren Blut. Hohe Mengen dieses Proteins könnten zu einer erhöhten Frequenz der Treg führen vice versa.

Neben der hohen Menge an G-CSF in der Rheumatoiden Arthritis findet sich am Endothel affektierter Gelenke die Expression von CXCL12. Treg werden durch CXCL12 (SDF-1) aktiviert und besitzen somit die Möglichkeit in die entzündete Synovialmembran über zu treten [137]. In der

Durchflusszytometrischen Analyse der Synovialmembran konnte bei 4 Patienten eine Frequenz von  $9,25 \pm 4,2$  % aller CD4(+) T-Zellen ermittelt werden. Bei 1 Probanden konnte keine regulatorischen T-Zellen nachgewiesen werden. Im Vergleich zur Flüssigkeit scheinen Treg unterrepräsentiert in der Membran zu sein. Ähnlich verhält es sich mit der Verteilung der CD8(+)CD25(+) Treg, die bei 2 Patienten mit einer Frequenz von  $0,78 \pm 0,69$ % gefunden wurden. Am Endothel entzündeter Gelenke kommt es also zu einem Sortierungsprozess, bei dem vor allem proinflammatorische Zellen (z.B. Th1) in die Membran geschleust werden. Dennoch treten auch regulatorischen Zellen, wenn auch in geringen Mengen (Tr1, CD4(+)CD25(+), CD8(+)CD25(+)) in die Membran über. Die durchflusszytometrische Frequenz von CD4(+)CD25(+) Treg ist in der Synovialflüssigkeit höher als in der Membran, sodass wahrscheinlich ein zweiter Sortierungsprozess innerhalb des Synoviums stattfindet bzw. dass die genannten Zellen weiter im Synovium migrieren.

#### 4.7. Transmigration durch das Synovium („Pseudoemperipolesis“)

Im Jahr 1999 wurde erstmals ein Mechanismus beschrieben, wie es B-Lymphozyten möglich ist, sekundäre Keimzentren im Synovium zu bilden. Typ B Fibroblasten ermöglichen den B-Lymphozyten die Bildung von sekundären Keimzentren, durch Expression von SDF-1.

In histologischen Schnitten lagern sich B-Zellen durch diesen Mechanismus neben diese Zellen. Im Vergleich zum Thymus, wo „nurse-cells“ Lymphozyten aufnehmen (Emperipolesis), bezeichnet man diesen Vorgang als Pseudoemperipolesis. Stromale Zellen haben „nurse-cell“-Qualität. Sie produzieren proinflammatorische Zytokine, in Form von IL-6, IL-8, G-CSF und GM-CSF. In der Co-Kultur mit B-Lymphozyten bilden diese Zellen zusätzlich TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  [138]. B-Lymphozyten benötigen für den Vorgang der Transmigration die Interaktion mit CD29 und CD49 [139]. Neben B-Lymphozyten können sich auch T-Zellen diesen Mechanismus zu Nutze machen. Die Fähigkeit der „Pseudoemperipolesis“ scheint den Typ B Synovialzellen eigen zu sein, denn auch Fibroblasten, gewonnen aus der Osteoarthritis besitzen diese Fähigkeit [140]. Typ B Synoviozyten scheinen SDF-1 über zu exprimieren. Diese Produktion findet überwiegend an der Grenze zur Flüssigkeit statt. Sie könnte Lymphozyten chemotaktisch an die Membran locken. Es sind dies vor allem jene Lymphozyten mit dem Rezeptor für SDF-1, dem CXCR4. CXCR4 findet sich auf aktivierten T-Zellen und auch auf CD4(+)CD25(+) Treg. Sind die Lymphozyten an der Membran angekommen, greift der Pseudoemperipolesismechanismus und die Lymphozyten begeben sich zwischen die Synoviozyten und verlassen das Synovium in Richtung Flüssigkeit. Besonders erfolgreich werden CD8(+) Lymphozyten aus der Membran geschleust. Man geht davon aus, dass dieser Mechanismus der Pseudoemperipolesis eine Eigenschaft der CD8(+) Lymphozyten ist. Dieser Vorgang erklärt möglicherweise die unterschiedliche Zusammensetzung an T-Lymphozyten zwischen den beiden Kompartimenten [141]. Hinweise auf diesen Sachverhalt ergeben sich aus der infrequenten Messung von CD8(+) Lymphozyten und der geringen Anzahl an CD4(+)CD25(+) im Synovium und einer großen Menge an CD8(+) und CD4(+)CD25(+) Treg in der Synovialflüssigkeit. In der Synovialflüssigkeit

könnten die Lymphozyten durch eine gesteigerte Expression von CXCR4 via TGF- $\beta$ 1 „gefangen“ werden, sodass ein Rückweg in die Synovialmembran unmöglich erscheint [142].

Es ergeben sich somit zwei Milieus, ein stark inflammatorisches und ein regulatorisches Milieu. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine Anreicherung von FoxP3(+)-Zellen an der Membran-Flüssigkeitsgrenze. Es läge nach der jetzigen Studienlage nahe, diesen oben genannten Mechanismus zu postulieren. Möglich wäre auch, unter der Annahme, dass sich die Inflammation vor allem an der Membran-Flüssigkeitsgrenze abspielte, eine gewollte Regulation in diesem Gebiet. Gegen diese Hypothese spricht aber, bei funktionstüchtigen Treg, die perpetuierte und progrediente Entzündung. Nach dem Konzept der „Pseudoemperipolesis“ und der Bildung von sekundären Keimzentren, liegt auch der Schluss nahe, dass sich auch dort Treg befinden. Immunhistologische Färbungen dieser Arbeit bestätigen diese Vermutung. Treg könnten dort regulatorisch auf die B-Lymphozyten eingreifen und dort die Bildung von Autoantikörpern und proinflammatorischen Zytokinen verhindern [72], wenn sie nicht durch die hohe Konzentration von IFN- $\gamma$ , produziert von CD8(+) T-Zellen, daran gehindert werden [63, 143].

Der physiologische Mechanismus Pseudoemperipolesis könnte dazu dienen, Leukozyten bei einer mikrobiellen Entzündung in den Gelenkbinnenraum zu befördern. Um einen ausgedehnten Schaden am Gelenkknorpel und den Binnenstruktur zu verhindern, transportieren Typ B Synoviozyten eine große Anzahl an regulatorische Lymphozyten mit in den Binnenraum. Liegt die Inflammation „intramural“ im Synovium, wie es bei der Rheumatoiden Arthritis postuliert wird, wäre dieser Mechanismus nutzlos könnte, im Gegenteil sogar, wegen seiner gewollten Distribution, zu einer Akzentuierung beitragen.

Die experimentelle Datenlage legt nahe, dass die Fehlverteilung von Zellen einen großen Beitrag zur Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis beisteuert. Dies erkennt man durch das Auflösen einer dieser Grenzbarrieren, wie

vergleichsweise in dieser Arbeit. Antiinflammatorische Aspekte werden durch die Epithelstrukturen der Membran zurückgehalten bzw. aussortiert.

Ein relativer Ausfall einer zweiten Gruppe von regulatorischen T-Zellen (Tr1) könnte zusätzlich zu einer fehlerhaften peripheren Toleranz beitragen.

## 4.8. Therapeutische Implikation

### 4.8.1 Modulation der Gewebeeinfiltration und Selektion von CD4(+)CD25(+) Treg Hemmung der Bildung von GCs (*arthritis remodelling therapy*)

CD4(+)CD25(+) Treg sind kompetente Zellen, um Entzündungszellen zu supprimieren und „Kollateralschäden“ am Gewebe zu verhindern. Dennoch scheint es, dass Treg auf Grund ihrer Eigenschaften aus dem Kompartiment Synovialmembran aussortiert werden. Eine therapeutische Möglichkeit wäre es, die Tregs im Kompartiment zu halten. Tregs exprimieren auf ihrer Oberfläche den CXCR4 Rezeptor, der sie mittels „Pseudoemperipolesis“ aus dem Synovium ausschleust. Eine therapeutische Möglichkeit bestünde in der Blockierung dieses Mechanismus. Laborchemische Experimente zeigen, dass Pertussistoxin ein kompetenter Hemmstoff dieses Transduktionsweges ist. Eine systemische Verabreichung ist auf Grund der immensen unerwünschten Nebenwirkungen nicht zu empfehlen. Möglicherweise ist auch eine gezielte Therapie mittels Pertussistoxin gekoppelten Antikörpern möglich. Es bestünde die Chance in der lokalen Applikation des Toxins in die peripheren Gelenke. Ob diese technisch machbar ist oder den theoretischen Benefit bringt, ist nicht bekannt.

Aus der hämatologischen Forschung ist das Pharmakon AMD3100 bekannt. Es unterbricht ebenfalls den Transduktionsweg von SDF-1/CXCR4 im Mausmodell und im Menschen [144]. Das Pharmakon AMD3100 wurde zur Stammzellliberation entwickelt. Da der Signalweg SDF-1/CXCR4 eine weitere wichtige Rolle in der Rheumatoiden Arthritis spielt, nämlich der Umverteilung der CD4(+)CD25(+) Treg und womöglich den Aufbau von sekundären Keimzentren, profitieren die Patienten theoretisch von zwei Effekten. Erstens werden CD4(+)CD25(+) Treg aus ihren Speichern entleert, es stehen damit mehr peripher zu Verfügung, und zweitens würde bei geeigneter Pharmakokinetik es zur Blockierung der „Pseudoemperipolesis“ kommen und mehr Zellen könnten in der Membran gehalten werden.

Ein weitere theoretischer Benefit wäre, dass synoviale Fibroblasten unter Mithilfe von CD8(+) T-Zellen keine „germinal centers“ bilden können und

somit die Bildung von Rheumafaktor und die Aktivierung von ortsständigen Zellen minimieren.

Neben der Verhinderung der Transmission dieser Zellen wird auch das Verhältnis der anderen Zellen verschoben werden. So würde man die Anzahl CD4(+) und CD8(+) Zellen im Synovium erhöhen. Die Erhöhung der zytotoxischen T Zellen könnte zu einer vermehrten Destruktion im Gewebe führen. Nach den Daten dieser Arbeit besteht die Möglichkeit, dass auch diese Zellen die Wirkung von inflammatorischen Zytokinen unterbinden. Dieses Pharmakon wäre eine theoretische Möglichkeit eine Auflösung von festen histologischen Kompartimenten zu bewerkstelligen.

Nachteilig für den Patienten könnte sich eine Erhöhung von weiteren inflammatorischen Zellen (neutrophile Granulozyten, etc.) im peripheren Blut auswirken. Auch die Auswirkung der Liberation von hämatogenen Stammzellen bleibt unbekannt. Ob es einen Benefit für den Patient mit Rheumatoider Arthritis nach dieser theoretischen Überlegung geben wird bleibt Gegenstand der Forschung.

