

**STUDIEN ZUR IMMUNREGULATION AM BEISPIEL DER
KOLLAGEN-TYP-II-INDUZIERTEN ARTHRITIS**

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
am Fachbereich Biologie
der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

Valeria Lifke

geboren in Novosibirsk / Russland

Mainz, Dezember 2000

I.	EINLEITUNG.....	1
1.	AKTIVIERUNG UND DIFFERENZIERUNG VON T-ZELLEN	1
1.1	<i>Subpopulationen der T-Helferzellen</i>	<i>1</i>
1.2	<i>Aktivierung und Differenzierung von T_H1- und T_H2-Zellen</i>	<i>2</i>
1.3	<i>T_H1- und T_H2- Effektorfunktionen</i>	<i>5</i>
2.	T_H1- UND T_H2-VERMITTELTE IMMUNKRANKHEITEN	6
2.1	<i>Das Tiermodell der Kollagen-Typ-II-induzierten Arthritis (CIA).....</i>	<i>10</i>
3.	FRAGESTELLUNGEN DER ARBEIT	14
II.	MATERIAL UND METHODEN.....	15
1.	MATERIALIEN.....	15
1.1	<i>Laborgeräte.....</i>	<i>15</i>
1.2	<i>Chemikalien, Reagenzien, Lösungen.....</i>	<i>15</i>
1.3	<i>Plastikwaren.....</i>	<i>17</i>
1.4	<i>Serologische Reagenzien.....</i>	<i>18</i>
1.4.1	<i>Antikörper zur Neutralisierung von Cytokinen</i>	<i>18</i>
1.4.2	<i>Antikörper für ELISA.....</i>	<i>18</i>
1.4.3	<i>Antikörper zur Stimulation und Kultivierung von T-Zellen</i>	<i>20</i>
1.4.4	<i>Antikörper zum Nachweis von Zelloberflächenmolekülen.....</i>	<i>20</i>
1.4.5	<i>Präparation polyklonaler Antikörper</i>	<i>21</i>
1.5	<i>Cytokine</i>	<i>21</i>
1.6	<i>Materialien für die Zellkultur.....</i>	<i>22</i>
2.	METHODEN	24
2.1	<i>Methoden der Zellkultur.....</i>	<i>25</i>
2.1.1	<i>Präparation von Zellen aus lymphatischen Organen der Maus.....</i>	<i>25</i>
2.1.2	<i>Bestimmung der Lebendzellzahl und der Zellvitalität</i>	<i>25</i>
2.1.3	<i>Separation von CD4⁺ T-Zellen</i>	<i>26</i>
2.1.4	<i>Antigenspezifische Stimulation von T-Zellen</i>	<i>27</i>
2.1.5	<i>Polyklonale Stimulation von CD4⁺ T-Zellen.....</i>	<i>27</i>
2.1.6	<i>Entwicklung antigenspezifischer T_H1- und T_H2-Populationen aus naiven CD4⁺ T-Zellen</i>	<i>27</i>
2.1.7	<i>Langzeitkultivierung der CII-spezifischen CD4⁺ T-Zelllinie.....</i>	<i>28</i>
2.1.8	<i>Proliferationstest.....</i>	<i>28</i>
2.1.9	<i>Bioassays zum Nachweis von Cytokinen</i>	<i>29</i>
2.1.10	<i>Kryokonservierung und Reaktivierung von Zellen.....</i>	<i>30</i>
2.2	<i>Produktion und Reinigung monoklonaler Antikörper.....</i>	<i>30</i>
2.3	<i>ELISA (enzyme linked immunosorbent assay).....</i>	<i>32</i>
2.3.1	<i>Allgemeines zur Durchführung von ELISA</i>	<i>33</i>

2.3.2 Übersicht der verwendeten Puffer und Reagenzien.....	33
2.3.3 Übersicht der verwendeten Antikörper.....	34
2.3.4 Nachweis von anti-TCR-V β ₁₂ -mAK im ELISA (anti-Maus-Ig-ELISA).....	35
2.4 <i>Fluoreszenzcytologische Untersuchungen (FACS-Studien)</i>	35
2.4.1 Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll.....	36
2.4.2 Nachweis von Zelloberflächenmolekülen mittels FACS.....	36
2.5 <i>Molekularbiologische Experimente</i>	37
2.5.1 Puffer und Reagenzien.....	37
2.5.2 Primer.....	39
2.5.3 Isolierung genomischer DNA.....	40
2.5.4 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	40
3. TIEREXPERIMENTE	41
3.1 <i>Tiere</i>	41
3.2 <i>Antigene und Adjuvantien</i>	41
3.3 <i>Immunisierung von Mäusen, Induktion einer Arthritis</i>	42
3.4 <i>Arthritisinzidenz und Schwere der Erkrankung</i>	42
3.5 <i>Blutentnahme zur Bestimmung antigenspezifischer Antikörper im Serum</i>	43
3.6 <i>Zellübertragung</i>	43
3.7 <i>Behandlung mit immunmodulatorischen Agenzien</i>	44
3.7.1 <i>Behandlung mit IL-12-Antagonist</i>	44
3.7.2 <i>IFN-γ- und IL-12-Behandlung</i>	44
3.7.3 <i>Behandlung mit anti-CD4- bzw. anti-CD44-Antikörpern</i>	44
3.7.4 <i>Dexamethason-Behandlung und Behandlung mit anti-IFN-γ-Antikörpern</i>	45
III. ERGEBNISSE	46
1. VERGLEICH VON DBA/1- UND TCR-βtg-MÄUSEN BEI DER INDUKTION EINER ARTHRITIS	46
1.1 <i>Immunisierung mit CII in CFA führt bei TCR-βtg-Mäusen zur Entstehung einer schweren destruktiven Arthritis in einem kürzeren Zeitraum und mit höherer Inzidenz im Vergleich zu DBA/1-Mäusen</i>	47
1.2 <i>Immunisierung von TCR-βtg-Mäusen mit CII in CFA führt zu einer gesteigerten zellulären und humoralen CII-spezifischen Immunantwort im Vergleich zu DBA/1-Mäusen</i>	51
1.2.1 <i>Immunisierung von TCR-βtg-Mäusen mit CII in CFA führt zur Entwicklung IFN-γ-produzierender CII-spezifischer CD4⁺ T-Zellen</i>	51
1.2.2 <i>Polyklonale T-Zell-Aktivierung durch die <i>in vivo</i> Gabe von anti-CD3-mAK oder CFA induziert keine Arthritis bei TCR-βtg-Mäusen</i>	54
1.3 <i>Zellübertragung von TCR-βtg-Mäusen fördert die humorale CII-spezifische Immunantwort und führt zu einer schweren Arthritis mit höherer Inzidenz bei DBA/1-Mäusen</i>	55
2. MANIPULATION DER T-ZELL-ANTWORT IN VITRO	58

2.1	<i>Polyklonale Primäraktivierung von CD4⁺ T-Zellen aus TCR-βtg-Mäusen durch anti-TCR-Vβ₁₂-Antikörper.....</i>	58
2.2	<i>Antigenspezifische Primäraktivierung von CD4⁺ T-Zellen aus TCR-βtg-Mäusen durch CII .</i>	60
2.2.1	<i>Primäraktivierung von CD4⁺ T-Zellen aus TCR-βtg-Mäusen durch das CII-Peptid₂₅₆₋₂₇₁/HyK-βGal₂₆₄.....</i>	62
3.	<i>DIE BEDEUTUNG VON IL-12 UND IFN-γ FÜR DIE INDUKTION EINER CIA</i>	67
3.1	<i>Verzögertes Auftreten und abgeschwächte Symptomatik einer CIA durch in vivo-Neutralisation von IL-12.....</i>	67
3.2	<i>Auswirkung der in vivo Neutralisation von IL-12 während der CIA-Induktion auf die zelluläre und humorale Immunantwort gegen CII.....</i>	70
3.3	<i>Charakterisierung der Arthritisinduktion in TCR-βtg F2-Hybridmäusen, die kein IFN-γ produzieren können.....</i>	72
3.3.1	<i>Immunisierung von F2 (IFN-γ^{-/-})-Mäusen mit CII in CFA führt nicht zur Entstehung einer Arthritis.....</i>	75
3.3.2	<i>Arthritis-Resistenz von F2 (IFN-γ^{-/-})-Mäusen korreliert mit einer verminderten humoralen CII-spezifischen Immunantwort.....</i>	76
3.3.3	<i>Immunisierung von F2 (IFN-γ^{-/-})-Mäusen mit CII in CFA führt zur Entwicklung IL-2-produzierender CII-spezifischer CD4⁺ T-Zellen.....</i>	77
3.3.4	<i>Behandlung von F2 (IFN-γ^{-/-})-Mäusen mit exogenem IFN-γ während der CIA-Induktion führt zu einer schweren Arthritis.....</i>	78
3.3.5	<i>IFN-γ-unabhängige Arthritis-induzierende Wirkung von IL-12 in F2 (IFN-γ^{-/-})-Mäusen.....</i>	79
3.3.6	<i>Untersuchungen zur Induktion der Synthese von inflammatorischen Cytokinen durch LPS-Gabe bei IFN-γR KO- und IFN-γ KO-Mäusen.....</i>	81
4.	<i>THERAPEUTISCHE ANSÄTZE ZUR BEHANDLUNG EINER CIA</i>	84
4.1	<i>Untersuchungen zur Depletion von CD4⁺ T-Zellen während der CIA-Induktion in TCR-βtg- und DBA/1- Mäusen.....</i>	84
4.1.1	<i>Depletion von CD4⁺ T-Zellen in TCR-βtg-Mäusen verzögert die Entstehung einer Arthritis und führt zu einem abgeschwächten Krankheitsverlauf.....</i>	84
4.1.2	<i>Die humorale CII-spezifische Immunantwort wird durch die Depletion von CD4⁺ T-Zellen nur in DBA/1-, nicht aber in TCR-βtg-Mäusen, vollständig gehemmt.....</i>	86
4.1.3	<i>Hinweise auf eine T_H2-Umwandlung von CD4⁺ T-Zellen nach der Behandlung mit depletierendem anti-CD4-Antikörper bei DBA/1-Mäusen.....</i>	87
4.2	<i>Eine Hemmung der Migration von aktivierten T-Zellen in periphere Gewebe während der CIA-Induktion in TCR-βtg-Mäusen blockiert die Entstehung einer Arthritis.....</i>	89
4.2.1	<i>Behandlung von TCR-βtg-Mäusen mit anti-CD44-mAK supprimiert die Entstehung einer Arthritis.....</i>	89
4.2.2	<i>Behandlung von TCR-βtg-Mäusen mit anti-CD44-mAK zeigt keine Auswirkung auf die humorale CII-spezifische Immunantwort.....</i>	91

