

**Die Rolle regulatorischer T-Zellen und der Einfluss von
TGF β 1
bei der juvenilen idiopathischen Arthritis**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Bieder, Nicole Sabrina

2015

Dekan: Professor Dr. med. Ingo B. Autenrieth

1. Berichterstatter: PD Dr. med. Ursula Holzer

2. Berichterstatter: PD Dr. med. Felix Bischof

Diese Arbeit ist
Pleasure und meiner Familie
gewidmet

I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis	1
II.	Abbildungsverzeichnis	4
II.	Abkürzungsverzeichnis.....	6
1	Einleitung.....	8
1.1	<i>Das angeborene und das erworbene Immunsystem</i>	<i>8</i>
1.2	<i>Einteilung von T-Zellen.....</i>	<i>10</i>
1.3	<i>Toleranzmechanismen.....</i>	<i>11</i>
1.4	<i>Regulatorische T-Zellen.....</i>	<i>12</i>
1.4.1	Charakterisierung von Tregs	14
1.4.1.1	CD25.....	14
1.4.1.2	CTLA4	14
1.4.1.3	FoxP3	15
1.4.1.4	CD127.....	16
1.4.1	Einfluss von TGFβ1 auf Tregs	17
1.4.2	Induktion von Tregs	20
1.5	<i>Juvenile idiopathische Arthritis, JIA.....</i>	<i>21</i>
2	Zielsetzung.....	23
3	Material	25
1.1	<i>Geräte und Hilfsmittel</i>	<i>25</i>
1.2	<i>Software</i>	<i>27</i>
1.3	<i>Chemikalien, Reagenzien und Puffer</i>	<i>27</i>
1.3.1	Allgemein	27
1.3.2	Westernblot.....	29
1.3.3	quantitative Realtime-PCR.....	30
1.3.4	BrdU, Thymidin	31
1.3.5	Verbrauchsmaterialien	31
1.3.5.1	Allgemein.....	31
1.3.5.2	Antikörper.....	32
4	Methoden.....	34
4.1	<i>Isolierung peripherer mononukleärer Zellen mittels Ficoll-Hypaque-Dichtegradientenzentrifugation.....</i>	<i>34</i>
4.2	<i>Isolierung von T-Zellen durch magnetische Zellsortierung, MACS</i>	<i>35</i>
4.1	<i>Bestimmung der Zellzahl</i>	<i>40</i>
4.4	<i>T-Zellkultur.....</i>	<i>40</i>
4.5	<i>Durchflusszytometrie.....</i>	<i>40</i>
4.5.1	Zellfärbung für die FACS-Analyse.....	42
4.5.1.1	Extrazelluläre Färbung	42

4.5.1.2	Intrazelluläre Färbung.....	42
4.5.1.2.1	CTLA4.....	42
4.5.1.2.2	FoxP3.....	43
4.6	<i>Proliferation</i>	43
4.6.1	BrdU-Test.....	43
4.6.2	³ H-Thymidin-Einbau.....	44
4.7	<i>Herstellung von Zelllysaten eukaryotischer Zellen</i>	45
4.7.1	Isolation von mRNA und Protein.....	45
4.7.1.1	RNeasy Mini Kit von Quiagen.....	45
4.7.2	Photometrische Bestimmung der mRNA-Menge.....	46
4.8	<i>Umschreibung von mRNA auf cDNA</i>	47
4.9	<i>Quantitative Realtime-PCR</i>	47
4.9.1	Auswertung qRT-PCR.....	52
5	Ergebnisse	59
5.1	Charakterisierung regulatorischer T-Zellen	59
5.1.1	CD127 – als neuer Marker geeignet?.....	62
5.2	<i>Tregs in Blut und Synovialflüssigkeit</i>	66
5.3	<i>Funktion von Tregs</i>	70
5.3.1	<i>Einfluß inhibitorischer Faktoren in der Synovialflüssigkeit</i>	72
5.4	<i>Lassen sich Tregs auch aus CD4⁺CD25⁻ Zellen generieren</i>	74
5.4.1	Einfluss von Zytokinen.....	75
5.4.1.1	Einfluss von anti-CD3 auf die Induktion von Tregs.....	75
5.4.1.2	Einfluss durch Zugabe von anti-CD28 und IL-2 auf die Expression von CD25 und FoxP3.....	78
5.4.1.3	Einfluss der TGFβ1-Konzentration auf die Expression von regulatorischen T-Zellmarkern.....	80
5.5	<i>Funktion der iTregs</i>	82
5.5.1	Einfluss inhibitorischer Faktoren in der Synovialflüssigkeit.....	87
5.6	<i>Signalkaskade von TGFβ1</i>	88
5.6.1	Etablierung einer quantitativen RT-PCR: geeignete Referenzgene.....	89
6	Diskussion	94
6.1	<i>Charakterisierung regulatorischer T-Zellen</i>	94
6.1.1	CD 127 – als neuer Marker geeignet?.....	94
6.2	<i>Tregs in Blut und Synovialflüssigkeit</i>	96
6.3	<i>Funktion von Tregs</i>	97
6.4	<i>Lassen sich Tregs auch aus CD4⁺CD25⁻ Zellen generieren</i>	99
6.5	<i>Funktion der iTregs</i>	102
6.6	<i>Signalkaskade von TGFβ1</i>	103
6.6.1	Etablierung einer quantitativen RT-PCR: geeignete Referenzgene.....	103
7	Zusammenfassung	106
8	Literaturverzeichnis	109

9	Erklärung zum Eigenanteil.....	117
10	Danksagung	118
11	Abstract	118

II. Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abbildung 1: Signalkaskade von TGFβ1	19
Abbildung 2: Schematische Darstellung der MACS (magnetic cell sorting) Isolation	39
Abbildung 3: Schematische Darstellung der quantitativen RT-PCR	49
Abbildung 4: qRT-PCR Amplifikationsphasen	53
Abbildung 5: Auswertung der qRT-PCR	55
Abbildung 6: CTLA4-Expression in CD4 ⁺ Zellen aus dem Blut	61
Abbildung 7: CD127 Expression in CD4 ⁺ CD25 ^{hoch+} SF Zellen	63
Abbildung 8: Untersuchung des Markers CD127 auf CD4 ⁺ Zellen	64
Abbildung 9: Anteil der CD4 ⁺ CD25 ^{hoch+} -Zellen in der CD127 ^{hoch+} oder CD127 ^{niedrig+} Population	65
Abbildung 10: Phänotypisierung Tregs aus dem Blut verglichen mit der SF	67
Abbildung 11: Prozentualer Anteil von Tregs im Blut verglichen mit SF	69
Abbildung 12: Inhibitorische Funktion der Tregs	71
Abbildung 13: Einfluss durch Zugabe zellfreier SF auf Funktion von Tregs	73
Abbildung 14: Einfluss von anti-CD3 Antikörper auf die Expression von CD25 und FoxP3 in CD4 ⁺ CD25 ⁻ Zellen	76
Abbildung 15: Einfluss von anti-CD3 Antikörper auf die Expression von CD25 und FoxP3 in CD4 ⁺ CD25 ⁻ Zellen der SF	77
Abbildung 16: Einfluss von anti-CD28 (1 µg/ml) und IL-2 (100 U/ml) auf die Expression von CD25 und FoxP3 in CD4 ⁺ CD25 ⁻ Zellen	79
Abbildung 17: Einfluss von TGFβ1 auf die Induktion von Tregs	81
Abbildung 18: nTregs aus SF nach 4 Tagen Kultur	83
Abbildung 19: Hemmung der Tresp Proliferation durch iTregs und nTregs	85

Abbildung 20: Einfluss zellfreier SF auf die Funktion der iTregs	88
Abbildung 21: GAPDH Expression in CD4 ⁺ Lymphozyten	91
Abbildung 22: Referenzgenanalyse für die quantitative RT-PCR	92

II. Abkürzungsverzeichnis

18S	18S rRNA
Abb.	Abbildung
APZ	Antigenpräsentierende Zellen
BrdU	5- bromo-2,-desoxyuridin
CD	Cluster of differentiation
cDNA	codierende DNA
CFSE	5(6)-Carboxyfluorescein di-acetate N-succinimidyl ester
Ct	Schwellenwertzyklus, cycle threshold
CTLA4	cytotoxic T lymphocyte associated 4
DCs	dendritische Zellen
FACS	fluorescence activated cell sorting/scanning
FCS	Vorwärtsstreulicht, forward scatter
FITC	Fluorescein
FoxP3	Forkhead box P3
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
huB2M	humanes β 2-Mikroglobulin
huBA	humanes β -Aktin
huCYC	humanes Cyclophilin
huGAPDH	humane Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase
huGUS	humane β -Glucuronidase
huHPRT	humane Hypoxanthin Ribosyltransferase
huPKG	humane Phosphoglycerolkinase
huPO	humanes saures ribosomales Protein
huTBP	humaner Transkriptionsfaktor IID
huTfR	humaner Transferrinrezeptor.
IL	Interleukin
ILAR	International League of Association for Rheumatology
INF- γ	Interferon γ
JIA	Juvenile idiopathische Arthritis
MACS	magnetic cell sorting

MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex, major histocompatibility complex
mRNA	messenger RNA
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
PBMC	periphere mononukleäre Zellen, peripheral mononuclear cells
PBS	Phosphat-gepufferte Saline, phosphate-buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion, polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin
PE-Cy5	Phycoerythrin-Cy5
PerCP	peridinin chlorophyll protein
PHS	gepooltes humanes Serum, pooled human serum
p-SMAD	phosphoryliertes mothers against decapentaplegic
qRT-PCR	quantitative Realtime-PCR
RNA	Ribonukleinsäure, ribonucleic acid
RO	CD45, exprimiert von memory T-Zellen
rpm	Umdrehungen pro Minute, rotations per minute
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SF	Synovialflüssigkeit
SFMCs	Mononukleare Zellen der Synovialflüssigkeit, mononuclear cells of the synovial fluid
SMAD	mothers against decapentaplegic
SSC	Seitwärtsstreulicht, side scatter
TZR	T-Zellrezeptor, T cell receptor
TGF β 1	transforming growth factor β 1
TGF β 1-RII	TGF β 1-Rezeptor 2
Th	T-Helfer-Zellen
TLR	toll like receptor
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor α
Tr1	regulierende T-Zellen Typ 1
Tregs	regulatorische T-Zellen

1 Einleitung

1.1 Das angeborene und das erworbene Immunsystem

Das Immunsystem ist ein komplexes System an Organen, Zellen und Zytokinen welches die Aufgabe hat, den Körper vor fremden Stoffen und Krankheitserregern wie Bakterien, Viren, Pilze und Parasiten zu schützen. Gleichzeitig sollte es die eigenen gesunden Zellen nicht als fremd erkennen, so dass keine Reaktion gegen den eigenen Körper erfolgt und eigene entartete Zellen zur Apoptose gezwungen werden. Durch das komplexe Zusammenwirken der einzelnen Bestandteile unseres Immunsystems wird normalerweise die immunologische Selbsttoleranz gewährleistet.

Das Immunsystem lässt sich in einen angeborenen und adaptiven Teil unterscheiden. Der angeborene Teil, welcher den entwicklungs geschichtlich älteren Teil darstellt, ist von Geburt an vorhanden und regelt die erste und schnelle Immunreaktion. Der angeborene Teil besteht aus der ersten Barriere wie der Haut, welche durch einen Säureschutzmantel und bakterizid wirkendes Lysozym vor dem Eindringen von Erregern schützt. Dazu zählen auch die bakterizid wirkende Magensäure und der Auswärtstransport von Schleim und Erregern über das Flimmerepithel aus den Atemwegen sowie die Spülfunktion der Harnwege. Zum angeborenen Immunsystem zählen auch das Komplementsystem und zelluläre Komponenten wie Granulozyten, Makrophagen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Die Zellen erkennen spezifisch über Toll-like Rezeptoren, TLRs, bestimmte konservierte Antigene auf Viren und Bakterien, beispielsweise Lipopolysaccharide gramnegativer Bakterien und können damit zwischen fremden und eigenen Zellen unterscheiden. Über diese Zellen sind unter anderem das angeborene und das adaptive Immunsystem verknüpft¹.

Das adaptive Immunsystem stellt ein hochspezialisiertes System dar und kann sich an eine enorme Anzahl von Antigenen anpassen. Es hat die Aufgabe zwischen fremden und eigenen Antigenen zu unterscheiden, ein immunologisches Gedächtnis zu bilden und lässt sich unterteilen in eine

zelluläre und humorale Abwehr. Für die adaptive Immunreaktion spielt die Präsentation von Antigenen über MHC-Moleküle eine wichtige Rolle. MHC-Moleküle, major histocompatibility complex, werden grob in MHC I und MHC II unterschieden. Es existieren auch MHC III Moleküle, welche allerdings zur unspezifischen Immunantwort zählen und an der Komplementkaskade beteiligt sind und daher hier nur erwähnt werden^{2,3}. MHC I wird von allen Körperzellen exprimiert und präsentiert hauptsächlich intrazelluläre Antigene aus dem Zytosol der Zelle. Werden Fremdproteine in der Zelle gebildet, wie es bei virusinfizierten Zellen der Fall ist, so werden diese ebenfalls mit Hilfe der MHC I-Moleküle präsentiert. Mit MHC I-Molekülen präsentierte Antigene werden von zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen erkannt. Die CD8⁺ T-Zellen werden ebenfalls im Thymus selektioniert und können über den T-Zellrezeptor, TZR, zwischen fremden und körpereigenen Antigenen unterscheiden⁴. So können erkrankte oder entartete Zellen erkannt und zur Apoptose induziert werden. MHC II-Moleküle werden ausschliesslich von antigenpräsentierenden Zellen, den APZs, exprimiert und können von CD4⁺ T-Lymphozyten erkannt werden.

Die zelluläre Abwehr wird hauptsächlich durch die T- und B-Lymphozyten, sowie den APZs gewährleistet. Zu den professionellen APZs gehören dendritische Zellen, Makrophagen und auch B-Zellen, welche nach Prozessierung von Erregern deren Antigene mit Hilfe der MHC II-Moleküle zusammen mit kostimulatorischen Signalen an T-Lymphozyten präsentieren können⁵.

Die B-Lymphozyten werden im Knochenmark gebildet und expandieren nach Interaktion mit CD4⁺ T-Helferzellen zu antikörperproduzierenden Plasmazellen und Gedächtniszellen. Die Antikörper stellen den humoralen Anteil der adaptiven Immunreaktion dar und führen zu einer Lyse der Erreger über Aktivierung des Komplementsystems der angeborenen Immunabwehr⁵.

1.2 Einteilung von T-Zellen

Die T-Lymphozyten werden ebenfalls im Knochenmark gebildet, aber reifen im Thymus und werden dort selektioniert. Sie besitzen den T-Zellrezeptor. Die T-Lymphozyten lassen sich durch unterschiedliche Oberflächenmarker und Funktionen in verschiedene Subtypen unterteilen.

Man unterscheidet zwischen zytotoxischen T-Zellen und T-Helferzellen anhand der Oberflächenmarker CD8 und CD4. CD8⁺ T-Zellen werden wie oben bereits erwähnt als zytotoxische T-Zellen bezeichnet und erkennen unter anderem Antigene, die über MHC I-Moleküle von virusinfizierten oder entarteten Zellen präsentiert werden und lysieren die Zellen direkt, beispielsweise über Perforin oder führen sie zur Apoptose⁵.

Die CD4⁺ Lymphozyten charakterisieren sich durch einen T-Zellrezeptor, TZR, der einen Komplex mit CD3 bildet und in Verbindung mit CD4 präsentierte Antigene auf MHC II-Molekülen erkennt, welche durch APZs präsentiert werden. Dabei wird das Peptid durch den TZR-CD3-Komplex und das MHC II durch CD4 erkannt³.

CD4⁺ Zellen werden als T-Helferzellen bezeichnet. Aufgrund ihrer Effektorfunktionen und Zytokinproduktion nach Aktivierung werden diese Zellen nochmals in verschiedene Subpopulationen unterteilt.

Th1: Th1-Effektorzellen sind in die Immunreaktion gegen Mikroorganismen eingebunden, welche Makrophagen oder NK-Zellen aktiviert, bzw. infiziert haben, aber auch bei der viralen Immunreaktion. Sie produzieren Effektorzytokine, hauptsächlich Interferon γ (INF- γ) und Tumornekrosefaktor α (TNF- α). INF- γ aktiviert Makrophagen und unterstützt die weitere Differenzierung zu Th1, während die Differenzierung zu Th2 gehemmt wird. Außerdem wird die humorale Immunabwehr aktiviert. TNF- α , ein Lymphotoxin, ist unter anderem an der Aktivierung von neutrophilen Granulozyten beteiligt.

Th2: Th2-Zellen sind an der Immunreaktion gegen Parasiten, Allergene und extrazelluläre Erreger und Toxine beteiligt, diese produzieren Zytokine wie Interleukin IL-4, -5 und -13 und helfen bei der Aktivierung der CD8⁺ T-Zellen.

IL-4 stimuliert B-Zellen zur IgG- und IgE-Antikörperproduktion, welches bei Mastzellen zur Mediatorenfreisetzung führt. Die Differenzierung zu Th2-Zellen wird stimuliert, während die zu Th1-Zellen gehemmt wird.

Th17: Th17-Zellen produzieren Interleukin 17, welches Stromazellen anregt, pro-inflammatorische Zytokine zu produzieren.

Darüber hinaus werden immunoregulative CD4⁺ Zellen unterschieden. 1970-1990 wurden im Bereich der peripheren Immuntoleranz regulatorische T-Zellen postuliert⁶. Damals konnte aufgrund der technischen Möglichkeiten noch keine isolierte Population gefunden werden. Erst mit dem technischen Fortschritt seit 1990 konnte eine Subpopulation, bezeichnet als regulatorische T-Zellen (Tregs) isoliert werden^{6,7}. Regulatorische T-Zellen spielen eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz, siehe auch Kapitel 1.4.

1.3 Toleranzmechanismen

Während der Entwicklung der T-Zellen kommt es zum genetischen Rearrangement, wodurch es zur Produktion sehr unterschiedlicher TZR kommt. Dieses Phänomen wird auch bei den B-Lymphozyten, die Antikörper betreffend, beschrieben. Durch diesen Mechanismus wird erreicht, dass das Immunsystem mehr als 10^7 verschiedene Antigene erkennen und sich verändernden Antigenen entsprechend anpassen kann. Um bei dieser Vielfalt der TZR eine Selbsttoleranz zu gewährleisten, ist eine Selektion erforderlich. Eine entsprechende Selektion von TZR, welche gegen eigene Proteine gerichtet oder wenig affin sind, erfolgt im Thymus. Um bei der großen Vielfalt der T-Zellen mit verschiedenen TZRs eine immunologische Toleranz zu gewährleisten sind mehrere Mechanismen erforderlich. Unter anderem wird eine zentrale von einer peripheren Toleranz unterschieden.

Die zentrale Toleranz wird durch die Selektion der T-Zellen im Thymus gewährleistet. Dabei unterscheidet man die positive und negative Selektion.

Die aufgrund der somatischen Rekombination entstandenen vielfältigen TZRs werden hinsichtlich ihrer Affinität zu peptidbeladenen MHC-Molekülen im

Thymus selektioniert. T-Zellen, die eine niedrige Affinität zu dem präsentierten Peptid zeigen, werden positiv selektioniert, das heißt sie können zunächst proliferieren und werden weiter getestet.

Mit Hilfe der negativen Selektion werden T-Zellen eliminiert, welche eine hohe Affinität zu dem peptidbeladenen MHC-Molekül mit körpereigenen Antigenen haben. Diese Zellen werden zur Apoptose gebracht, um eine Toleranz gegen körpereigene Antigene zu gewährleisten⁸⁻¹¹. Die übrigen Zellen verlassen den Thymus als funktionsfähige Lymphozyten.

Die immune Selbsttoleranz wird neben dieser zentralen auch durch eine periphere Toleranz unterstützt, da trotz dieser negativen Selektion autoreaktive T-Zellen in der Peripherie gesunder Probanden gefunden werden¹²⁻¹⁷.

Die periphere Toleranz besteht aus intrinsischen und extrinsischen Mechanismen¹⁸. Zu den intrinsischen Mechanismen zählt, dass zu einer T-Zell-Aktivierung kostimulatorische Signale wie über den CD28 Rezeptor erforderlich sind. Für die extrinsische periphere Toleranz spielen regulatorische T-Zellen eine wichtige Rolle.

1.4 Regulatorische T-Zellen

CD4⁺CD25⁺ regulatorische T-Zellen wurden erstmal 1999 von Itoh et al beschrieben¹⁹. Sie lassen sich in verschiedene Subpopulationen unterteilen und sollen eine periphere Toleranz bewirken sowie eine überschießende Immunreaktion verhindern¹⁹. Sie zeigen unter anderem eine regulierende Funktion auf autoaggressive T- und B-Zellen^{20,21}. Man unterscheidet natürliche Tregs, welche bereits im Thymus gebildet werden und peripher generierte regulatorische Zellen. Allerdings bestehen mangels geeigneter Marker bis heute noch viele Unklarheiten über die Treg-Subpopulationen. Induzierte Tregs und im Thymus generierte Tregs können phänotypisch nicht unterschieden werden²²⁻²⁵.

Adaptive regulatorische T-Zellen (iTregs) werden aus peripher zirkulierenden T-Zellen generiert. Dazu zählen die Th3 und Tr1-Zellen, welche durch Zytokine wie IL-10 und TGF β 1 supprimierend wirken⁶. Am Besten untersucht sind die iTregs, welche in vielen Funktionen und Charakteristika den natürlichen regulatorischen T-Zellen, nTregs, entsprechen.

Die nTregs inhibieren T-Effektorzellen dosisabhängig durch Zell-Zell-Kontakt^{8,26}. Die Zellen zeigen einen anergen Phänotyp und können durch TZR-Stimulation nur mit in hohen Dosen zugeführtem IL-2 kultiviert werden. Eine alleinige Stimulation des TZR führt in vitro zu keiner Proliferation der Zellen. Durch eine verminderte Aktivität der Telomerase sind diese Zellen nur limitiert teilungsfähig^{27,28}. Die nTregs lassen sich durch die Expression der Oberflächenmoleküle CD4⁺ und der IL-2 Rezeptor alpha-subunit CD25^{hoch+} charakterisieren, sind damit aber nur schwer von aktivierten Effektor-T-Zellen zu unterscheiden, da diese ebenfalls CD4 und CD25 exprimieren, allerdings in geringerer Oberflächendichte. Eine inhibitorische Wirkung konnte nur bei den CD25^{hoch+}-Zellen nachgewiesen werden²⁶.

Die nTregs besitzen Oberflächenmarker, wie zum Beispiel CD45RO, die für Gedächtniszellen typisch sind, das heißt sie sind bereits mit einem spezifischen Antigen aktiviert worden²⁹. Die immunsupprimierende Wirkung allerdings konnte als antigen-unspezifisch^{8,30} nachgewiesen werden und scheint unabhängig von der TZR Stimulation zu sein^{17,29}.

Bisher konnten keine spezifischen Marker von Tregs beschrieben werden, welche extrazellulär exprimiert werden. Die bisher am zuverlässigsten verwendeten Marker stellen das Molekül CTLA4⁸, das sich intrazellulär und gering extrazellulär nachweisen läßt und der intrazelluläre Transkriptionsfaktor FoxP3 dar^{17,31,32}. Ein weiterer Marker ist CD127, der nur gering auf Tregs exprimiert wird, als alleiniger Marker allerdings wenig zuverlässig ist³³⁻³⁵.

Eine Isolation mittels FoxP3 ist nicht möglich, da FoxP3 einen Transkriptionsfaktor darstellt und sich intrazellulär befindet. Die Zellen werden bei der intrazellulären Markierung von Foxp3 abgetötet. Es konnte auch gezeigt werden, dass CD4⁺CD25⁻ T-Zellen transient CTLA4⁸ und FoxP3³⁶⁻³⁹ bei Aktivierung exprimieren. Diese Responderzellen, welche transient FoxP3

exprimieren, sind weniger reaktiv auf Aktivierung. Sie nehmen trotz der transienten FoxP3 Expression aber keinen Treg-Phänotyp an⁴⁰. In einigen Arbeiten konnte eine Korrelation der FoxP3⁴¹ und CTLA4^{38,42} Expression mit der supprimierenden Wirkung der Tregs gezeigt werden.

1.4.1 Charakterisierung von Tregs

1.4.1.1 CD25

Die alpha-Kette des IL-2 Rezeptors ist auf Chromosom 10, p15-p14 zu finden und ist ein Transmembranprotein. Zusammen mit der beta und gamma Kette stellt sie einen hochaffinen Rezeptor für IL-2 dar. Ein Rezeptor aus zwei Alphaketten führt allerdings zu einer niedrigeren Affinität zu IL-2. CD25 wird von aktivierten CD4-Lymphozyten, sowie in höherer Konzentration auf Tregs exprimiert. Es wird als extrazellulärer Marker zur Isolation der Tregs verwendet. Milojevic et al. konnten eine Korrelation der CD25-Expression und den supprimierenden Eigenschaften der Tregs nachweisen⁶.

1.4.1.2 CTLA4

CTLA4, cytotoxic T lymphocyte associated 4, auch als CD152 bezeichnet, gehört zu der Gruppe der Immunglobuline und wird auf CD4⁺ T-Zellen exprimiert. Bei Expression ist die intrazelluläre Konzentration deutlich höher als es extrazellulär nachweisbar wäre⁴³. CTLA4 stellt ein kostimulatorisches Signal dar, entsprechend CD28 und bindet ebenfalls an das B7 Molekül, CD80 und CD86, auf APZs. CTLA4 vermittelt immuninhibitorische Signale, während CD28 stimulierende Signale auslöst⁴⁴. In einigen Versuchen zeigte sich, dass CTLA4 in Kombination mit einer Antigenstimulation zu einer verminderten T-Zellfunktion führt^{45,46}, dabei korrelierte die suppressive Aktivität von Tregs mit der CTLA4 Expression und zeigte eine zytokinunabhängige Regulation^{38,42,47}.

Daher wurde postuliert, dass die zellkontaktabhängige Regulation der Tregs durch CTLA4 vermittelt wird⁶. Zum Beispiel wurde bei Patienten mit juveniler idiopathischer Arthritis, JIA, eine geringere Expression von CTLA4 auf Tregs nachgewiesen, verglichen mit Zellen gesunder Probanden³¹. Vergleicht man die unterschiedlichen Formen der juvenilen idiopathischen Arthritis mit der Expression von CTLA4 auf Tregs, so konnte bei der persistierenden oligoartikulären Form, im Vergleich mit der polyartikulären oder systemischen Form, mehr CTLA4 auf Tregs detektiert werden³¹.

1.4.1.3 FoxP3

FoxP3, Forkhead box P3, ist ein Transkriptionsfaktor der zu einer Gruppe von forkhead Transkriptionsfaktoren zählt, welche sich durch eine als winged-helix bezeichnete Domäne auszeichnen. FoxP3 ist auf dem X-Chromosom, p11.23 lokalisiert. Der Transkriptionsfaktor FoxP3 bindet an etwa 700 Gene^{48,49}. Ein Defekt von FoxP3 führt zu der Entwicklung eines Typ I Diabetes, MIM 222100 oder des IPEX Syndroms, MIM 304790⁵⁰.

Es besteht eine teilweise verwendete Nomenklatur für FoxP3 als Gen und als Protein FOXP3⁵¹. Hier allerdings wurde die allgemein übliche Nomenklatur verwendet und sowohl Gen als auch Protein als FoxP3 bezeichnet.

IPEX, immunodysregulation, polyendocrinopathy and enteropathy x-linked syndrome, ist eine Erkrankung mit multiplen Autoimmunerkrankungen, bei dem es kurz nach der Geburt oder in den ersten Monaten zu der typischen Konstellation aus Enteropathie, Dermatitis und Endokrinopathie kommt. Die Kinder leiden an schwer behandelbarer schleimig, blutig oder wässrigen Diarrhö, einer unspezifischen Dermatitis, einem Typ I Diabetes mellitus, einer autoimmunbedingter Hypo- oder Hyperthyreose und autoimmunen Erkrankungen des Blutes wie einer hämolytischen Anämie. Es besteht ausserdem eine vermehrte Infektanfälligkeit. Erkrankte Mädchen oder Frauen sind bisher noch nicht beschrieben worden, dies führt zu der Annahme, dass Überträgerinnen gesund bleiben.

Die Vererbung erfolgt rezessiv. Die bei IPEX nachgewiesenen Mutationen im FoxP3 betreffen unterschiedliche Abschnitte des Transkriptionsfaktors⁵².

Eine Mutation außerhalb der proteinkodierenden Domäne, wie des Polyadenylationssignals, führen zu einer geringen Ausprägung des Syndroms⁵³.

In Tregs und nonTregs unterdrückt FoxP3 die Genexpression von IL-2 und induziert die Expression der Gene von CD25 und CTLA4^{54,55}. FoxP3 transduzierte T-Zellen wurden anerg, zeigten eine eingeschränkte Zytokinproduktion, exprimierten vermehrt CD25 und CTLA4 und wirkten regulierend auf T-Effektorzellen⁵⁶.

Seit 2003 wurde FoxP3 als Marker für Tregs beschrieben⁵⁷⁻⁵⁹. Bei Mäusen wurde FoxP3 in aktivierten T-Zellen nicht hochreguliert, daher ist er dort als definitiver Marker verwendbar⁵⁸. Beim Menschen wurde im Gegensatz dazu gezeigt, dass es bei aktivierten T-Zellen zu einer transienten Expression von FoxP3 kommt^{36,39,40}. Dies ist wiederum ein Beispiel dafür, warum Ergebnisse, die im Tiermodell gefunden werden, nicht auf das humane System zu übertragen sind⁸.

1.4.1.4 CD127

CD127 stellt die Alphakette des IL-7 Rezeptors, ein Transmembranrezeptor, dar und ist auf Chromosom 5, p13 lokalisiert^{33,60}.

CD127 korreliert umgekehrt proportional zu der Expression von FoxP3 und der suppressiven Funktion von Tregs³⁴. Nach Liu et al wird CD127 nach Aktivierung von T-Zellen vermindert exprimiert³⁴. Während Tregs nur gering CD127 exprimieren, steigern die meisten Effektorzellen und Gedächtniszellen erneut ihre Expression^{33,34,60,61}.

Allerdings zeigten andere Arbeiten, dass in FoxP3⁺CD127^{niedrig+} Zellen eine geringe bis keine CD25 Expression nachweisbar war^{33,35}.

1.4.1 Einfluss von TGFβ1 auf Tregs

TGFβ1, transforming growth factor beta 1, ist auf Chromosom 19, q13.1 lokalisiert und stellt ein multifunktionales Peptid dar. Es greift in die Differenzierung, in das Wachstum und die Funktion vieler Zellen ein. Nach Bindung an den TGFβ1 Rezeptor wird eine Signalkaskade über SMAD-Proteine ausgelöst, siehe Abbildung 1^{62,63}.

Die TGF-β-Gruppe besteht aus potenten regulatorischen Molekülen, denen eine wichtige Rolle in der T-Zell-Toleranz zukommt⁶⁴⁻⁶⁶. Es bestehen bei Säugetieren drei Isoformen, welche über zwei Serin-Threoninkinase-Rezeptoren wirken⁶⁷. Im Immunsystem ist überwiegend Isoform 1 exprimiert⁶⁸.

Für TGFβ1 konnte eine steigernde Wirkung auf die FoxP3-Expression in CD4⁺CD25⁻ Zellen nachgewiesen werden. Für diese Zellen konnte ein regulatorischer Phänotyp gezeigt werden, somit kommt TGFβ1 eine besondere Bedeutung in der Generierung von iTregs zu^{22,23,69-72}. Darüber hinaus hemmt TGFβ1 die T-Zell-Proliferation und Differenzierung zu Th1 und Th2 Zellen^{42,64-66,73}.