#### 4.8.2. Steigerung der CD4(+)CD25(+) Treg Frequenz und Treg Aktivierung

Zou et al. konnten in ihrer Arbeit zeigen, dass das Knochenmark ein Reservoir von Tregs darstellt [136]. Ähnlich wie die Umverteilung in dem Synovium und in der Flüssigkeit wird die Rate der gespeicherten versus den abwanderten Tregs durch das Verhältnis SDF-1 zu G-CSF bestimmt. Doch wie funktioniert dieser Mechanismus beim Rheumatiker, der immer hohe Blutkonzentrationen von G-CSF hat? Vela-Ojeda et al. konnten zeigen, dass CD4(+)CD25(+) Treg durch eine intermittierende Gabe von rekombinaten humanen G-CSF mobilisiert werden [145]. Nach diesem Befund, der bei gesunden Probanden erhoben wurde, müsste in der Rheumatoiden Arthritis es, durch die kontinuierliche Anwesenheit von G-CSF, zu einer vollständigen Entleerung der Speicher kommen und zu einer Erhöhung im peripheren Blut. Da dies, wie einige Studien zeigen konnten nicht der Fall ist, könnte man für diesen Mechanismus ein „Escape“- Phänomen postulieren. Hohe Dosen von G-CSF führen damit nicht mehr zu einer Mobilisation von CD4(+)CD25(+) Treg.

Ehrenstein et al konnten zeigen, dass Treg in ihre Funktion suppremiert sind. Sie haben beim Rheumatiker die Fähigkeit, die Zytokinproduktion zu suppremierem, verloren. Nur die Blockierung des TNF- $\alpha$  mittels TNF- $\alpha$  Inhibitoren, konnten diesen Zustand überwinden. Interessant ist die Tatsache, dass nur TNF- $\alpha$  Inhibitoren mit Oberflächenaktivität diesen Zustand wiederherstellen. Es existieren auch anders lautenden Studien, die diesen Zusammenhang nicht sehen. In dieser Arbeit konnte auch gezeigt werden, dass diese Zellen bei allen Probanden aktiv waren, auch ohne TNF- $\alpha$  Inhibitor Therapie. Dennoch besteht also die Möglichkeit einer hemmenden Wirkung von inflammatorische Zytokine auf Tregs. Experimentelle Studien zeigen einen Zusammenhang zwischen IL-6 aus APCs und der regulatorischen Kapazität von CD4(+)CD25(+) Treg. Es scheint, dass in Inflammatorischen Gewebe möglich ist die CD4(+)CD25(+) Treg Funktion zu minimieren, bzw. partielle zu inhibieren. Nach der jetzigen Literatur spielen verschieden Zytokine, meist aus APC, eine grundlegende Rolle in der partiellen Inhibition von CD4(+)CD25(+) Treg. Treg könnten zunächst

physiologisch in ihre Fähigkeit inhibiert werden, um zunächst eine Eliminierung eines Antigens (mikrobiell etc.) mittels einer Inflammation nicht zu stören. Nach vollständiger Elimination könnten sie die Inflammation zum Abklingen bringen, um den Gewebeschaden zu minimieren.

Eine Möglichkeit der Therapie für eine perpetuierte Inflammation mit starker Suppression der Treg, läge in der Minimierung Zytokine, welche die Fähigkeit besitzen Treg Inhibierung besitzen. Nach der jetzigen Datengrundlage entspräche dieser Therapie eine Kombination aus anti-TNF- $\alpha$  und anti-IL-6.

Im Mausmodell zeigt sich auch eine Kontrolle der regulatorischen Funktion von CD4(+)CD25(+) Treg durch IFN- $\gamma$ . Die Autoren postulieren eine gegenseitige Beeinflussung von IFN- $\gamma$  und der CD4(+)CD25(+) Treg Funktion. Hohe Konzentration von IFN- $\gamma$  führen zu einer Verminderung der CD4(+)CD25(+) Treg Funktion vice versa [146]. Diese Arbeit konnte zeigen, dass die Synovialmembran eine basale Produktion von IFN- $\gamma$  besitzt und das Treg in die Membran vorhanden sind. IFN- $\gamma$  könnte somit auch zu einer Verminderung der CD4(+)CD25(+) Treg Funktion beitragen.

Eine Therapie mit anti-IFN- $\gamma$  Antikörpern könnte eine Steigerung der CD4(+)CD25(+) Treg Funktion bewirken und zu einem klinischen Benefit führen. Chatenoud et al. berichten, dass eine Aktivierung von murine CD4(+)CD25(+) Treg zu einer Erhöhung der regulatorischen Kapazität führt. Eine Behandlung mit OKT3 führt zu einer Erhöhung der TGF- $\beta$  produzierenden CD4(+)CD25(+) Treg im regionären Lymphknoten bei einem Diabetes mellitus Mausmodell [147]. In dieser Arbeit konnte keine Erhöhung der regulatorischen Kapazität gefunden werden, da es durch die Behandlung mit OKT3/anti-CD28 ebenfalls zu einer Aktivierung von Effektor CD4(+) T-Zellen, welche diesen Effekt im „Setting“ überspielen könnten.

Hormone, wie Östrogene und  $\alpha$ -MSH können zu einer Expandierung der CD4(+)CD25(+) Foxp3(+) Treg führen. Jedoch ist noch sehr wenig über den endogenen Mechanismus diesbezüglich bekannt. Demnach kann das vasoaktive Peptid (VIP), welches immunsuppressive Eigenschaften besitzt, auch funktionelle Treg induzieren. Die Gabe von VIP und einem spezifischen Antigen führt zur einer Expansion der CD4(+)CD25(+)FoxP-3(+)neuropilin1(+) Treg. Diese können unabhängig vom Zellkontakt die T-

Zellproliferation hemmen. Auch sind diese Zellen effizienter im Vergleich zu anderen induzierten Zellen [148].

Copolymer-1 ist ein Peptid, welches immun regulatorische Eigenschaften besitzt. Es wird vor allem in der Therapie der Multiplen Sklerose verwendet. Dieses Peptid ist in der Lage CD4(+)CD25(-) in CD4(+)CD25(+) Treg zu überführen. Es bedient sich der Aktivierung des FoxP3 Transkriptionsfaktor, um diesen Schritt zu vollziehen. Solche induzierten FoxP3(+) Zellen haben eine hohe Expression des Transskriptionsfaktors. An dieser Induktion könnte IFN- $\gamma$  beteiligt sein [149].

CD200 ist ein transmembranöses Protein, welches nach Erweiterung seines Rezeptors (CD200R) immunregulatorische Mechanismen vermittelt. Eine Behandlung von Knochenmarkzellen mit anti-CD200R2/3, IL-4 und G-CSF führt zu einer Differenzierung zu dendritischen Zellen, die in der Lage sind, CD4(+)CD25(+) Treg zu induzieren. Anti-CD200R2 augmentiert die Expression von Treg von anti-CD3/CD28 aktivierten T-Zellen [150]

FoxP3-retroviral transfizierte CD4(+)CD25(-) T-Zellen exprimieren eine Vielzahl von Zelloberflächenmarkern und intrazelluläre Moleküle, die mit der Aktivität von Treg assoziiert sind. Dieser Treg Phänotyp war stabil in „in vitro“ Kulturen. „In vitro“ waren diese Zellen funktionell anergisch und suppressiv. Bei „in vivo“ Versuchen konnten diese Zellen die Abstoßung von allogenen Transplantaten verhindern [151]. Die laborchemische Beeinflussung und Induktion von CD4(+)CD25(+)Treg ist sehr vielfältig. Das suppressive Potential dieser Zellen scheint „in vitro“ immens zu sein. Wie eine Beeinflussung der Zellen in der Klinik umgesetzt werden kann und ob damit ein Benefit für an Rheumatoider Arthritis erkrankte Menschen erreicht wird, ist Gegenstand der klinischen Forschung.

### 4.8.3. DMARDs

DMARD's sind essentieller Bestandteil der Therapie der RA. Der immunologische Effekt der einzelne DMARD ist heterogen.

Das am häufigsten verwendete DMARD ist das Methotrexat (MTX). In experimentellen Studien konnte für MTX eine Proliferationshemmung auf Lymphozyten, sowie eine Verminderung der Immunglobulinproduktion nachgewiesen werden. Histologische Untersuchungen zeigten eine Divergenz in der Morphologie der Synovialmembran zu Patienten, die an Stelle von MTX solitär mit NSAIDs behandelt wurden. Unter MTX Therapie findet sich eine Reduktion der CD3(+)-, der CD4(+)- und der HLA-DR(+)- Zellen. Im Blut findet sich unter MTX-Therapie ein Anstieg der IL-10 produzierenden Zellen [152]. Es führt ferner zu einer Verminderung der Anzahl von infiltrierenden Zellen in die Synovialmembran [153].

Eine neue Medikamentengruppe der DMARD sind Proteine gegen TNF- $\alpha$ , welche unter den Begriff der „biologicals“ subsumiert werden. Es handelt sich hierbei einerseits um soluble Rezeptoren sowie Antikörper andererseits. Mit Hilfe der anti-TNF- $\alpha$  Therapie konnte eine höhere Remissionsrate erreicht werden [154]. Durch die Blockierung des TNF- $\alpha$  Signalwegs könnte es theoretisch zu einer Erhöhung der anti-inflammatorischen Zytokinen, wie z.B. IL-10 kommen. In dieser Arbeit konnte eine Erhöhung des Mittelwertes der Interleukin-10 Frequenz gezeigt werden, im Gegensatz zu eine konventionellen DMARD Therapien.