4.3	<i>Versuche zur kombinierten Arthritis­therapie durch Dexamethason und diverse immunomodulatorische Agenzien.....</i>	92
4.3.1	<i>Dexamethason-Behandlung einer etablierten Arthritis bei TCR-βtg-Mäusen führt zu einer effizienten Unterdrückung der Krankheitssymptome</i>	92
4.3.2	<i>Behandlung mit einer Kombination von Dexamethason mit anti-CD4-Antikörper zeigt keine verstärkte Supprimierung einer etablierten Arthritis.....</i>	94
4.3.3	<i>Kombination einer Dexamethason- und einer anti-CD4-Behandlung und gleichzeitige Neutralisation von IL-12 und IFN-γ führt zu einer dauerhaften Stabilisierung der Symptome auf niedrigem Niveau</i>	96
IV.	DISKUSSION	98
1.	<i>DIE BEDEUTUNG VON CD4⁺ T-ZELLEN FÜR DIE ENTSTEHUNG EINER KOLLAGEN-TYP-II-INDUZIERTEN ARTHRITIS (CIA).....</i>	98
2.	<i>MECHANISMEN DER ENTSTEHUNG UND KONTROLLE VON AUTOREAKTIVEN T-LYMPHOCYTEN.....</i>	101
3.	<i>DIE BEDEUTUNG VON ANTIKÖRPERN FÜR DIE ENTSTEHUNG EINER CIA</i>	105
4.	<i>DIE ROLLE DES CD44-MOLEKÜLS IN DER PATHOGENESE EINER CIA.....</i>	107
5.	<i>DIE BEDEUTUNG VERSCHIEDENER SUBPOPULATIONEN DER T-HELPERZELLEN FÜR DIE ENTSTEHUNG UND AUFRECHTERHALTUNG EINER CIA</i>	108
6.	<i>DIE BEDEUTUNG VON IL-12 UND IFN-γ FÜR DIE INDUKTION EINER CIA</i>	111
7.	<i>THERAPEUTISCHE ANSÄTZE ZUR BEHANDLUNG EINER CIA</i>	118
V.	ZUSAMMENFASSUNG.....	124
VI.	LITERATUR	127

I. EINLEITUNG

1. AKTIVIERUNG UND DIFFERENZIERUNG VON T-ZELLEN

1.1 Subpopulationen der T-Helferzellen

Murine T-Lymphocyten, die den T-Zellrezeptor- $\alpha\beta$ zusammen mit dem Korezeptor CD4 exprimieren, werden als T-Helferzellen (T_H) bezeichnet. Sie verlassen den Thymus als sogenannte naive T_H -Vorläuferzellen, die noch keinen Antigenkontakt hatten (1;2). Bei Aktivierung der T_H -Zellen durch ein Antigen können sich unterschiedliche Populationen von T_H -Effektorzellen sowie Gedächtniszellen entwickeln. Aufgrund des Musters der gebildeten Cytokine werden T_H -Effektorzellen in zwei Hauptpopulationen, die T_H1 - und T_H2 - Zellen, unterteilen (3). T_H1 -Zellen produzieren Interleukin-2 (IL-2), Interferon- γ (IFN- γ) und Tumor-Nekrose-Faktor- β (TNF- β), während T_H2 -Zellen IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 und IL-13 produzieren (1;4). IL-10 zählt man oft ebenfalls zu den T_H2 -Cytokinen (5), allerdings muß betont werden, daß es, insbesondere im Humansystem, auch von T_H1 -Zellen sezerniert werden kann (6-8). $CD4^+$ T-Zellen, die gemischte Cytokinspektren exprimieren, werden T_H0 -Zellen genannt (1;9;10). Es wird diskutiert, ob T_H0 -Zellen entweder ein alternatives Differenzierungsstadium repräsentieren, oder ob es sich um ein Vorläuferstadium der T_H1/T_H2 - Zellen handelt (7;11). Weitere Subtypen von $CD4^+$ T-Lymphocyten erhielten die Bezeichnung T_H3 -Zellen und T_R - (regulatorische) Zellen (12-14). Diese Zellen produzieren große Mengen an TGF- β (*transforming growth factor- β*) bzw. IL-10 und sind an der Immunregulation beteiligt.

T_H1 - und T_H2 -Zellen unterscheiden sich außer durch das jeweilige Cytokinmuster auch durch die Expression von bestimmten Oberflächenmolekülen. T_H1 -Zellen exprimieren z.B. die beiden IL-12-Rezeptor-Ketten IL-12R β 1 und IL-12R β 2, T_H2 -Zellen dagegen nur IL-12R β 1 (7). Umgekehrt exprimieren T_H2 -Zellen die beiden IFN- γ -Rezeptor-Ketten IFN- γ R α und IFN- γ R β , T_H1 -Zellen nur IFN- γ R α (15;16). Ferner besitzen nur T_H2 -Zellen einen funktionellen IL-1-Rezeptor und exprimieren ST2L/T1, ein vor kurzem beschriebenes Molekül, das Ähnlichkeit mit dem IL-1RI aufweist (17;18). Es konnten auch unterschiedliche Expressionen von Chemokin-Rezeptoren nachgewiesen werden, die spezifisch für bestimmte T-Zellsubtypen sind. Zum Beispiel ist die Expression von CXCR-3 und CCR-5 für T_H1 -Zellen, CXCR-4, CCR-3, CCR-4, CCR-7 und CCR-8 dagegen für T_H2 -Zellen charakteristisch (19-21).

1.2 Aktivierung und Differenzierung von T_H1 - und T_H2 -Zellen

Die Aktivierung der naiven T-Zellen kann in folgende Schritte eingeteilt werden: Zelluläre Adhäsion, Antigen-Erkennung über den T-Zellrezeptor-Komplex und Kostimulation.

Die Adhäsion stellt den initialen Schritt einer Aktivierung von T-Zellen dar. Der Kontakt zwischen den interagierenden Zellen wird durch eine Reihe von Membranmolekülen vermittelt. Auf der Seite der T-Zelle ist eine solche Funktion u.a. für LFA-1 (*lymphocyte function-associated antigen-1*) beschrieben worden. LFA-1 kann mit ICAM-1, 2 oder 3 (*intercellular adhesion molecule*) auf der Seite der antigenpräsentierenden Zellen (APC) in Wechselwirkung treten.

APCs sind in der Lage, Antigene aufzunehmen, sie zu prozessieren und sie dann als Peptidbruchstücke den T-Helferzellen über die MHC-Klasse-II-Moleküle (*major histocompatibility complex class II*) zu präsentieren. Die spezifische Erkennung eines Antigens durch $CD4^+$ T-Lymphocyten beruht auf der Wechselwirkung zwischen dem T-Zellrezeptor (TCR) und Peptid-MHC-Klasse-II-Komplex (22). Zusätzlich sind weitere, als CD3-Komplex bezeichnete Membranproteine mit dem TCR assoziiert, welche für die Signaltransduktion ins T-Zellinnere verantwortlich sind. Außerdem spielt das CD4-Molekül bei der Erkennung von Peptid in Verbindung mit dem MHC-Klasse-II-Molekül eine wichtige Rolle. CD4 interagiert mit dem MHC-Klasse-II-Molekül und dem T-Zellrezeptor, stabilisiert die Bindung zwischen der T-Zelle und der APC und ist an der Signalweiterleitung beteiligt (22).

Die Erkennung des Antigens durch den TCR/CD3/CD4-Komplex und die damit verbundenen intrazellulären Signale führen jedoch alleine nicht zur vollständigen Aktivierung, d.h. Cytokinbildung und Proliferation, der naiven T-Lymphocyten. Zusätzlich werden kostimulatorische Signale benötigt, die von den APCs bereitgestellt werden müssen. Erfolgt eine Stimulation der T-Zellen nur über den TCR/CD3-Komplex in Abwesenheit solcher Kosignale, so resultiert daraus eine funktionelle Inaktivierung, d.h. eine Anergie der T-Zellen. Diese ist dadurch gekennzeichnet, daß bei erneuter antigenspezifischer Stimulation auch in Anwesenheit von kostimulatorischen Signalen diese T-Zellen nicht mehr in der Lage sind, ihre Funktion zu erfüllen. Zur Kostimulation können u.a. die Molekülpaare CD80,86/CD28 (23), CD40/CD154 (24) beitragen. Je nachdem in welchem Differenzierungszustand sich die T-Zellen befinden, benötigen sie den kompletten Stimulus mit sämtlichen kostimulatorischen Molekülen, oder es genügt

eine Stimulation in Abwesenheit von Kosignale. Für eine Reaktivierung einer bereits ausdifferenzierten Effektorzelle werden z.B. nicht mehr alle kostimulatorische Signale benötigt (25).

