

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Immunologie
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Johannes Roth-

**Einfluss der Überexpression von CREM α auf
die T-Zellphysiologie *in vitro* und *in vivo***

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor rerum medicinalium
der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Lippe, Ralph Martin
aus Saarbrücken

2011

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Wilhelm Schmitz
1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Johannes Roth
2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Klaus Tenbrock
Tag der mündlichen Prüfung: 17.03.2011

Aus dem Universitätsklinikum Münster

Institut für Immunologie

-Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Johannes Roth-

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Johannes Roth

Koreferent: Priv.-Doz. Dr. med. Klaus Tenbrock

ZUSAMMENFASSUNG

Einfluss der Überexpression von CREM α auf die T-Zellphysiologie

in vitro und *in vivo*

Ralph Martin Lippe

Interleukin 17 produzierende T-Zellen repräsentieren einen eigenen T-Zell Subtyp, der sowohl bei der antimikrobiellen Abwehr als auch bei Autoimmunerkrankungen beteiligt ist. Der systemische Lupus Erythematoses (SLE) ist der Prototyp einer Autoimmunerkrankung, bei der eine durch Autoantikörper vermittelte Komplementaktivierung stattfindet. Die Autoantikörperbildung ist Folge einer polyklonalen B-Zellaktivierung. Bei dieser B-Zellaktivierung spielen T-Zellen eine wichtige Rolle.

SLE T-Zellen können gekennzeichnet sein durch eine verminderte Produktion von IL-2, während die Expression von IL-17 und IL-21 erhöht ist. Der cAMP response element modulator alpha (CREM α) stellt eine mögliche Verbindung zwischen dieser gegensätzlichen Interleukinproduktion dar. Um den Einfluss von CREM α auf die T-Zell-Physiologie *in vivo* zu untersuchen, wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit eine transgene Maus generiert, die CREM α spezifisch in T-Zellen überexprimiert. Wie erwartet zeichnete sich diese Maus durch eine verminderte IL-2 Produktion, eine verminderte Expression der CD3 ζ Kette sowie eine verminderte T-Zellproliferation *in vitro* aus.

Bei der durch DNFB ausgelösten Kontaktallergie (Aktenzeichen der Tierversuchsgenehmigung: 8.87-50.10.36.08.001) zeigten die CREM α -transgenen Mäuse allerdings überraschenderweise eine verstärkte Ohrschwellung, die durch eine vermehrte Expression von IL-17 ausgelöst wurde. Die IL-17 Expression war getriggert durch eine gesteigerte Expression von IL-21, während die bisher bekannten Mechanismen die zu einer Induktion von Th17-Zellen führen, IL-6, ROR- γ t, ROR- α und AhR hingegen nicht in der initialen Entstehung der Immundysregulation involviert waren. Durch eine funktionelle Blockade von IL-21 durch IL-21RFc konnte die IL-17 Expression in den T-Zellen der CREM α -transgenen Mäuse wieder normalisiert werden.

Dies repräsentiert einen neuen, bisher nicht bekannten Mechanismus bei der Entstehung von TH17-Zellen mit möglichen Folgen für die CREM α vermittelte Autoimmunität. Zudem entsprechen die CREM α -transgenen T-Zellen in weiten Teilen der Pathophysiologie von SLE T-Zellen. Auch diese sind gekennzeichnet durch eine verminderte CD3 ζ Ketten-Expression, ein verstärktes Kalziumsignal, eine verminderte IL-2-Expression und eine gesteigerte Produktion von IL-17 und CREM α .

Tag der mündlichen Prüfung: 17.03.2011

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Systemischer Lupus erythematoses (SLE)	1
1.2.	Das Immunsystem	6
1.2.1.	Das angeborene Immunsystem	6
1.2.2.	Das adaptive Immunsystem	7
1.3.	T-Helfer-Zellen	9
1.3.1.	Th1/Th2-Zellen	11
1.3.2.	Th17-Zellen	13
1.3.3.	Regulatorische T-Zellen	15
1.4.	Abnorme Immunantwort und -regulation bei Patienten mit SLE	16
1.5.	Die Rolle von Th17-Zellen bei Autoimmunerkrankungen	21
1.5.1.	Die Rolle von Th17-Zellen bei Rheumatoider Arthritis	21
1.5.2.	Die Rolle von Th17-Zellen bei Systemischem Lupus erythematoses	22
2.	FRAGESTELLUNG	24
3.	MATERIALIEN	25
3.1.	Verbrauchsmaterial	25
3.2.	Chemikalien, Seren, Zellkulturmedien und Puffer	25
3.2.1.	Chemikalien und Seren	25
3.2.2.	Zellkulturmedien	27
3.2.3.	Puffer und Lösungen	29
3.3.	Enzyme	31
3.4.	Mikrobiologische Kits	31
3.5.	Antikörper	32
3.6.	Primer	32
3.6.1.	CREM α -Klonierungsprimer	32
3.6.2.	CREM α -Genotypisierungsprimer	32
3.6.3.	RT-Primer	33
3.7.	Versuchstiere	33
3.8.	Geräte	34

4. METHODEN	36
4.1. Generierung und Charakterisierung der T-Zell-spezifischen CREMα-transgenen Maus	36
4.1.1. Amplifikation des CREM α -Gens	36
4.1.2. Klonierung des CREM α -Gens hinter den CD2-Promotor	37
4.1.3. Transformation des CREM α CD2-Vektors in E coli	38
4.1.4. Isolierung des CREM α CD2-Vektors aus E coli	39
4.1.5. Sequenzierung von DNA Sequenzen	39
4.1.6. Generierung der CREM α -transgenen Maus	39
4.1.7. Entwicklung der Genotypisierungs-PCR	40
4.2. Zellbiologische Versuche	41
4.2.1. Milz- und Lymphknotenzellpräparation	41
4.2.2. Bestimmung der Zellzahl	41
4.2.3. T-Zell Isolierung	42
4.2.4. Gewinnung von DCs	42
4.2.5. T-Zell-Stimulation	43
4.2.6. T-Zell-Proliferations-Assay	43
4.2.7. IL-2 Cytometric Bead Array (CBA)	44
4.2.8. Phänotypische Charakterisierung der T-Zellen	45
4.2.9. FACS-Analysen	46
4.2.10. Intrazelluläre Kalziummessung	47
4.3. Molekularbiologische Methoden	48
4.3.1. RNA-Isolierung aus T-Zellen	48
4.3.2. RNA-Isolierung aus Gewebe	48
4.3.3. cDNA-Synthese	49
4.3.4. Real Time Polymerase Kettenreaktion (qT-PCR)	49
4.3.5. Chromatin-Immuno-Präzipitation (ChIP)	50
4.4. Methoden zur Analyse von Proteinen	52
4.4.1. Herstellung von Kernextrakten	52
4.4.2. Bestimmung der Protein-Konzentration	52
4.4.3. Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) und Western-Blot	53
4.5. Kontaktallergie	54

4.6.	Histologie	54
5.	ERGEBNISSE	55
5.1.	Transgenes Mausmodell mit CREMα-Überexpression	55
5.1.1.	Generierung einer CREM α Überexpression unter Kontrolle des hCD2-Promoters	55
5.1.2.	Pronukleusinjektion	57
5.1.3.	Wurfzahlanalyse mittels Genotypisierungs-PCR	57
5.1.4.	CREM α -Expression in transgenen Mäusen	58
5.2.	T-Zell-Proliferation der CREMα-CD2 Mäuse	60
5.2.1.	CREM α hemmt die IL-2 Expression in vivo	61
5.2.2.	Die Hemmung der IL-2 Expression vermindert die T-Zell Proliferation	63
5.3.	CREMα-CD2 Mäuse entwickeln eine verstärkte Kontaktallergie	65
5.3.1.	CREM α -CD2 Mäuse zeigen eine gesteigerte T-Zell-Proliferation von aktivierten T-Zellen	67
5.3.2.	IL-2-Produktion in den regionalen Lymphknoten	69
5.3.3.	Der Einfluss von regulatorischen T-Zellen auf die gesteigerte Kontaktallergie	70
5.4.	Vermehrte Produktion von IL-17 in CREMα-transgenen Mäusen	71
5.4.1.	Induktion der IL-17 Produktion durch die Stimulation mit anti-CD3 / anti-CD28 Antikörper	75
5.5.	IL-21 verstärkt die IL-17 Produktion in CREMα-CD2 Mäusen	77
5.5.1.	Die Inaktivierung von IL-21 führt zu einer Reduktion der IL-17 Expression bei CREM α -transgenen Mäusen	77
5.5.2.	CREM α -transgene T-Zellen weisen einen vermehrten Kalziumeinstrom auf	79
5.5.3.	CREM α -transgene T-Zellen zeigen eine verminderte CD3 ζ -Kettenexpression	80
6.	DISKUSSION	82
7.	LITERATURVERZEICHNIS	90
8.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	104
9.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	106

10. DANKSAGUNG	108
11. CURRICULUM VITAE	109
12. ANHANG	I
12.1. Sequenz des amplifizierten CREM α -Gens	I
12.2. Tierversuchsgenehmigung	II

1. Einleitung

1.1. Systemischer Lupus erythematoses (SLE)

Der so genannte systemische Lupus erythematoses (SLE) ist eine „klassische“ Autoimmunerkrankung, die mit einer Vielzahl von Symptomen einhergehen kann, wobei ein Multiorganbefall das klinische Bild prägt. Der Name „Lupus“ (lat. lupus, „der Wolf“) leitet sich von möglichen Verstümmelungen im Gesichtsbereich durch Läsionen ab, die Ärzte lange Zeit mit Wolfsbissen verglichen. Dank moderner Behandlungsmöglichkeiten treten solche Verstümmelungen heute nur noch selten auf. „Erythematoses“ (griech. erythematosus, „errötend“) stammt von den bei dieser Krankheit auftretenden Rötungen. Besonders charakteristisch für den SLE ist das so genannte Schmetterlingserythem.

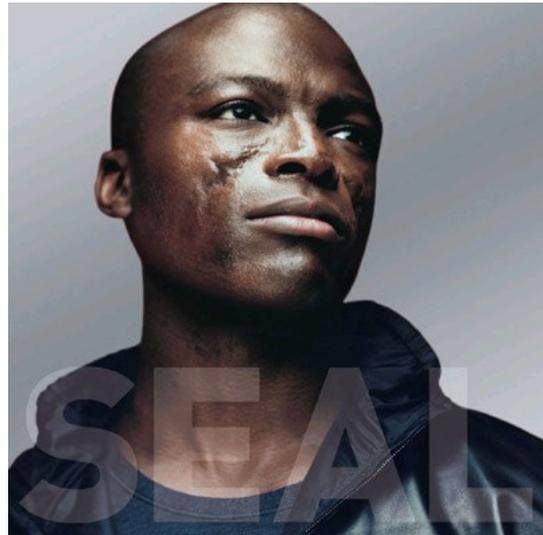


Abbildung 1: Seal

Der Sänger Seal leidet seit seiner Jugend unter Lupus erythematoses, wie die charakteristischen Narben in seinem Gesicht zeigen.

Bildquelle:

<http://www.gofeminin.de/star/bild-746-seal.html>

Bereits im Jahr 1851 wurde SLE von dem franz. Dermatologen Pierre L. Cazenave als Hautkrankheit beschrieben (135). Anfang des 20. Jahrhunderts folgten Beobachtungen erster serologischer Charakteristika im Zusammenhang mit SLE, als ein falsch positives Ergebnis des Wassermann-Syphilis-Tests bei zwei Patienten mit SLE beschrieben wurde (7). Im Jahr 1943 lieferte die Hypergammaglobulinämie, ein weiterer serologischer Befund bei SLE Patienten, die Erklärung für die falsch positiven Ergebnisse des Wassermann-Tests (13).

1957 konnten erstmals bei mehreren SLE-Patienten erhöhte Konzentrationen von dsDNA- und auch ssDNA-Autoantikörpern nachgewiesen werden (11, 59, 99). Neben spezifischen anti-DNA-Autoantikörpern wurden noch weitere SLE-spezifische Autoantikörper isoliert, z. B. gegen das Ribonukleoprotein Sm (116) und das zytoplasmatische RNA Antigen Ro (74). Speziell bei SLE-Patienten, die keine anti-DNA-Antikörper aufwiesen, wie es bei etwa 5% aller Fälle vorkommt, erwiesen sich anti-Ro-Autoantikörper als ein wichtiges diagnostisches Hilfsmittel (28).

Um die Vielzahl an möglichen klinischen Ausprägungen systematisch zu erfassen wurde vom American College of Rheumatology (ACR) 1971 ein Katalog mit diagnostischen Kriterien erstellt, der zur Klassifizierung von SLE-Fällen dienen sollte. Diese 14 vorläufigen Kriterien wurden nach eingehender Überprüfung nochmals revidiert und stellen mit einigen Änderungen die aktuell gültigen Klassifikationskriterien für SLE Patienten in klinischen Studien dar. Von den 11 nach der letzten Überarbeitung noch gültigen Kriterien, die klinische, immunologische sowie serologische Aspekte umfassen, müssen mindestens vier erfüllt sein, damit eine Erkrankung als SLE klassifiziert werden kann (115).

SLE ist eine relativ häufig vorkommende Autoimmunerkrankung. In verschiedenen Studien variieren allerdings die Zahlen über die Prävalenz der Erkrankung. Dies scheint an den unterschiedlichen Zusammensetzungen der beobachteten Kohorten zu liegen. Die beobachtete Prävalenz von SLE reicht von 14 Fällen pro 100.000 Personen in einer Kohorte, die hauptsächlich aus Nordamerikanern mit europäischer Abstammung bestand (109), bis zu 50 SLE Fällen pro 100.000 Personen in einer Studienpopulation, die zu einem großen Teil aus Nordamerikanern mit afrikanischer Abstammung bestand (27). Alle Studien kamen jedoch zu dem Ergebnis, dass Frauen mit einem Verhältnis von 8:1 signifikant häufiger betroffen sind als Männer (27).

Kriterium	Definition
Schmetterlingserythem	lokalisiertes Erythem im Wangenbereich, flach oder erhaben
Diskoide Erytheme	Erythematöse erhabene Hautflecken mit keratotischer Schuppung und möglicher Vernarbung
Photosensitivität	Hautrötung in Folge von UV-Bestrahlung
Schleimhautläsionen	Orale oder nasopharyngale Läsionen, meist schmerzlos
Arthritis	nicht erosive Arthritis an mindestens 2 peripheren Gelenken
Serositis	Rippenfell- oder Herzbeutelentzündung (Pleuritis oder Perikarditis)
Nierenbeteiligung	anhaltende Proteinurie (>0,5 g/d) oder zelluläre Zylinder
Neurologische Symptome	Anfallsleiden oder Psychosen oder andere Ursachen
Hämatologische Befunde	hämolytische Anämie, Leukozytopenie (<4000/ μ l), Lymphozytopenie (<1500/ μ l) oder Thrombozytopenie (<100000/ μ l) ohne medikamentöse Ursachen
Immunologische Befunde	Anti ds DNA, Anti SM oder anti Phospholipid-antikörper
ANA-Antikörper	pathologisch erhöhte ANA-Titer im direkten Fluoreszenztest oder einem äquivalenten Test, nicht medikamentös induziert

Tabelle 1: Klassifikationskriterien für SLE-Patienten

Zum Zweck klinischer Studien wird ein Patient als SLE-Patient definiert, wenn 4 der 11 diagnostischen Kriterien simultan oder sequenziell im Beobachtungszeitraum zutreffen. (115)

Für die noch unklare Ätiologie des SLE werden derzeit Mechanismen diskutiert, bei denen Wechselwirkungen zwischen genetischen Komponenten und Umweltfaktoren zu einer gestörten Immunregulation und schließlich zur Manifestation der Krankheit führen. Zu den externen Faktoren zählen Stress, UV-Strahlung und Infektionen, die alle eine gesteigerte Apoptose und Freisetzung von Antigenen zur Folge haben können. Es konnte aber bisher noch kein spezifischer pathogener Erreger gesichert mit SLE in Verbindung gebracht werden. Es gibt jedoch Hinweise auf einen Zusammenhang mit EBV (Epstein-Barr-Virus) bei der Immunpathogenese des SLE, die sich in einer ungewöhnlichen Immunantwort gegen dieses Virus äußert und deshalb als

potentieller Auslöser der veränderten Autoimmunität bei Patienten mit SLE diskutiert wird (38). Hinweise auf eine genetische Prädisposition ergeben sich primär aus der Beobachtung von Familien von SLE-Patienten. Die Ergebnisse zeigten eine familiäre Häufung bei Verwandten ersten Grades (44). In späteren Genanalysen konnten verschiedenen Varianten bestimmter Suszeptibilitätsgene, zu denen mitunter der hoch polymorphe MHC-II Locus und Gene der FcY-Rezeptoren sowie des Komplementsystems zählen, nachgewiesen werden (40, 41, 110). Es wird jedoch vermutet, dass nicht ein einzelnes Gen für die Krankheitsentstehung verantwortlich ist, sondern die Kombination aus mindestens vier Suszeptibilitätsgenen die Krankheitsentwicklung entscheidend beeinflusst (102).

Darüber hinaus gibt es auch eine medikamentös induzierte Form des SLE, die als medikamenteninduzierter Lupus bezeichnet wird und nach Absetzen der entsprechenden Arzneimittel meist reversibel ist

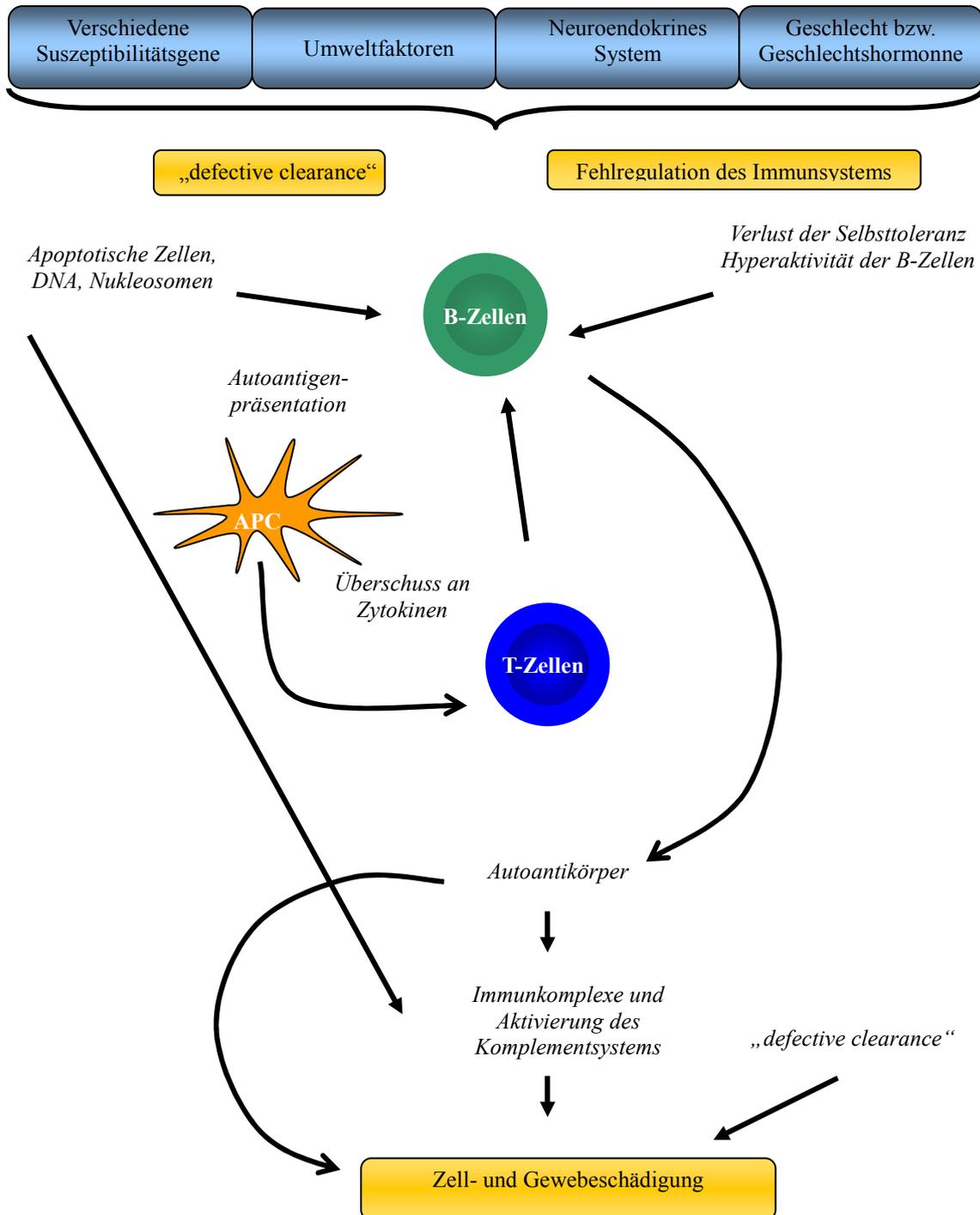


Abbildung 2: Schematische Darstellung der zur Pathogenese des SLE beitragen Faktoren
 Bei der Ätiologie von SLE scheint eine Wechselwirkung verschiedener Faktoren von entscheidender Rolle zu sein (81).

1.2. Das Immunsystem

Der Begriff Immunität leitet sich von dem lateinischen Wort immunis (= frei, unberührt) ab. Die Hauptfunktion des Immunsystems komplexer mehrzelliger Organismen besteht in der Abwehr eindringender Mikroorganismen und Fremdstoffen, aber auch in der Beseitigung geschädigter körpereigener Zellen. Dazu hat das Immunsystem die Fähigkeit erworben, „körpereigene“ und „körperfremde“ Moleküle voneinander zu unterscheiden. Die Zellen des Immunsystems befinden sich hauptsächlich in den lymphatischen Organen, zu denen das Knochenmark, der Thymus, die Milz und die Lymphknoten zählen.

Das Immunsystem gliedert sich in zwei synergetisch wirkende Mechanismen: die angeborene unspezifische Immunabwehr und die adaptive oder spezifische Abwehr. Beide lassen sich zudem in den zellulären und den humoralen Anteil des Immunsystems aufteilen.

1.2.1. Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem ist die erste Verteidigungslinie gegen pathogene Erreger. Der Körper wird durch Epithelien geschützt, welche eine physische Barriere für eindringende Erreger darstellen. Zusätzlich werden eindringende Mikroorganismen durch chemische Mittel wie zum Beispiel einen niedrigen pH-Wert im Magen und Lysozym in der Tränenflüssigkeit oder im Speichel wirksam bekämpft.

Mikroorganismen oder Toxine, die erfolgreich diese Barriere überwinden und in den Körper eindringen, aktivieren zuerst das angeborene Immunsystem. Hier sind neben Entzündungsreaktionen vor allem zelluläre Bestandteile, die sich aus natürlichen Killerzellen, Granulozyten, Epithelzellen, Makrophagen und dendritischen Zellen (DC) zusammensetzen, wobei letztere den Übergang zum erworbenen Immunsystem darstellen, Bestandteil der angeborenen Immunantwort (51). Sie bieten zusammen mit löslichen Faktoren und

Defensinen, sowie dem Komplementsystem einen zusätzlichen Schutz. Des Weiteren spielt das angeborene Immunsystem eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von Effektorzellen des erworbenen Immunsystems (78). Um dies zu ermöglichen, finden sich auf Oberflächen von Zellen des angeborenen Immunsystems eine Reihe von Rezeptoren, die so genannten „pattern recognition receptors“ (PRR), welche in der Lage sind, „pathogen-associated molecular pattern“ (PAMPs), bakterielle Bestandteile wie z.B. Lipopolysaccharide (LPS) oder CpG (Cytosin Guanosin) DNA zu erkennen (51). Diese PRRs liegen in unterschiedlichen Formen vor. Sie sind entweder auf der Zelloberfläche oder in intrazellulären Kompartimenten zu finden, oder kommen sekretiert in Blut oder Gewebeflüssigkeit vor. Zu diesen Rezeptoren zählen unter anderem der Makrophagen-Mannose-Rezeptor (MMR) sowie die Rezeptoren der Toll-like-Familie (TLR) (51). Mit Hilfe dieser Rezeptoren ist das angeborene Immunsystem in der Lage, sehr früh eingedrungene Pathogene zu erkennen und spezifische Abwehrmechanismen zu aktivieren.

Es wird angenommen, dass ca. 90 Prozent aller Infektionen durch die angeborene Immunabwehr erkannt und erfolgreich bekämpft werden. Viele Erreger haben allerdings Strategien zur Umgehung der angeborenen Abwehr entwickelt und machen eine flexiblere Antwort und ein „immunologisches Gedächtnis“ notwendig. Das „immunologische Gedächtnis“ besteht aus Körperabwehrzellen und Antikörpern des adaptiven Immunsystems, die bereits erfolgreich eine Infektion abgewehrt haben. Sie verweilen oft noch jahrelang im Organismus um bei Reinfektion mit demselben oder einem ähnlichen Pathogen eine schnelle Immunantwort zu gewährleisten.

1.2.2. Das adaptive Immunsystem

Neben Antigen-präsentierenden Zellen (APC) wie dendritischen Zellen, stellen zwei Gruppen von Zellen die wesentlichen Elemente der adaptiven Immunität dar.

Die B-Lymphozyten oder auch B-Zellen, die sich im Knochenmark entwickeln, sind in der Lage, nach Aktivierung Antikörper zu sezernieren (86). Die Spezifität dieser Antikörper entspricht dem auf der Oberfläche der B-Zelle exprimierten B-Zellrezeptors. Antikörper sind Proteine aus der Klasse der Immunglobuline, welche in der Lage sind, spezifische Antigenstrukturen zu erkennen und diese zu binden. Jeder Antikörper besteht aus zwei identischen leichten Ketten und zwei identischen schweren Ketten. Diese beiden Ketten sind durch kovalente Disulfidbrücken zu einer Ypsilon-förmigen Struktur miteinander verknüpft. Am Ende jeder schweren und leichten Kette befinden sich zwei hochvariable Regionen, die die Antigenbindungsstelle bilden. Am anderen Ende der schweren Ketten befindet sich eine Bindungsstelle für Komponenten des Komplementsystems (86). Durch die Antigenbindung kann es zu einer Neutralisierung des Fremdkörpers oder zu einer vermehrten Lyse der Erreger durch das Komplementsystem kommen. Zudem kann die Bindung der Antikörper auf der Oberfläche die Phagozytose der befallenen Zellen fördern (86).

T-Lymphozyten oder auch T-Zellen entwickeln sich im Thymus aus einer dem Knochenmark entspringenden Vorläuferzelle. Sie tragen einen für jede Zelle einzigartigen Oberflächenrezeptor, der in der Lage ist, bestimmte Antigene zu erkennen. Voraussetzung hierfür ist, dass diese Antigene auf MHC-Molekülen präsentiert werden. MHC-Moleküle sind spezialisierte Proteine, die Peptidfragmente auf die Zelloberfläche transportieren und dort präsentieren können (86).

CD4+ T-Zellen tragen den CD4-Rezeptor auf der Oberfläche. Dieses Protein besteht aus vier extrazellulären Immunglobulindomänen und einem zytoplasmatischen Abschnitt. Es trägt wesentlich zur Erkennung des MHC II Antigenkomplexes durch den T-Zellrezeptor bei. CD4+ T-Zellen werden auch als T-Helferzellen bezeichnet, da sie in den weiterführenden Schritten der Immunantwort entscheidende Signale an die dort beteiligten Zellen liefern (s. 2.3).

CD8⁺ T-Zellen werden als zytotoxische T-Zellen bezeichnet. Neben einem antigenspezifischen T-Zellrezeptor tragen sie den CD8-Rezeptor auf der Oberfläche. Sie erkennen Antigene, die von nahezu allen kernhaltigen Zellen auf MHC I Molekülen präsentiert werden. Zellen, die das für sie spezifische Antigen tragen, werden von den zytotoxischen T-Zellen durch Induktion von Apoptose beseitigt (108).

Neben den CD4⁺ und den CD8⁺ T-Zellen gibt es noch eine Reihe weiterer T-Zellen, wie die NK-T-Zellen, die $\gamma\delta$ -Antigenrezeptor-positiven T-Lymphozyten und CD3⁺CD4⁻CD8⁻ doppelt negativen T-Zellen. Bei diesen Zellen ist die genaue Funktion und Spezifität teils noch unbekannt.

1.3. T-Helfer-Zellen

T-Helfer-Zellen (Th-Zellen, CD4⁺ Zellen) stellen die wichtigsten regulatorischen Zellen des Immunsystems dar. Ihre Funktion vermitteln sie über die Sekretion von Zytokinen. Die unterschiedlichen Th-Zellen stammen von denselben Vorläufer- (Precursor-) Zellen ab (138). Dabei handelt es sich um naive, reife Th-Zellen, die nach vollständiger Aktivierung hauptsächlich den autokrinen Wachstumsfaktor IL-2 sezernieren (104). Die dadurch ausgelöste Aktivierung des Zellzyklus ist Voraussetzung für die Fähigkeit der Th-Zellen, ihre Zytokine, wie zum Beispiel Interferon(IFN)- γ und IL-4, zu bilden (8).

Heute unterscheidet man insbesondere vier Arten von Th-Zellen: Th1-, Th2- und Th17-Zellen, sowie regulatorische T-Zellen (s. Abbildung 3).

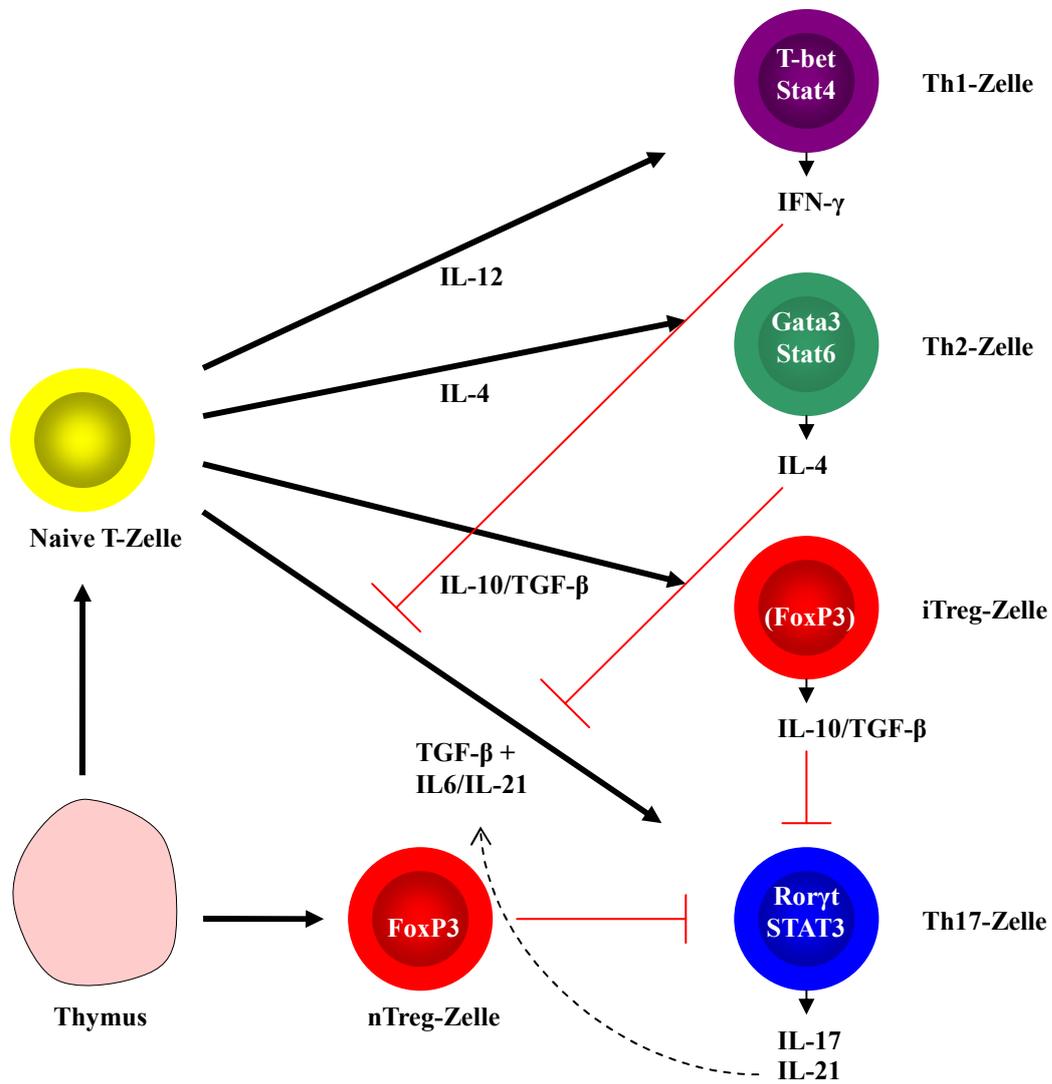


Abbildung 3: Th-Zell-Differenzierung

Alle T-Helferzellen entwickeln sich aus einer naiven T-Zelle in Abhängigkeit von dem vorherrschenden Zytokinmilieu (79).