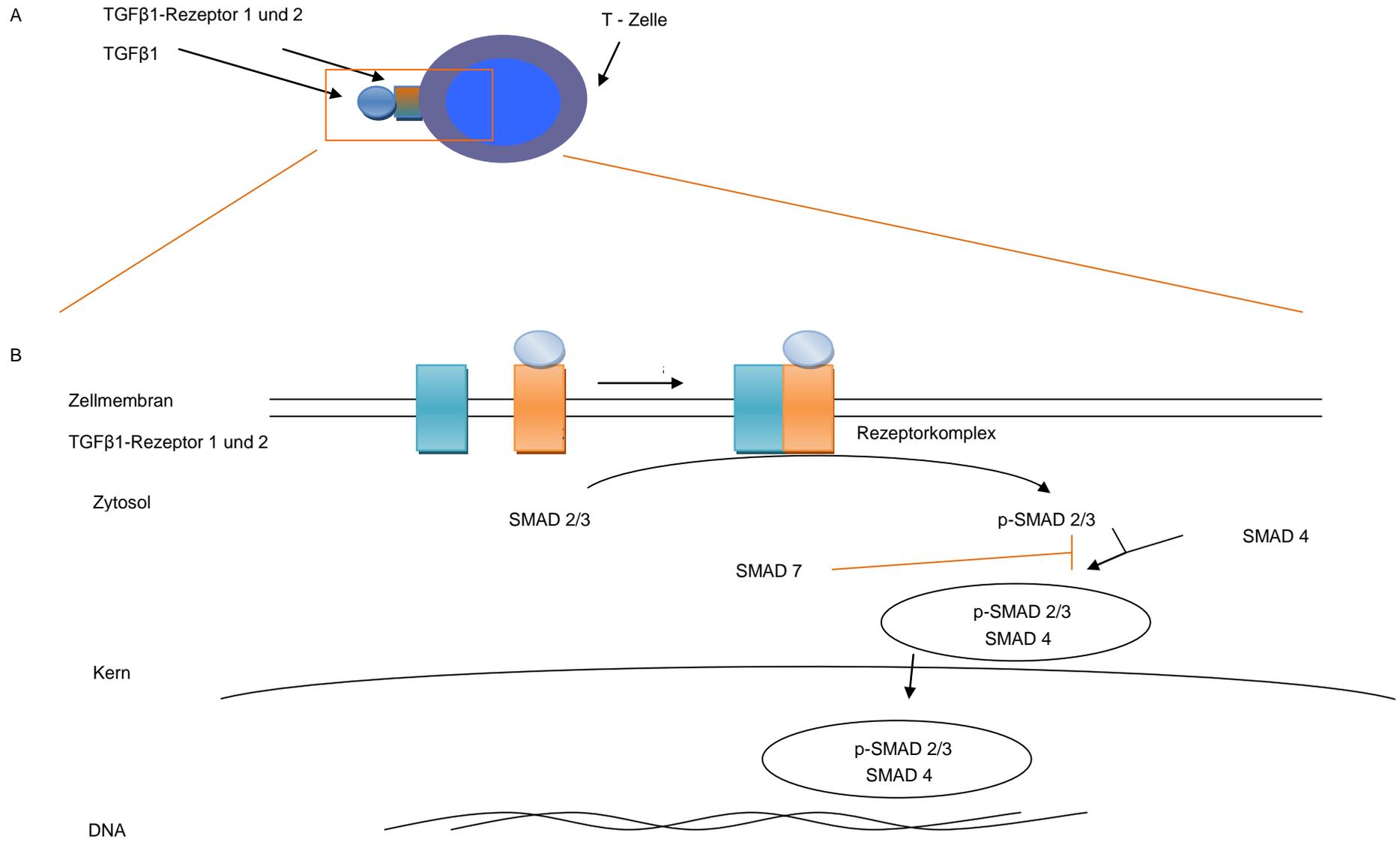


Abbildung 1: Signalkaskade von TGF β 1

A: Darstellung der T-Zelle (blau) mit an der Oberfläche fusionierte TGF β 1-Rezeptoren 1/2, sowie dem TGF β 1 (hellblauer Kreis) als Ligand.

B: Vergrößerte Darstellung der intrazellulären Effekte von TGF β 1 (rotes Rechteck vergrößert)

Bindet TGF β 1 an den TGF β 1-Rezeptor 2 assoziiert dieser mit Rezeptor 1 und bildet einen Rezeptorkomplex

Dieser Rezeptorkomplex phosphoryliert SMAD2 und 3 zu einem phosphorylierten

SMAD2/3-Komplex (p-SMAD 2/3). Der p-SMAD2/3 Komplex bildet wiederum mit SMAD4 einen Komplex. SMAD7 wirkt hemmend auf die Bildung des p-SMAD2/3\SMAD4. Der gebildete p-SMAD2/3\SMAD4-Komplex tritt als Transkriptionsfaktor in den Zellkern ein und reguliert die Expression verschiedener Gene.

1.4.2 Induktion von Tregs

Bei Tregs können nTregs und iTregs unterschieden werden. Während nTregs in dem Thymus generiert werden und durch den Phänotyp $CD4^+CD25^{\text{hoch}}$ charakterisiert sind, werden iTregs aus $CD25^-$ Zellen in peripheren lymphatischen Organen generiert⁷⁴. Bei den gefundenen Tregs zeigten sich kurze Telomere, daher besteht die Theorie, dass die iTregs aus hoch differenzierten $CD4^+$ -Lymphozyten generiert werden⁷⁵.

Die Stimulation $CD4^+CD25^-$ Zellen mit anti-CD3 Antikörper und anti-CD28 Antikörper zeigte bei einigen Arbeiten eine Induktion der FoxP3 Expression^{36,58,76}. FoxP3 gilt als zuverlässigster Marker für Tregs, somit kam die Theorie auf, dass sich Tregs in der Peripherie unter bestimmten Bedingungen generieren lassen. Die Zellen konnten allerdings in einigen Arbeiten keinen inhibitorischen Effekt zeigen^{36,76,77}. Andere Arbeiten konnten wiederum mit $TGF\beta 1$ immunregulatorische iTregs stimulieren^{25,30,36,78}. Verschiedene Arbeiten zeigten, dass eine Stimulation über den TZR und anti-CD28 Antikörper nötig ist um iTregs zu generieren⁷⁹⁻⁸³. Auch für $TGF\beta 1$ und CTLA4 als Kostimulator wurde eine bedeutende Rolle in der Induktion beschrieben^{84,85}. $TGF\beta 1$ steigert die Expression von FoxP3^{23,24,78}, CD25 und CTLA4^{30,78}. Tran et al. konnten zeigen, dass bei Stimulation des TZRs und des kostimulatorischen Signals CD28 nur 30 % der Zellen zur Expression von FoxP3 stimuliert wurden⁸⁴. Erfolgt dagegen die Stimulation mit zusätzlichem $TGF\beta 1$ exprimieren 80 % der Zellen FoxP3. Gibt man anti- $TGF\beta 1$ hinzu exprimieren wiederum nur noch < 4 % der Zellen FoxP3.

Andere Arbeiten zeigten ebenfalls eine wesentliche Bedeutung von $TGF\beta 1$ für die Induktion von Tregs und deren inhibitorische Funktion aus $CD4^+CD25^-$ Zellen^{25,30,78}.

In den durchgeführten Arbeiten war allerdings keine einheitliche Wirkung von $TGF\beta 1$ auf die Funktion der iTregs nachzuweisen, während einerseits kein Einfluss zu erkennen war⁸⁴, haben Andere einen verstärkenden Effekt von $TGF\beta 1$ auf die inhibitorischen Funktionen der iTregs feststellen können²³⁻

^{25,30,78,86}. Einige Arbeiten zeigten eine Zell-Zell-Kontakt abhängige Regulation, während andere dem membrangebundenen TGFβ1 die eigentliche regulatorische Funktion zuordnen. Letzteres konnte allerdings durch Piccirillo et al. widerlegt werden. Piccirillo wies keinen Effekt von zugefügtem TGFβ1 zu bereits induzierten Tregs nach. Auch konnte zugefügtes anti-TGFβ1 nicht die inhibitorische Funktion der iTregs aufheben^{26,30,87}.

Tregs wirken auf DCs indem sie deren Immunogenität reduzieren^{88,89} und deren Toleranz erhöhen⁹⁰. Beschrieben wurde auch die Möglichkeit von nTregs aus Effektor-T-Zellen iTregs zu rekrutieren²⁵.

1.5 Juvenile idiopathische Arthritis, JIA

Sind die komplexen Toleranzmechanismen gestört, können autoimmune Erkrankungen wie beispielsweise Diabetes mellitus Typ 1 oder die juvenile idiopathische Arthritis, JIA, entstehen. Die JIA ist die häufigste rheumatische Erkrankung des Kindesalters mit einer Häufigkeit von 0,1 %, d. h. die Inzidenz beträgt 10/100.000 Kinder⁹¹. Bundesweit kommt es zu 1500 Neuerkrankungen/Jahr. Die JIA umfasst verschiedene Formen der chronischen Gelenkentzündung und stellt eine T-Zell vermittelte rheumatische Erkrankung dar. Mädchen sind häufiger betroffen als Jungen. Sie ist definiert als eine arthritische Erkrankung unklarer Ursache welche vor dem 16. Lebensjahr beginnt und mindestens 6 Wochen andauert^{91,92}. Die JIA wird anhand klinischer und laborchemischer Parameter durch die International League of Associations for Rheumatology, ILAR, Klassifikation in 7 verschiedene Gruppen unterteilt. Die wichtigsten sind⁹³:

Oligoartikuläre Arthritis: Die oligoartikuläre Arthritis stellt 50-60 % der neu entstandenen JIA dar.

In den ersten 6 Monaten sind nicht mehr als 4 Gelenke betroffen. Kommen nach 6 Monaten weitere Gelenke hinzu, spricht man von einer extended oligoartikulären Form, bleibt es bei 4 oder weniger Gelenken, wird von einer persistierenden oligoartikulären Verlaufsform gesprochen. Diese Unterteilung ist

für prognostische Aussagen von Bedeutung, da die persistierende Form eine selbstlimitierende Erkrankung darstellt.

Polyarthritits: 15 – 20 % der JIA

Bei der Polyarthritits sind in den ersten 6 Monaten mehr als 4 Gelenke betroffen. Die Polyarthritits wird laborchemisch entsprechend dem Nachweis des Rheumafaktors, RF, in eine RF positive, <5% der JIA, oder RF negative Form, 10-15 % der JIA-Erstdiagnose, eingeteilt. Die RF positive Form stellt wahrscheinlich eine Frühform der rheumatoiden Arthritis des Erwachsenenalters dar.

Systemische Arthritis: 10 % der JIA

Bei der systemischen Arthritis, wird die Arthritis typischerweise durch antibiotikaresistentes Fieber, das im tageszeitlichen Rhythmus, spiking fever, sowie ein flüchtiges Exanthem, eine generalisierte Lymphknotenschwellung, eine Hepato- und/oder Splenomegalie und eine Serositis begleitet.

Der Verlauf ist abhängig von den Subtypen. 80 % der Patienten, welche eine persistierende Form der oligoartikulären Arthritis haben, erreichen innerhalb von 15 Krankheitsjahren eine Remission. Die betroffenen Gelenke sind deutlich weniger destruiert im Vergleich zu den anderen Verlaufsformen. Bei der extended Form der oligoartikulären Arthritis oder der Polyarthritits erreichen eine Remission nur 25 % der Patienten.

Folgen der Erkrankung sind Gelenkfehlstellungen, Wachstumsstörungen und Störungen der psychosozialen Entwicklung. 10 % der Patienten sind im Erwachsenenalter auf Hilfe im Alltag angewiesen.

2 Zielsetzung

Die juvenile idiopathische Arthritis ist die häufigste rheumatische Erkrankung des Kindes- und Jugendalter und stellt eine sehr heterogene Gruppe an Gelenkerkrankungen dar⁹¹. Sie ist eine T-Zell-vermittelte Erkrankung, deren Pathogenese noch nicht vollständig geklärt ist. Zudem bestehen verschiedene Verlaufsformen der Erkrankung mit einer großen Diskrepanz in der Prognose. Die Verlaufsformen reichen von einer spontanen Remission ohne Folgeschäden bis zur anhaltenden Inflammation mit Gelenkdestruktion. Welche Faktoren für die unterschiedlichen Verlaufsformen verantwortlich sind ist ebenfalls unklar.

Die Theorie, weshalb es zur Entstehung und zum Fortschreiten der Erkrankung kommt, ist eine gestörte T-Zellhomöostase. Die regulatorischen T-Zellen spielen eine entscheidende Rolle am immunologischen Gleichgewicht und der Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz¹⁹⁻²¹ und scheinen bei der Entstehung der JIA eine wichtige Rolle zu spielen. Um die Pathophysiologie der JIA zu verstehen und entsprechende Therapieansätze entwickeln zu können, stehen diese regulatorischen T-Zellen im Fokus der Ursachenforschung und dieser Arbeit. Um einen möglichen Mangel an Tregs in den betroffenen Gelenken zu untersuchen sollten Tregs aus dem Blut und der SF durchflusszytometrisch anhand ihrer Oberflächenmarker verglichen werden. Zudem sollten die isolierten Tregs in vitro auf deren immunregulatorischen Fähigkeiten überprüft werden. Inwiefern sich beispielsweise lokale Faktoren negativ auf die Funktion von Tregs auswirken, ist ebenfalls eine zu klärende Frage.

Zudem wurde beschrieben, dass auch nicht regulatorische T-Zellen unter gewissen Voraussetzungen einen Treg-Phänotyp annehmen^{36,74}. Häufig zeigten diese induzierten Zellen allerdings keine ausreichende immunregulatorische Aktivität^{36,76,77}. Inwieweit sich Tregs in der Peripherie induzieren lassen und welchen immunregulatorischen Einfluss diese Zellen auf inflammatorische Prozesse ausüben können, sollte ebenfalls Gegenstand dieser Arbeit sein. Sollten diese induzierten Tregs eine immunregulatorische Aktivität zeigen, so stellt sich auch hier die Frage, welche Faktoren der

entzündungshemmenden Wirkung entgegen stehen, so dass die Inflammation in den Gelenken noch nicht ausreichend gehemmt wurde. In dieser Arbeit sollte überprüft werden, welchen Einfluss hier lokale Faktoren in den Gelenken spielen.

Darüber hinaus scheint das Zytokin $TGF\beta 1$ ⁶⁴⁻⁶⁶ einen entscheidenden Einfluss auf Tregs und deren Funktion zu haben, so dass auch dieser Einfluss in vitro auf die Zellen von Kindern mit JIA untersucht werden sollte. Inwieweit molekulare Mechanismen auf Ebene der Signaltransduktion dieses immunregulatorischen Botenstoffes eine Rolle spielen bleibt unklar. Um dieser Frage nachzugehen, sollte im Rahmen dieser Arbeit das Verfahren der quantitativen Realtime-PCR etabliert werden.

3 Material

1.1 Geräte und Hilfsmittel

Zellzählgerät COBAS MICROS Roche Diagnostics	Mannheim	Deutschland
Bestrahlungsgerät Gammacell 1000 Elite MDS Nordion	Ontario	Kanada
FACSCalibur Flüssigkeitszytometer Becton Dickinson	Heidelberg	Deutschland
Microplate Reader Tecan SpectraFluor Tecan	Männedorf	Schweiz
Schüttler Heidolph Polymax 1040 Heidolph	Schwabach	Deutschland
Überkopfmischer Heidolph Reax 2 Heidolph	Schwabach	Deutschland
Ultrazentrifuge Beckmann L8-70M + Rotor TI 60 Beckmann	Krefeld	Deutschland
Umkehrmikroskop LM Olympus IX50 Olympus	Hamburg	Deutschland
Vario MACS Seperator Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach	Deutschland
Zellzählgerät COBAS MICROS Roche Diagnostics	Mannheim	Deutschland
Brutschrank HERA cell Heraeus	Hanau	Deutschland
Zytospin 3 Shandon	Frankfurt	Deutschland

ELISA-Reader Milenia Kinetic Analyzer Diagnostic Products Corporation	Los Angeles, CA	USA
Entwicklungsmaschine Classic E.O.S. Agfa	Köln	Deutschland
Folienschweißgerät Petra-electric	Burgau	Deutschland
Jura Impressa XF70 JURA Elektroapparate	Niederbuchsiten	Schweiz
Magnetrührer Fisher Bioblock Scientific	Illkirch Cedex	Frankreich
Pipetten LABMATE™ ABIMED	Langenfeld	Deutschland
Pipettierhilfe SWIFTPET™ ABIMED	Langenfeld	Deutschland
Rotiergerät MACSmix™ Tube Rotator Milteny Biotec	Bergisch Gladbach	Deutschland
Schüttelgerät Polymax 1040 Heidolph Instruments	Nürnberg	Deutschland
Standzentrifuge Rotixa 50 RS Hettich	Tuttlingen	Deutschland
Sterilbank HERA safe Heraeus	Hanau	Deutschland
Vortex IKA minishaker MS 1 IKA Works	Wilmington, NC	USA
Wärmebad Gesellschaft für Labortechnik	Burgwedel	Deutschland
Zentrifuge 5415 C Eppendorf	Hamburg	Deutschland
AutoMACS, Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach	Deutschland
Victor X3 Multilable Platereader, Perkin Elmer	Massachusetts	USA

1.2 Software

BD CellQuest™ Pro Version 4.0.2 BD Biosciences	Heidelberg	Deutschland
CellQuest™ Version 3.3. Becton Dickinson Immunocytometry Systems	Heidelberg	Deutschland
FCS Express V3, De Novo Software	Los Angeles	USA

1.3 Chemikalien, Reagenzien und Puffer

1.3.1 Allgemein

Ampuwa® Wasser Fresenius Kabi Deutschland GmbH	Bad Homburg	Deutschland
FACS Clean BD Biosciences Immunocytometry Systems	Heidelberg	Deutschland
FACS Flow BD Biosciences Immunocytometry Systems	Heidelberg	Deutschland
FACS Rinse BD Biosciences Immunocytometry Systems	Heidelberg	Deutschland
Biocoll/Ficoll Separating Solution, 1,077 g/ml, Biochrom AG	Berlin	Deutschland
PBS-Lösung (Dulbecco) ohne Ca/Mg Biochrom AG	Berlin	Deutschland
5 ml FACS-Röhrchen BD Biosciences Discovery Labware	Heidelberg	Deutschland

15 ml Falcon-Röhrchen Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen	Deutschland
50 ml Falcon-Röhrchen BD Biosciences Discovery Labware	Heidelberg	Deutschland
96-well Costar® Flachboden Zellkulturplatten Corning Incorporated	New York	USA
96-well U-Boden Zellkulturplatten Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen	Deutschland
162cm ² Costar® Zellkulturflasche Corning Incorporated	New York	USA
Deckgläser 22 x 22 mm Menzel Gläser	Braunschweig	Deutschland
EQUIBIO Einmalpipetten für alle Küvetten, Peqlab Biotechnologie GmbH	Erlangen	Deutschland
Fertiggele, NuPAGE® Novex Bis-Tris Gel 4-12 %, 1,0 mm, 12 well, Invitrogen	Karlsruhe	Deutschland
Glaspasteurpipetten 230 mm WU Mainz	Mainz	Deutschland
Kodak BioMax XAR Film Kodak	Rochester, NY	USA
Nitrocellulose Membrane Filter Paper, Sandwich 0,45 µm Porengröße, Invitrogen	Karlsruhe	Deutschland
Pipettenspitzen Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen	Deutschland
Safe-Lock Mikroreaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml), Eppendorf	Hamburg	Deutschland
Zellkulturpipetten, (2,0 ml, 5,0 ml, 10 ml, 25 ml), Corning Incorporated	New York	USA
Zellschaber Corning Incorporated	New York	USA

1.3.2 Westernblot

SDS Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe	Deutschland
Magermilchpulver Töpfer GmbH	Dietmannsried	Deutschland
peqGOLD Prestained Protein-Marker IV Peqlab Biotechnologie GmbH	Erlangen	Deutschland
SuperSignal® West Pico	Rockford, IL	USA
Chemiluminescent Substrate, Pierce Biotechnology	Rockford, IL	USA
TRIS-hydrochlorid Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe	Deutschland
Trypanblau Sigma-Aldrich	Steinheim	Deutschland
Trypsin/EDTA-Lösung (0,05 % / 0,02 %) in PBS ohne Ca , Mg, Biochrom AG	Berlin	Deutschland
Tween® 20 Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe	Deutschland
Laufpuffer, NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (20x) Invitrogen	Karlsruhe	Deutschland
Probenpuffer, NuPAGE® LDS Sample Buffer (4x), Invitrogen	Karlsruhe	Deutschland
Transferpuffer, NuPAGE® Transfer Buffer (20x), Invitrogen	Karlsruhe	Deutschland
Nucleospin RNA/Protein, Macherey-Nagel	Düren	Deutschland
Rneasy Mini Kit, Qiagen	Düsseldorf	Deutschland
Antikörper		
SMAD 2/3, sc-6202, I-20, Santa Cruz	Heidelberg	Deutschland

p-SMAD 2/3, sc-11769, Ser 433/435, Santa Cruz	Heidelberg	Deutschland
SMAD 4, sc-7966, B-8, Santa Cruz	Heidelberg	Deutschland
SMAD 7, sc-7004, N-19, Santa Cruz	Heidelberg	Deutschland

1.3.3 quantitative Realtime-PCR

High-Capacity cDNA Archieve Kit, Applied Biosystems	California	USA
TaqMan Universal PCR Master Mix, no Amperase UNG, Applied Biosystems	California	USA
TaqMan Gene Expression Assay, Applied Biosystems	California	USA
Primer, Applied Biosystems	California	USA
SMAD3, Hs00232219_m1 SMAD4, Hs00232068_m1 SMAD7, Hs00178696_m1 FoxP3, Hs00203958_m1 Hs (human), m (Intronlänge > 1 kb, nicht für genomische DNA geeingnet, nur cDNA)		
MicroAmp Optical 96 Reaction Plate, N801-0560, Applied Biosystems	California	USA
TaqMan Human Endogenous Control Plate, 4309921, Applied Biosystems	California	USA

1.3.4 BrdU, Thymidin

Viewplate 96, black, Packard/Perkin Elmer	Massachusetts	USA
Cell Proliferation ELISA, BrdU chemiluminescence, Roche	Mannheim	Deutschland
Thymidin H3, GE Healthcare	Freudenstadt	Deutschland

1.3.5 Verbrauchsmaterialien

1.3.5.1 Allgemein

Human-Albumin 20 % ZLB Behring GmbH	Marburg	Deutschland
VLE-RPMI 1640 (Very Low Endotoxin) mit 2,0 g/l NaHCO ₃ ohne L-Glutamin, Biochrom AG	Berlin	Deutschland
FBS, Biochrom AG	Berlin	Deutschland
HEPES Pufferlösung (1 M) (50x) Biochrom AG	Berlin	Deutschland
L-Glutamin (200 mM) Biochrom AG	Berlin	Deutschland
Penicillin/Streptomycin, 10.000 E/10.000 µg/ml. Biochrom AG	Berlin	Deutschland
Pooled Human Serum (PHS) Universitätskinderklinik Tübingen	Tübingen	Deutschland

1.3.5.2 Antikörper

Durchflußzytometrie		
FITC, anti-human CD4, BD, Klon RPA-T4	Heidelberg	Deutschland
FITC, anti-human CD25, BD, Klon M-A251	Heidelberg	Deutschland
PE, Mouse anti-human CD127, hIL-27R-M21, BD, Klon hIL-7R-M21	Heidelberg	Deutschland
PE, anti-human CD4, BioLegend, Klon RPA-T4	San Diego	USA
PerCP, anti-human CD4, BD, Klon RM4-5	Heidelberg	Deutschland
PE/Cy5, anti-human CD4, Biolegend, Klon RPA-T4	San Diego	USA
APC, anti-human CD152, CTLA4, BD, Klon BNI3	Heidelberg	Deutschland
APC, anti-FoxP3, Klon 259D, Alexa Fluor 647, Biolegend	San Diego	USA
APC, anti-human CD4, BioLegend, RPA-T4	San Diego	USA
Simultest $\gamma 1/\gamma 2a$, BD, Klon X39, X40	Heidelberg	Deutschland
Maus-anti-Human, IgG1, APC X0 IgG1 BD Biosciences Immunocytometry Systems	Heidelberg	Deutschland
MACS		
CD4 MicroBeads, human, 130-045-101, Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach	Deutschland
CD4 T-Cell Isolation Kit II, 130-091-155, Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach	Deutschland

CD4 Multisort Kit, human, 130-055-101, Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach	Deutschland
CD4 CD25 Regulatory T Cell Isolation Kit, human, 130-091-301, Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach	Deutschland
CD25 MicroBeads, human, 130-090-445, Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach	Deutschland
LS Säule, 130-042-401, Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach	Deutschland
MS Säule, 130-042-201, Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach	Deutschland

4 Methoden

4.1 Isolierung peripherer mononukleärer Zellen mittels Ficoll-Hypaque-Dichtegradientenzentrifugation

Die mononukleären Zellen aus dem Peripherblut (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) und der Synovialflüssigkeit (synovial fluid mononuclear cells, SFMCs) wurden aus Proben von Blut und Synovialflüssigkeit von Kindern mit juveniler idiopathischer Arthritis, JIA, isoliert. Die Synovialflüssigkeit wurde im Rahmen von therapeutischen Punktionen der Gelenke gewonnen. Das überschüssige Punktat, das für die weitere klinische Diagnostik nicht erforderlich war, wurde für die durchgeführten Versuche verwendet.

Die Zellen wurden durch eine Dichtegradientenzentrifugation gewonnen. Hierzu wurde die Probe in einem Verhältnis von 1:2 mit einer Pufferlösung (PBS) verdünnt. Zur Dichtegradientenzentrifugation wurden 15 ml Ficoll-Hypaque in ein 50 ml Zentrifugationsröhrchen gegeben und darüber vorsichtig 30 ml der Proben-PBS Mischung darüber geschichtet. Die Proben werden mit 2020 rpm (rounds per minute) für 15 Minuten bei Raumtemperatur und einer verzögerten Beschleunigungs- und Bremsfunktion zentrifugiert. Die gewünschte Schicht mit den PBMCs/SFMCs befindet sich zwischen der Ficoll-Hypaque-Trennlösung, mit ihrer spezifischen Dichte von etwa bei 1,077 g/ml und dem Überstand an. Der Überstand setzt sich aus Thrombozyten und Plasma zusammen. Die Phase welche die PBMCs/SFMCs beinhaltet stellt sich dabei als milchigtrüber Saum dar. Die Erythrozyten und Granulozyten setzen sich als Zellkuchen ab. Nach dem Abnehmen von 15 ml Überstand, wurde der Saum mit einer Pipette abgesaugt, resuspendiert und mit einer Lösung aus PBS + 2% FBS in zwei Schritten gewaschen. Die PBMCs/SFMCs setzen sich bei diesem Waschvorgang jeweils als Zellkuchen ab. Die isolierten PBMCs/SFMCs wurden gezählt und im Anschluss in 5 ml MACS-Puffer, bestehend aus PBS mit 0,5 % HSA, resuspendiert und für die nachfolgende MACS Isolierung erneut gewaschen.

4.2 Isolierung von T-Zellen durch magnetische Zellsortierung, MACS

Die Isolation der CD4⁺-Lymphozyten aus PBMCs/SFMCs erfolgte mittels magnetischer Zellsortierung (magnetic cell sorting, MACS) unter Verwendung entsprechender Antikörper, siehe Abbildung 2.

Zur CD4⁺-Isolierung aus dem Blut konnte der CD4⁺ „untouched“ T-Zell-Isolationskit zur Negativselektion verwendet werden. Bei der Negativselektion wurde eine Antikörpermischung zugegeben, welche gegen Epitope auf allen im peripheren Blut vorkommenden Zellen außer CD4⁺ gerichtet ist. Die Antikörper sind am Fc-Ende mit Biotin markiert, so dass mit einem sekundären Biotin-Antikörper, der am Fc-Ende mit Eisen beladen ist, die Isolation über die magnetische Säule möglich ist. Der Vorteil dieser Negativselektion ist, dass es nicht zur Aktivierung der Zellen kommt und somit auch kein Einfluss auf die weiteren Versuche besteht. Der Rezeptor bleibt frei und wird nicht blockiert.

Die positiv selektionierten Zellen aus dem Blut, welche nicht CD4⁺ tragen und somit im Magnet im ersten Schritt zurückgeblieben sind, wurden in einem zweiten Schritt nach Entfernung des Magnetfeldes aus den Säulen herausgewaschen und in den Versuchen als antigenpräsentierende Zellen, APZs, verwendet.

Für die Isolation von CD4⁺-Zellen aus der Synovialflüssigkeit konnte dieser Kit nicht verwendet werden, da er nicht für die Zellzusammensetzung in der Synovialflüssigkeit optimiert ist. Bei der Anwendung waren nach einer Isolation zusätzlich zu den CD4⁺ Zellen auch reichlich andere Zellen nachweisbar, die nicht CD4⁺ exprimiert haben.

Für die Isolation der CD4⁺ Zellen aus den SFMCs wurde eine Positivselektionierung angewandt. Dafür wurden Antikörper gegen CD4 verwendet, welche an ihrem Fc-Ende mit Eisen beladen waren. Die

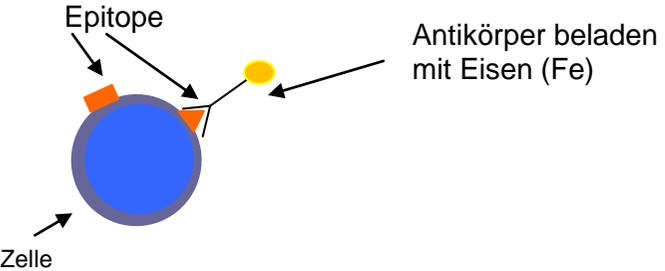
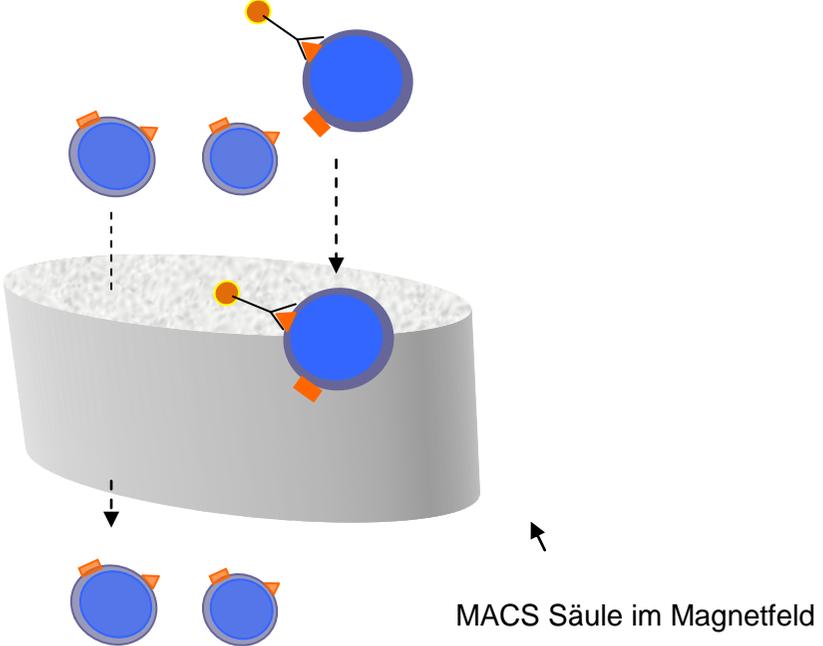
gewünschten Zellen blieben so in dem Magnetfeld hängen und konnten nach Entfernung des Magnetfeldes aus der Säule herausgewaschen werden.

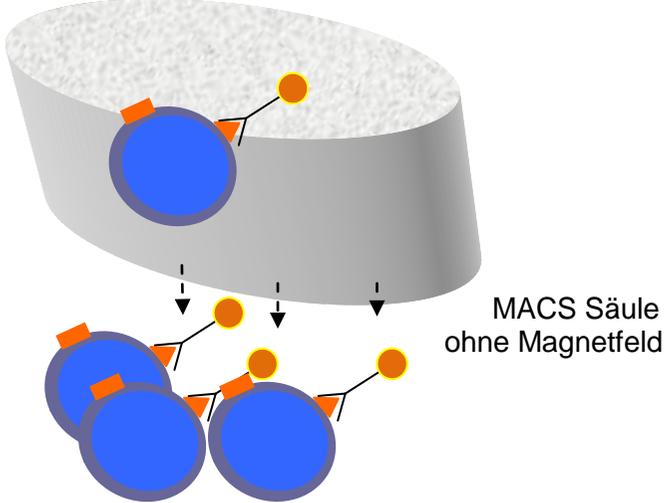
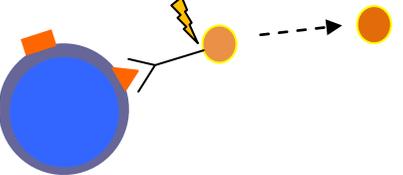
Um eine weitere Sortierung vorzunehmen wurde mit einem Releasereagenz der Eisenanteil abgespalten, so dass im nächsten Schritt eine erneute Isolation von Untergruppen wie CD25 möglich wird.

Um diese Untergruppe zu isolieren wurde erneut eine Positivselektionierung für das Epitop CD25 durchgeführt. Dazu wurden die CD4⁺ T-Lymphozyten aus Blut und SF mit einer Antikörperlösung gegen CD25 inkubiert und erneut über das Magnetfeld isoliert.

Die Isolation über die Magnetsäule erfolgte anfangs manuell mittels spezieller MACS-Säulen. Für die Isolation verwendete LS MACS-Säule ist für eine Zellzahl von bis zu 10⁸ markierten Zellen geeignet.

Die später verwendete automatische MACS-Isolation erfolgte mit dem AutoMACS Pro Gerät der Fa. Miltenyi Biotec wobei die Isolationsschritte automatisiert sind. Dafür wurden die mit Antikörpern beladenen Zellen in 1 ml MACS-Puffer aufgenommen und mit entsprechenden Isolationsprogrammen isoliert. Für die negative Selektion bei der CD4⁺-Isolation aus Blut wurde das Programm Deplete S verwendet. Für die positive Selektion bei der CD4⁺-Isolation aus SF oder bei der CD25⁺-Isolation wurde das Programm Possel S oder DS verwendet.