Die Aktivierung einer naiven T-Zelle durch den TCR/CD3/CD4-Komplex fördert vor allem die Expression des hochaffinen IL-2-Rezeptorkomplexes (α , β , γ) und die Produktion von IL-2. Außerdem wird die Expression von CD154 erhöht. IL-2 bindet an den IL-2R und fördert die Proliferation von T_H -Zellen autokrin. Die Expression von CD154 (= CD40L) führt zur Interaktion mit dem konstitutiv auf der Oberfläche von APC exprimierten CD40-Molekül. Diese Interaktion stimuliert die APC zur Expression von CD86 (= B7-2) und später von CD80 (= B7-1). Diese beiden Moleküle dienen als membranständige Liganden für CD28 auf T-Zellen. Die Interaktion zwischen B7/CD28 hat eine entscheidende Bedeutung für die Aktivierung von T-Zellen, da sie zum einen die IL-2-Produktion und somit die Proliferation fördert, zum anderen die Expression des anti-apoptotischen Moleküls Bcl-x_L induziert und dadurch vor Apoptose schützt, und letztlich zur Produktion weiterer Cytokine beiträgt (22;26-28). Im Verlaufe dieser Aktivierung können naive CD4⁺ T-Zellen je nach den vorherrschenden Bedingungen zu T_{H1} - oder T_{H2} -Effektorzellen differenzieren. Folgende Parameter haben sich in unterschiedlichen Experimentalsystemen als bedeutungsvoll für diesen Differenzierungsprozess erwiesen. Es wurde berichtet, daß die Stärke der Interaktion zwischen dem TCR und dem MHC-Klasse-II-Peptid-Komplex die Differenzierung der naiven T_H -Zellen beeinflusst. In Studien mit sogenannten „*altered peptide ligands*“ konnte nachgewiesen werden, daß sich die naiven Zellen bei einer hochaffinen Bindung zwischen Peptid und MHC-Klasse-II zu T_{H1} -Zellen, bei einer niederaffinen Bindung hingegen zu T_{H2} -Zellen entwickeln (29). Weiterhin scheint die Dosis des Antigen während der Primärstimulation eine Rolle bei der T_{H1}/T_{H2} -Entwicklung zu spielen. Mittlere Dosen eines bestimmten Antigen sollen zu einer T_{H1} -, niedrige und hohe Dosen zu einer T_{H2} -Entwicklung führen (30). Obwohl das CD4-Molekül ein Bestandteil des TCR-Komplexes ist, konnte gezeigt werden, daß die Beteiligung dieses Moleküles für die T_{H1}/T_{H2} -Entwicklung nicht relevant ist (31;32).

Auch die Rolle von unterschiedlichen kostimulatorischen Molekülen für die Differenzierung der naiven Zellen ist gut dokumentiert. So konnte gezeigt werden, daß die Interaktion von CD28 mit B7-2 die T_{H2} -Entwicklung fördert (10;33;34), während B7-1 ein eher neutrales kostimulatorisches Signal vermittelt (35;36). Weiterhin wurde

berichtet, daß ein vor kurzem entdecktes CD28-ähnliches Molekül auf der Oberfläche der T-Zelle, ICOS (*inducible costimulator*), von allem die Bildung von IL-10 fördert (37;38).

Den wichtigsten Einfluß auf die Differenzierung naiver T-Helferzellen haben jedoch die Cytokine, die während der primären T-Zell-Stimulation anwesend sind (1;39). Aufgrund verschiedener experimenteller Hinweise wird angenommen, daß im wesentlichen drei Cytokine entscheidend für die Differenzierung naiver CD4⁺ T-Zellen sind (1;10;40-42). Das erste ist IL-4, ein 20 kDa schweres Monomer, das von T_H2-Zellen, Mastzellen, basophilen und eosinophilen Granulocysten sezerniert werden kann. Das zweite ist IFN- γ , ein 35 kDa schweres Homodimer, das aus zwei nicht kovalent gebundenen Ketten besteht, und von T_H1-Zellen, NK-Zellen, aktivierten Makrophagen (Mph) und CD4⁺ TCR- $\gamma\delta$ T-Lymphocyten produziert werden kann. Das dritte ist IL-12, ein 75 kDa schweres Heterodimer, das aus einer kovalent gebundenen p40- und p35-Polypeptidkette besteht, welches von APCs, Neutrophilen und Keratinocyten gebildet werden kann.

Naive T-Zellen exprimieren den funktionellen IL-4-Rezeptor (IL-4R) (43;44) und beide IFN- γ -Rezeptor-Ketten (IFN- γ R α und IFN- γ R β) (45). Werden solche Zellen durch ein Antigen stimuliert, so wird die Expression des IL-4R erhöht (44) und es erscheinen die beiden IL-12-Rezeptor-Ketten (IL-12R β 1 und IL-12R β 2) (42), während die Expression der IFN- γ -Rezeptor-Ketten (IFN- γ R α und IFN- γ R β) beibehalten wird (45). In diesem Zustand exprimieren naive T-Zellen also alle wichtigen Cytokin-Rezeptoren. Die weitere Differenzierungsrichtung wird durch die Menge und die Erscheinungszeit der oben genannten Cytokine bestimmt. IL-12, ein T_H1-differenzierender Faktor, wird fast direkt nach der Antigen-Präsentation durch die Interaktion von CD154 mit CD40 auf seiten der APC durch diese sezerniert (40;46;47). IL-12 bindet an den IL-12R auf NK- und T_H-Zellen und induziert eine rasche Synthese von IFN- γ (39;48;49). Einerseits verstärkt IFN- γ die Expression der IL-12R β 2-Kette des IL-12R auf CD4⁺ T-Zellen (7), andererseits reguliert es die Expression der IFN- γ R β -Kette herunter (7;45). Dies führt letztendlich zur Entwicklung von T_H1-Zellen, welche große Mengen an IFN- γ sezernieren, aber auf selbstproduziertes IFN- γ nicht mehr reagieren können. Allerdings muß betont werden, daß T_H1-Zellen immer noch auf IL-12 und IL-4 ansprechen können. Die Existenz des IL-4R auf der Oberfläche vollständig ausdifferenzierter T_H1-Zellen weist auf eine potentielle Modulation der Funktion von T_H1-Zellen durch IL-4 hin (43).

Die Wirkung von IL-4 auf aktivierte T_H-Zellen ist gegenüber dem Einfluß von IL-12 dominant. Durch IL-4 wird die Expression des IL-4R erhöht, während die Expression der hochaffinen IL-12Rβ₂-Kette herunterreguliert wird, was eine negative Wirkung auf die Entwicklung von T_{H1}-Zellen aus naiven T-Zellen hat. Außerdem inhibiert IL-4 die Bildung von IL-12 durch APCs. Darüber hinaus wurde gezeigt, daß IL-4 durch einen positiven Rückkopplungsmechanismus seine eigene Synthese bei naiven T-Zellen und T-Effektorzellen fördert und sogar T_{H1}- zu T_{H2}-Zellen umwandeln kann, was durch die verstärkte Expression des IL4R der T_{H1}-Zellen erklärbar ist (41-43;50;51). Im Gegensatz dazu kann IL-12 die IL-4-Synthese nicht unterdrücken und keinen Shift von T_{H2}- zu T_{H1}-Zellen induzieren. Dies könnte durch die negative Regulation der IL-12Rβ₂-Kette unter dem Einfluß von IL-4 bei T_{H2}-Zellen verursacht werden (7;40;43;46;51). Allerdings kann IL-12 indirekt durch die verstärkte Bildung von IFN-γ die Synthese von IL-4 hemmen, da IFN-γ die Expression des IL-4R inhibiert und eine direkte negative Wirkung auf die IL-4- und IL-5-Genexpression hat (41;43).

Im Gegensatz zu IL-12, das sofort nach der Aktivierung von T-Zellen verfügbar ist, wird IL-4 von verschiedenen Zellen gebildet, wie z.B. Mastzellen, T_{H2}-Effektorzellen, TCR-γδ T-Lymphocyten und einem speziellen Typ von Zellen, die sowohl typische Eigenschaften von CD4⁺ T-Zellen als auch von NK-Zellen aufweisen und die zuerst im Maussystem beschrieben wurden (NK1.1⁺ CD4⁺ T-Zellen) (7;10;42;46).

Aufgrund der verschiedenen Cytokinmuster erfüllen diese T-Zell-Subpopulationen unterschiedliche immunologische Funktionen.

1.3 T_{H1}- und T_{H2}- Effektorfunktionen

T_{H1}-Zellen sind die Haupteffektorzellen der sogenannten zellvermittelten Immunität. Durch die Produktion von IFN-γ und TNF-β tragen sie entscheidend zur Bekämpfung von Infektionen bei, die durch intrazelluläre Pathogene hervorgerufen werden. Weiter sind sie für die Überempfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ - DTH (*delayed type hypersensitivity*) verantwortlich. Das wichtigste T_{H1}-Cytokin, IFN-γ, erfüllt unterschiedliche Funktionen. Es fördert bei Makrophagen die Expression des hochaffinen Fcγ-Rezeptors (FcγRI) und verstärkt somit deren Phagozytosefähigkeit. Ferner verstärkt es die Bildung von Stickstoffoxid, Peroxid und Sauerstoffradikalen und unterstützt dadurch die Vernichtung internalisierter Parasiten und Bakterien. Darüber hinaus fördert IFN-γ die Bildung von IgG-Antikörpern der Isotypen IgG_{2a} und IgG₃ in

der Maus, welche an hochaffine Fc γ -Rezeptoren und an die erste Komplementkomponente C1 binden können. Somit vermitteln sie die antikörperabhängige zellvermittelte Cytotoxizität (ADCC) und die Komplementaktivierung, was letztendlich zur Opsonisierung und Abtötung der Mikroorganismen führt (41;52;53). Außerdem induzieren IFN- γ und TNF- β bei Endothelzellen die Expression von Adhäsionsmolekülen (P- und E-Selektine) und die Bildung von Chemokinen (IP-10, MIG, RANTES und MCP-1), die für das Anlocken von T-Zellen und Monocyten zu den Infektionsstellen verantwortlich sind (53;54).