1.3.1. Th1/Th2-Zellen

Nach dem Zytokinsekretionsmuster der Th-Zellen wurden zunächst zwei verschiedene Th-Subpopulationen beschrieben: Der Th1-Phänotyp ist charakterisiert durch die Produktion von IFN- γ und Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)- β , der Th2- Phänotyp durch Produktion von IL-4, IL-5 und IL-13 (2, 14, 83, 84). Abgesehen von der verschiedenartigen Zytokinsekretion der Th-Zellen wurden bisher nur wenige weitere stabile Differenzierungsmerkmale für Th1- und Th2-Zellen entdeckt.

Ob sich eine naive Vorläufer-Th-Zelle zu einer Th1- oder einer Th2-Zelle differenziert, wird hauptsächlich durch die Anwesenheit von Zytokinen während der Aktivierung der Zelle über den T-Zell-Rezeptor (TCR) bestimmt (87, 92). Naive T-Zellen differenzieren in Gegenwart von IL-4 zu Th2-Zellen, die wiederum IL-4 produzieren. Zudem kann IL-4 die Produktion von IFN- γ hemmen und infolgedessen die Entwicklung von Th1-Zellen inhibieren (105). So wird eine Th2-Antwort gefördert und gleichzeitig die Th1-Antwort unterdrückt. Ein weiteres Zytokin, das eine Th-Differenzierung zu beeinflussen scheint, ist IL-25. IL-25 wird von polarisierenden Th2-Zellen selbst gebildet und scheint eine Th1- und Th17-Differenzierung zu inhibieren (138).

Bei der Th1-Differenzierung spielt IL-12 eine bedeutende Rolle (126). Dieses Zytokin wird dabei vornehmlich von Makrophagen und DCs gebildet und verstärkt unabhängig von der Antigen-Spezifität der Th-Zellen deren IFN- γ Produktion (46). IL-12 hat keinen direkt hemmenden Effekt auf die Th2-Entwicklung, kann jedoch den inhibitorischen Effekt von IL-4 auf die IFN- γ -Produktion reduzieren und so die Induktion des Th1-Phänotypes durch IFN- γ selbst unterstützen (45, 103, 140). Insgesamt scheint allerdings die Bedeutung von IL-12 bei der Th1-Entwicklung weniger eindeutig zu sein, als die von IL-4 bei der Th2-Entwicklung. So konnte zum Beispiel in IL-12-defizienten Mäusen ein Th1-Phänotyp induziert werden (52).

Die unterschiedlichen Zytokinsekretionsmuster der Th1- und Th2-Zellen bedingen die Initiierung zweier unterschiedlicher Formen der Immunantwort. Th1-Zellen sind für die Regulation der zellulären Immunität verantwortlich. Das von ihnen sezernierte IFN- γ aktiviert zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) und stimuliert die antimikrobielle Aktivität von Makrophagen. IFN- γ bewirkt außerdem die Bildung von Immunglobulin (Ig)G2a und IgG3, Antikörper, die für die Opsonierung von Mikroorganismen verantwortlich sind und somit deren Phagozytose fördern. Viele organspezifische Autoimmunerkrankungen, wie primär insulinabhängiger Diabetes mellitus (IDDM) Typ1 und Multiple Sklerose (MS), sowie granulomatöse Erkrankungen wurden lange Zeit mit einer Th1-Antwort assoziiert. So können Mäuse, denen der für die Th1-Differenzierung wesentliche Transkriptionsfaktor T-bet (engl. T box expressed in T-cells) fehlt, eine Reihe muriner Modell-Autoimmunerkrankungen nicht entwickeln (95). Es gibt zudem Hinweise auf eine protektive Rolle einer Th2-Antwort bei diesen Erkrankungen (68).

Th2-Zellen regulieren dagegen die humorale Immunantwort durch die Sekretion von IL-4 und IL-5. Diese Zytokine fördern die Proliferation von B-Zellen und sind essentiell für den Ig-Klassenwechsel (engl. switch) von IgM zu IgG1 (murin) bzw. IgG4 (human) und IgE (IL-4). Über die Induktion der IgE-Produktion und der Aktivierung von Mastzellen und Eosinophilen (IL-5) sind Th2-Zellen an der Genese von Allergien beteiligt (113).

Die Resistenz gegen Mikroorganismen wird einerseits von Eigenschaften des Pathogens, andererseits von genetischen Eigenschaften des Wirtes bestimmt (100). Der Wirtsorganismus muss auf intrazelluläre Pathogene anders reagieren als auf extrazelluläre. Die Bedeutung der verschiedenen Zytokinsekretionsmuster der Th-Phänotypen für eine adäquate Immunabwehr wurde primär in Tiermodellen untersucht. Dabei wurde mehrfach festgestellt, dass die Resistenz gegen bzw. die Anfälligkeit für bestimmte Pathogene mit dem Vorliegen eines bestimmten Th-Phänotyps korreliert (49, 85). Th1-Antworten sind besonders bedeutend bei der Abwehr intrazellulärer Erreger. Als Beispiel sei an dieser Stelle die Infektion mit *Leishmania major* genannt:

BALB/c Mäuse entwickeln während der Infektion aufgrund ihres genetischen Hintergrundes eine Th2-Antwort und sterben, dagegen entwickeln C57BL/6-Mäuse eine protektive Th1-Antwort (45).

1.3.2. Th17-Zellen

Die Einteilung in eine Th1- und eine Th2-Antwort löste sehr viele Fragen im Bereich der Immunologie und förderte insbesondere das Verständnis für Infektionen und Allergien. Trotzdem erklärte dieses Modell nicht alle Beobachtungen. Besonders die Untersuchung von organspezifischen Autoimmunkrankheiten machte den sehr stark vereinfachten Charakter des bisherigen Th1/Th2-Konzeptes deutlich. So zeigten zum Beispiel IFN- γ -KO Mäuse in mehreren Untersuchungen eine gegenüber dem Wildtyp deutlich erhöhte Suszeptibilität für die Entwicklung einer experimentellen Autoimmunenzephalitis (EAE) (35, 134). In Folge weiterer Untersuchungen wurde in murinen Modellen der EAE die übergeordnete Bedeutung von IL-23, einem Heterodimer der IL-12p40-Untereinheit mit der p19-Untereinheit (93), gegenüber IL-12 für die Pathogenese nachgewiesen (19). Im Jahr 2000 wurde nach in vitro-Stimulation naiver Th-Zellen mit Lipopeptiden von *Borrelia burgdorferi* ein Th-Zell-Phänotyp, der nicht IFN- γ oder IL-4 sondern IL-17, TNF- α und G-CSF produzierte, charakterisiert (48). Ein ähnlicher Effekt war dabei auch durch Stimulation mit IL-6 zu beobachten. 2005 konnte gezeigt werden, dass IL-23 die Differenzierung einer IL-17-produzierenden Th-Subpopulation induziert (66). Der passive Transfer von IL-23-stimulierten T-Zellen in Mäusen induzierte zudem ausgeprägte Zeichen einer EAE bei den Tieren, während dieser Effekt beim Transfer von IL-12-stimulierten T-Zellen ausblieb. In der Folge wurden die IL-17 produzierenden Zellen als eigener Th-Phänotyp, so genannte Th17-Zellen, charakterisiert (39).

Diese Th17-Zellen zeichnen sich durch die Expression verschiedener proinflammatorischer Zytokine (IL-17, IL-21 und IL-22) aus. Durch inzwischen

zahlreiche weitere Untersuchungen konnte die Bedeutung des Th17-Phänotyps bei der Genese organspezifischer Autoimmunerkrankungen wie Multipler Sklerose, rheumatoider Arthritis, Systemischer Lupus erythematoses und Morbus Crohn weiter überzeugend untermauert werden (s. 2.4).

Für die Differenzierung naiver T-Zellen zu Th17-Zellen scheint das Zusammenspiel verschiedener Zytokine von Bedeutung zu sein. Für die Induktion einer Differenzierung zu Th17 bei Mäusen scheint eine simultane TGF- β - und IL-6-Wirkung entscheidend zu sein (5, 76, 132). Die Kombination dieser beiden Zytokine führt über einen STAT3 abhängigen Weg zu einer Hochregulation von ROR γ T. Es wurde gezeigt, dass ROR γ T die IL-17-Produktion antreibt (148), während ein Fehlen von ROR γ T zu einer geminderten Th17-Differenzierung führt (50).

Obwohl die Expression von TGF- β und IL-6 die Entstehung von Th17-Zellen aus naiven T-Zellen initiiert, sind weitere Stimuli notwendig um eine reife Th17-Zelle zu erhalten. Ein sehr wichtiger Schritt ist hier die Fähigkeit entstehender Th17-Zellen, IL-21 zu produzieren. IL-21 unterstützt auf autokrine Weise die Entstehung der sich bildenden Th17-Zelle (61, 91). Zudem konnte in verschiedenen Experimenten gezeigt werden, dass IL-21 IL-6 bei der Entstehung von Th17-Zellen ersetzen kann (145).

Beim Menschen hat es den Anschein, als würde IL-6 bei der Differenzierung von Th17-Zellen keine entscheidende Rolle spielen. Vielmehr scheint hier entweder eine Kombination von IL-1 β und IL-23 oder eine Kombination von TGF- β und IL-21 für die Entstehung von Th17-Zellen verantwortlich zu sein (141, 145). Für die Aufrechterhaltung des Th17-Phänotyps ist zudem die Produktion von IL-23 durch DCs wichtig.

1.3.3. Regulatorische T-Zellen

Seit einiger Zeit kennt man eine T-Zell-Subpopulation, deren wichtigste Funktion u.a. darin besteht, Immunreaktionen, die durch autoreaktive T-Zellen ausgelöst werden, zu limitieren. Man bezeichnet diese Zellpopulation als regulatorische T-Zellen.

Sowohl bei Mäusen als auch bei Ratten und Menschen sind sogenannte natürliche regulatorische T-Zellen (nTreg) als wichtigste Träger dieser Funktion nachgewiesen worden. Dabei handelt es sich um CD4 und CD25-exprimierende Zellen, die außerdem durch die Expression des spezifischen Transkriptionsfaktors FoxP3 gekennzeichnet sind (10, 30). In gesunden Individuen umfassen nTregs etwa 5-10% der peripheren CD4+ T-Zellen (30). Im Unterschied zu konventionellen CD4+ T-Zellen sind nTregs nach TZR Stimulation weder in der Lage autokrin *in vitro* zu proliferieren noch *in vitro* oder *in vivo* IL-2 zu produzieren (107). Allerdings sind sie in der Lage, *in vitro* und *in vivo* die Proliferation und Zytokinproduktion von aktivierten konventionellen CD4+ und CD8+ T-Zellen in einem antigenunabhängigen aber zellkontaktabhängigen Prozess zu inhibieren (96, 125). Ein wesentliches Merkmal der nTreg-vermittelten Suppression scheint die Hemmung der endogenen IL-2 Produktion in den supprimierten T-Zellen zu sein und damit erst sekundär die Inhibition der Proliferation (123, 124).

Neben den natürlichen regulatorischen T-Zellen können auch induzierte CD4+CD25+ regulatorische T-Zellen (iTregs) auf unterschiedliche Weise in der Peripherie aus konventionellen CD4+ T-Zellen entstehen. In Gegenwart des Zytokins Transforming Growth Factor beta (TGF- β) kann in konventionellen CD4+ T-Zellen die Expression von FoxP3 induziert werden. Diese iTregs besitzen wie die nTreg suppressive Eigenschaften (3, 12, 62). In Anwesenheit von IL-6 bei der TGF- β -abhängigen *in vitro* Induktion wird allerdings die Differenzierung zu FoxP3+ T-Zellen behindert, und es kommt zur Bildung von Th17-Zellen (5, 132). Die Gegenwart von IL-2 wiederum vereinfacht die Differenzierung zu FoxP3+ T-Zellen, inhibiert aber die Differenzierung zu Th17-

Zellen. Zusätzlich ist der Vitamin A-Metabolit Retinolsäure in der Lage, die IL-6-abhängige Differenzierung zu Th17-Zellen zu hemmen und stattdessen die Differenzierung zu FoxP3+ T-Zellen anzuregen.

Neben den oben erwähnten iTregs gibt es unter den induzierten regulatorischen T-Zellen zusätzlich noch Tr1- (T regulatory type1-) und Th3- (T-Helfer-) Zellen. Beide Zelltypen vermitteln ihre suppressiven Eigenschaften vorwiegend über lösliche Faktoren. Tr1-Zellen, die kein FoxP3 exprimieren, produzieren nach TZR Stimulation primär IL-10. Th3-Zellen, die sowohl FoxP3+ als auch FoxP3-sein können, sind primär charakterisiert durch die Bildung von TGF- β .

1.4. Abnorme Immunantwort und -regulation bei Patienten mit SLE

Bei Patienten mit SLE konnte eine gestörte Phagozytose apoptotischer Zellen beobachtet werden, die auch als „*defective clearance*“ bezeichnet wird und in einer vermehrten Freisetzung von Antigenen resultiert. Darüber hinaus führt bei Patienten mit SLE eine fehlerhafte Immunregulation oftmals zum Verlust der Immuntoleranz und zur Generierung von Autoantikörpern, die meist gegen nukleäre und ribosomale Bestandteile gerichtet sind (26, 114). Dadurch kommt es zur Bildung zirkulierender Immunkomplexe, die sich in verschiedenen Geweben ablagern und unter Umständen eine irreversible Organschädigung verursachen. Außerdem aktivieren sie das Komplementsystem, wodurch chemotaktisch, zytotoxisch und immun-modulatorisch wirksame Substanzen freigesetzt werden. Dies löst eine veränderte zelluläre Immunantwort aus, die sich in einer polyklonalen B-Zellaktivierung und einer Hyperaktivität von T-Zellen äußern kann. Eine Zusammenfassung der Mechanismen, die zur Entstehung und Entwicklung des SLE beitragen, ist in Abbildung 2 wiedergegeben.

Patienten mit SLE zeichnen sich zudem durch eine erhöhte Anzahl von B-Zellen in der Milz und im peripheren Blut aus, was zu einer gesteigerten Antikörperproduktion beiträgt (9, 56). Darüber hinaus erwiesen sich B-Zellen von SLE-Patienten als sensibler für immunstimulatorische Effekte, die durch Zytokine wie IL-6 und IL-10 vermittelt werden (69, 72). Weiterhin zeigen B-Zellen von SLE-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern eine gesteigerte Kalziumantwort nach Ligation des B-Zellrezeptors und eine verstärkte antigenrezeptorvermittelte Tyrosin-Phosphorylierung (71). Diese Mechanismen dürften entscheidend zur polyklonalen Aktivierung und Hyperaktivität der B-Zellen beitragen.

Es konnte gezeigt werden, dass Therapien, die hauptsächlich gegen T-Zellen gerichtet sind, die Krankheitsaktivität des SLE mildern. Daher sind auch T-Zellen entscheidend an der Immunpathogenese des SLE beteiligt. Bei SLE Patienten findet sich ein erhöhter Anteil von Gedächtnis-T-Zellen, während die Zahl der naiven und regulatorischen T-Zellen meist als vermindert beschrieben wurde (118).

Genau wie die B-Zellen zeichnen sich auch die T-Zellen von SLE Patienten zudem durch eine gesteigerte Kalziumantwort nach einer Stimulation über den TCR aus. Verantwortlich für diese überschießende Zellantwort ist ein Defekt der CD3-zeta-Kette (CD3 ζ), die in dem CD3-Komplex vor allem für die intrazelluläre Signaltransduktion verantwortlich ist (130). CD3 ist ein Protein-Komplex, der auf allen T-Zellen exprimiert

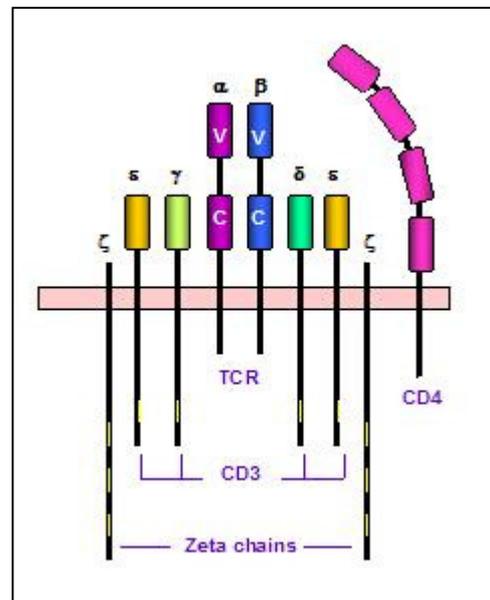


Abbildung 4: Aufbau des CD3-Komplexes

Der CD3 Komplex besteht aus einer CD3-gamma-Kette, einer CD3-delta-Kette, zwei CD3-Epsilon-Ketten und zwei CD3-zeta-Ketten. Zusammen mit dem T-Zell-Rezeptor (TCR) bilden sie den TCR-CD3-Komplex, der zur Aktivierung von T-Lymphozyten dient.

Bildquelle:

http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Datei:TCR_complex.jpg&filetimestamp=20080504111606

wird und aus 4 verschiedenen Proteinketten besteht: einer CD3 γ -Kette, einer CD3 δ -Kette sowie zwei CD3 ϵ -Ketten. Zusammen mit den beiden CD3 ζ -Ketten fungieren sie als Cofaktoren des T-Zell-Rezeptors. Cofaktorproteine zeigen keine Antigen-spezifität, besitzen aber Sequenzen, die man als Tyrosinaktivierungssequenzen von Immunrezeptoren (Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs, ITAMs) bezeichnet. Sobald ein Antigen an den Rezeptor bindet, kommt es zur Ausbildung von Aggregaten (cross-linking), welche die Cofaktoren in die Nähe des Rezeptors bringen. Eine Tyrosinkinase wird aktiviert und phosphoryliert in der Folge die ITAMs der CD3 ζ -Ketten. Als weitere Kinase wird ZAP-70 (ζ -associated protein of 70kd) ebenfalls phosphoryliert, aktiviert und bindet an die phosphorylierten ITAMs. In Folge werden verschiedene Adapterproteine phosphoryliert, welche über unterschiedliche Mediatorsysteme letztendlich entsprechende Signale in den Kern leiten.

Bei Lupuspatienten wird die unzureichend gebildete CD3 ζ vor allem durch die gamma Kette des normalen FC-Rezeptors (FCR γ) ersetzt. Dadurch kommt es zu einer vermehrten Aktivierung der Syk, die etwa 70-mal stärker die nachgeschalteten Adapterproteine aktiviert als ZAP-70 (25, 127). Durch diese veränderte Kalziumantwort von SLE T-Zellen kommt es zu einer vermehrten Translokation des Transkriptionsfaktors NFAT (Nuclear factor of activated T-cells), welches wiederum eine vermehrte Bindung von NFAT an seine Ziel-Promotoren, wie CD154 (CD40L) und IL-2, zur Folge hat (64). Folgerichtig zeigen aktivierte T-Zellen von SLE Patienten eine verstärkte Expression von CD154 (22). Hierdurch kann es nach Kontakt der CD154 exprimierenden T-Zellen mit alterierten Selbstantigenen aus apoptotischen Zellen, die von antigenpräsentierenden Zellen (engl. *antigen presenting cells*, APCs) präsentiert werden, durch Interaktion mit CD40 zu einer verlängerten Stimulation der B-Zellen und somit zur Hypergammaglobulinämie kommen.

Die IL-2 Expression ist dagegen bei SLE Patienten trotz der vermehrten Bindung von NFAT an den IL-2-Promotor nicht erhöht, sondern, ganz im Gegenteil, sogar vermindert (122). Die beiden Transkriptionsregulatoren

CREM α (cAMP response element modulator α) und CREB (c AMP response element-binding) spielen hierbei eine übergeordnete Rolle. Beide binden an die CRE-Bindungsstelle des IL-2 Promoters, wobei die Bindung von CREB die Transkription erhöht und CREM α diese inhibiert. Die im Serum von SLE Patienten enthaltenen anti-CD3/TCR-Autoantikörper aktivieren SLE T-Zellen und führen zu einer Translokation der Kalzium/Calmodulin-abhängigen Kinase IV (CaMKIV) aus dem Zytoplasma in den Zellkern, was zu einer verstärkten Transkription von CREM α führt. Somit kommt es zu einem Ungleichgewicht zwischen den beiden Transkriptionsregulatoren CREM α und CREB. Diese Fehlregulation wurde *in vitro* in direkten Zusammenhang mit der verminderten IL-2 Expression und damit schlechteren Proliferation von SLE T-Zellen gebracht (120).

Die verminderte IL-2 Expression wiederum ist bei SLE Patienten unter anderem für die gestörte Immunantwort und eine erhöhte Infektanfälligkeit verantwortlich. Gleichzeitig führt eine verminderte IL-2 Produktion zu einer verringerten aktivierten Apoptose (activation induced cell death (AICD)) und fördert so die Persistenz autoreaktiver T-Zellen.

Neben IL-2 ist auch die Expression anderer von T-Zellen exprimierter Zytokine wie TNF α , IL-1, IL-6, IL-17, IL-18 und IFN γ fehlreguliert, was möglicherweise entscheidend zur Entstehung von Entzündungsprozessen und zur Gewebeschädigung beiträgt. Hier ist allerdings der Mechanismus noch teilweise unklar.

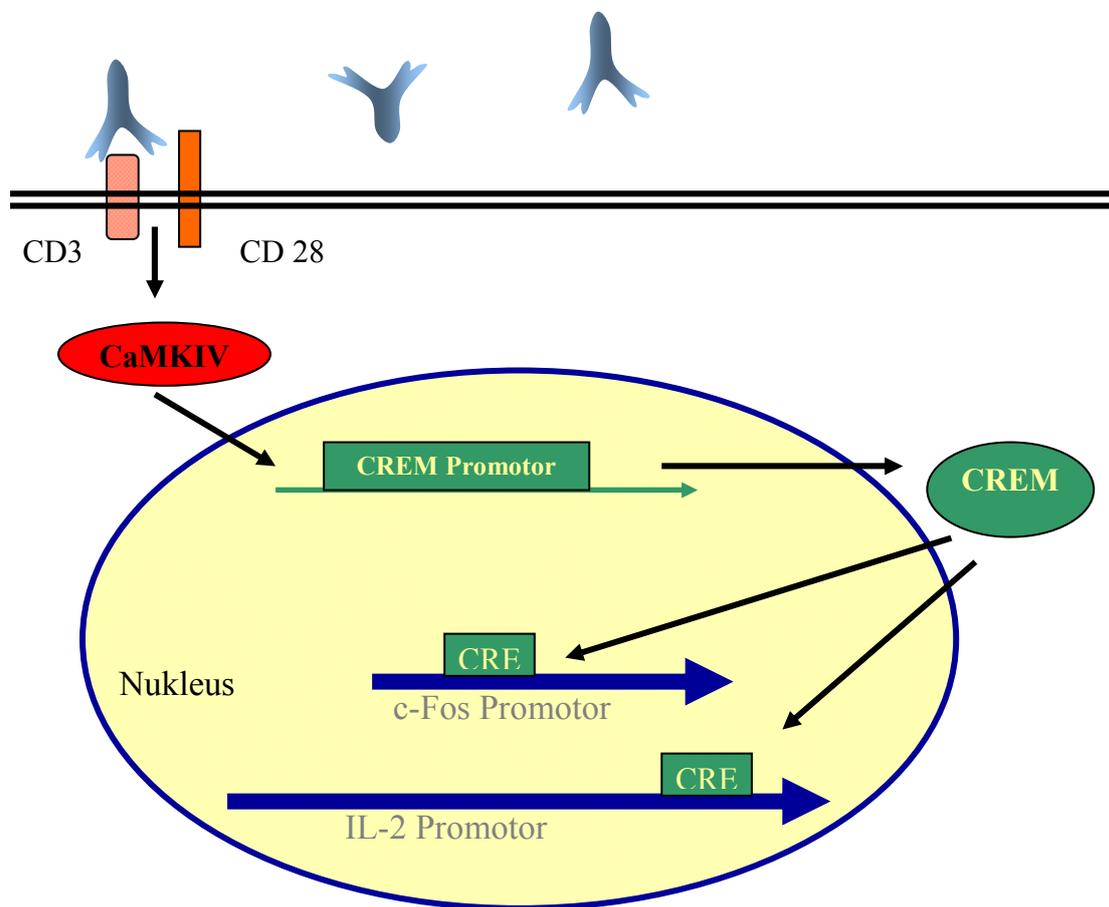


Abbildung 5: Induktion von CREM α in SLE T-Zellen durch Autoantikörper

Die Aktivierung der T-Zellen durch Autoantikörper, führt zu einem vermehrten Kalziumeinstrom, der wiederum die CaMKIV aktiviert, was zu einer verstärkten Transkription von CREM α führt. Durch die Bindung des transkriptionellen Repressors CREM α an der CRE-Bindungsstelle am IL-2- und c-Fos-Promotor wird die Transkription von IL-2 gehemmt (118).

1.5. Die Rolle von Th17-Zellen bei Autoimmunerkrankungen

Neben ihrer Funktion bei der Bekämpfung von Pathogenen (146) scheinen Th17-Zellen von Relevanz für die Entstehung von Autoimmunerkrankungen zu sein. Der IL-23/IL-17-Signalweg ist maßgeblich an der Entwicklung und Aufrechterhaltung chronischer Entzündungen beteiligt. So sind Mäuse, die kein IL-17, IL-23p19 oder IL12/IL23p40 produzieren, resistent gegen die Ausbildung einer EAE, IBD (engl: inflammatory bowel disease, chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen) oder CIA (engl: chronic intermittent asphyxia, chronisch intermittierende Asphyxie) (66, 88, 89). Erstmals konnten Th17-Zellen bei Patienten mit Morbus Crohn isoliert werden. Mittlerweile wurde eine vermehrte Expression von IL-17, IL-23 und anderen mit Th17-Zellen assoziierten Zytokinen, wie IL-21, bei Patienten mit verschiedensten Autoimmunerkrankungen wie Multipler Sklerose, Morbus Crohn, Psoriasis, Rheumatoider Arthritis und SLE nachgewiesen (1, 129, 141, 143). Erste klinische Studien mit einem neutralisierenden Antikörper gegen IL-17 zeigten ebenfalls vielversprechende Ergebnisse bei der Behandlung der Rheumatoiden Arthritis.

1.5.1. Die Rolle von Th17-Zellen bei Rheumatoider Arthritis

Die Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine komplexe entzündliche Autoimmunerkrankung, die bei etwa einem Prozent der westlichen Weltbevölkerung auftritt. Bei der RA ist speziell die Synovialis der Gelenke durch primäre entzündliche Läsionen geschädigt. Diese Läsionen sind durch das Eindringen von Entzündungszellen in das Synovium, sekundäre Degeneration des Knorpels sowie durch Knochenerosionen charakterisiert (29). In letzter Zeit wird unter anderem von Th17-Zellen produziertes IL-17 mit diesen Läsionen assoziiert. IL-17 kann die Expression proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α und IL-1 induzieren und fördert den Knochenabbau (58, 112). Obwohl das primäre Kennzeichen einer RA die Entzündung der Gelenke ist, zeigen RA-Patienten

auch Anzeichen einer systemischen Entzündung, die durch die Bildung von Autoantikörpern, wie dem Rheumafaktor oder Antikörper gegen citrullinierte Peptide/Proteine (ACPAs) charakterisiert ist (82). Im Einklang mit diesen Beobachtungen wurde in verschiedenen Mausmodellen der RA eine erhöhte IL-17-Produktion nachgewiesen (57, 73, 106, 150). Auch in der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten ist der IL-17 Spiegel erhöht, wobei hier in einer Kohortenstudie ein direkter Zusammenhang zwischen der Höhe des IL-17 Levels und der Schwere der Gelenkschädigung gezeigt werden konnte (55).

1.5.2. Die Rolle von Th17-Zellen bei Systemischem Lupus erythematodes

Neben der RA werden Th17-Zellen auch immer mehr mit der Pathogenese von SLE in Verbindung gebracht, nachdem bei SLE-Patienten ebenfalls vermehrte IL-17 Spiegel nachgewiesen werden konnten (53, 63, 142). Interessanterweise zeigen neuere Arbeiten, dass diese gesteigerte IL-17 Produktion sowohl durch CD4+ T-Zellen (Th17-Zellen) als auch durch das vermehrte Vorkommen von CD3+CD4-CD8- doppelt negativen T-Zellen erzeugt wird (16). Gleichzeitig wurden in den Nieren von Patienten mit einer Lupus Nephritis sowohl IL-17 als auch IL-23 nachgewiesen, was vermuten lässt, dass diese Zytokine möglicherweise auch hier eine Rolle spielen (16). Im Einklang mit diesen Beobachtungen zeigen Studien mit SNF1-Mäusen, einem Mausmodell für SLE, eine erhöhte Anzahl von autoreaktiven Th17-Zellen, die die Niere infiltrieren (75). Obwohl die genaue Rolle von IL-17 bei SLE bisher noch nicht geklärt ist, spielt IL-17 bei BXD2-Mäusen, einem Mausstamm, der Lupus-ähnliche Symptome entwickelt, eine entscheidende Rolle bei der Bildung von autoreaktiven Keimzellen. Es wird angenommen, dass dieser Effekt auf eine Colokalisation von Th17-Zellen und IL-17R+ B-Zellen hervorgerufen wird (47). In der Pathophysiologie des SLE wird der Fähigkeit der Th17-Zellen zur Expression von IL-21 eine Schlüsselrolle zugesprochen. Zwar wurde weder bei SNF1- noch bei BXD2-Mäusen direkt die Rolle von IL-21 untersucht, jedoch

zeigen andere Lupus-Mausmodelle wie BXSB-Yaa- oder „sanroque“-Mäuse eine erhöhte IL-21-Expression (94, 133). Zudem verbessern sich die Krankheitssymptome von BXSB-Yaa- und MRL/LPR-Mäusen durch die Blockade des IL-21/IL-21R Synthesewegs (43).

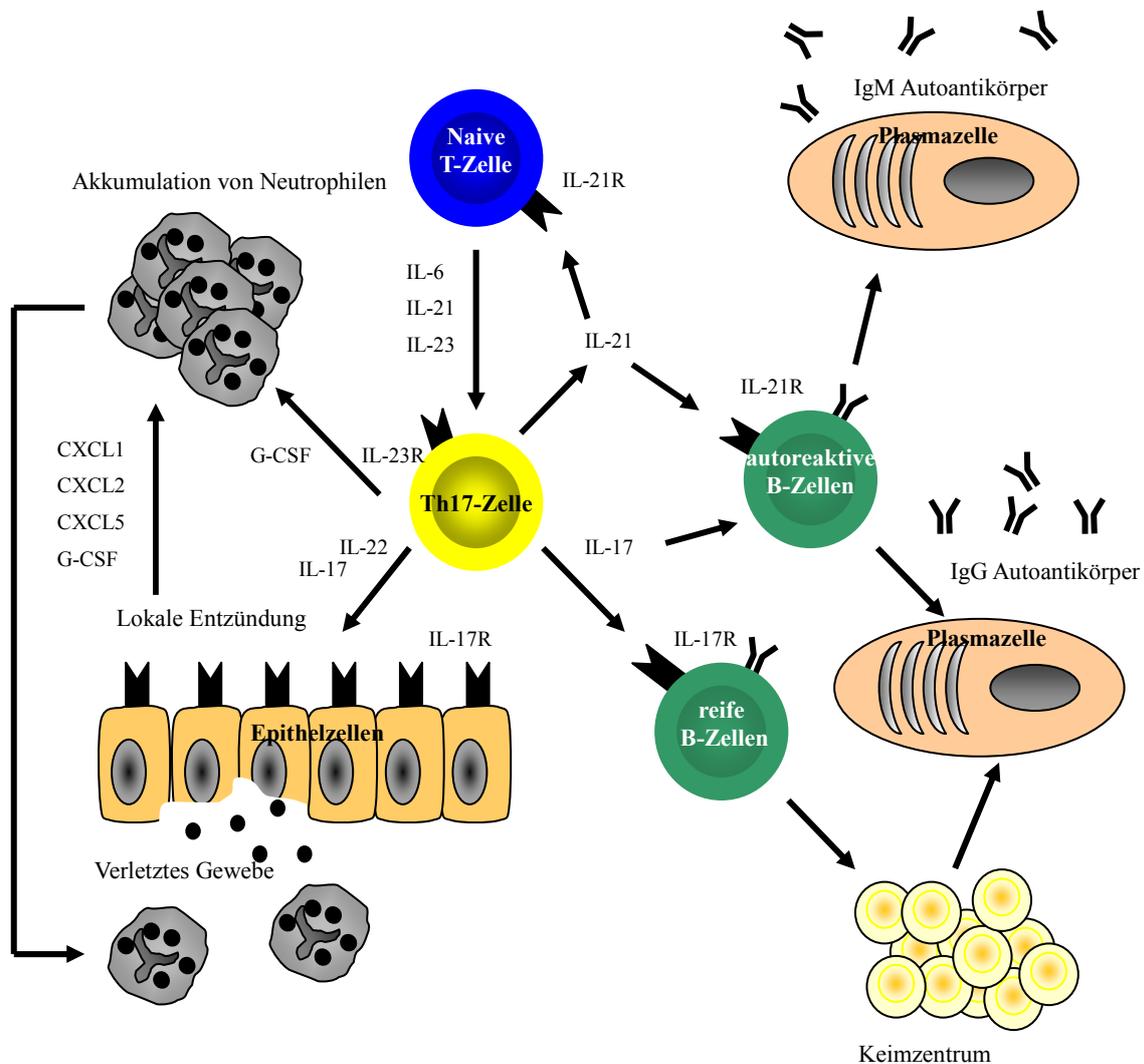


Abbildung 6: Mögliche Rolle von Th17-Zellen bei der Pathogenese von SLE

Die von Th17-Zellen exprimierte Zytokine, IL-17, IL-21, IL-22 und G-CSF, beeinflussen sowohl B-Zellen (Förderung der Bildung von autoreaktiven Keimzentren sowie der Sekretion von Autoantikörpern), als auch andere Zellen des Immunsystems (Förderung von Entzündungsreaktionen, besonders durch die Stimulation von Neutrophilen). Zusammen könnte dies die Ausbildung der Lupuspathogenese fördern (32).