<p>A Markierungsschritt:</p> <p>Die Zellen werden mit Antikörpern gegen die gewünschten Oberflächenmarker wie CD4 oder CD25 markiert. Diese Antikörper tragen einen Eisenkern (Fe) am Fc-Ende des Antikörpers.</p>	
<p>B Selektionsschritt:</p> <p>Die Proben werden nun über eine MACS Säule gegeben, die sich in einem Magnetfeld befindet.</p> <p>Die mit Antikörpern und damit mit Eisen markierten Zellen werden im Magnetfeld in der Säule gehalten, während die nicht markierten Zellen hindurchwandern.</p> <p>Positivselektion: Die gewünschten Zellen sind markiert und bleiben im ersten Schritt im Magnetfeld haften.</p>	

<p>Negativselektion: Die gewünschten Zellen sind die einzigen die nicht markiert sind und passierend das Magnetfeld ungehindert.</p>	
<p>C Gewinnungsschritt: Nachdem die Säule im Magnetfeld gewaschen wurde und damit alle unmarkierten Zellen aus der Säule entfernt wurden, wird die Säule aus dem Magnetfeld geholt und gespült. Die markierten Zellen werden gewonnen.</p>	 <p>MACS Säule ohne Magnetfeld</p> <p>Das Diagramm zeigt eine 3D-Perspektive einer MACS Säule. Die Säule ist als grauer Zylinder mit einer weißen, porösen Oberfläche dargestellt. Ein blauer Kugelkörper (Antikörper) ist an der Oberfläche befestigt. Ein gelber Kugelkörper (Zelle) ist an den Antikörper gebunden. Drei vertikale Pfeile zeigen nach unten, was den Fluss von Flüssigkeit durch die Säule darstellt. Unten sind drei weitere blaue Kugelkörper dargestellt, die von der Säule getrennt sind, was die Gewinnung markierter Zellen darstellt.</p>
<p>D Abspaltungsschritt: Als nächster Schritt wird der Eisenkern durch ein Releasereagenz vom Antikörper abgespalten. Somit wäre eine weitere Selektion möglich.</p>	 <p>Das Diagramm zeigt einen blauen Kugelkörper (Antikörper) und einen gelben Kugelkörper (Zelle), die durch einen Antikörper verbunden sind. Ein gelber Blitz symbolisiert die Wirkung einer Releasereagenz, die die Verbindung zwischen dem Eisenkern und dem Antikörper spaltet. Ein gestrichelter Pfeil zeigt den Weg des gelben Kugelkörpers weg von der Säule.</p>

4.1 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte automatisch mittels Zellzählgerät COBAS MICROS, Roche Diagnostics.

4.4 T-Zellkultur

Die 96-Loch-Flachboden-Kulturplatten wurden mit einem plattengebundenem anti-CD3 Antikörper präpariert. Dazu wurde eine anti-CD3 Antikörperlösung (Konzentration: 5 µg/ml) hergestellt, lochbedeckend in jedes Fach der Kulturplatte gegeben (50 µl) und inkubiert (bei 37 °C für 30 Minuten).

Die gewonnenen Zellen wurden in diese Flachbodenplatten gegeben und je nach Versuchsansatz mit TGFβ1 (Konzentration: 5 ng/ml) und/oder anti-CD28 Antikörper (Konzentration: 1 µg/ml) in gelöster Form zugefügt. Die isolierten CD4⁺ T-Zellen wurden erneut gewaschen (mit PBS + 2 % FBS bei 300 g 5 Minuten) und resuspendiert (in einer Mischung aus VLE-RPMI 1640, 10 % PHS pooled human serum, Penicillin 0,06 mg/ml, Streptomycin 0,1 mg/ml, Glutamin 2 mM und HEPES-Puffer 10 mM). Für die Kultur wurden die Platten in den Brutschrank gegeben und bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

4.5 Durchflusszytometrie

Mittels der Durchflußzytometrie (fluorescence-activated cell scan, FACS) erhält man Informationen über Größe, Granularität sowie Antigene der untersuchten Zellen. Die Antigene der Zellen werden zuvor mit fluoreszierenden Antikörpern markiert. Die verwendeten Antikörper waren gegen CD4, CD3, CD25, CD127, CTLA4 und FoxP3 gerichtet. Die beiden letzteren Antikörper sind intrazelluläre Farbstoffe.

Im Durchflußzytometer werden dafür alle Zellen einzeln mit den Lasern bestrahlt. Die verwendeten Laser im BD FACSCalibur sind ein Argonlaser (Wellenlänge: 488nm) und ein Helium-Neon-Laser (Wellenlänge 635 nm).

Informationen zur Größe der Zellen erhält man über das Vorwärtsstreulicht (FCS) des Lasers, während die Brechung des Lichts, das Seitwärtsstreulicht (SSC), ein Maß für die Granularität darstellt. Durch diese Informationen lassen sich die Zellen bereits in vitale/avitale Zellen, Monozyten, Lymphozyten, Granulozyten und andere Zellen unterteilen.

Um Informationen über die markierten Antigene zu erhalten, werden durch die Laser die Fluoreszenzfarbstoffe der Antikörper angeregt. Das emittierte Fluoreszenzlicht befindet sich je nach Farbstoff in einem spezifischen Spektrum. Diese spezifischen Fluoreszenzen werden durch Detektoren erfasst und können einer bestimmten Zelle zugeordnet werden. In dem verwendeten Gerät BD FACSCalibur können bis zu 4 verschiedene Färbungen gleichzeitig gemessen werden. Die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe waren Fluorescein (FITC) (Maximum der Fluoreszenz: 530 nm), Phycoerythrin (PE) (Maximum der Fluoreszenz: 578 nm), Peridinin Chlorophyll Protein (PerCP) (Maximum der Fluoreszenz: 678 nm). Diese Fluoreszenzemissionen werden über den blauen Argonlaser (488 nm) angeregt. Als weiterer Fluoreszenzfarbstoff wurde Allophycocyanin (APC) (Maximum der Fluoreszenz: 660 nm) verwendet, das vom roten Helium-Neon-Laser (633 nm) angeregt wird.

In der Auswertung erfolgte zunächst die Aufteilung anhand der SSC und FSC Daten. Dabei wurde als erste Eingrenzung eine Region festgelegt, die den Lymphozyten entspricht. Dieser Bereich weist wenig Granularität, eine kleine bis mittlere Größe auf und ist als eigenständige Population zu erkennen. Daraufhin wurden die Zellen anhand der markierten Antigene analysiert. Für eine Analyse der Tregs wurden die oberen 3 % der CD4⁺CD25⁺-Zellen des Blutes vor jeglicher Kultur als Tregs definiert. Diese Quadranteneinteilung wurde für die Analyse der anderen Proben verwendet.

4.5.1 Zellfärbung für die FACS-Analyse

4.5.1.1 Extrazelluläre Färbung

Die zu färbenden Zellen wurden in FACS-Röhrchen gegeben und gewaschen (2 ml PBS + 2 % FCS, Raumtemperatur, 5 Minuten, 1400 rpm). Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 50 µl 10 % PBS resuspendiert. Der extrazellulären Antikörper (1 µl) wurde hinzugegeben und 10 Minuten auf Eis unter Lichtabschluss inkubiert. Daraufhin erfolgten zwei weitere Waschschriffe (jeweils 2 ml PBS + 2 % FCS, Raumtemperatur, 5 Minuten, 1400 rpm). Der extrazellulären Färbung schließt sich die intrazelluläre Färbung an.

4.5.1.2 Intrazelluläre Färbung

4.5.1.2.1 CTLA4

Nach dem letzten Waschvorgang der extrazellulären Färbung wurden die Zellen in 1 % Paraformaldehyd (100 µl) resuspendiert und bei Raumtemperatur unter Lichtabschluss 15 Minuten inkubiert. Danach erfolgten zwei weitere Waschschriffe (2 ml PBS + 2 % FCS, Raumtemperatur, 5 Minuten, 1400 rpm). Ein dritter Waschschritt erfolgte mit einer Saponinlösung (0,5 – 1 ml PBS + 2 % FCS + 0,1 % Saponin), welche die Zellmembranen perforiert. Dem resuspendierten Pellet (in 50 µl der Lösung) wurde der CTLA4 Antikörper zugegeben (1 µl). Die Inkubation erfolgte 30 Minuten auf Eis. Nach einem erneuten Waschschritt (2 ml PBS + 2 % FCS, Raumtemperatur, 5 Minuten, 1400 rpm) konnten die Zellen nun gemessen werden.

4.5.1.2.2 FoxP3

Für die intrazelluläre Färbung mit FoxP3 wurden nach erfolgter extrazellulärer Färbung die Zellen mit der 1X FoxP3 Fix/Perm Lösung (0,5 ml) unter Lichtabschluss 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und danach zentrifugiert (1400 U/min 5 Minuten). Es erfolgten zwei Waschschriffe (2 ml PBS + 2 % FCS, 1400 U/min 5 Minuten) und (0,5 ml 1 X FoxP3 Permbuffer, 1400 U/min 5 Minuten). Nach Resuspension in 1 X FoxP3 Permbuffer (0,5 ml) wurden die Zellen unter Lichtabschluss bei Raumtemperatur 15 Minuten inkubiert und danach nochmals zentrifugiert. Dem Pellet wurde der FoxP3-Antikörper (1 µl) dazugegeben. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur unter Lichtabschluss für 30 Minuten. Nach zwei weiteren Waschschriffen (2 ml PBS + 2 % FCS, 1400 U/min 5 Minuten) konnten die Zellen gemessen werden.

4.6 Proliferation

Proliferation kann, je nach verwendetem Verfahren, über den Einbau markierter Nukleotide bei der Replikation gemessen werden. Die Nukleotide können radioaktiv markiert sein. Somit kann anhand der gemessenen Strahlungsintensität auf die Proliferationsrate rückgeschlossen werden. Andererseits existieren auch immunologische Verfahren, bei denen nicht radioaktiv markierte Nukleotide eingebaut und mittels eines ELISA nachgewiesen werden können. Diese zwei Verfahren wurden in den durchgeführten Versuchen verwendet und im Weiteren näher beschrieben.

4.6.1 BrdU-Test

Um das Wachstum der Zellen bestimmen zu können, verwendeten wir ein Verfahren, welches den Einbau markierter Nukleotide während der Replikation

der DNA detektiert. Dazu wurde das nicht radioaktive 5-Bromo-2,-desoxyuridin (BrdU) verwendet.

Das BrdU wird anstelle des Thymidin in die DNA eingebaut und kann immunologisch nachgewiesen werden. Verwendet wurde der 'cell proliferation ELISA BrdU chemiluminescence Kit' der Firma Roche. Für die Messung werden die Zellen kultiviert und den letzten 24 Stunden das BrdU hinzugegeben. Am Tag der Auswertung wurden die Zellen in der Kulturplatte depletiert und auf dem Boden getrocknet. Nach Fixierung der Zellen und Denaturierung (mit FixDenat) werden die Zellen mit einem anti-BrdU-POD-Antikörper inkubiert. Für die Messung wurde eine Substratreaktion durch Zugabe einer Substratlösung (TMB) ausgelöst. Diese Chemilumineszenz wird mit Hilfe eines Plattenlesers (Victor plate-reader, Wellenlänge: 370 – 492 nm) gemessen.

4.6.2 ³H-Thymidin-Einbau

Das Verfahren funktioniert ebenfalls über den Einbau markierter Nukleotide in die sich teilenden Zellen bei der Replikation. Das Thymidin ist in diesem Fall mit Tritium, ³H, radioaktiv markiert. Die Zellen werden kultiviert und den letzten 24 Stunden ³H-Thymidin zugegeben. (20 µl Kulturmedium auf je Kultur 1 µCi verdünnt) In einem Zellerntegerät werden die Zellen aufgenommen und durch eine Glasfasermatte gesaugt. In Zellen eingebautes ³H-Thymidin bleibt auf der Glasfasermatte hängen, während ungebundenes Thymidin gewaschen wird. Nach mehreren Waschvorgängen wird die Glasfasermatte 30 Minuten bei etwa 180 Watt in der Mikrowelle getrocknet. Nach Zugabe von Szintillationsflüssigkeit wird die Radioaktivität in einem entsprechenden Beta-Counter gemessen. Die gemessene Strahlungsintensität (cpm, counts per minute) ist ein Maß für die Proliferation.

4.7 Herstellung von Zelllysaten eukaryotischer Zellen

4.7.1 Isolation von mRNA und Protein

Für die Isolation von mRNA wurden die Zellen (Anzahl: $0,5 - 1 \cdot 10^6$) in Eppendorf-Röhrchen (1,5 ml) gewaschen und in einer Lyselösung resuspendiert. Die entsprechende Lösung zur Lyse der Zellen unterscheidet sich je nach Isolationskit, diese enthalten aber stets RNase-Inhibitoren. Die lysierten Zellen wurden eingefroren (-80 °C) und für die weitere Isolation entsprechend aufgetaut. Im gefrorenen Zustand sind die Lysate jahrelang haltbar.

Für die Isolation von messenger RNA (mRNA) und Protein wurde anfangs ein Kit von Machery Nagel verwendet, der in den durchgeführten Versuchen keine ausreichende Reinheit oder zu wenig mRNA erbrachte, weshalb im Weiteren ein Kit von Quiagen verwendet wurde, mit dem die Reinheit sowie eine größere mRNA-Menge erzielt werden konnte.

4.7.1.1 RNeasy Mini Kit von Quiagen

Für die mRNA Isolation, mit dem Isolationskit von Quiagen, wurden die Zellen in Lysepuffer (350 μ l) resuspendiert, welcher aus 1 ml RLT-Puffer und 10 μ l Mercaptoethanol bestand. Nach 1 Minute vortexen wurden die Zellen bei -80 °C eingefroren.

Zur weiteren Isolation wurde das Zelllysate zusätzlich mechanisch lysiert, dazu wurde die Probe mit Ethanol 70% (350 μ l) vermischt und mehrmals durch eine Kanüle (0,9 mm) gezogen. Diese Mischung (700 μ l) wurden auf den RNeasy Filter gegeben. In dem Silica-Gel des Filters bleibt die RNA zurück. Mit diesen Filtercups wurden die Zellen 15 Sekunden bei 10 000 rpm zentrifugiert.

Nach verschiedenen Waschschritten wurde die mRNA aus dem Filter mit RNase freiem Wasser gewaschen. Nach der mRNA Isolation wurden die RNA Proben bei – 80 °C eingefroren.

Der gewonnene Durchfluß im ersten Schritt wurde zur Proteingewinnung verwendet. Zur Isolation von Protein wurde die 4-fache Acetonmenge (eisgekühlt) mit dem Durchfluß vermischt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach 10 Minuten zentrifugieren setzen sich die Proteine als Pellet ab. Das Pellet wurde danach mit Ethanol (100 µl, eisgekühlt) gewaschen und getrocknet. Daraufhin wurde es in Loading Puffer resuspendiert und 7 Minuten auf 95 °C gehitzt. Die so gewonnene Probe kann nun für Westernblotmessungen verwendet werden.

4.7.2 Photometrische Bestimmung der mRNA-Menge

Die Messung der mRNA-Menge erfolgte photometrisch. Dazu wurde ein Leerwert mit RNA-freiem Wasser (50 µl) bestimmt. Die Probe wurde dann in einem Verhältnis von 1:50 verdünnt gemessen. Die photometrische Messung erfolgte bei 260 nm. Die gemessene mRNA-Menge wird in µg/ml angegeben. Dies entspricht einer Umrechnung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm entsprechend folgender Formel:

$$\text{mRNA } (\mu\text{g/ml}) = 260 \text{ nm} * 40 * \text{Verdünnungsvolumen}$$

Der gemessene Reinheitsquotient sollte zwischen 1,7 und 2,1 liegen und setzt sich aus dem Quotienten der Extinktion für mRNA bei 260 nm und der Extinktion für Protein bei 280 nm zusammen.

4.8 Umschreibung von mRNA auf cDNA

Für die quantitative Realtime-PCR (qRT-PCR) wird codierende DNA (cDNA) benötigt. Diese wird durch eine reverse Transkription aus der isolierten mRNA hergestellt. Für diese Umschreibung wurde der High-Capacity cDNA Archive Kit von Applied Biosystems verwendet.

Nachdem die mRNA Proben im Photometer nach ihrer Reinheit und Konzentration untersucht wurden, wird für die reverse Transkription 1 µg mRNA eingesetzt. Diese wurde auf eine Menge von 25 µl verdünnt und mit einem RT Mastermix (25 µl) vermischt (Reagenzien des Kit: RT Puffer 5 µl, dNTP-Mix 2 µl, Random Primer 5 µl, Multiscribe RT 2,5 µl, RNase freies Wasser 10,5 µl).

Für eine Negativkontrolle dieses Vorgangs, wurde eine Probe ohne Zusatz der reversen Transkriptase (Multiscribe RT) eingesetzt.

4.9 Quantitative Realtime-PCR

Mit der quantitativen Realtime-PCR (qRT-PCR) kann auf eine absolute Menge an cDNA rückgeschlossen werden. Das Verfahren ist in Abbildung 3 dargestellt. Dafür ist eine Referenzprobe mit bekannter Menge erforderlich, die in derselben Messung ebenfalls amplifiziert wird.

Für die bestehende Fragestellung einer unterschiedlichen Expression der Botenstoffe der Signalkaskade von TGFβ1 ist auf RNA-Ebene allerdings eine relative Quantifizierung ausreichend.

Etabliert wurde das Verfahren für die Gene SMAD3, SMAD4, SMAD7 und FoxP3. Um die gemessene DNA Menge relativ quantifizieren zu können, müssen diese auf geeignete Referenzgene bezogen werden. Der Anspruch an die Referenzgene besteht in einer stabilen Expression der untersuchten Zellen. Für die bestehende Fragestellung war auch eine stabile Expression der Referenzgene unter verschiedenen Kulturbedingungen (anti-CD3, anti-CD28, TGFβ1, IL-2) erforderlich. Die verwendeten Referenzgene wurden nach Untersuchung der Expression von 11 verschiedenen, gängigen Referenzgenen

mittels eines Testkits (TaqMan Endogenous Control Plate, Applied Biosystem) ausgewählt. Als Referenzgene wurden β_2 -Mikroglobulin und humane β -Glucuronidase verwendet.

Die PCR ist ein in vitro Verfahren bei der, durch spezifische Primer, definierte Bereiche der cDNA repliziert werden und durch wiederholte Zyklen eine nahezu exponentielle Zunahme der Ziel-DNA erreicht wird. Um diese Amplifikationen zu detektieren, werden so genannte TaqMan Sonden eingesetzt, die mit einem fluoreszierenden Reporterfarbstoff am 5' Ende markiert sind. Diese Sonden enthalten einen zusätzlichen Quencher am 3' Ende, der die Fluoreszenz durch einen Fluoreszenzresonanz-Energietransfer (FRET) unterdrückt, solange eine räumliche Nähe besteht.

Der Effekt beruht darauf, dass das Emissionsspektrum des Reporterfarbstoffes dem Anregungsspektrum des Quenchers entspricht, dieser aber nicht im Fluoreszenzspektrum die Energie emittiert.

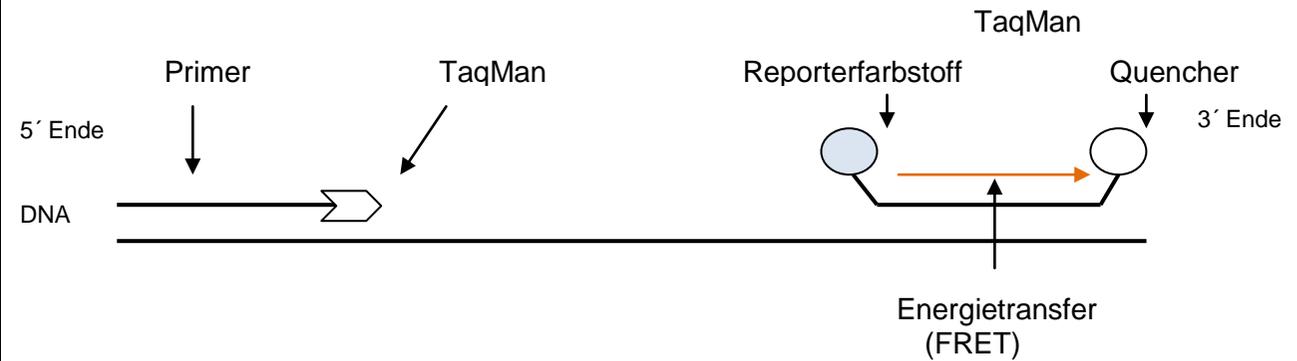
Die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe sind 6-Carboxyfluorescein (FAM, 530 nm), ROX (610 nm) als passiver Referenzfarbstoff und VIC (554 nm, in der Referenzgenkontrollplatte verwendet).

Während der Amplifikation wird durch die 5' Exonukleaseaktivität der Taq DNA Polymerase die Sonde vom 5' Ende her gesehen aufgespalten. Die dadurch aufgelöste Nähe von Reporterfarbstoff und Quencher führt zu einer messbaren Fluoreszenz, welche proportional zur Amplifikationsmenge ist. Das Verfahren ist in Abbildung 3 schematisch dargestellt.

A Der spezifische Primer haftet an das 5' Ende der DNA, an die für ihn definierte Stelle. An den Primer haftet sich die Polymerase und beginnt in 3' Richtung die DNA zu amplifizieren.

Zusätzlich haftet eine TaqMan Sonde an die DNA, welche am 5' Ende einen Reporterfarbstoff trägt und am 3' Ende einen Quencher.

Der Quencher unterdrückt die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffs durch einen so genannten Fluoreszenzresonanz-Energietransfer (FRET). Das Emissionsspektrum des Reporterfarbstoffes entspricht



	<p>dem Anregungsspektrum des Quenchers. Die Emission der Energie durch den Quencher liegt aber nicht im Fluoreszenzspektrum.</p>
B	<p>Die Polymerase amplifiziert das spezifische DNA Segment. Trifft die Polymerase die angeheftete TaqMan Sonde, so wird diese durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität verdrängt und gespalten.</p>  <p>Das Diagramm zeigt den Mechanismus der TaqMan-Methode. Eine TaqMan-Polymerase (blauer Kreis) synthetisiert ein DNA-Fragment (graue Linie) von einem Primer (schwarze Linie) aus. Die TaqMan-Sonde (weiße Linie) ist an der 3'-Ende des Primers angeheftet und enthält einen Fluorophor (blauer Kreis) und einen Quencher (roter Blitz). Die Polymerase spaltet die Sonde durch ihre 5'-3'-Exonukleaseaktivität, was zur Freisetzung des Fluorophors führt.</p>

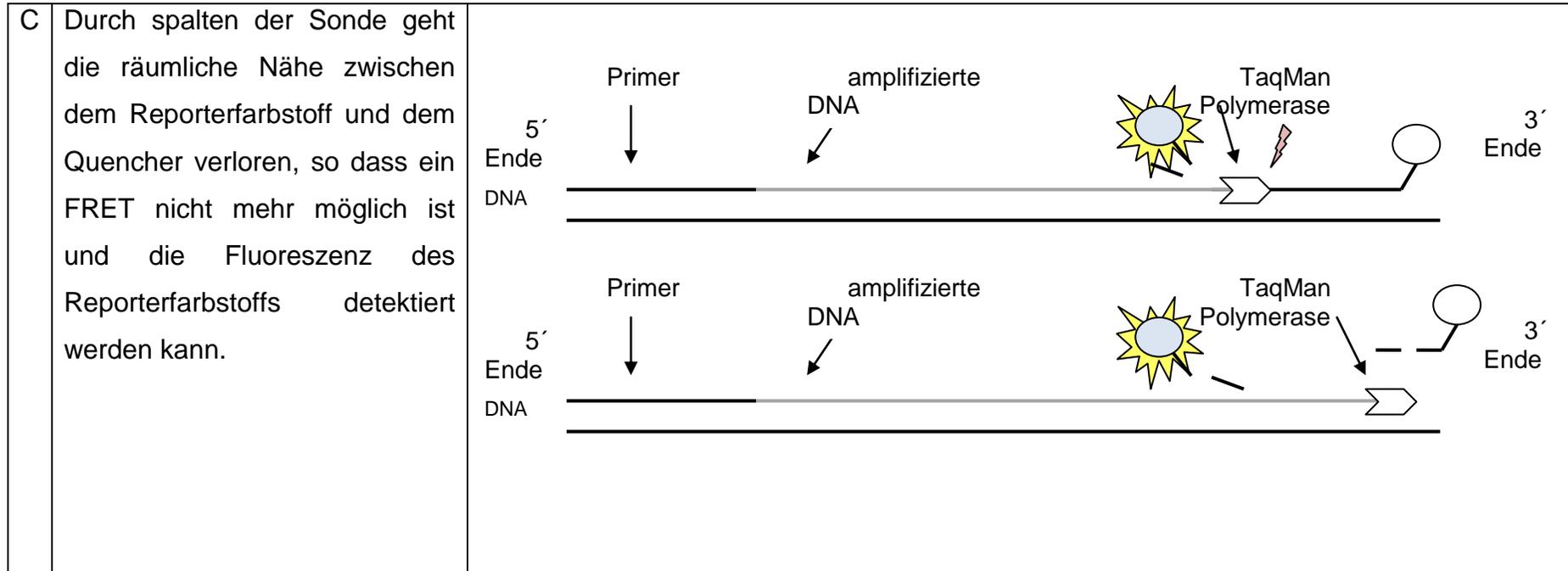


Abbildung 3: Schematische Darstellung der quantitativen RT-PCR

Für den PCR Ansatz wurde die umgeschriebene cDNA (10 µl) verwendet und mit den spezifischen Primern (qPCR Primer Mix 2,6 µl) zusammen pipettiert und mit Master-Mix Taq Man (25 µl) und H₂O (12,4 µl) vermischt.

Bei jeder Messung wurden Negativkontrollen durchgeführt. Diese wurden durchgeführt um Verunreinigungen der Reagenzien zu untersuchen.

- 1) nur die Primer ohne Probe
- 2) nur der Taq Man enthalten
- 3) Negativkontrolle aus der Generierung der cDNA, bei der also keine Umschreibung durch fehlende reverse Transkriptase möglich war.

4.9.1 Auswertung qRT-PCR

Die Auswertung der qRT-PCR ist in Abbildung 4 und 5 illustriert. Wie unter 4.9 beschrieben, ist die gemessene Fluoreszenz direkt proportional zur amplifizierten DNA-Menge. Da die Amplifikation ein nahezu exponentielles Wachstum zeigt, kann anhand verschiedener Parameter auf die Ausgangsmenge rückgeschlossen werden.

Für eine relative Quantifizierung der cDNA Ausgangsmenge, werden die gemessenen Parameter auf ein oder mehrere Referenzgene bezogen. Die Referenzgene zeigen unter den Versuchsbedingungen und den untersuchten Zellgruppen eine stabile Expression.

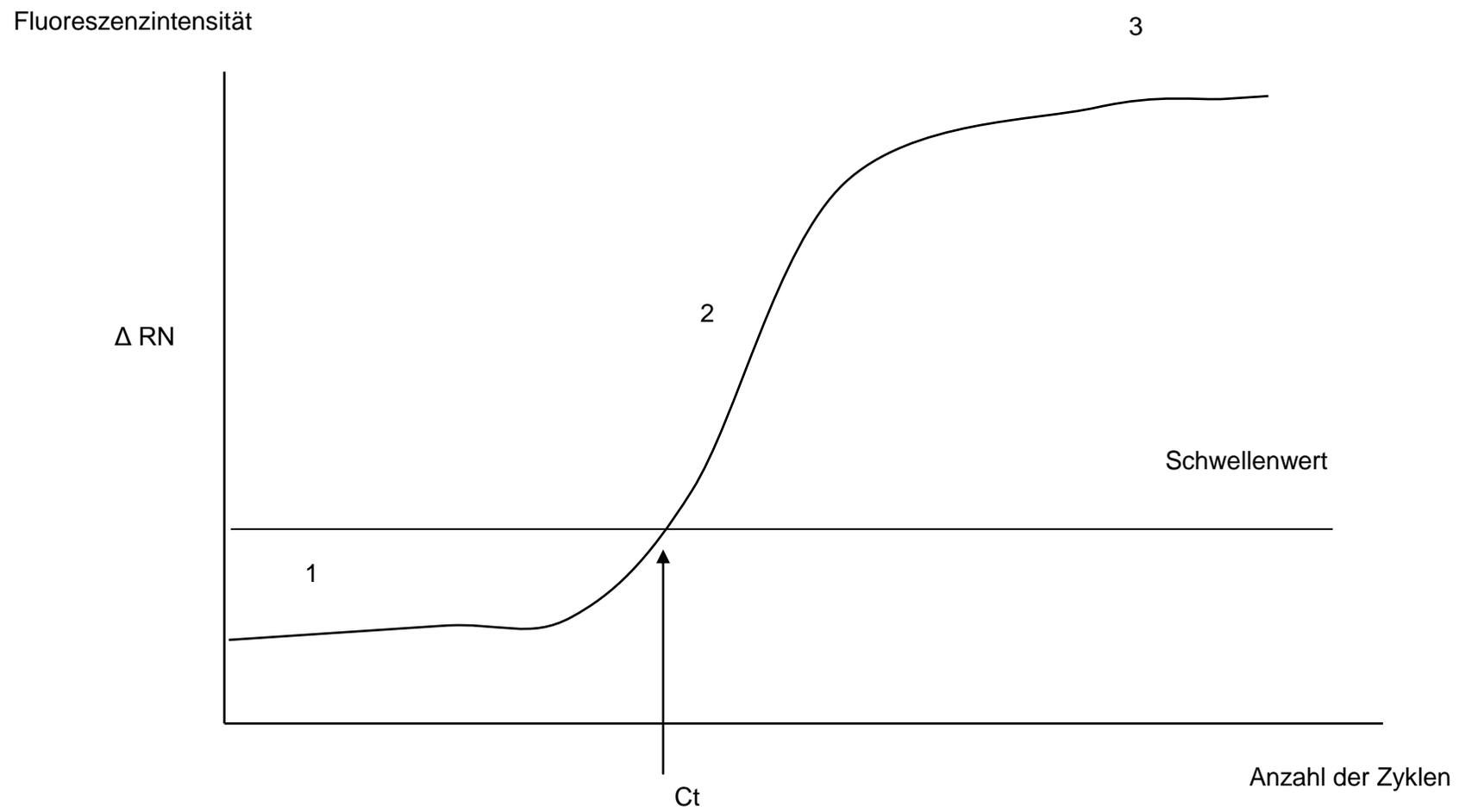


Abbildung 4: qRT-PCR Amplifikationsphasen

Δ RN: Maß für die Fluoreszenzintensität. Differenz zwischen Reporterfluoreszenz FAM zum passiven Referenzfarbstoff ROX.

Ct: Cycle threshold. Anzahl der Zyklen bis die Fluoreszenzintensität (Kopienanzahl) einen Schwellenwert überschreitet. Je niedriger dieser Ct Wert ist, desto größer war die Ausgangsmenge der cDNA.

Bei einer quantitativen realtime PCR werden verschiedene Phasen durchlaufen:

1 - Baseline: Bei der ersten Phase erfolgt eine Hemmung infolge unzureichendem Kontakt zwischen Primer und cDNA. Daher kann hier noch kein exponentielles Wachstum gemessen werden.

2 - Exponentielle Phase: Optimales Verhältnis von Primer und cDNA. In diesem Bereich wird der Schwellenwert festgelegt.

3 - Plateau: Die dritte Phase wird durch ineffizienter werdende Nukleotide und Polymerasen sowie hybridisierte Fragmente gehemmt.

Bereits im Übergangsbereich von 2 zu 3 entsteht eine große Streubreite der Meßwerte einer Probe.