Finnische Studien zeigten, dass MTX das häufigste DMARD in der Therapie der Rheumatoiden Arthritis ist. Eine Kombination bestand meist mit Sulfasalazin und/oder Hydroxychloroquin. Leflunomid oder Azathioprin kombiniert mit Kortikoidsteroiden erhalten die meisten Patienten anstelle von MTX. Das Ergebnis der finnischen Studie zeigt, dass diese Kombinationen den gleichen klinischen Effekt besitzen, wie Infliximab und MTX. Es scheint, dass die Kombination von DMARDs zu einer effektiveren Therapie führt und besser ist als MTX oder Infliximab allein [155]. Eine Metaanalyse von Choy et al. zeigte, dass eine kombinierte DMARD Therapie effizienter ist als eine Monotherapie, obwohl das Toxizitätsrisiko leicht erhöht ist [156]. In dieser Arbeit wurde die kumulative IFN- $\gamma$  und Interleukin-10 Frequenz mit der

aktuellen Therapie der Patienten verglichen. Patienten mit einer intensivierten DMARD Therapie zeigten in den ELISPOT-Assays eine geringe Frequenz beider Zytokine. Eine Therapie mit mehreren DMARDs scheint die Funktion der Produzenten, welche fast ausschließlich Lymphozyten sind, stark zu beeinträchtigen. Theoretisch würde dies bedeutet, dass man mit einer solchen Therapie eine gewünschte Reduktion der pro-inflammatorischen Zytokine erreichen kann, jedoch auf Kosten einer reduzierten anti-inflammatorischen Zytokinkonzentration. Im Gegensatz dazu würden anti-TNF- $\alpha$  Inhibitoren dies erfüllen. Durch die Wegnahme des TNF- $\alpha$  kommt könnte es zu einer ausschließlichen Erhöhung der anti-inflammatorischen IL-10 kommen.

#### 4.9. Klinische Aktivität und Zytokinproduktion innerhalb des Synoviums

Die Auswertung der klinischen Daten zeigt eine tendenzielle Abnahme der IFN- $\gamma$  Frequenz und signifikante Zunahme des Interleukin- 10 mit steigender Erkrankungsdauer. Bezogen auf CD4(+)/CD25(+) Treg ist die Studienlage ist zu diesem Thema widersprüchlich. Tsaknaridis et al. konnten eine funktionelle Minderung der CD4(+)/CD25(+) Treg mit dem Alter nachweisen [157]. Die Frequenz der peripheren CD4(+)/CD25(+) Treg nimmt mit dem Alter nicht ab, sondern steigt sogar an [158]. Aus den Daten könnten sich folgende Thesen ableiten lassen. Entweder findet eine Minderung der Th1 Frequenz/Antwort statt oder eine Wiedergewinnung einer peripheren Toleranz. Eine Wiedergewinnung der peripheren Toleranz wäre durch eine Erhöhung der CD4(+)/CD25(+) Treg Aktivität denkbar. Wie oben erwähnt, könnte die Hemmung der CD4(+)/CD25(+) Treg Aktivität durch IFN- $\gamma$  wegfallen und eine denkbare Erhöhung der Tr1- like Zellen stattfinden, welche wiederum für die Erhöhung der Interleukin- 10 Frequenz verantwortlich wäre. Ebenso ist natürlich auch eine Minderung der Th1 Antwort an sich denkbar.

Welcher der Mechanismen den größten Beitrag zur Minderung der IFN- $\gamma$  Frequenz beiträgt ist unbekannt.

Neben dem Aspekt der Dauer der Erkrankung spielt auch das Geschlecht eine wichtige Rolle. Epidemiologisch sind Frauen häufiger betroffen als Männer. Nach einer Studie von Tengstrand et al. sind Frauen stärker betroffen, stratifiziert nach DAS28(3V), als Männer. Ihr Erkrankungszeitpunkt ist früher. Im zweijährigen Verlauf hatten Frauen höhere Erkrankungsaktivität als Männer [159]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass kein geschlechtlicher Unterschied in der IFN- $\gamma$  Frequenz der Synovialmembranzellkulturen zu finden ist. Die unterschiedliche Klinik ließe sich womöglich durch ein unterschiedliches Ansprechen der Zellen auf IFN- $\gamma$  erklären. Die differente Zusammensetzung der Sexualhormone könnte im Zusammenhang stehen. Östrogene wirken auf das Immunsystem in verschiedener Weise. Es bewirkt als Immunmodulator eine Verschiebung der Immunantwort von einer Th1 polarisierten zu einer Th2 [160, 161]. Gleichzeitig fördert es die Proliferation der CD8(+)-Zellen [162], in welchen

das Östrogen eine höher Affinität besitzt [163]. Die unterschiedliche Antwort wird auch durch eine differente Ausprägung der beiden Östrogenrezeptoren bewirkt. So finden sich in sekundären Lymphgeweben eine höhere Ausprägung des Östrogenrezeptors beta [164]. Ferner beeinflusst Östrogen Makrophagen und B-Zellen.

Neben der Beeinflussung von den oben genannten Effektorzellen führen Östrogene auch zur Expansion von CD4(+)CD25(+) Treg. Überraschend ist jedoch das dieser immunmodulatorischer Effekt in den funktionellen Tests, durch eine Suppression des IFN- $\gamma$  nicht zum tragen kommt. Nach der oben aus geführten These könnte die gleichzeitig Induktion und Proliferation kompetenter IFN- $\gamma$  Produzenten diesen Vorteil wettmachen, da ihr Produkt zu einer Hemmung der CD4(+)CD25(+) Treg Funktion führt.

Testosteron und Androgene hingegen könnte durch ihren immunsuppressiven Charakter diesen Nachteil partiell ausgleichen [165].

Zur Stratifizierung der Krankheitsaktivität werden der DAS28 Score und Akute- Phase Proteine verwendet. Eines der häufigsten verwendeten Entzündungsmarker ist das CRP. CRP besteht aus fünf identischen Untereinheiten in Form eines fünfgliedrigen Rings. Es wird in den Hepatocyten, induziert durch pro-inflammatorische Zytokine (IL-1, IL-6), gebildet [166]. Eine Korrelation zwischen den im Synovium gebildeten Zytokine Interleukin- 10, IFN- $\gamma$  und CRP zeigt für die Rheumatoide Arthritis und die Osteoarthrose einen unterschiedlichen Zusammenhang.

In der Osteoarthrose findet man eine positive Korrelation zwischen den beiden Parametern CRP und IFN- $\gamma$ . Einen Zusammenhang mit Interleukin- 10 besteht nicht. Vice versa verhält es sich bei der Rheumatoiden Arthritis. Mit Hilfe dieses Zusammenhangs könnte man durch die routinemäßig bestimmten Parameter das Zytokinmilieu innerhalb der Synovialmembran bestimmen. In der Literatur findet sich widersprüchliche Korrelationen zwischen CRP und zirkulierenden Interleukin- 10 in der Rheumatoiden Arthritis [167, 168].

Überraschend ist dennoch eine positive Korrelation zwischen dem intrasynovialen IL-10 und den proinflammatorisch getriggerten CRP.

Innerhalb des Synovialmembrans scheint eine Erhöhung der proinflammatorischen Aktivität Hand in Hand mit einer Erhöhung der antiinflammatorischen zu gehen. Gemäß dem Postulat des negativen Regelkreises müsste eine weitere Progression dadurch verhindert werden.

Da die Messung des zirkulierende Interleukin- 10 klinisch nicht möglich ist und zu widersprüchlichen Aussagen führt, könnte bei geeigneter Evaluierung dieses Befundes eine Möglichkeit bestehen, IL-10 im Synovium zu messen. Ein ähnlicher Befund findet sich bei einer Korrelation zwischen IL-10 und den DAS28. Ein hoher DAS28 Score zeigt auch hier eine hohe Frequenz innerhalb der Synovialzellmembrankultur an. Im Gegensatz dazu findet sich eine Erniedrigung des IFN- $\gamma$ . Im Zug eines negativen Feedbacks – Mechanismus müsste eine hohe Interleukin- 10 Produktion das IFN- $\gamma$  senken. Kawashima et al. konnten auf mRNA-Ebene zeigen, dass Patienten mit hoher Krankheitsaktivität eine niedrige IFN- $\gamma$  und T-bet Expression im peripheren Blut aufweisen [169]. Durchflusszytometrische Messungen dieser Arbeit zeigen eine Erhöhung der CD3(+) Fraktion beim Anstieg der klinischen Aktivität, ohne gleichzeitigen Anstieg der Treg. Theoretisch könnte die infiltrierte CD3(+) Fraktion für den Anstieg des IL-10 verantwortlich sein. Die intrasynoviale IL-10 Konzentration wäre in diesem Fall ein Marker für die Aktivität innerhalb des Synoviums und der Progression der Erkrankung [170].

Immunhistologische Färbungen dieser Arbeit haben eine dezente Anreicherung von CD4(+)CD25(+) Treg in den GCs zeigen können. Es ist jedoch bekannt, dass IFN- $\gamma$  die regulatorische Fähigkeit von Treg partiell herunterreguliert [143]. CD4(+)CD25(+) Treg sind dadurch nicht in der Lage die Aktivierung von T-Zellen und B-Zellen zu verhindern. Eine Verminderung von IFN- $\gamma$  in den Follikeln könnte theoretisch zu einer Erhöhung der regulatorischen Kapazität in diesen Strukturen beitragen. Möglicherweise spielt dieser Sachverhalt auch eine Rolle in der Präsenz des Rheumafaktors bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis. Ein Ergebnis dieser Arbeit ist der signifikante Unterschied in der IFN- $\gamma$  Frequenz abhängig vom Rheumafaktor. Das Patientenkollektiv mit positivem Rheumafaktor hatte eine höhere IFN- $\gamma$  Frequenz als das Kollektiv mit negativem Rheumafaktor. Der Rheumafaktor

wird vor allem in den Lymphfollikeln in der Synovialmembran gebildet. Nach der jetzigen Überlegung würde hier eine fehlende Regulation durch CD4(+)CD25(+) Treg zu Grunde liegen, die durch eine hohe Produktion von IFN- $\gamma$  seitens der CD8(+) T-Zellen bedingt sein könnte. Dies könnte ein weitere Mosaikstein sein, das zu dem Bild beiträgt, warum Rheumafaktor positive Patienten einen klinisch progredienteren Verlauf haben als Rheumafaktor negative Patienten. Auch im Hinblick auf die juvenile Rheumatoide Arthritis (JCA) könnte dies eine Rolle spielen, da bei dieser Erkrankung in den meisten Fällen kein Rheumafaktor vorhanden ist. Vielleicht liegt in dieser Tatsache eine Möglichkeit, warum die JCA in einer Großzahl der Fälle zur Remission führt. Umgekehrt wäre eine Akzentuierung der Inflammation, mit daraus folgender IFN- $\gamma$  Produktion durch die Anwesenheit des Rheumafaktors denkbar.

## 5. Zusammenfassung

T-Lymphozyten spielen eine entscheidende Rolle in der Pathophysiologie der Rheumatoiden Arthritis. Sie fördern einerseits die perpetuierende Entzündung innerhalb der Membran und besitzen andererseits die Fähigkeit auf die Inflammationen regulativ bzw. suppressiv zu wirken.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob entzündungsfördernde T-Zellprodukte und regulatorische T-Zellpopulationen innerhalb der Synovialmembran nachweisbar sind, und wie unstimulierte periphere T-Zellen auf Synovialmembranzellen „in vitro“ reagieren.