2. Fragestellung

Der Systemische Lupus Erythematoses (SLE) ist der Prototyp einer Autoimmunerkrankung bei der T-Zellen geringere Mengen an IL-2 produzieren, während die Expression von IL-17 und IL-21 erhöht ist. Der transkriptionelle Repressor cAMP response element modulator alpha (CREM α) wurde bereits *in vitro* als Ursache für die verminderte IL-2 Expression in T-Zellen identifiziert. T-Zellen von SLE-Patienten zeichnen sich nach der Aktivierung über den T-Zell-Rezeptor, durch eine gesteigerte Kalziumantwort aus. Hierdurch kommt es über eine vermehrte Aktivierung der CaMKIV zu einer gesteigerten Expression von CREM α .

Um die Auswirkungen einer Überexpression von CREM α *in vivo* zu untersuchen, sollte in dieser Arbeit eine transgene Maus generiert werden, die unter Verwendung des hCD2-Promotors CREM α spezifisch auf T-Zellen überexprimiert. Neben der Bestätigung der *in vitro* Daten zu dem Einfluss von CREM α auf die IL-2 Expression und damit der Proliferation von T-Zellen, sollte auch die Auswirkung auf die Produktion weiterer Zytokine und in einem Kontaktdermatitismodell die Auswirkung der CREM α Überexpression auf das Immunsystem generell *in vivo* untersucht werden, um so den Einfluss von CREM α auf die T-Zellphysiologie zu analysieren.

3. Materialien

3.1. Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial wurde von den Firmen Greiner-Bio-One in Frickenhausen, Eppendorf in Hamburg sowie BD Biosciences in Heidelberg bezogen. Für die Zellkultur wurden Zellkulturflaschen der Firma Nunc aus Wiesbaden verwendet. Herstellerangaben und Bezugsquellen der verwendeten Arbeitsmittel und Reagenzien werden in den folgenden Tabellen erwähnt oder speziell im Text genannt.

3.2. Chemikalien, Seren, Zellkulturmedien und Puffer

3.2.1. Chemikalien und Seren

Bezeichnung	Bezugsquelle
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
4-Dinitro-1-Fluorobenzene (DNFB)	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
5fach-M-MuIV RT-Puffer	MBI Fermentas, St. Leon Rot
Immuno Pure [®] Immobilited Protein A/G Sepharose	Pierce, Rockford, USA
Aceton	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Agarose, Ultra Pure	Gibco BRL Eggenstein
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Amoxicillin	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Bromphenolblau	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Calciumchlorid-Dihydrat	VWR, Darmstadt
Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester (CFSE)	Molecular Probes/Invitrogen, Oregon, USA
Chloroform	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Coomassie Reagenz	Pierce, Rockford, USA
D-Galactopyranoside Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim

Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Digitoxin	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	VWR, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Fermentas, Karlsruhe
dNTPs	Invitrogen, Karlsruhe
EDTA (Tritriplex III)	Merck, Darmstadt
Essigsäureanhydride	Fluka, Seelze
Ethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Ethylenglykol-bis(aminoethylether)- N,N,N'-Tetraessigsäure (EGTA)	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Fluorescent Mounting Medium	Dako, Hamburg
Formaldehyd 37 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Formamid	Merck, Darmstadt
Fura-2/AM	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Gelatine	Merck, Darmstadt
Glucose	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Glutamin	Biochrom, Berlin
Glycergel [®] , Mounting Medium	Dako, Hamburg
Glycin	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
inaktiviertes fötales Kälberserum (iFCS)	Biowest, Nuaille, Frankreich
Ionomycin	Calbiochem, Darmstadt
Isopropanol	Fluka, Seelze
Kaliumchlorid	VWR, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	VWR, Darmstadt
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO_3)	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Lambda DNA/Eco1301 (Styi) Marker	MBI Fermentas, St. Leon Rot
L-Glutamin	Biochrom, Berlin
Library Efficiency [®] DH5 α [™] Competent Cells	Invitrogen, Karlsruhe
Lithiumchlorid (LiCl)	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Luminol	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Magnesiumchlorid	VWR, Darmstadt
Methanol	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
MOPS 3-(N-Morpholino)propanesulfonic acid	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
N,N-Dimethylformamid	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Natrium Chlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natrium Dodecylsulfate (SDS; $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natrium Pyrovat	Biochrom, Berli
Natriumcarbonat (NaCO_3)	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Nicht Essentielle Aminosäuren (100x)	Biochrom, Berlin
Nonidet P 40 (NP 40)	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim

Page Ruler™ Prestained Protein Ladder	MBI Fermentas, St. Leon Rot
Paraformaldehyd	Merk, Darmstadt
pBR322 DNA/AluI Marker	MBI Fermentas, St. Leon Rot
p-Cumarsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Pen/Strep	Biochrom, Berlin
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Phosphate Buffered Saline (PBS)	PromoCell, Heidelberg
Proteinase K	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Roti®-Phenol/Chloroform/Isoamyl Alkohol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Salzsäure (HCL)	VWR, Darmstadt
Triton-X-100	VWR, Darmstadt
Trizma® Base Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
TRIzol® Reagent	Invitrogen, Karlsruhe
Trypanblau	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Tween20	Merk, Darmstadt
β – Mercaptoethanol	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim

3.2.2. Zellkulturmedien

T-Zell-Medium

Substanz	Menge	Bezugsquelle
iFCS	50 ml	Biowest, Nuaille, Frankreich
Glutamin	5 ml	Biochrom, Berlin
Hepes	5 ml	Biochrom, Berlin
Natrium Pyrovat	5 ml	Biochrom, Berlin
Pen/Strep	5 ml	Biochrom, Berlin
NEAA	5 ml	Biochrom, Berlin
β-Mercaptoethanol	3,5 µl	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
RPMI-Medium	ad 500 ml	Biochrom, Berlin

DC-Medium

Substanz	Menge	Bezugsquelle
FCS	25 ml	Biowest, Nuaille, Frankreich
GM-CSF-SN	25 ml	Zellüberstand von GM-CSF produzierenden Zellen
IL4-SN	25 ml	Zellüberstand von IL-4 produzierenden Zellen
Glutamin	5 ml	Biochrom, Berlin
NEAA	5 ml	Biochrom, Berlin
Gentamycin	500 µl	Biochrom, Berlin
β-Mercaptoethanol	3,5 µl	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
RPMI-Medium	ad 500 ml	Biochrom, Berlin

LB-Agar-Kulturplatten

Substanz	Menge	Bezugsquelle
Bacto-Agar	16g	Becton Dickinson, Heidelberg
Bacto-Trypton	10 g	Becton Dickinson, Heidelberg
NaCl	10 g	Merck; Darmstadt
Hefe-Extrakt	5 g	Becton Dickinson, Heidelberg
Amoxicillin	100	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Aqua bidest.	ad 1 l	

3.2.3. Puffer und Lösungen

ChIP-Puffer	
Chip-Dilutions-Buffer 0,01% SDS 1,1 % Triton-X-100 1,2 mM EDTA 16,7 mM Tris pH 8,1 167 mM NaCL	High-salt-Wasch-Puffer 0,1% SDS 1% Triton x-100 2mM EDTA 20mM Tris pH 8,1 NaCL 500mM
Low-salt-Wasch-Puffer 0,1% SDS 1% Triton x-100 2mM EDTA 20 mM Tris pH 8,1 150 mM NaCL	LiCL-Puffer 0,25 M LiCL 1mM EDTA 10mM Tris pH 8,1 1% NP40
SDS-Lysis-Puffer 1% SDS 10mM EDTA 50mM Tris/HCL pH 8,1	TE-Puffer 10mM Tris 1mM EDTA pH 8,0

Kernextraktion	
Lysepuffer A 10 mM HEPES pH 7,9 10 mM KCl 0,1 mM EDTA 0,1 mM EGTA	Lysepuffer B 20 mM HEPES pH 7,9 0,4 mM NaCl 1 mM EDTA 1 mM EGTA 1 mM DTT 1 mM PMSF

PAGE und Western-Blot – Puffer	
Blotpuffer I 36,5 g Tris 200 ml Methanol ad 1000 ml H ₂ O	Blotpuffer II 3,03 g Tris 200 ml Methanol ad 1000 ml H ₂ O
Blotpuffer III 3,03 g Tris 200 ml Methanol 7,5 g Glycin ad 1000 ml H ₂ O	ECL-Lösung 250 mM Lunimol 90 mM p-Cumarsäure 1M Tris pH 8.5 0,1 % H ₂ O ₂ ad 1000 ml H ₂ O
Probenpuffer 5 ml Tris 1M pH 6,8 2 g SDS 5 ml β-Mercaptoethanol 10 ml Glycerin 10 mg Bromphenolblau ad 50 ml H ₂ O	TBST 10 mM Tris pH 8,1 140 mM NaCl 0,1 % Tween20

sonstige Puffer	
HEPES-Tyrode Puffer 129 mM NaCl 8.9 mM NaCO ₃ 2.8 mM KCl 0.8 mM KH ₂ PO ₄ 20 mM Glucose 10 mM HEPES 0.8 mM MgCl ₂	NID-Puffer 50 mM KCl 10 mM Tris/Cl 2 mM MgCl ₂ 0,1 mg/ml Gelatine 0,45 % NP40 0,45 % Tween 20
Erythrolysispuffer 4,15 g NH ₄ Cl 0,5 g KHCO ₃ 1,85 mg EDTA ad 500 ml H ₂ O	Tris-Buffered Saline Tween-20 (TBST) 8.8 g of NaCl 0.2g of KCl 3g of Tris 500 µl Tween 20 ad 1 l H ₂ O

3.3. Enzyme

Alle Enzyme wurden entsprechend der Herstellerangaben und mit den mitgelieferten Puffern eingesetzt.

Enzym	Bezugsquelle
Proteinase K	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
RNAseA	Merck, Darmstadt
EcoRI	MBI Fermentas, St. Leon Rot
Sna BI	MBI Fermentas, St. Leon Rot
T4 – Ligase	MBI Fermentas, St. Leon Rot
DNAse I	Qiagen, Hilden
Pfu Taq DNA Polymerase	Promega GmbH, Mannheim
GoTaq [®] DNA Polymerase	Promega GmbH, Mannheim
RevertAid [™] H Minus M-MuLV Reverse Transkriptase	MBI Fermentas, St. Leon Rot

Für die Real-Time-PCR wurde der Absolute[™] qPCR SYBR Green[®] Mix mit der darin enthaltenen Thermo-Start[®] DNA Polymerase der Firma ABgene verwendet.

3.4. Mikrobiologische Kits

Kitbezeichnung	Bezugsquelle
BD [™] Cytotfix/Cytoperm Plus Kit (with BD GolgiStop)	BD Biosciences, Heidelberg
BD [™] Cytometric Bead Array (CBA) Mouse IL-2 Flex Set [®]	BD Biosciences, Heidelberg
JETQUICK Gel Extraction Spin Kit [®]	Genomed, Löhne
JETQUICK PCR Product Purification Spin Kit [®]	Genomed, Löhne
JETSTAR Plasmid Purification Kit [®] – Maxi	Genomed, Löhne
JETSTAR Plasmid Purification Kit [®] - Mini	Genomed, Löhne
Mini Quick Spin Columns [®]	Roche, Mannheim
Pan T Cell Isolation Kit [®]	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
QIAshredder [®] -Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy [®] Micro Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy [®] Mini Kit	Qiagen, Hilden

3.5. Antikörper

Antikörper	Bezugsquelle
Alexa Fluor [®] 488 Rat anti-Mouse IL-17	BD Biosciences, Heidelberg
PE Rat anti-Mouse CD4	BD Biosciences, Heidelberg
APC Rat anti-Mouse CD8	BD Biosciences, Heidelberg
CD3- ζ (G3): sc-59012	Santa Cruz, Kalifornien, USA
CREM (C-12): sc-34024	Santa Cruz, Kalifornien, USA
Actin (NH3): sc-58679	Santa Cruz, Kalifornien, USA
PE Hamster anti-Goat CD3	BD Biosciences, Heidelberg
anti-CD3-Antikörper	BD Biosciences, Heidelberg
anti-CD28-Antikörper	BD Biosciences, Heidelberg
IL-21 RFc	Wyeth Pharma, Madison, USA
Fitc Rat anti-Mouse FoxP3	NatuTec GmbH, Frankfurt

3.6. Primer

Alle verwendeten Primer wurden mit Hilfe der Primer Express Software erstellt und ihre Synthese bei der Firma Biozym Hess (Oldendorf) in Auftrag gegeben.

3.6.1. CREM α -Klonierungsprimer

Schnittstelle	Sequenz
EcoRI F	5'-ATG GAA TTC ATG ACC ATG GAA ACA GTT GA-3'
SnaBI R	5'-GCA TCA GCT ACG TAC TAA TCT GTT TTG G-3'

3.6.2. CREM α -Genotypisierungsprimer

Sequenz
5'-GCA GGC GAT GCA GCA TCC CAT AAT GG-3'
5'-CCT CTA CCA TTC TTG CAA TCA C-3'

3.6.3. RT-Primer

Oligonukleotid	Sequenz
AhR F AhR R	5'-AAG GAT GTG GTG CTG GAT CTG TT-3' 5'-AGAGCACAGGTTGAGAAACACTTC-3'
CREM α F CREM α R	5'- AAC TGT CCT CTG ATG TGC CTG G-3' 5'-TTG CCC CGT GCT AGT CTG ATA T-3'
GAPDH F GAPDH R	5'-GCAAATTTTC CATGGCACCGT-3' 5'-GCCCCACTTGATTTTGGAGG-3'
IL-2 F IL-2 R	5'-GAC CTC TGC GGC ATG TTC TG-3' 5'-TCA TCG AAT TGG CAC TCA AAT G-3'
IL-2 Promotor F IL-2 Promotor R	5'-AAG TGT GGG CTA ACC GCA CC-3' 5'-TCT CTG GAA TTT CTT TAA ACC CCC-3'
IL-6 F IL-6 R	5'-TGA GAT CTA CTC GGC AAA CCT AGT G-3' 5'-CTT CGT AGA GAA CAA CAT AAG TCA GAT ACC-3'
IL-17a F IL-17a R	5'-AGC TGG ACC ACC ACA TGA ATT C-3' 5'-CCA CAC CCA CCA GCA TCT TC-3'
IL-17f F IL-17f R	5'-CTC TGT GTG AAG CCC GAT CTC-3' 5'-TGA GCA CAG AGA GCT TCA AGA CTG-3'
ROR α T F ROR α T R	5'-GAA CCA CCG ACA ACT GGA ATT C-3' 5'-ATG GAG TCG CAC AAT GTC TGG-3'
ROR γ T F ROR γ T R	5'-CTC TGC AAG ACT CAC GAC AAG G-3' 5'-GTG CTG GAA GAT CTG CAG CTT T-3')
RPL F RPL R	5'-TGG TCC CTG CTC TCA AG-3' 5'-GGC CTT TTC CTT CCG TTT CTC-3'
TGF- β F TGF- β R	5'-GGA CCC TGC CCC TAT ATT TGG-3' 5'-TGT TGC AGG TCAT TTA ACC AAG TG-3'
TNF- α F TNF- α R	5'-AGA AAC ACA AGA TGC TGG GAC AGT-3' 5'-CCT TTG CAG AAC TCA GGA ATG G-3'

3.7. Versuchstiere

Die Kontaktallergie wurde entsprechend der gesetzlichen Bestimmungen von der Bezirksregierung Münster (Aktenzeichen 8.87-50.10.36.08.001) genehmigt. Als Versuchstiere wurden 8-12 Wochen alte CREM α -transgene FVB/N- und wildtype FVB/N-Mäuse verwendet. Die Versuchstiere wurden in Makrolonkäfigen (Typ III) im Zentraltierstall des Instituts für Immunologie bei einer Raumtemperatur von +20 °C, relativer Luftfeuchtigkeit von 55 % \pm 5 %, einem Tag-Nacht-Rhythmus von 12 Std. durch Kunstlicht bei 300 Lux gehalten.

Entkeimtes Trinkwasser aus Flaschen, sowie pelletiertes Futter stand den Mäusen ad libitum zur Verfügung.

Insgesamt wurden für die Kontaktallergie 10 CREM α -transgene und 10 Wildtyp-Mäuse verwendet. Des Weiteren wurden CREM α -transgene und Wildtyp-Mäuse für die Gewinnung von T-Zellen verwendet.

Die für die T-Zell-Stimulation verwendeten DCs stammten von Balb/c- und C57BL/6-Mäusen.

3.8. Geräte

Bezeichnung	Bezugsquelle
BioRad Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad, München
Fluoreszenzmikroskop, HBO50	Axioskop Zeiss, Jena
FluoroMax-2	ISA, USA
Frigocut 2800	Reichert Jung, Depew, USA
FACS Calibur	BD Biosciences, Heidelberg
Gefriercontainer, Qualifreeze	Nalgene Nunc International, Hamburg
Gelelektrophoresekammer	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Heizblock, Thermomixer 5436	Eppendorf AG, Hamburg
Inkubator, CO ₂ - Inkubator 55/55k	Mytron, Heiligenstadt
Lichtmikroskop, Telaval 31	Zeiss, Jena
Meßschieber	Wiha, Schonach
Mikrowaage Precisa 600 C	Oerlikon AG, Zürich
Multimage Light Cabinet	Alpha Innotech, San Leandro, USA
Nanodrop ND-100 Spectrophotometer	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
PCR Lightcycler, Mastercycler Gradient	Eppendorf AG, Hamburg
pH-Meter, Digital-pH-Meter CG 820	Schott GmbH, Hofheim
Pipetten, versch. Größen, Research [®] pro	Eppendorf AG, Hamburg
Power Pac 300	Bio-Rad, München
RealTime-PCR cycler, ABI prism 7900 HT- Sequence Detection System	Applied Biosystems, Weiterstadt
Schüttelinkubator, Innova 4230	New Brunswick Scientific, USA
Sonifier 250	Branson, USA
Steril Bank, LaminAir [®] HLB 2448 GS	Heraeus, Hanau

Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg
Trockenschrank Serie ED	Binder, Tuttlingen
Vortexgerät	Bender und Hoben AG, Zürich
Zählkammer nach Neubauer	Brand, Wertheim
Zentrifuge	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge, 4-15	Sigma, Osterode

4. Methoden

4.1. Generierung und Charakterisierung der T-Zell-spezifischen CREM α -transgenen Maus

4.1.1. Amplifikation des CREM α -Gens

Der erste Schritt der Klonierung bestand in der Amplifizierung des CREM α -Gens. Als Template für die Klonierung des CREM α Gens mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) diente eine aus einer Blutprobe isolierte gesamt-DNA Probe. Für die PCR wurden die Primer CREM α EcoRI und CREM α SnaBI so gewählt, dass sie jeweils an das 5'- bzw. 3'-Ende des CREM α -Gens binden. Zudem enthielten die Primer eine EcoRI bzw. SnaBI Schnittstelle, um sie später mit dem hCD2-Promotor zu ligieren. Der Reaktionsansatz der PCR setzte sich aus MgCl (1,5 mmol / l), dNTP-Mix (1,0 mmol / l), CREM α EcoRI (0,4 mmol / l), CREM α SnaBI (0,4 mmol / l), cDNA (0,4 ng), Taq-Polymerase (0,15 μ l), Puffer (2,5 μ l) und H₂O bidest. ad 25 μ l zusammen, wobei die Komponenten auf Eis pipettiert wurden. Als Negativkontrolle diente ein PCR-Ansatz, dem keine Template-DNA zugefügt wurde. Die PCR wurde in 35 Zyklen durchgeführt, wobei sich die Zyklen wie in Tabelle 2 beschrieben zusammensetzten.

Schritt	Temperatur, Dauer
Denaturierung	95 °C, 5 min
Denaturierung	95 °C, 30 sec
Annealing	62 °C, 30 sec
Polymerisation	74 °C, 1 min
Endsynthese	74 °C, 5 min

Tabelle 2: PCR Programm zur Amplifikation des CREM α -Gens

Nach der PCR wurde die Probe elektrophoretisch aufgetrennt. Dazu wurde ein 1%-iges Agarosegel in TAE-Puffer verwendet, dem 1 %-iges Ethidiumbromid

(0,5 µl / 10 ml) zugesetzt wurden. Das Ethidiumbromid interkaliert mit der DNA, so dass nach Auftrennung der DNA im elektrischen Feld eine Betrachtung unter UV-Licht möglich wird. Zur Probenvorbereitung wurde die PCR-Probe mit 1 / 10 ihres Volumens an Auftragspuffer versetzt und anschließend auf ein Gel aufgetragen. Zusätzlich zu der Probe wurde ein Molekulargewichtsmarker aufgetragen, mit dem die Größe der DNA-Fragmente ermittelt werden konnte. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 100 Volt durchgeführt.

Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde die 1,3 kd Bande des CREM α -Gens unter UV-Licht ausgeschnitten und mit Hilfe des JETQUICK Gel Extraction Spin Kit[®] nach Protokoll des Herstellers aufgereinigt.

4.1.2. Klonierung des CREM α -Gens hinter den CD2-Promotor

Um das CREM α -Gen hinter den CD2-Promotor zu klonieren, wurden der hCD2-Vektor und das amplifizierte CREM α -Gen mit den beiden Restriktionsendonukleasen SnaBI und EcoRI verdaut. Restriktionsendonukleasen schneiden einen DNA-Abschnitt sequenzspezifisch an festgelegten Schnittstellen. Für den Restriktionsverdau wurde sowohl die CREM α -Insert-DNA als auch der CD2-Vektor mit je 1 µl SnaBI und EcoRI, sowie 1 µl NEBuffer 4 versetzt und 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Zum Inaktivieren der Enzyme wurden die Lösungen für 10 min auf 65°C erhitzt. Nach dem Verdau wurden die beiden DNA-Proben jeweils elektrophoretisch aufgetrennt und mittels des JETQUICK Gel Extraction Spin Kit[®] aufgereinigt.

Um eine optimale Ligation zu ermöglichen, wurde zunächst die Konzentration der nach der Extraktion erhaltenen CD2-Vektor-DNA-Lösung und der CREM α -Insert-DNA-Lösung photometrisch mit dem Nano-Drop bestimmt. Die Kalkulation der für die Ligation benötigten Menge an Vektor- und Insert-DNA erfolgte anhand der nachfolgenden Formel:

Masse Insert [ng] = 5 x Masse Vektor [ng] x Länge Fragment [bp] / Länge Vektor [bp]

Für die Ligationen wurden initial 4ng CD2-Vektor und 2 ng CREM α -Insert mit Wasser auf 16 μ l aufgefüllt und über einen Zeitraum von 5 min auf 45 °C erhitzt. Anschließend erfolgte die Zugabe 2 μ l T4-DNA-Ligase sowie 2 μ l des entsprechenden 10-fach Ligasepuffers. Die Inkubation des Ligationsansatzes erfolgte bei 4 °C über Nacht. Abschließend wurde die Ligase durch Erhitzen für 10 min auf 65°C inaktiviert.

4.1.3. Transformation des CREM α CD2-Vektors in E coli

Nach der Ligation der beiden Fragmente wurde der Vektor mittels des Hitzeschockverfahrens in E. coli-Bakterien transformiert. Hierbei werden E. coli-Keime chemisch kompetent gemacht, indem sie mit Calciumchlorid versetzt und kurzfristig erhitzt werden. Dadurch wird die Membran der Zellen für eine kurze Zeit permeabel und die gewünschte Plasmid-DNA kann in die Bakterien penetrieren. Es wurden 50 μ l kompetente DH5 α Zellen mit 3 μ l der zu transformierenden Plasmid-DNA versetzt und der Ansatz 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem 45 sekündigen Hitzeschock bei 45°C wurden die Zellen mit 900 μ l LB-Medium versetzt und für 45 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Nach Zentrifugation (750 rpm, 5 min, 37°C) wurden die Zellen in 100 μ l LB-Medium aufgenommen und auf vorgewärmten LB-Platten ausplattiert. Die Inkubation der E. coli-Bakterien erfolgte über Nacht bei 37°C im Brutschrank. Am nächsten Tag wurden einzelne Kolonien gepickt und in 20 μ l LB-Medium aufgenommen. Um die Transformation des Vektors in die Zellen zu überprüfen, wurde eine Kolonie-PCR mit den bei der Amplifikation verwendeten Primern (CREM α EcoRI und CREM α SnaBI) durchgeführt. Positive Proben wurden über Nacht in 150 ml LB Medium zzgl. 100 μ l Amoxicillin kultiviert.

4.1.4. Isolierung des CREM α CD2-Vektors aus E coli

Aus den über Nacht Kulturen wurde am nächsten Tag die Plasmid DNA mittels des JETSTAR Plasmid Purification Kit[®] – Maxi nach den Angaben des Hersteller extrahiert.

4.1.5. Sequenzierung von DNA Sequenzen

Sämtliche Sequenzierungen zur Kontrolle von DNA-Fragmenten und Klonierungen wurden vom Zentrallabor der Universitätsklinik Münster durchgeführt und die entsprechenden Sequenzen mit ChromasLite analysiert.

4.1.6. Generierung der CREM α -transgenen Maus

Die Generierung der CREM α -transgenen Maus erfolgte durch die Arbeitsgruppe von Dr. Boris Skryabin durch Mikroinjektion des CREM α -CD2 DNA Konstrukts in den Pronukleus von befruchteten FVB/N Oocyten. Die Embryos wurden dann in pseudoschwangere Weibchen transplantiert, die wiederum die CREM α -transgenen Mäuse gebären.

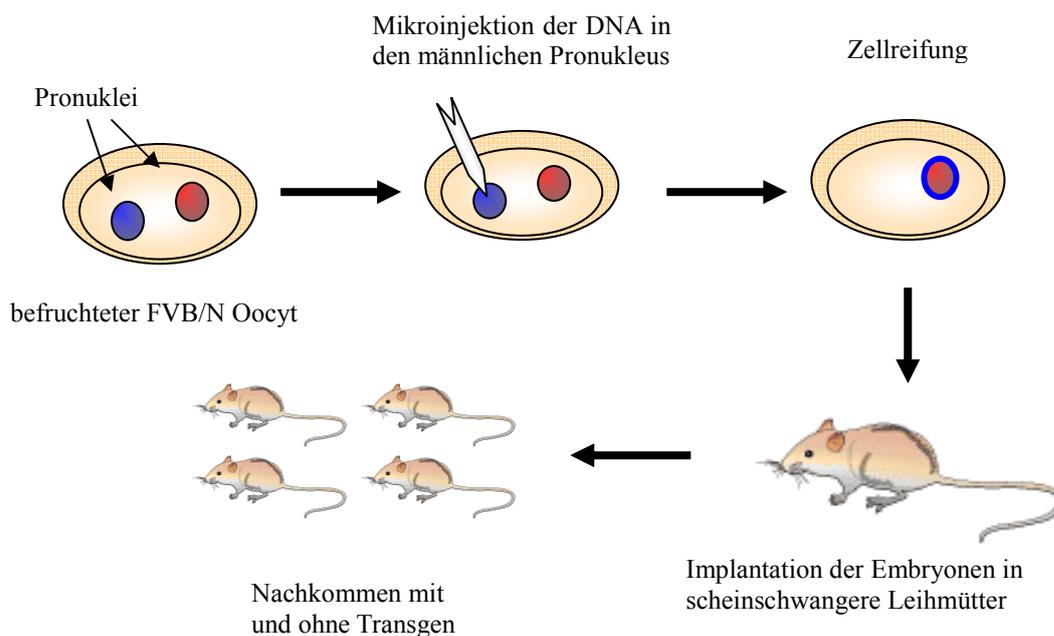


Abbildung 7: Generierung einer CREM α -transgenen Maus mittels Mikroinjektion

Bei der Mikroinjektion wird die zuvor linearisierte DNA gezielt mit einer speziell geformten Glaskanüle in den männlichen Pronukleus eingeschleust. In der nachfolgenden Verschmelzung wird mütterliches und väterliches Erbgut neu kombiniert. Die transformierten befruchteten Eizellen entwickeln sich in einer Zellkultur weiter und werden schließlich als Embryonen in scheinchwangere Leihmuttertiere eingeführt.

4.1.7. Entwicklung der Genotypisierungs-PCR

Um die Integration des Transgens zu überprüfen, wurde eine PCR basierte Genotypisierungsmethode der CREM α -transgenen Maus entwickelt. Hierzu wurde zuerst aus der Schwanzspitze der Maus durch Zugabe von 198 μ l NID-Puffer und 2 μ l Proteinase K und einer Inkubation über Nacht bei 37°C die genomische DNA extrahiert. Mittels einer PCR, bei der 2 μ l der genomischen DNA Lösung eingesetzt wurden, wurde ein 650 bp Fragment um die SnaBI Schnittstelle des CREM α -CD2 DNA Konstruktes amplifiziert, welches sich ausschließlich in den CREM α -transgenen Mäusen findet. Die hierfür verwendeten Primer waren: forward 5'--GCA GGC GAT GCA GCA TCC CAT AAT GG-3', reverse 5'-CCT CTA CCA TTC TTG CAA TCA C-3'

Schritt	Temperatur, Dauer
Denaturierung	95 °C, 5 min
Denaturierung	95 °C, 30 sec
Annealing	63 °C, 30 sec
Polymerisation	74 °C, 30 sec
Endsynthese	74 °C, 5 min

Tabelle 3: PCR Programm zur Genotypisierung der transgenen Maus

4.2. Zellbiologische Versuche

4.2.1. Milz- und Lymphknotenzellpräparation

Vor der Organentnahme wurden die Mäuse durch Vergasung mit CO₂ getötet und gründlich mit Ethanol desinfiziert.

Die entnommenen Milzen und Lymphknoten wurden durch Metallsiebe (60 µm) gedrückt und die Zellen in PBS / 1% FCS aufgenommen. Nach anschließender Zentrifugation (750 x g; 8 min) wurden die Erythrozyten durch Zugabe von 5 ml Erythrolysispuffer lysiert. Nach 3 min wurde die Lysereaktion durch Zugabe von PBS / 1% FCS gestoppt, die Zellen erneut zentrifugiert und abschließend in 10 ml T-Zell Medium aufgenommen.

4.2.2. Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde ein Teil der Zellsuspension mit Trypanblau verdünnt. Hierdurch werden tote Zellen blau angefärbt, da der Farbstoff durch defekte Zellmembranen dringen kann. Lebende Zellen dagegen erschienen unter dem Mikroskop hell. Die eigentliche Bestimmung der Zellzahl erfolgte unter dem Mikroskop mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer.

4.2.3. T-Zell Isolierung

Die Isolierung der T-Zellen aus der Milzzellsuspension erfolgte mittels der negativen Selektion. Die Lymphknotenzellsuspension wurden nicht weiter aufgereinigt, da diese nach der Erythrolyse schon fast ausschließlich aus T-Zellen besteht.

Die negative Selektion erfolgte in zwei Schritten. Für den ersten Schritt wurde 1g Nylonwolle in eine 10 ml Spritze gestopft, autoklaviert und mit T-Zell Medium gefüllt für 45 min auf 37°C erhitzt. Danach erfolgte der Austausch des T-Zell Mediums durch die Milzzellsuspension, die wiederum für 45 min bei 37°C inkubiert wurde. Hierbei kommt es zu einer Bindung von Monozyten und B-Zellen an die Nylonsäule, so dass beim anschließenden langsamen Ablassen der Suspension diese zu etwa 80% aus reinen T-Zellen bestand.

Der zweite Schritt erfolgte mittels des Pan T Cell Isolation Kit. Hierbei werden durch indirektes magnetisches Labeling nichtaktivierte T-Zellen isoliert. Die hierfür verwendeten Biotin-konjugierten Antikörper (gegen CD45R, DX5, CD11b und Ter-119) binden an verschiedene B-Zellen, NK-Zellen, dendritische Zellen, Makrophagen, Granulozyten und Erythrozyten. Durch Zugabe von magnetischen Anti-Biotin Microbeads kommt es zu einer magnetischen Markierung dieser Zellen. Nach Auftragen der Zellsuspension aus gelabelten Zellen und ungelabelten T-Zellen auf eine in einem magnetischen Feld befindlichen Säule eluiert man reine T-Zellen, während die gelabelten Zellen in der Säule gebunden bleiben. Die Durchführung dieser MACS-Separation erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Nach der Separation wurden die eluierten T-Zellen zweimal mit PBS / 1% FCS gewaschen.