Im Gegensatz zur Abwehr von intrazellulären Erregern, die von der Aktivierung der Makrophagen durch das T_H1-Cytokin IFN- γ abhängt, sind beim Schutz vor großen extrazellulären Parasiten, wie z.B. Helminthen, T_H2-Cytokine (IL-4 und IL-5) protektiv (52;55;56). T_H2-Cytokine unterstützen die Proliferation und Differenzierung von B-Zellen sowie die Sekretion von Antikörpern. Darüber hinaus ist IL-5 ein Differenzierungs- und Aktivierungsfaktor für eosinophile Granulocyten (57;58). IL-4 induziert u.a. den Klassenwechsel zur Bildung von IgG₁- und IgE-Antikörpern (41;53). Letztere sind für die IgE-abhängige Degranulation der Mastzellen verantwortlich (59). Bezüglich der Bildung verschiedener Antikörperklassen haben IL-4 und IFN- γ eine antagonistische Wirkung : IFN- γ fördert die Bildung von IgG_{2a}- und inhibiert die IgG₁- und IgE-Antikörpern, während IL-4 eine reziproke Wirkung hat (53).

Aufgrund dieser unterschiedlichen Funktionen hat das Gleichgewicht zwischen T_H1/T_H2-Zellen eine große Bedeutung für die Abwehr von Infektionen.

2. T_H1- UND T_H2-VERMITTELTE IMMUNKRANKHEITEN

Immunantworten, die durch eine zu starke Ausprägung der von T_H1- oder T_H2-Zellen abhängigen Reaktionen aus dem „Gleichgewicht“ geraten sind, können pathologische Folgen haben und deshalb zu Krankheiten führen. Das ist bei vielen autoimmunen und allergischen Erkrankungen der Fall.

Unter dem Begriff Autoimmunerkrankung wird eine Reihe von Krankheiten zusammengefaßt, bei denen gegen körpereigene Antigene gerichtete Immunreaktionen eine Erkrankung hervorrufen. Autoimmunkrankheiten können in organspezifische und systemische Erkrankungen eingeteilt werden. Bei den ersteren ist die Autoimmunität gegen ein einzelnes Organ gerichtet, wie z.B. bei dem Typ-I-Diabetes mellitus (IDDM) oder der Multiplen Sklerose (MS). Bei systemischen Autoimmunerkrankungen sind

viele Organsysteme betroffen, wie z.B. beim systemischen Lupus erythematodes (SLE). Ein kausales Verständnis der Mechanismen, die im jeweiligen Fall zur Autoimmunität führen, fehlt. Allerdings gibt es Erkenntnisse, die auf eine genetische Prädisposition für die Entwicklung von Autoimmunerkrankungen hindeuten. Darüber hinaus können Umweltfaktoren einen stark modulierenden Einfluß auf die Entwicklung von Autoimmunkrankheiten haben.

Es mehren sich die Hinweise, daß die funktionelle Dichotomie der T_H-Zellen für pathologische Vorgänge bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen entscheidend sein können. Bei vielen Autoimmunkrankheiten kommt autoreaktiven CD4⁺ T-Zellen vom T_H1-Typ eine zentrale Bedeutung in der Pathogenese zu (60;61). So konnte in verschiedenen Tiermodellen, wie der experimentellen allergischen Enzephalomyelitis (EAE) (62) und des Typ-I-Diabetes mellitus (63), die Krankheit durch adoptiven Transfer von T_H1-Zellen von erkrankten Tieren auf gesunde Empfängertiere übertragen werden. Auch beim Menschen konnte bezüglich der autoimmunen Thyreoiditis und der Multiplen Sklerose gezeigt werden, daß die autoreaktiven T-Zellen zum T_H1-Subtyp gehörten.

Da IL-12 die T_H1-Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen induziert, kommt diesem Cytokin eine potentielle Beteiligung bei der Auslösung und Aufrechterhaltung solcher Autoimmunkrankheiten zu (64-69). So verschlimmert die Verabreichung von exogenem IL-12 die Symptomatik einer EAE, wohingegen durch eine anti-IL-12-Therapie eine Linderung der Symptome erreicht werden kann (70-72). Bei NOD- (*nonobese diabetic*) Mäusen, die einige Wochen nach der Geburt spontan einen Typ-I-Diabetes mellitus entwickeln, konnte der Ausbruch dieser Autoimmunkrankheit durch exogene Applikation von IL-12 beschleunigt und durch Neutralisation von IL-12 verhindert werden (73-75). Am Beispiel der experimentell induzierten Colitis konnte sogar im etablierten Stadium eine Unterdrückung der Krankheit durch die Behandlung mit anti-IL-12-Antikörpern erreicht werden (76).

Umgekehrt gibt es viele Hinweise, wonach im Falle der oben genannten Autoimmunerkrankungen durch die bevorzugte Entwicklung autoreaktiver T_H2-Zellen, der Krankheitsverlauf abgeschwächt oder die Entstehung einer Autoimmunkrankheit komplett unterdrückt werden kann. So konnte IL-4 als Induktor der Entwicklung von T_H2-Zellen die Ausbildung eines IDDM (77) bzw. einer EAE (78) im jeweiligen Tiermodell verhindern. Darüber hinaus konnte IL-4 eine negative Wirkung auf T_H1-

Effektorzellen ausüben, indem es die Expression des IL-4R erhöhte, während es die Expression der hochaffinen IL-12-Rezeptor- β 2-Kette herunterregulierte und sogar etablierte T_H1 - zu T_H2 -Zellen umwandelte (43). Außerdem inhibiert IL-4 die Synthese proinflammatorischer Cytokine (z.B. IL-12) und regt die Bildung antiinflammatorischer Mediatoren, wie z.B. des IL-1-Rezeptorantagonisten (IL-1Ra), an (79-82). Somit vermitteln $CD4^+$ T-Zellen vom T_H2 -Typ einen protektiven Effekt auf die Entwicklung verschiedener Autoimmunkrankheiten.

Eine weitere Autoimmunerkrankung, die möglicherweise durch eine falsch balancierte T-Helferzellentwicklung ausgelöst wird, ist die Rheumatoide Arthritis (RA). Im Verlauf einer RA kommt es zur chronischen Entzündung der Gelenkinnenhaut und zur Schädigung des Knorpelgewebes. Dies führt schließlich zur Gelenkzerstörung.

Die zelluläre Komponente des hoch organisierten und komplexen Knorpelgewebes ist der Chondrocyt, der weniger als 1% des Gewebsvolumens ausmacht (83). Chondrocyten sind in eine extrazelluläre Matrix eingebettet, die aus Kollagenen, Proteoglykanen und Hyaluronsäuren besteht. Das Kollagen setzt sich aus den Typen II, IX und XI zusammen, wobei Typ II mit 90-95% den Hauptanteil darstellt (83). Knorpel ist weder innerviert noch vaskularisiert, die Ernährung erfolgt über die Synovialflüssigkeit (SF) und den subchondralen Knochen.

Gelenkschwellung und Erythembildung sind die ersten klinischen Symptome einer RA. Histologische Untersuchungen zeigen, daß im Gegensatz zum gesunden Gelenk die Synovialflüssigkeit eines arthritischen Gelenks durch starke Zellinfiltration gekennzeichnet ist. In der Synovialflüssigkeit findet man überwiegend neutrophile Granulocyten (84), Makrophagen und aktivierte T-Zellen (85) neben dendritischen Zellen (DC) und Plasmazellen (84;86). Darüber hinaus konnte eine starke, unkontrollierte Proliferation der aktivierten fibroblastähnlichen Synovialzellen an der Entzündungsstelle nachgewiesen werden (87). Diese Zellen können eine T-Zell-unabhängige Gelenkzerstörung einleiten (87).

Aktivierte B-Zellen, Mph und DCs weisen eine starke Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen auf und können sehr effiziente APCs für die in das Gelenk eingewanderten T-Zellen sein. Allerdings muß betont werden, daß die auslösenden Antigene bzw. Autoantigene noch unbekannt sind. An der Gelenkzerstörung sind auch antikörpervermittelte Reaktionen beteiligt. So konnte bei der Mehrzahl dieser Krankheitsfälle gezeigt werden, daß zirkulierende, gegen Kollagen-Typ-II gerichtete

Antikörper nachweisbar sind (88). Im Blut von RA-Patienten wird häufig ein hoher Titer von sogenannten Rheumafaktoren (RF) nachgewiesen. RF sind überwiegend IgM-Antikörper, die gegen den Fc-Teil von IgG-Antikörpern gerichtet sind und entsprechende Immunkomplexe bilden. Diese Komplexe lagern sich auch in Gelenken ab und können zusammen mit Komplement eine Schädigung des Knorpels hervorrufen.

RA ist eine komplexe Erkrankung und ihre Pathogenese ist derzeit Gegenstand intensiver Forschung. Zahlreiche Befunde deuten darauf hin, daß die Entwicklung einer RA auf einer Kombination von genetischen Faktoren, darunter die HLA-DR4- und DR1-Allele, hormonellen Einflüssen und Umweltfaktoren (z.B. Infektionen, Streß) beruht (89-91).