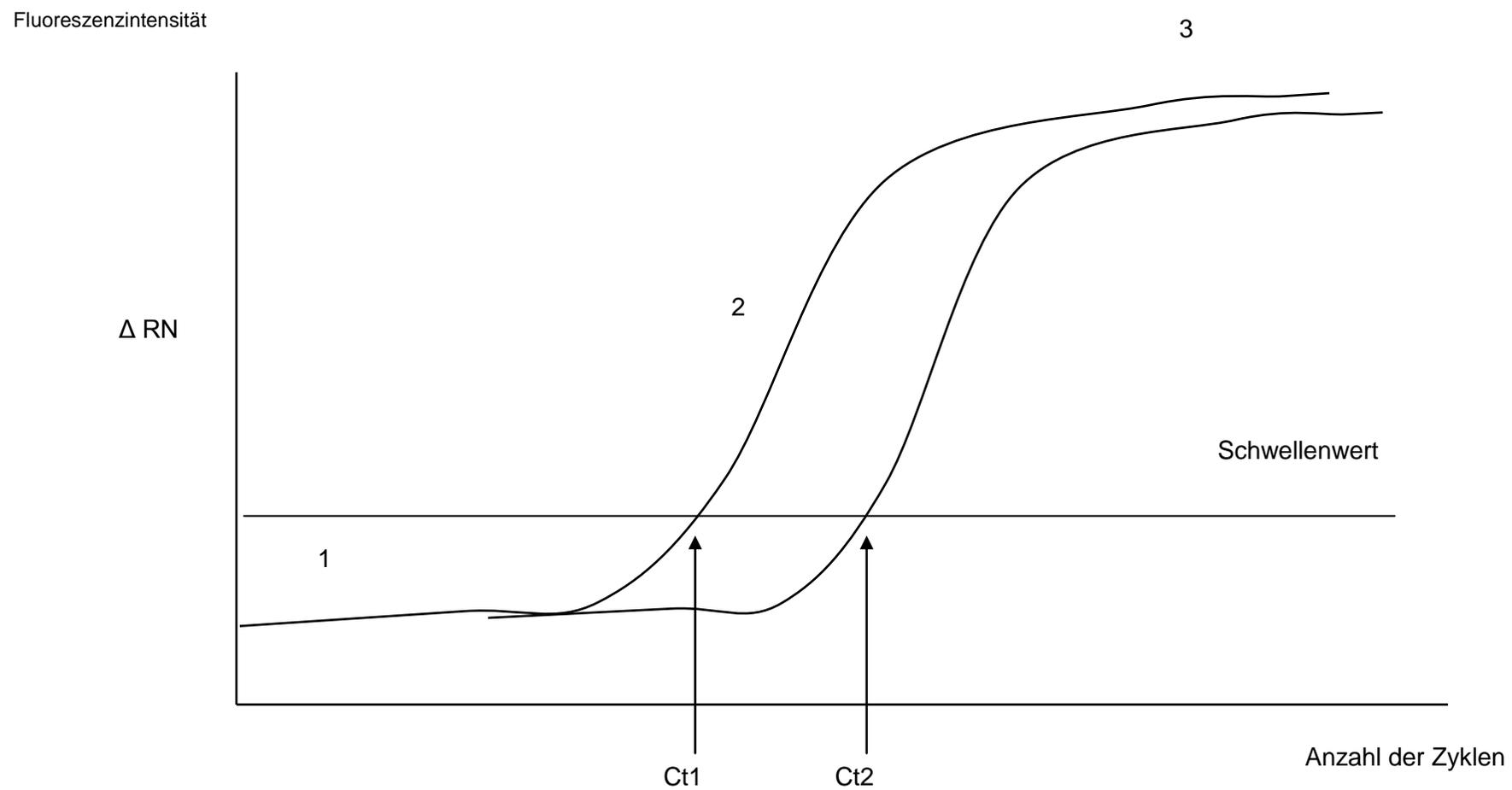


Abbildung 5: Auswertung der qRT-PCR

Δ RN: Maß für die Fluoreszenzintensität. Ct: Cycle threshold. Anzahl der Zyklen bis die Fluoreszenzintensität (Kopienanzahl) einen Schwellenwert überschreitet. Je niedriger dieser Ct Wert ist, desto größer war die Ausgangsmenge der cDNA.

Gen 1 erreicht früher den Schwellenwert als Gen 2, somit lässt sich für Gen 1 ein niedriger Ct-Wert ermitteln im Vergleich zu Gen 2.

Der Schwellenwert wird in die exponentielle Phase manuell gelegt, da in dieser Phase ein umgekehrt proportionales Verhältnis zur Ausgangsmenge an cDNA besteht. Wie in Abbildung 4 zu erkennen ist, sind ineffiziente Amplifikationszyklen vor und nach der exponentiellen Phase vorhanden, die keine Rückschlüsse erlauben.

Anhand der Abbildungen 4 und 5 ist zu erkennen, je früher eine Amplifikationsreihe den Schwellenwert erreicht, desto früher war ein optimales Mengenverhältnis von Primer zu cDNA und somit eine größere Ausgangsmenge vorhanden. Die gemessenen Ct-Werte bilden somit ein direktes Maß für die Ausgangsmenge der eingesetzten cDNA und geben Rückschlüsse auf die Expression des Zielgens.

Um verlässliche Aussagen treffen zu können, müssen die gemessenen Werte zunächst aufgearbeitet werden und auf die interne Kontrolle bezogen werden.

Für die relative Quantifizierung werden die Ct-Werte gemittelt, also die Werte, bei denen die gemessene Kopienanzahl der DNA den Schwellenwert während der Amplifikationszyklen überschreitet. Der Ct-Wert ist ein direktes Maß für die Ausgangsmenge der cDNA. Je mehr cDNA eingesetzt wurde, desto früher erreicht die Amplifikationsreihe ein optimales Verhältnis von cDNA und Primer und somit die exponentielle Phase. Somit ist der Ct-Wert umgekehrt proportional zur Ausgangsmenge, das heißt je niedriger der Ct-Wert, desto höher die Ausgangsmenge.

Um Meßungenauigkeiten möglichst gering zu halten, werden für jede Probe 3 Messungen durchgeführt. Man berechnet den Mittelwert der gemessenen Werte nach folgender Formel.

$$Ct = \sum Ct/n$$

Die Anzahl der gemessenen Werte eines Genes werden mit n bezeichnet. Bei drei Messungen entspricht n=3.

Im nächsten Schritt sollten die gemittelten Ct-Werte normalisiert, das heißt auf die internen Referenzgene bezogen werden. Da die Referenzgene in ihrer Expression stabil und unabhängig sind von den untersuchten Kulturbedingungen, wird ist die Änderung dieses Verhältnisses ein relatives Maß für die Expression des Zielgens.

Hat man nur ein Referenzgen, so berechnet man diesen normalisierten Wert folgendermaßen:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{normalisiert}} = Ct_{\text{Zielgen}} - Ct_{\text{Referenzgen}}$$

Eine Normalisierung auf mehrere Referenzgene ist allerdings empfehlenswert, da Schwankungen der Expression der Referenzgene innerhalb der Proben besser herausgerechnet werden und somit die relative Quantifizierung verlässlichere Aussagen zuläßt.

Durch Hellemanns et al.⁹⁴ wurde dafür ein Verfahren entwickelt, bei dem zwei oder mehr Referenzgene verwendet werden können und somit einen stabilen Bezugspunkt für die relative Quantifizierung bilden.

Bezieht man also die gemittelten Ct-Werte des Zielgens auf zwei Referenzgene, berechnet sich der normalisierte Wert folgendermaßen:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{normalisiert}} = Ct_{\text{Zielgen}} - (Ct_{\text{Referenzgen 1}} + Ct_{\text{Referenzgen 2}})/2$$

Anhand der bestimmten ΔCt -Werte, können nun verlässliche Vergleiche zur Expression des Zielgens zwischen den Proben erfolgen.

Möchte man die Expression zweier Proben vergleichen, so berechnet man $\Delta\Delta Ct$ -Werte. Dabei bezieht man das $\Delta Ct_{\text{Probe 1}}$ auf das $\Delta Ct_{\text{Probe 2}}$.

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{Probe 1}} - \Delta Ct_{\text{Probe 2}}$$

Wird nun die n-fache Expression des Zielgens von Probe 1 zu Probe 2, wird dies folgendermaßen berechnet:

$$\text{n-fache Expression Probe 1 zu Probe 2} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

5 Ergebnisse

5.1 Charakterisierung regulatorischer T-Zellen

Eine gute Charakterisierung der zu untersuchenden Treg Zellen ist erforderlich, um diese in PB und SF identifizieren und analysieren zu können und damit deren Rolle in der peripheren Toleranz und ihre Bedeutung in der Pathogenese von autoimmunen Erkrankungen zu verstehen. Zudem ermöglicht dies auch eine reine Isolation der Tregs. Aktuell existieren keine Marker, mit denen spezifisch Tregs erkannt und vital isoliert werden können. Tregs zeigen einen $CD4^+$ Phänotyp mit einer starken Expression von CD25. Diese Marker befinden sich extrazellulär und werden deshalb für die Isolierung vitaler Tregs verwendet. Damit sind Tregs allerdings schwer von aktivierten $CD4^+$ Effektor-T-Zellen zu differenzieren, da Effektor-T-Zellen ebenfalls CD4 und CD25 exprimieren. Zuverlässigere Marker wie CTLA4⁸ oder FoxP3^{17,32,57} können, als überwiegend intrazelluläre Marker, für die Isolation der Tregs nicht verwendet werden. Der Marker CTLA4 wird extrazellulär nur in geringer Konzentration exprimiert und der Transkriptionsfaktor FoxP3 ist ein rein intrazellulärer Marker. Diese Umstände lassen keine Isolation von vitalen Zellen zu.

Zur Untersuchung der Tregs aus dem Blut und der SF von Kindern mit JIA wurden $CD4^+$ T-Zellen mittels eines magnetischen Isolationsverfahren (MACS, s. 4.2) isoliert und durchflußzytometrisch (FACS, s. 4.5) charakterisiert.

Die Population der Tregs wurde innerhalb der isolierten $CD4^+$ Zellen anhand der Marker CD25 und CTLA4 oder FoxP3 eingegrenzt. Wie in der Einleitung beschrieben, werden im Blut von gesunden Menschen die $CD4^+$ T-Zellen mit der höchsten Expression von CD25 (2–3 % der $CD4^+CD25^{\text{hoch}}$ Zellen) als die Population der Tregs angesehen²⁶.

Der Anteil der im Blut bestimmten Tregs ist laut de Kleer et al.⁹⁵ bei Patienten mit JIA mit den Proben von gesunden Probanden vergleichbar. Daher wurde davon ausgegangen, dass auch bei JIA-Patienten etwa 3% Tregs im Peripherblut zu finden sind.

Bei der Analyse der Messungen wurde eine Quadranteneinteilung verwendet, welche die 2–3 % der $CD4^+CD25^{\text{hoch}+}$ Zellen abbildet. Diese Quadranteneinteilung (3 %-Regel) wurde beibehalten und für die Analyse der Zellen der SF desselben Patienten verwendet.

Als weitere Merkmale wurde FoxP3 und CTLA4 verwendet. Als zuverlässigster Parameter erwies sich FoxP3. FoxP3 stellt einen Transkriptionsfaktor dar, der spezifisch für Tregs und deren Funktion sein soll⁵⁶⁻⁵⁹. Wie in der Einleitung unter 1.4.1.2 bereits dargestellt, gilt CTLA4 ebenfalls als zuverlässiger Marker für Tregs. Eine Korrelation der CTLA4-Konzentration und der immunregulatorischen Funktion der Tregs konnte durch Wei et al.³¹ gezeigt werden. Untersucht wurde zudem CD127, der durch Liu et al.³⁴ als Marker für Tregs beschrieben wurde. Abbildung 6 zeigt die Expression von CTLA4 in $CD4^+$ Zellen aus dem Blut eines JIA Patienten. Die $CD4^+$ Zellen werden zunächst anhand der 3 %-Regel eingeteilt. Die anhand dieses Verfahrens eingeteilten $CD4^+CD25^{\text{hoch}+}$ Zellen (Tregs) exprimierten in diesem Beispiel zu 58 % CTLA4, während die $CD4^+CD25^-/CD4^+CD25^+$ Zellen nur zu 33 % CTLA4 exprimierten.

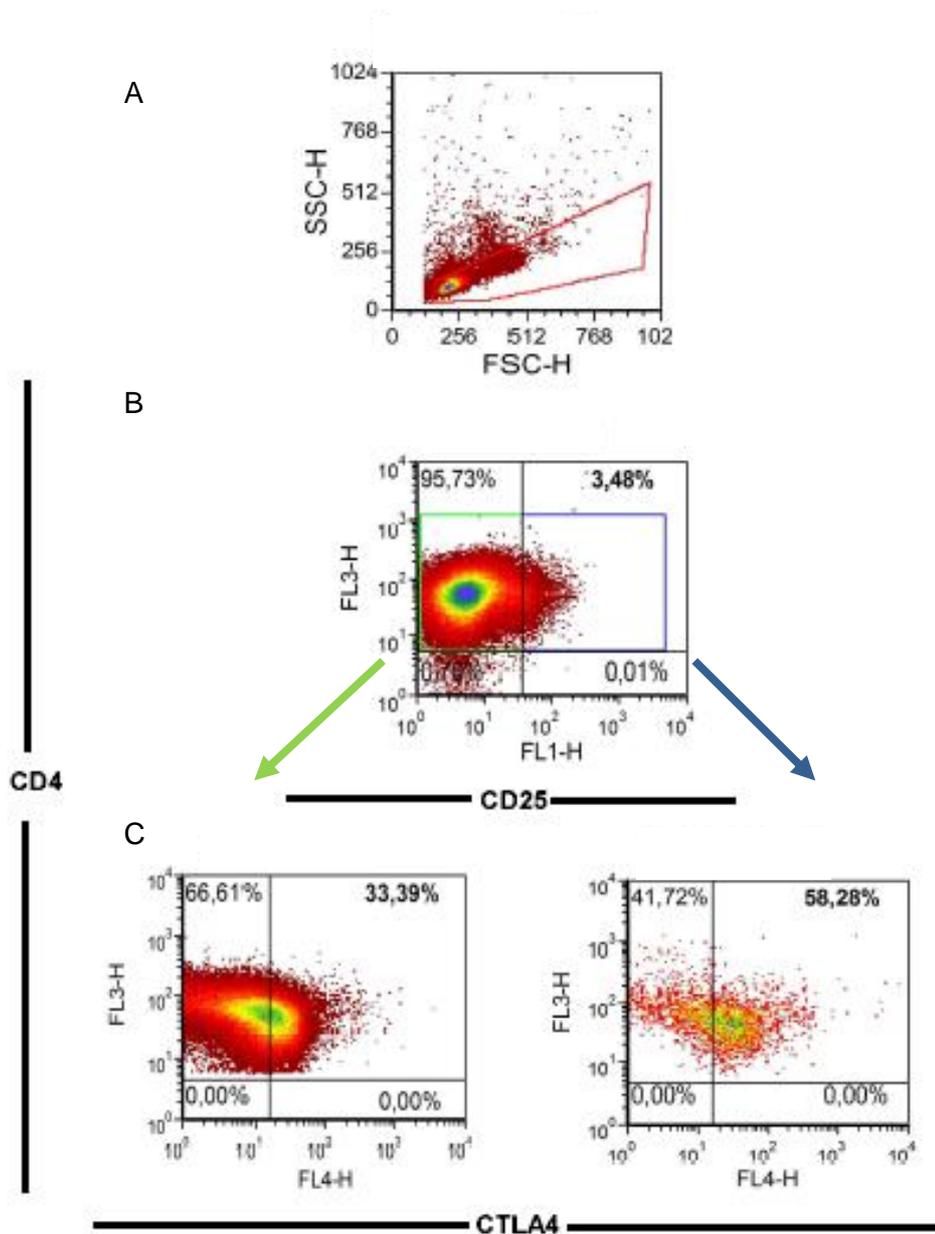


Abbildung 6: CTLA4-Expression in CD4⁺ Zellen aus dem Blut

Nach MACS Isolierung wurden die CD4⁺ Lymphozyten aus dem Blut in der Durchflusszytometrie analysiert.

A: Analyse der Zellen anhand der Granularität (Seitwärtsstreulicht, SSC) und der Zellgröße (Vorwärtsstreulicht, FSC).

Rote Umrandung: Selektion der Zellen, welche der Lymphozytenpopulation entsprechen und für die weiteren Analyse verwendet wurden.

B: Analyse anhand der Oberflächenmarker CD4 (y-Achse) und CD25 (x-Achse). Gewählte Quadranteneinteilung anhand der 3 % Regel: Rechts oben 3 % doppelt positive CD4⁺CD25^{hoch+} Zellen der Zellen aus dem Blut. Diese wurden als Treg definiert.

C: Anhand der Einteilung aus B wurden CD4⁺CD25⁺/CD4⁺CD25⁻ Zellen und CD4⁺CD25^{hoch+} Zellen getrennt auf CTLA4 Expression untersucht.

y-Achse: CD4 Expression, x-Achse: CTLA4 Expression.

Linkes Bild: CD4⁺CD25⁺/CD4⁺CD25⁻ Zellen, Rechtes Bild: CD4⁺CD25^{hoch+} Zellen. Quadrant rechts oben: Expression von CD4⁺ und CTLA4⁺. CTLA4 als Treg Marker verwendet.

Aufgrund unspezifischer Färbungen des verfügbaren FoxP3 Antikörpers⁸⁴ zu Beginn der Versuchsreihen, wurde für eine Charakterisierung der Tregs der Marker CTLA4 verwendet. Diese unspezifische Färbung konnte durch Tran et al.⁸⁴ als klonabhängig beschrieben werden und betrifft den Klon PCH101. Ein anderer, im Verlauf verfügbarer Klon (259D), zeigte eine zuverlässige Färbung und war zur Differenzierung der Tregs geeignet^{84,87}. In den folgenden Versuchen wurde der spezifisch färbenden FoxP3-Antikörper verwendet.

5.1.1 CD127 – als neuer Marker geeignet?

Wie bereits beschrieben, stehen für eine Isolierung der Tregs nur CD4 und CD25 zur Verfügung, welche selbst nicht spezifisch sind für Tregs, sondern ebenfalls von Effektor T-Zellen exprimiert werden. Darüber hinaus existieren nur intrazelluläre Marker, die keine Isolation vitaler Zellen möglich machen. Liu et al.³⁴ beobachtete eine umgekehrt proportionale Korrelation der Expression von CD127^{33,34,60}, der alpha-Kette des IL7-Rezeptors. Nach Liu et al. exprimieren Tregs nur geringe Mengen an CD127. Falls sich diese Beobachtung bestätigen würde, bestünde in CD127 ein weiterer extrazellulärer Marker, mit dem die Isolation von vitalen Tregs weiter optimiert werden könnte. Um die Beobachtungen von Liu et al. zu überprüfen, wurde CD127 als zusätzlicher Marker in den Analysen der Durchflusszytometrie verwendet.

Für die Analysen wurden PBMCs und SFMCs isoliert und mittels MACS aufgereinigt. Die gewonnenen $CD4^+$ Zellen wurden anhand der Marker CD4, CD25 und FoxP3 in Durchflusszytometrie, wie unter 5.1 beschrieben, analysiert. Die Zellen aus dem Blut wurden anhand der 3 %-Regel in Quadranten eingeteilt und für die Zellen aus der SF übernommen.

Abbildung 7 zeigt ein Beispiel mit $CD4^+$ Zellen aus der SF. Die ausgewählten $CD4^+CD25^{\text{hoch}}$ Zellen (9,5 % Tregs in SF) sind zu fast 90 % FoxP3 positiv und werden als Tregs definiert. In der Analyse der Tregs zeigen allerdings nur etwa 58 % der Zellen eine niedrige Expression von CD127. Dies bedeutet, dass Zellen welche über den Marker FoxP3 als Tregs noch spezifischer eingegrenzt werden konnten, zu 30 % CD127 in höherer Konzentration exprimieren.

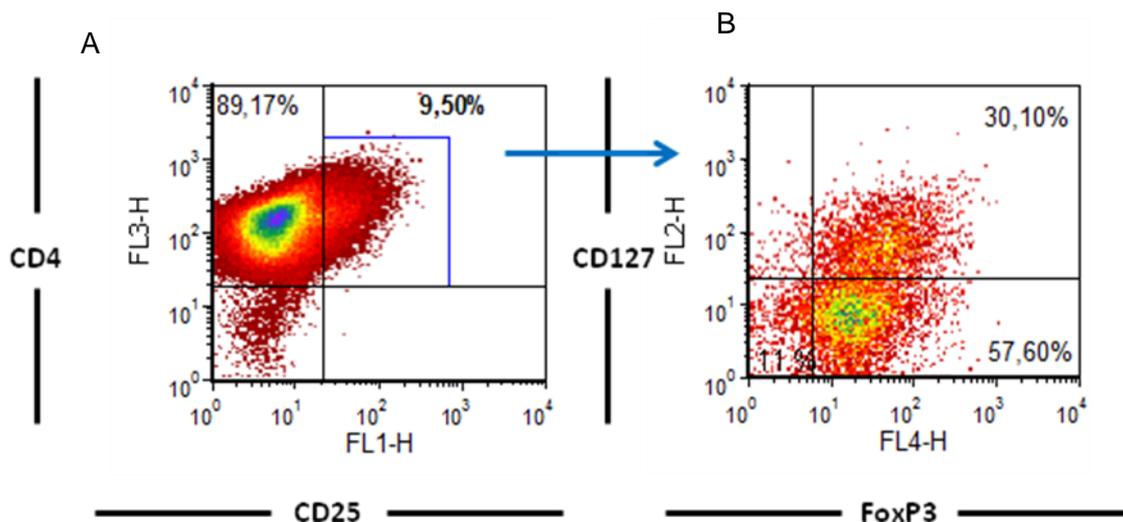


Abbildung 7: CD127 Expression in $CD4^+CD25^{\text{hoch}}$ SF Zellen

Lymphozyten aus SF wurden anhand der Marker CD4, CD25, CD127 und FoxP3 charakterisiert. Zuvor wurden die Zellen anhand von FSC und SSC vorselektioniert.

A: y-Achse: CD4, x-Achse: CD25. Die Quadranteneinteilung wurde aus dem Blut anhand der 3 %-Regel übernommen. Die ausgewählte Region (blau) zeigt die $CD4^+CD25^{\text{hoch}}$ Zellen und definiert die Tregs (9,5 % Tregs in der SF).

B: Die in A definierten Tregs (blauer Kasten) wurden auf die Expression von CD127 (y-Achse) und FoxP3 (x-Achse) analysiert. Rechter unterer Quadrant: $FoxP3^+CD127^{\text{niedrig}}$ Zellen.

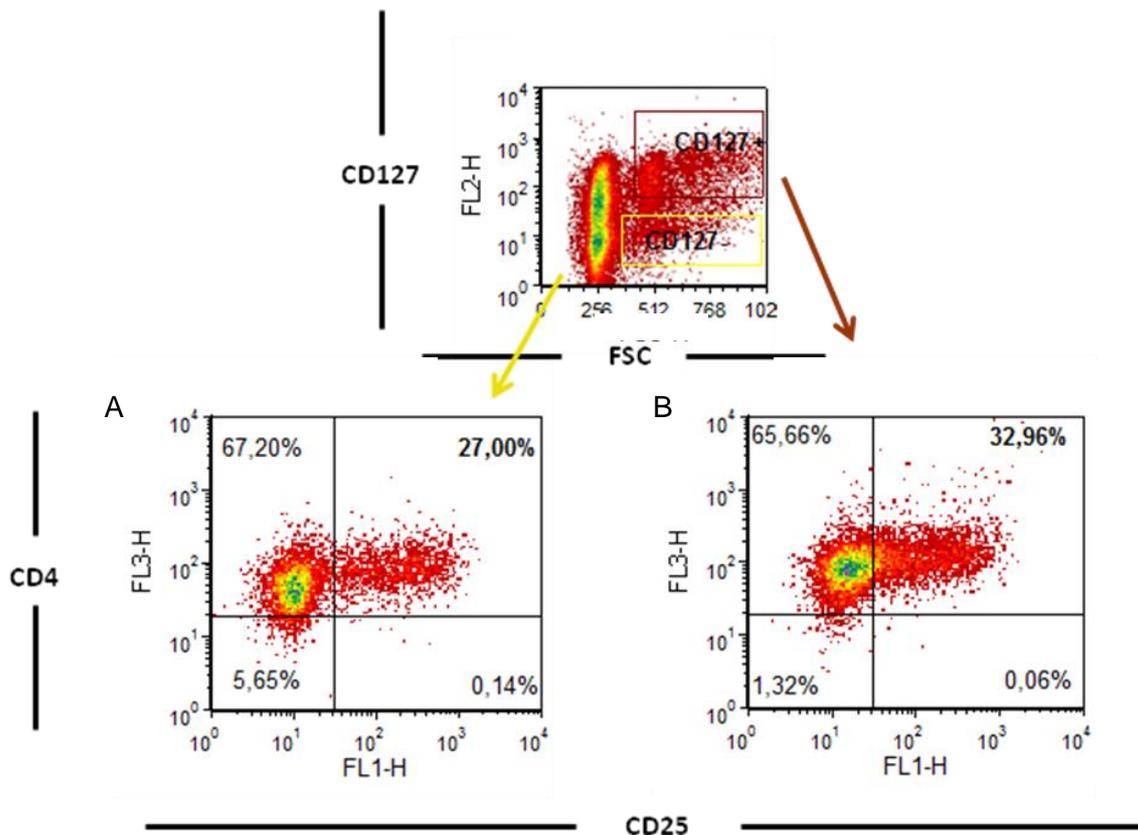


Abbildung 8: Untersuchung des Markers CD127 auf CD4⁺ Zellen

Lymphozyten aus SF eines JIA-Patienten wurden anhand der Marker CD4, CD25 und CD127 charakterisiert.

A: Einteilung der Zellen anhand des Markers CD127 (y-Achse) und FSC (x-Achse). CD127 negativen Zellen wurden getrennt von CD127 positiven Zellen analysiert.

B: Analyse der CD127 negativen Zellen ist links, der CD127 positiven Zellen rechts dargestellt. Quadranteneinteilung anhand der 3 % Regel. Y-Achse: CD4 Expression. X-Achse CD25 Expression. Quadrant oben rechts: Zellen, die CD4 und CD25 exprimieren.

Betrachtet man im Umkehrschluß die CD127 markierten CD4⁺ Zellen und teilt diese anhand der Expression von CD4 und CD25 ein, so ist in der Population mit niedriger Expression von CD127 der überwiegende Anteil der Zellen CD25 negativ, siehe Abbildung 8. Damit sind Zellen der Population, welche CD127^{niedrig+} exprimieren, nicht als Tregs definierbar. Zusätzlich ist der Anteil der CD4⁺CD25^{hoch+} Zellen in der eingeteilten Population, mit hoher Expression von CD127, größer als unter den Zellen, welche CD127 nur niedrig exprimieren.

Anhand der statistischen Auswertung von 5 Proben jeweils für Blut und SF wurden die beschriebenen Phänomene bestätigt, siehe Abbildung 9. In Zahlen ausgedrückt konnten in der Population aus dem Blut, welche CD127 hoch exprimieren, zwischen 10-35 % und in der SF zwischen 22-49 (-83) % Tregs gefunden werden. Der Anteil von 83 % Treg der CD127 hoch exprimierenden Zellen aus der SF, konnte in keiner weiteren Probe bestätigt werden. In der Population, welche helfen soll Tregs weiter einzugrenzen (niedrige CD127 Expression), sind noch weniger Zellen als Tregs definierbar (anhand der Marker CD4 und CD25), als bei Zellen, welche CD127 hoch exprimieren. Für das Blut können in den CD127^{niedrig+} Zellen nur etwa 3-15 % gefunden werden. Für die SF können in dieser Population 20-43 % als Tregs eingeteilt werden, wie Abbildung 9 zeigt.

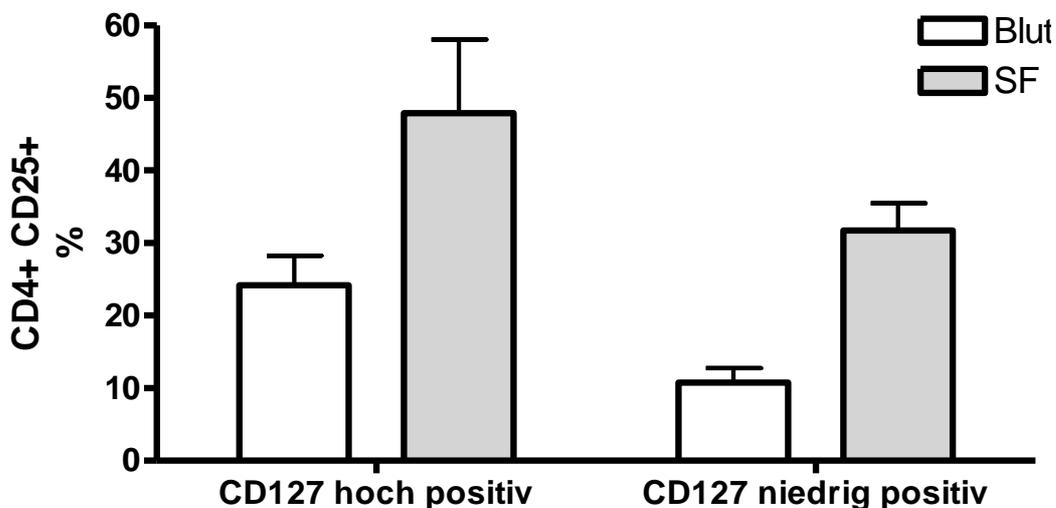


Abbildung 9: Anteil der CD4⁺CD25^{hoch+}-Zellen in der CD127^{hoch+} oder CD127^{niedrig+} Population

Der prozentuale Anteil der CD4⁺CD25^{hoch+} Zellen (Tregs) innerhalb der CD127^{hoch+} (links) und CD127^{niedrig+} (rechts) Population ist dargestellt. PBMCs (weiss) und SFMCs (grau) nach CD4⁺-Isolation. Für die Darstellung sind 5 Proben zusammengefasst.

Zusammenfassend können $CD127^{\text{niedrig}+}$ Zellen weder der Population der Tregs, noch der $CD4^+CD25^-$ Zellen, zugeordnet werden. Eine zusätzliche Selektion von Tregs, anhand der Expression von CD127, ist weder zur primären, noch zur sekundären Eingrenzung hilfreich und ist somit als Marker für Tregs in unseren Versuchen nicht geeignet.

5.2 Tregs in Blut und Synovialflüssigkeit

Die anhaltende Inflammation in entzündeten Gelenken könnte durch einen quantitativen Mangel an regulatorischen T-Zellen hervorgerufen werden. Van Amelsfort et al.⁹⁶ beobachtete entgegen dieser Theorie sogar eine erhöhte Anzahl von Tregs in der SF bei JIA im Vergleich zum Blut beschrieben.

Sollte diese Beobachtung sich in den Versuchen bestätigen lassen, so scheinen bei der JIA zwar ausreichend regulatorische Zellen im Gelenk vorhanden zu sein, aber im Vordergrund ein ineffektiver Einfluss der Tregs auf die immunologische Homöostase zu bestehen.

Um dies zu überprüfen, wurden mit Hilfe der Ficoll-Isolierung PBMCs und SFMCs aus Proben von Kindern mit JIA isoliert und mittels MACS Isolation die $CD4^+$ T-Zellen gewonnen. Die Zellen wurden hinsichtlich der Marker CD4, CD25 und FoxP3 in der Durchflußzytometrie analysiert.

Für die Analyse wurde die Definition der Tregs anhand der 3 %-Regel, siehe 5.1, der Zellen aus dem Blut durchgeführt. Diese Quadranteneinstellung zur Identifizierung von Tregs wurde auch für die isolierten Zellen der SF verwendet. Zusätzlich wurden diese $CD4^+CD25^{\text{hoch}+}$ Zellen in einem weiteren Schritt auf die Expression von CTLA4 untersucht.

In den durchgeführten Analysen war zu erkennen, dass zum Einen ein höherer Anteil an $CD4^+CD25^{\text{hoch}+}$ Zellen in der SF zu finden war, aber auch zum Anderen ein größerer Anteil an $CD4^+CD25^{\text{hoch}+}CTLA4^+$ Zellen (Tregs) der SF verglichen mit den Zellen aus dem Blut, wie Abbildung 10 zeigt, nachgewiesen werden konnte.

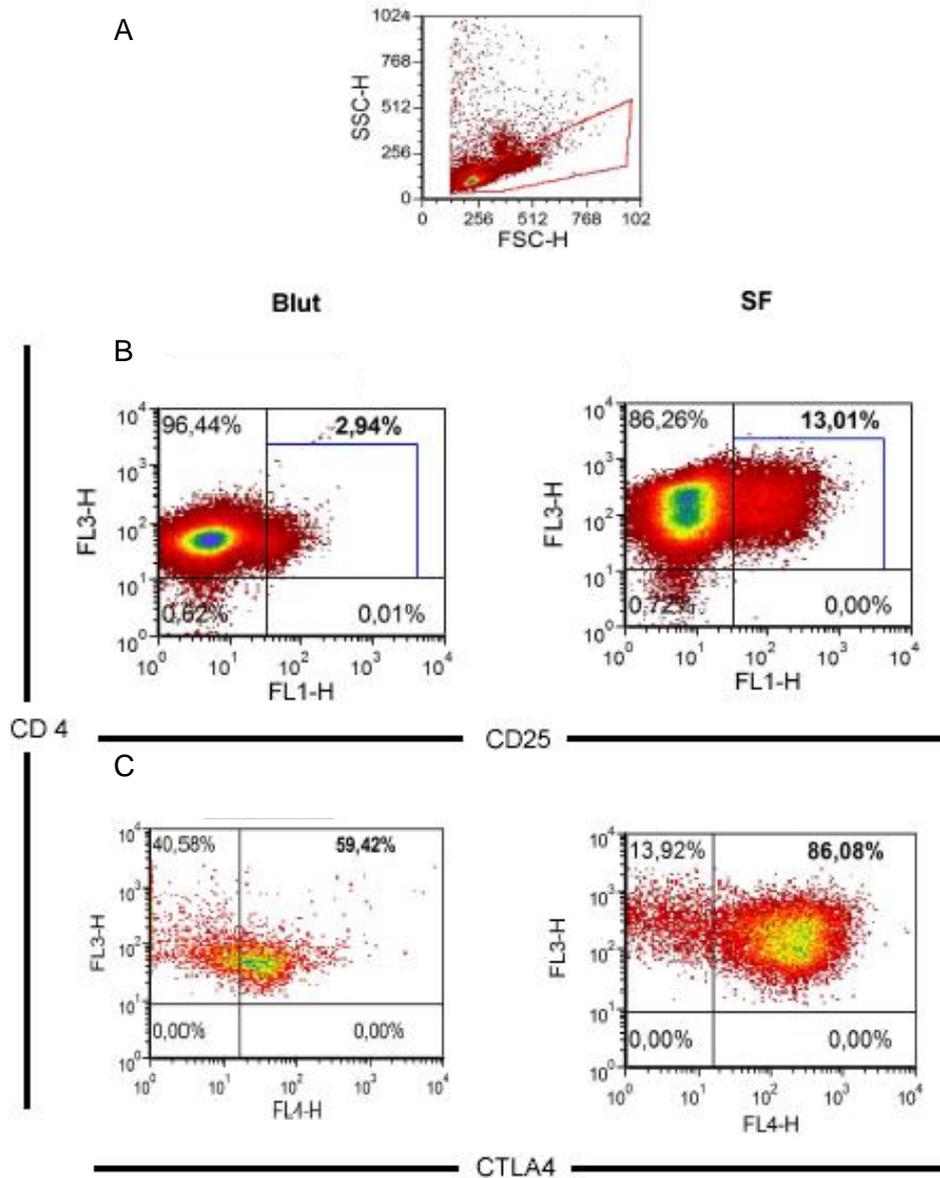


Abbildung 10: Phänotypisierung Tregs aus dem Blut verglichen mit der SF
 Die durchflusszytometrische Untersuchung von CD4⁺ Lymphozyten aus Blut und SF nach Ficoll-Isolierung und MACS Sortierung ist dargestellt.
 A: Einteilung der Zellen nach Zellgröße (FSC, x-Achse) und Granularität (SSC, y-Achse). Ausgewählt wurden Lymphozyten zur weiteren Analyse (rote Region).
 B: Lymphozyten (rote Region) wurden anhand der Marker CD4 (y-Achse) und CD25 (x-Achse) analysiert. Links: PBMCs Quadranteneinteilung entsprechend der 3 %-Regel, rechts: SFMCs. Blaue Region: CD4⁺CD25^{hoch} Zellen, definiert als Treg.
 C: Lymphozyten (rote Region) wurden anhand der Marker CD4 (y-Achse) und CTLA4 (x-Achse) analysiert. Links: PBMCs Quadranteneinteilung entsprechend der 3 %-Regel, rechts: SFMCs. Blaue Region: CD4⁺CTLA4^{hoch} Zellen, definiert als Treg.