4.2.4. Gewinnung von DCs

Zur Gewinnung von DCs wurden Femur (Oberschenkel) und Tibia (Unterschenkel) der Hinterläufe unter sterilen Bedingungen freipräpariert, entnommen und anliegendes Gewebe entfernt. Die gesäuberten Knochen

wurden mit einer sterilen Schere geöffnet und das Knochenmark mit PBS unter der Verwendung einer Kanüle (0,4 x 19mm Nr.20, BD Pharmingen, Heidelberg) aus dem Knochen gespült. Nach einmaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen in DC-Medium aufgenommen und in einer Dichte von 2×10^6 Zellen in Zellkulturschalen ausgesät. Am dritten und sechsten Tag wurden jeweils 10 ml der Zellsuspension abgenommen, abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in frischem 10 ml DC-Medium resuspendiert und wieder zu den restlichen DC in die ursprüngliche Zellkulturschale überführt. Die DCs wurden für die Stimulation der T-Zellen nach einer siebentägigen Kultivierung verwendet.

4.2.5. T-Zell-Stimulation

Für die Stimulation wurden je 1×10^5 T-Zellen in 200 μ l T-Zell Medium in jedes Well einer 96-Well Platte aufgetragen. Die eigentliche Stimulation erfolgte auf drei unterschiedliche Arten. Zum einen wurden die T-Zellen durch die Zugaben von je $1,25 \times 10^3$ allogener DCs pro Well stimuliert. Zum anderen erfolgte eine chemische Stimulation durch die Zugabe von 0,6 ng PMA und 60 ng Ionomycin pro Well zu den T-Zellen. Eine weitere Möglichkeit der Stimulation bestand in dem Coaten der Platten mit anti-CD3/anti-CD28 Antikörpern. Hierfür wurde die 96-Well Platte mit je 5 μ l anti-CD3 und 5 μ l anti-CD28 Antikörpern für 45 min inkubiert bevor die T-Zellen in die Wells aufgetragen wurden.

4.2.6. T-Zell-Proliferations-Assay

Zur Messung der Zellproliferationsrate der T-Zellen wurden CFSE (5(6)-Carboxyfluorescein di-acetate N-succinimidylester) Proliferationsmessungen durchgeführt. Nach initialer Markierung der Zellen verteilt sich der CFSE Farbstoff zu gleichen Teilen bei jeder Zellteilung auf die zwei neu entstandenen

Zellen. Somit lässt die Abnahme der Fluoreszenz auf die Anzahl der Zellteilungen schließen.

Bevor die frisch isolierten T-Zellen (s. 5.2.3.) mit CFSE gelabelt werden konnten, wurden sie ein weiteres Mal mit reinem PBS gewaschen, da der CFSE-Farbstoff ansonsten mit FCS (und anderen Proteinen) reagieren würde. Für das Labelling wurden je 1×10^7 T-Zellen in 5 μM CFSE-Lösung bei 37°C für 5 min im dunklen inkubiert. Nach dieser Inkubationsphase hat der Farbstoff an die Zellmembran gebunden, und die Reaktion wird durch die Zugabe von reinem FCS gestoppt. Nach einem weiteren Waschschriff mit PBS / 1% FCS wurden die Zellen in T-Zell Medium aufgenommen und in je 200 μl zu je 1×10^5 Zellen auf einer 96 Well Platte ausplattiert. Die Stimulation der Zellen erfolgte bei 37° im Brutschrank für bis zu 5 Tage sowohl mit DCs, mit anti-CD3/anti-CD28 Antikörpern als auch mit PMA/Ionomycin (s. 5.2.5.). Die abschließende Bestimmung der Proliferation erfolgte durch die Messung der Fluoreszenz der einzelnen T-Zellen mittels des Durchflusszytometers.

4.2.7. IL-2 Cytometric Bead Array (CBA)

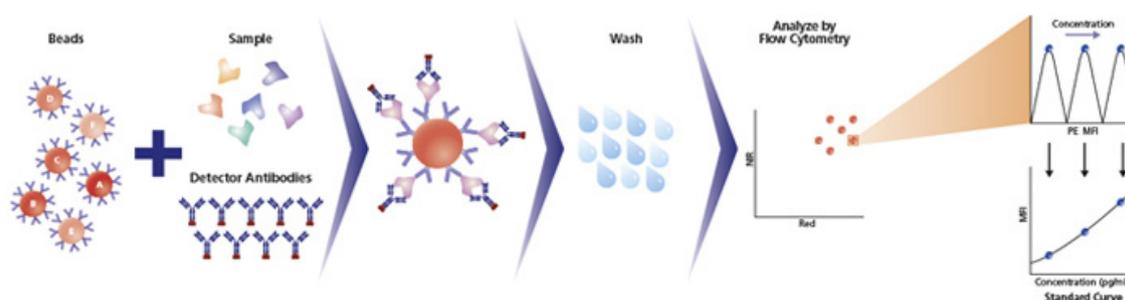


Abbildung 8: Funktionsweise des Cytometric Bead Array

Jeder Bead in dem Array hat eine spezielle Fluoreszenzintensität. Zudem sind die Beads an für die zu messenden Zytokine spezifischen Antikörper gebunden. Die daraus resultierenden „Sandwich“-Komplexe lassen sich nach Inkubation und mehreren Waschschriffen in einem Durchflusszytometer messen.

Bildquelle: <http://www.bdbiosciences.com/reagents/cytometricbeadarray/workflow/index.jsp>

Ein Cytometric Bead Array ist eine Methode um die Expression verschiedener Zytokine gleichzeitig quantitativ zu bestimmen. Der Test beruht auf der Bildung eines „Sandwich“-Komplexes aus den zu detektierenden Zytokinen, Detektionsantikörpern und den mit den für die Zytokine entsprechenden Antikörpern gekoppelten Beads. Durch die unterschiedlich starke Fluoreszenzintensität der verschiedenen Beads und der Stärke der Expression der gekoppelten Detektionsantikörper lassen sich mit Hilfe eines FACS-Gerätes und der entsprechenden Analysesoftware die in der Probe vorhandenen Zytokinkonzentrationen bestimmen. Die Vorbereitung und Messung der Proben erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

4.2.8. Phänotypische Charakterisierung der T-Zellen

Bei der phänotypischen Charakterisierung der T-Zellen wurden die Glykoproteine CD3, CD3ζ, CD4, CD8 auf der Oberfläche sowie intrazellulär IL-17 und FoxP3 gemessen. Hierzu wurden frisch isolierte T-Zellen aus den Lymphknoten für 4 Stunden mit PMA und Ionomycin unter Zusatz von 1 µl/ml GolgiPlug stimuliert. GolgiPlug enthält Brefeldin A, welches den intrazellulären Proteintransport und die Sekretion von Proteinen hemmt. Dadurch kommt es zu einer Anreicherung der exprimierten Proteine, die eine intrazelluläre FACS-Messung erst möglich machen. Nach der Stimulation wurden die T-Zellen mit PBS / 1% FCS gewaschen und die Oberflächenproteine mit 2 µl spezifischen Antikörpern für 20 min bei RT unter Ausschluss von Licht gefärbt. Um eine intrazelluläre Färbung zu ermöglichen, wurden die Zellen für 20 min auf Eis mit BD™ Cytotfix/Cytoperm inkubiert und anschließend zweimal mit PermWash gewaschen. Die Färbung des intrazellulären IL-17 erfolgte für 20 min bei RT unter Ausschluss von Licht durch Zugabe von 1 µl Alexa Fluor® 488 Rat anti-Mouse IL-17 Antikörper bzw. Fitc Rat anti-Mouse FoxP3 Antikörper. Nach erneutem Waschen mit PBS erfolgte die Messung der Probe in einem Durchflusszytometer.

4.2.9. FACS-Analysen

Die phänotypische Charakterisierung der T-Zellen, die Detektion des IL-2 CBA und die CFSE Proliferationsmessung erfolgte mit einem Durchflusszytometer (FACS). Eingesetzt wurde ein Vierfarbengerät (FACS Calibur), mit dem neben der Größe der Zellen/Beads (FSC) und ihrer Granularität (SSC) gleichzeitig bis zu vier weitere Parameter über Fluoreszenzfarbstoffe bestimmt werden konnten (s. Abbildung 9)

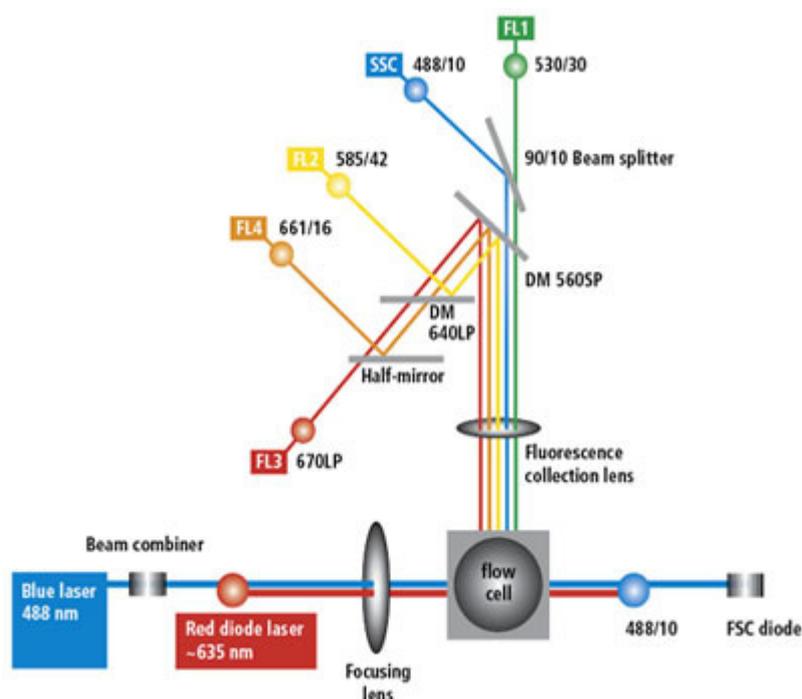


Abbildung 9: Aufbau eines vierfarbigen Durchflusszytometers

Am Kreuzungspunkt eines Laserstrahls mit dem Probenstrom wird während der Passage einzelner Zellen/Beads Licht gestreut und gleichzeitig die an die spezifischen Antikörper gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe angeregt. Das FSC wird als Maß der Zellgröße detektiert. Farbteilerspigel und Filter trennen SSC als Maß der Granularität und die 4 unterschiedlichen Fluoreszenzen (FL1, FL2, FL3, FL4).

Quelle: <http://www.bdbiosciences.com/instruments/facs-calibur/features/index.jsp>

Die Auswertung der Messdaten erfolgte mittels WinMDI. Dabei wird anhand eines Density Plots die betreffende Lymphozytenpopulation mit einem Fenster

gegated und danach diese Zellen in einem Diagramm dargestellt, welches die Expression der verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe gegenüberstellt. Anhand ungefärbter Negativkontrollen erfolgte schließlich eine Abgrenzung der positiven Zellen.

4.2.10. Intrazelluläre Kalziummessung

Für die Messung des intrazellulären Kalziumeinstroms wurden pro Messung 1×10^7 frisch isolierte T-Zellen für 20 min mit HEPES-Tyrode Puffer und Fura-2/AM (5 μM) bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, in HEPES-Tyrode Puffer aufgenommen und mit 1 mM CaCl_2 versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 15 min erfolgte die Messung des intrazellulären Kalziumeinstroms nach Stimulation mit 2 μl anti-CD3- / anti-CD28-Antikörper mittels eines Fluoreszenzspektrometers. Das durch die Stimulation in die Zelle einströmende Ca^{2+} bildet mit dem Fura-2 einen Chelatkomplex, der sich mit einem Spektrometer bei 340nm und 380 nm messen lässt. Die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wurde anhand der folgenden Formel bestimmt:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d \times S_{f380}/b_{380} (R - R_{\text{min}})/(R_{\text{max}} - R)$$

K_d beträgt in einer cytoplasmatischen Umgebung 224 nm, S_{f380}/b_{380} beschreibt das Verhältnis der Intensität des freien und des gebundenen Farbstoffes, R stellt den Quotienten der Fluoreszenzemission bei 340 nm und 380 nm des intrazellulären Fura-2 dar, und R_{max} und R_{min} die maximalen und minimalen Fluoreszenzraten. R_{max} und R_{min} erhält man durch die Zugabe von Digitoxin, das für einen maximalen Ca^{2+} Einstrom sorgt bzw. durch die Zugabe von EGTA das Ca^{2+} komplexiert.

4.3. Molekularbiologische Methoden

4.3.1. RNA-Isolierung aus T-Zellen

Für die Isolierung der RNA wurden 1×10^7 T-Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in 600 μ L RLT-Puffer (Quiagen), der 1% β -Mercaptoethanol enthielt, lysiert und über Nacht bei -20°C gelagert. Die eigentliche RNA-Isolierung erfolgte mit Hilfe des Shredder- und des RNeasy Mini-Kits entsprechend der jeweiligen Protokolle des Herstellers. Der RNA-Gehalt, der bei dieser Isolierung entstandenen Lösung wurde mittels des NanoDrops photometrisch bestimmt. Die Reinheit der Probe ergab sich aus dem Quotienten der Extinktion bei 260 nm und 280 nm.

4.3.2. RNA-Isolierung aus Gewebe

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus Mäuseohren erfolgte durch die Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. Dazu wurden die in flüssigem Stickstoff gelagerten Ohren zuerst in einem vorgekühlten Mörser pulverisiert. Das so gewonnene Pulver wurde in 1,2 ml TRIzol[®] Reagent lysiert und in einem Potter mehrmals homogenisiert. Das im TRIzol[®] enthaltene Phenol und Guanidinium-Isothiocyanat bewirkt eine Zelllyse, wodurch DNA, RNA und Proteine frei werden. Nach Zentrifugation (12000 x g, 3 min, 4°C) wurde der Überstand zur vollständigen Dissoziation der Nukleoprotein Komplexe 5 min bei RT inkubiert. Durch Zugabe von 0,2 Volumenteilen Chloroform und 15 Sekunden kräftigem Schütteln bildeten sich nach erneuter Zentrifugation (12000 x g, 20 min, 4°C) drei Phasen. Eine untere rote Phenol-Chloroform-Phase, eine weiße proteinhaltige Interphase und eine farblose wässrige obere Phase. Die in der oberen Phase enthaltene RNA wurde bei 4°C mit 500 μ l Isopropanol gefällt. Das nach Zentrifugation (12000 x g, 20 min) gebildete gelartige Pellet wurde mit 75 %igem Ethanol gewaschen, bei 37°C

getrocknet und in 100 µl DEPC-A. bidest. eluiert. Dieses Eluat wurde anschließend mit dem RNeasyMiniKit[®] nochmals aufgereinigt.

4.3.3. cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurde von der RNA-Lösung genau 1 µg RNA mit 1 µl der Oligo-dT Primer Lösung versetzt, auf 11 µl mit RNase freiem Wasser aufgefüllt und 10 Minuten auf 70°C erhitzt. Nach zweiminütiger Inkubation auf Eis wurde jedem Ansatz ein Mix aus 4 µl 5fach-M-MuLV RT-Puffer, 1 µl dNTPs, 3.5 µl RNase freiem Wasser und 0.5 µl Reverser Transkriptase zugesetzt, so dass das Gesamtvolumen für die cDNA-Synthese 20 µl betrug. Nach der cDNA-Synthese, die über 90 Minuten bei 42°C erfolgte, wurde die Reverse Transkriptase bei 70°C inaktiviert und die Probe anschließend bei -20°C gelagert.

4.3.4. Real Time Polymerase Kettenreaktion (qT-PCR)

Die RT-PCR wurde mit dem SYBR[®] Green PCR Master Mix von AB Applied Biosystems angesetzt. Hierzu wurden pro Probe 0,025 µg in cDNA umgeschriebene RNA (s. 5.3.3.), 5 µl SYBR[®] Green PCR Master Mix und 0,02 µM der spezifischen Primer auf eine 384-Well Platte aufgetragen und mit Wasser bidest. auf 10 µl aufgefüllt. Um mögliche Pipettier- und Messfehler zu minimieren, erfolgte bei jeder Probe eine Doppelbestimmung.

Die eigentliche PCR wurde mit einem TaqMan Gerät 7900 von Applied Biosystems durchgeführt. Dabei erfolgte die Amplifizierung der PCR Produkte über insgesamt 40 Zyklen einer 2-step Reaktion, d.h. die Proben wurden 40 Mal auf 92° C (Denaturierung) erhitzt und anschließend auf 60° C (Annealing) abgekühlt.

Die spätere Auswertung der PCR erfolgte mittels ABI PRISM anhand des Ct-Wertes (treshold cycle). Dieser Wert entspricht der errechneten Zykluszahl,

bei der die Fluoreszenzintensität innerhalb einer Probe zum ersten Mal über einer zuvor festgelegten Schwellenintensität, die sich aus dem Hintergrundrauschen ergibt, liegt. Die Fluoreszenzintensität wird während der PCR nach jedem Zyklus gemessen und nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Um die Genauigkeit der Auswertung zu erhöhen, wurde für jede Probe neben dem Ct-Wert der Expression der spezifischen Gene auch die Ct-Werte der Expression von Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) untersucht. Man geht davon aus, dass GAPDH als internes Kontrollgen in allen Zellen in gleicher Menge vorhanden ist. Durch den Bezug der Expression der untersuchten Gene auf die GAPDH-Expression lassen sich Unterschiede beim Umschreiben der RNA in cDNA sowie in der Menge der eingesetzten Probe ausgleichen.

4.3.5. Chromatin-Immuno-Präzipitation (ChIP)

Die Chromatin-Immuno-Präzipitation ist ein Verfahren zur Analyse der Bindungsfähigkeiten distinkter Proteine an spezifische Abschnitte genomischer DNA. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode verwendet, um die Bindung von CREM α an den IL-2-Promotor *in vivo* nachzuweisen.

Das Grundprinzip beruht auf der Fixierung der zu einem bestimmten Zeitpunkt bestehenden Protein-DNA-Bindungen durch Formaldehyd, der Größenreduktion der gebundenen DNA und der Immunopräzipitation des zu untersuchenden Proteins durch Verwendung spezifischer Antikörper. Die so isolierte DNA wird vom Protein gelöst und unter Verwendung sequenzspezifischer Primer mittels PCR hinsichtlich ihrer Identität untersucht.

Im Einzelnen wurden 5×10^6 T-Zellen pro später verwendeten Antikörper zuerst über 3 Tage mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörper stimuliert (s. 5.2.5.). Durch Zugabe von 37%igem Formaldehyd (Endkonzentration 1 %), erfolgte dann bei RT die Fixierung der Protein-DNA Bindungen, welche wiederum durch Zugabe von 5 % (v/v) 2,5 M Glycin nach 5 min gestoppt wurde. Nach zweimaligem Waschen mit kaltem PBS wurden die Nuklei bei -10°C mit 200 μl Lysis-Puffer

aus den Zellen lysiert. Zur Fragmentierung der genomischen DNA erfolgte eine Sonifizierung der Proben mit Hilfe des Branson Sonifier 250 (Duty Cycle: 50, Output control: Stufe 5), wobei die Proben während der Sonifizierung weiterhin auf -10°C gekühlt wurden. Die bei der Sonifizierung entstandenen zellulären Bruchstücke wurden durch Zentrifugation ($13000 \times g$, 20 min, 4°C) sedimentiert, während von den in den Überständen vorhandenen Protein-DNA-Komplexen $10\mu\text{l}$ zur Inputkontrolle abgenommen und bei -20°C gelagert wurden, der Rest wurde weiterverarbeitet.

Nach der Zugabe von Chip-Dilutions-Puffer erfolgte das preclearing der Lysate durch das Hinzufügen von $25 \mu\text{l}$ A/G-Sepharose. Nach einstündiger Inkubation unter Rotation bei 4°C wurden die Proben zentrifugiert ($13000 \times g$, 20 sec, 4°C), die abgenommenen Überstände auf $1000\mu\text{l}$ mit Chip-Dilutions Puffer aufgefüllt und über Nacht unter Rotation bei 4°C mit den spezifischen Antikörpern inkubiert.

Am Folgetag wurde der Ansatz nach Zugabe von $30 \mu\text{l}$ A/G-Sepharose für weitere 2 h inkubiert (Rotation, 4°C), so dass eine Bindung der Antikörper Protein Komplexe an die Sepharose beads erfolgte.

Um überschüssige Antikörper und ungebundene DNA-Reste zu entfernen, folgten nacheinander insgesamt sieben Waschschriffe, wobei die beads jeweils nach Rotation für 5 min (RT) wiederholt zentrifugiert ($2000 \times g$, 2 min, RT) und der Überstand verworfen wurde. Im Einzelnen wurde einmal mit Low-salt-Wasch-Puffer, zweimal mit High-salt-Wasch-Puffer, einmal mit Li-Cl Puffer und abschließend noch zweimal mit TE-Puffer gewaschen.

Nach den Waschschriffen wurden die beads zweimal in $100 \mu\text{l}$ Elutionspuffer aufgenommen, unter Schütteln bei RT für 15 min inkubiert und nachfolgend die proteingebundene DNA durch Zentrifugation ($3000 \times g$, 2 min, RT) in ein frisches Reaktionsgefäß eluiert.

Die Protein-DNA Quervernetzung wurde durch Zugabe von $8 \mu\text{l}$ 5 M NaCl sowie $60 \mu\text{g}$ RNAse und Inkubation bei 65°C über Nacht, sowie durch die darauf folgenden Zugabe von $4\mu\text{l}$ $0,5\text{M EDTA}$ sowie $4 \mu\text{l}$ 1M Tris HCL und $4 \mu\text{l}$ Proteinase K (20mg/ml) für 1h bei 42°C aufgehoben.

Die abschließende Aufreinigung der Eluat-DNA sowie der zuvor abgenommenen Input-Proben erfolgte mit Hilfe des Genomed-PCR-Kits, wobei für die Elution 30 µl 70°C warmes VE Wasser verwendet wurde. Die Bindung an distinkte DNA Sequenzen wurde unter Verwendung promotorspezifischer Primer mittels RT-PCR analysiert (5.3.4).

4.4. Methoden zur Analyse von Proteinen

4.4.1. Herstellung von Kernextrakten

Zur Herstellung von Kernextrakten wurden 5×10^6 Zellen zweimal mit PBS gewaschen und in 400 µl Lysepuffer A aufgenommen. Die Zellen wurden 15 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend mit 25 µl 10 % NP40 versetzt und gevortext. Nach einer Zentrifugation ($12000 \times g$, 2 min, 4°C) wurde das Kernpellet in 40 µl Lysepuffer B resuspendiert und für weitere 15 Minuten auf Eis gelagert, so dass die Proteine im Überstand gelöst wurden. Zuletzt wurden die Kernreste durch erneute Zentrifugation von den Extrakten getrennt.

4.4.2. Bestimmung der Protein-Konzentration

Die Bestimmung der Protein-Konzentration erfolgte mit Hilfe des Bradford Test. Dieser Test basiert auf der Eigenschaft des Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250 (CBBG), in saurer Lösung mit kationischen und unpolaren Seitenketten von Proteinen Komplexe zu bilden. Dabei erhöht sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 470 nm auf 595 nm und die Farbe wechselt so von rot zu blau. Da der Extinktionskoeffizient des Farbstoff-Protein-Komplexes sehr viel höher ist als der des freien Farbstoffes, kann die Zunahme der Absorption bei 595 nm photometrisch gemessen werden und ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung.

Zur Kalibrierung der Extinktionswerte wurde eine Standardreihe mit unterschiedlichen Konzentrationen von Bovinem Serumalbumin (BSA) verwendet. Für die Messung der Extinktion wurden in 96-Well Platte jeweils 10 µl zu untersuchenden Probe mit 300 µl Coomassie Reagenz versetzt. Die Messung der Extinktion erfolgte mit einem Dynatech Laboratories MRX ELISA-Reader.

4.4.3. Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) und Western-Blot

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese ist ein Verfahren zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Hierfür wurden 10 µg der Zell-Lysate mit dem Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Das in dem Probenpuffer enthaltene anionische Detergenz SDS (Natriumdodecylsulfat) bewirkt eine Entfaltung der Proteine und somit eine bessere Auftrennung. Die Anzahl der SDS-Moleküle, die an die Proteine binden, ist proportional zu deren Molekulargewichten. Die Überlagerung der Eigenladung der Proteine durch die negative Ladung der SDS Moleküle ermöglicht hierbei erst eine Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht in einem elektrischen Feld.

Für die Auftrennung der Proteine wurden 10%ige Trenngele verwendet, wobei die Auftragung der Proben auf 5%ige Sammelgele erfolgte. Zusätzlich zu den Proben wurde als interner Standard der Page Ruler verwendet. Die Auftrennung erfolgte bei 180 V für etwa eine Stunde und der Transfer auf die Nitrocellulose-Membranen (Pierce), das eigentliche blotten, bei 220 mA für 70 Minuten. Zur Blockierung unspezifischer Bindungen wurden die Membranen über Nacht bei 4°C mit 5% BSA in TBST inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBST erfolgte dann für 2 Stunden bei RT die Bindung des in TBST mit + 1% BSA gelösten Primärantikörpers. Nach weiterem dreimaligem Waschen mit TBST wurde die Membran mit dem Sekundärantikörper erneut für 2 Stunden inkubiert. Nach der Inkubation mit dem zweiten Antikörper wurde weitere dreimal mit TBST gewaschen. Die Detektion der Antikörperbindung an die aufgetrennten Proteine erfolgte jeweils mit ECL-Lösung.

4.5. Kontaktallergie

Für die Kontaktallergie wurde zuerst die Bauchdecke der Mäuse rasiert. Einen Tag später wurden die Mäuse durch das Einpinseln des rasierten Bauches mit 50µl einer 0,3 % 2,4-Dinitro-1-Fluorobenzene (DNFB) Lösung in einem Aceton/Olivenöl (4:1) Gemisch und der Fußballen mit 10 µl einer 0,5% DNFB-Lösung sensibilisiert. 6 Tage später wurde durch Einpinseln der ventralen und dorsalen Seite des linken Mäuseohres mit 10 µl eine 0,3% DNFB-Lösung die Kontaktallergie ausgelöst. Das rechte Ohr diente als interne Kontrolle und wurde lediglich mit dem Aceton/Olivenöl-Gemisch eingepinselt. Über die nächsten 3 Tage wurde in regelmäßigen Abständen mittels eines Mikrometers die Ohrdicke der beiden Ohren gemessen, wobei sich die Ohrschwellung aus der Differenz der Dicke des mit DNFB behandelten Ohrs und des Kontrollohrs ergab.

4.6. Histologie

Zur Gewinnung der Gewebeschnitte wurden die Mäuseohren bei 70°C schockgefroren und bei einer Messertemperatur von -21°C und einer Objekttemperatur von -20°C mit einem Kryostat geschnitten. Nach dem Schneiden wurden die Schnitte auf sialinisierte Objektträger aufgezogen, mit Aceton für 10 min fixiert und alle unspezifischen Bindungen durch Inkubation für 2 Stunden mit PBS / 3% FSC geblockt. Die Anfärbung der so geblockten Schnitte erfolgte mit dem IL-17 Alexa 488 und dem CD3 PE Antikörper für 1 Stunde. Nach gründlichem Waschen wurden die angefärbten Schnitte in Fluoreszenz Mounting Medium eingebettet und unter einem Fluoreszenz-Mikroskop (Axioskop HBO50, Zeiss) ausgewertet.

5. Ergebnisse

5.1. *Transgenes Mausmodell mit CREM α -Überexpression*

SLE ist eine komplexe Autoimmunerkrankung, die sich durch einen multiplen Organbefall auszeichnet. Auch wenn der SLE in der Effektorphase als eine durch B-Zellen getriggerte Krankheit angesehen wird, sind T-Zellen an der Pathophysiologie dieser Erkrankung wesentlich beteiligt. So finden sich bei SLE-Patienten vermehrt Gedächtnis-T-Zellen, während naive und Supressor-T-Zellen weniger häufig vorkommen. Auch die Anzahl FoxP3 exprimierender regulatorischer T-Zellen ist bei SLE-Patienten vermindert. Im Serum wurden zudem vermehrte Konzentrationen der pro-inflammatorischen T-Zell Zytokine IL-6, IL-10 und IL-17 gemessen, die Konzentrationen von IL-2 und IFN γ waren dagegen vermindert. Die verminderte IL-2-Produktion der SLE-Patienten führt zu einer verminderten Aktivierung des induzierten Zelltodes und so zu einer Persistenz von Autoreaktivität und Gedächtnis-T-Zellen. Zudem ist IL-2 für die Generierung und Entwicklung von regulatorischen T-Zellen entscheidend. Die erhöhte Infektanfälligkeit und die Persistenz autoreaktiver T- und B-Zellen, wie sie bei SLE-Patienten vorkommen, lassen sich zumindest teilweise durch diese Veränderungen der Zytokinexpression erklären.

Um die Relevanz von CREM α für die T-Zell-Pathophysiologie des SLE in vivo zu untersuchen, wurde eine transgene Maus mit einer T-Zellen spezifischen Überexpression von CREM α generiert.

5.1.1. **Generierung einer CREM α Überexpression unter Kontrolle des hCD2-Promoters**

Um eine zellspezifische CREM α Überexpression zu erreichen, wurde für die Generierung der CREM α -transgenen Maus der hCD2-Promotor verwendet. Dieser wurde freundlicherweise von Dr. Dimitris Kioussis (London, UK) zur

Verfügung gestellt. Seine Arbeitsgruppe konnte bereits zeigen, dass der hCD2-Promoter sich durch eine T-Zell spezifische Aktivität auszeichnet (149). Darüber hinaus wurden bereits mehrere Mausmodelle mit einer transgenen Expression unter Kontrolle des hCD2-Promoters beschrieben (20, 144).

Für die Generierung einer CREM α -transgenen Maus wurde das 1,2 kb große CREM α Gen-Fragment aus genomischer DNA amplifiziert und in den VA-CD2 Expressions-Vektor kloniert. Das so entstandene Plasmid wurde durch Sequenzierung überprüft (Sequenz s. Anhang) und VA-CREM α /CD2 genannt.

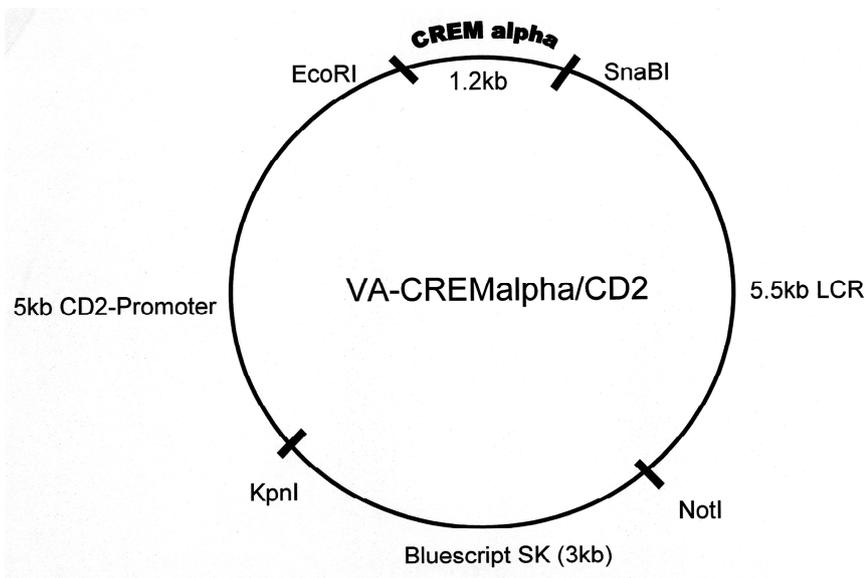


Abbildung 10: Vektorkarte des VA-CREM α /CD2 Plasmids

Das 1,2Kb große CREM α Gen wurde über die Schnittstellen EcoRI und SnaBI direkt hinter den CD2-Promotor kloniert.

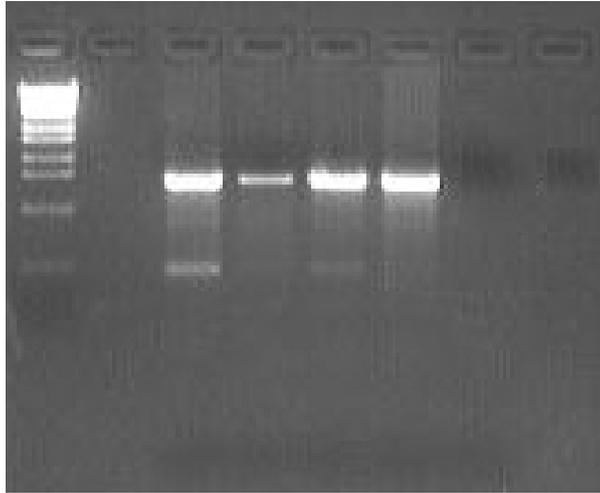
5.1.2. Pronukleusinjektion

Um transgene Mäuse mit Überexpression von CREM α in T-Zellen zu generieren, wurde das VA-CREM α /CD2 Plasmid zunächst mit Restriktionsenzymen linearisiert und aufgereinigt. Anschließend wurde das gereinigte DNA-Fragment durch Mikroinjektion in den Pronukleus von Mäuseeizellen eingebracht und die so präparierte Eizelle in pseudoschwangere FVB/N Muttermäuse implantiert.

Sowohl die Mikroinjektion als auch die weitere Generierung der CREM α -transgenen Mäuse wurde von Dr. Boris Skryabin (Münster) durchgeführt. Die Vorkern-Injektionen erbrachten insgesamt vier Tiere, in die das Transgen integriert worden ist.