Die Analyse der in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit RA vorhandenen Cytokine ergab, daß vor allem die proinflammatorischen Cytokine TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 und GM-CSF in großen Mengen nachweisbar sind (92).

Aufgrund verschiedener experimenteller Hinweise wird angenommen, daß TNF- α eine zentrale Rolle in der Pathogenese einer RA spielt. So konnte gezeigt werden, daß TNF- α in den Gelenkhaut- und Knorpelzellen die Bildung verschiedener Matrixmetalloproteasen (z.B. Kollagenase (MMP-1), Stromlysin (MMP-3) und Prostaglandin E₂ (PGE₂)), die an der Zerstörung der extrazellulären Matrix beteiligt sind, anregt und die Synthese von Proteoglykanen inhibiert. Somit verursacht TNF- α die Zerstörung des Knorpels und seiner angrenzenden Knochenflächen (93). Ferner konnte gezeigt werden, daß TNF- α die Synthese von proinflammatorischen Cytokinen, wie IL-1, IL-6, IL-8 und GM-CSF, steigert (94-97). Darüber hinaus induziert TNF- α in Endothelzellen die Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle (z.B. β_2 -Integrin, ICAM-1, E-Selektin) und fördert die Synthese von Chemokinen (z.B. MIP-1 α , MCP-4 und RANTES) (97-100). Dies lockt verschiedene Zellen an, wie z.B. Monocyten, Neutrophile, T- und B-Lymphocyten, die an der Entzündungsreaktion beteiligt sind.

An der Entstehung einer RA sind ebenfalls autoreaktive CD4⁺ T-Zellen vom T_H1-Typ beteiligt (92). Die Etablierung von T-Zelllinien aus der Synovialmembran oder aus dem peripheren Blut von Rheumatikern erbrachte selbstreaktive T-Zellen gegen gelenkspezifische Proteinantigene, wie z.B. Kollagen-Typ-II (101). Diese Zellen sezernierten nach Stimulation überwiegend die T_H1-Cytokine IFN- γ und IL-2 (101-105). Darüber hinaus wurde gezeigt, daß in entzündeten Gelenken IL-12, welches die Entwicklung von T_H1-Zellen fördert, ebenfalls vorhanden ist (106). Diese

Untersuchungen demonstrieren, daß T_H1 -Cytokine mit der Entstehung und Aufrechterhaltung einer RA assoziiert sind (103;104). IL-4 konnte bislang nicht in Synovialgewebe von Rheumatikern nachgewiesen werden (107). Dies legt die Hypothese nahe, daß möglicherweise ein Übergewicht an T_H1 -Zellen die Entwicklung der Rheumatoiden Arthritis verursachen könnte.

2.1 Das Tiermodell der Kollagen-Typ-II-induzierten Arthritis (CIA)

Verschiedene Tiermodelle eröffnen weitere experimentelle Möglichkeiten, um die zugrunde liegenden Mechanismen einer Krankheit aufzuklären. Zum Beispiel kann die Pathogenese einer Arthritis zu verschiedenen Zeitpunkten, d.h. vor und nach der Entwicklung klinischer Symptome, untersucht werden. Im Gegensatz dazu werden RA-Patienten immer erst dann untersucht, wenn die Krankheit ausgebrochen ist und sich Arthritis-symptome zeigen. Ferner können Experimente, die an genetisch identischen Tieren und unter stabilen, und kontrollierbaren Lebensbedingungen durchgeführt werden, die Einflüsse von undefinierten Umweltfaktoren weitgehend ausschließen.

Wie oben erwähnt, ist das Autoantigen bei der RA unbekannt, allerdings kann als potentieller Kandidat Kollagen-Typ-II (CII), das Hauptprotein des Knorpels, genannt werden. Dieses fibrilläre Protein besteht aus drei identischen Polypeptidketten ($\alpha 1$ (II)), welche eine Tripel-Helix bilden. CII wird von Chondrocyten synthetisiert und kommt nur in der extrazellulären Matrix der Knochen und des Knorpels vor (108).

Von Trentham et al. wurde im Jahre 1977 erstmals die Induktion einer destruktiven Arthritis in bestimmten Ratteninzuchtstämmen nach einer intradermalen Immunisierung mit homologem (Ratte) oder heterologem (Huhn, Mensch) nativem CII in Adjuvans beschrieben (109;110). Später konnte das Modell der Kollagen-Typ-II-induzierten Arthritis (CIA) auf Mäuse (111;112) und Primaten (113;114) übertragen werden und gilt als anerkanntes Modell für die RA (115;116).

Im Mausmodell führt die Immunisierung mit heterologem CII (Ratte, Huhn, Mensch, Rind) zur Entwicklung einer akuten Arthritis (111;112). 4-6 Wochen nach Immunisierung kommt es zur Entzündungsreaktion, welche ca. 3-4 Wochen andauert. Die betroffenen Gelenke sind gerötet, geschwollen und in ihrer Funktion eingeschränkt (117). Eine mit autologem CII induzierte Arthritis hingegen nimmt einen chronischen Verlauf (117). Mit systemisch exprimierten Kollagentypen, wie z.B. CI und CIII, läßt sich die Krankheit nicht induzieren (118).

Die Inzidenz und der Krankheitsverlauf einer CIA wird von dem angewandten Adjuvans beeinflusst. So wurde gezeigt, daß die Immunisierung von DBA/1-Mäusen mit in komplettem Freundschens Adjuvans (CFA) emulgiertem CII eine schwere destruktive Arthritis mit einer Inzidenz von 50-70% auslöst. CFA besteht aus einer Mineralölfraction und enthält zusätzlich hitzegetötete *Mycobakterien*. Die Bakterien des Stammes *M. tuberculosis H37RA* sind besonders geeignet für die Auslösung einer CIA (119). Bei Verwendung von inkompletten Freundschens Adjuvans (IFA), was aus der gleichen Mineralölfraction wie CFA besteht, aber keine *Mycobakterien* enthält, ist die Inzidenz der CIA gering und die Krankheit wird von einer milder Symptomatik begleitet (111;120).

CIA hat viele klinische und histologische Ähnlichkeiten mit der humanen RA. So konnte im Maussystem gezeigt werden, daß das Synovium eines arthritischen Gelenks von Mac-1⁺ MHC-Klasse-II⁺ Makrophagen, B220⁺ MHC-Klasse-II⁺ B-Zellen und CD4⁺ T-Zellen infiltriert ist. Außerdem wurde eine massive Infiltration neutrophiler Granulocyten nachgewiesen, welche die Schwellung der Pfortengelenke verursacht.

Ähnlich wie bei RA ist die Entwicklung der CIA mit bestimmten MHC-Klasse-II-Haplotypen assoziiert. Im Mausmodell korreliert die Suszeptibilität für eine CIA mit der MHC-Klasse-II-Expression der I-A^q- und I-A^r-Allele (117;121;122). Darüber hinaus wird ein supprimierender Einfluß auf die Entstehung einer CIA mit der Expression von I-E-Molekülen vermutet (123;124). Neben bestimmten MHC-Klasse-II-Haplotypen spielen andere Gene außerhalb des MHC-Komplexes, im sogenannten genetischen Hintergrund der jeweiligen Mausstämme, eine wichtige Rolle für die Entstehung der CIA (123;125).

Die Tatsache, daß die CIA-Suszeptibilität mit bestimmten MHC-Klasse-II-Haplotypen assoziiert ist, weist auf die potentielle Beteiligung von CD4⁺ T-Zellen bei der CIA-Pathogenese hin. Tatsächlich führt die Immunisierung von DBA/1-Mäusen mit CII zur Proliferation CII-spezifischer CD4⁺ T-Zellen. Allerdings muß betont werden, daß diese Zellen überwiegend gegen Antigen determinanten des zur Immunisierung verwendeten heterologen CII gerichtet sind und somit zum größten Teil nicht mit autologem CII reagieren (126). Jedoch wurde berichtet, daß durch sehr hohe Dosen von homologem CII eine schwache Proliferation offensichtlich autoreaktiver T-Zellen induziert werden kann (126). Dies deutet auf eine Toleranz der autoreaktiven T-Zellen hin.

Im Gegensatz dazu können Antikörper, die gegen heterologes CII gerichtet sind, mit murinem CII kreuzreagieren (127). Diese Antikörper binden an bestimmte Konformationsdeterminanten des intakten tripelhelikalen CII Moleküls (128). Sie zeigen weder eine Kreuzreaktivität mit den einzelnen Ketten ($\alpha 1$ (II)) des denaturierten CII noch mit anderen Kollagentypen. Die Tatsache, daß sich mit denaturierten CII keine CIA induzieren läßt (129), spricht für die Bedeutung von autoreaktiven B-Zellen bzw. Antikörpern bei der CIA-Pathogenese. Es konnte gezeigt werden, daß B-Zell-defiziente Mäuse keine CIA entwickeln (130) und durch die Behandlung mit anti-IgM- (131) und anti-CD40L- (132) Antikörpern die Entwicklung einer CIA verhindert werden kann. Zusätzlich konnte durch eine Übertragung von Serum oder gereinigten anti-CII-Antikörpern erkrankter Mäuse bei gesunden Empfängertieren eine akute vorübergehende Entzündungsreaktion ausgelöst werden (133-135). Hierbei wurde den IgG_{2a}- und IgG_{2b}- Antikörpern eine besondere Rolle zugeordnet (136;137). Diese Antikörpersubklassen sind im Maussystem für die Aktivierung der Komplementkaskade verantwortlich (138). Dies könnte ein möglicher Mechanismus sein, über den Antikörper Arthritis initiieren (136;137). So konnte gezeigt werden, daß die Gabe von komplementdepletierendem Kobragift (137) oder anti-C5-Antikörpern (139) die Entwicklung einer CIA verhindert.