C: $CD4^+CD25^{\text{hoch}+}$ Zellen (blaue Region aus B) wurden hinsichtlich CD4 (y-Achse) und CTLA4 (x-Achse) untersucht. Links: PBMCs, rechts: SFMCs.

Die erhobenen Daten bestätigen die Beobachtung, dass sich in der SF deutlich mehr phänotypische Tregs ($CD4^+CD25^{\text{hoch}+}$) nachweisen lassen, verglichen mit Proben aus dem Blut. In Abbildung 11 ist eine statistische Gegenüberstellung der Tregs aus Blut und SF dargestellt. Die eingesetzten Analysewerte entsprechen den Analyseschritten aus Abbildung 10 B und C. Es ist ein signifikant erhöhter Anteil $CD4^+CD25^{\text{hoch}+}$ Zellen in der SF verglichen mit dem Blut zu erkennen (unpaired t-Test: p-Wert $<0,0004$ bei Auswertung von 6 Proben), wie Abbildung 11 A zeigt.

Differenziert man diese Beobachtung auf die Expression von CTLA4, siehe Abbildung 11 B, das mit den immunsupprimierenden Eigenschaften der Tregs korreliert, so konnte anhand der erhobenen Daten ebenfalls ein erhöhter, hier nicht signifikanter, Anteil der $CD4^+CD25^{\text{hoch}+}CTLA4^+$ Zellen der SF festgestellt werden (unpaired t-Test: p-Wert von 0,0512).

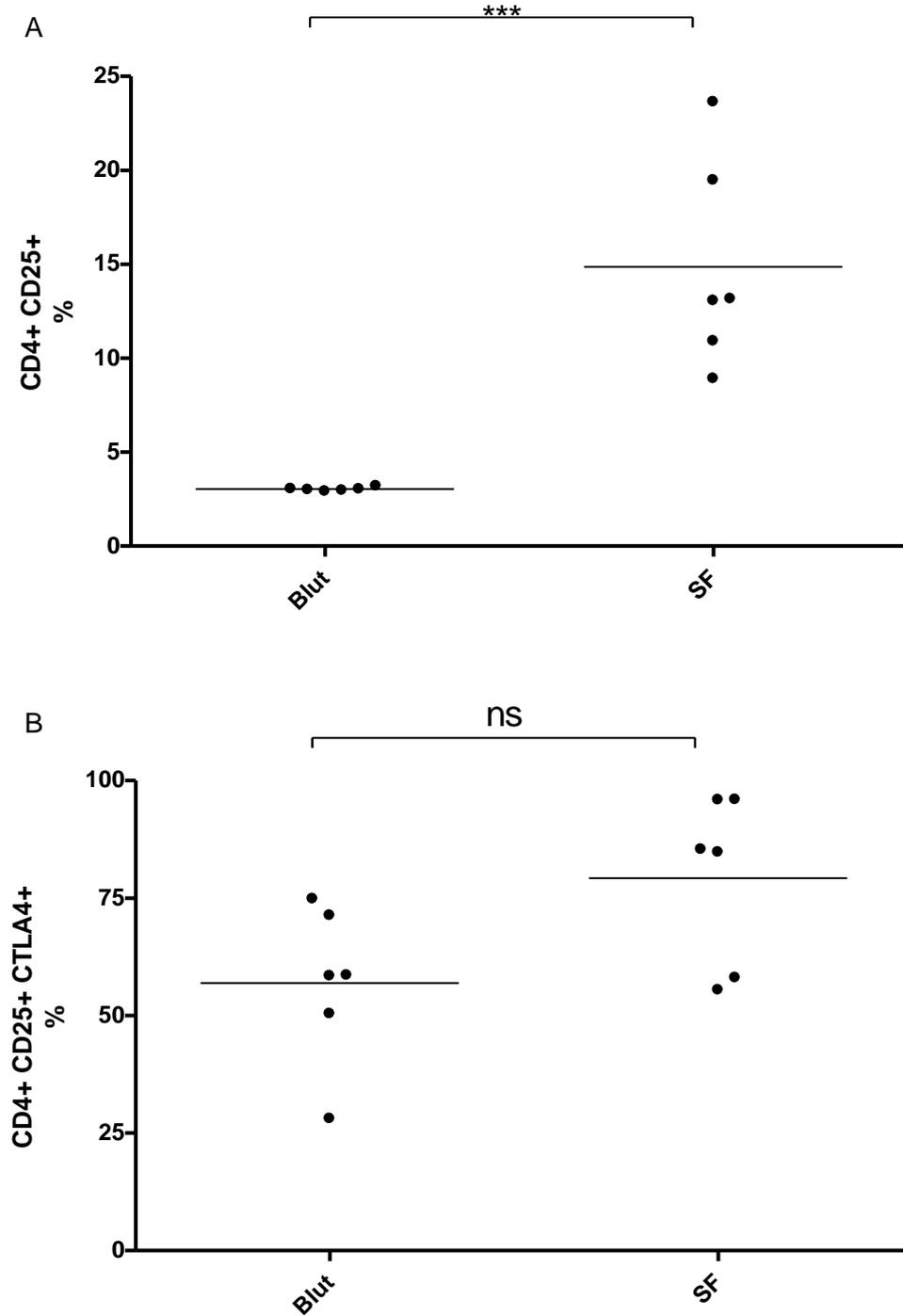


Abbildung 11: Prozentualer Anteil von Tregs im Blut verglichen mit SF

Die CD4⁺ isolierten Zellen wurden durchflusszytometrisch anhand der Marker CD4, CD25 und CTLA4 analysiert. Zusammenfassung der Messung von insgesamt 6 Proben.

A: Dargestellt ist der prozentuale Anteil CD4⁺CD25^{hoch+} Zellen der gesamten Lymphozytenpopulation aus Blut und SF.

B: Der prozentuale Anteil CD4⁺CD25⁺CTLA4⁺ Zellen der CD4⁺ Lymphozytenpopulation ist dargestellt.

ns: nicht signifikant, *** p-Wert < 0,001

Zusammenfassend sprechen die erhobenen Daten für einen deutlich höheren Anteil an Tregs in entzündlichen Gelenken bei Kindern mit JIA, verglichen mit dem Blut. Damit steht eine qualitative Einschränkung der Tregs als Grund für eine anhaltende Inflammation in den Gelenken im Vordergrund, also deren immunregulatorische Funktionseinschränkung und weniger der Mangel an Tregs.

5.3 Funktion von Tregs

Die JIA ist eine autoimmune Erkrankung, welche auf eine nicht ausreichende T-Zellhomöostase zurückzuführen ist. Wodurch diese mangelnde Regulation der entzündlichen Vorgänge in den Gelenken hervorgerufen wird, ist noch weitgehend unklar. In den vorangegangenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass in den entzündeten Gelenken bei der JIA verglichen mit dem Blut deutlich mehr regulatorische Zellen vorhanden sind. Der Frage warum nun aber diese Zellen nicht zu einer ausreichenden Hemmung der Entzündungsvorgänge führen, wurde in den folgenden Versuchen nachgegangen.

Um die Funktion und hemmende Einflüsse auf Tregs untersuchen zu können, stehen auch deren Kulturmöglichkeiten im Vordergrund. Tregs erfordern besondere Kulturbedingungen, um diese in Kultur halten oder expandieren zu können, da sich Tregs durch einen anergen Phänotyp auszeichnen. Herausgestellt hatte sich in einigen Studien, dass zur Kultur und Expansion von Tregs hohe Dosen von IL-2 erforderlich sind⁹⁷⁻¹⁰⁰. So wurden die Tregs zusätzlich zur vorangegangenen MACS Isolation zu CD4⁺CD25⁺ Zellen noch ergänzend durch Kultur selektioniert. Die zusätzliche Selektionierung erfolgte für 5 Tage mit 100 U/ml IL-2 durch Kultur.

Um die Funktion der Tregs untersuchen zu können, sollten als Responderzellen $CD4^+CD25^-$ Zellen von gesunden Probanden fungieren. Als antigenpräsentierende Zellen (APZs) wurden von diesen gesunden Probanden die $CD4^-$ Zellen verwendet und mit 30 Gy bestrahlt, um selbst nicht zu proliferieren. Die Responderzellen, sowie die APZs wurden frisch isoliert und in einem 1:1 Verhältnis gemischt. Mit den expandierten Tregs wurden diese in einem abfallenden Verhältnis vermischt.

Die Messung der Proliferation erfolgte durch Einbau von 3H -Thymidin oder BrdU, welche beide, wie in der Methoden unter 4.6 beschrieben, als Nukleotide in die DNA bei Zellteilungen eingebaut werden. Die Zellen wurden erneut für 4 Tage kultiviert und ihnen 24 h vor der Messung 3H -Thymidin oder BrdU, je nach entsprechendem Ansatz, zugegeben.

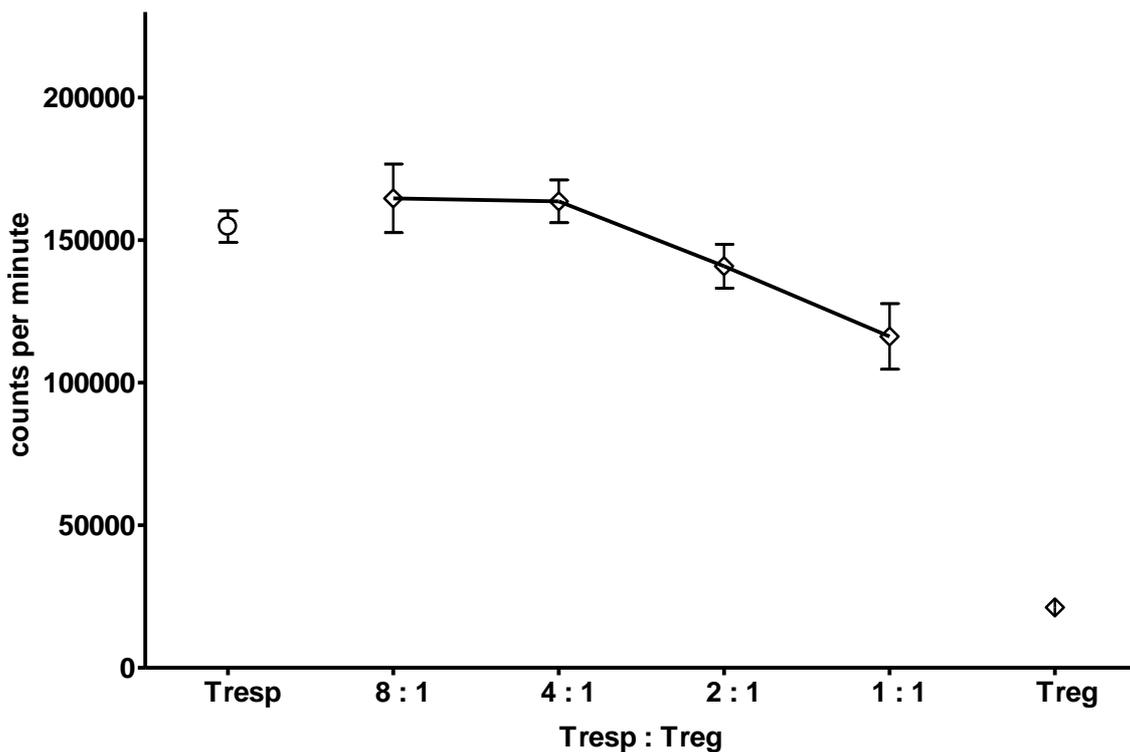


Abbildung 12: Inhibitorische Funktion der Tregs

Die Abbildung zeigt die Funktion von Tregs aus der SF nach einer $CD4^+CD25^+$ MACS-Isolation und Expansion durch 5-tägige Kultur mit IL-2. Tresp entspricht $CD4^+CD25^-$ Zellen aus dem Blut gesunder Spender, als APZs wurden bestrahlte $CD4^-$ Zellen des gleichen Spenders hinzugegeben. Responderzellen und APZs im Verhältnis jeweils von 1:1. Die Messung erfolgte anhand eines radioaktiven Thymidineinbaus in die Zelle.

y-Achse: Strahlungsintensität (counts per minute), entspricht der Teilungsrate.

x-Achse: Verhältnis der Responderzellen, Tresp, zu regulatorischen T-Zellen, Tregs.

Ganz links: Tresp und APZ (Tresp).

Ganz rechts: Tregs ohne Tresp (Treg).

Mit dem entsprechenden Versuchsaufbau konnte eine konzentrationsabhängige Proliferationshemmung durch die expandierten Tregs aus der SF gezeigt werden. Die Tregs selbst zeigten einen anergen Phänotyp. Abbildung 12 zeigt ein Beispiel einer solchen Messung.

Ganz links in der Abbildung ist zu erkennen, dass die Responderzellen eine deutliche Proliferation zeigten, während die Tregs, ganz rechts in der Abbildung, selbst anerg sind. Mit zunehmendem Verhältnis der Treg zu Responderzellen wird die Proliferation der Tresp gehemmt und zeigt einen funktionsfähigen Treg Phänotyp.

5.3.1 Einfluß inhibitorischer Faktoren in der Synovialflüssigkeit

Anhand der Versuche konnte gezeigt werden, dass regulatorische T-Zellen in der SF zum Einen in großer Anzahl vorzufinden waren. Zum Anderen waren sie selbst auch funktionsfähig und damit in der Lage Responderzellen in ihrer Aktivität zu hemmen.

Wenn funktionsfähige Tregs in der SF vorhanden sind, so tragen vermutlich andere Faktoren zum Versagen der Regulation bei und führen zur Aufrechterhaltung der chronischen Entzündung in JIA-Patienten. Nun stellte sich die Frage, ob andere Faktoren in der SF die Funktion der Treg beeinflussen.

Um eine lokale Hemmung der Treg-Funktion durch lösliche Faktoren in entzündeten Gelenken zu untersuchen, fügten wir zellfreie SF zu den

Proliferationsversuchen hinzu. Die zellfreie SF wurde aus dem Überstand der Ficoll-Isolation im ersten Schritt der Isolation gewonnen. Bei den Versuchsansätzen wurden die Zellen in einem Volumen von 200 µl kultiviert, die zugeführte zellfreie SF betrug 25 µl und somit 1/8 des Gesamtvolumens.

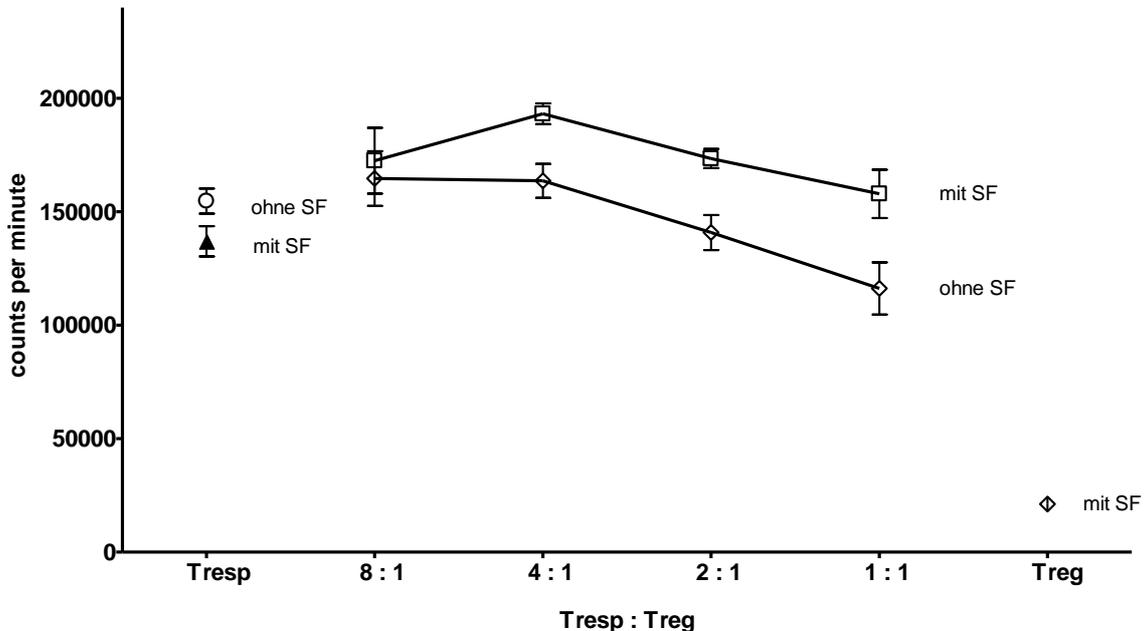


Abbildung 13: Einfluss durch Zugabe zellfreier SF auf Funktion von Tregs

Die Proliferation der Zellen wurde über Einbau von ^3H -Thymidin gemessen, welches 24 h vor der Messung der Kultur zugegeben wurde. Je nach Ansatz Zugabe von zellfreier SF zu den Versuchsansätzen mit 1/8 des Gesamtvolumens.

y-Achse: Strahlungsintensität (counts per minute), entspricht der Teilungsrate.

x-Achse: Verhältnis der Responderzellen, Tresp, zu regulatorischen T-Zellen, Tregs.

Ganz links: Tresp: Responderzellen, $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ Zellen, mit 30 Gy bestrahlte APZs mit und ohne Zugabe von zellfreier SF.

Ganz rechts: Tregs: $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ Zellen nach 5-tägiger Kultur mit IL-2 100 U/ml mit Zugabe von zellfreier SF.

Wie in Abbildung 13 zu erkennen, zeigten die Responderzellen selbst eine starke Proliferation. Auch waren die Tregs nach Zugabe von SF selbst weiter anerg (ganz rechts, Treg). Eine konzentrationsabhängige Hemmung der Proliferation von Tresp durch Tregs aus der SF wurde erreicht. Bei Zugabe der

zellfreien SF wurde die immunregulatorische Funktion der Tregs deutlich reduziert. Dass dieser beobachtete Effekt nicht auf eine vermehrte Proliferation von Responderzellen durch Zugabe von zellfreier SF zurückzuführen war, ist ganz links (Tresp) dargestellt. Die Zugabe von zellfreier SF hat hier keinen Einfluss auf die Proliferation. Auch die Tregs selbst haben nicht zur Proliferation beigetragen, wie in der Abbildung ganz rechts (Tregs) erkennbar. Die Tregs waren auch mit Zugabe von zellfreier SF anerg.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass sich in entzündeten Gelenken von JIA Patienten Tregs nachweisen lassen, welche in ausreichender Anzahl nachweisbar sind. Zudem zeigen sie in vitro keine Einschränkung ihrer regulatorischen Fähigkeiten. Allerdings scheinen in der SF Faktoren zu bestehen, welche die Funktionalität und damit die regulierenden Eigenschaften der Tregs einschränken. Diese Faktoren zu differenzieren, soll Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

5.4 Lassen sich Tregs auch aus CD4⁺CD25⁻ Zellen generieren

In der Literatur wurde zunehmend von CD4⁺CD25⁻ T-Zellen berichtet, welche unter bestimmten Voraussetzungen einen Phänotyp annehmen können, wie er für Tregs typisch ist. Walker et al.³⁶ beispielsweise konnte in stimulierten CD4⁺CD25⁻ T-Zellen nachweisen, dass sich phänotypische Tregs generieren ließen und auch FoxP3 exprimierten. FoxP3 gilt als zuverlässigster Marker für die Differenzierung von Tregs zu aktivierten T-Effektorzellen und gilt als Faktor für die immunsuppressive Aktivität von Tregs⁴¹. Anhand dieser Beobachtungen kam die Theorie auf, dass sich Tregs aus peripher zirkulierenden T-Zellen unter bestimmten Bedingungen generieren lassen. Diese generierten Tregs lassen sich, von den bereits im Thymus gebildeten natürlichen Tregs, phänotypisch nicht mehr unterscheiden und werden in der Nomenklatur dieser Dissertation durch die Bezeichnung natürliche Tregs (nTregs) von induzierten Tregs (iTregs) unterschieden.

Einen Einfluss auf die Induktion von Tregs scheinen die Stimulation mit den Antikörpern anti-CD3 und anti-CD28 zu haben^{36,58,76}. Die Zellen konnten in den veröffentlichten Studien beim Menschen allerdings keinen inhibitorischen Effekt zeigen^{36,76,77}. Zudem wird dem Zytokin TGFβ1 eine bedeutende Rolle in der Expression von FoxP3 und damit in der Induktion von Tregs gegeben^{41,84}.

Um die Induktion von regulatorischen T-Zellen (iTregs) zu untersuchen, wurden CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus dem Blut und der SF isoliert und unter verschiedenen Bedingungen stimuliert. Die Zellen wurden nach der primären Isolation, sowie nach 4 Tagen Kultur durchflusszytometrisch analysiert. Wir untersuchten den Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen von anti-CD3 und TGFβ1, sowie die Zugabe von anti-CD28 und IL-2 auf die Expression von CD4, CD25 und FoxP3.

5.4.1 Einfluss von Zytokinen

5.4.1.1 Einfluss von anti-CD3 auf die Induktion von Tregs

Die Stimulation des T-Zellrezeptors (TZR) mit anti-CD3 Antikörpern konnte in den durchgeführten Versuchen eine Steigerung der FoxP3 Expression zeigen. Um aber eine optimale Konzentration bestimmen zu können, wurden die CD4⁺CD25⁻ Zellen mit plattengebundenem anti-CD3 Antikörper in den Konzentrationen 0, 0,1, 1, 5 und 10 µg/ml für 4 Tage stimuliert und durchflusszytometrisch an Tag 0 und 4 analysiert.

Abbildung 14 zeigt den konzentrationsabhängigen Einfluss steigender anti-CD3 Konzentrationen auf die Expression von CD25 und FoxP3. In A ist die Stimulation für die Zellen aus dem Blut, in B für die Zellen der SF dargestellt. Zu erkennen ist, dass bereits eine geringe Menge an anti-CD3 Antikörpern ausreicht um CD4⁺CD25^{hoch+}Foxp3⁺ Zellen (iTregs) zu induzieren.

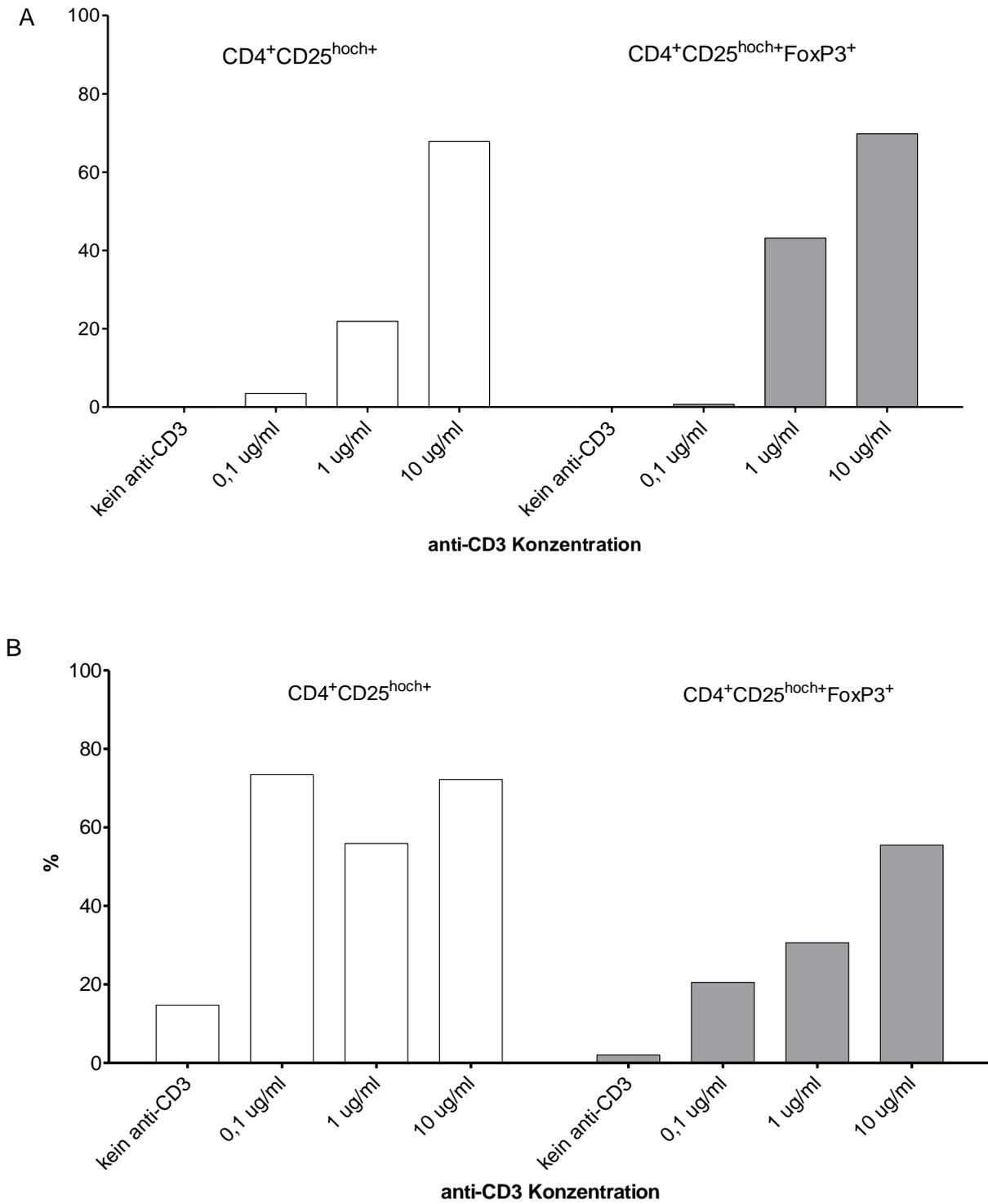


Abbildung 14: Einfluss von anti-CD3 Antikörper auf die Expression von CD25 und FoxP3 in CD4⁺CD25⁻ Zellen

Induktion von CD4⁺CD25⁺ T-Zellen mit regulatorischem Phänotyp aus Blut (A) und SF (B) von JIA-Patienten durch Stimulation mit anti-CD3 Antikörper in unterschiedlicher

Konzentration. Die Abbildung zeigt die druchflußzytometrische Analyse der Zellen mit der prozentualen Expression von CD25 (links) und von FoxP3 (rechts). Für die Analyse wurde die Quadranteneinstellung wie unter 5.1 beschrieben für die Analyse der Zellen nach Kultur angewandt.

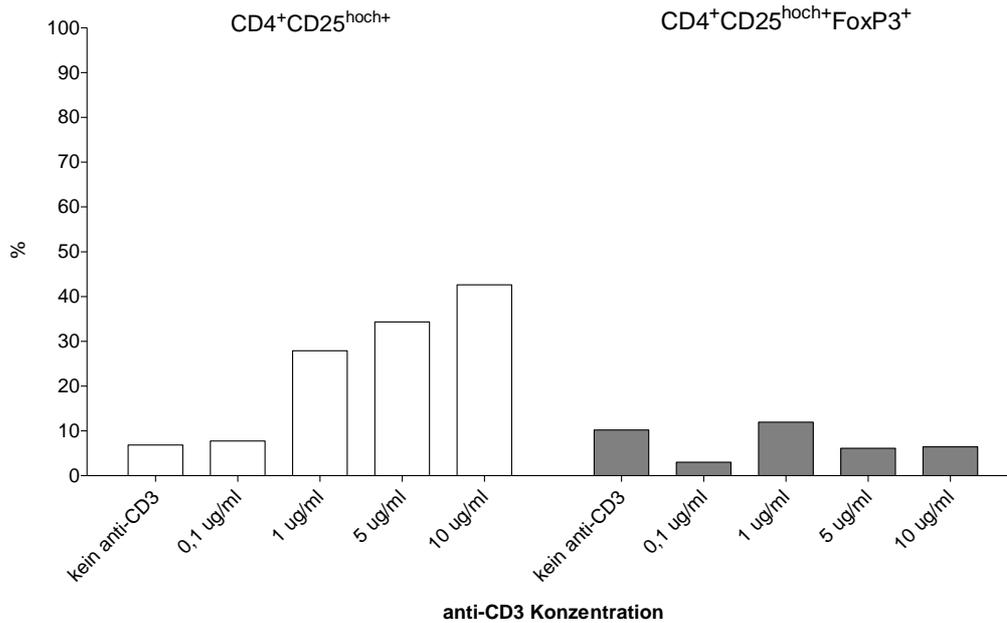


Abbildung 15: Einfluss von anti-CD3 Antikörper auf die Expression von CD25 und FoxP3 in CD4⁺CD25⁻ Zellen der SF

Die Abbildung zeigt die Expression von CD25 (links) und FoxP3 (rechts) in CD4⁺CD25⁻ Zellen aus der SF, welche 4 Tage mit anti-CD3 bei unterschiedlichen Konzentrationen stimuliert wurden.

In einzelnen Versuchen, wie Abbildung 15 zeigt, konnte beobachtet werden, dass in den CD4⁺CD25⁻ Zellen aus der SF mit steigender anti-CD3 Konzentration sich die Expression von FoxP3 sich nicht weiter steigern lässt.

Da in Zusammenschau der durchgeführten Untersuchungen eine maximale Expression sich zwischen 1 – 5 µg/ml erreicht werden konnte, wurde für die weiteren Versuche eine anti-CD3-Konzentration von 5 µg/ml verwendet.

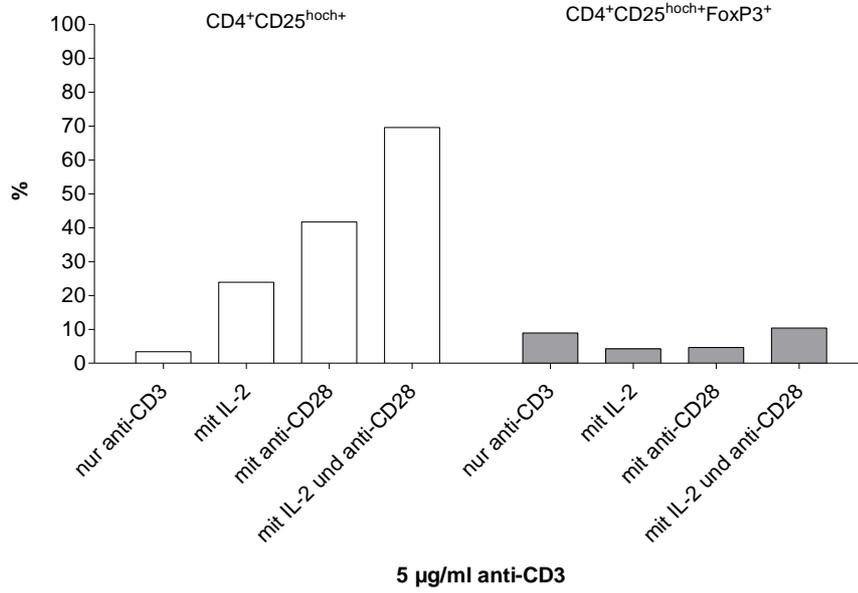
5.4.1.2 Einfluss durch Zugabe von anti-CD28 und IL-2 auf die Expression von CD25 und FoxP3

Für die Expression von CD25 und FoxP3 in CD4⁺CD25⁻ Zellen als Marker für die Induktion von Tregs werden als weitere Faktoren IL-2 und Antikörper gegen CD28 diskutiert. Um diesen Effekt näher zu untersuchen, wurden der Kultur (mit einer festgelegten Konzentration von 5 µg/ml anti-CD3) anti-CD28 (1 µg/ml) und IL-2 (100 U/ml) zugegeben. Die Zellen wurden für diese Versuche isoliert und nach 4 Tagen Kultur durchflusszytometrisch analysiert. Für die Analyse wurde erneut die Quadranteneinstellung, wie unter 5.1 beschrieben, angewandt.