Innerhalb der Synovialmembran konnte eine Population von CD4(+)CD25(+) regulatorischen T-Zellen (Tregs) durchflusszytometrisch nachgewiesen werden. Immunhistochemische Analysen des Gewebes konnten eine Akkumulation dieser Zellen innerhalb von Sekundärfollikeln des Synovialmembrans nachweisen.

Die ELISPOT-Analyse ausgewählter Zytokine resultierte in der Detektion immunsuppressiver (IL-10) und immunstimulatorischer Zytokine in Synovialmembranzellkultur. Hier konnte erstmalig eine autologe IFN- $\gamma$  Produktion auf Proteinebene nachgewiesen werden. Klinische Betrachtungen der IFN- $\gamma$  Produktion zeigten eine starke Assoziation mit dem Rheumafaktor. Zusätzlich findet sich eine tendenzielle Abnahme der immunstimulatorischen Kapazität mit der Dauer der Erkrankung.

Eine Betrachtung der intrasynovialen IL-10 Produktion unter Berücksichtigung des klinischen Entzündungsparameter CRP, zeigt einen starken Zusammenhang zwischen den beiden Parametern.

ELISPOT Analysen einer Co-Kultur zwischen autologen CD4(+) und CD8(+) PBMCs und Synovialmembranzellen ergaben eine Abnahme der autologen IFN- $\gamma$  Produktion ohne Zunahme der Interleukin-10 Produktion. Eine Aktivierung der Zellkultur lässt diesen Effekt verschwinden. Durch Aufreinigung der PBMCs konnte der stärkste suppressive Effekt innerhalb der CD4(+)CD25(+) T-Zellfraktion nachgewiesen werden, welcher marginal durch Aktivierung der Zellkultur unterbrochen werden konnte.

Regulatorische Effekte konnten auch innerhalb der CD8(+) T-Zellfraktion dokumentiert werden, welche sich aber durch spezifische anti-CD3 Ab und anti-CD28 Ab Aktivierung verliert.

Die Beeinflussung der suppressiven Eigenschaften von T-Zellen bzw. ihrer spezialisierten T-Zellpopulationen könnte in Zukunft zu einer besseren Therapie der Rheumatoiden Arthritis führen.

## Abstract

**Objective:** Rheumatoid arthritis is characterized by infiltration and accumulation of T lymphocytes in inflamed synovial membranes. Cytokine production is a surrogate marker of activated T cells, especially Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) for effector T cells and Interleukin – 10 (IL-10) for cells with regulatory capacity. Here we primarily aimed to detect IFN- $\gamma$  and IL- 10 secretion in synovial membrane cell cultures and their modulation by co-culture autologous peripheral blood lymphocytes with a special regard to CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells (Treg). Secondary we aim detection and distribution of Treg within synovial tissue.

**Methods:** Synovial membrane materials from 19 RA and 5 OA patients undergoing joint surgery were collected and on the one hand kept for immunohistochemistry and on the other dissected and digested by collagenase for functional examination. The following day, obtained tissue cells were characterized by flow cytometrie and incubated in anti- IFN- $\gamma$  and anti- IL-10 coated 96 well ELISPOT plates for 36 h under basal conditions or by adding autologous peripheral CD4(+) -, CD8(+) - T cell subsets or Tregs.

**Results:** Synovial tissue cell culture (STC) consists of a mixture of infiltrated and local cells. CD4(+)CD25(+) Treg are detectable ( $7.42\% \pm 6.71$ ) within this mixture. Immunohistochemistry studies show FOXP3(+)Treg accumulation within germinal centers of synovial membrane and sparely distribution in sublining tissue.

Functional analysis of RA synovial tissue cells shows IFN- $\gamma$  production under basal conditions ( $64.59 \pm 72.50$ ; CI: 20.8 – 108.4) also RA – STC produces IL -10 ( $217.75 \pm 210.0$ , CI: - 43.13 – 478.63). Intrasynovial cytokine production correlates with clinical parameters, especially CRP and IL -10.

Addition of CD4(+) peripheral blood cells reduces IFN-  $\gamma$  production ( $38.79 \pm 65.51$ , CI: - 2.83 – 80.41,  $p < 0.01$ ) without increasing IL-10 production ( $206.10 \pm 215.21$ , CI: - 61.12 – 473.32). Furthermore added CD8(+) PB reduces IFN- $\gamma$  ( $40.73 \pm 56.51$  CI: 6.65- 74.88,  $p < 0.05$ ) and IL-10

production ( $86.33 \pm 59.08$ , CI: - 60.43 – 233.09). In contrast, anti-CD3/anti-CD28 activated CD4(+) respectively CD8(+) STC co-cultures lose their cytokine suppressive ability.

More important, CD4(+)CD25(+) Treg strongly suppresses IFN- $\gamma$  production in STC co-culture ( $3.5 \pm 4.33$ , CI: -7.25 – 14.24,  $p < 0.05$ ) without increasing IL-10. However, activation of this co-culture with anti-CD3/anti-CD28 doesn't seem to influence their suppressive capacity. CD8(+)CD25(+) T cells shows also a strongly suppression of cytokine productions in STC co-cultures.

**Conclusion:** IFN- $\gamma$  is produced in synovial membrane and could cause a positive feedback mechanism which could lead in a perpetuating inflammation. Regulatory T cells are detectable within synovial membrane. Tregs isolated from blood are very potent inhibitors of IFN- $\gamma$  produced by synovial membrane cells in vitro. Other T lymphocytes subsets like CD8(+) show also regulatory ability in vitro.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Harvey J, Arnett FC, Bias WB, Hsu SH, Stevens MB: **Heterogeneity of HLA-DR4 in the rheumatoid arthritis of a Chippewa band.** *J Rheumatol* 1981, **8**(5):797-803.
2. Darmawan J, Muirden KD, Valkenburg HA, Wigley RD: **The epidemiology of rheumatoid arthritis in Indonesia.** *Br J Rheumatol* 1993, **32**(7):537-540.
3. Del Puente A, Knowler, W.C., Pettit, D.j., Benenett, P.H.: **High incidence and prevalence of rheumatoid arthritis in Pima Indians.** *Am J Epidemiol* 1989, **129**:1170-1178.
4. Scott DL SD, Coulton BL, Popert AJ.: **Long-term outcome of treating rheumatoid arthritis: results after 20 years.** *Lancet* 1987, **1**:1108-1111.
5. Merkesdal S, Ruof J, Schoffski O, Bernitt K, Zeidler H, Mau W: **Indirect medical costs in early rheumatoid arthritis: composition of and changes in indirect costs within the first three years of disease.** *Arthritis Rheum* 2001, **44**(3):528-534.
6. Pincus T, Callahan LF: **Taking mortality in rheumatoid arthritis seriously--predictive markers, socioeconomic status and comorbidity.** *J Rheumatol* 1986, **13**(5):841-845.
7. Ritchie DM, Boyle, J.A., McInnes, J.N., Jasani, M.K., Dalakos, T.G. Grieson, P., Buchanan W.W.: **Clinical studies with an articular index for the assesment of joint tenderness in patients with rheumatoid arthritis.** *Q J Med* 1968, **37**:393-406.
8. Bland J: **Rheumatoid arthritis of the cervical spine.** *J Rheumatol* 1974, **1**:319-342.
9. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS *et al*: **The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 1988, **31**(3):315-324.
10. Hurd ER: **Extraarticular manifestations of rheumatoid arthritis.** *Semin Arthritis Rheum* 1979, **8**(3):151-176.
11. Bennett GA, Zeller, J.W., Bauer W.: **Subcutaneous nodules of rheumatoid arthritis and rheumatic fever: A pathologic study.** *Arch Pathol* 1940, **30**:70-89.
12. Duke-Elder S: **System of Ophthalmology, Volume 15, Summary of Systemic Ophthalmology**, vol. 15. Mosby, St Louis, Missouri: Duke-Elder, S., Soley, R.E.; 1976.
13. Jacoby RK, Jayson MI, Cosh JA: **Onset, early stages, and prognosis of rheumatoid arthritis: a clinical study of 100 patients with 11-year follow-up.** *Br Med J* 1973, **2**(5858):96-100.
14. Masi AT: **Articular patterns in the early course of rheumatoid arthritis.** *Am J Med* 1983, **75**(6A):16-26.
15. [<http://www.das-score.nl/www.das-score.nl/>]
16. Resnick D NG: **Rheumatoid arthritis and the seronegative spondylarthropathies: radiographic and pathologic concepts**, vol. 2. Philadelphia: WB Saunders Company; 1998.
17. van der Heijde DDT, Niemann F, Rau R, Boers M: **Reliability and sensitivity to change of a simplification of the Sharp/van der Heijde radiological assesment in rheumatoid arthritis.** *Rheumatology (Oxford)* 1999, **38**:941-947.

18. Rau R WS, Herborn G, Stucki G, Gebler A: **A new method of scoring radiographic change in rheumatoid arthritis.** *J Rheumatol* 1998, **25**:2094-2107.
19. Larsen A TJ: **Hand radiography of 200 patients with rheumatoid arthritis repeated after an interval of one year.** *Scand J Rheumatol* 1987, **22**:395-401.
20. Sharp JT LM, Collins LC, Moreland J: **Methods of scoring the progression of radiologic changes in rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 1971, **14**:706-720.
21. Sharp JT YD, Bluhm GB, Brook A, Brower AC: **How many joints in the hands and wrists should be included in a score of radiologic abnormalities used to assess rheumatoid arthritis?** *Arthritis Rheum* 1985, **1985**(28):1326-1335.
22. Genant H: **Methods of assessing radiographic change in rheumatoid arthritis.** *Am J Med* 1983, **75**:35-47.
23. Wordsworth BP, Stedeford J, Rosenberg WM, Bell JI: **Limited heterogeneity of the HLA class II contribution to susceptibility to rheumatoid arthritis is suggested by positive associations with HLA-DR4, DR1 and DRw10.** *Br J Rheumatol* 1991, **30**(3):178-180.
24. Aho K, Koskenvuo M, Tuominen J, Kaprio J: **Occurrence of rheumatoid arthritis in a nationwide series of twins.** *J Rheumatol* 1986, **13**(5):899-902.
25. Wagner U, Kaltenhauser S, Sauer H, Arnold S, Seidel W, Hantzschel H, Kalden JR, Wassmuth R: **HLA markers and prediction of clinical course and outcome in rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 1997, **40**(2):341-351.
26. Ollier W, Thomson W, Welch S, de Lange GG, Silman A: **Chromosome 14 markers in rheumatoid arthritis.** *Ann Rheum Dis* 1988, **47**(10):843-848.
27. Malhotra R, Wormald MR, Rudd PM, Fischer PB, Dwek RA, Sim RB: **Glycosylation changes of IgG associated with rheumatoid arthritis can activate complement via the mannose-binding protein.** *Nat Med* 1995, **1**(3):237-243.
28. Wordsworth P, Pile K: **Genetic modelling in rheumatoid arthritis: cat walk or tight rope?** *Br J Rheumatol* 1994, **33**(5):409-410.
29. Haynes BF, Miller, S.E., Plaker, T.J., Moore, J.O., Dunn, P.H., Bolognesi, D.P., Metzgar, R.S.: **Identification of human T cell leukemia virus in a Japanese patient with adult T cell leukemia and a lymphomatous vasculitis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983, **80**:2054-2058.
30. Sato K, Maruyama, Y., Kitajama, I., Nakajama, Y., Higaki, M., Yamamoto, K., Miyasaka, N., Osame, M., Nishioka, K.: **Arthritis in patients infected with human T lymphotropic virus type I. Clinical and immunopathologic features.** *Arthritis Rheum* 1991, **34**:714-721.
31. Barland P, Novikoff AB, Hamerman D: **Electron microscopy of the human synovial membrane.** *J Cell Biol* 1962, **14**:207-220.
32. Vollertsen RS, Conn DL: **Vasculitis associated with rheumatoid arthritis.** *Rheum Dis Clin North Am* 1990, **16**(2):445-461.
33. Weinberg JB, Pippen AM, Greenberg CS: **Extravascular fibrin formation and dissolution in synovial tissue of patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 1991, **34**(8):996-1005.
34. Dreher R: **Origin of synovial type A cells during inflammation. An experimental approach.** *Immunobiology* 1982, **161**(3-4):232-245.