5.1.3. Wurfzahlanalyse mittels Genotypisierungs-PCR

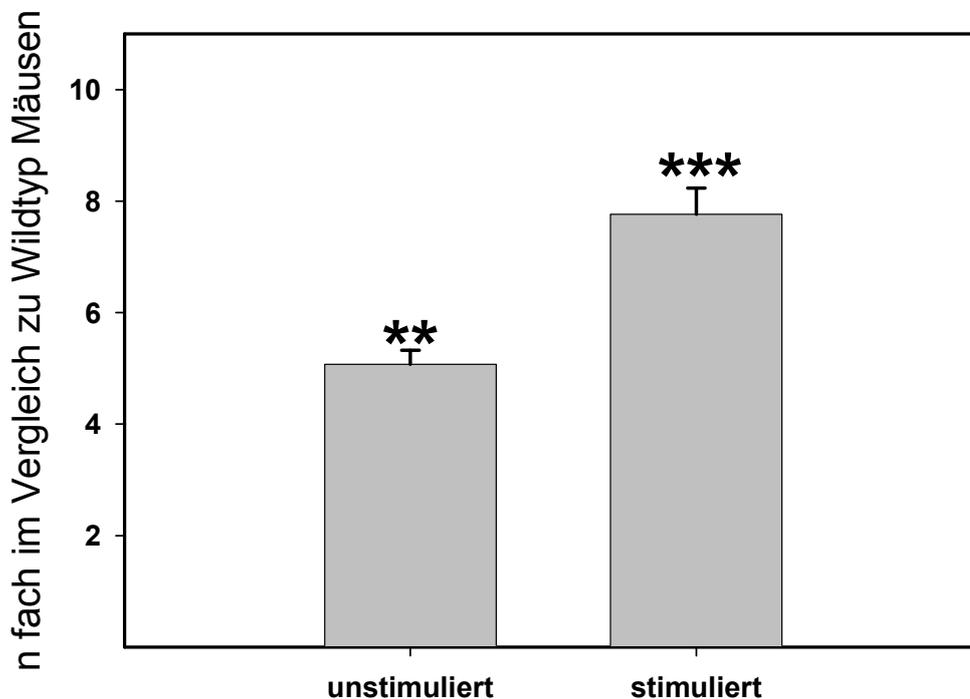
Die 4 Ursprungmäuse sowie alle von ihnen abstammenden Nachkommen wurden mittels PCR auf das Transgen untersucht. Hierzu wurde genomische DNA, wie im Kapitel „Methoden“ beschrieben, aus Schwanzspitzen extrahiert. Anschließend wurde diese als Template in einer PCR eingesetzt, bei der ein transgenspezifisches 650 bp Fragment um die SnaBI Schnittstelle amplifiziert wurde. Abbildung 11 zeigt exemplarisch eine Genotypisierung von 6 Mäusen (inkl. H₂O Kontrolle) aus verschiedenen Verpaarungen. 4 PCR positive Mäuse mit Integration der CREM α -CD2 cDNA in das Genom sind eindeutig von 2 negativen Mäusen zu unterscheiden.

**Abbildung 11: Genotypisierungs-PCR**

Für die Genotypisierung wurde die genomische DNA aus der Schwanzspitze isoliert und ein transgenspezifisches 650 bp großes Fragment amplifiziert.

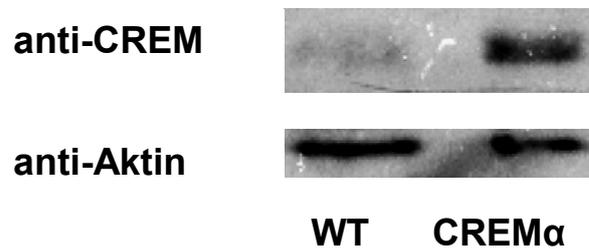
5.1.4. CREM α -Expression in transgenen Mäusen

Zum Nachweis der Überexpression von CREM α in vivo wurden T-Zellen aus der Milz der CREM α -transgenen und Wildtyp Mäuse isoliert und die mRNA extrahiert. Nach der Umwandlung in cDNA wurde die CREM α mRNA Expression mittels RT-PCR bestimmt. Erwartungsgemäß war die Expression von CREM α in den CREM α -transgenen Mäusen deutlich erhöht (Abb.12). Durch eine Stimulation der T-Zellen für 6 Stunden mit anti-CD3- und anti-CD28-Antikörper erhöhte sich die 5-fache Überexpression auf den Faktor 8.

**Abbildung 12: CREM α mRNA Expression**

Für die Bestimmung der CREM α Expression wurde die mRNA aus T-Zellen aus der Milz isoliert. Der CREM α mRNA Gehalt vor und nach der Stimulation für 6 Stunden mit anti-CD3/antiCD28-Antikörper wurde mittels Real Time PCR bestimmt. Die Abbildung zeigt die relative Expression der transgenen Mäuse im Vergleich zu Wildtyp Mäusen (n = 4, P = 0,002, P <0,001, die Fehlerbalken markieren die Standardabweichung).

Neben der RNA-Expression wurde auch die CREM α -Proteinexpression über einen Western Blot ermittelt. Hierfür wurde zuerst die Gesamtproteinkonzentration durch den Bradford-Test bestimmt. Anschließend wurden von jeder Probe genau gleiche Mengen an Protein aufgetragen. Als interne Kontrolle der Proteinkonzentration diente ein anti-Aktin-Antikörper. Genau wie bei der mRNA, zeigten die CREM α -transgenen Mäuse auch auf Proteinebene eine vermehrte CREM α -Expression (Abb. 13).

**Abbildung 13: CREM α Proteinexpression**

Western Blot Analyse der CREM α -transgenen und einer Wildtyp Maus mit einem anti-CREM-Antikörper. Als interne Kontrolle erfolgte die Detektion des Aktin Gehaltes.

5.2. T-Zell-Proliferation der CREM α -CD2 Mäuse

IL-2 ist ein Schlüsselzytokin für die Proliferation von T-Zellen und somit die Immunantwort. Die IL-2 Produktion bei SLE-Patienten ist durch eine Hemmung der Gen-Transkription vermindert. Die Überexpression des transkriptionellen Repressors CREM α wurde als ein Faktor identifiziert, der für die verminderte IL-2 Produktion in SLE-T-Zellen *in vitro* verantwortlich ist. So konnte durch ein Ausschalten von CREM α in SLE T-Zellen die Anergie durchbrochen und die IL-2 Produktion wiederhergestellt werden (117). Des Weiteren wurde die Bindung von CREM α an die -180-CRE-Bindungsstelle des IL-2-Promotors nachgewiesen (120). Diese Bindung fördert die Histondeacetylierung, wodurch der Zugang zu der Promotorregion erschwert und so die Transkription des Promotors gehemmt wird (119).

5.2.1. CREM α hemmt die IL-2 Expression *in vivo*

Um den Einfluss der CREM α -Überexpression auf die T-Zell Proliferation *in vivo* zu untersuchen, wurde zuerst die Bindung von CREM α an den IL-2-Promotor geprüft. Hierzu wurden frisch isolierte T-Zellen für 6 Stunden mit anti-CD3- und anti-CD28-Antikörper stimuliert und anschließend die CREM-DNA-Komplexe mittels CHIP präzipitiert. Der Nachweis der Bindung erfolgte durch eine RT-PCR mit spezifischen Primern für den IL-2-Promotor. Bei den CREM α -transgenen Mäusen konnte so eine bis zu 8-fach erhöhte Bindung nachgewiesen werden (Abb. 14).

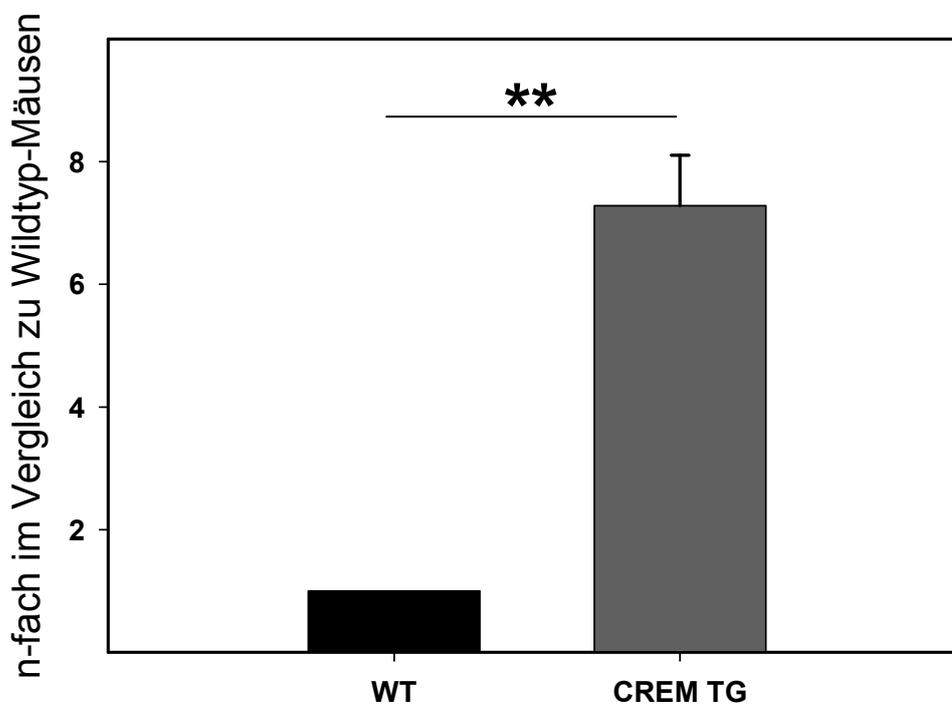


Abbildung 14: Bestimmung der CREM α Bindung an den IL-2-Promotor

Bei dem CREM α CHIP wurde der CREM α -Promotorkomplex mit einem CREM Antikörper gefällt und anschließend die Menge des gefällten Promotor-Fragmentes in einer Real Time PCR bestimmt. Die gemessenen ct-Werte wurden um die eingesetzte Probenmenge bereinigt. Dargestellt ist die gesteigerte CREM-Bindung bei den CREM α -transgenen Mäusen im Vergleich zu Wildtyp Mäusen (n = 3, P = 0,003, die Fehlerbalken markieren die Standardabweichung)

Als funktionelle Konsequenz der Bindung von CREM α war die IL-2 mRNA Expression in den stimulierten T-Zellen der CREM α -transgenen Mäuse vermindert (Abb. 15). Dies wurde auch auf Proteinebene mittels Cytometric Bead Array nach viertägiger Stimulation mit anti-CD3-/anti-CD28-Antikörper in den CREM α transgenen T-Zellen bestätigt (Abb. 16). Insgesamt bestätigten diese Ergebnisse die Rolle von CREM α als transkriptionellen Repressor, der direkt in die IL-2 Transkription von T-Zellen eingreift.

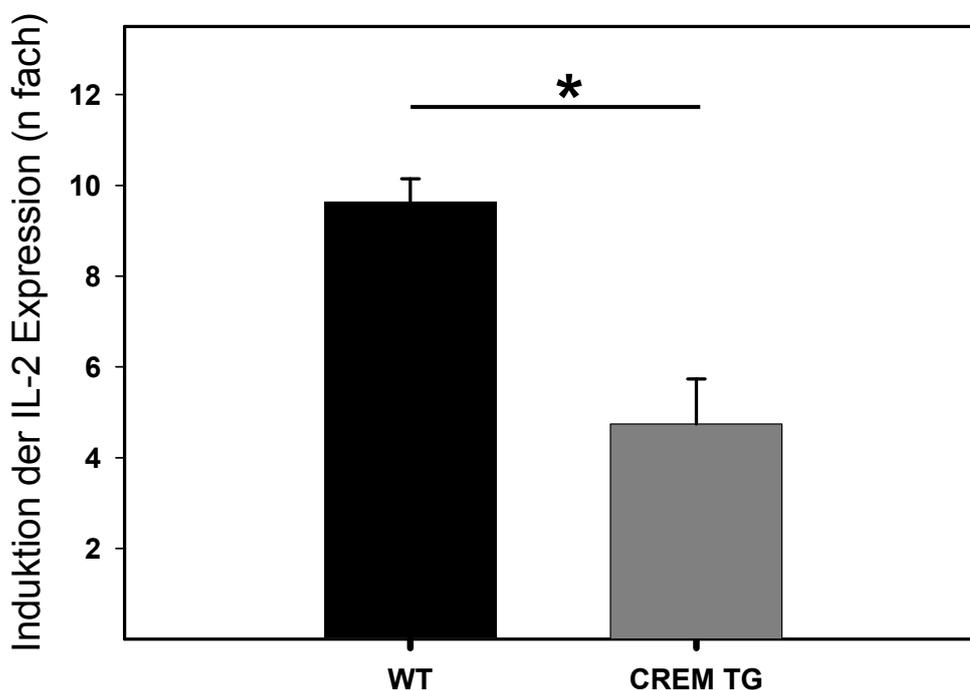


Abbildung 15: IL-2 mRNA Expression nach der Stimulation mit anti-CD3/anti-CD28-Antikörpern

T-Zellen aus CREM α -transgenen und Wildtyp Mäusen wurden für 6 Stunden mit anti-CD3/anti-CD28-Antikörpern stimuliert und die IL-2 Expression mit einer Real Time PCR bestimmt. Dargestellt ist die Induktion der IL-2 Expression durch die Stimulation mit den anti-CD3/anti-CD28-Antikörpern (n = 4, P = 0,034, die Fehlerbalken markieren die Standardabweichung).

5.2.2. Die Hemmung der IL-2 Expression vermindert die T-Zell Proliferation

Da IL-2 der Hauptfaktor für die T-Zellteilung ist, wurde auch der Einfluss der CREM α Überexpression auf die T-Zell Proliferation untersucht. Hierfür wurden frisch isolierte T-Zellen mit CFSE markiert, für bis zu 5 Tage auf verschiedene Weisen stimuliert und an den Tagen 3, 4 und 5 die Proliferationsrate mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Wie Abbildung 17 zeigt, lag die Proliferationsrate bei den CREM α -transgenen Mäusen unabhängig von der Stimulation und dem Zeitpunkt der Messung immer deutlich unter der der Wildtyp Mäuse. Die als Gegenprobe gleichzeitig gemessenen nicht stimulierten T-Zellen zeigten erwartungsgemäß weder bei den CREM α -transgenen noch bei den Wildtyp Mäusen nach 5 Tagen eine nennenswerte Proliferation.

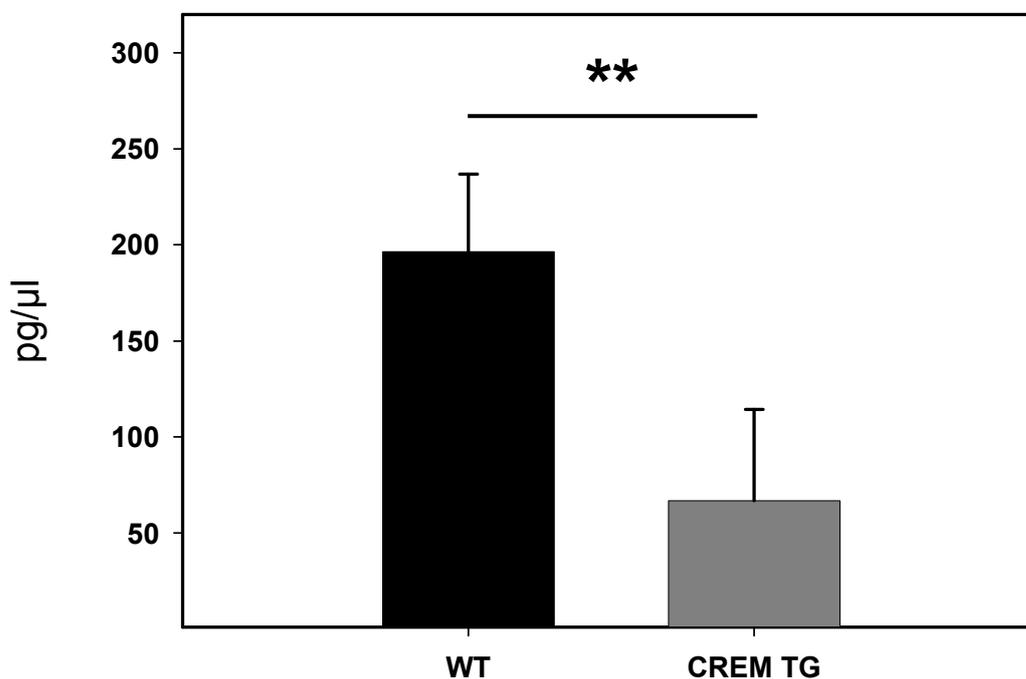


Abbildung 16: IL-2 Proteingehalt im Überstand der Zellkultur

T-Zellen aus CREM α -transgenen und Wildtyp Mäusen wurden für 5 Tage mit anti-CD3/anti-CD28-Antikörpern stimuliert. Der IL-2 Gehalt im Überstand der dieser Zellkulturen wurde mit einem IL-2 Cytometric Bead Assay bestimmt (n = 4, P = 0,004, die Fehlerbalken markieren die Standardabweichung).

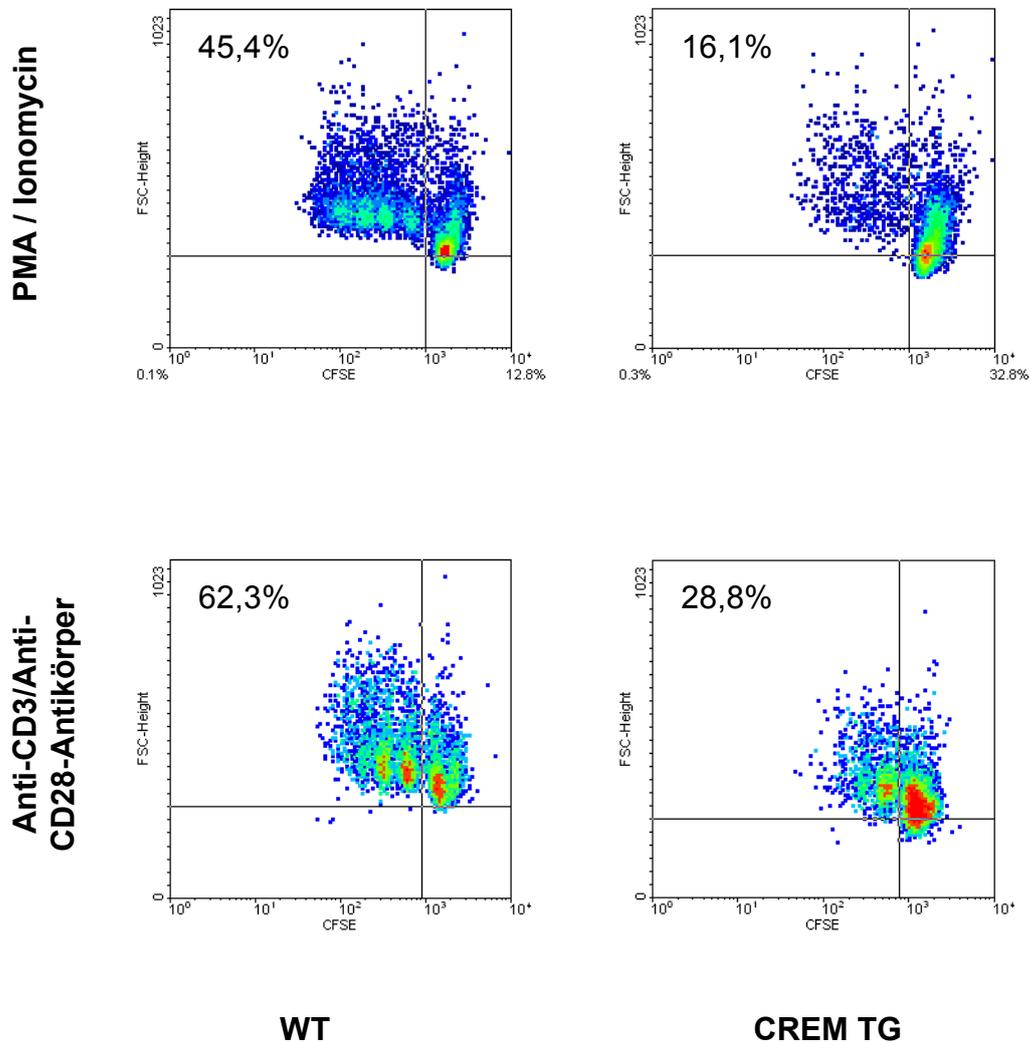


Abbildung 17: T-Zellproliferation

Zur Messung der T-Zellproliferation wurden die Zellen mit CFSE markiert und am vierten Tag die Proliferationsrate durchflusszytometrisch bestimmt. Bei der Proliferation verteilt sich der CFSE Farbstoff zu gleichen Teilen bei jeder Zellteilung auf die zwei neu entstandenen Zellen. Somit lässt die Abnahme der Fluoreszenz auf die Anzahl der Zellteilungen schließen. Alle Proliferierten Zellen befinden sich daher im oberen linken Quadranten. Die Prozentzahlen geben den Anteil der proliferierten Zellen an der Gesamtpopulation an. (n = 4).

Untersuchungen bei CREM knockout Mäusen bestätigten den hier gezeigten negativen Einfluss von CREM α auf die Proliferation von T-Zellen. Durch den knockout von CREM konnte diese im Vergleich zu Wildtyp Zellen deutlich gesteigert werden (noch nicht publizierte Daten).

5.3. CREM α -CD2 Mäuse entwickeln eine verstärkte Kontaktallergie

Basierend auf diesen *in vitro* Daten wurde das Verhalten der CREM α überexprimierenden T-Zellen in einem *in vivo* Modell untersucht. Hierzu wurden die Mäuse durch das Auftragen von DNFB auf die rasierte Bauchhaut und die Fußballen sensibilisiert. Nach einer Woche wurde auf die ventrale und dorsale Seite des linken Ohres erneut DNFB aufgetragen, während das andere Ohr als Kontrolle diente und lediglich mit Aceton / Olivenöl behandelt wurde. Durch den zweimaligen Kontakt mit dem Hapten DNFB wurde eine Kontaktallergie ausgelöst. Beim ersten Kontakt werden Langerhans-Zellen aktiviert, die dann zu den lokalen Lymphknoten wandern und Lymphozyten stimulieren, die sich danach in Gedächtniszellen umwandeln. Diese Sensibilisierung dauert eine Woche und verläuft ohne erkennbare Symptome. Erst nach einem Zweitkontakt wandeln sich die antigenspezifischen Gedächtniszellen in Effektorzellen um und lösen eine Überempfindlichkeitsreaktion aus. Hierbei kommt es zu einer Einwanderung weiterer Zellen des Immunsystems sowie einer T-Zell Proliferation am Ort der Entzündung (33). Die daraus resultierende Schwellung stellt einen Indikator für die Stärke der Entzündungsreaktion dar. Entgegen der Vermutung, die aufgrund der verminderten IL-2 Produktion und daraus resultierenden verminderten Proliferation *in vitro* eine geringere Entzündungsreaktion bei den CREM α -CD2 Mäusen erwarten ließ, zeigten die transgenen Mäuse sowohl 24 Stunden als auch 48 Stunden nach dem Auslösen der Kontaktallergie eine signifikant stärkere Ohrschwellung als die Wildtyp-Mäuse.

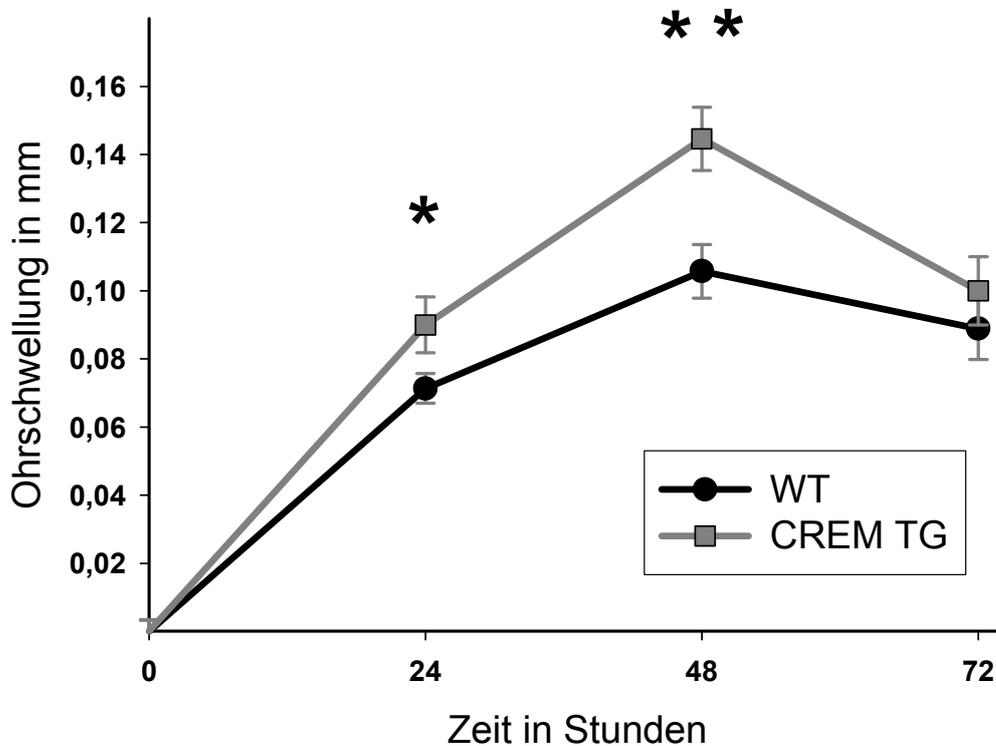


Abbildung 18: Ohrschwellung nach Auslösen einer Kontaktallergie mit DNFB

Die Mäuse wurden an Tag 0 mit DNFB sensibilisiert. An Tag 6 erfolgte das Auslösen der Kontaktallergie durch das Auftragen von 10 μ l 0.3% DNFB in Acetone/Olivenöl (4:1) auf der ventralen und dorsalen Seite des linken Ohres. Das rechte Ohr wurde zur Kontrolle nur mit Acetone/Olivenöl (4:1) behandelt. Die Kontaktallergie wurde über Messung der Ohrschwellung des behandelten im Vergleich zu dem unbehandelten Ohres bestimmt (n = 10, P = 0,049, P = 0,004, die Fehlerbalken markieren die Standardabweichung).

5.3.1. CREM α -CD2 Mäuse zeigen eine gesteigerte T-Zell-Proliferation von aktivierten T-Zellen

Die bei einer Kontaktallergie gemessene verstärkte Ohrschwellung resultiert aus einer vermehrten Proliferation und Einwanderung von Entzündungszellen. Bei einer Kontaktallergie, die durch DNFB ausgelöst wird, konnte in vielen Studien die entscheidende Rolle von T-Zellen nachgewiesen werden (34). Um die Proliferation der CREM α -transgenen und der Wildtyp- T-Zellen in dem entzündeten Gewebe zu bestimmen wurden die T-Zellen direkt aus den regionalen mandibulären Lymphknoten der betroffenen Ohren isoliert und in Analogie zu den *in vitro* stimulierten T-Zellen (s. 6.2.2.), die Proliferationsrate bestimmt. Entgegen den T-Zellen aus den Kontroll-Lymphknoten zeigten die T-Zellen aus den regionalen Lymphknoten der betroffenen Ohren eine im Vergleich zu den Wildtyp T-Zellen verstärkte Proliferationsrate bei den CREM α -transgenen Tieren.

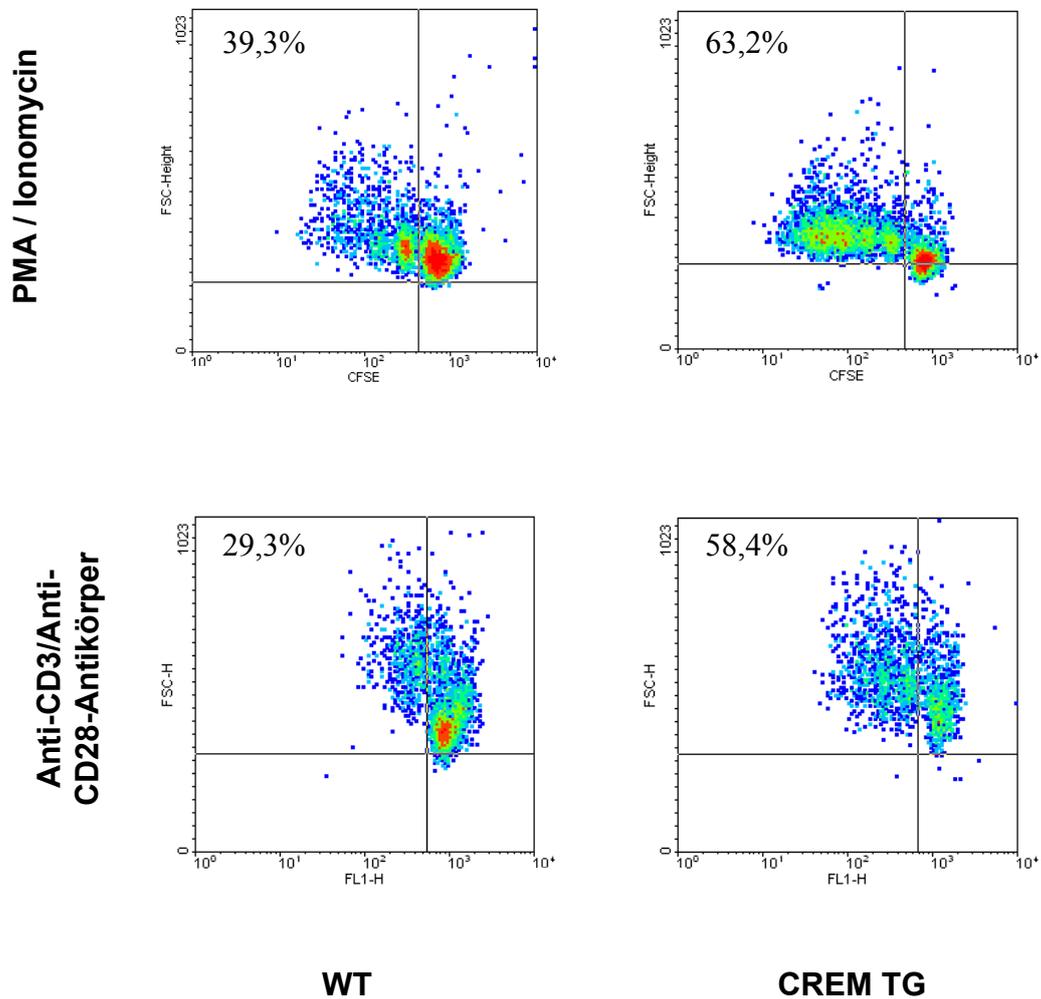


Abbildung 19: T-Zellproliferation nach der Kontaktallergie

48 Stunden nach der Induktion der Kontaktallergie wurde die T-Zellen aus den lokalen Lymphknoten isoliert, mit CFSE markiert und für 4 Tage mit anti-CD3/anti-CD28-Antikörpern oder PMA/Ionomycin stimuliert. Die T-Zellproliferation wurde zytometrisch bestimmt (n = 4).

5.3.2. IL-2-Produktion in den regionalen Lymphknoten

Die T-Zell-Proliferation ist, wie beschrieben, vor allem von der IL-2 Expression abhängig. Eine Analyse des IL-2-Gehaltes im Überstand der proliferierten T-Zellen zeigt einen leichten Anstieg bei den CREM α -transgenen T-Zellen im Vergleich zu dem Gehalt bei den nicht aktivierten Zellen, dieser lag aber immer noch signifikant unter der IL-2-Expression in Wildtyp Zellen. Diese Daten deuten darauf hin, dass bei den T-Zellen die an dem Entzündungsprozess beteiligt sind, zusätzlich zu IL-2 andere Faktoren eine Rolle spielen.