In Abbildung 16 wurde der Einfluss dieser Faktoren auf die CD4⁺CD25⁻ Zellen in Kultur dargestellt. Beobachtet werden konnte ein stärkerer Einfluss durch Zugabe von IL-2 und anti-CD28 auf die Expression von CD25. Ein wesentlicher Unterschied der Zellen aus dem Blut (A) zu den Zellen der SF (B) konnte hier nicht beobachtet werden. Betrachtet man die Expression von FoxP3 dieser Zellen, so war der Effekt hier nicht so deutlich nachzuvollziehen.

Der stärkste Einfluss auf die Expression von CD25 und FoxP3 wurde durch die Zugabe beider Faktoren (IL-2 und anti-CD28) sowohl in den Zellen aus dem Blut sowie der SF erzielt.

A



B

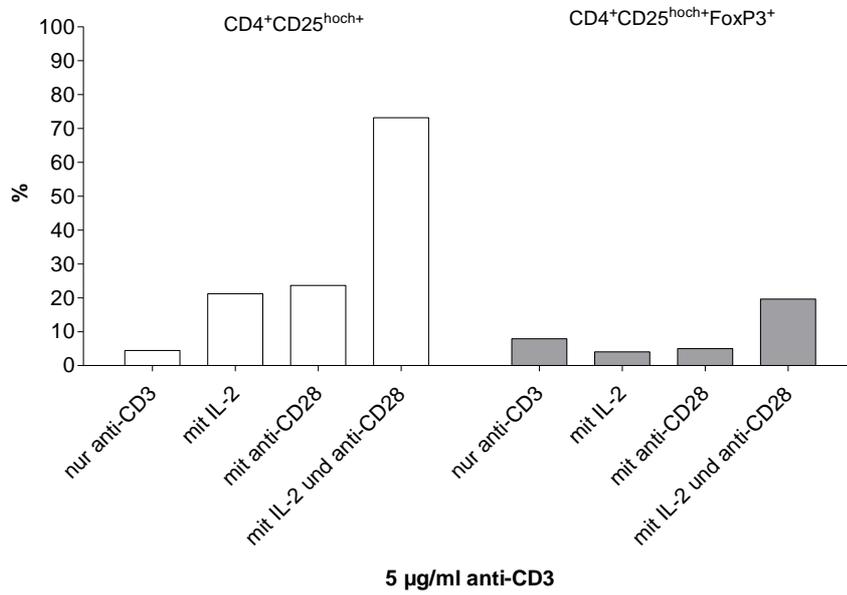


Abbildung 16: Einfluss von anti-CD28 (1 µg/ml) und IL-2 (100 U/ml) auf die Expression von CD25 und FoxP3 in CD4⁺CD25⁻ Zellen

Dargestellt ist die durchflusszytometrische Analyse der Expression von CD25 (links) und FoxP3 (rechts) nach 4 Tagen Kultur von CD4⁺CD25⁻ Zellen mit 5 µg/ml anti-CD3 und der Zugabe von IL-2, anti-CD28 oder beiden Faktoren.

A: Zellen aus dem Blut

B: Zellen aus der SF

5.4.1.3 Einfluss der TGFβ1-Konzentration auf die Expression von regulatorischen T-Zellmarkern

Für die Immunregulation, besonders die T-Zell Toleranz, scheint das Zytokin TGFβ1 eine wichtige Rolle zu spielen⁶⁴⁻⁶⁶. Passend dazu konnte Tran et al.⁸⁴ eine gesteigerte Expression von FoxP3 bei T-Zellen in Kultur, durch den Einfluss von TGFβ1, beobachten. Durch Ergebnisse wie diese wird dem Zytokin eine besondere Bedeutung bei der Induktion von Tregs zugesprochen^{41,84}. Inwieweit das Zytokin TGFβ1 einen Einfluss auf die Induktion von Tregs aus CD4⁺CD25⁻ Zellen und deren immunregulatorische Fähigkeiten hat, wurde in den folgenden Versuchen überprüft.

Dazu wurden CD4⁺CD25⁻ Zellen aus dem Blut und der SF von Kindern mit JIA isoliert und 4 Tage mit anti-CD3 Antikörpern (5 µg/ml) kultiviert. Je nach Versuchsansatz wurde der Kultur anti-CD28 (1 µg/ml), IL-2 (100 U/ml) und TGFβ1 (5 ng/ml) zugegeben. Die Analyse erfolgte durchflusszytometrisch nach Isolation, sowie nach 4 Tagen Kultur. Erneut wurde die Quadranteneinstellung wie unter 5.1 beschrieben für die Analyse verwendet.

In Abbildung 17 ist der Einfluss von TGFβ1 auf die Expression von FoxP3 in CD4⁺CD25⁻ Zellen dargestellt. Der Einfluss wurde unter alleiniger TZR Stimulation mit anti-CD3 (erste zwei Spalten) und unter Stimulation mit IL-2 und anti-CD28 (letzte zwei Spalten) untersucht. Zu erkennen ist, dass sowohl in der SF (rechts) als auch im Blut (links) das Zytokin TGFβ1 einen überwiegend steigernden Effekt der Expression von FoxP3 hat.

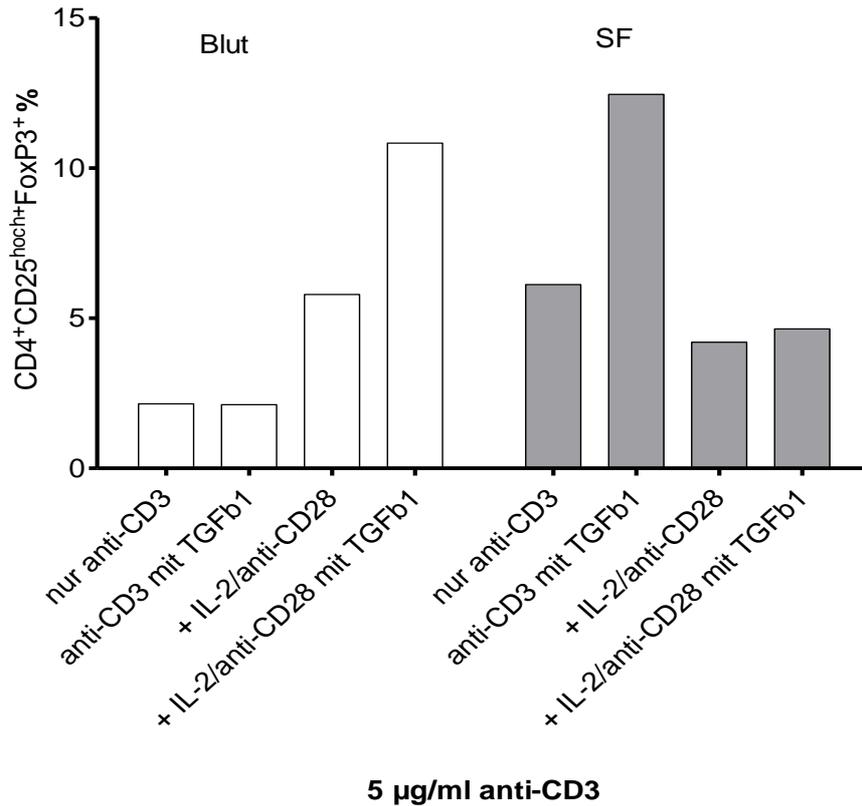


Abbildung 17: Einfluss von TGFβ1 auf die Induktion von Tregs

Dargestellt ist die Expression von FoxP3 von CD4⁺CD25⁻ Zellen, welche 4 Tage mit anti-CD3 (5 µg/ml), anti-CD28 (1 µg/ml), IL-2 (100 U/ml) und/oder TGFβ1 (5 ng/ml) stimuliert wurden. Die Analyse erfolgte durchflusszytometrisch, wie unter 5.1 beschrieben.

Links: Zellen aus dem Blut

Rechts: Zellen aus der SF

Durch diese Beobachtung konnte die Beobachtung von Tran et al.⁸⁴ bestätigt werden, dass sich die Expression von FoxP3 und damit einem Marker für Tregs durch TGFβ1 sogar in Zellen, welche zuvor nicht der natürlich generierten Tregs angehörten, steigern lässt. Zu prüfen bleibt, ob sich diese induzierten Tregs in der Funktion von den natürlichen Tregs unterscheiden.

Die Gruppe der natürlichen Tregs wird phänotypisch als anerge Population beschrieben, welche T-Effektorzellen in ihrer Proliferation hemmt und somit

immunregulatorisch in inflammatorische Prozesse eingreift. In den folgenden Versuchen wurde untersucht, inwieweit induzierte Tregs diesen Phänotyp zeigen und wie potent deren immunregulatorische Fähigkeiten sind.

5.5 Funktion der iTregs

Wie in den vorangegangenen Versuchen beobachtet, scheinen sich Tregs aus einer Population der T-Zellen generieren zu lassen, welche nicht der natürlichen Tregs angehören. Als zuverlässigster Marker für die Bestimmung von Tregs zählt der intrazelluläre Marker FoxP3, welcher mit der immunsuppressiven Funktion zu korrelieren scheint⁴¹. In der Literatur sind unterschiedliche Aussagen zu der Funktion der induzierten Tregs zu finden. Einige bescheinigen den iTregs einen inhibitorischen Effekt^{25,30,78}, während andere Studien bei den iTregs einen inhibitorischen Effekt nicht beobachten konnten^{36,76,77}.

In den bereits durchgeführten Versuchen wurden aus einer CD4⁺CD25⁻ T-Zellgeneration Tregs induziert. Die Kultur mit anti-CD3, IL-2 und anti-CD28, sowie dem Zytokin TGFβ1 scheint den größten Effekt auf die Induktion von Tregs zu haben. Unklar bleibt, ob diese iTregs in der Lage sind Effektor T-Zellen in ihrer Proliferation zu hemmen und damit immunregulatorisch zu wirken.

Um den anergen Phänotyp und die Funktion der iTregs zu untersuchen, wurden CD4⁺CD25⁻ und CD4⁺CD25^{hoch+} Zellen isoliert. Die CD4⁺CD25^{hoch+} nTregs wurden mit IL-2 (100 U/ml) für 4 Tage kultiviert (s. 5.3).

Für die Induktion wurde bei den CD4⁺CD25⁻ Zellen eine TZR Stimulation mit plattengebundenem anti-CD3 (5 µg/ml) durchgeführt. Zudem wurde in einem weiteren Ansatz eine Stimulation zusätzlich mit anti-CD28 (1 µg/ml) und IL-2 (100 U/ml) durchgeführt. Um den Einfluss von TGFβ1 (5 ng/ml) auf die Funktion der so induzierten Tregs zu untersuchen, wurden beide Ansätze mit und ohne TGFβ1 durchgeführt.

Nach 4 Tagen Kultur wurden die iTregs und nTregs mit Effektor T-Zellen (Responderzellen) kultiviert. Mit einem Proliferationsassay mittels H^3 -Thymidin-Einbau während der Zellteilung, wie unter 4.6 beschrieben, konnte die Proliferationsrate der Zellen gemessen werden.

Als Responderzellen (Tresp) wurden $CD4^+CD25^-$ Zellen von einem gesunden Spender verwendet und über den TZR mit plattengebundenem anti-CD3 (5 $\mu\text{g/ml}$) aktiviert. Als Antigen präsentierende Zellen (APZs) fungierten bestrahlte $CD4^-$ Zellen, welche ebenfalls von dem gesunden Spender stammten.

Für den Proliferationsassay wurden zu den Responderzellen und APZs in steigendem Verhältnis Tregs hinzugegeben.

Eine durchflusszytometrische Analyse erfolgte am Tag der Isolation, sowie nach 4 Tagen Kultur. Die Quadranteneinstellungen bei der Analyse erfolgte wie unter 5.1 beschrieben.

Abbildung 18 zeigt ein Beispiel der durchflusszytometrischen Analyse natürlicher Tregs nach 4 Tagen Kultur mit IL-2 (100U/ml), welche für den in Abbildung 19 eingesetzten Proliferationsassay verwendet wurden.

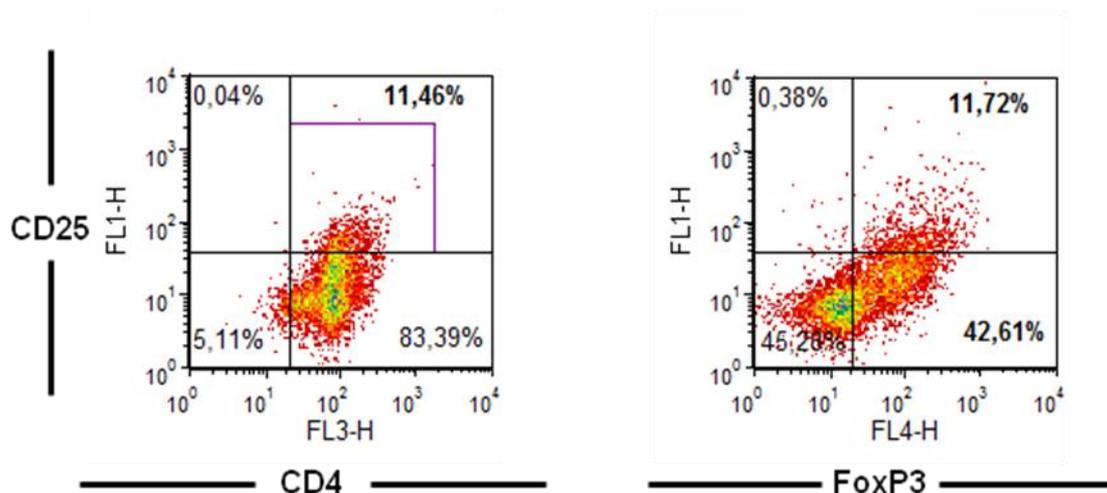


Abbildung 18: nTregs aus SF nach 4 Tagen Kultur

Dargestellt ist die durchflusszytometrische Analyse von primär $CD4^+CD25^{\text{hoch+}}$ natürlichen Tregs, welche nach 4 Tagen Kultur mit 100 U/l IL-2, gemessen wurden. Für die Analyse wurde die Quadrantenregel, wie unter 5.1 beschrieben, verwendet.

y-Achse: CD25 Expression

x-Achse: CD4 Expression (links), FoxP3 Expression (rechts)

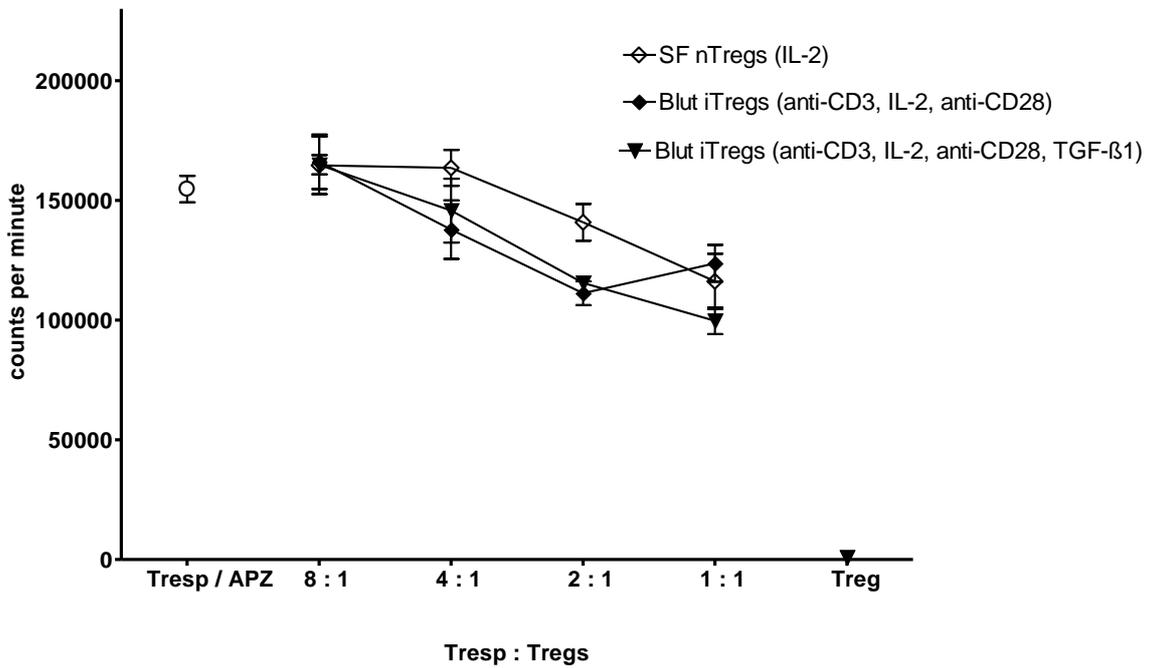
Betrachtet man die Zellen, welche zur Induktion von Tregs mit unterschiedlichen Kulturbedingungen wie anti-CD3, anti-CD28 und IL-2, sowie TGF β 1, stimuliert wurden, so ist für die Funktionsanalysen die Korrelation mit dem Anteil der FoxP3 exprimierenden Zellen und somit der iTregs wichtig.

Wie bereits unter 5.2 gezeigt und in Abbildung 19 dargestellt, lässt sich eine konzentrationsabhängige Suppression der Proliferation der Tresp durch natürliche Tregs erreichen. Dabei zeigen die natürlichen Tregs sich anerg. Durchflusszytometrisch lag der Anteil der CD25 und FoxP3 doppelpositiven T-Zellen im dargestellten Beispiel bei 55 %. Als vergleichende nTregs wurden die Zellen der SF gewählt, da sich die Zellen aus dem Blut nicht in ausreichender Anzahl gewinnen ließen.

Für einen möglichen Therapieansatz, der die T-Zellhomöostase bei der JIA beeinflussen soll, ist es entscheidend inwieweit die induzierten Tregs immunsuppressiv fungieren können.

In den durchgeführten Versuchen konnte auch für die induzierten Tregs eine immunregulatorische Fähigkeit beobachtet werden, welche wie natürliche Tregs einen konzentrationsabhängigen Einfluss zeigten. Zudem waren auch die iTregs anerg. In Abbildung 19 ist ein Beispiel einer Messung der immunsuppressiven Aktivität von iTregs aus der SF und dem Blut dargestellt. Der prozentuale Anteil für dieses Beispiel an durchflusszytometrisch bestimmten iTregs in der SF lag für anti-CD3 stimulierte Zellen bei 29 % CD4⁺CD25^{hoch+}FoxP3⁺ Zellen, mit zusätzlichem TGF β 1 konnten 27 % erreicht werden. Im Blut lag der prozentuale Anteil der CD4⁺CD25^{hoch+}FoxP3⁺ Zellen mit 10 % (stimuliert mit anti-CD3, anti-CD28, IL-2) und 16 % zusätzlichem TGF β 1 deutlich niedriger verglichen mit der SF. Wie die Abbildung 19 erkennen lässt, zeigten die Responderzellen (Tresp) allein, in der Abbildung ganz links dargestellt, eine gute Proliferationsrate. Wurden nun induzierte Tregs den Responderzellen zugefügt, so war eine konzentrationsabhängige Hemmung der Proliferation zu beobachten (von links nach rechts). Die iTregs zeigten selbst einen anergen Phänotyp (ganz rechts).

A



B

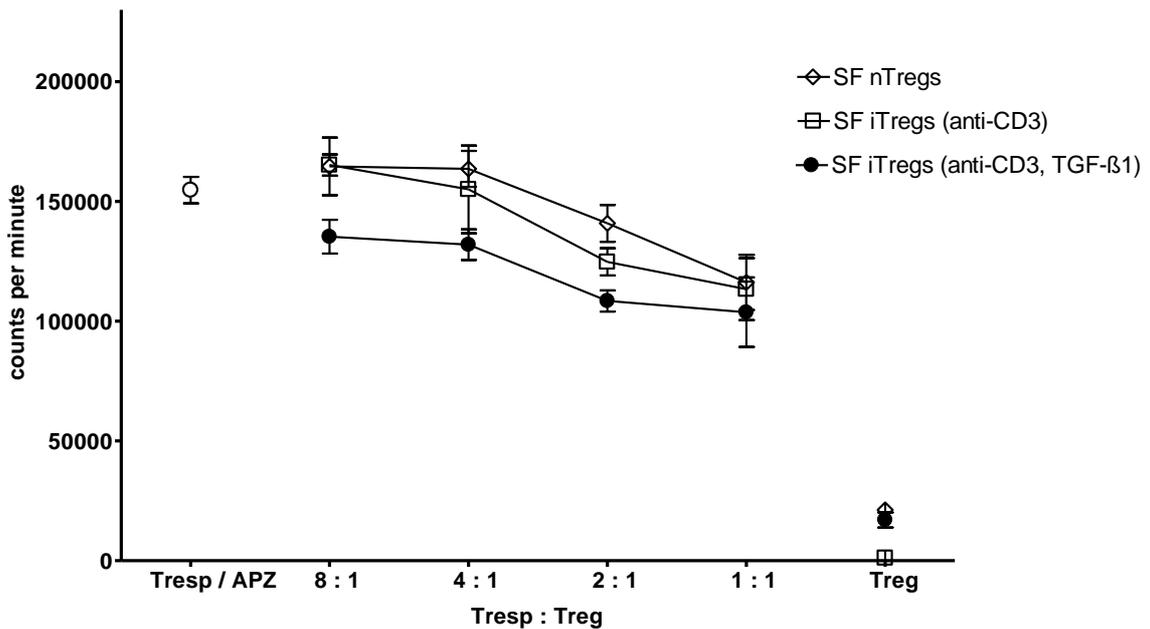


Abbildung 19: Hemmung der Tresp Proliferation durch iTregs und nTregs
 Messung der T-Zellproliferation (Tresp) nach Zugabe von iTregs und nTregs aus Blut (A) und SF (B) von JIA-Patienten mittels einer ^3H -Proliferationsmessung.
 Als Tresp wurden frisch isolierte $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ T-Zellen aus dem Blut eines gesunden Spenders, als APZs CD4^- Zellen vom gleichen Spender eingesetzt. Die eingesetzten iTregs wurden generiert durch Stimulation mit anti-CD3, IL-2, anti-CD28, sowie TGF- β 1

(je nach Versuchsansatz) aus $CD4^+CD25^-$ T-Zellen aus dem Blut und der SF. Die nTregs entsprechen $CD4^+CD25^+$ Zellen aus der SF nach Kultur mit IL-2.

X-Achse: Aufgetragen ist das Konzentrationsverhältnis Tresp zu Tregs mit zunehmendem Anteil an Tregs von links nach rechts. Ganz links aufgetragen Tresp mit APZs ohne Tregs. Ganz rechts nur Tregs angesetzt.

Y-Achse: Counts per minute (Strahlungsintensität) ist proportional zum eingebauten H^3 -Thymidin und damit der Proliferationsrate.

Von besonderem Interesse ist auch der Einfluss des Zytokins $TGF\beta 1$ auf die suppressive Aktivität der iTregs. Wie bereits beschrieben scheint $TGF\beta 1$ die FoxP3 Expression bei der Induktion zu verstärken. In der Literatur wird ein proportionales Verhältnis der Expression von FoxP3 und der immunsuppressiven Aktivität vermutet⁸⁴.

Die durchgeführten Versuche scheinen die Beobachtung zu bestätigen, dass $TGF\beta 1$ bei der Induktion der Tregs die immunsuppressive Fähigkeit verstärkt, wie ein Beispiel in Abbildung 19 zeigt. Dies konnte für iTregs aus der SF, sowie aus dem Blut, allerdings nicht signifikant, beobachtet werden.

Mit den durchgeführten Versuchen konnte gezeigt werden, dass eine Induktion von Tregs aus $CD4^+CD25^-$ T-Zellen sowohl aus dem Blut als auch der SF von Patienten mit JIA möglich ist und diese auch in der Lage sind immunsuppressiv auf Responderzellen einzuwirken.

In vorangegangenen Versuchen, siehe 5.3, konnte gezeigt werden, dass lokale Faktoren in betroffenen Gelenken die immunregulatorische Funktion der nTregs herabsetzen können. Der Frage inwieweit sich diese Beobachtung auf induzierte Tregs sich übertragen lässt, wurde in weiteren Versuchen untersucht.

5.5.1 Einfluss inhibitorischer Faktoren in der Synovialflüssigkeit

In den bereits durchgeführten Versuchen konnte eine erfolgreiche Induktion von Tregs und deren immunsuppressive Aktivität beobachtet werden. Es ist anzunehmen, dass im entzündeten Gelenk bei JIA Patienten Tregs lokal induziert werden. Da aber bei Kindern mit JIA offensichtlich trotzdem eine unkontrollierte chronische Entzündung im Gelenk stattfindet, sollte auch für induzierte Tregs getestet werden, ob die lokalen Faktoren der SF, welche nTregs in ihrer immunsuppressiven Funktion einschränken, siehe Kapitel 5.3.1, auch auf die Aktivität der iTregs Einfluss nehmen. Um dieser Frage nachzugehen, wurde den unter 4.6 beschriebenen Proliferationsassays mit iTregs zellfreie SF, der Überstand der Ficoll-Isolation, unter 4.1 beschrieben, zugegeben. Abbildung 20 zeigt ein Beispiel anhand von iTregs der SF, welche mit anti-CD3 und TGF β 1 induziert wurden. Zu erkennen ist ein deutlich reduzierter immunsuppressiver Einfluss der iTregs auf die Responderzellen. Die Kurve, welche den konzentrationsabhängigen Einfluss der Tregs auf die Proliferationsrate der Tresp beschreibt, scheint mit zellfreier SF parallel nach oben verschoben zu sein, im Sinne einer vermehrten Proliferation. Somit scheinen die lokalen Faktoren in den betroffenen Gelenken auch die Funktion induzierter Tregs zu beeinflussen. Die zellfreie SF zeigt dabei keinen Einfluss auf die Proliferation der Responderzellen (ganz links). Zudem wird auch der anerge Phänotyp der iTregs durch zellfreie SF nicht aufgehoben.

Noch unklar ist welche Faktoren einen derartigen Einfluss auf die regulatorischen T-Zellen in Gelenken bei JIA haben.

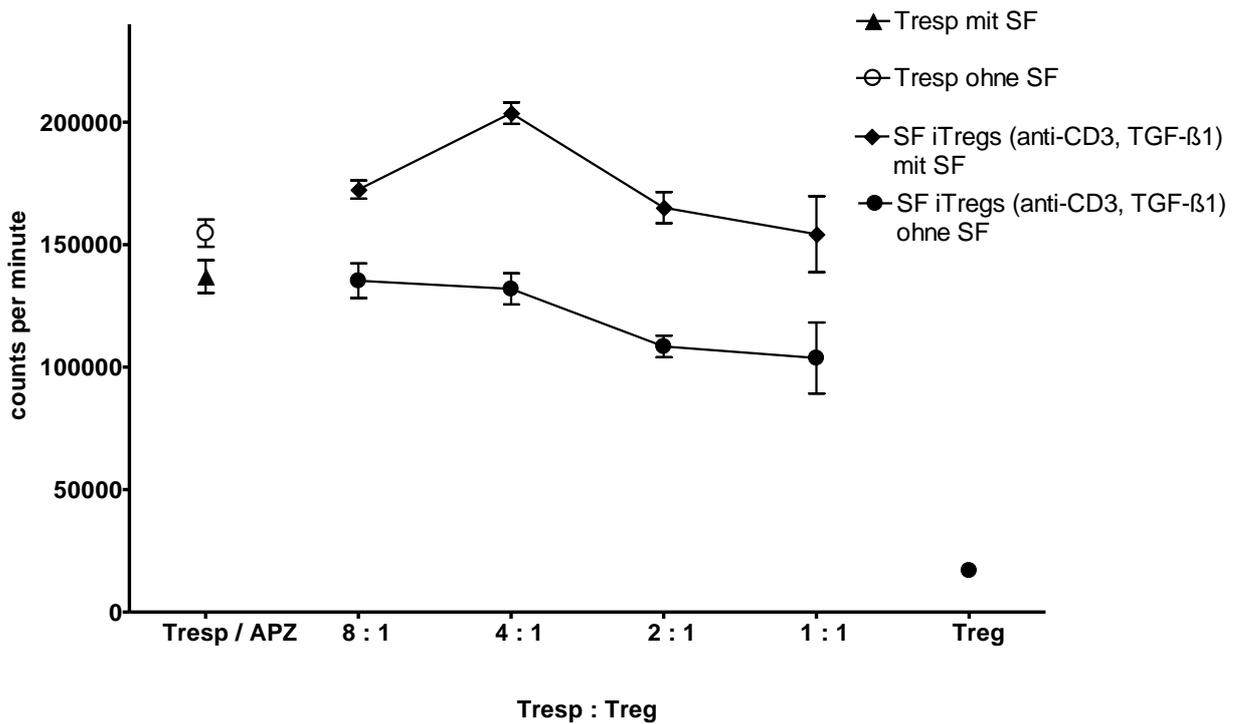


Abbildung 20: Einfluss zellfreier SF auf die Funktion der iTregs

Der Versuch wurde mit Responderzellen eines gesunden Spenders, unter den Bedingungen wie in Abbildung 19 B durchgeführt.

Dem Ansatz wurde zellfreie SF (Überstand der Ficoll-Isolation, siehe 4.1) in einem Verhältnis von 1:8 zum Kulturmedium zugegeben.

Links: Tresp allein, mit und ohne zellfreie SF. Rechts: iTregs allein mit SF

X-Achse: Von links nach rechts zunehmend höherer Anteil an Tregs im Verhältnis zu Tresp

Y-Achse: Counts per minute (Strahlungsintensität) lässt sich proportional zum eingebauten H^3 -Thymidin messen und entspricht damit der Proliferationsrate.

5.6 Signalkaskade von TGFβ1

TGFβ1 spielt eine wichtige Rolle in der T-Zellhomöostase. In den vorangegangenen Versuchen konnte eine gesteigerte Expression von FoxP3 bei der Generierung von iTregs, sowie eine gesteigerte immunsuppressive Funktion auf die Proliferation von Effektor T-Zellen beobachtet werden. Zudem konnte eine verminderte Funktion von natürlichen, wie auch induzierten Tregs,

nachgewiesen werden wenn zellfreie SF zugegeben wurde. Somit besteht in lokalen Faktoren eine Möglichkeit, die zu einer fortbestehenden Entzündung in den Gelenken bei Kindern mit JIA kommt. Welche Faktoren dazu in der Lage sind ist weiterhin offen.

Eine weitere Theorie, warum es bei der JIA zu einer anhaltenden chronischen Inflammation kommt, ist eine verminderte immunsuppressive Wirksamkeit von TGF β 1 auf Ebene der Signaltransduktion der T-Zellen. Daher beschäftigte sich ein weiterer Projektbereich mit der Signalkaskade von TGF β 1 bei JIA.

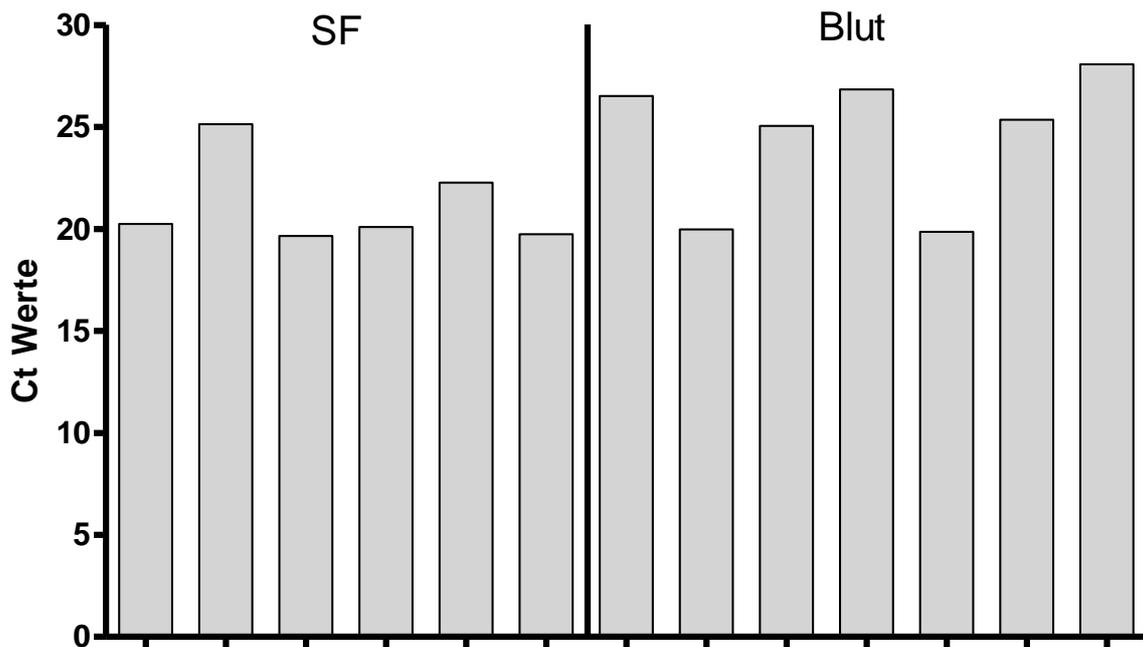
Da TGF β 1 als immunregulatorisches Zytokin gilt, soll in der Zukunft untersucht werden, ob auf Protein oder RNA-Ebene zwischen den einzelnen Verlaufsformen der JIA oder im Vergleich zu gesunden Personen Unterschiede in der Signalkaskade vorkommen, die eine verminderte Funktion von TGF β 1 erklären könnten. Ein Defekt in der Signalkaskade könnte somit ebenfalls für eine gestörte Regulation der Tregs verantwortlich sein und damit ein möglicher Therapieansatz. Wie Abbildung 1 zeigt, spielen die sekundären Botenstoffe SMAD3, SMAD4 und SMAD7 eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion.