35. Yanni G, Whelan A, Feighery C, Fitzgerald O, Bresnihan B: **Morphometric analysis of synovial membrane blood vessels in rheumatoid arthritis: associations with the immunohistologic features, synovial fluid cytokine levels and the clinical course.** *J Rheumatol* 1993, **20**(4):634-638.
36. Kohem CL, Brezinschek RI, Wisbey H, Tortorella C, Lipsky PE, Oppenheimer-Marks N: **Enrichment of differentiated CD45RBdim,CD27-memory T cells in the peripheral blood, synovial fluid, and synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 1996, **39**(5):844-854.
37. Krenn V, Morawietz L, Haupl T, Neidel J, Petersen I, Konig A: **Grading of chronic synovitis--a histopathological grading system for molecular and diagnostic pathology.** *Pathol Res Pract* 2002, **198**(5):317-325.
38. Tak PP, Smeets TJ, Daha MR, Kluin PM, Meijers KA, Brand R, Meinders AE, Breedveld FC: **Analysis of the synovial cell infiltrate in early rheumatoid synovial tissue in relation to local disease activity.** *Arthritis Rheum* 1997, **40**(2):217-225.
39. Choy E, Panayi, G.S. : **Mechanisms of Disease: Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis.** *N Engl J Med* 2001, **344**:907-916.
40. Romagnani S: **T- cell subsets and cytokines.** In: *The Autoimmune Diseases.* vol. 3. San Diego, California, USA: Noel R. Rose, Ian R. Mackay 1998
41. Young CL, Adamson TC, 3rd, Vaughan JH, Fox RI: **Immunohistologic characterization of synovial membrane lymphocytes in rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 1984, **27**(1):32-39.
42. Ratcliffe LT, Lukey PT, Meyers OL, Ress SR: **Prostanoid modulation of synovial antigen-specific CD4+ T-cell cytotoxic function in rheumatoid arthritis.** *Br J Rheumatol* 1995, **34**(2):113-120.
43. Janossy G, Panayi G, Duke O, Bofill M, Poulter LW, Goldstein G: **Rheumatoid arthritis: a disease of T-lymphocyte/macrophage immunoregulation.** *Lancet* 1981, **2**(8251):839-842.
44. Kurosaka M, Ziff M: **Immunoelectron microscopic study of the distribution of T cell subsets in rheumatoid synovium.** *J Exp Med* 1983, **158**(4):1191-1210.
45. Poulter LW, Duke O, Panayi GS, Hobbs S, Raftery MJ, Janossy G: **Activated T lymphocytes of the synovial membrane in rheumatoid arthritis and other arthropathies.** *Scand J Immunol* 1985, **22**(6):683-690.
46. Forre O, Dobloug JH, Natvig JB: **Augmented numbers of HLA-DR-positive T lymphocytes in the synovial fluid and synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis and juvenile rheumatoid arthritis: in vivo-activated T lymphocytes are potent stimulators in the mixed lymphocyte reaction.** *Scand J Immunol* 1982, **15**(2):227-231.
47. Konttinen YT, Reitamo S, Ranki A, Hayry P, Kankaanapaa U, Wegelius O: **Characterization of the immunocompetent cells of rheumatoid synovium from tissue sections and eluates.** *Arthritis Rheum* 1981, **24**(1):71-79.
48. Carson DA, Chen, P.P., Kipps, T.J.: **New roles for rheumatoid factor.** *J Clin Invest* 1991, **87**:379-383.
49. Tarkowski A, Klareskog L, Carlsten H, Herberts P, Koopman WJ: **Secretion of antibodies to types I and II collagen by synovial tissue cells in patients with rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 1989, **32**(9):1087-1092.

50. Firestein GS, Alvaro-Gracia JM, Maki R: **Quantitative analysis of cytokine gene expression in rheumatoid arthritis.** *J Immunol* 1990, **144**(9):3347-3353.
51. Mulherin D, Fitzgerald O, Bresnihan B: **Synovial tissue macrophage populations and articular damage in rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 1996, **39**(1):115-124.
52. Liu MF, Kohsaka H, Sakurai H, Azuma M, Okumura K, Saito I, Miyasaka N: **The presence of costimulatory molecules CD86 and CD28 in rheumatoid arthritis synovium.** *Arthritis Rheum* 1996, **39**(1):110-114.
53. Merville P, Dechanet J, Desmouliere A, Durand I, de Bouteiller O, Garrone P, Banchereau J, Liu YJ: **Bcl-2+ tonsillar plasma cells are rescued from apoptosis by bone marrow fibroblasts.** *J Exp Med* 1996, **183**(1):227-236.
54. Dechanet J, Merville P, Durand I, Banchereau J, Miossec P: **The ability of synoviocytes to support terminal differentiation of activated B cells may explain plasma cell accumulation in rheumatoid synovium.** *J Clin Invest* 1995, **95**(2):456-463.
55. Yellin MJ, Winikoff S, Fortune SM, Baum D, Crow MK, Lederman S, Chess L: **Ligation of CD40 on fibroblasts induces CD54 (ICAM-1) and CD106 (VCAM-1) up-regulation and IL-6 production and proliferation.** *J Leukoc Biol* 1995, **58**(2):209-216.
56. Hino K, Shiozawa S, Kuroki Y, Ishikawa H, Shiozawa K, Sekiguchi K, Hirano H, Sakashita E, Miyashita K, Chihara K: **EDA-containing fibronectin is synthesized from rheumatoid synovial fibroblast-like cells.** *Arthritis Rheum* 1995, **38**(5):678-683.
57. Shiozawa K, Shiozawa S, Shimizu S, Fujita T: **Fibronectin on the surface of articular cartilage in rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 1984, **27**(6):615-622.
58. Shi HZ, Qin XJ: **CD4CD25 regulatory T lymphocytes in allergy and asthma.** *Allergy* 2005, **60**(8):986-995.
59. [www.sigmaaldrich.de]
60. van Amelsfort JM, Jacobs KM, Bijlsma JW, Lafeber FP, Taams LS: **CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in rheumatoid arthritis: differences in the presence, phenotype, and function between peripheral blood and synovial fluid.** *Arthritis Rheum* 2004, **50**(9):2775-2785.
61. De A, Blotta HM, Mamoni RL, Louzada P, Bertolo MB, Foss NT, Moreira AC, Castro M: **Effects of dexamethasone on lymphocyte proliferation and cytokine production in rheumatoid arthritis.** *J Rheumatol* 2002, **29**(1):46-51.
62. Morita Y, Yamamura M, Kawashima M, Harada S, Tsuji K, Shibuya K, Maruyama K, Makino H: **Flow cytometric single-cell analysis of cytokine production by CD4+ T cells in synovial tissue and peripheral blood from patients with rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 1998, **41**(9):1669-1676.
63. Kang YM, Zhang X, Wagner UG, Yang H, Beckenbaugh RD, Kurtin PJ, Goronzy JJ, Weyand CM: **CD8 T cells are required for the formation of ectopic germinal centers in rheumatoid synovitis.** *J Exp Med* 2002, **195**(10):1325-1336.
64. Katsikis PD, Chu CQ, Brennan FM, Maini RN, Feldmann M: **Immunoregulatory role of interleukin 10 in rheumatoid arthritis.** *J Exp Med* 1994, **179**(5):1517-1527.