Neben der Antikörperproduktion kommt den B-Zellen eine potentielle Rolle als APC zu. Hier ist anzumerken, daß natives CII von dendritischen Zellen nicht prozessiert bzw. präsentiert werden kann (140;141). Hingegen können B-Zellen natives CII über ihre B-Zellrezeptoren aufnehmen, prozessieren und den naiven T-Zellen präsentieren.

Die Beteiligung CII-spezifischer T-Zellen an der Pathogenese einer CIA konnte in verschiedenen Experimenten nachgewiesen werden. Die krankheitsassoziierten T-Zellen scheinen zur Population der CD4⁺ $\alpha\beta$ T-Zellen zu gehören. Einerseits ließ sich mit anti-CD4-Antikörpern die Immunreaktion inklusive der Bildung CII-spezifischer Antikörper hemmen und die Entstehung einer Arthritis verhindern. Andererseits wurde durch Transfer CII-spezifischer CD4⁺ T-Zellen von erkrankten Mäusen auf gesunde Empfängertiere eine zelluläre Infiltration der Gelenke, aber keine klinisch manifeste Arthritis induziert (126;142-144). Ferner wurde durch die Übertragung derartiger Zellen in immundefizienten SCID^{*}-Mäusen eine milde Arthritis hervorgerufen (145;146). Weitere Transferexperimente ergaben, daß für die Entwicklung einer chronischen

* SCID = schwerer kombinierter Immundefekt als Folge eines genetisch bedingten Defekts, der dazu führt,

aggressiven Arthritis ein Zusammenspiel von CII-spezifischen CD4⁺ T-Zellen und Antikörpern essentiell ist (129;147).

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß arthritogene T-Zellen ein eingeschränktes TCR-Repertoire besitzen. So ergab die Untersuchung von T-Zellen aus peripheren Lymphknoten und arthritischen Gelenken im Mausmodell, daß bevorzugt die TCR-Gensegmente V α 11.1, V α 8.3 und V α 22.1 in Kombination mit V β 8.2, V β 6 und V β 1 exprimiert werden (148-150). Außerdem wurde berichtet, daß SWR/J- und FVB/J-Mäuse, welche das für CIA permissive I-A^q-Molekül exprimieren und gleichzeitig eine genetisch bedingte ca. 50%-ige Depletion von TCR-V β -Gensegmenten haben, gegen die Induktion einer CIA resistent sind (151-153). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß SWR/J-Mäuse, die transgen für die T-Zellrezeptor-V β 12-Kette eines CII-spezifischen, arthritogenen T-Zellklons waren, trotzdem keine CIA entwickelten (154). Allerdings wurde berichtet, daß die transgene Expression dieser TCR- β -Kette in F1 (SWR/J x DBA/1)-Hybridmäusen die Suszeptibilität gegenüber einer CIA erhöht (154). Diese Ergebnisse zeigen, daß einerseits die Expression von bestimmten TCR-V β -Gensegmenten eine wesentliche Komponente bezüglich der Empfänglichkeit gegenüber einer CIA ist, dies andererseits aber nicht für die Arthritsentwicklung zumindest in transgenen SWR/J-Mäusen ausreicht. Dies weist auf die Komplexität dieser Autoimmunerkrankung hin und auf das Zusammenwirken einer Reihe anderer, noch weitgehend unbekannter Faktoren.

Viele Untersuchungen deuten darauf hin, daß vor allem T_H1-Zellen entscheidend an der Induktion einer CIA beteiligt sind. So produzieren CD4⁺ T-Zellen immunisierter DBA/1-Mäuse nach Stimulation mit CII *in vitro* IFN- γ , und die im Serum nachweisbaren kollagenspezifischen Antikörper gehören überwiegend den komplementfixierenden IgG_{2a}- und IgG_{2b}-Subklassen an. Außerdem konnte gezeigt werden, daß die Gabe von IFN- γ nach Immunisierung mit CII die Entwicklung einer CIA beschleunigt (155). Hingegen kann die Neutralisation von IFN- γ während der Induktion einer CIA die Entstehung der Krankheit inhibieren (156). Außerdem konnte in diesem Modell gezeigt werden, daß die Gabe des T_H1-Differenzierungsfaktors IL-12 die Erkrankung sowohl die Inzidenz als auch den Schweregrad betreffend, fördert (120). Diese Befunde sprechen für eine präferentielle Entwicklung von T_H1-Zellen und für eine pathogene Bedeutung dieser T_H-Subpopulation bei einer CIA.

daß keine Antikörper oder T-Zellrezeptoren produziert werden können.

Allerdings gibt es hinsichtlich der pathogenen Funktion von IFN- γ bei der CIA auch widersprüchliche Befunde (156;157). So wurde publiziert, daß in Mäusen, die defizient für die IFN- γ -Rezeptor- α -Kette (IFN- γ R KO) sind und die somit nicht auf IFN- γ reagieren können, eine schwere destruktive Arthritis mit höherer Inzidenz als in normalen DBA/1-Tieren induzierbar ist (158-160). IFN- γ scheint also einerseits essentiell für die Entstehung einer CIA zu sein, während sich andererseits das Fehlen seines Rezeptors eher verschlimmernd auswirkt.

3. FRAGESTELLUNGEN DER ARBEIT

Im Hinblick auf das oben Beschriebene war ein erstes Ziel der vorliegenden Arbeit die Aufklärung der Funktion des T_H1-Cytokins IFN- γ bei der Entwicklung einer CIA. Zu diesem Zweck sollten IFN- γ -defiziente (IFN- γ KO) Mäuse verwendet werden. Um zu prüfen, ob die beobachteten Effekte ausschließlich aufgrund des fehlenden IFN- γ auftreten, sollten IFN- γ KO-Mäuse mit exogenem IFN- γ behandelt werden. Dies ist bei IFN- γ -Rezeptor-defizienten Mäusen nicht möglich. Alternativ sollten IFN- γ KO-Mäuse mit IL-12 behandelt werden, um zu klären, ob IL-12 in Abwesenheit von IFN- γ die Induktion einer CIA ermöglichen kann.

In einer zweiten Versuchsreihe sollte eine CIA schon im Verlauf der Induktionsphase inhibiert werden. Zu diesem Zweck sollte ein physiologischer IL-12-Antagonist (IL-12(p40)₂) eingesetzt werden. Weiterhin war vorgesehen, die Entstehung einer CIA auf der Ebene der T-Helfereffektorzellen zu unterbinden, indirekt indem deren Migration durch anti-CD44 Antikörper blockiert werden sollte oder direkt durch Elimination der T-Helferzellen mittels anti-CD4 Antikörper.

Unter Berücksichtigung der in der zweiten Versuchsreihe erhaltenen Daten sollte dann in einer dritten Versuchsreihe geprüft werden, ob eine bestehende CIA therapiert werden kann, d.h. die Mäuse sollten erst dann behandelt werden, wenn sie schon CIA-Symptome aufweisen und nicht schon während der Induktionsphase. Das Behandlungskonzept sollte darin bestehen, die erkrankten Mäuse durch eine Glukokortikoid-Behandlung transient von den CIA-Symptomen zu befreien. Durch flankierende immunmodulatorische Maßnahmen (anti-CD4-, anti-IFN- γ -Antikörper, IL-12(p40)₂) sollte anschließend versucht werden, eine wiederaufflammenden CIA-Symptome auf möglichst niedrigem Niveau zu stabilisieren oder sogar die Tiere symptomfrei zu halten.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. MATERIALIEN

1.1 Laborgeräte

Die Geräte, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit von besonderer Bedeutung waren, sind in folgender Tabelle aufgelistet.

Bezeichnung	Typ/Modell	Hersteller
Bestrahlungsgerät	Gamma Cell 2000	<i>Isgaard Medical</i>
Beta-Szintillator-Zähler	TRI-CARB 460C	<i>Packard</i>
CO ₂ -Inkubator	B 50 60 EK-CO ₂	<i>Heraeus, Hanau</i>
Elektrophorese-System		
Netzgerät	Modell 3000/300	<i>Bio-Rad</i>
Horizontale Kammer	Maxi 20x25 cm	<i>MWG-Biotech</i>
ELISA-Photometer	ASYS Hightech	<i>ASYS Hightech GmbH</i>
MikroWIN Software	Version 2.25	<i>Mikrotek Laborsysteme GmbH, Overath</i>
FACScan Cytofluorometer		<i>Becton-Dickinson, USA</i>
CellQuest Software		
Magnetischer Zellsorter (MACS)	MACS, MS ⁺ und LS ⁺ Säulen	<i>Miltenyi Biotec</i>
Mikroskope	Labormikroskop	<i>Zeiss, Oberkochen</i>
	Invertmikroskop	<i>Zeiss, Oberkochen</i>
Photometer	GeneQuant	<i>MWG-Biotech</i>
Thermocycler	OmniGene	<i>MWG-Biotech</i>
Tischzentrifuge	Biofuge 13	<i>Heraeus, Hanau</i>
Waage, digital	Typ 1202	<i>Sartorius, Göttingen</i>
Wasserbad	Haake GH & Haake D8	<i>Haake</i>
Werkbank, steril	Nr. 003	<i>Matthiesen Bio</i>
Zentrifuge	Sorvall RC5C	<i>Du Pont</i>
	Megafuge 1.0R	<i>Heraeus, Hanau</i>

1.2 Chemikalien, Reagenzien, Lösungen

- **ABTS**

Sigma, Deisenhofen

2,2'-Azino-bis(-3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)-diammoniumsalz

(jeweils frisch gelöst in Citratpuffer + 0,0075% Wasserstoffperoxid)