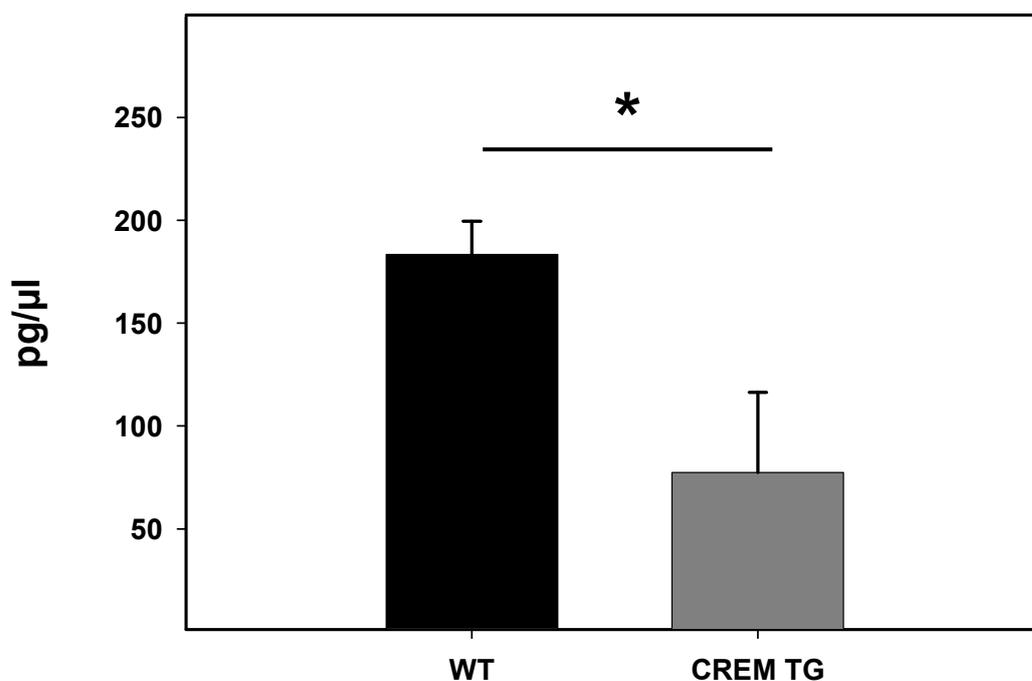


Abbildung 20: IL-2 Proteingehalt im Überstand der T-Zellkultur nach der Kontaktallergie

48 Stunden nach der Induktion der Kontaktallergie wurden die T-Zellen aus den regionalen Lymphknoten isoliert, mit CFSE markiert und für 5 Tage mit anti-CD3/anti-CD28-Antikörpern stimuliert. Der IL-2 Gehalt im Überstand der dieser Zellkulturen wurde mit einem IL-2 Cytometric Bead Assay bestimmt (n = 4, P = 0,048, die Fehlerbalken markieren die Standardabweichung).

5.3.3. Der Einfluss von regulatorischen T-Zellen auf die gesteigerte Kontaktallergie

IL-2 fördert nicht nur allgemein die Proliferation der T-Zellen, sondern ist auch ein essentieller Regulator der Expression von CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ exprimierenden T-Zellen (128). Diese sogenannten regulatorischen T-Zellen (Treg) können Entzündungsreaktionen eindämmen und Autoimmunität verhindern. Ein möglicher Auslöser für die verstärkte Kontaktallergie in den transgenen Mäusen könnte daher in einer verminderten Anzahl von regulatorischen Zellen liegen. Diese wären dann nicht mehr in der Lage, die Entzündung einzudämmen, was den Anstieg der Ohrschwellung zur Folge hätte. Eine Analyse der FoxP3 mRNA-Expression in dem entzündeten Gewebe mittels RT-PCR (Abb. 21), wie auch der FoxP3 Produktion in den aktivierten Lymphknoten und der Milz über FACS-Färbungen zeigten jedoch keinen Unterschied zwischen den CREM α -CD2 Mäusen und Wildtyp-Mäusen (nicht dargestellt). Somit ist ein Einfluss von Tregs bei der Entstehung der gesteigerten Kontaktallergie unwahrscheinlich.

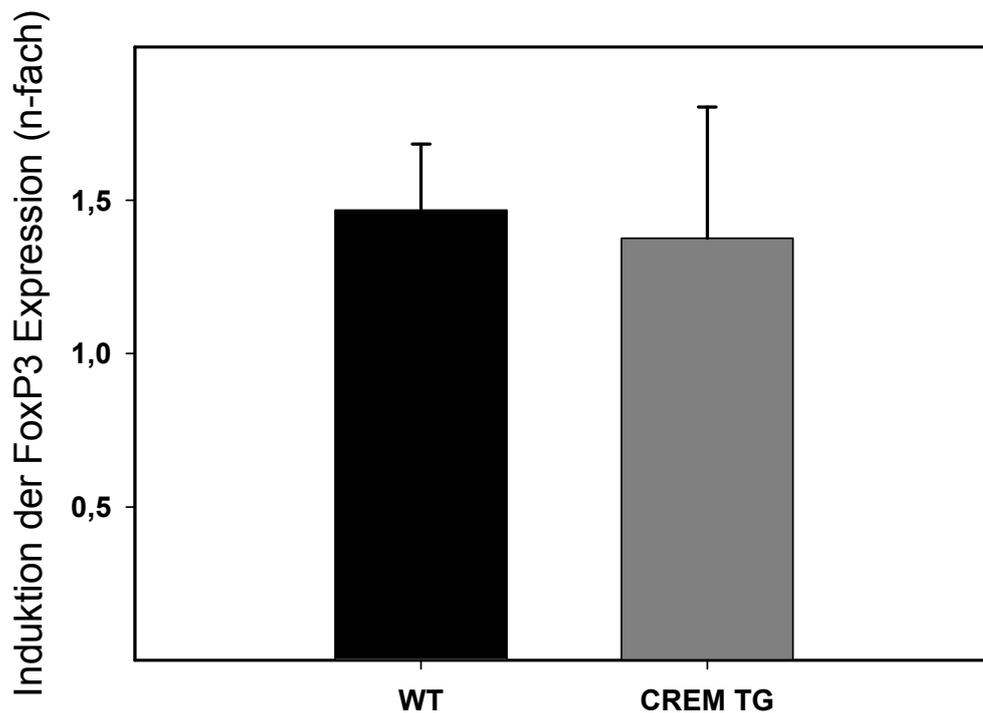


Abbildung 21: FoxP3 mRNA Expression

24 Stunden nach Induktion der Kontaktallergie wurde die Gesamt-RNA aus den entzündeten Ohren mittels der Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction isoliert und die FoxP3 Expression in einer Real Time PCR bestimmt. Dargestellt ist die Induktion der mRNA Expression durch die Kontaktallergie (n = 3).

5.4. Vermehrte Produktion von IL-17 in CREM α -transgenen Mäusen

Um die Auslöser der gesteigerten Immunantwort auf die Entzündung bei der Kontaktallergie zu identifizieren, wurde die mRNA Expression verschiedener proinflammatorischer Zytokine im entzündeten und im nicht entzündeten Gewebe gemessen. Hierzu wurde aus den Mäuseohren die Gesamt-RNA durch die Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction isoliert und die Expression mittels RT-PCR bestimmt. Hierbei zeigt sich eine erhöhte Expression von IL-6, IL-17, IL-21, IL-23, IFN γ und TNF α in den mit DNFB

behandelten Ohren sowohl bei den Wildtyp- als auch bei den CREM α -transgenen Mäusen. Während bei der mRNA Produktion von IFN γ und TNF α kein Unterschied zu Wildtyp-Mäusen zu erkennen war, war die Expression von IL-17, IL-21, IL-22 und IL-23 in den CREM-transgenen Mäusen zwischen zwei- und neunfach erhöht. Die IL-6 Produktion in den CREM α -transgenen Mäusen war zwar auch gegenüber den Wildtyp-Mäusen erhöht, jedoch war dies nicht statistisch signifikant.

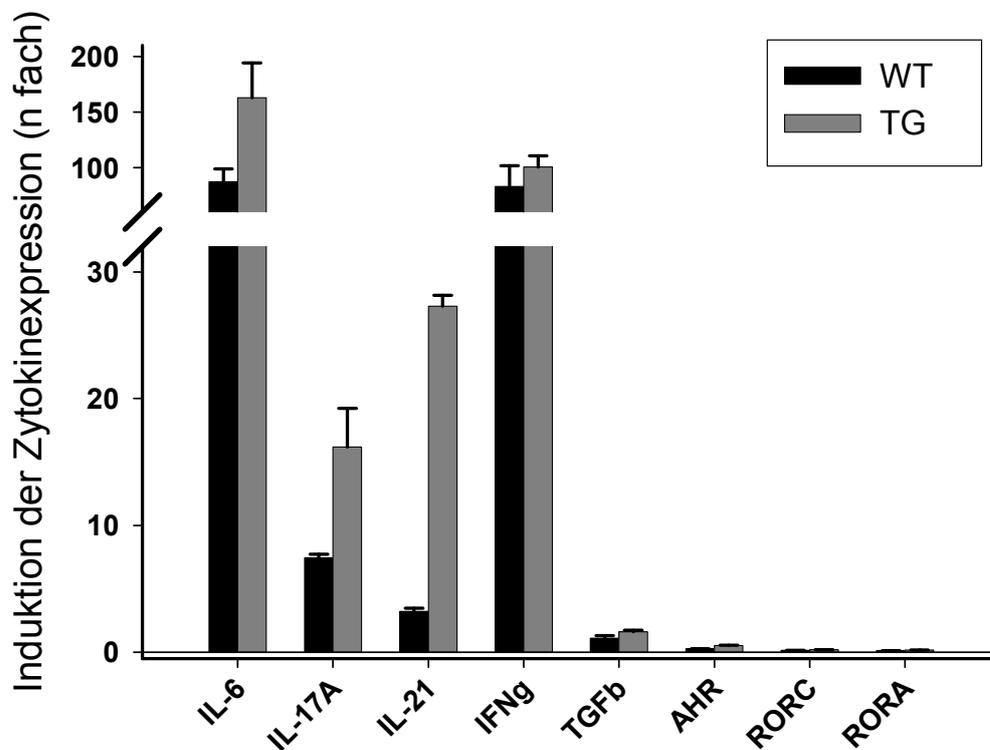


Abbildung 22: Zytokin mRNA Expression im entzündeten Gewebe

24 Stunden nach Induktion der Kontaktallergie wurde die Gesamt-RNA aus den entzündeten Ohren mittels der Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction isoliert und die Expression verschiedener Zytokine und Transkriptionsfaktoren mit in einer Real Time PCR bestimmt, Dargestellt ist die Induktion der Zytokinexpression durch die Kontaktallergie (n = 3, IL-6: P = 0,086, IL-17: P = 0,045, IL-21: P <0,001, IL-23: P = 0,002, die Fehlerbalken markieren die Standardabweichung).

Entsprechend der mRNA Expression war auch der Gehalt von IL-17 Protein im entzündeten Gewebe bei den CREM α -transgenen Mäusen deutlich höher als bei den Wildtyp-Mäusen. Durch die Analyse von Gewebeschnitten des entzündeten Gewebes, die neben einem IL-17 Antikörper mit einem CD3 Antikörper gefärbt wurden, konnte zudem eine Co-Lokalisation von T-Zellen und IL-17 Protein nachgewiesen werden. Neben dem Nachweis einer IL-17 Überexpression im Gewebe, war auch in den T-Zellen der regionalen Lymphknoten bei den mit DNFB behandelten Ohren die IL-17 Expression erhöht. Um dies zu untersuchen wurden die T-Zellen 24h nach dem Auslösen der Kontaktallergie aus den Lymphknoten isoliert und im Durchflusszytometer die IL-17 Expression intrazellulär gemessen. Durch eine Co-Färbung mit CD4 konnten die IL-17 exprimierenden T-Zellen als CD4⁺ Zellen, also so genannte T-Helferzellen, identifiziert werden.

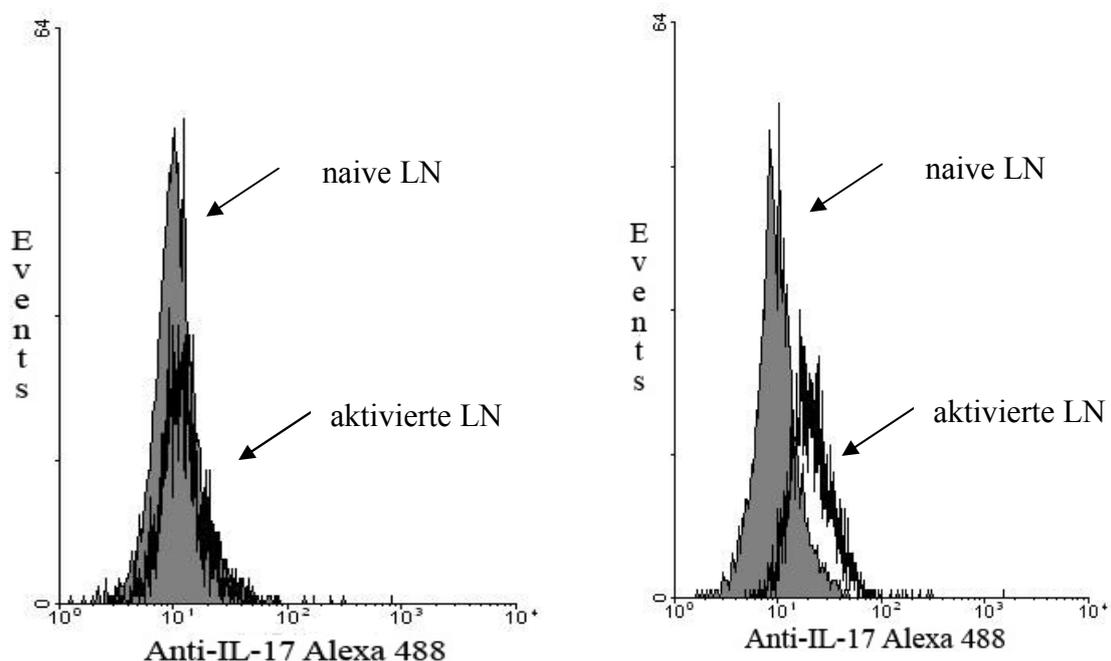


Abbildung 23: IL-17 Proteinexpression

Aus den durch die Kontaktallergie aktivierten Lymphknoten wurden T-Zellen isoliert, für 4 Stunden nach Zusatz von GolgiStop mit anti-CD3/anti-CD28-Antikörper stimuliert und die intrazelluläre IL-17 Konzentration der CD4⁺ Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Beispiel der vermehrte Expression von IL-17 in den CD4⁺ T-Zellen der CREM α -transgenen Mäuse (rechts) im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen (links) (n = 3).

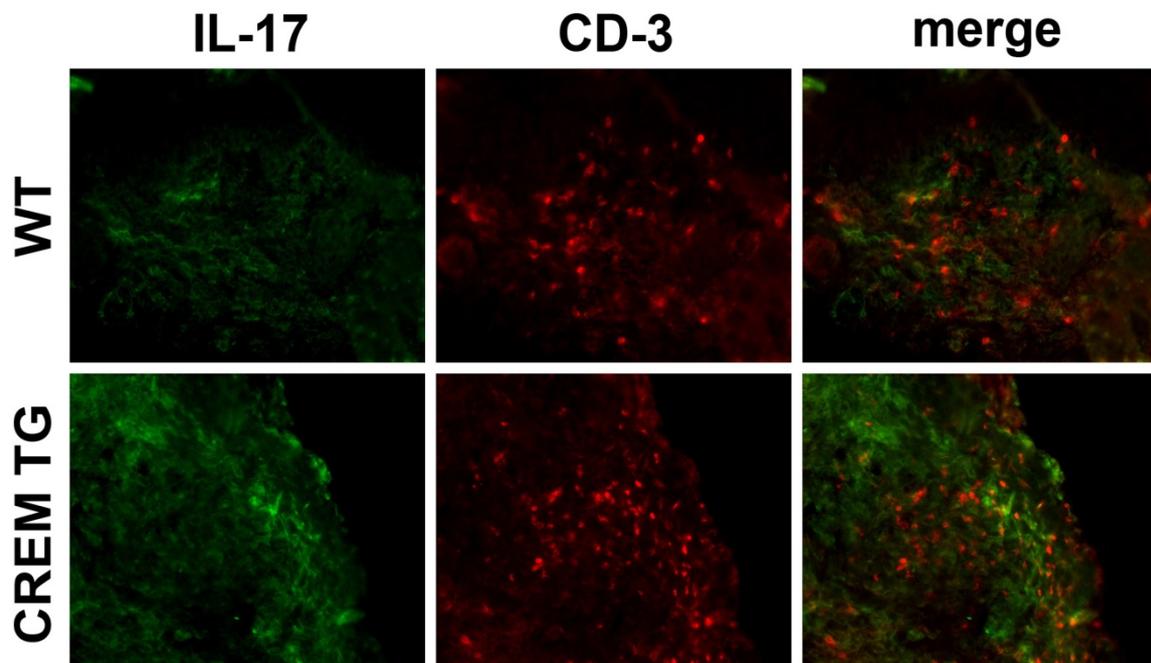


Abbildung 24: Co-Expression von IL-17 und CD3 am Ort der Entzündung

48 Stunden nach dem Auslösen der Kontaktallergie wurden die Mäuseohren bei -70°C schockgefroren, mit einem Cryostat geschnitten und mit Aceton fixiert. Die unspezifischen Bindungen wurden durch zweistündige Zugabe von PBS + 3% FCS blockiert. Abschließend erfolgte die Färbung der Schnitte mit einem IL-17 Alexa 488 Antikörper (grün) und einem anti-CD3 Antikörper (rot). Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Beispiel eines Gewebeschnittes ($n = 4$).

IL-17 ist das Markerzytokin der so genannten Th17-Zellen. Diese Zellen wurden bereits mit einer Reihe von entzündlichen Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht. Des Weiteren wurde IL-17 als ein Zytokin identifiziert, welches für die Ausbildung einer Kontaktallergie von entscheidender Bedeutung ist. So führt eine Blockade von IL-17 zu einer deutlichen Reduktion der Krankheitsaktivität (42). Zudem zeigen IL-17 knock out Mäuse eine gestörte antigen-spezifische T-Zell-Sensibilisierung, die ebenfalls zu einer verminderten Kontaktallergie führt (88). IL-17 scheint auch einen direkten Einfluss auf die T-Zell-Proliferation zu haben. So konnte gezeigt werden, dass T-Zellen durch die Zugabe von IL-17 deutlich besser proliferieren. Dieser Effekt ließ sich zwar durch die Blockade der durch die Zugabe von IL-17 ebenfalls gesteigerten IL-2 Expression teilweise reduzieren, jedoch nicht ganz aufheben (18). Die Ergebnisse der Untersuchungen der Kontaktallergie deuten demnach daraufhin,

dass es bei den CREM α -transgenen Mäusen zu einer vermehrten Proliferation der T-Zellen in den Lymphknoten und daraufhin zur Einwanderung von Th17-Zellen in das entzündete Gewebe gekommen ist, die der Auslöser für die gesteigerte Entzündungsreaktion waren.

Bisher waren für die Entstehung von Th17-Zellen insbesondere die Expression der 3 Transkriptionsfaktoren AhR, ROR γ T und ROR α als bedeutsam beschrieben (6, 18, 50, 98, 131). Eine Analyse der mRNA-Expression dieser Faktoren in dem entzündeten Gewebe 24 Stunden nach Induktion der Kontaktallergie bei den Wildtyp und CREM α -transgenen Mäuse zeigte bei unseren Experimenten jedoch keine Hochregulation von AhR, ROR γ T oder ROR α zu diesem frühen Zeitpunkt (Abb. 22). Damit lässt sich zwar ein Einfluss dieser Transkriptionsfaktoren im späteren Verlauf der Entzündung und bei der Entstehung der Th17-Zellen nicht ausschließen, im Anfangsstadium der Entzündung scheinen jedoch andere Faktoren für die vermehrte Bildung von IL-17 in den CREM α -transgenen Mäusen verantwortlich zu sein.

5.4.1. Induktion der IL-17 Produktion durch die Stimulation mit anti-CD3 / anti-CD28 Antikörper

Die Induktion der IL-17 Expression bereits 24 Stunden nach dem Auslösen der Kontaktallergie zeigt eine sehr schnelle Induktion von IL-17 im Rahmen einer akuten entzündlichen Reaktion. Daher stellte sich die Frage, ob es auch möglich ist, die Expression von IL-17 in CREM α -transgenen Tieren durch Stimulation von naiven T-Zellen zu induzieren, was normalerweise in T-Zellen ohne Zugabe von zusätzlichen IL-17 stimulierenden Faktoren wie IL-1 β , IL-6 oder IL-23 nicht gelingt. Hierfür wurden T-Zellen aus der Milz isoliert und für 6 Stunden mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörper stimuliert. Die Messung der mRNA zeigt auch hier eine vermehrte Expression von IL-17 und IL-21 bei den CREM α -transgenen Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen. Die

Transkriptionsfaktoren ROR γ T, ROR α und AhR waren hingegen, wie auch bei der Kontaktallergie, zu diesem fröhem Zeitpunkt nicht verstärkt transkribiert.

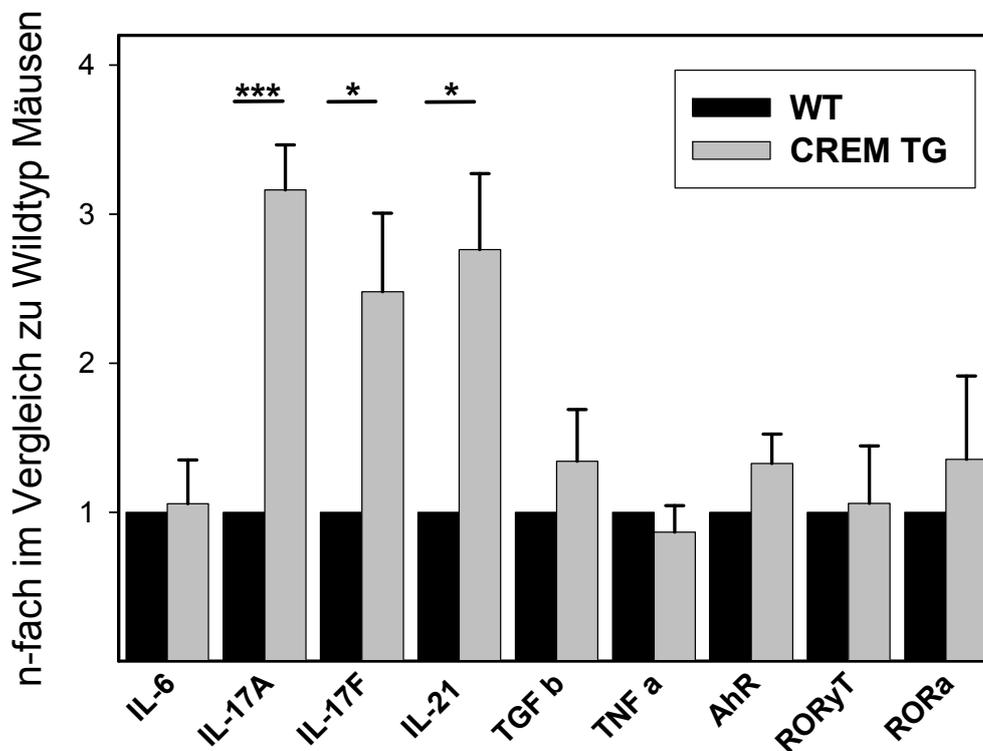


Abbildung 25: Zytokinexpression nach der Stimulation mit anti-CD3/anti-CD28-Antikörper

Zur Messung der Zytokinexpression wurden T-Zellen aus der Milz isoliert und für 6 Stunden mit anti-CD3/anti-CD28-Antikörpern stimuliert. Nach Isolierung der mRNA wurde die Expression mit einer Real Time PCR bestimmt (n = 3, IL-17A: P = 0,001, IL-21: P = 0,029, IL-17F: P = 0,029, die Fehlerbalken markieren die Standardabweichung).

Diese Daten zeigen, dass allein die vermehrte Bildung von CREM α in den T-Zellen zu einer komplexen Dysregulation der T-Zell-Antwort sowie einer vermehrten Expression von proinflammatorischem IL-17 führt. Dies ist vor allem deshalb interessant, weil es sich bei CREM α um einen transkriptionellen Repressor handelt und somit ein direkter Einfluss auf die IL-17 Expression unwahrscheinlich ist. Auch eine Regulation über die bisher identifizierten Transkriptionsfaktoren der IL-17 Expression, ROR γ T, ROR α und AhR, ist zu

diesem frühem Zeitpunkt der T-Zell-Antwort aufgrund der mangelnden Induktion der mRNA Expression nicht wahrscheinlich. Vielmehr ist eine indirekte Beeinflussung der IL-17 Produktion durch CREM α anzunehmen.

5.5. IL-21 verstärkt die IL-17 Produktion in CREM α -CD2 Mäusen

Sowohl bei der Kontaktallergie als auch bei der Stimulation der naiven T-Zellen mit anti-CD3- und anti-CD28-Antikörper war die vermehrte IL-17 Expression mit einer noch deutlicheren Steigerung der IL-21 Expression verknüpft (Abb. 22 und 25). IL-21 gehört zu der Familie der IL-2 Zytokine. Es induziert die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren JAK1 und JAK 3, sowie STAT1, STAT3 und STAT5 (36, 60, 147). IL-21 wird primär von aktivierten CD4⁺ Zellen und NK-Zellen produziert ((15, 37). Murine Th17-Zellen produzieren große Mengen an IL-21 und scheinen die überwiegende Quelle der IL-21 Produktion in Mäusen zu sein (61, 91, 139, 148). Die Bildung von Th17-Zellen in IL-21 knock out Mäusen ist stark vermindert, während die Zahl regulatorischer T-Zellen im Vergleich zu wildtyp Mäusen erhöht ist (61, 91). Abhängig von dem Zytokinmilieu und den kostimulatorischen Faktoren induziert IL-21 die Differenzierung und Aktivierung von NK-Zellen, unterstützt die T-Zell Proliferation oder führt zu einer vermehrten Differenzierung von Th17-Zellen (111).

5.5.1. Die Inaktivierung von IL-21 führt zu einer Reduktion der IL-17 Expression bei CREM α -transgenen Mäusen

Da IL-21 sowohl von Th17-Zellen gebildet wird als auch deren Differenzierung unterstützt, perpetuiert IL-21 die Induzierung eines Th17-Phänotyps. Daher stellte sich die Frage, welchen Einfluss eine Blockade von IL-21 durch ein lösliches IL-21 Rezeptor Fc Fragment auf die IL-17 Überexpression bei den CREM α -transgenen Mäusen hat. Hierfür wurden frisch isolierte T-Zellen aus

CREM α -transgenen und Wildtyp-Mäusen für 6 Stunden mit anti-CD3-/anti-CD28-Antikörpern stimuliert, wobei zu je einem Ansatz 20 μ g IL-21RFc zur Blockade des IL-21 zugegeben wurde. Mittels einer RT-PCR wurde dann die IL-17 mRNA Expression bestimmt. Wie Abbildung 26 zeigt, konnte bei den CREM α -transgenen Mäusen durch die Blockade von IL-21 die IL-17 Expression um fast 75% gesenkt werden, was die entscheidende Bedeutung von IL-21 bei der Generierung des Th17-Phänotyps in den CREM α -transgenen Mäusen zeigt.

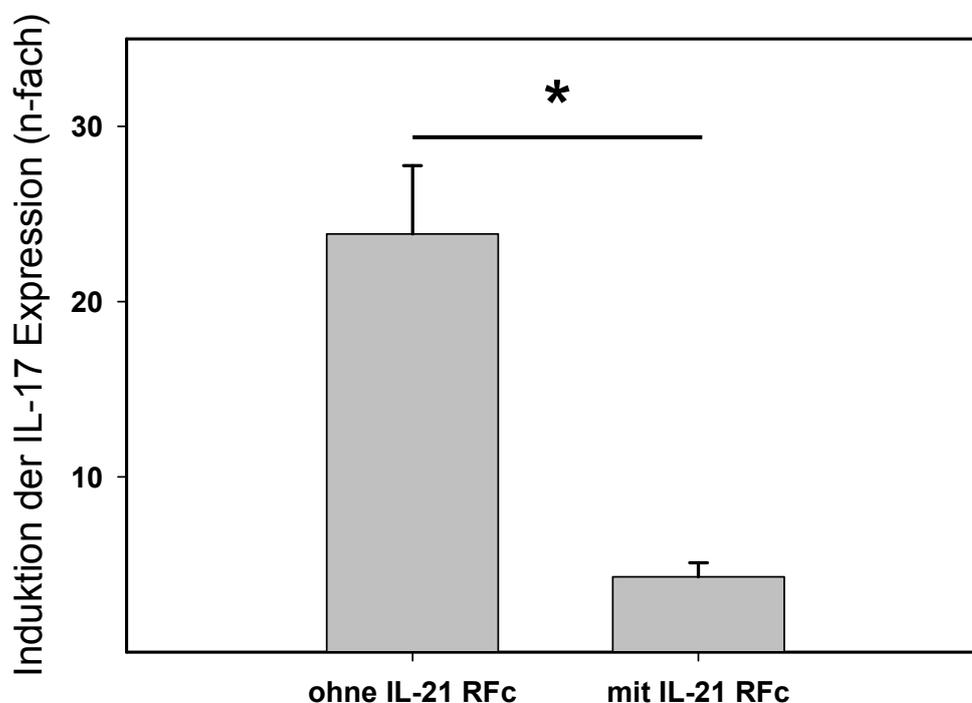


Abbildung 26: IL-17 mRNA Expression nach Blockade von IL-21

T-Zellen wurden aus der Milz isoliert und für 6 Stunden in Gegenwart von IL-21RFc und ohne die Blockade von IL-21 für 6 Stunden mit anti-CD3/anti-CD28-Antikörpern stimuliert. Es folgte die Messung der IL-17 mRNA Expression mittels Real Time PCR. Dargestellt ist die Induktion der Expression im Vergleich zu nicht stimulierten T-Zellen ($n = 3$, $P = 0,011$, die Fehlerbalken markieren die Standardabweichung).

5.5.2. CREM α -transgene T-Zellen weisen einen vermehrten Kalziumeinstrom auf

Die Expression von IL-21 wird genau wie bei IL-2, durch die Aktivierung des T-Zell-Rezeptors induziert. Allerdings reicht bei IL-21 das durch die Aktivierung über den „nuclear factor of activated T cells“ (NFAT) vermittelte Kalziumsignal aus, um die Transkription zu regulieren (54). Ein vermehrter Kalziumeinstrom und damit eine vermehrte Aktivierung von NFAT führen daher folgerichtig zu einer vermehrten Expression von IL-21. Die Messung des Kalziumeinstroms erfolgte über die Bestimmung der intrazellulären Kalziumkonzentration mit Fura2. Fura2 bildet mit Kalzium einen Gelatkomplex dessen Konzentration sich photometrisch bestimmen lässt. Durch die kontinuierliche Messung der Extinktion sowohl vor der Aktivierung der T-Zellen durch einen anti-CD3-Antikörper als auch danach, lässt sich der Einstrom von Kalzium über den T-Zell-Rezeptor ermitteln

Ein Vergleich der intrazellulären Kalziumkonzentration in den CREM α -transgenen und den Wildtyp Mäusen zeigt einen deutlich stärkeren Anstieg in den CREM α -transgenen Mäusen nach der Aktivierung des T-Zell-Rezeptor/CD3 Komplexes.

Interessanterweise konnte auch bei T-Zellen von SLE-Patienten ein vermehrter Kalziumeinstrom über den T-Zell-Rezeptor/CD3 Komplex und eine daraus resultierende vermehrte Aktivierung von NFAT gezeigt werden (64, 70). Der T-Zell-Rezeptor/CD3 Komplex besteht neben dem eigentlichen T-Zell-Rezeptor aus dem CD3-Co-Rezeptor, einem Komplex aus einer CD3 γ Kette, einer CD3 δ Kette, zwei CD3 ϵ Ketten und zwei die anderen Ketten umschließenden CD3 ζ Ketten.

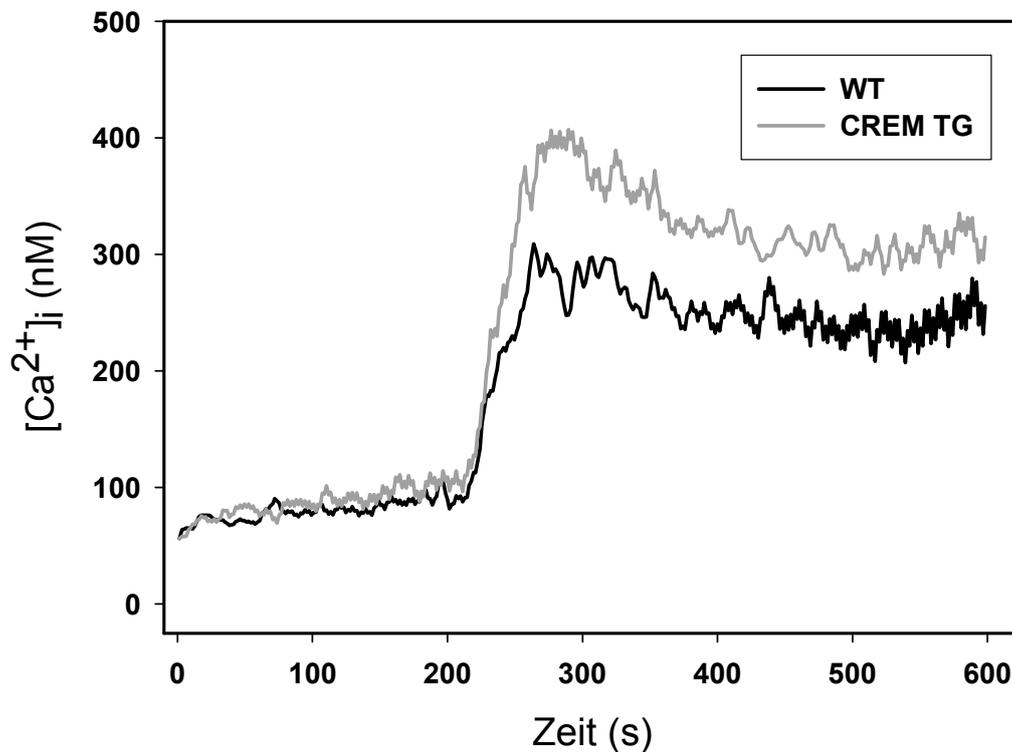


Abbildung 27: Kalziueinstrom nach Aktivierung des T-Zell-Rezeptors

Zur Messung des Kalziueinstroms wurden T-Zellen aus der Milz isoliert und mit Fura/2 gelabelt. Die intrazelluläre Kalziumkonzentration wurde über einen Zeitraum von 10 Minuten zytometrisch bestimmt. Die Aktivierung des T-Zell-Rezeptors erfolgte nach 200 Sekunden durch die Zugabe von einem anti-CD3-Antikörper. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel (n = 4)

5.5.3. CREM α -transgene T-Zellen zeigen eine verminderte CD3 ζ -Kettenexpression

In T-Zellen von SLE-Patienten bindet CREM α an den Promotor der CD3 ζ Kette und hemmt so seine Aktivität (121). In der Folge kommt es zu einem Austausch der verminderte CD3 ζ Kette durch die Fc ϵ R1 γ Kette. Entgegen der CD3 ζ Kette erfolgt die Regulation des Kalziueinstroms bei der Fc ϵ R1 γ Kette nicht über ZAP-70, sondern über das etwa 100fach stärker aktivierende Protein Syk (90). Auch bei den CREM α überexprimierenden CREM α -transgenen Mäusen konnte mit Hilfe der Durchflusszytometrie ein geringerer Anteil der CD3 ζ Kette am

T-Zell-Rezeptor/CD3 Komplex von CD4 und CD8 Zellen nachgewiesen werden. Die Expression des gesamten CD3 Komplexes unterschied sich dagegen nicht von dem der Wildtypen. Wie humane Zellen besitzt auch der murine CD3 ζ -Promotor eine Stelle, an die CREM α binden und so die Promotoraktivität hemmen kann. Weiterführende Untersuchungen in der Arbeitsgruppe von Dr. Klaus Tenbrock konnten in den transgenen Zellen eine vermehrte Bindung von CREM α an diese CRE-Bindungsstelle nachweisen (noch nicht publizierte Daten).