65. Yudoh K, Matsuno H, Nakazawa F, Yonezawa T, Kimura T: **Reduced expression of the regulatory CD4+ T cell subset is related to Th1/Th2 balance and disease severity in rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 2000, **43**(3):617-627.
66. Papiernik M, de Moraes ML, Pontoux C, Vasseur F, Penit C: **Regulatory CD4 T cells: expression of IL-2R alpha chain, resistance to clonal deletion and IL-2 dependency.** *Int Immunol* 1998, **10**(4):371-378.
67. Watanabe N, Wang YH, Lee HK, Ito T, Wang YH, Cao W, Liu YJ: **Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4+CD25+ regulatory T cells in human thymus.** *Nature* 2005, **436**(7054):1181-1185.
68. Maggi E, Cosmi L, Liotta F, Romagnani P, Romagnani S, Annunziato F: **Thymic regulatory T cells.** *Autoimmun Rev* 2005, **4**(8):579-586.
69. Jordan MS, Boesteanu A, Reed AJ, Petrone AL, Hohenbeck AE, Lerman MA, Naji A, Caton AJ: **Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide.** *Nat Immunol* 2001, **2**(4):301-306.
70. Shevach EM: **CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers.** *Nat Rev Immunol* 2002, **2**(6):389-400.
71. Fattorossi A, Battaglia A, Buzzonetti A, Ciaraffa F, Scambia G, Evoli A: **Circulating and thymic CD4 CD25 T regulatory cells in myasthenia gravis: effect of immunosuppressive treatment.** *Immunology* 2005, **116**(1):134-141.
72. Lim HW, Hillsamer P, Kim CH: **Regulatory T cells can migrate to follicles upon T cell activation and suppress GC-Th cells and GC-Th cell-driven B cell responses.** *J Clin Invest* 2004, **114**(11):1640-1649.
73. Green EA, Choi Y, Flavell RA: **Pancreatic lymph node-derived CD4(+)CD25(+) Treg cells: highly potent regulators of diabetes that require TRANCE-RANK signals.** *Immunity* 2002, **16**(2):183-191.
74. Chung IY, Dong HF, Zhang X, Hassanein NM, Howard OM, Oppenheim JJ, Chen X: **Effects of IL-7 and dexamethasone: induction of CD25, the high affinity IL-2 receptor, on human CD4+ cells.** *Cell Immunol* 2004, **232**(1-2):57-63.
75. Fantini MC, Becker C, Tubbe I, Nikolaev A, Lehr HA, Galle PR, Neurath MF: **TGF- $\beta$  induced Foxp3+ regulatory T cells suppress Th1-mediated experimental colitis.** *Gut* 2005.
76. Zelenay S, Lopes-Carvalho T, Caramalho I, Moraes-Fontes MF, Rebelo M, Demengeot J: **Foxp3+ CD25- CD4 T cells constitute a reservoir of committed regulatory cells that regain CD25 expression upon homeostatic expansion.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**(11):4091-4096.
77. Jonuleit H, Adema G, Schmitt E: **Immune regulation by regulatory T cells: implications for transplantation.** *Transpl Immunol* 2003, **11**(3-4):267-276.
78. Jonuleit H, Schmitt E, Stassen M, Tuettenberg A, Knop J, Enk AH: **Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood.** *J Exp Med* 2001, **193**(11):1285-1294.
79. Thornton AM, Shevach EM: **CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production.** *J Exp Med* 1998, **188**(2):287-296.
80. Kursar M, Bonhagen K, Fensterle J, Kohler A, Hurwitz R, Kamradt T, Kaufmann SH, Mittrucker HW: **Regulatory CD4+CD25+ T cells restrict memory CD8+ T cell responses.** *J Exp Med* 2002, **196**(12):1585-1592.

81. Thornton AM, Shevach EM: **Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific.** *J Immunol* 2000, **164**(1):183-190.
82. Stephens LA, Mottet C, Mason D, Powrie F: **Human CD4(+)CD25(+) thymocytes and peripheral T cells have immune suppressive activity in vitro.** *Eur J Immunol* 2001, **31**(4):1247-1254.
83. Morgan ME, van Bilsen JH, Bakker AM, Heemskerk B, Schilham MW, Hartgers FC, Elferink BG, van der Zanden L, de Vries RR, Huizinga TW *et al*: **Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4+CD25+ T regulatory cells in humans.** *Hum Immunol* 2005, **66**(1):13-20.
84. Roncador G, Brown PJ, Maestre L, Hue S, Martinez-Torrecuadrada JL, Ling KL, Pratap S, Toms C, Fox BC, Cerundolo V *et al*: **Analysis of FOXP3 protein expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells at the single-cell level.** *Eur J Immunol* 2005, **35**(6):1681-1691.
85. Jarvis LB, Matyszak MK, Duggleby RC, Goodall JC, Hall FC, Gaston JS: **Autoreactive human peripheral blood CD8(+) T cells with a regulatory phenotype and function.** *Eur J Immunol* 2005, **35**(10):2896-2908.
86. Bopp T, Palmetshofer A, Serfling E, Heib V, Schmitt S, Richter C, Klein M, Schild H, Schmitt E, Stassen M: **NFATc2 and NFATc3 transcription factors play a crucial role in suppression of CD4+ T lymphocytes by CD4+ CD25+ regulatory T cells.** *J Exp Med* 2005, **201**(2):181-187.
87. Lu LF, Gondek DC, Scott ZA, Noelle RJ: **NFkappaB-inducing kinase deficiency results in the development of a subset of regulatory T cells, which shows a hyperproliferative activity upon glucocorticoid-induced TNF receptor family-related gene stimulation.** *J Immunol* 2005, **175**(3):1651-1657.
88. Thornton AM, Donovan EE, Piccirillo CA, Shevach EM: **Cutting edge: IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4+CD25+ T cell suppressor function.** *J Immunol* 2004, **172**(11):6519-6523.
89. Thornton AM, Piccirillo CA, Shevach EM: **Activation requirements for the induction of CD4+CD25+ T cell suppressor function.** *Eur J Immunol* 2004, **34**(2):366-376.
90. de la Rosa M, Rutz S, Dorninger H, Scheffold A: **Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function.** *Eur J Immunol* 2004, **34**(9):2480-2488.
91. Thornton AM: **Signal transduction in CD4+CD25+ regulatory T cells: CD25 and IL-2.** *Front Biosci* 2006, **11**:921-927.
92. Curotto de Lafaille MA, Lino AC, Kutchukhidze N, Lafaille JJ: **CD25- T cells generate CD25+Foxp3+ regulatory T cells by peripheral expansion.** *J Immunol* 2004, **173**(12):7259-7268.
93. Scheffold A, Huhn J, Hofer T: **Regulation of CD4+CD25+ regulatory T cell activity: it takes (IL-)two to tango.** *Eur J Immunol* 2005, **35**(5):1336-1341.
94. Barthlott T, Moncrieffe H, Veldhoen M, Atkins CJ, Christensen J, O'Garra A, Stockinger B: **CD25+ CD4+ T cells compete with naive CD4+ T cells for IL-2 and exploit it for the induction of IL-10 production.** *Int Immunol* 2005, **17**(3):279-288.
95. McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA, Young DA, Shevach EM, Collins M, Byrne MC: **CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor.** *Immunity* 2002, **16**(2):311-323.

96. Ronchetti S, Zollo O, Bruscoli S, Agostini M, Bianchini R, Nocentini G, Ayroldi E, Riccardi C: **GITR, a member of the TNF receptor superfamily, is costimulatory to mouse T lymphocyte subpopulations.** *Eur J Immunol* 2004, **34**(3):613-622.
97. Stephens GL, McHugh RS, Whitters MJ, Young DA, Luxenberg D, Carreno BM, Collins M, Shevach EM: **Engagement of glucocorticoid-induced TNFR family-related receptor on effector T cells by its ligand mediates resistance to suppression by CD4+CD25+ T cells.** *J Immunol* 2004, **173**(8):5008-5020.
98. Birebent B, Lorho R, Lechartier H, de Guibert S, Alizadeh M, Vu N, Beauplet A, Robillard N, Semana G: **Suppressive properties of human CD4+CD25+ regulatory T cells are dependent on CTLA-4 expression.** *Eur J Immunol* 2004, **34**(12):3485-3496.
99. Tang Q, Boden EK, Henriksen KJ, Bour-Jordan H, Bi M, Bluestone JA: **Distinct roles of CTLA-4 and TGF-beta in CD4+CD25+ regulatory T cell function.** *Eur J Immunol* 2004, **34**(11):2996-3005.
100. Sempowski GD, Cross SJ, Heinly CS, Scarce RM, Haynes BF: **CD7 and CD28 are required for murine CD4+CD25+ regulatory T cell homeostasis and prevention of thyroiditis.** *J Immunol* 2004, **172**(2):787-794.
101. Zheng Y, Manzotti CN, Liu M, Burke F, Mead KI, Sansom DM: **CD86 and CD80 differentially modulate the suppressive function of human regulatory T cells.** *J Immunol* 2004, **172**(5):2778-2784.
102. Cederbom L, Hall H, Ivars F: **CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells.** *Eur J Immunol* 2000, **30**(6):1538-1543.
103. Zheng G, Wang B, Chen A: **The 4-1BB costimulation augments the proliferation of CD4+CD25+ regulatory T cells.** *J Immunol* 2004, **173**(4):2428-2434.
104. Choi BK, Bae JS, Choi EM, Kang WJ, Sakaguchi S, Vinay DS, Kwon BS: **4-1BB-dependent inhibition of immunosuppression by activated CD4+CD25+ T cells.** *J Leukoc Biol* 2004, **75**(5):785-791.
105. Bruder D, Probst-Kepper M, Westendorf AM, Geffers R, Beissert S, Loser K, von Boehmer H, Buer J, Hansen W: **Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells.** *Eur J Immunol* 2004, **34**(3):623-630.
106. Huber S, Schramm C, Lehr HA, Mann A, Schmitt S, Becker C, Protschka M, Galle PR, Neurath MF, Blessing M: **Cutting edge: TGF-beta signaling is required for the in vivo expansion and immunosuppressive capacity of regulatory CD4+CD25+ T cells.** *J Immunol* 2004, **173**(11):6526-6531.
107. Gondek DC, Lu LF, Quezada SA, Sakaguchi S, Noelle RJ: **Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism.** *J Immunol* 2005, **174**(4):1783-1786.
108. Paust S, Lu L, McCarty N, Cantor H: **Engagement of B7 on effector T cells by regulatory T cells prevents autoimmune disease.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**(28):10398-10403.
109. Liang S, Alard P, Zhao Y, Parnell S, Clark SL, Kosiewicz MM: **Conversion of CD4+ CD25- cells into CD4+ CD25+ regulatory T cells in vivo requires B7 costimulation, but not the thymus.** *J Exp Med* 2005, **201**(1):127-137.