Um die Signalkaskade von TGF β 1 auf Protein- und RNA-Ebene besser verstehen zu können, sollten zunächst Verfahren entwickelt werden, die ermöglichen sollen auf Protein- und RNA-Ebene diese sekundären Botenstoffe (SMAD3, SMAD4 und SMAD7) untersuchen zu können. Zu diesem Zweck sollte das Verfahren der quantitativen Realtime-PCR etabliert werden.

5.6.1 Etablierung einer quantitativen RT-PCR: geeignete Referenzgene

Die quantitative RT-PCR soll dazu verwendet werden, die Expression der SMAD-Moleküle der TGF β 1-Signalkaskade auf mRNA Ebene zu untersuchen. Bei der quantitativen RT-PCR kann auf die mRNA-Menge rückgeschlossen werden, wenn in der Probe ein Referenzgen mitgemessen wird, welches in den untersuchten Zellen stabil (in gleicher Menge) exprimiert wird (relative

Quantifizierung der mRNA-Menge). Um diese Messung zu etablieren, sollte ein Referenzgen gesucht werden, auf das die erzielten Werte bezogen werden können. Das Referenzgen muss dazu bei den jeweilig untersuchten Bedingungen, also in allen Zellen, stabil exprimiert bleiben und ungefähr der gleichen mRNA-Menge entsprechen, wie auch das gesuchte Gen in der Zelle exprimiert wird (etwa im gleichen Ct-Wert-Bereich). Da in den meisten vergleichbaren Arbeiten GAPDH verwendet wurde, wurde zunächst die Stabilität der GAPDH-Expression in den verschiedenen stimulierten Lymphozyten untersucht. GAPDH (Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) stellt ein Schlüsselenzym in der Glykolyse dar. Dessen Expression ist besonders abhängig vom Zellzyklus und von der Zelllinie¹⁰¹.



	SF						Blut						
frisch isoliert	X	X					X	X	X				
anti-CD3			X	X	X	X				X	X	X	X
TGFβ1				X	X						X	X	
Dauer der Stimulation			1,5 h	1,5 h	2 h	6 d				2 h	4 h	2 h	2h

Abbildung 21: GAPDH Expression in CD4⁺ Lymphozyten

GAPDH Expression verschiedener Zelltypen. Dargestellt ist die Expression von GAPDH unter verschiedenen Bedingungen in Kultur und Herkunft der Zellen. Im linken Abschnitt auf der x-Achse (Balken 1 – 6) sind CD4⁺ T-Zellen der SF, im rechten Abschnitt (Balken 7 – 13) aus dem Blut dargestellt. Auf der y-Achse sind die gemessenen Ct Werte aufgetragen. Wie unter 4.9.1 beschrieben, ist der Ct Wert ein Maß für die Ausgangsmenge der cDNA und entspricht der Zyklenanzahl, bis die Fluoreszenzintensität (Kopienzahl) einen Schwellenwert überschreitet.

Untersucht wurden CD4⁺ T-Lymphozyten unter verschiedenen Kulturbedingungen auf ihre GAPDH Expression. Dazu wurden frisch isolierte und stimulierte CD4⁺ Lymphozyten der SF und des Blutes verwendet. Die stimulierten T-Zellen wurden mit plattengebundenem anti-CD3 Antikörper, mit oder ohne TGFβ1 kultiviert. Wie Abbildung 21 zeigt, wurden große Schwankungen in der GAPDH Expression (Ct Werte) zwischen den untersuchten Zellen beobachtet. Für die Zellen aus dem Blut konnte eine Standardabweichung von 3,3 Ct-Werten nachgewiesen werden, für die T-Zellen aus der SF waren es 2,2 Ct-Werte Standardabweichung. Betrachtet man die gesamte Population aus Blut und SF ergibt sich ebenfalls eine Standardabweichung von 3,3 Ct-Werten.

Da für eine stabile Expression eine Standardabweichung von 1 (– 1,5) Ct-Werten gefordert wird, kann GAPDH nicht als geeignetes Referenzgen angesehen werden.

Um ein geeignetes Referenzgen zu finden, testeten wir mit Hilfe einer endogenen Kontrollplatte (TaqMan Human Endogenous Control Plate) 11 verschiedene Gene.

Es wurde eine interne Positivkontrolle verwendet, um negative Ergebnisse durch inhibierende Faktoren zu erkennen. Bei der internen Positivkontrolle wird eine künstliche Sequenz verwendet, so dass die Primer nicht mit Proben-DNA reagieren.

Gemessen werden Amplifikationen durch Fluoreszenz-Transfer-Energie-Sonden. Verwendet werden hier TaqMan Sonden, die fluoreszierenden Emissionen werden im VIC Kanal gemessen. Das Prinzip entspricht dem, unter 4.9 beschriebenen, Fluoreszenzresonanz-Energietransfer.

Als mögliche Referenzgene testeten wir 18S ribosomale RNA, saures ribosomales Protein, β -Aktin, Cyclophilin, GAPDH, Phosphoglycerolkinase, Transkriptionsfaktor IID, β 2-Mikroglobulin, β -Glucuronidase, Hypoxanthin Ribosyltransferase und den Transferrinrezeptor, siehe Material und Methoden.

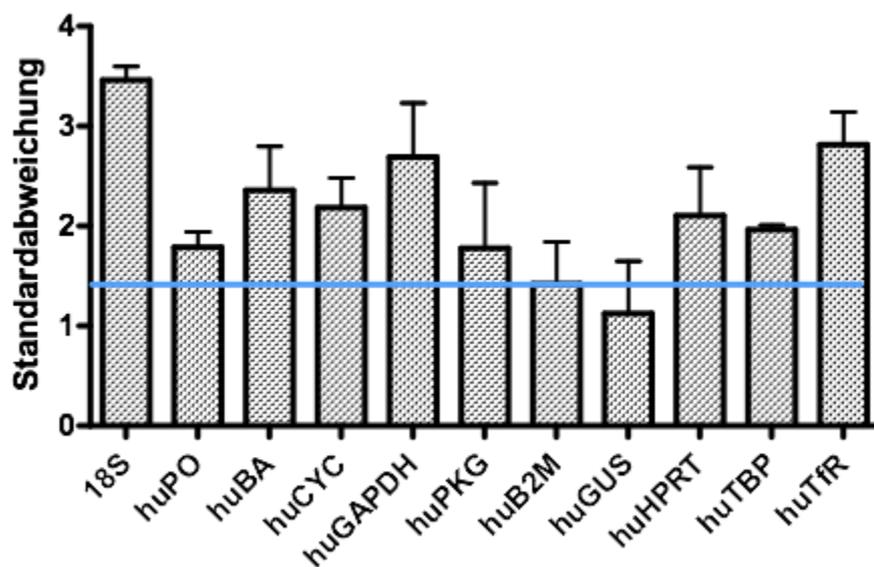


Abbildung 22: Referenzgenanalyse für die quantitative RT-PCR

Dargestellt ist die Standardabweichung der Expression der entsprechenden Gene in den untersuchten Lymphozyten. Untersucht wurde die mRNA von CD4⁺ Lymphozyten aus Blut und SF von 13 verschiedenen Proben unter verschiedenen Stimulationsbedingungen.

Y-Achse: Standardabweichung der deltaCt-Werte. Blauer Balken: Grenze, ab der eine Abweichung signifikant ist und somit keine stabile Expression darstellt.

X-Achse: Abkürzungen Referenzgene

18S = 18S ribosomale RNA

huPO= humanes saures ribosomales Protein

huBA= humanes β -Aktin

huCYC= humanes Cyclophilin

huGAPDH= humane Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase

huPKG= humane Phosphoglycerolkinase

huB2M= humanes β 2-Mikroglobulin

huGUS= humane β -Glucuronidase

huHPRT= humane Hypoxanthin Ribosyltransferase

huTBP= humaner Transkriptionsfaktor IID

huTfR= humaner Transferrinrezeptor

Bei den untersuchten Genen beobachteten wir unter den getesteten Proben, dass das humane β 2-Mikroglobulin und die β -Glucuronidase am Stabilsten exprimiert wurden.

β 2-Mikroglobulin spielt bei der Immunantwort eine Rolle, die β -Glucuronidase ist ein Glycoprotein das als Exoglucuronidase in Lysosomen vorhanden ist. Beide werden in den meisten Geweben exprimiert ¹⁰¹. Diese beiden Gene zeigten lediglich eine Standardabweichung von 1,42 und 1,125, siehe Abbildung 22 und stellen somit geeignete Referenzgene dar.

Verwendet man für quantifizierende Versuche, anstatt nur einem Referenzgen, diese Zwei, so lässt sich damit eine verlässliche relative Quantifizierung ermöglichen.

6 Diskussion

Die JIA stellt eine autoimmune T-Zell-vermittelte Erkrankung im Kindesalter dar, deren Ursache bisher nicht vollständig geklärt ist. Zudem zeigen sich unterschiedliche Verlaufsformen, die von einer spontanen Remission ohne Folgeschäden bis zu einer fortbestehenden Erkrankung mit Gelenkdestruktion reichen. Eine Theorie für die Entstehung und Aufrechterhaltung der Erkrankung stellt eine mögliche Dysfunktion der regulatorischen T-Zellen in den Vordergrund. Diese spielen, wie bereits in der Einleitung, siehe 1.4, beschrieben, eine entscheidende Rolle in der peripheren Toleranz und am immunologischen Gleichgewicht. Bisher ist es allerdings noch nicht klar, ob eine gestörte Funktion der Tregs eine primäre Ursache der Erkrankung darstellt oder eine sekundäre Folge. Für mögliche Therapieansätze sind besonders die Eigenschaften der Tregs und Einflussmöglichkeiten auf deren Funktion von besonderem Interesse.

6.1 Charakterisierung regulatorischer T-Zellen

6.1.1 CD 127 – als neuer Marker geeignet?

Um Tregs zu charakterisieren und sie auf ihre Funktion untersuchen zu können, wurden Lymphozyten aus dem Blut und SF von 44 Kindern mit JIA isoliert. Innerhalb dieser Gruppe wurden die Zellen auf den Anteil phänotypischer Tregs anhand der Marker CD4, CD25 und CTLA4 oder FoxP3 untersucht. Spezifische Marker für Tregs stellen CTLA4 und FoxP3 dar. Für beide Marker konnte eine Korrelation mit der regulatorischen Aktivität gezeigt werden^{38,41,42}.

In den durchgeführten Versuchen wurden diese Marker für die durchflusszytometrische Typisierung verwendet. Für die Isolation von Tregs stehen allerdings nur die Marker CD4 und CD25 zur Verfügung. Aktuell existieren keine weiteren Marker, mit denen Tregs vital isoliert werden können.

Da diese Marker auch von aktivierten T-Zellen exprimiert werden, ist eine spezifische Isolation vitaler Tregs schwierig, da spezifische Marker wie CTLA4 oder FoxP3 nur intrazellulär ausreichend vorhanden sind. Daher besteht ein hohes Interesse weitere Marker zu finden, welche die Population der Tregs spezifisch bestimmen oder zumindest weiter eingrenzen lassen. So wurde mit CD127 (Alpha-Kette des IL-7 Rezeptors) ein weiterer Parameter durch Liu et al.³⁴ beschrieben. Die Forschungsgruppe postuliert, dass CD127 auf Tregs nur sehr wenig exprimiert^{34,60} wird und beschreibt einen umgekehrt proportionalen Zusammenhang zwischen der CD127 Expression und des intrazellulären Markers FoxP3 in nTregs.

Falls sich diese Beobachtung bestätigen würde, so könnte sich mit CD127 die Isolation vitaler Tregs weiter optimieren lassen. Zur Überprüfung dieser Beobachtung wurden $CD4^+CD25^{\text{hoch}}FoxP3^+$ oder $CTLA4^+$ Tregs auf deren CD127 Expression untersucht.

Die in der Durchflusszytometrie zur Verfügung stehenden Marker FoxP3 oder CTLA4 sind sehr spezifisch für Tregs und ermöglichen eine gute Eingrenzung der Population der Tregs. Somit können die erhobenen Ergebnisse in den durchflusszytometrischen Analysen der Population der Tregs sicher zugeordnet werden.

In den durchgeführten Versuchen wurde beobachtet, dass ein größerer Anteil der Tregs den Marker CD127 in geringer Menge exprimiert, wie durch Liu et al.³⁴ postuliert. Allerdings exprimierte etwa 1/3 der regulatorischen T-Zellen den Marker CD127 vermehrt.

Betrachtet man im Umkehrschluss die Population der CD127 gering exprimierenden Zellen, siehe auch Abbildung 8, so sind die Zellen zwar alle $CD4^+$, allerdings exprimiert der überwiegende Anteil der Zellen den Marker CD25 in nur geringem Maße bis garnicht. Die Aufteilung der Expression von CD25 stellt sich simultan für die $CD127^{\text{hoch}}$ Zellen dar. Betrachtet man somit die Lymphozyten anhand der Expression von CD127, so können diese Zellen keiner Population, bezogen auf CD25, zugeordnet werden. Somit lassen sich die Zellen anhand des Markers CD127 nicht weiter definieren. Diese Ergebnisse passen zu den Beobachtungen von Zhang et al.³³ und Anderson et

al.³⁵, welche in der CD127 niedrig exprimierenden Population Zellen nachgewiesen haben, die CD25 nur gering bis nicht exprimieren.

6.2 Tregs in Blut und Synovialflüssigkeit

Die JIA stellt eine chronische Erkrankung des Kindes- und Jugendalter dar, bei der es über Jahre hinweg zu wiederkehrenden oder anhaltenden Inflammationen in den betroffenen Gelenken kommt. Warum mögliche Toleranzmechanismen es nicht schaffen, die autoimmunen Reaktionen in den Gelenken zu unterdrücken, sind noch immer offene Fragen an die Forschung. Eine mögliche Theorie wäre ein quantitativer Mangel an regulatorischen T-Zellen in den Gelenken.

Um dem nachzugehen, wurden aus dem Blut und der SF Lymphozyten isoliert und in der Durchflusszytometrie anhand der Marker CD4, CD25 und CTLA4 analysiert. Betrachtet man die Population der Tregs (CD4⁺CD25^{hoch+}CTLA4⁺ Zellen) konnte in den durchgeführten Versuchen ein signifikant erhöhter Anteil an Tregs in der Synovialflüssigkeit verglichen mit dem Blut (siehe Abbildung 11, mean 79 % SF vs. 57 % Blut) nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse passen zu den Beobachtungen von van Amelsfort et al.⁹⁶. Er sowie andere Forschungsgruppen^{8,102} konnten ebenfalls einen erhöhten Anteil phänotypischer Tregs in betroffenen Gelenken nachweisen.

Eine mögliche Erklärung für die gemachten Beobachtungen wäre, dass eine erhöhte proinflammatorische Konzentration von IL-2 und die Anwesenheit von APZs, wie es in entzündlichem Gewebe der Fall ist, zur Proliferation von Tregs führt.

Denn, wie bereits beschrieben, sind hohe Konzentrationen an IL-2 mit einer kombinierten TZR-Stimulation erforderlich, um Tregs zu expandieren^{97-100,103}.

Eine andere mögliche Erklärung für die erhöhte Anzahl an gemessenen Tregs in der SF könnte sein, dass neben den nTregs zusätzlich auch induzierte Tregs vermehrt vorkommen. Yagi et al¹⁰⁴ konnte zeigen, dass nTregs andere nicht

aktivierte Tregs oder Effektorzellen anregen können einen regulatorischen Phänotyp anzunehmen und somit als iTregs die nTregs in ihrer Funktion unterstützen. In Folgeversuchen, siehe 5.4, konnte gezeigt werden, dass sich aus Responderzellen induzierte Tregs generieren lassen. Da sich iTregs von nTregs in ihrem Phänotyp nicht sicher unterscheiden lassen, können bisher keine Untersuchungen diese Hypothesen hinterfragen²³.

Warum aber unter einer erhöhten Anzahl von regulatorischen T-Zellen in den betroffenen Gelenken es zu einem Fortbestehen der Inflammation kommt ist mit diesen Beobachtungen weiterhin nicht geklärt. Da weniger der quantitative Mangel an regulatorischen T-Zellen dafür verantwortlich zu sein scheint, so wird vermutlich eine Funktionseinschränkung der Zellen im Vordergrund der Problematik stehen.

6.3 Funktion von Tregs

Bei der JIA besteht eine nicht ausreichende T-Zellhomöostase, die zu einer chronischen Inflammation der Gelenke führt. Die mangelnde Immunregulation scheint nicht durch einen quantitativen Mangel an regulatorischen T-Zellen hervorgerufen zu werden. Warum aber die sogar vermehrt vorliegenden Tregs, in den betroffenen Gelenken, nicht zu einer ausreichenden Hemmung der Inflammation führen, ist noch unklar. Da vermutlich eine Funktionseinschränkung der Tregs vorliegt, wurden die Tregs aus dem Blut und der SF anhand der Marker CD4 und CD25 isoliert und in Kultur mit IL-2 selektioniert⁹⁷⁻¹⁰⁰. Die CD4⁺CD25⁻ Zellen eines gesunden Spenders wurden als Responderzellen eingesetzt, siehe auch 5.3. Die Proliferationsmessung erfolgte anhand des Einbaus markierter Nukleotide an die Stelle des Thymidins während der Zellteilung, wie unter 4.6 beschrieben.

In den Versuchen, siehe Abbildung 12, zeigten die Tregs selbst einen anergen Phänotyp, während für die frischen Responderzellen des gesunden Spenders alleine eine ungehemmte Proliferation beobachtet wurde. Wurde den

Responderzellen in unterschiedlicher Konzentration Tregs hinzugegeben, so zeigte sich eine konzentrationsabhängige Suppression der Proliferation dieser Zellen.

Anhand dieser Versuche scheinen die Tregs bei Kindern mit JIA aus der SF funktionsfähig zu sein. Warum aber die vermehrt vorkommenden Tregs, welche eine gute immunregulatorische Funktion in vitro zeigten, nicht in der Lage sind die immunologische Selbsttoleranz im Gelenk wieder herzustellen, ist weiterhin unklar.

Eine Theorie dazu wurde von van Amelsfort aufgestellt. Nach ihm reagieren die Responderzellen in den Gelenken weniger empfindlich auf die Tregs^{96,105} und stellen somit einen Grund für den Funktionsverlust der Tregs dar.

Eine komplementäre Theorie ist, dass lokale Faktoren für den Funktionsverlust der Tregs verantwortlich sind. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde zellfreie SF den Proliferationsversuchen zugegeben. Die zellfreie SF wurde aus dem Überstand der Ficoll-Isolation gewonnen, siehe 5.3.1.

Beobachtet werden konnte, wie Abbildung 13 zeigt, dass mit Zugabe zellfreier Synovialflüssigkeit die immunregulatorische Fähigkeit der Tregs, die Proliferation von Responderzellen zu hemmen, beeinträchtigt wurde. Somit scheinen in der Synovialflüssigkeit lokale Faktoren für einen Funktionsverlust der Tregs verantwortlich zu sein. Durch Zheng et al. und weitere^{69,103,106,107} wurden Zytokine wie IL-7 und IL-15 oder TNF- α ^{108,109} für diesen Effekt verantwortlich gemacht. Die Blockade dieser Zytokine könnte somit eine neue Behandlungsoption für Kinder mit JIA darstellen. Auch für das Zytokin TNF- α konnte ein solcher Einfluss auf die Funktion von Tregs beobachtet werden. Dafür wird bereits mit dem löslichen TNF- α Rezeptorantikörper (Etanercept) oder den TNF- α Antikörpern (Infliximab (chimär) oder Adalimumab (human) eine Blockade durchgeführt¹¹⁰. Unter dieser Therapie konnte durch Nadkarni et al.¹¹¹ die regulatorische Fähigkeit der Tregs gesteigert werden.

In weiteren Studien sollte untersucht werden, ob durch entsprechende Antikörper die Zytokine in der SF von JIA-Patienten antagonisiert werden

können und somit die Funktion der Tregs in den betroffenen Gelenken wieder hergestellt werden kann.

6.4 Lassen sich Tregs auch aus CD4⁺CD25⁻ Zellen generieren

In der Literatur wurde zunehmend davon berichtet, dass eine Induktion phänotypischer Tregs aus CD4⁺CD25⁻ Zellen möglich scheint^{25,36,76,77}. Sollte dies wirklich möglich sein, so könnte auf diesem Weg Einfluss auf die T-Zellhomöostase genommen werden und damit ein neuer Ansatz für die Therapie der JIA entstehen. Welche Einflüsse für die Induktion von regulatorischen T-Zellen verantwortlich sind ist noch unklar.

Vermutlich ist für die Induktion von Tregs eine CD3/TZR Stimulation, sowie die Zugabe der Zytokine IL-2 und TGFβ1 erforderlich. Für die Stimulation mit anti-CD3 Antikörper und anti-CD28 Antikörper konnte eine transiente Expression von FoxP3 gezeigt werden^{36,39,40,76,112}. Diese Zellen waren durch ihre Oberflächenantigene nicht von nTregs zu unterscheiden^{36,76,77}. Diese so genannten iTregs zeigten allerdings keinen anergen Phänotyp, produzierten proinflammatorische Zytokine und übten keine regulierende Funktion aus^{76,77,84}. Dies steht allerdings im Widerspruch zu anderen Studien, welche eine immunsuppressive Wirkung von iTregs beobachten konnten. So zeigten einige Arbeiten, dass unter Zugabe von TGFβ1 phänotypische und funktionelle iTregs generiert werden konnten^{30,78,84,85}.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde mit verschiedenen Kulturbedingungen versucht, Zellen mit regulatorischem Phänotyp aus Blut und SF von JIA-Patienten zu induzieren und deren Funktion untersucht. Für diese Versuche wurden die isolierten Lymphozyten anhand der Marker CD4 und CD25 mittels MACS, siehe 4.2, differenziert. Die so isolierten CD4⁺CD25⁺ Zellen wurden als nTreg verwendet, enthalten aber mit hoher Wahrscheinlichkeit bereits in vivo induzierte Tregs. Die CD4⁺CD25⁻ Zellen wurden für die Induktion von iTregs in vitro herangezogen und unter verschiedenen Bedingungen 4 Tage stimuliert.

Am Tag der Isolation und nach 4 Tagen wurden die Zellen durchflusszytometrisch anhand der Marker CD4, CD25, FoxP3 analysiert.

Untersucht wurde der Einfluß von steigenden Konzentrationen anti-CD3 Antikörper und TGFβ1, sowie die Zugabe von anti-CD28 Antikörper und dem Zytokin IL-2.

Um eine optimale Konzentration für die CD3-Stimulation bestimmen zu können, wurden frisch isolierte CD4⁺CD25⁻ Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von plattengebundenem anti-CD3 Antikörper stimuliert.

Wie die Versuche zeigen konnten, lassen sich bereits durch anti-CD3 die CD4⁺CD25⁻ Zellen zu einer Expression von CD25 anregen, wie es auch für aktivierte T-Effektorzellen zutrifft. Diese Zellen zeigten allerdings auch eine dosisabhängige Steigerung der Expression von FoxP3, welcher ein spezifischer Marker für Tregs darstellt. Diese Beobachtung konnte für die Lymphozyten aus dem Blut sowie der SF gemacht werden, siehe Abbildung 14. Allerdings konnte in einigen Versuchen für die Zellen der SF keine weitere Steigerung der Expression von FoxP3 erreicht werden, wie Abbildung 15 zeigt. Diese Beobachtung könnte auf eine bereits maximale Stimulation und bereits erfolgten Induktion von Tregs in vivo zurückzuführen sein.

Somit scheint die CD3-Stimulation einen wichtigen Einfluss auf die Induktion von Tregs zu haben und passt zu den Beobachtungen in der Literatur^{36,39,40,76,112}. Durch die Zugabe von anti-CD28 Antikörper und IL-2, siehe Abbildung 16, konnte der Einfluss auf die Expression von CD25 noch verstärkt werden. Auch auf die Expression von FoxP3 in den CD4⁺CD25^{hoch+} Zellen konnte eine Steigerung erzielt werden, bei gleichzeitiger Zugabe beider Faktoren. Anti-CD28 Antikörper und IL-2 allein scheinen keinen so deutlichen Einfluss auf die Expression von FoxP3 zu haben. Ein wesentlicher Unterschied zwischen den Zellen aus dem Blut und der SF konnte hier nicht beobachtet werden.

Somit zeigte sich in unseren Versuchsreihen, dass eine Induktion phänotypischer Tregs möglich zu sein scheint. Der Einfluss von anti-CD3 Antikörper und damit einer ausreichenden T-Zellstimulation scheint hier

entscheidend zu sein. Eine noch weitere Steigerung phänotypischer iTregs scheint durch Zugabe von anti-CD28 Antikörper und IL-2 erreichbar. Zusätzlich wird dem Zytokin TGF β 1 ein wesentlicher Einfluss für die Induktion von Tregs zugeschrieben, besonders im Hinblick auf die immunregulatorischen Eigenschaften⁸⁴.

Um diesen Einfluss zu untersuchen, wurden die Zellen mit anti-CD3 +/- TGF β 1 oder anti-CD3/IL-2/anti-CD28 +/- TGF β 1 stimuliert und durchflusszytometrisch analysiert. In den durchgeführten Versuchen wurde durch TGF β 1 der Anteil phänotypischer Tregs (CD4⁺CD25^{hoch+}FoxP3⁺) nochmals erhöht, siehe Abbildung 17. Diese gemachten Ergebnisse stimmen mit der Arbeit von Tran et al⁸⁴ überein, in der ebenfalls eine Steigerung der Expression von FoxP3 durch TGF β 1 zu erkennen war.

Anhand der durchgeführten Versuchsreihen scheint für die Induktion von Tregs aus einer Population, welche nicht den natürlichen Tregs entspricht eine Stimulation proinflammatorischer Signale (anti-CD3/anti-CD28/IL-2) erforderlich zu sein. Zusätzlich zeigt TGF β 1, dem immunregulatorische Eigenschaften nachgesagt werden, ebenfalls einen wesentlichen Einfluss zu haben^{25,30,78}.

Sollten diese induzierten Tregs nun auch in ihrer Funktion den natürlichen Tregs entsprechen, so wäre dies ein neuer Ansatz in der Therapie der JIA. Damit könnte die Wiederherstellung des immunologischen Gleichgewichtes beeinflusst werden.

6.5 Funktion der iTregs

Um herauszufinden, ob die induzierten Tregs einen Einfluss auf Responderzellen ausüben können oder den nTregs nur durchflusszytometrisch entsprechen, wurden Proliferationsversuche mit frisch isolierten Responderzellen eines gesunden Spenders durchgeführt.

In der Literatur existieren verschiedene Beobachtungen zur Funktion der iTregs. Einige Arbeiten konnten den typischen anergen Phänotyp, sowie die immunregulatorische Funktion nicht beobachten^{36,76,77}. Während andere Forschungsgruppen den iTregs die gleichen Eigenschaften wie den nTregs bescheinigen^{25,30,78}. Betreffend die immunregulatorische Funktion scheint TGFβ1 einen entscheidenden Einfluss zu haben^{41,84}.

Für die 4 Tage Kultur wurden die CD4⁺CD25⁻ Zellen des gesunden Spenders als Responderzellen und dessen CD4⁻ Zellen als APZs eingesetzt, wie unter 5.5 dargestellt. Die immunregulatorische Funktion wurde mit der der nTregs (CD4⁺CD25⁺ Zellen nach Selektion mit IL-2 in Kultur) verglichen. Zur Messung der Proliferation wurde das Verfahren des Nukleotideinbaus anstatt des Thymidins durch ³H-Thymidin oder BrdU, siehe 4.6, verwendet.

Entsprechend den Ergebnissen wie unter 5.3 beschrieben zeigen die nTregs den für sie spezifischen anergen Phänotyp und eine konzentrationsabhängige Suppression der Responderzellproliferation. Die Responderzellen zeigten allein ohne Tregs eine ungehemmte Proliferation. Für die iTregs dagegen konnte ein anerger Phänotyp beobachtet werden, wie er für Tregs spezifisch ist. Auch zeigten die induzierten Tregs eine konzentrationsabhängige Hemmung der Proliferation von Responderzellen.

Ob TGFβ1 einen Effekt auf die immunregulatorischen Eigenschaften der iTregs hat, konnte in den durchgeführten Versuchen für die iTregs aus dem Blut nicht sicher beobachtet werden. Während für die iTregs aus der SF mit TGFβ1 der hemmende Einfluss auf die Proliferation von Responderzellen noch verstärkt werden konnte, wie Abbildung 19 B zeigt. Dies unterstützt die Beobachtung, siehe 5.4.1.3, dass durch TGFβ1 eine gesteigerte Expression von FoxP3 nachweisen lässt und auch von Tran et al.⁸⁴ beobachtet wurde.

Zusammenfassend lassen sich induzierte Tregs aus einer CD4⁺CD25⁻ Population generieren, welche nicht den natürlichen Tregs entsprechen, unter dem Einfluss proinflammatorischer Signale (anti-CD3/anti-CD28/IL-2) und TGFβ1. Diese generierten iTregs konnten in den Proliferationsversuchen einen immunregulatorischen Einfluss auf die Proliferation von Responderzellen nachweisen und waren dabei selbst anerg. Warum aber in den entzündeten Gelenken, in denen sicherlich auch iTregs vorliegen, die Inflammation nicht unterdrückt werden kann ist unklar.

Um zu untersuchen ob lokale Faktoren in der SF auch die Funktion der iTregs beeinflussen können, wie es für die nTregs, siehe 5.3.1 beobachtet werden konnte, wurde den Versuchen zellfreie SF zugefügt. Dabei konnte auch für die iTregs eine deutlich verminderte Funktion ihrer immunregulatorischen Fähigkeiten durch lokale Faktoren der SF gezeigt werden, wie in Abbildung 20 zu erkennen.

Welche Faktoren dazu in der Lage sind, sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Diese Faktoren zu blockieren, wäre ein möglicher Ansatz in der Therapie der JIA.

6.6 Signalkaskade von TGFβ1

6.6.1 Etablierung einer quantitativen RT-PCR: geeignete Referenzgene

Dem Peptid TGFβ1 wird eine wichtige Rolle in der T-Zelltoleranz zugesprochen⁶⁴⁻⁶⁶. In den vorangegangenen Versuchen konnten wir, wie auch in der Literatur mehrfach beschrieben^{22,23,69,70}, einen Einfluss von TGFβ1 auf die Induktion von Tregs durch eine gesteigerte Expression von FoxP3 beobachten.

Bei der JIA steht eine gestörte T-Zelltoleranz im Vordergrund. In den durchgeführten Versuchen konnte auf zellulärer Ebene eine gestörte Funktion der Tregs, sowie der iTregs nachgewiesen werden, welche durch lokale Faktoren hervorgerufen wurden. Eine weitere mögliche Störung, welche zur

Erkrankung und Aufrechterhaltung der Entzündung führen kann, stellt eine fehlende oder verminderte Wirkung durch TGF β 1 auf Ebene der Signaltransduktion dar. Ein Defekt dieser Signaltransduktion wäre ebenfalls für eine gestörte Funktion der Tregs verantwortlich und könnte einen weiteren Ansatz für zukünftige Therapien bieten.

Die Signalkaskade TGF β 1 erfolgt über sogenannte SMAD Proteine, siehe Abbildung 1, bei der die Proteine SMAD2, SMAD3 und SMAD7 eine Schlüsselrolle einnehmen.

Um eine mögliche quantitative oder qualitative Störung der Signalkaskade von TGF β 1 in T-Zellen der SF zu untersuchen, sollte zunächst das Verfahren der quantitativen Realtime-PCR für diese SMAD Proteine etabliert werden.

Mit der qRT-PCR kann auf die zuvor bestandene mRNA-Menge rückgeschlossen werden. Dazu wird für die relative Quantifizierung die Menge des gesuchten Gens auf ein internes Referenzgen bezogen. Gemessen wird im Rahmen der quantitativen RT-PCR die Zyklusanzahl. Diese entspricht der Anzahl der Kopierschritte, die gebraucht werden, bis die kopierte DNA-Menge eine festgelegte Schwelle überschreitet. Die replizierte DNA-Menge wird durch Fluoreszenzsignale gemessen. Der Grenzwert wird manuell festgelegt, wie unter 4.9 beschrieben.

Wichtig für die relative Quantifizierung ist ein internes Referenzgen, das selbst stabil in den untersuchten Zellen und in etwa gleicher Menge wie das Zielgen exprimiert wird⁹⁴.

Ein häufig verwendetes Referenzgen stellt GAPDH (Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase), ein Schlüsselenzym der Glykolyse, dar. Die Expression ist besonders vom Zellzyklus und der jeweiligen Zelllinie abhängig¹⁰¹.