-
- **CFA** (komplette Freundschsche Adjuvans) *Difco, Detroit, USA*
(Bestell-Nr. 3113-60-5, CFA enthält abgetötete Bakterien [*Mycobacterium tuberculosis*, Stamm H37 RA, 10 µg/ml] in Mineralöl, Lagerung bei 4°C)
 - **Dexamethason** *Sigma, Deisenhofen*
(Bestell-Nr. D2915, 10 mg/ml gelöst in H₂O, Lagerung bei -20°C, lichtempfindlich)
 - **DMSO** (Dimethylsulfoxid) *Roth, Karlsruhe*
 - **EDTA** (Ethyldiamintetraessigsäure-Na₂-Salz x 2H₂O) *Roth, Karlsruhe*
 - **Essigsäure** *Roth, Karlsruhe*
 - **Ficoll** *Pharmacia, Freiburg*
(steriles Medium [Silicagel beschichtet mit Polyvinylpyrrolidon] der Dichte 1,13 g/ml +/- 0,005, pH 9,0 - zur Dichtegradienten-Zentrifugation von Zellen; Lagerung bei 4°C)
 - **IFA** (inkomplette Freundschsche Adjuvans) *Difco, Detroit, USA*
(Bestell-Nr. 263910, IFA besteht wie CFA aus Mineralöl mit Emulgatoren aber ohne Mycobakterien, Lagerung bei 4°C)
 - **Kollagen-Typ-II** (CII, aus Hühner-Sternum) *Sigma, Deisenhofen*
(*collagen-type-II from chicken sternal cartilage, cell culture tested*, Bestell-Nr. C-9301; 4 mg/ml gelöst in 0,01M Essigsäure (0,2 µm), Lagerung bei -20°C)
 - **LPS** (Lipopolysaccharid, aus E.coli O55:B5) *Difco, Detroit, USA*
(10 mg/ml gelöst in PBS [1 x], Lagerung bei -20°C)
 - **2-Mercaptoethanol** (2-ME) *Sigma, Deisenhofen*
Eine Stammlösung von 20 µl 2-ME in 5,7 ml H₂O wurde 0,1%-ig (v/v) den Kulturmedien zugesetzt (Endkonzentration: 5 x 10⁻⁵ M). Das Reduktionsmittel 2-ME vermittelt einen Oxidationsschutz.
 - **Milchpulver** (aus Magermilch, Instant) *Reformhaus*
 - **(Mikrokultur Tetrazolium-Test) Tetrazolium (MTT)** *Sigma, Dreisenhofen*

- **Paraformaldehyd (PFA)** *Roth, Karlsruhe*
Eine 0,7%-ige (w/v) Lösung wurde in PBS [1 x] angesetzt, 30 min bei 65°C im Wasserbad gelöst und der pH-Wert auf 7,0 eingestellt. Zur Durchführung immuncytofluorometrischer Untersuchungen wurden die Zellen mit PFA-Lösung fixiert.

- **Proteinase K** *Boehringer, Mannheim*
(Bestell-Nr. 745723, 10 mg/ml gelöst in H₂O, Lagerung bei - 20°C)

- **Streptavidin-Meerrettichperoxidase-konjugiert** *Boehringer, Mannheim*

- **Tritium-markierte Thymidin-Desoxyribose (³H-TdR):** *Amersham-Buchler*
(zum Markieren von Zellen im Proliferationstest, Endkonzentration: 0,1µCi/well)

- **Tween 20** (Polyoxyethylensorbitanmonolaurat) *Roth, Karlsruhe*

- **Wasserstoffperoxid, 30%** *Roth, Karlsruhe*

1.3 Plastikwaren

Zur Präparation und Kultivierung von Zellen (Milzzellen, Hybridomzellen) und für die verschiedenen Testsysteme (*in vitro* Stimulationen von Milzzellen und ELISA) wurden sterile Plastikgefäße verwendet.

Einfrierröhrchen	Cryotube 1,8 ml	<i>Nunc, Wiesbaden</i>
ELISA-Platten	96well Flachboden, Maxisorp™ 96well Flachboden, Nr. 655061	<i>Nunc, Wiesbaden</i> <i>Greiner, Nürtingen</i>
FACS-Röhrchen	5 ml, Rundboden, Nr. 2052	<i>Falcon</i>
Petrischalen	10 cm Durchmesser, Nr. 628102 (unbeschichtet)	<i>Greiner, Nürtingen</i>
Zellkulturflaschen	175 cm ² /800 ml, Nr. 156502 80 cm ² /250 ml, Nr. 152732 25 cm ² /50 ml, Nr. 163371	<i>Nunc, Wiesbaden</i> <i>Nunc, Wiesbaden</i> <i>Nunc, Wiesbaden</i>

Zellkulturplatten	24well Flachboden, Nr. 3524	<i>Costar, Fernwald</i>
	48well Flachboden, Nr. 3548	<i>Costar, Fernwald</i>
	96well Flachboden, Nr. 3598	<i>Costar, Fernwald</i>
	96well Rundboden, Nr. 650101	<i>Greiner, Nürtingen</i>
Zentrifugenröhrchen	15 ml, Spitzboden, Nr. 155170	<i>Greiner, Nürtingen</i>
	50 ml, Spitzboden, Nr. 227261	<i>Greiner, Nürtingen</i>

1.4 Serologische Reagenzien

1.4.1 Antikörper zur Neutralisierung von Cytokinen

- **XMG1.2 (anti-IFN- γ)**

Die Hybridomzellen XMG1.2 sezernieren einen neutralisierenden monoklonalen Ratte-anti-Maus-IFN- γ -Antikörper der IgG₁ Subklasse. Die Zellen wurden uns freundlicherweise von Dr. T. Mosmann, Edmonton, Kanada zur Verfügung gestellt und in IMDM + 5% FCS kultiviert. Der Antikörper wurde aus Kulturüberständen angereinigt (siehe II.2.2) und in Experimenten zur Neutralisierung von IFN- γ eingesetzt.

- **BVD4-1D11 (anti-IL-4)**

Die Hybridomzellen BVD4-1D11 sezernieren einen monoklonalen Ratte-anti-Maus-IL-4-Antikörper der IgG_{2b} Subklasse. Die Zellen wurden uns von Dr. A. O'Garra, DNAX Research Institute, Palo Alto, CA, USA zur Verfügung gestellt. Der Antikörper wurde aus Kulturüberständen angereinigt und in Experimenten zur Neutralisierung von IL-4 eingesetzt.

1.4.2 Antikörper für ELISA

Antikörper zum Nachweis von Cytokinen

- **R4-6A2 und AN18.17.24-biotinyliert: anti-IFN- γ**

Die Hybridome R4-6A2 und AN18.17.24 sezernieren Ratten-Antikörper, welche verschiedene Epitope auf murinem IFN- γ erkennen. Die Antikörper wurden aus den Kulturüberständen über Affinitätschromatographie gereinigt und in einem ELISA mit Spezifität für murines IFN- γ verwendet. Wir erhielten die Hybridomzellen von Dr. M. Lohoff, Erlangen.

- **JES6-1A12, JES6-5H4 und 90.2-biotinyliert: anti-IL-2**

Es handelt sich um Ratte-anti-Maus-IL-2-Antikörper der IgG_{2a} bzw. IgG_{2b} Subklasse. Sie wurden in einem ELISA mit Spezifität für Maus-IL-2 eingesetzt. Die beiden Klone JES6-

1A12 und JES6-5H4 wurden von Dr. A. O'Garra, DNAX Research Institute, Palo Alto, CA, USA zur Verfügung gestellt. Die Antikörper des Klons 90.2 wurden von H. D. Dr. habil. E. Schmitt affinitätsgereinigt und biotinyliert.

- **BVD4-1D11 und BVD6-24G2-biotinyliert: anti-IL-4**

Beide Hybridome sezernieren Ratten-Antikörper, welche verschiedene Epitope auf murinem IL-4 erkennen. Die Antikörper wurden über Affinitätschromatographie gereinigt und in einem ELISA mit Spezifität für murines IL-4 verwendet. Die beiden Klone wurden von Dr. A. O'Garra, DNAX Research Institute, Palo Alto, CA, USA zur Verfügung gestellt.

- **TRFK5 und TRFK4-biotinyliert: anti-IL-5**

Es handelt sich um Ratte-anti-Maus-IL-5-Antikörper der IgG₁ bzw. IgG_{2a} Subklasse. Sie wurden in einem ELISA mit Spezifität für Maus-IL-5 eingesetzt.

- **2B5 und 10F6-biotinyliert: anti-IL-12**

Der Antikörper 2B5 erkennt spezifisch eine Konformationsdeterminante des IL-12-Heterodimers und wurde als „Fang“-Antikörper zum Nachweis von biologisch aktivem IL-12 eingesetzt. Der Antikörper 10F6 bindet an die p40-Kette von IL-12 sowohl im IL-12-Heterodimer als auch im freien p40 (Monomer und Dimer). Die Antikörper dienen zum Nachweis von IL-12 und IL-12p40 mittels ELISA. Diese Reagenzien erhielten wir von Herrn Dr. M. K. Gately, Hoffmann-LaRoche, Nutley, USA.

Antikörper zum Nachweis von Immunglobulinen

- **Anti-Maus-IgG₁, biotinyliert**

Die Antikörper (Bestell-Nr. AB273) wurden von The Binding Site, Heidelberg bezogen und bei – 20°C aufbewahrt.

- **Anti-Maus-IgG_{2a}, biotinyliert**

Die Antikörper (Bestell-Nr. AB274) wurden von The Binding Site, Heidelberg bezogen und bei – 20°C aufbewahrt.

- **Anti-Maus-IgG_{2b}, biotinyliert**

Die Antikörper (Bestell-Nr. AB275) wurden von The Binding Site, Heidelberg bezogen und bei – 20°C aufbewahrt.