110. Jonuleit H, Schmitt E, Kakirman H, Stassen M, Knop J, Enk AH: **Infectious tolerance: human CD25(+) regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4(+) T helper cells.** *J Exp Med* 2002, **196**(2):255-260.
111. Zheng SG, Gray JD, Ohtsuka K, Yamagiwa S, Horwitz DA: **Generation ex vivo of TGF-beta-producing regulatory T cells from CD4+CD25-precursors.** *J Immunol* 2002, **169**(8):4183-4189.
112. Stassen M, Fondel S, Bopp T, Richter C, Muller C, Kubach J, Becker C, Knop J, Enk AH, Schmitt S *et al*: **Human CD25+ regulatory T cells: two subsets defined by the integrins alpha 4 beta 7 or alpha 4 beta 1 confer distinct suppressive properties upon CD4+ T helper cells.** *Eur J Immunol* 2004, **34**(5):1303-1311.
113. Fantini MC, Becker C, Monteleone G, Pallone F, Galle PR, Neurath MF: **Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25-T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7.** *J Immunol* 2004, **172**(9):5149-5153.
114. Fu S, Zhang N, Yopp AC, Chen D, Mao M, Chen D, Zhang H, Ding Y, Bromberg JS: **TGF-beta induces Foxp3 + T-regulatory cells from CD4 + CD25 - precursors.** *Am J Transplant* 2004, **4**(10):1614-1627.
115. Zheng SG, Wang JH, Gray JD, Soucier H, Horwitz DA: **Natural and induced CD4+CD25+ cells educate CD4+CD25- cells to develop suppressive activity: the role of IL-2, TGF-beta, and IL-10.** *J Immunol* 2004, **172**(9):5213-5221.
116. Heikkinen J, Mottonen M, Alanen A, Lassila O: **Phenotypic characterization of regulatory T cells in the human decidua.** *Clin Exp Immunol* 2004, **136**(2):373-378.
117. Valzasina B, Guiducci C, Dislich H, Killeen N, Weinberg AD, Colombo MP: **Triggering of OX40 (CD134) on CD4(+)CD25+ T cells blocks their inhibitory activity: a novel regulatory role for OX40 and its comparison with GITR.** *Blood* 2005, **105**(7):2845-2851.
118. Azuma T, Takahashi T, Kunisato A, Kitamura T, Hirai H: **Human CD4+CD25+ regulatory T cells suppress NKT cell functions.** *Cancer Res* 2003, **63**(15):4516-4520.
119. Trzonkowski P, Szmit E, Mysliwska J, Dobyszyk A, Mysliwski A: **CD4+CD25+ T regulatory cells inhibit cytotoxic activity of T CD8+ and NK lymphocytes in the direct cell-to-cell interaction.** *Clin Immunol* 2004, **112**(3):258-267.
120. Powrie F, Read S, Mottet C, Uhlig H, Maloy K: **Control of immune pathology by regulatory T cells.** *Novartis Found Symp* 2003, **252**:92-98; discussion 98-105, 106-114.
121. Raghavan S, Fredriksson M, Svennerholm AM, Holmgren J, Suri-Payer E: **Absence of CD4+CD25+ regulatory T cells is associated with a loss of regulation leading to increased pathology in Helicobacter pylori-infected mice.** *Clin Exp Immunol* 2003, **132**(3):393-400.
122. Caramalho I, Lopes-Carvalho T, Ostler D, Zelenay S, Haury M, Demengeot J: **Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide.** *J Exp Med* 2003, **197**(4):403-411.
123. Cosmi L, Liotta F, Lazzeri E, Francalanci M, Angeli R, Mazzinghi B, Santarlasci V, Manetti R, Vanini V, Romagnani P *et al*: **Human CD8+CD25+ thymocytes share phenotypic and functional features with CD4+CD25+ regulatory thymocytes.** *Blood* 2003, **102**(12):4107-4114.

124. Moller B, Nguyen TT, Kessler U, Kaltwasser JP, Hoelzer D, Ottmann OG: **Interleukin-10 expression: is there a neglected contribution of CD8+ T cells in rheumatoid arthritis joints?** *Clin Exp Rheumatol* 2002, **20**(6):813-822.
125. Fernandez-Gutierrez B, Hernandez-Garcia C, Banares AA, Jover JA: **Characterization and regulation of CD69 expression on rheumatoid arthritis synovial fluid T cells.** *J Rheumatol* 1995, **22**(3):413-420.
126. Davila E, Kang YM, Park YW, Sawai H, He X, Pryshchep S, Goronzy JJ, Weyand CM: **Cell-based immunotherapy with suppressor CD8+ T cells in rheumatoid arthritis.** *J Immunol* 2005, **174**(11):7292-7301.
127. Danke NA, Koelle DM, Yee C, Beheray S, Kwok WW: **Autoreactive T cells in healthy individuals.** *J Immunol* 2004, **172**(10):5967-5972.
128. Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA: **Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis.** *J Exp Med* 2004, **199**(7):971-979.
129. 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.** *Eur J Immunol* 2003, **33**(1):215-223.
130. Ehrenstein MR, Evans JG, Singh A, Moore S, Warnes G, Isenberg DA, Mauri C: **Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy.** *J Exp Med* 2004, **200**(3):277-285.
131. Liu MF, Wang CR, Fung LL, Lin LH, Tsai CN: **The presence of cytokine-suppressive CD4+CD25+ T cells in the peripheral blood and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis.** *Scand J Immunol* 2005, **62**(3):312-317.
132. Mottonen M, Heikkinen J, Mustonen L, Isomaki P, Luukkainen R, Lassila O: **CD4+ CD25+ T cells with the phenotypic and functional characteristics of regulatory T cells are enriched in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis.** *Clin Exp Immunol* 2005, **140**(2):360-367.
133. Baecher-Allan C, Viglietta V, Hafler DA: **Inhibition of human CD4(+)/CD25(+high) regulatory T cell function.** *J Immunol* 2002, **169**(11):6210-6217.
134. Carlos TM, Harlan JM: **Leukocyte-endothelial adhesion molecules.** *Blood* 1994, **84**(7):2068-2101.
135. Austrup F, Vestweber D, Borges E, Lohning M, Brauer R, Herz U, Renz H, Hallmann R, Scheffold A, Radbruch A *et al*: **P- and E-selectin mediate recruitment of T-helper-1 but not T-helper-2 cells into inflamed tissues.** *Nature* 1997, **385**(6611):81-83.
136. Zou L, Barnett B, Safah H, Larussa VF, Evdemon-Hogan M, Mottram P, Wei S, David O, Curiel TJ, Zou W: **Bone marrow is a reservoir for CD4+CD25+ regulatory T cells that traffic through CXCL12/CXCR4 signals.** *Cancer Res* 2004, **64**(22):8451-8455.
137. Burman A, Haworth O, Hardie DL, Amft EN, Siewert C, Jackson DG, Salmon M, Buckley CD: **A chemokine-dependent stromal induction mechanism for aberrant lymphocyte accumulation and compromised lymphatic return in rheumatoid arthritis.** *J Immunol* 2005, **174**(3):1693-1700.
138. Takeuchi E, Tomita T, Toyosaki-Maeda T, Kaneko M, Takano H, Hashimoto H, Sugamoto K, Suzuki R, Ochi T: **Establishment and characterization of**

- nurse cell-like stromal cell lines from synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1999, **42**(2):221-228.
139. Takeuchi E, Tanaka T, Umemoto E, Tomita T, Shi K, Takahi K, Suzuki R, Ochi T, Miyasaka M: **VLA-4-dependent and -independent pathways in cell contact-induced proinflammatory cytokine production by synovial nurse-like cells from rheumatoid arthritis patients.** *Arthritis Res* 2002, **4**(6):R10.
140. Burger JA, Zvaifler NJ, Tsukada N, Firestein GS, Kipps TJ: **Fibroblast-like synoviocytes support B-cell pseudoemperipolesis via a stromal cell-derived factor-1- and CD106 (VCAM-1)-dependent mechanism.** *J Clin Invest* 2001, **107**(3):305-315.
141. Bradfield PF, Amft N, Vernon-Wilson E, Exley AE, Parsonage G, Rainger GE, Nash GB, Thomas AM, Simmons DL, Salmon M *et al*: **Rheumatoid fibroblast-like synoviocytes overexpress the chemokine stromal cell-derived factor 1 (CXCL12), which supports distinct patterns and rates of CD4+ and CD8+ T cell migration within synovial tissue.** *Arthritis Rheum* 2003, **48**(9):2472-2482.
142. Buckley CD, Amft N, Bradfield PF, Pilling D, Ross E, Arenzana-Seisdedos F, Amara A, Curnow SJ, Lord JM, Scheel-Toellner D *et al*: **Persistent induction of the chemokine receptor CXCR4 by TGF-beta 1 on synovial T cells contributes to their accumulation within the rheumatoid synovium.** *J Immunol* 2000, **165**(6):3423-3429.
143. Nishikawa H, Kato T, Tawara I, Ikeda H, Kuribayashi K, Allen PM, Schreiber RD, Old LJ, Shiku H: **IFN-gamma controls the generation/activation of CD4+ CD25+ regulatory T cells in antitumor immune response.** *J Immunol* 2005, **175**(7):4433-4440.
144. De Klerck B, Geboes L, Hatse S, Kelchtermans H, Meyvis Y, Vermeire K, Bridger G, Billiau A, Schols D, Matthys P: **Pro-inflammatory properties of stromal cell-derived factor-1 (CXCL12) in collagen-induced arthritis.** *Arthritis Res Ther* 2005, **7**(6):R1208-1220.
145. Vela-Ojeda J, Esparza MA, Reyes-Maldonado E, Jimenez-Zamudio L, Garcia-Latorre E, Moreno-Lafont M, Estrada-Garcia I, Mayani H, Montiel-Cervantes L, Tripp-Villanueva F *et al*: **CD4+ CD25+ lymphocyte and dendritic cell mobilization with intermediate doses of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in healthy donors.** *Stem Cells Dev* 2005, **14**(3):310-316.
146. Kelchtermans H, De Klerck B, Mitera T, Van Balen M, Bullens D, Billiau A, Leclercq G, Matthys P: **Defective CD4+CD25+ regulatory T cell functioning in collagen-induced arthritis: an important factor in pathogenesis, counter-regulated by endogenous IFN-gamma.** *Arthritis Res Ther* 2005, **7**(2):R402-415.
147. Chatenoud L: **CD3 antibody treatment stimulates the functional capability of regulatory T cells.** *Novartis Found Symp* 2003, **252**:279-286; discussion 286-290.
148. Delgado M, Chorny A, Gonzalez-Rey E, Ganea D: **Vasoactive intestinal peptide generates CD4+CD25+ regulatory T cells in vivo.** *J Leukoc Biol* 2005.
149. Hong J, Li N, Zhang X, Zheng B, Zhang JZ: **Induction of CD4+CD25+ regulatory T cells by copolymer-I through activation of transcription factor Foxp3.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**(18):6449-6454.