Die vermehrte Transkription von IL-21 in den CREM α -transgenen T-Zellen ist daher eine Folge des vermehrten Kalziumeinstroms durch die Hemmung der Expression der CD3 ζ -Kette durch CREM α .

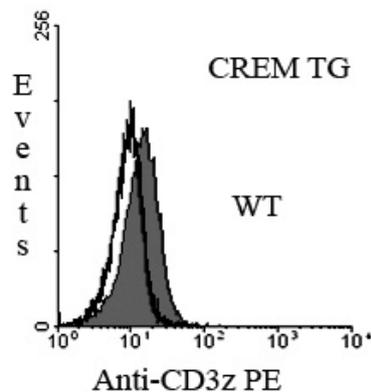


Abbildung 28: Expression der CD3 ζ Kette

Die Expression der CD3 ζ Kette wurde durch eine intracytoplasmatische Färbung bestimmt. Hierfür wurden T-Zellen aus Ctem-transgenen und Wildtyp Mäusen mit dem Anti-CD3zPE Antikörper gefärbt und die Expression photometrisch gemessen. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel (n = 3).

6. Diskussion

Die Entdeckung von IL-17 produzierenden CD4⁺ T-Zellen als eine separate T-Helferzellsubpopulation hat zu einer weitgehenden Revision des bisherigen Th1/Th2 Paradigmas geführt. 1986 wurde durch die Veröffentlichung des Th1/Th2 Konzeptes durch Mossman und Coffman der Grundpfeiler der modernen T-Zellbiologie gelegt (14, 83). Ihre Theorie basierte auf der Beobachtung, dass von eindeutig zuzuordnenden CD4⁺ T-Helferzellsubpopulationen ein festes Zytokinprofil exprimiert wird, welches zugleich die Funktion der Subpopulation bestimmt. Hiernach ließen sich IFN γ und TNF α produzierende Th1-Zellen, die die zellvermittelte Entzündungsreaktion induzieren von IL-4, IL-5 und IL-13 produzierenden Th2-Zellen unterscheiden, welche die B-Zell-Antwort unterstützen. Coffman postulierte zudem einen direkten Einfluss der Effektorzytokine der einen Subpopulation auf die Entwicklung und die Entstehung der anderen. Im Laufe der Jahre konnte durch Genanalysen und weitere molekularbiologische Untersuchungen ein komplexes Netzwerk an Janus-Kinasen (JAK), Signaltransduktoren (STAT) sowie Transkriptionsfaktoren (T-bet und GATA-3) identifiziert werden, welches die genetische Programmierung der T-Zell Differenzierung regelt.

In den letzten Jahren wurde dieses Model um IL-17, IL-21 und IL-22 produzierende CD4⁺ T-Zellen, so genannte Th17-Zellen, erweitert. Diese Zellen sind sowohl bei der antimikrobiellen Abwehr vor allem extrazellulärer Erreger (146) als auch bei verschiedenen Entzündungsreaktionen sowie Autoimmunerkrankungen beteiligt. So konnte bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis (1), Multipler Sklerose (129) und Psoriasis (141) eine direkte Verbindung zwischen der Pathophysiologie und dem Vorhandensein von Th17-Zellen hergestellt werden. Erhöhte Mengen an IL-17 finden sich auch im Plasma (143), in der Niere und in T-Zellen (16) von Patienten mit systemischen Lupus erythematodes.

Als erster spezifischer Transkriptionsfaktor für Th17-Zellen wurde ROR- γ t identifiziert (50). ROR- γ t induziert die Transkription des IL-17 Gens in naiven T-Zellen und ist zudem für die Entstehung von Th17-Zellen in Gegenwart von IL-6 und TGF- β erforderlich (148). Dabei ist allerdings die Expression von ROR- γ t alleine nicht ausreichend um eine Differenzierung von naiven Vorläuferzellen zu Th17-Zellen festzulegen. Vielmehr kommt es bei der Differenzierung der naiven Zellen zu einem Zusammenspiel mit mehreren anderen Transkriptionsfaktoren, wie ROR- α , AhR und IRF-4. Die Aktivierung von ROR- γ t führt neben der Induktion der IL-17 Transkription auch zu einer vermehrten Expression des IL-23 Rezeptors auf Th17-Zellen. Auf naiven T-Zellen findet sich dagegen kein Rezeptor für IL-23. Dies deutet darauf hin, dass IL-23 vor allem auf T-Zellen wirkt, welche bereits der Th17 Zelllinie zuzuordnen sind. So führt auch die Stimulation von sich entwickelnden Th17-Zellen mit IL-23 nicht nur zur Expression von IL-17, sondern auch von IL-22, sowie der Supprimierung der IL-10 und IFN- γ Produktion (77). Darüber hinaus stabilisiert IL-23 bestehende Th17-Zellen.

Als weitere Zytokine, welche die Bildung von IL-17 produzierenden Zellen fördern, wurden fast gleichzeitig in drei unabhängigen Arbeiten eine Kombination von TGF- β und IL-6 identifiziert (5, 76, 132). Dies war in der Hinsicht erstaunlich, da TGF- β bis dahin eher immunsupprimierende Eigenschaften zugeschrieben wurden. So exprimieren T-Zellen in Gegenwart von TGF- β alleine vor allem FoxP3, den Haupttranskriptionsfaktor für regulatorische T-Zellen (67). IL-6 hingegen hemmt die Induktion der FoxP3 Expression durch TGF- β (5) und fördert dafür zusammen mit TGF- β die Differenzierung von proinflammatorischen Th17-Zellen.

Wie bei Th1- und Th2-Zellen findet sich auch bei Th17-Zellen eine autokrine Schleife, die die Differenzierung weiterer Th17-Zellen fördert. Diese autokrine Schleife wird durch IL-21 ausgelöst. IL-21 wird in großen Menge von reifen Th17- produziert und ist wie IL-6 in der Lage, in Gegenwart von TGF- β die Differenzierung naiver T-Zellen zu Th17-Zellen zu unterstützen (61, 91, 148).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es neben den bisher bekannten Transkriptionsfaktoren einen hiervon unabhängigen Weg gibt, der zu einer vermehrten Bildung von Th17-Zellen führt. So sind die CREM α -transgenen T-Zellen durch eine verminderte IL-2 Produktion und T-Zell Proliferation, eine verminderte CD3 ζ Ketten Expression und ein dadurch resultierendes verstärktes Kalziumsignal charakterisiert. Dies führt wahrscheinlich über eine vermehrte Aktivierung von NFAT zu einer Steigerung der IL-21 Expression, welche wie beschrieben auf eine autokrine Weise die Bildung von Th17-Zellen triggert. Die einfache Überexpression von CREM α führt so über diesen Weg zu einer komplexen Dysregulierung der T-Zell Physiologie, welche schließlich in einer vermehrten Bildung von IL-17 und einer erhöhten Entzündungsaktivität im Rahmen einer Kontaktallergie mündet.

Eine mögliche Ursache warum dieser Mechanismus, trotz verschiedener Genanalysen, bisher unentdeckt blieb, ist möglicherweise die Tatsache, dass es verschiedene Spleiß-Varianten von CREM α gibt. Darüber hinaus ist CREM α unter physiologischen Bedingungen sehr engmaschig reguliert. Die Expression von CREM α wird durch die Stimulation von T-Zellen induziert. CREM α selber ist ein transkriptioneller Repressor und ist entscheidend an der Beendigung einer Immunantwort beteiligt. Durch die Bindung von CREM α an die Chromatinstruktur kommt es zu einer Rekrutierung von HDAC 1 und in folge dessen zu einer Deacetylierung des Histons (119). Deacetylierte Chromatin Strukturen sind allerdings deutlich dichter gepackt und damit bei der Genexpression schlechter ablesbar, wodurch die Transkription gehemmt wird.

Interessanterweise ähneln die CREM α transgenen T-Zellen den T-Zellen von Patienten mit SLE auf frappierende Weise. So findet sich auch bei diesen eine Verminderung der IL-2 Produktion, eine verminderte Expression der CD3 ζ Ketten und ein vermehrter Kalzium-Influx.

Dabei ist SLE zunächst eine klassische Autoimmunerkrankung mit B-Zell vermittelter Autoantikörperproduktion und Komplementaktivierung, welche in einer Entzündungsreaktion mündet. T-Zellen spielen bei dieser Erkrankung

insofern eine Rolle, als sie entscheidende Hilfen für die Reifung der B-Zellen und den Immunglobulin-Switch zur Verfügung stellen.

T-Zellen von SLE Patienten, die über den T-Zell-Rezeptor (TCR) stimuliert werden, zeigen einen verstärkten Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration, der wiederum zu einer vermehrten Phosphorylierung von zytoplasmatischem Tyrosin führt (130). Zu dieser überschießenden Zellantwort kommt es, da die CD3 ζ Kette, die in dem CD3 Komplex vor allem für die intrazelluläre Signaltransduktion verantwortlich ist, nur unzureichend gebildet wird (70). Die CD3 ζ Kette wird bei Lupuspatienten primär durch die gamma-Kette des normalen Fc-Rezeptors (FcR γ) ersetzt, was über eine vermehrte Aktivierung der Syk zu der abnormen T-Zell-Aktivierung führt (127).

In den CREM α -transgenen Mäusen konnte nun gezeigt werden, dass CREM α einen direkten Einfluss auf den TCR *in vivo* hat. So führt die Überexpression von CREM α sowohl zu einer vermehrten Kalziumantwort, nach der Stimulation des TCR durch einen anti-CD3 Antikörper als auch am TCR selber zu einer verminderten Bildung der CD3 ζ Kette. Weiterführende Untersuchungen mit den CREM α -transgenen Mäusen konnten eine vermehrte Bindung von CREM α an den CD3 ζ -Promotor als Auslöser der verminderten Expression identifizieren (noch nicht publizierte Daten)

Durch diese abnorme T-Zell-Aktivierung kommt es zu einer vermehrten Translokation und im Anschluss daran zu einer vermehrten Bindung von NFAT an seine Zielpromotoren (31). Diese sind unter anderem CD154 und IL-2. Die Bindung von NFAT an den CD154- (CD40L-) Promotor hat folgerichtig eine vermehrte Expression des Liganden von CD40 auf der Oberfläche zur Folge (21). Durch die Interaktion mit CD40 auf der Oberfläche von B-Zellen führt dies zu einer Differenzierung dieser Zellen in Plasmazellen und damit zur Produktion von Autoantikörpern.

Im Gegensatz zu CD154 kommt es trotz vermehrter Bindung von NFAT an den IL-2-Promotor nicht zu einer vermehrten IL-2 Expression (64). Ganz im Gegenteil ist die IL-2 Expression bei SLE Patienten vermindert, wodurch es zu einer verminderten T-Zellproliferation und damit einer erhöhten Infektanfälligkeit bei diesen Patienten kommt. Gleichzeitig führt eine verminderte IL-2 Produktion

zu einer verringerten aktivierten Apoptose (activation induced cell death (AICD)) und fördert so die Persistenz autoreaktiver T-Zellen. Hierbei spielen die beiden Transkriptionsregulatoren CREM α und CREB eine übergeordnete Rolle (122). Beide binden in reziproker Weise an die CRE-Bindungsstelle des IL-2-Promoters, wobei die Bindung von CREB die Transkription erhöht und CREM α diese inhibiert. Zusätzlich bindet CREM α an den c-Fos-Promotor und vermindert auch hier die Transkription. C-Fos gehört zu der Transkriptionsfaktorfamilie der Immediate early genes und fördert unter anderem die Transkription von IL-2. In T-Zellen von SLE Patienten finden sich geringe Mengen an CREB, während man sowohl eine erhöhte CREM α Konzentration als auch eine vermehrte Bindung von CREM α an den IL-2-Promotor feststellen kann. Im Serum enthaltene anti-CD3/TCR-Autoantikörper aktivieren SLE T-Zellen und führen zu einer Translokation der Kalzium/Calmodulin-abhängigen Kinase IV (CaMKIV) aus dem Zytoplasma in den Zellkern, was zu einer verstärkten Transkription von CREM α führt (118). *In vitro* wurde bereits ein direkter Zusammenhang dieser Fehlregulation mit der verminderten IL-2 Expression gezeigt (117).

In den transgenen CREM α -Mäusen konnte nun erstmal der direkte Einfluss von CREM α auf die IL-2 Produktion und damit verbundene T-Zell Proliferation *in vivo* untersucht werden. Auch hier führte eine vermehrte Expression von CREM α zu einer gesteigerten Bindung von CREM α an den IL-2-Promotor. Als funktionelle Konsequenz war auch in dem transgenen Mausmodell die IL-2 Expression vermindert und die T-Zell Proliferation gestört.

Zusammen mit den Ergebnissen von Mäusen mit einer dominant negativen Mutation des Transkriptionsfaktors cAMP responsive binding protein (CREB), die sich durch eine verminderte IL-2 Produktion und T-Zell Proliferation auszeichnen (4), belegen diese Untersuchungen die wichtige Rolle der Bindung von CREB und CREM α an die -180 CRE Bindungsstelle des IL-2-Promotors für die T-Zell Physiologie bei SLE und darüber hinaus (97).

Neben der gestörten IL-2 Expression wird auch zunehmend IL-17 mit der Pathogenese von SLE in Verbindung gebracht. So sind der Serumspiegel von

IL-17 und der IL-23 in SLE Patienten höher als in gesunden Kontrollgruppen (142, 143). Neben dem Spiegel des IL-17 Zytokins wurde auch eine erhöhte Anzahl der Th17 Zellen in Blutproben dieser Patienten nachgewiesen (143). Außer der Analyse der Blutproben wurden auch die Nieren von SLE Patienten mit einer Lupus Nephritis untersucht. Auch hier ließen sich IL-17 produzierende Zellen nachweisen, was die pathogene Bedeutung dieser Zellen bei SLE zusätzlich unterstreicht (137). Zudem konnte mittlerweile ein direkter Zusammenhang zwischen der IL-17 Plasmakonzentration und der Krankheitsaktivität hergestellt werden (24).

Zusätzlich zu den Th17 Zellen wurde eine zweite IL-17 produzierende T-Zell Population in SLE Patienten nachgewiesen. Hierbei handelt es sich um doppelt negative TCR- $\alpha\beta^+$ CD4⁻ CD8⁻ T-Zellen (DN T-Zellen) (16, 24). Normalerweise repräsentieren diese DN T-Zellen lediglich eine sehr kleine T-Zell Subpopulation, bei SLE Patienten ist ihre Zahl im peripheren Blut dagegen deutlich erhöht (17). Auch hier konnte eine vermehrte Anzahl von IL-17 produzierenden DN T-Zellen in den Nieren von SLE Patienten mit einer Lupus Nephritis nachgewiesen werden (16).

Neben diesen *in vivo* Daten ergab die Stimulation von SLE T-Zellen *in vitro* ebenfalls eine vermehrte Produktion von IL-17 (143). Diese Daten decken sich mit unseren Ergebnissen aus der Stimulation der T-Zellen der CREM α -transgenen Mäuse. Auch hier führte die Stimulation mit einem anti-CD3/anti-CD28-Antikörper zu einer Induktion der IL-17 Expression.

Th17 Zellen scheinen zudem, abgesehen von dem direkten pro-inflammatorischen Einfluss von IL-17, einen sehr weitreichenden Einfluss auf die Pathophysiologie von SLE zu haben. So wird durch die von Th17-Zellen produzierten Zytokine IL-17 und IL-21 die Produktion von Autoantikörpern durch B-Zellen gefördert (47), lokale Entzündungsreaktionen begünstigt und eine Akkumulation von Neutrophilen unterstützt (65). Eine Kultivierung von peripheren Blutmonozyten aus Patienten mit einer Lupus Nephritis führte in Gegenwart von IL-17 zu einem Anstieg der IgG Produktion, der anti-ds DNA

Autoantikörper Produktion sowie der IL-6 Produktion, welche sich auch bei SLE Patienten in vivo findet. (23).

Obwohl CREM α , wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, bei der Bildung dieser Th17 Zellen beteiligt ist, reicht die einfache Überexpression nicht aus um bei den CREM α -transgenen Mäusen eine Autoimmunität auszulösen. So ergab eine Beobachtung der CREM α -transgenen Mäuse über einen maximalen Zeitraum von 56 Wochen kein Auftreten spontaner Krankheitszeichen. Kommt es jedoch zu einer Entzündungsreaktion, wie eine durch DNFB ausgelöste Kontaktallergie, lenkt CREM α über die gesteigerte IL-21 Produktion die Entzündung in Richtung eines durch IL-17 geprägten Phenotyps.

Interessanterweise wurde mittlerweile auch eine Verbindung zwischen IL-21 selber und SLE hergestellt. So ergab die Untersuchung einer großen Population an SLE Patienten eine Assoziation von SLE mit einem Polymorphismus im Intron des IL-21 Gens (101). Auch konnte ein erhöhter Spiegel von IL-21 im Serum von SLE Patienten nachgewiesen werden, der zudem mit der Krankheitsaktivität korrelierte (136). Allerdings zeigten Untersuchungen von B-Zellen bei SLE Patienten eine verminderte Expression von IL-21R auf der Oberfläche (80), so dass die genaue Bedeutung von IL-21 bei der Entstehung von Lupus beim Menschen noch nicht vollständig geklärt ist.

Verschiedene Untersuchungen in Mausmodellen unterstützen jedoch die Theorie eines entscheidenden Einflusses von IL-21 auf die Pathophysiologie des SLE. In Sanroque Mäusen sorgt zum Beispiel eine Mutation des RING-Typ Ubiquitin Ligase Proteins Roquin für einen starken Anstieg der IL-21 Produktion, was die Ausbildung eines ausgeprägten SLE ähnlichen Phenotyps zur Folge hat (133). Auch ist der Gehalt an IL-21 in BXSB.B6-Yaa+/J- Mäuse, die spontan eine Lupus ähnliche Krankheit mit Symptomen einer Lymphadenopathy, Splenomegaly, Leukozytose, Hypergammaglobulinämie und einer ausgeprägten, durch Immunkomplexe ausgelösten Glomerulonephritis entwickeln, deutlich erhöht (94). Die Analyse der Splenozyten aus diesen Mäusen zeigte einen altersabhängigen Anstieg der IL-21 Expression. Dieser

steht in direktem Zusammenhang mit einer steigenden IgG1 und IgG3 Produktion, so dass ein Einfluss von IL-21 auf die Akkumulation von Plasmazellen und die Produktion von Autoantikörpern, wie bei SLE Patienten, angenommen wird. MRL-lpr Mäuse, ein weiteres murines Lupus-Model, zeigen spontan keine erhöhten IL-21 Werte, jedoch ist nach der Stimulation von CD4+ T-Zellen mit einem anti-CD3/anti-CD28-Antikörper die Expression von IL-21 im Vergleich zu MRL-MPJ Mäusen um bis zum zehnfachen erhöht (43). Darüber hinaus kommt es durch die Behandlung dieser Mäuse mit einem IL-21-Rezeptor-FC Fusionsprotein zu einer deutlichen Verbesserung der Krankheitssymptome. So entwickeln die behandelten Mäuse eine deutlich schwächere Proteinurie, weniger und leichtere Hautläsionen, weniger dsDNA Autoantikörper und eine schwächere Lymphadenopathie (43).

Insgesamt zeigen die in dieser Arbeit gewonnenen Daten, dass die Bedeutung von CREM α in der T-Zell Pathophysiologie weit über den Einfluss auf die IL-2 Expression hinausgeht. CREM α scheint maßgeblich in der komplexen Fehlregulation von SLE T-Zellen beteiligt zu sein und so ist CREM α ein mögliches therapeutisches Ziel für die Immunmodulation bei SLE und weiteren rheumatischen Erkrankungen.

7. Literaturverzeichnis

1. Aarvak T, Chabaud M, Miossec P, Natvig JB (1999) IL-17 is produced by some proinflammatory Th1/Th0 cells but not by Th2 cells. *J Immunol* 162:1246-1251
2. Abbas AK, Murphy KM, Sher A (1996) Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383:787-793
3. Apostolou I, von BH (2004) In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells. *J Exp Med* 199:1401-1408
4. Barton K, Muthusamy N, Chanyangam M, Fischer C, Clendenin C, Leiden JM (1996) Defective thymocyte proliferation and IL-2 production in transgenic mice expressing a dominant-negative form of CREB. *Nature* 379:81-85
5. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK (2006) Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441:235-238
6. Bettelli E, Korn T, Oukka M, Kuchroo VK (2008) Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature* 453:1051-1057
7. Bialynicki-Birula R (2008) The 100th anniversary of Wassermann-Neisser-Bruck reaction. *Clin Dermatol* 26:79-88
8. Bird JJ, Brown DR, Mullen AC, Moskowitz NH, Mahowald MA, Sider JR, Gajewski TF, Wang CR, Reiner SL (1998) Helper T cell differentiation is controlled by the cell cycle. *Immunity* 9:229-237
9. Blaese RM, Grayson J, Steinberg AD (1980) Increased immunoglobulin-secreting cells in the blood of patients with active systemic lupus erythematosus. *Am J Med* 69:345-350
10. Cao D, Borjesson O, Larsson P, Rudin A, Gunnarsson I, Klareskog L, Malmstrom V, Trollmo C (2006) FOXP3 identifies regulatory CD25bright CD4+ T cells in rheumatic joints. *Scand J Immunol* 63:444-452
11. Ceppellini R, POLLI E, CELADA F (1957) A DNA-reacting factor in serum of a patient with lupus erythematosus diffusus. *Proc Soc Exp Biol Med* 96:572-574
12. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM (2003) Conversion of peripheral CD4+ 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

13. Coburn AF, Moore DH (1943) The plasma proteins in disseminate lupus erythematosus. *Bull J Hopkins Hosp* 73:196-204
14. Coffman RL, Carty J (1986) A T cell activity that enhances polyclonal IgE production and its inhibition by interferon-gamma. *J Immunol* 136:949-954
15. Coquet JM, Kyparissoudis K, Pellicci DG, Besra G, Berzins SP, Smyth MJ, Godfrey DI (2007) IL-21 is produced by NKT cells and modulates NKT cell activation and cytokine production. *J Immunol* 178:2827-2834
16. Crispin JC, Oukka M, Bayliss G, Cohen RA, Van Beek CA, Stillman IE, Kyttaris VC, Juang YT, Tsokos GC (2008) Expanded double negative T cells in patients with systemic lupus erythematosus produce IL-17 and infiltrate the kidneys. *J Immunol* 181:8761-8766
17. Crispin JC, Tsokos GC (2009) Human TCR-alpha beta+ CD4- CD8- T cells can derive from CD8+ T cells and display an inflammatory effector phenotype. *J Immunol* 183:4675-4681
18. Crome SQ, Wang AY, Kang CY, Levings MK (2009) The role of retinoic acid-related orphan receptor variant 2 and IL-17 in the development and function of human CD4+ T cells. *Eur J Immunol* 39:1480-1493
19. Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, Seymour B, Lucian L, To W, Kwan S, Churakova T, Zurawski S, Wiekowski M, Lira SA, Gorman D, Kastelein RA, Sedgwick JD (2003) Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 421:744-748
20. de Boer J, Williams A, Skavdis G, Harker N, Coles M, Tolaini M, Norton T, Williams K, Roderick K, Potocnik AJ, Kioussis D (2003) Transgenic mice with hematopoietic and lymphoid specific expression of Cre. *Eur J Immunol* 33:314-325
21. Desai-Mehta A, Lu L, Ramsey-Goldman R, Datta SK (1996) Hyperexpression of CD40 ligand by B and T cells in human lupus and its role in pathogenic autoantibody production. *J Clin Invest* 97:2063-2073
22. Desai-Mehta A, Lu L, Ramsey-Goldman R, Datta SK (1996) Hyperexpression of CD40 ligand by B and T cells in human lupus and its role in pathogenic autoantibody production. *J Clin Invest* 97:2063-2073
23. Dong G, Ye R, Shi W, Liu S, Wang T, Yang X, Yang N, Yu X (2003) IL-17 induces autoantibody overproduction and peripheral blood mononuclear cell overexpression of IL-6 in lupus nephritis patients. *Chin Med J (Engl)* 116:543-548

24. Doreau A, Belot A, Bastid J, Riche B, Trescol-Biemont MC, Ranchin B, Fabien N, Cochat P, Pouteil-Noble C, Trolliet P, Durieu I, Tebib J, Kassai B, Ansieau S, Puisieux A, Eliaou JF, Bonnefoy-Berard N (2009) Interleukin 17 acts in synergy with B cell-activating factor to influence B cell biology and the pathophysiology of systemic lupus erythematosus. *Nat Immunol* 10:778-785
25. Enyedy EJ, Nambiar MP, Liossis SN, Dennis G, Kammer GM, Tsokos GC (2001) Fc epsilon receptor type I gamma chain replaces the deficient T cell receptor zeta chain in T cells of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 44:1114-1121
26. Fauci AS, Steinberg AD, Haynes BF, Whalen G (1978) Immunoregulatory aberrations in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 121:1473-1479
27. Fessel WJ (1974) Systemic lupus erythematosus in the community. Incidence, prevalence, outcome, and first symptoms; the high prevalence in black women. *Arch Intern Med* 134:1027-1035
28. Fessel WJ (1978) ANA-negative systemic lupus erythematosus. *Am J Med* 64:80-86
29. Firestein GS (2005) Immunologic mechanisms in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J Clin Rheumatol* 11:S39-S44
30. Frey O, Petrow PK, Gajda M, Siegmund K, Huehn J, Scheffold A, Hamann A, Radbruch A, Brauer R (2005) The role of regulatory T cells in antigen-induced arthritis: aggravation of arthritis after depletion and amelioration after transfer of CD4+CD25+ T cells. *Arthritis Res Ther* 7:R291-R301
31. Fujii Y, Fujii K, Iwata S, Suzuki K, Azuma T, Saito K, Tanaka Y (2006) Abnormal intracellular distribution of NFAT1 in T lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus and characteristic clinical features. *Clin Immunol* 119:297-306
32. Garrett-Sinha LA, John S, Gaffen SL (2008) IL-17 and the Th17 lineage in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol* 20:519-525
33. Gober MD, Gaspari AA (2008) Allergic contact dermatitis. *Curr Dir Autoimmun* 10:1-26
34. Gorbachev AV, Fairchild RL (2001) Induction and regulation of T-cell priming for contact hypersensitivity. *Crit Rev Immunol* 21:451-472
35. Gran B, Chu N, Zhang GX, Yu S, Li Y, Chen XH, Kamoun M, Rostami A (2004) Early administration of IL-12 suppresses EAE through induction of interferon-gamma. *J Neuroimmunol* 156:123-131

36. Habib T, Senadheera S, Weinberg K, Kaushansky K (2002) The common gamma chain (gamma c) is a required signaling component of the IL-21 receptor and supports IL-21-induced cell proliferation via JAK3. *Biochemistry* 41:8725-8731
37. Harada M, Magara-Koyanagi K, Watarai H, Nagata Y, Ishii Y, Kojo S, Horiguchi S, Okamoto Y, Nakayama T, Suzuki N, Yeh WC, Akira S, Kitamura H, Ohara O, Seino K, Taniguchi M (2006) IL-21-induced Beppsilon cell apoptosis mediated by natural killer T cells suppresses IgE responses. *J Exp Med* 203:2929-2937
38. Harley JB, James JA (2006) Epstein-Barr virus infection induces lupus autoimmunity. *Bull NYU Hosp Jt Dis* 64:45-50
39. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT (2005) Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 6:1123-1132
40. Hartung K, Baur MP, Coldewey R, Fricke M, Kalden JR, Lakomek HJ, Peter HH, Schendel D, Schneider PM, Seuchter SA, . (1992) Major histocompatibility complex haplotypes and complement C4 alleles in systemic lupus erythematosus. Results of a multicenter study. *J Clin Invest* 90:1346-1351
41. Hartung K, Fontana A, Klar M, Krippner H, Jorgens K, Lang B, Peter HH, Pichler WJ, Schendel D, Robin-Winn M, . (1989) Association of class I, II, and III MHC gene products with systemic lupus erythematosus. Results of a Central European multicenter study. *Rheumatol Int* 9:13-18
42. He D, Wu L, Kim HK, Li H, Elmets CA, Xu H (2006) CD8+ IL-17-producing T cells are important in effector functions for the elicitation of contact hypersensitivity responses. *J Immunol* 177:6852-6858
43. Herber D, Brown TP, Liang S, Young DA, Collins M, Dunussi-Joannopoulos K (2007) IL-21 has a pathogenic role in a lupus-prone mouse model and its blockade with IL-21R.Fc reduces disease progression. *J Immunol* 178:3822-3830
44. Hochberg MC, Florsheim F, Scott J, Arnett FC (1985) Familial aggregation of systemic lupus erythematosus. *Am J Epidemiol* 122:526-527
45. Hsieh CS, Macatonia SE, O'Garra A, Murphy KM (1995) T cell genetic background determines default T helper phenotype development in vitro 5. *J Exp Med* 181:713-721

46. Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A, Murphy KM (1993) Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* 260:547-549
47. Hsu HC, Yang P, Wang J, Wu Q, Myers R, Chen J, Yi J, Guentert T, Tousson A, Stanus AL, Le TV, Lorenz RG, Xu H, Kolls JK, Carter RH, Chaplin DD, Williams RW, Mountz JD (2008) Interleukin 17-producing T helper cells and interleukin 17 orchestrate autoreactive germinal center development in autoimmune BXD2 mice. *Nat Immunol* 9:166-175
48. Infante-Duarte C, Horton HF, Byrne MC, Kamradt T (2000) Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. *J Immunol* 165:6107-6115
49. Infante-Duarte C, Kamradt T (1999) Th1/Th2 balance in infection 2. *Springer Semin Immunopathol* 21:317-338
50. Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, Cua DJ, Littman DR (2006) The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 126:1121-1133
51. Janeway CA, Jr., Medzhitov R (2002) Innate immune recognition 4. *Annu Rev Immunol* 20:197-216
52. Jankovic D, Kullberg MC, Hieny S, Caspar P, Collazo CM, Sher A (2002) In the absence of IL-12, CD4(+) T cell responses to intracellular pathogens fail to default to a Th2 pattern and are host protective in an IL-10(-/-) setting 8. *Immunity* 16:429-439
53. Kang HK, Liu M, Datta SK (2007) Low-dose peptide tolerance therapy of lupus generates plasmacytoid dendritic cells that cause expansion of autoantigen-specific regulatory T cells and contraction of inflammatory Th17 cells. *J Immunol* 178:7849-7858
54. Kim HP, Korn LL, Gamero AM, Leonard WJ (2005) Calcium-dependent activation of interleukin-21 gene expression in T cells. *J Biol Chem* 280:25291-25297
55. Kirkham BW, Lassere MN, Edmonds JP, Juhasz KM, Bird PA, Lee CS, Shnier R, Portek IJ (2006) Synovial membrane cytokine expression is predictive of joint damage progression in rheumatoid arthritis: a two-year prospective study (the DAMAGE study cohort). *Arthritis Rheum* 54:1122-1131
56. Klinman DM, Shirai A, Ishigatsubo Y, Conover J, Steinberg AD (1991) Quantitation of IgM- and IgG-secreting B cells in the peripheral blood of