In den Versuchen konnte allerdings eine große Streubreite, siehe Abbildung 21, der Expression von GAPDH beobachtet werden. Dabei wurden Standardabweichungen der Ct-Werte von bis zu 3,3 nachgewiesen. Bei einer maximalen Streubreite von 1 – 1,5 Standardabweichungen, stellt somit GAPDH kein geeignetes Referenzgen für die Population der CD4⁺ Lymphozyten dar.

Für die Suche nach geeigneten Referenzgenen wurde eine standardisierte Kontrollplatte verwendet, mit der 11 verschiedene Gene getestet werden

konnten, siehe 5.6.1. Von diesen 11 Genen konnte für das humane β 2-Mikroglobulin (1,42 SD) und die β -Glucuronidase (1,125 SD) eine stabile Expression mit einer Standardabweichung von unter 1,5 delta Ct-Werten nachgewiesen werden.

Um kleinere Schwankungen in der Expression und damit eine höhere Aussagekraft der Versuche zu erreichen, ist es sinnvoll die gemessenen Werte des Zielgens auf zwei oder mehrere Referenzgene zu beziehen⁹⁴.

Im Weiteren kann nun mit den Messungen der Expression der SMAD-Proteine begonnen werden. Möglicherweise lassen sich auf Ebene der mRNA, also der Expression, dieser SMAD-Proteine Störungen nachweisen, die eine Erklärung für die unterschiedlichen Verlaufsformen der JIA liefern. Sollte dies der Fall sein, bestünde auch in diesem Bereich ein neuer Ansatz für zukünftige Therapien.

7 Zusammenfassung

Die juvenile idiopathische Arthritis ist die häufigste rheumatische Erkrankung im Kindes- und Jugendalter und zeigt eine große Diskrepanz im Verlauf und der Prognose. Sie zählt zu den T-zellvermittelten Erkrankungen, deren Pathophysiologie allerdings noch nicht vollständig geklärt ist. Die Population der regulatorischen T-Zellen scheint hier eine wichtige Rolle zu spielen. Diese Population ist entscheidend für das immunologische Gleichgewicht und die Selbsttoleranz. Im Rahmen dieser Dissertation standen die regulatorischen T-Zellen im Zentrum des Interesses.

Bei der JIA kommt es zu rezidivierenden oder anhaltenden Inflammationen in den betroffenen Gelenken. Als erste Frage sollte untersucht werden, ob durch einen Mangel an Tregs die Inflammation nicht ausreichend supprimiert wird. Im Rahmen dieser Arbeit konnte allerdings nachgewiesen werden, dass in den betroffenen Gelenken kein quantitativer Mangel an diesen Tregs besteht, sondern ganz im Gegenteil sich reichlich Tregs in betroffenen Gelenken nachweisen ließ. In vitro zeigten diese Zellen eine gute immunregulatorische Aktivität auf Responderzellen von gesunden Spendern. Dies bedeutet, dass trotz reichlich vorhandener regulatorischer T-Zellen mit erhaltenen immunregulatorischer Fähigkeit sich die Inflammation in den Gelenken fortsetzt. Gezeigt werden konnte, dass lokale Faktoren aus dem zellfreien Anteil der Synovialflüssigkeit die Funktion der Tregs inhibieren. Welche Faktoren hierzu in der Lage sind, muss in weiteren Untersuchungen geprüft werden. Eine Blockade dieser lokalen Faktoren könnte hierbei neue Therapiemöglichkeiten bei der JIA bieten.

Das immunmodulatorische Peptid TGF β 1 scheint einen entscheidenden Einfluss auf die Funktion von Tregs zu haben. Welchen Einfluss diese auf die phänotypischen Eigenschaften der Tregs haben, wurde hier untersucht. In den durchflusszytometrischen Analysen konnte eine gesteigerte Expression von FoxP3 bzw. CTLA4 durch das Peptid TGF β 1 in den Tregs nachgewiesen werden. Da diese Marker mit der immunregulatorischen Fähigkeit der

regulatorischen T-Zellen korrelieren, scheint hier ein bedeutender Einfluss von TGF β 1 zu bestehen.

In der Literatur wurde wiederholt davon berichtet, dass sich Zellen induzieren lassen, welche die gleichen phänotypischen Merkmale wie natürliche Tregs aufweisen. In der hier vorgestellten Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich diese so genannten iTregs aus CD4⁺CD25⁻ Zellen generieren lassen. Als für die Induktion unterstützende Faktoren konnte eine T-Zellstimulation über CD3, sowie weitere proinflammatorische Signale (anti-CD28 Antikörper und IL-2) identifiziert werden. Das Zytokin TGF β 1 bewirkte auch für die induzierten Tregs eine gesteigerte Expression von FoxP3 und somit einem spezifischen Marker für Tregs, der mit der immunregulatorischen Aktivität der Zellen korreliert. In vitro konnte eine gute immunregulatorische Funktion der induzierten Tregs beobachtet werden, zudem waren diese Zellen, wie auch natürliche Tregs, selbst anerg.

Damit konnte in der hier vorgestellten Arbeit nachgewiesen werden, dass sich regulatorische T-Zellen aus peripheren T-Zellen induzieren lassen, welche eine gute immunregulatorische Funktion zeigen und sich von natürlichen Tregs nicht unterscheiden lassen. Möglicherweise stellen in der Zukunft diese induzierten Tregs eine spezialisierte Behandlungsoption bei therapieresistentem Verlauf der JIA dar. Dafür muss allerdings eine ausreichende Blockade der hemmenden Faktoren in den Gelenken erfolgen, da diese auch induzierte Tregs in ihrer Funktion einschränken.

Das Zytokin TGF β 1 zeigt einen entscheidenden Einfluss auf die immunregulatorischen Eigenschaften von natürlichen und induzierten Tregs. Die entsprechenden Tregs könnten durch veränderte Proteine in der Signalkaskade von TGF β 1 nicht mehr oder nur eingeschränkt auf den immunregulatorischen Einfluss ansprechen. Um die mRNA Expression der Proteine der Signalkaskade untersuchen zu können, wurde das Verfahren der quantitativen Realtime-PCR etabliert. Dabei kann auf die Menge an mRNA eines Zielgens in den Zellen rückgeschlossen werden. Für die relative Quantifizierung der Expression der einzelnen Botenstoffe in der Signalkaskade sollte ein internes Referenzgen gefunden werden. Wichtig hierbei ist, dass das

Referenzgen stabil exprimiert wird. Wir konnten zeigen, dass sich GAPDH, ein häufig verwendetes Referenzgen, für diese Fragestellung nicht eignet, da in den einzelnen Zellreihen eine variable Expression des Gens beobachtet werden konnte. Wir testeten 11 unterschiedliche Referenzgene und konnten für das β 2-Mikroglobulin und die β -Glucuronidase eine ausreichend stabile Expression nachweisen. Um möglichst verlässliche Ergebnisse zu erhalten, sollte bei der relativen Quantifizierung die Menge des Zielgens auf mindestens zwei Referenzgene bezogen werden. Somit eignen sich diese beiden Referenzgene für die Analysen mit der quantitativen Realtime-PCR. In zukünftigen Untersuchungen soll dieses Verfahren angewandt werden, um mögliche Störungen in der TGF β 1 Signalkaskade näher untersuchen zu können.

Zusammenfassend tragen die Ergebnisse dieser Dissertation dazu bei, die Funktion und die Beteiligung der Tregs an der JIA, sowie den Einfluss von TGF β 1 auf Tregs besser zu verstehen. Zudem konnten Tregs aus einer nicht Treg-Population generiert werden, welche sich von den natürlichen Tregs nicht unterscheiden lassen. In der Synovialflüssigkeit konnten lokale Faktoren die wichtige Funktion der Tregs hemmen und somit ein Fortbestehen der Inflammation fördern. Die Ergebnisse dieser Arbeit ermöglichen die Entwicklung neuer Behandlungsstrategien bei der JIA, beispielsweise auf Ebene einer lokalen Blockade dieser lokalen Faktoren oder der Induktion von Tregs in den betroffenen Gelenken.

8 Literaturverzeichnis

Reference List

1. Takeda,K. & Akira,S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol.* **17**, 1-14 (2005).
2. Hamilos,D.L. Antigen presenting cells. *Immunol. Res.* **8**, 98-117 (1989).
3. Janeway CA Jr,T.P. Immuno biology. *New York. : Garland. Science* (2001).
4. Campanelli,R. *et al.* Human CD8 co-receptor is strictly involved in MHC-peptide tetramer-TCR binding and T cell activation. *Int. Immunol.* **14**, 39-44 (2002).
5. Neumann,J. Immunbiologie, Eine Einführung. 2008. , *Immunologie. , Eine. Einführung. , ISBN. 978. -3-540. -72568. -8. 3-540.*
6. Milojevic,D., Nguyen,K.D., Wara,D. & Mellins,E.D. Regulatory T cells and their role in rheumatic diseases: a potential target for novel therapeutic development. *Pediatr Rheumatol Online. J.* **6:20.**, 20 (2008).
7. Sakaguchi,S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell.* **101**, 455-458 (2000).
8. Leipe,J., Skapenko,A., Lipsky,P.E. & Schulze-Koops,H. Regulatory T cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* **7**, 93 (2005).
9. Kappler,J.W., Roehm,N. & Marrack,P. T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell.* **49**, 273-280 (1987).
10. Kisielow,P., Bluthmann,H., Staerz,U.D., Steinmetz,M. & von Boehmer,H. Tolerance in T-cell-receptor transgenic mice involves deletion of nonmature CD4+8+ thymocytes. *Nature.* **333**, 742-746 (1988).
11. Anderson,M.S. *et al.* Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science.* **298**, 1395-1401 (2002).
12. Villoslada,P. *et al.* Frequency, heterogeneity and encephalitogenicity of T cells specific for myelin oligodendrocyte glycoprotein in naive outbred primates. *Eur J Immunol.* **31**, 2942-2950 (2001).
13. Tiller,T. *et al.* Autoreactivity in human IgG+ memory B cells. *Immunity.* **26**, 205-213 (2007).
14. Koelsch,K. *et al.* Mature B cells class switched to IgD are autoreactive in healthy individuals. *J Clin Invest.* **117**, 1558-1565 (2007).
15. Lohse,A.W., Dinkelman,M., Kimmig,M., Herkel,J. & Meyer zum Buschenfelde,K.H. Estimation of the frequency of self-reactive T cells in health and inflammatory diseases by limiting dilution analysis and single cell cloning. *J Autoimmun.* **9**, 667-675 (1996).

16. Ota, K. *et al.* T-cell recognition of an immunodominant myelin basic protein epitope in multiple sclerosis. *Nature*. **346**, 183-187 (1990).
17. Takahashi, T. *et al.* Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol*. **10**, 1969-1980 (1998).
18. Anderton, S.M. & Wraith, D.C. Selection and fine-tuning of the autoimmune T-cell repertoire. *Nat. Rev. Immunol*. **2**, 487-498 (2002).
19. Itoh, M. *et al.* Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J Immunol*. **162**, 5317-5326 (1999).
20. Ng, W.F. *et al.* Human CD4(+)CD25(+) cells: a naturally occurring population of regulatory T cells. *Blood*. **98**, 2736-2744 (2001).
21. Taams, L.S. *et al.* Human anergic/suppressive CD4(+)CD25(+) T cells: a highly differentiated and apoptosis-prone population. *Eur J Immunol*. **31**, 1122-1131 (2001).
22. Fantini, M.C. *et al.* Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *J Immunol*. **172**, 5149-5153 (2004).
23. Chen, W. *et al.* Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med*. **198**, 1875-1886 (2003).
24. Peng, Y., Laouar, Y., Li, M.O., Green, E.A. & Flavell, R.A. TGF-beta regulates in vivo expansion of Foxp3-expressing CD4+CD25+ regulatory T cells responsible for protection against diabetes. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* **101**, 4572-4577 (2004).
25. Zheng, S.G., Wang, J.H., Gray, J.D., Soucier, H. & Horwitz, D.A. 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*. **172**, 5213-5221 (2004).
26. Baecher-Allan, C., Brown, J.A., Freeman, G.J. & Hafler, D.A. CD4+CD25high Regulatory Cells in Human Peripheral Blood. *J Immunol* **167**, 1245-1253 (2001).
27. Allsopp, R.C. *et al.* Telomere shortening is associated with cell division in vitro and in vivo. *Exp Cell Res*. **220**, 194-200 (1995).
28. Pan, C., Xue, B.H., Ellis, T.M., Peace, D.J. & Diaz, M.O. Changes in telomerase activity and telomere length during human T lymphocyte senescence. *Exp Cell Res*. **231**, 346-353 (1997).
29. Weiner, H.L. Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells. *Microbes Infect*. **3**, 947-954 (2001).

30. Yamagiwa,S., Gray,J.D., Hashimoto,S. & Horwitz,D.A. A role for TGF-beta in the generation and expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells from human peripheral blood. *J Immunol.* **166**, 7282-7289 (2001).
31. Wei,C.M. *et al.* Frequency and phenotypic analysis of CD4+CD25+ regulatory T cells in children with juvenile idiopathic arthritis. *J Microbiol. Immunol Infect.* **41**, 78-87 (2008).
32. Wing,K. *et al.* CD4+ CD25+ FOXP3+ regulatory T cells from human thymus and cord blood suppress antigen-specific T cell responses. *Immunology.* **115**, 516-525 (2005).
33. Zhang,B. *et al.* Clinical significance of increased CD4+CD25-Foxp3+ T cells in patients with new-onset systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* **67**, 1037-1040 (2008).
34. Liu,W. *et al.* CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med.* **203**, 1701-1711 (2006).
35. Anderson,A.E. & Isaacs,J.D. Tregs and rheumatoid arthritis. *Acta Reumatol. Port.* **33**, 17-33 (2008).
36. Walker,M.R. *et al.* Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25- T cells. *J Clin Invest.* **112**, 1437-1443 (2003).
37. Selvaraj,R.K. & Geiger,T.L. A kinetic and dynamic analysis of Foxp3 induced in T cells by TGF-beta. *J Immunol.* **179**, 11 (2007).
38. Allan,S.E. *et al.* The role of 2 FOXP3 isoforms in the generation of human CD4+ Tregs. *J Clin Invest.* **115**, 3276-3284 (2005).
39. Gavin,M.A. *et al.* Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* **103**, 6659-6664 (2006).
40. Wang,J., Ioan-Facsinay,A., van der Voort,E.I., Huizinga,T.W. & Toes,R.E. Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells. *Eur J Immunol.* **37**, 129-138 (2007).
41. Ocklenburg,F. Bedeutung des Transkriptionsfaktors FoxP3 für die T-Zell-Funktion. *Dissertation.*
42. Sakaguchi,S. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol.* **22:531-62.**, 531-562 (2004).
43. Read,S., Malmstrom,V. & Powrie,F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med.* **192**, 295-302 (2000).

44. Magistrelli, G. *et al.* A soluble form of CTLA-4 generated by alternative splicing is expressed by nonstimulated human T cells. *Eur J Immunol.* **29**, 3596-3602 (1999).
45. Rao, S. *et al.* Targeted delivery of anti-CTLA-4 antibody downregulates T cell function in vitro and in vivo. *Clin Immunol.* **101**, 136-145 (2001).
46. Carreno, B.M. *et al.* CTLA-4 (CD152) can inhibit T cell activation by two different mechanisms depending on its level of cell surface expression. *J Immunol.* **165**, 1352-1356 (2000).
47. Birebent, B. *et al.* Suppressive properties of human CD4+CD25+ regulatory T cells are dependent on CTLA-4 expression. *Eur J Immunol.* **34**, 3485-3496 (2004).
48. Zheng, Y. *et al.* Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells. *Nature.* **445**, 936-940 (2007).
49. Marson, A. *et al.* Foxp3 occupancy and regulation of key target genes during T-cell stimulation. *Nature.* **445**, 931-935 (2007).
50. Bennett, C.L. *et al.* The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat. Genet.* **27**, 20-21 (2001).
51. Carlsson, P. & Mahlapuu, M. Forkhead transcription factors: key players in development and metabolism. *Dev. Biol.* **250**, 1-23 (2002).
52. Bennett, C.L. *et al.* The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat. Genet.* **27**, 20-21 (2001).
53. Wahn, U. Pädiatrische Allergologie und Immunologie. *Urban. und Fischer.*
54. Wu, Y. *et al.* FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell.* **126**, 375-387 (2006).
55. Chen, C., Rowell, E.A., Thomas, R.M., Hancock, W.W. & Wells, A.D. Transcriptional regulation by Foxp3 is associated with direct promoter occupancy and modulation of histone acetylation. *J Biol Chem.* **281**, 36828-36834 (2006).
56. Yagi, H. *et al.* Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int. Immunol.* **16**, 1643-1656 (2004).
57. Sakaguchi, S. The origin of FOXP3-expressing CD4+ regulatory T cells: thymus or periphery. *J Clin Invest.* **112**, 1310-1312 (2003).
58. Hori, S., Nomura, T. & Sakaguchi, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science.* **299**, 1057-1061 (2003).

59. Fontenot, J.D., Gavin, M.A. & Rudensky, A.Y. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol.* **4**, 330-336 (2003).
60. Seddiki, N. *et al.* Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med.* **203**, 1693-1700 (2006).
61. Boettler, T. *et al.* Expression of the interleukin-7 receptor alpha chain (CD127) on virus-specific CD8⁺ T cells identifies functionally and phenotypically defined memory T cells during acute resolving hepatitis B virus infection. *J Virol.* **80**, 3532-3540 (2006).
62. Bommireddy, R. *et al.* TGF beta 1 inhibits Ca²⁺-calcineurin-mediated activation in thymocytes. *J Immunol.* **170**, 3645-3652 (2003).
63. Derynck, R., Zhang, Y. & Feng, X.H. Smads: transcriptional activators of TGF-beta responses. *Cell.* **95**, 737-740 (1998).
64. Gorelik, L., Constant, S. & Flavell, R.A. Mechanism of transforming growth factor beta-induced inhibition of T helper type 1 differentiation. *J Exp Med.* **195**, 1499-1505 (2002).
65. Gorelik, L., Fields, P.E. & Flavell, R.A. Cutting edge: TGF-beta inhibits Th type 2 development through inhibition of GATA-3 expression. *J Immunol.* **165**, 4773-4777 (2000).
66. Gorelik, L. & Flavell, R.A. Transforming growth factor-beta in T-cell biology. *Nat Rev Immunol.* **2**, 46-53 (2002).
67. Massague, J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem.* **67**:753-91., 753-791 (1998).
68. Govinden, R. & Bhoola, K.D. Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor-beta. *Pharmacol. Ther.* **98**, 257-265 (2003).
69. Zheng, S.G., Wang, J., Wang, P., Gray, J.D. & Horwitz, D.A. IL-2 is essential for TGF-beta to convert naive CD4⁺CD25⁻ cells to CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells and for expansion of these cells. *J Immunol.* **178**, 2018-2027 (2007).
70. Wan, Y.Y. & Flavell, R.A. Identifying Foxp3-expressing suppressor T cells with a bicistronic reporter. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* **102**, 5126-5131 (2005).
71. Davidson, T.S., DiPaolo, R.J., Andersson, J. & Shevach, E.M. Cutting Edge: IL-2 is essential for TGF-beta-mediated induction of Foxp3⁺ T regulatory cells. *J Immunol.* **178**, 4022-4026 (2007).
72. Marie, J.C., Letterio, J.J., Gavin, M. & Rudensky, A.Y. TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *J Exp Med.* **201**, 1061-1067 (2005).

73. Heath,V.L., Murphy,E.E., Crain,C., Tomlinson,M.G. & O'Garra,A. TGF-beta1 down-regulates Th2 development and results in decreased IL-4-induced STAT6 activation and GATA-3 expression. *Eur J Immunol.* **30**, 2639-2649 (2000).
74. Bluestone,J.A. & Abbas,A.K. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol.* **3**, 253-257 (2003).
75. Gregg,R. *et al.* The number of human peripheral blood CD4+ CD25high regulatory T cells increases with age. *Clin Exp Immunol.* **140**, 540-546 (2005).
76. Morgan,M.E. *et al.* Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4+CD25+ T regulatory cells in humans. *Hum. Immunol.* **66**, 13-20 (2005).
77. Allan,S.E. *et al.* Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *Int Immunol.* **19**, 345-354 (2007).
78. Zheng,S.G., Gray,J.D., Ohtsuka,K., Yamagiwa,S. & Horwitz,D.A. Generation ex vivo of TGF-beta-producing regulatory T cells from CD4+CD25- precursors. *J Immunol.* **169**, 4183-4189 (2002).
79. Liang,S. *et al.* Conversion of CD4+ CD25- cells into CD4+ CD25+ regulatory T cells in vivo requires B7 costimulation, but not the thymus. *J Exp Med.* **201**, 127-137 (2005).
80. Salomon,B. *et al.* B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity.* **12**, 431-440 (2000).
81. Tang,Q. *et al.* Cutting edge: CD28 controls peripheral homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol.* **171**, 3348-3352 (2003).
82. Lohr,J., Knoechel,B., Jiang,S., Sharpe,A.H. & Abbas,A.K. The inhibitory function of B7 costimulators in T cell responses to foreign and self-antigens. *Nat Immunol.* **4**, 664-669 (2003).
83. Howland,K.C., Ausubel,L.J., London,C.A. & Abbas,A.K. The roles of CD28 and CD40 ligand in T cell activation and tolerance. *J Immunol.* **164**, 4465-4470 (2000).
84. Tran,D.Q., Ramsey,H. & Shevach,E.M. Induction of FOXP3 expression in naive human CD4+FOXP3 T cells by T-cell receptor stimulation is transforming growth factor- β dependent but does not confer a regulatory phenotype. *Blood* **110**, 2983-2990 (2007).
85. Zheng,S.G. *et al.* TGF-beta requires CTLA-4 early after T cell activation to induce FoxP3 and generate adaptive CD4+CD25+ regulatory cells. *J Immunol.* **176**, 3321-3329 (2006).
86. Zheng,S.G. The Critical Role of TGF-beta1 in the Development of Induced Foxp3+ Regulatory T Cells. *Int J Clin Exp Med.* **1**, 192-202 (2008).

87. Fox, B.C., Bignone, P.A., Brown, P.J. & Banham, A.H. Defense of the clone: antibody 259D effectively labels human FOXP3 in a variety of applications. *Blood* **111**, 3897-389a (2008).
88. Cederbom, L., Hall, H. & Ivars, F. CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *Eur J Immunol.* **30**, 1538-1543 (2000).
89. Mahnke, K. *et al.* Induction of immunosuppressive functions of dendritic cells in vivo by CD4+CD25+ regulatory T cells: role of B7-H3 expression and antigen presentation. *Eur J Immunol.* **37**, 2117-2126 (2007).
90. Min, W.P. *et al.* Inhibitory feedback loop between tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells in transplant tolerance. *J Immunol.* **170**, 1304-1312 (2003).
91. Minden, K. & Niewerth, M. Klinische Formen der juvenilen idiopathischen Arthritis und ihre Klassifikation. *Z. Rheumatol.* 100-110 (2008).
92. Ravelli, A. & Martini, A. Juvenile idiopathic arthritis. *Lancet.* **369**, 767-778 (2007).
93. Petty, R.E. *et al.* International League of Associations for Rheumatology classification of juvenile idiopathic arthritis: second revision, Edmonton, 2001. *J Rheumatol.* **31**, 390-392 (2004).
94. Hellemans, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F. & Vandesompele, J. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol.* **8**, R19 (2007).
95. de Kleer, I.M. *et al.* CD4+CD25bright regulatory T cells actively regulate inflammation in the joints of patients with the remitting form of juvenile idiopathic arthritis. *J Immunol.* **172**, 6435-6443 (2004).
96. van Amelsfort, J.M., Jacobs, K.M., Bijlsma, J.W., Lafeber, F.P. & Taams, L.S. CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in rheumatoid arthritis: differences in the presence, phenotype, and function between peripheral blood and synovial fluid. *Arthritis Rheum.* **50**, 2775-2785 (2004).
97. Bluestone, J.A. Regulatory T-cell therapy: is it ready for the clinic? *Nat Rev Immunol* **5**, 343-349 (2005).
98. Chai, J.G. *et al.* In Vitro Expansion Improves In Vivo Regulation by CD4+CD25+ Regulatory T Cells. *J Immunol* **180**, 858-869 (2008).
99. Hoffmann, P., Eder, R., Kunz-Schughart, L.A., Andreesen, R. & Edinger, M. Large-scale in vitro expansion of polyclonal human CD4+CD25high regulatory T cells. *Blood* **104**, 895-903 (2004).
100. Tang, Q. *et al.* In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes. *J. Exp. Med.* **199**, 1455-1465 (2004).
101. Taq Man Endogenous Control Plate.

102. de Kleer, I.M. *et al.* CD4+CD25^{bright} regulatory T cells actively regulate inflammation in the joints of patients with the remitting form of juvenile idiopathic arthritis. *J Immunol.* **172**, 6435-6443 (2004).
103. Thornton, A.M. & Shevach, E.M. CD4+CD25⁺ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med.* **188**, 287-296 (1998).
104. Yagi, H. *et al.* Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4⁺ regulatory T cells. *Int. Immunol.* **16**, 1643-1656 (2004).
105. Haufe, S. *et al.* Impaired suppression of synovial fluid CD4+CD25⁻ T cells from patients with juvenile idiopathic arthritis by CD4+CD25⁺ Treg cells. *Arthritis Rheum.* **63**, 3153-3162 (2011).
106. Ruprecht, C.R. *et al.* Coexpression of CD25 and CD27 identifies FoxP3⁺ regulatory T cells in inflamed synovia. *J Exp Med.* **201**, 1793-1803 (2005).
107. Pasare, C. & Medzhitov, R. Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25⁺ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science.* **299**, 1033-1036 (2003).
108. Kutukculer, N., Caglayan, S. & Aydogdu, F. Study of pro-inflammatory (TNF- α , IL-1 α , IL-6) and T-cell-derived (IL-2, IL-4) cytokines in plasma and synovial fluid of patients with juvenile chronic arthritis: correlations with clinical and laboratory parameters. *Clin. Rheumatol.* **17**, 288-292 (1998).
109. van Amelsfort, J.M. *et al.* Proinflammatory mediator-induced reversal of CD4⁺, CD25⁺ regulatory T cell-mediated suppression in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **56**, 732-742 (2007).
110. Bayry, J., Siberil, S., Triebel, F., Tough, D.F. & Kaveri, S.V. Rescuing CD4+CD25⁺ regulatory T-cell functions in rheumatoid arthritis by cytokine-targeted monoclonal antibody therapy. *Drug Discov. Today.* **12**, 548-552 (2007).
111. Nadkarni, S., Mauri, C. & Ehrenstein, M.R. Anti-TNF- α therapy induces a distinct regulatory T cell population in patients with rheumatoid arthritis via TGF- β . *J. Exp. Med.* **204**, 33-39 (2007).
112. Roncador, G. *et al.* Analysis of FOXP3 protein expression in human CD4+CD25⁺ regulatory T cells at the single-cell level. *Eur J Immunol.* **35**, 1681-1691 (2005).

9 Erklärung zum Eigenanteil

Ich erkläre hiermit, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen zur Promotion eingereichte Arbeit mit dem Titel

**Die Rolle regulatorischer T-Zellen und der Einfluss von TGFβ1
bei der juvenilen idiopathischen Arthritis**

selbständig ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Unterstützungsleistungen:

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen der Arbeitsgruppe von PD Dr. med. U. Holzer, Kinderklinik Tübingen erhalten. Frau PD Dr. med. U. Holzer, sowie Dr. rer. nat. M. Haug waren an der Konzeption der Studie beteiligt, haben die Arbeit betreut und das Manuskript kontrolliert. Die Versuche wurden bis auf Unterstützung in der Planung und Besprechung der Ergebnisse selbstständig durchgeführt und ausgewertet. Die Rekrutierung der Patienten und Entnahme der Proben wurden durch die Abteilung der Kinderreumatologie Tübingen durchgeführt.

10 Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle mich bei denen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Dissertation besonders unterstützt haben.

Ganz besonderer Dank gebührt Frau PD Dr. med. Ursula Holzer und Dr. med. rer. nat. Markus Haug ohne die die Durchführung der Studie nicht möglich gewesen wäre, sie brachten mir viel Geduld entgegen, standen mir immer mit wertvollen Ratschlägen zur Seite und hatten stets ein offenes Ohr. Auch gilt mein Dank dem gesamten Team der Arbeitsgruppe von PD Dr. med. Ursula Holzer, für deren Unterstützung und die tolle und kollegiale Atmosphäre und ganz besonders hier auch Dr. med. rer. nat. Markus Haug für die persönlichen Gespräche und besondere Unterstützung.

Ich möchte mich ganz besonders bei meiner Familie und Pleasure bedanken, ohne die mein Studium und die Durchführung der Dissertation nicht möglich gewesen wäre, die mich auch in den teilweise zähen und langwierigen Zeiten aufgemuntert und unterstützt haben. Und ich möchte mich bei meinen Freunden für die ermunternden Worte bedanken.

11 Abstract

Die Rolle regulatorischer T-Zellen und der Einfluß von TGFβ1 bei der juvenilen idiopathischen Arthritis

Die juvenile idiopathische Arthritis (JIA) ist die häufigste rheumatische Erkrankung des Kindes- und Jugendalter und stellt bezüglich dem Verlauf und der Prognose eine heterogene Gruppe dar, von Spontanremissionen ohne Folgeschäden bis zur starken Gelenkdestruktion mit erheblichen Einschränkungen als Folge. Die Erkrankung zählt zu den T-zellvermittelten Erkrankungen. Bei der Eindämmung von autoaggressiven Reaktionen und für das immunologische Gleichgewicht sind außerdem regulatorische T-Zellen (Tregs) von entscheidender Bedeutung. Bei dieser Dissertationsarbeit stehen regulatorischen T-Zellen und deren immunologische Zusammenhänge bei der JIA im Vordergrund. Regulatorischen T-Zellen sollten zunächst aus Blut und der Synovialflüssigkeit charakterisiert und isoliert werden, um einen möglichen quantitativen Mangel oder eine nicht ausreichende Funktionalität in den Gelenken zu untersuchen. Zudem sollte überprüft werden ob es möglich ist, aus einer nonTreg Population funktionale Tregs zu generieren. Das Zytokin TGFβ1 hat einen wichtigen Einfluss auf die Generation von Tregs, was im Rahmen dieser Arbeit im Zusammenhang mit JIA überprüft werden sollte. In den durchgeführten Versuchen konnte anhand von durchflusszytometrischer Messungen der Marker CD4, CD25 und FoxP3 oder CTLA4 nachgewiesen werden, dass sich in der Synovialflüssigkeit von JIA-Patienten vermehrt regulatorische T-Zellen nachweisen lassen. Betrachtet man deren Funktion, so zeigen diese eine konzentrationsabhängige immunsuppressive Funktion und sind in der Lage die Proliferation von Responderzellen zu hemmen. Diesen Funktionsanalysen wurde zellfreie Synovialflüssigkeit zugeführt. Dadurch konnte die Annahme bestätigt werden, dass sich in den Gelenken Faktoren befinden, die die Funktion der Tregs hemmen. Die Differenzierung dieser Faktoren ist Gegenstand weiterer Untersuchungen. Um die Generierung von Tregs aus einer nonTreg Population zu untersuchen, wurden unterschiedliche Kulturbedingungen überprüft. CD4⁺CD25⁻ Zellen wurde mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörper sowie IL-2 und TGFβ1 stimuliert. Dabei konnten Zellen induziert werden, welche den Tregs phänotypisch entsprechen, auch iTregs genannt. Das Zytokin TGFβ1 führte bei diesen Versuchen zu einer gesteigerten Expression von FoxP3, einem spezifischen Marker für Tregs. Diese induzierten Tregs zeigten in den Funktionsanalysen selbst einen anergen Phänotyp, wie es für Tregs charakteristisch ist, sowie eine immunregulatorische Funktion gegenüber Responderzellen. Auch diese iTregs wurden durch Faktoren im zellfreien Teil der Synovialflüssigkeit gehemmt.

Es bestätigte sich, dass das Zytokin TGFβ1 einen wichtigen Einfluss auf die Expression von phänotypischen Merkmalen der Tregs und deren Funktion hat. Um die Signalkaskade dieses Peptids und eventuelle Störungen untersuchen zu können, wurde das Verfahren der quantitativen RealtimePCR etabliert.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sich in den Gelenken von JIA Patienten ausreichend funktionsfähige Tregs nachweisen lassen, die allerdings die Inflammation nicht ausreichend regulieren, so dass es zum Fortbestehen der Inflammation kommt. Hierfür werden lokale Faktoren verantwortlich gemacht, die im Rahmen dieser Dissertation im zellfreien Anteil der SF sich nachgewiesen wurden.

Zudem konnte gezeigt werden, dass es möglich ist Tregs aus einer Population zu generieren, welche zuvor keine Treg Eigenschaften zeigte. Diese induzierten Tregs waren in vitro in der Lage immunregulierend zu wirken, wurden allerdings ebenfalls durch Faktoren im zellfreien Anteil der SF gehemmt. Die Analyse dieser Faktoren ist Gegenstand weiterer Untersuchungen und deren Blockade könnte in der Behandlung der JIA einen wichtigen Faktor darstellen.