150. Gorczynski RM, Lee L, Boudakov I: **Augmented Induction of CD4+CD25+ Treg using monoclonal antibodies to CD200R.** *Transplantation* 2005, **79**(9):1180-1183.
151. Chai JG, Xue SA, Coe D, Addey C, Bartok I, Scott D, Simpson E, Stauss HJ, Hori S, Sakaguchi S *et al*: **Regulatory T cells, derived from naive CD4+CD25- T cells by in vitro Foxp3 gene transfer, can induce transplantation tolerance.** *Transplantation* 2005, **79**(10):1310-1316.
152. Rudwaleit M, Yin Z, Siegert S, Grolms M, Radbruch A, Braun J, Sieper J: **Response to methotrexate in early rheumatoid arthritis is associated with a decrease of T cell derived tumour necrosis factor alpha, increase of interleukin 10, and predicted by the initial concentration of interleukin 4.** *Ann Rheum Dis* 2000, **59**(4):311-314.
153. Balsa A, Gamallo C, Martin-Mola E, Gijon-Banos J: **Histologic changes in rheumatoid synovitis induced by naproxen and methotrexate.** *J Rheumatol* 1993, **20**(9):1472-1477.
154. Liang GC, Cordero M, Dyer A, Chang RW: **Current tumor necrosis factor-alpha inhibitor use is associated with a higher probability of remissions in patients with rheumatoid arthritis.** *J Rheumatol* 2005, **32**(9):1662-1665.
155. Nordstrom DC, Konttinen L, Korpela M, Tiippana-Kinnunen T, Eklund K, Forsberg S, Ilva K, Kaipainen-Seppanen O, Malmi T, Yla-Kerttula T *et al*: **Classic disease modifying anti-rheumatic drugs (DMARDs) in combination with infliximab. The Finnish experience.** *Rheumatol Int* 2005:1-8.
156. Choy EH, Smith C, Dore CJ, Scott DL: **A meta-analysis of the efficacy and toxicity of combining disease-modifying anti-rheumatic drugs in rheumatoid arthritis based on patient withdrawal.** *Rheumatology (Oxford)* 2005, **44**(11):1414-1421.
157. Tsaknaridis L, Spencer L, Culbertson N, Hicks K, LaTocha D, Chou YK, Whitham RH, Bakke A, Jones RE, Offner H *et al*: **Functional assay for human CD4+CD25+ Treg cells reveals an age-dependent loss of suppressive activity.** *J Neurosci Res* 2003, **74**(2):296-308.
158. Gregg R, Smith CM, Clark FJ, Dunnion D, Khan N, Chakraverty R, Nayak L, Moss PA: **The number of human peripheral blood CD4+ CD25high regulatory T cells increases with age.** *Clin Exp Immunol* 2005, **140**(3):540-546.
159. Tengstrand B, Ahlmen M, Hafstrom I: **The influence of sex on rheumatoid arthritis: a prospective study of onset and outcome after 2 years.** *J Rheumatol* 2004, **31**(2):214-222.
160. Cutolo M, Sulli A, Capellino S, Villaggio B, Montagna P, Seriolo B, Straub RH: **Sex hormones influence on the immune system: basic and clinical aspects in autoimmunity.** *Lupus* 2004, **13**(9):635-638.
161. Salem ML: **Estrogen, a double-edged sword: modulation of TH1- and TH2-mediated inflammations by differential regulation of TH1/TH2 cytokine production.** *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2004, **3**(1):97-104.
162. Athreya BH, Pletcher J, Zulian F, Weiner DB, Williams WV: **Subset-specific effects of sex hormones and pituitary gonadotropins on human lymphocyte proliferation in vitro.** *Clin Immunol Immunopathol* 1993, **66**(3):201-211.
163. Cutolo M, Accardo S, Villaggio B, Clerico P, Bagnasco M, Coviello DA, Carruba G, lo Casto M, Castagnetta L: **Presence of estrogen-binding sites on macrophage-like synoviocytes and CD8+, CD29+, CD45RO+ T**

- lymphocytes in normal and rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum* 1993, **36**(8):1087-1097.**
164. Chen Z, Laurence A, Kanno Y, Pacher-Zavisin M, Zhu BM, Tato C, Yoshimura A, Hennighausen L, O'Shea JJ: **Selective regulatory function of Socs3 in the formation of IL-17-secreting T cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**(21):8137-8142.
165. Dulos GJ, Bagchus WM: **Androgens indirectly accelerate thymocyte apoptosis.** *Int Immunopharmacol* 2001, **1**(2):321-328.
166. Blaschke S, Middel P, Dorner BG, Blaschke V, Hummel KM, Kroczeck RA, Reich K, Benoehr P, Koziolok M, Muller GA: **Expression of activation-induced, T cell-derived, and chemokine-related cytokine/lymphotactin and its functional role in rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 2003, **48**(7):1858-1872.
167. Lacki JK, Klama K, Mackiewicz SH, Mackiewicz U, Muller W: **Circulating interleukin 10 and interleukin-6 serum levels in rheumatoid arthritis patients treated with methotrexate or gold salts: preliminary report.** *Inflamm Res* 1995, **44**(1):24-26.
168. Lacki JK, Samborski W, Mackiewicz SH: **Interleukin-10 and interleukin-6 in lupus erythematosus and rheumatoid arthritis, correlations with acute phase proteins.** *Clin Rheumatol* 1997, **16**(3):275-278.
169. Kawashima M, Miossec P: **mRNA quantification of T-bet, GATA-3, IFN-gamma, and IL-4 shows a defective Th1 immune response in the peripheral blood from rheumatoid arthritis patients: link with disease activity.** *J Clin Immunol* 2005, **25**(3):209-214.
170. Verhoef CM, van Roon JA, Vianen ME, Bijlsma JW, Lafeber FP: **Interleukin 10 (IL-10), not IL-4 or interferon-gamma production, correlates with progression of joint destruction in rheumatoid arthritis.** *J Rheumatol* 2001, **28**(9):1960-1966.

## 7. Anhang

### 7.1. Abkürzungsverzeichnis

---

°C	Grad Celsius
µg,µL	Mikrogramm, Mikroliter
Abbildung	Abbildung
Ab	Antikörper
Aqua dest.	Aqua destillata
BSA	Bovines Serum Albumin
ca.	circa
CD	cluster of differentiation
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
DC	Dendritische Zelle
DMARD	Disease modifying antirheumatic drug
FACS	"fluorescence activated cell sorter", Durchflusszytometer
FCS	Fetales Kälberserum
GITR	Glucocorticoid-induced TNF receptor family-related gene product
h	Stunde
HLA	Human leukocyte antigen
IFN	Interferon
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
Iono	Ionomycin
kd	Kilodalton
Lsg.	Lösung
M	Mol
mg,mL	Milligramm, Milliliter
MHC	major histocompatibility complex
min	Minute
mM	Millimol
MTX	Metothrexat
NaCl	Natriumchlorid
NSAID	Nonsteroidal anti inflammatory drug
OKT3	Anti-T3 antibody
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
rpm	rotation per minute
RT	Raumtemperatur
Tab.	Tabelle
TGF beta	Transforming growth factor beta
Th	T- Helfer Zelle
Th0	naive T Helfer Zelle
Th1	T- Helfer Zelle Typ 1
Th2	T- Helfer Zelle Typ 2
Th3	T- Helfer Zelle Typ 3
Tr1	TNF- receptor like 1 cell
Treg	CD4(+)CD25(+) regulatorische T -Zelle

---

## 7.2. Beiträge zu wissenschaftlichen Publikationen und Konferenzen

### Konferenzbeitrag

British Society for Rheumatology Annual Meeting with the Deutsche Gesellschaft für Rheumatologie, 19-22 April 2005, Birmingham, United Kingdom:

Behrens F., Beutel, B., Kaltwasser, JP., Moeller, B., Radeke, HH.: **Evidence of regulatory effects of peripheral T cells on IFN $\gamma$  and IL-10 production of synovial tissue cells in rheumatoid arthritis.**

### wissenschaftlichen Publikationen

Behrens F, Himsel A, Rehart S, Stanczyk J, Beutel B, Zimmermann SY, Koehl U, Moller B, Gay S, Kaltwasser JP, Pfeilschifter, JM, Radeke, HH.: **Imbalance in distribution of functional autologous regulatory T cells in rheumatoid arthritis.** *Ann Rheum Dis* 2007

### 7.3. Danksagung

Ich möchte mich besonders herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. H. H. Radeke für die Möglichkeit zur Promotion im pharmazentrum frankfurt bedanken. Für die anregenden Diskussionen und die lehrreichen Einblicke in die Arbeitsweise der immunologischen Forschung meinen herzlichsten Dank.

Meinem Betreuer Herrn Dr. med. F. Behrens gilt mein besonderer Dank für die Auswahl des Themas und die tutorale Anleitung. Für seine stetige Unterstützung, seine unermüdliche Diskussionsbereitschaft meinen herzlichsten Dank.

Herrn Prof. Dr. med. S. Rehart meinen aufrichtigsten Dank für die Bereitstellung der Proben.

Herrn Prof. Dr. med. S. Gay meinen herzlichsten Dank für die Anfertigung und Bereitstellung der immunhistochemischen Färbungen.

Ebenso möchte ich mich bei Frau Dr. med. Y. Zimmermann, Frau Dr. U. Köhl und ihrem Team für ihre stete Hilfsbereitschaft bei den FACS- Analysen bedanken.

Ich bedanke mich herzlichst bei den Mitarbeitern der Rheumatagesklinik besonders bei Frau Dr. med. J. Riemann, Frau Dr. med. A. Himsel, Frau K. Ritter, Fr. J. Rudkowski und Frau A. Schulmeyer für ihre Hilfsbereitschaft und die freundlichen Arbeitsatmosphäre in einer nicht immer leichten Zeit.

Meinen Eltern und meinen Bruder möchte ich einen besonderen Dank aussprechen. Ihre ständige liebevolle und verständnisvolle Unterstützung hat sehr zum Gelingen und Verfassen dieser Arbeit beigetragen.

#### 7.4. Schriftliche Erklärung

Ich erkläre, daß ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

**Regulatorische T- Lymphozyten in der  
Rheumatoiden Arthritis:**

Eine funktionelle und durchflusszytometrische Studie mit 19 Patienten

in dem  
Institut für Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie

unter Betreuung und Anleitung von Herrn Prof. Dr. H.H. Radeke

mit Unterstützung durch

Dr. F. Behrens (Zentrum Innere Medizin, Rheumatologie, Frankfurt am Main),  
Herrn PD Dr. B. Möller (Zentrum Innere Medizin, Rheumatologie, Frankfurt  
am Main), Herrn PD. Dr. S. Rehart (Orthopädie Stiftung Friedrichsheim,  
Frankfurt am Main), Frau Dr. U. Koehl (Zentrum für Kinderheilkunde,  
Frankfurt am Main), Frau Dr. S.Y. Zimmermann (Zentrum für  
Kinderheilkunde, Frankfurt am Main) und Herrn Prof. Dr. S. Gay  
(Universitätsspital Zürich)

ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt  
und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen  
als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel  
benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um  
Zulassung zur Promotion eingereicht.\*)

Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Die vorliegende Arbeit wurde (wird) in folgendem Publikationsorgan  
veröffentlicht:

Behrens F, Himsel A, Rehart S, Stanczyk J, Beutel B, Zimmermann SY, Koehl  
U, Moller B, Gay S, Kaltwasser JP, Pfeilschifter, JM, Radeke, HH.:  
**Imbalance in distribution of functional autologous regulatory T cells  
in rheumatoid arthritis.** *Ann Rheum Dis* 2007

.....

Marburg, den 05.06.2009

\_\_\_\_\_  
Björn Beutel