- patients with systemic lupus erythematosus
5. *Arthritis Rheum* 34:1404-1410
57. Koenders MI, Devesa I, Marijnissen RJ, bdollahi-Roodsaz S, Boots AM, Walgreen B, di Padova FE, Nicklin MJ, Joosten LA, van den Berg WB (2008) Interleukin-1 drives pathogenic Th17 cells during spontaneous arthritis in interleukin-1 receptor antagonist-deficient mice. *Arthritis Rheum* 58:3461-3470
58. Koenders MI, Joosten LA, van den Berg WB (2006) Potential new targets in arthritis therapy: interleukin (IL)-17 and its relation to tumour necrosis factor and IL-1 in experimental arthritis. *Ann Rheum Dis* 65 Suppl 3:iii29-iii33
59. Koffler D, Carr RI, Agnello V, Fiezi T, Kunkel HG (1969) Antibodies to polynucleotides: distribution in human serums. *Science* 166:1648-1649
60. Konforte D, Paige CJ (2006) Identification of cellular intermediates and molecular pathways induced by IL-21 in human B cells. *J Immunol* 177:8381-8392
61. Korn T, Bettelli E, Gao W, Awasthi A, Jager A, Strom TB, Oukka M, Kuchroo VK (2007) IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature* 448:484-487
62. Kretschmer K, Apostolou I, Hawiger D, Khazaie K, Nussenzweig MC, von BH (2005) Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat Immunol* 6:1219-1227
63. Kurasawa K, Hirose K, Sano H, Endo H, Shinkai H, Nawata Y, Takabayashi K, Iwamoto I (2000) Increased interleukin-17 production in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 43:2455-2463
64. Kytтарыс VC, Wang Y, Juang YT, Weinstein A, Tsokos GC (2007) Increased levels of NF-ATc2 differentially regulate CD154 and IL-2 genes in T cells from patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 178:1960-1966
65. Laan M, Cui ZH, Hoshino H, Lotvall J, Sjostrand M, Gruenert DC, Skoogh BE, Linden A (1999) Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in the airways. *J Immunol* 162:2347-2352
66. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA, Cua DJ (2005) IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation 2. *J Exp Med* 201:233-240

67. Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AK, Flavell RA (2006) Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol* 24:99-146
68. Liblau RS, Singer SM, McDevitt HO (1995) Th1 and Th2 CD4+ T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases
4. *Immunol Today* 16:34-38
69. Linker-Israeli M, Deans RJ, Wallace DJ, Prehn J, Ozeri-Chen T, Klinenberg JR (1991) Elevated levels of endogenous IL-6 in systemic lupus erythematosus. A putative role in pathogenesis
7. *J Immunol* 147:117-123
70. Liossis SN, Ding XZ, Dennis GJ, Tsokos GC (1998) Altered pattern of TCR/CD3-mediated protein-tyrosyl phosphorylation in T cells from patients with systemic lupus erythematosus. Deficient expression of the T cell receptor zeta chain. *J Clin Invest* 101:1448-1457
71. Liossis SN, Kovacs B, Dennis G, Kammer GM, Tsokos GC (1996) B cells from patients with systemic lupus erythematosus display abnormal antigen receptor-mediated early signal transduction events
5. *J Clin Invest* 98:2549-2557
72. Llorente L, Zou W, Levy Y, Richaud-Patin Y, Wijdenes J, Cacer-Varela J, Morel-Fourrier B, Brouet JC, Arcon-Segovia D, Galanaud P, Emilie D (1995) Role of interleukin 10 in the B lymphocyte hyperactivity and autoantibody production of human systemic lupus erythematosus
2. *J Exp Med* 181:839-844
73. Lubberts E, Joosten LA, Oppers B, van den BL, Coenen-de Roo CJ, Kolls JK, Schwarzenberger P, van de Loo FA, van den Berg WB (2001) IL-1-independent role of IL-17 in synovial inflammation and joint destruction during collagen-induced arthritis. *J Immunol* 167:1004-1013
74. Maddison PJ, Provost TT, Reichlin M (1981) Serological findings in patients with "ANA-negative" systemic lupus erythematosus. *Medicine (Baltimore)* 60:87-94
75. Mamane Y, Sharma S, Grandvaux N, Hernandez E, Hiscott J (2002) IRF-4 activities in HTLV-I-induced T cell leukemogenesis. *J Interferon Cytokine Res* 22:135-143
76. Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO, Hatton RD, Wahl SM, Schoeb TR, Weaver CT (2006) Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 441:231-234

-
77. McGeachy MJ, Bak-Jensen KS, Chen Y, Tato CM, Blumenschein W, McClanahan T, Cua DJ (2007) TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. *Nat Immunol* 8:1390-1397
 78. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. (1997) A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388:394-397
 79. Mills KH (2008) Induction, function and regulation of IL-17-producing T cells. *Eur J Immunol* 38:2636-2649
 80. Mitoma H, Horiuchi T, Kimoto Y, Tsukamoto H, Uchino A, Tamimoto Y, Miyagi Y, Harada M (2005) Decreased expression of interleukin-21 receptor on peripheral B lymphocytes in systemic lupus erythematosus. *Int J Mol Med* 16:609-615
 81. Mok CC, Lau CS (2003) Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J Clin Pathol* 56:481-490
 82. Moreland LW, Curtis JR (2009) Systemic nonarticular manifestations of rheumatoid arthritis: focus on inflammatory mechanisms. *Semin Arthritis Rheum* 39:132-143
 83. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL (1986) Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136:2348-2357
 84. Mosmann TR, Coffman RL (1989) TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 7:145-173
 85. Mosmann TR, Sad S (1996) The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 17:138-146
 86. Murphy KM, Travers P, Walport M, Seidler L (2009) *Immunologie*, Spektrum Akademischer Verl., Heidelberg
 87. Murphy KM, Reiner SL (2002) The lineage decisions of helper T cells 1. *Nat Rev Immunol* 2:933-944
 88. Nakae S, Komiyama Y, Nambu A, Sudo K, Iwase M, Homma I, Sekikawa K, Asano M, Iwakura Y (2002) Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses. *Immunity* 17:375-387

89. Nakae S, Nambu A, Sudo K, Iwakura Y (2003) Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *J Immunol* 171:6173-6177
90. Nambiar MP, Juang YT, Krishnan S, Tsokos GC (2004) Dissecting the molecular mechanisms of TCR zeta chain downregulation and T cell signaling abnormalities in human systemic lupus erythematosus. *Int Rev Immunol* 23:245-263
91. Nurieva R, Yang XO, Martinez G, Zhang Y, Panopoulos AD, Ma L, Schluns K, Tian Q, Watowich SS, Jetten AM, Dong C (2007) Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature* 448:480-483
92. O'Garra A (1998) Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity* 8:275-283
93. Oppmann B, Lesley R, Blom B, Timans JC, Xu Y, Hunte B, Vega F, Yu N, Wang J, Singh K, Zonin F, Vaisberg E, Churakova T, Liu M, Gorman D, Wagner J, Zurawski S, Liu Y, Abrams JS, Moore KW (2000) Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12
1. *Immunity* 13:715-725
94. Ozaki K, Spolski R, Ettinger R, Kim HP, Wang G, Qi CF, Hwu P, Shaffer DJ, Akilesh S, Roopenian DC, Morse HC, III, Lipsky PE, Leonard WJ (2004) Regulation of B cell differentiation and plasma cell generation by IL-21, a novel inducer of Blimp-1 and Bcl-6. *J Immunol* 173:5361-5371
95. Peng SL (2006) The T-box transcription factor T-bet in immunity and autoimmunity. *Cell Mol Immunol* 3:87-95
96. Piccirillo CA, Shevach EM (2001) Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells. *J Immunol* 167:1137-1140
97. Powell JD, Lerner CG, Ewoldt GR, Schwartz RH (1999) The -180 site of the IL-2 promoter is the target of CREB/CREM binding in T cell anergy. *J Immunol* 163:6631-6639
98. Quintana FJ, Basso AS, Iglesias AH, Korn T, Farez MF, Bettelli E, Caccamo M, Oukka M, Weiner HL (2008) Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. *Nature* 453:65-71
99. Robbins WC, Holman HR, Deicher RH, Kunkel HG (1957) Complement fixation with cell nuclei and DNA in lupus erythematosus. *Proc Soc Exp Biol Med* 96:575-579

100. Romagnani S (1994) Lymphokine production by human T cells in disease states. *Annu Rev Immunol* 12:227-257
101. Sawalha AH, Kaufman KM, Kelly JA, Adler AJ, Aberle T, Kilpatrick J, Wakeland EK, Li QZ, Wandstrat AE, Karp DR, James JA, Merrill JT, Lipsky P, Harley JB (2008) Genetic association of interleukin-21 polymorphisms with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 67:458-461
102. Schur PH (1995) Genetics of systemic lupus erythematosus. *Lupus* 4:425-437
103. Seder RA, Gazzinelli R, Sher A, Paul WE (1993) Interleukin 12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for interferon gamma production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:10188-10192
104. Seder RA, Germain RN, Linsley PS, Paul WE (1994) CD28-mediated costimulation of interleukin 2 (IL-2) production plays a critical role in T cell priming for IL-4 and interferon gamma production. *J Exp Med* 179:299-304
105. Seder RA, Paul WE (1994) Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. *Annu Rev Immunol* 12:635-673
106. Shahrara S, Huang Q, Mandelin AM, Pope RM (2008) TH-17 cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 10:R93
107. Shevach EM (2002) CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol* 2:389-400
108. Shresta S, Thomas DA, Graubert T.A., Ley T.J. (1998) How do cytotoxic lymphocytes kill their targets? *Curr Opin Immunol* 10:581-587
109. Siegel M, Lee SL (1973) The epidemiology of systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum* 3:1-54
110. So AK, Fielder AH, Warner CA, Isenberg DA, Batchelor JR, Walport MJ (1990) DNA polymorphism of major histocompatibility complex class II and class III genes in systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* 35:144-147
111. Spolski R, Leonard WJ (2008) Interleukin-21: basic biology and implications for cancer and autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 26:57-79
112. Stamp LK, James MJ, Cleland LG (2004) Interleukin-17: the missing link between T-cell accumulation and effector cell actions in rheumatoid arthritis? *Immunol Cell Biol* 82:1-9

113. Stirling RG, Chung KF (2000) Future treatments of allergic diseases and asthma. *Br Med Bull* 56:1037-1053
114. Tan EM (1989) Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. *Adv Immunol* 44:93-151
115. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, Schaller JG, Talal N, Winchester RJ (1982) The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 25:1271-1277
116. Tan EM, Kunkel HG (1966) Characteristics of a soluble nuclear antigen precipitating with sera of patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol*. 1966. 96: 464-471. *J Immunol* 176:1297-1304
117. Tenbrock K, Juang YT, Gourley MF, Nambiar MP, Tsokos GC (2002) Antisense cyclic adenosine 5'-monophosphate response element modulator up-regulates IL-2 in T cells from patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 169:4147-4152
118. Tenbrock K, Juang YT, Kyttaris VC, Tsokos GC (2007) Altered signal transduction in SLE T cells. *Rheumatology (Oxford)* 46:1525-1530
119. Tenbrock K, Juang YT, Leukert N, Roth J, Tsokos GC (2006) The transcriptional repressor cAMP response element modulator alpha interacts with histone deacetylase 1 to repress promoter activity. *J Immunol* 177:6159-6164
120. Tenbrock K, Juang YT, Tolnay M, Tsokos GC (2003) The cyclic adenosine 5'-monophosphate response element modulator suppresses IL-2 production in stimulated T cells by a chromatin-dependent mechanism. *J Immunol* 170:2971-2976
121. Tenbrock K, Kyttaris VC, Ahlmann M, Ehrchen JM, Tolnay M, Melkonyan H, Mawrin C, Roth J, Sorg C, Juang YT, Tsokos GC (2005) The cyclic AMP response element modulator regulates transcription of the TCR zeta-chain. *J Immunol* 175:5975-5980
122. Tenbrock K, Tsokos GC (2004) Transcriptional regulation of interleukin 2 in SLE T cells. *Int Rev Immunol* 23:333-345
123. Thornton AM, Donovan EE, Piccirillo CA, Shevach EM (2004) Cutting edge: IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4+CD25+ T cell suppressor function. *J Immunol* 172:6519-6523

124. Thornton AM, Shevach EM (1998) CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* 188:287-296
125. Thornton AM, Shevach EM (2000) Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J Immunol* 164:183-190
126. Trinchieri G (2003) Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 3:133-146
127. Tsokos GC, Nambiar MP, Tenbrock K, Juang YT (2003) Rewiring the T-cell: signaling defects and novel prospects for the treatment of SLE. *Trends Immunol* 24:259-263
128. Turka LA, Walsh PT (2008) IL-2 signaling and CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells. *Front Biosci* 13:1440-1446
129. Tzartos JS, Friese MA, Craner MJ, Palace J, Newcombe J, Esiri MM, Fugger L (2008) Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am J Pathol* 172:146-155
130. Vassilopoulos D, Kovacs B, Tsokos GC (1995) TCR/CD3 complex-mediated signal transduction pathway in T cells and T cell lines from patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 155:2269-2281
131. Veldhoen M, Hirota K, Westendorf AM, Buer J, Dumoutier L, Renauld JC, Stockinger B (2008) The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature* 453:106-109
132. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B (2006) TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 24:179-189
133. Vinuesa CG, Cook MC, Angelucci C, Athanasopoulos V, Rui L, Hill KM, Yu D, Domaschitz H, Whittle B, Lambe T, Roberts IS, Copley RR, Bell JI, Cornall RJ, Goodnow CC (2005) A RING-type ubiquitin ligase family member required to repress follicular helper T cells and autoimmunity. *Nature* 435:452-458
134. Voorthuis JA, Uitdehaag BM, De Groot CJ, Goede PH, van der Meide PH, Dijkstra CD (1990) Suppression of experimental allergic encephalomyelitis by intraventricular administration of interferon-gamma in Lewis rats. *Clin Exp Immunol* 81:183-188
135. Wallace DJ, Lyon I (1999) Pierre Cazenave and the first detailed modern description of lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum* 28:305-313

136. Wang XF, Yuan SL, Jiang L, Zhang XL, Li SF, Guo Y, Wu CL, Chen JJ (2007) Changes of serum BAFF and IL-21 levels in patients with systemic lupus erythematosus and their clinical significance. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* 23:1041-1042
137. Wang Y, Ito S, Chino Y, Goto D, Matsumoto I, Murata H, Tsutsumi A, Hayashi T, Uchida K, Usui J, Yamagata K, Sumida T (2010) Laser microdissection-based analysis of cytokine balance in the kidneys of patients with lupus nephritis. *Clin Exp Immunol* 159:1-10
138. Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR, Harrington LE (2007) IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol* 25:821-852
139. Wei L, Laurence A, Elias KM, O'Shea JJ (2007) IL-21 is produced by Th17 cells and drives IL-17 production in a STAT3-dependent manner. *J Biol Chem* 282:34605-34610
140. Wenner CA, Guler ML, Macatonia SE, O'Garra A, Murphy KM (1996) Roles of IFN-gamma and IFN-alpha in IL-12-induced T helper cell-1 development. *J Immunol* 156:1442-1447
141. Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, McKenzie BS, Blumenschein WM, Mattson JD, Basham B, Smith K, Chen T, Morel F, Lecron JC, Kastelein RA, Cua DJ, McClanahan TK, Bowman EP, de Waal MR (2007) Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol* 8:950-957
142. Wong CK, Ho CY, Li EK, Lam CW (2000) Elevation of proinflammatory cytokine (IL-18, IL-17, IL-12) and Th2 cytokine (IL-4) concentrations in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 9:589-593
143. Wong CK, Lit LC, Tam LS, Li EK, Wong PT, Lam CW (2008) Hyperproduction of IL-23 and IL-17 in patients with systemic lupus erythematosus: implications for Th17-mediated inflammation in autoimmunity. *Clin Immunol* 127:385-393
144. Xue SA, Bendle GM, Holler A, Stauss HJ (2008) Generation and characterization of transgenic mice expressing a T-cell receptor specific for the tumour-associated antigen MDM2. *Immunology* 124:315-321
145. Yang L, Anderson DE, Baecher-Allan C, Hastings WD, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK, Hafler DA (2008) IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells. *Nature* 454:350-352
146. Ye P, Rodriguez FH, Kanaly S, Stocking KL, Schurr J, Schwarzenberger P, Oliver P, Huang W, Zhang P, Zhang J, Shellito JE, Bagby GJ, Nelson S, Charrier K, Peschon JJ, Kolls JK (2001) Requirement of interleukin 17

- receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J Exp Med* 194:519-527
147. Zeng R, Spolski R, Casas E, Zhu W, Levy DE, Leonard WJ (2007) The molecular basis of IL-21-mediated proliferation. *Blood* 109:4135-4142
148. Zhou L, Ivanov II, Spolski R, Min R, Shenderov K, Egawa T, Levy DE, Leonard WJ, Littman DR (2007) IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol* 8:967-974
149. Zhumabekov T, Corbella P, Tolaini M, Kioussis D (1995) Improved version of a human CD2 minigene based vector for T cell-specific expression in transgenic mice. *J Immunol Methods* 185:133-140
150. Ziolkowska M, Koc A, Luszczkiewicz G, Ksiezopolska-Pietrzak K, Klimczak E, Chwalinska-Sadowska H, Maslinski W (2000) High levels of IL-17 in rheumatoid arthritis patients: IL-15 triggers in vitro IL-17 production via cyclosporin A-sensitive mechanism. *J Immunol* 164:2832-2838

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Seal	1
Abbildung 2: Schematische Darstellung der zur Pathogenese des SLE beitragen Faktoren	5
Abbildung 3: Th-Zell-Differenzierung	10
Abbildung 4: Aufbau des CD3-Komplexes	17
Abbildung 5: Induktion von CREM α in SLE T-Zellen durch Autoantikörper	20
Abbildung 6: Mögliche Rolle von Th17-Zellen bei der Pathogenese von SLE	23
Abbildung 7: Generierung einer CREM α -transgenen Maus mittels Mikroinjektion	40
Abbildung 8: Funktionsweise des Cytometric Bead Array	44
Abbildung 9: Aufbau eines vierfarben Durchflusszytometers	46
Abbildung 10: Vektorkarte des VA-CREM α /CD2 Plasmids	56
Abbildung 11: Genotypisierungs-PCR	58
Abbildung 12: CREM α mRNA Expression	59
Abbildung 13: CREM α Proteinexpression	60
Abbildung 14: Bestimmung der CREM α Bindung an den IL-2 Promotor	61
Abbildung 15: IL-2 mRNA Expression nach der Stimulation mit anti-CD3/anti-CD28-Antikörpern	62
Abbildung 16: IL-2 Proteingehalt im Überstand der Zellkultur	63
Abbildung 17: T-Zellproliferation	64
Abbildung 18: Ohrschwellung nach Auslösen einer Kontaktallergie mit DNFB	66
Abbildung 19: T-Zellproliferation nach der Kontaktallergie	68
Abbildung 20: IL-2 Proteingehalt im Überstand der T-Zellkultur nach der Kontaktallergie	69

Abbildung 21: FoxP3 mRNA Expression	71
Abbildung 22: Zytokin mRNA Expression im entzündeten Gewebe	72
Abbildung 23: IL-17 Proteinexpression	73
Abbildung 24: Co-Expression von IL-17 und CD3 am Ort der Entzündung	74
Abbildung 25: Zytokinexpression nach der Stimulation mit anti-CD3/anti-CD28-Antikörper	76
Abbildung 26: IL-17 mRNA Expression nach Blockade von IL-21	78
Abbildung 27: Kalziumeinstrom nach Aktivierung des T-Zell-Rezeptors	80
Abbildung 28: Expression der CD3 ζ Kette	81

9. Abkürzungsverzeichnis

ACR	American College of Rheumatology
AhR	Aryl hydrocarbon receptor
APC	Antigen-präsentierenden Zellen
CaMKIV	Kalzium/Calmodulin-abhängigen Kinase IV
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	complementary DNA
CREM α	cAMP response element modulator alpha
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten
DC	dendritische Zelle
dsDNA	doppelsträngige DNA
E. coli	Escherichia coli
EAE	experimentellen Autoimmunenzephalitis
FoxP3	Forkhead box P3
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
JAK	Janus Kinase
LPS	Lipopolysaccharide
MHC	Major Histocompatibility Complex
mRNA	messenger RNA
MS	Multiple Sklerose
NFAT	Nuclear factor of activated T cells

PAMPs	Pathogen-associated Molecular Pattern
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PRR	Pattern Recognition Receptor
RA	Rheumatoide Arthritis
ROR- α	RAR-related orphan receptor alpha
ROR- γ t	RAR-related orphan receptor gamma
SLE	systemische Lupus Erythematoses
ssDNA	einzelstrang DNA
STAT	Signal transducer and activator of transcription
Syk	Spleen tyrosine kinase
T-bet	T box expressed in T-cells
TCR	T-Zell-Rezeptor
Th-Zellen	T-Helferzellen
TLR	Toll-like-Receptor
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
Treg	regulatorische T-Zellen
ZAP-70	Zeta-chain-associated protein kinase 70

10. Danksagung

PD. Dr. med. Klaus Tenbrock, Dr. Georg Varga und Univ.-Prof. Dr. med Johannes Roth danke ich ganz besonders für die hervorragende Betreuung meiner Dissertation.

Ein herzlicher Dank geht an Thomas Vogl und alle Mitarbeiter des Institutes für Immunologie für die außerordentlich freundliche und harmonische Arbeitsatmosphäre sowie die ständige Bereitschaft, mir bei fachlichen und inhaltlichen Fragen weiterzuhelfen.

Ein weiterer Dank für das Korrekturlesen und hilfreiche Hinweise gehen an Martina Löckener, Malte von Spankeren und meine Eltern.

11. Curriculum Vitae

12. Anhang

12.1. Sequenz des amplifizierten CREMa-Gens

GTTCTGTGGCAGAGCATAGCTCTGCTCATATGCAGACTGGTCAAATTTCTGT
TCCTACTCTAGCTCAGGTAGCAACAATTGCAGAGACAGATGATTCTGCAGA
CTCAGAAGTAATTGATTTCGCATAAACGTAGAGAAATTCTTTCACGAAGACCC
TCATATAGAAAAATACTGAATGAACTTTCCTCTGATGTGCCTGGTATTCCCAA
GATTGAAGAAGAAAAATCAGAGGAAGAAGGGACACCACCTAACATTGCTAC
CATGGCAGTACCAACTAGCATATATCAGACTAGCACGGGGCAATACAATGAG
GAGACTGACCTTGCCCCAAGTCACATGGCTGCTGCCACAGGTGACATGCC
AACTTACCAGATCCGAGCTCCTACTACTGCTTTGCCACAAGGTGTGGTGAT
GGCTGCCTCACCAGGAAGCCTGCACAGTCCCCAGCAACTAGCAGAAGAAG
CAACTCGCAAGCGGGAGCTGAGGCTGATGAAAAACAGGGAAGCTGCCCG
GGAGTGTCGCAGGAAGAAGAAGAATATGTCAAATGTCTTGAAAATCGTGT
GGCTGTGCTTGAAAATCAAAACAAGACCCTCATTGAGGAACTCAAGGCCCT
CAAAGACCTTTATTGCCATAAAGCAGAGTAACTGTGTTTGATTTGGACCTTG
TTGACTGTGAACTCTAATCGGGGCAGGCGATGCAGCATCCTCATAATGGCC
ATGTGGACTTGTAGATGGGTCTCTTAACCCTTGCTTAAGAATACAGTCTGCT
GTAGAGTGTGAATTGGGAATACTGTTCCATGGGTTGGAATGCAGCTCCCCT
CACATTACCAAGCTTGCTCTATTGCCAATAGCATGCAACATATGTTTTGTTG
CCCTTCTGCTTCTACTTTTTTTCAGGGAAGCTGCTAAAGAATGTGACGTCG
AAAGAAAGAGTATGTGAAGTGTCTTGAGAGTCGAGTCGCAGTGCTGGAAG
TTCAGAACAAGAAGCTTATAGAGGAGCTTGAACTTTGAAAGACATTTGCTC
TCCCAAACAGATTAGTA

12.2. Tierversuchsgenehmigung

Landesamt für Natur,
Umwelt und Verbraucherschutz
Nordrhein-Westfalen



LANUV NRW, Postfach 10 10 52, 45610 Recklinghausen

Herrn
Prof. Dr. med. Johannes Roth
Institut für Experimentelle Dermatologie
Röntgenstr. 21
48149 Münster

Tierschutz

Durchführung von Tierversuchen; Genehmigung gem. § 8 Tierschutzgesetz
Ihr Antrag vom 19.12.2007

Sehr geehrter Herr Prof. Dr. Roth,

auf Grund des § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes in der Bekanntmachung der Neufassung des Tierschutzgesetzes vom 18.05.2006 (BGBl. I S. 1206) erteile ich Ihnen unter dem Vorbehalt des jederzeitigen Widerrufs die Genehmigung zur Durchführung des nachstehenden Tierversuches

„Molekulare Mechanismen in der Sensibilisierungsphase beim Kontaktekzem“.

Ihrem Genehmigungsantrag entsprechend obliegt die Verantwortung für die Durchführung des Tierversuchsvorhabens folgenden Personen:

Verantwortlicher Leiter: Herr Prof. Dr. med. Johannes Roth
Stellvertretende Leiter: Herr Dr. rer. nat. Jan Ehrchen

Diese Genehmigung ist für die Dauer von 24 Monaten ab dem 27.02.2008 befristet bis zum

28.02.2010.

Die Genehmigung wird unter den folgenden Bedingungen erteilt und mit folgenden Auflagen verbunden:

Auskunft erteilt:

Herr Skoff

Direktwahl 02361/305-3478

Fax 02361/305-3439

poststelle@lanuv.nrw.de

Aktenzeichen 8.87-

50.10.36.08.001

bei Antwort bitte angeben

Ihre Nachricht vom:

Ihr Aktenzeichen:

Datum: 27.02.2008

Hauptsitz:

Leibnizstraße 10

45659 Recklinghausen

Telefon 02361 305-0

Fax 02361 305-3215

poststelle@lanuv.nrw.de

www.lanuv.nrw.de

Dienstgebäude:

Hauptsitz Recklinghausen

Öffentliche Verkehrsmittel:

Ab Recklinghausen Hbf mit

Buslinie 235 bis Haltestelle

"Siemensstraße" oder mit

Buslinie 235 bis Haltestelle

"Blitzkuhlenstraße" und 10 Min.

Fußweg in Richtung Trabrenn-

bahn bis Siemensstraße

Bankverbindung:

Landeskasse Düsseldorf

Konto-Nr.: 41 000 12

West LB AG

(BLZ: 300 500 00)

BIC-Code: WELADED0

IBAN-Code: DE 41 3005

0000 0004 1000 12

1.

Seite 2 / 27.02.2008

Für die Durchführung des Tierversuchsvorhabens darf folgende Tierart in folgender Anzahl verwendet werden:

610 Mäuse

2.

Es ist ein Tierbestandsbuch zu führen. Sie haben über die Herkunft und den Verbleib der Tiere Aufzeichnungen zu machen und diese drei Jahre lang aufzubewahren.

3.

An der Durchführung des Tierversuchsvorhabens dürfen neben dem Leiter und dem Stellvertreter des Versuchsvorhabens folgende Personen beteiligt werden:

Frau Eva Nattkemper

Die bezeichneten Personen dürfen ausschließlich die im Genehmigungsantrag aufgeführten Eingriffe oder Behandlungen im Rahmen der zulässigen Verantwortlichkeitsstufe durchführen.

4.

- a) Für die Einhaltung der Vorschriften des Tierschutzgesetzes sowie der hier erteilten Auflagen ist der/die in dieser Genehmigung bezeichnete Leiter/in des Tierversuchsvorhabens oder der/die in dieser Genehmigung bezeichnete Vertreter/in verantwortlich (§ 9 Abs. 3 TierSchG).
- b) Jeder beabsichtigte Wechsel der Versuchsleiter- oder Stellvertreterposition ist dem Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW unverzüglich anzuzeigen (§ 8 Abs. 4 Satz 2 TierSchG).

5.

- a) Diese Genehmigung gilt nur für die Art, Durchführung und Dauer der Eingriffe oder Behandlungen im Umfang des von Ihnen schriftlich beantragten Tierversuchsvorhabens.
- b) Änderungen genehmigter Versuchsvorhaben sind dem Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW anzuzeigen (§ 8a Abs. 7 Satz 2 TierSchG).

6. Seite 3 / 27.02.2008
- a) Der Widerruf dieser Genehmigung kann erfolgen, wenn gegen eine der Bedingungen oder eine der Auflagen dieser Genehmigung verstoßen wird.
 - b) Die Durchführung des Tierversuchsvorhabens wird gemäß § 8a Abs. 5 TierSchG untersagt, wenn Tierversuche entgegen tierschutzrechtlicher Bestimmungen durchgeführt werden oder wenn die Voraussetzungen nach § 8 Abs. 3 TierSchG nicht mehr gegeben sind und dem Mangel nicht innerhalb einer gesetzten Frist abgeholfen wird.

7.
Natürliche und juristische Personen und nicht rechtsfähige Personenvereinigungen haben der zuständigen Behörde auf Verlangen die Auskünfte zu erteilen, die zur Durchführung der der Behörde durch das Tierschutzgesetz übertragenen Aufgaben erforderlich sind, § 16 Abs. 2 TierSchG. Der Inhaber dieser Genehmigung ist auskunftspflichtig nach § 16 Abs. 3 Satz 2 TierSchG und hat die mit der Überwachung beauftragten Personen zu unterstützen.

8.
Die Kennzeichnungen der Käfige oder Einrichtungen, in denen Versuchstiere gehalten werden, sind mit dem zuständigen beamteten Tierarzt abzustimmen.

9.
Ist ein Transport der Versuchstiere zwischen Operations- und Tierhaltungsraum unvermeidbar, so ist dafür Sorge zu tragen, dass mit Hilfe geeigneter Behältnisse dieser Transport so durchgeführt wird, dass negative Beeinflussungen durch äußere Einflüsse (z. B. Witterung, Lärm etc.) ausgeschlossen sind. Es ist insbesondere darauf zu achten, dass die Tiere keinen Temperaturschwankungen ausgesetzt sind.

Rechtsbehelfsbelehrung:

Gegen diesen Bescheid kann nunmehr innerhalb eines Monats nach Bekanntgabe Widerspruch erhoben werden. Der Widerspruch ist schriftlich bei mir, dem Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW, Leibnizstraße 10, 45659 Recklinghausen, einzulegen oder dort zur Niederschrift zu erklären. Falls die Frist durch das Verschulden eines von Ihnen Bevollmächtigten versäumt werden sollte, würde dessen Verschulden Ihnen zugerechnet werden.

Hinweise:

1.

Diese Genehmigung ist zeitlich bis zum dem o. g. Termin befristet.

Hierzu werden folgende Hinweise gegeben:

- a) Vor Ablauf der Genehmigungsfrist ist ggf. der Abschluss des Tierversuchsvorhabens mitzuteilen.
- b) Sollte das Tierversuchsvorhaben innerhalb des zeitlichen Genehmigungsrahmens noch nicht abgeschlossen sein, ist rechtzeitig vor Ende der Genehmigungsfrist – über den zuständigen Tierschutzbeauftragten – ein Antrag auf Verlängerung des Tierversuchsvorhabens zu stellen.
- c) Sollte die Absicht bestehen, nach Abschluss dieses Versuches einen gleichen oder ähnlichen Versuch durchzuführen, weise ich schon jetzt darauf hin, dass mit den erneuten Antragsunterlagen gleichzeitig ein zusammenfassender Ergebnisbericht über das jetzt genehmigte Versuchsvorhaben vorzulegen ist.

2.

Auf die Einhaltung der allgemeinen Vorschriften des Tierschutzgesetzes in Bezug auf die Haltung, Betreuung, Ernährung und Pflege der Versuchstiere (§ 2 TierSchG) sowie der Vorschriften für die Durchführung von Tierversuchsvorhaben (§§ 9 und 9a TierSchG) i. V. m. den Straf- und Bußgeldvorschriften der §§ 17 bis 20 TierSchG wird hingewiesen.

3.

Evtl. erforderliche Ausnahmegenehmigungen nach dem Tierschutzgesetz (§ 9 Abs. 1 und Abs. 2 Nr. 7) oder anderen gesetzlichen Bestimmungen bleiben von dieser Genehmigung unberührt.

4.

Wer Tierversuche nach § 7 Abs. 1 TierSchG an Wirbeltieren durchführt, ist nach der Verordnung über die Meldung zu Versuchszwecken oder zu bestimmten anderen Zwecken verwendeter Wirbeltiere vom 4. November 1999 (BGBl. I S. 2156) - Versuchstiermeldeverordnung – verpflichtet, der zuständigen Behörde für jedes Kalenderjahr bis zum 31. März des folgenden Jahres Meldungen nach dem Muster der Anlage zur Versuchstiermeldeverordnung zu erstatten. Zuständige Behörde nach § 1 der Verordnung über Zuständigkeiten auf dem Gebiet des Tierschutzrechts (GV. NW. S. 508) ist hier die Kreisordnungsbehörde.

Dieser Bescheid ist nicht gebührenpflichtig.

Seite 5 / 27.02.2008

Bitte geben Sie bei Änderungsanzeigen, Rückfragen oder sonstigen Ergänzungen stets das Aktenzeichen: **8.87-50.10.36.08.001** an.

Es wird empfohlen, allen an der Tierversuchsdurchführung beteiligten Personen diese Genehmigung zur Kenntnis zu geben.

Mit freundlichen Grüßen

Im Auftrag

Dr. Hieronymus
(Dr. Hieronymus)