- **Anti-Maus-Ig, biotinyliert**

Diese Antikörper wurden von H. D. Dr. habil. E. Schmitt (Institut für Immunologie, Mainz) entwickelt, über Affinitätschromatographie gereinigt und biotinyliert.

1.4.3 Antikörper zur Stimulation und Kultivierung von T-Zellen

- **145-2C11 (anti-CD3)**

Es handelt sich um einen Hamster-anti-Maus-CD3-Antikörper (IgG_{2b}), welcher im Labor von Dr. J. Bluestone (Ben May Institute, Chicago, IL, USA) entwickelt wurde. Er ermöglicht die antigenunabhängige polyklonale Aktivierung von T-Zellen über den TCR/CD3-Komplex.

- **37.51 (anti-CD28)**

Die Hybridomzellen 37.51 sezernieren einen Hamster-anti-Maus-CD28-Antikörper, welcher das CD28 Molekül auf der Oberfläche muriner CD4⁺ T-Zellen erkennt und ein kostimulatorisches Signal während der T-Zellaktivierung liefert. Wir erhielten die Hybridomzellen über Dr. G. Leclereq, Universität Genf, Schweiz.

- **MR11-1 (anti-TCR-V β ₁₂)**

Ein Maus-anti-Maus-TCR-V β ₁₂-Antikörper (IgG₁), welcher im Labor von Dr. O. Kanagawa (Missouri, USA) entwickelt wurde. Er ermöglicht die antigenunabhängige polyklonale Aktivierung von T-Zellen, welche diese TCR-V β ₁₂-Kette exprimieren.

1.4.4 Antikörper zum Nachweis von Zelloberflächenmolekülen

- **GK1.5 (anti-CD4)**

GK1.5 ist ein Antikörper (IgG_{2b}) aus der Ratte, welcher spezifisch für das murine CD4-Molekül ist. Die Bezugsquelle für das Hybridom war die ATCC (TIB 207).

- **H129.19 (anti-CD4), biotinyliert**

Der Klon H129.19, der einen Ratte-anti-Maus-CD4-Antikörper produziert, wurde von Dr. H. Huber (Hautklinik Mainz) zur Verfügung gestellt.

- **IM7 (anti-CD44)**

Es handelt sich um einen Ratte-anti-Maus-CD44-Antikörper, der von Dr. M. Hegen (Universität Karlsruhe) zur Verfügung gestellt wurde.

- **KH116 (anti-I-A^q), biotinyliert**

Der Antikörper wurde von PharMingen International, Bestell-Nr. 06302D, bezogen. Er bindet an das Maus MHC-Klasse-II-Allel I-A^q und wurde für FACS-Färbungen (1: 200) eingesetzt.

- **25-5-165 (anti-I-A^b)**, FITC-konjugiert

Der Antikörper wurde von Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA, Bestell-Nr. MM3301, bezogen. Er bindet an das Maus MHC-Klasse-II-Allel I-A^b und wurde für FACS-Färbungen (1: 10) eingesetzt.

- **Streptavidin-R-Phycoerythrin (SA-PE)**

Dieses Streptavidin-Konjugat wurde von Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA, USA, Bestell-Nr. 016-110-084) über Dianova (Hamburg) bezogen. Es wurde bei Fluoreszenzfärbungen zum Nachweis biotinylierter Antikörper (1: 400) verwendet.

- **Ziege-anti-Maus IgG₁-FITC-konjugiert**

Der polyklonale Antikörper wurde von Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA, Bestell-Nr. M32101, bezogen. Er erkennt schwere (H) Ketten von Maus-IgG₁ und wurde für Immunfluoreszenzfärbungen (1: 250) eingesetzt.

1.4.5 Präparation polyklonaler Antikörper

- **Ratten-Immunglobulin**

Ratten-Immunglobulin wurde aus Serum von nicht immunisierten Ratten, die im institutseigenen Tierstall gezüchtet worden waren, unter Verwendung einer Hydroxylapatit-Säule (Merck, Darmstadt) gereinigt. Die Konzentration wurde auf 10 mg/ml eingestellt und die einzelnen Aliquote bei - 70°C aufbewahrt. Es diente als Kontroll-IgG in *in vivo* Experimenten.

1.5 Cytokine

- **Interleukin-2: murin, rekombinant (mrIL-2)**

Dr. F. Melchers, Institut für Immunologie, Basel, Schweiz, übergab uns die mit der cDNA für murines IL-2 transfizierten X63Ag8.653-Myelomzellen. mrIL-2 wurde zur Vermehrung der T-Zelllinien eingesetzt (Endkonzentration: 10 ng/ml).

- **Interleukin-4: murin, rekombinant (mrIL-4)**

mrIL-4 wurde von H. D. Dr. habil. E. Schmitt, Institut für Immunologie, Mainz, über Affinitätschromatographie aus dem Kulturüberstand des mit IL-4 cDNA transfizierten Myeloms X63Ag8.653 angereinigt und zur Differenzierung der T_H2-Zellen eingesetzt (Endkonzentration: 1 x 10³ U/ml).

- **Interleukin-5: murin, rekombinant (mrIL-5)**
mrIL-5 wurde von H. D. Dr. habil. E. Schmitt, Institut für Immunologie, Mainz, zur Verfügung gestellt und als Standard im IL-5-spezifischen ELISA verwendet.
- **Interleukin-6: murin, rekombinant (mrIL-6)**
mrIL-6 wurde als Standard im IL-6-Bioassay verwendet. Zur Homogenität gereinigt von Dr. J. van Snick, Ludwig Institut for Cancer Research, Brüssel.
- **Interleukin-12: murin, rekombinant (mrIL-12)**
Die für die umfangreichen *in vivo* Experimente benötigten Mengen an gereinigtem IL-12 wurden freundlicherweise von Dr. M. K. Gately, Hoffmann LaRoche Research Center, Nutely, USA, zur Verfügung gestellt.
- **IL-12p40-Homodimer: murin, rekombinant (IL-12(p40)₂)**
IL-12(p40)₂ wurde von Dr. F. Mattner, Hoffmann LaRoche, Mailand, Italien, zur Verfügung gestellt. Die Stammlösung enthielt 1,04 mg gereinigtes Protein pro ml Puffer (0,5M NaCl, 0,02M Phosphatpuffer, pH 7,2). Eine Konzentration von 250 ng/ml IL-12p40-Homodimer führt zur kompletten Inhibition von 250 pg/ml IL-12. Zur *in vivo* Behandlung wurde pro Maus 40 µg IL-12p40-Homodimer jeden zweiten Tag verabreicht.
- **Interleukin-15: human, rekombinant (hrIL-15)**
hrIL-15 wurde von Dr. T. Wölfel, III Med. Klinik, Mainz, zur Verfügung gestellt und als Standard im IL-15-Bioassay verwendet.
- **Interferon- γ : murin, rekombinant (mrIFN- γ)**
mrIFN- γ wurde von Dr. G. R. Adolf, Ernst Boehringer Institut für Arzneimittelforschung, Wien, Österreich, zur Verfügung gestellt.
- **Tumor Nekrose Faktor- α : human, rekombinant (hrTNF- α)**
hrTNF- α wurde von Dr. G. R. Adolf, Ernst Boehringer Institut für Arzneimittelforschung, Wien, Österreich, zur Verfügung gestellt und als Standard im TNF- α -Bioassay verwendet.

1.6 Materialien für die Zellkultur

Die verwendeten Puffer und Kulturmedien wurden mit vollentsalztem, über Aktivkohle gereinigtem Wasser (VE-Wasser) angesetzt, sterilfiltriert (0,2 µm Filter) und bei 4°C aufbewahrt.

- **MEM** (*minimal essential medium*): *Gibco, Karlsruhe*

MEM-Trockenpulver	10,58 g/l
HEPES	4,77 g/l

MEM mit 2% FCS wurde zum Waschen und kurzfristigen Aufbewahren von Zellen verwendet.

- **IMDM** (*Iscove's modified Dulbecco's medium*): *Gibco, Karlsruhe*

IMDM-Trockenpulver	7,67 g/l
NaHCO ₃	3,02 g/l
Penicillin	10 ⁵ U/l
Streptomycin	100 mg/ml
2-Mercaptoethanol	5 x 10 ⁻⁵ M
<i>(Serva, Heidelberg, Nr. 28625)</i>	
Na-Pyruvat	1 mM
Glutamin	2 mM
pH-Wert: 7,2 (Phenolrot als Indikator)	
HEPES	3,574 g/l

Nach Zusatz von 5% FCS und 1% NaPyr wurde dieses Medium Testmedium genannt und diente zur Kultivierung von Zellen.

- **PBS** (*phosphate buffered saline*):

Dieser Puffer wurde durch Verdünnung (1: 10) mit VE-Wasser aus einer konzentrierten Stammlösung (10 x) folgender Zusammensetzung hergestellt:

NaCl	81,8 g/l [1,4 M]
NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O	15,6 g/l [0,1 M]

Der pH-Wert wurde mit 10 N NaOH auf 6,6 eingestellt und betrug nach Verdünnung 7,4.

- **Rinderserumalbumin (BSA)** *Boehringer, Mannheim*

BSA-Pulver (Fraktion V) wurde je nach Verwendung mit PBS [1 x] als 0,1-5%-ige Lösung angesetzt, sterilfiltriert (0,2 / 0,4 µm) und bei 4°C aufbewahrt.

- **Glutamin (Gln)** *Roth, Karlsruhe*

Eine 0,2 M Stammlösung wurde mit 29,2 g/l L(+)-Glutamin (Bestell-Nr. 3772) in VE-Wasser angesetzt, 0,2 µm sterilfiltriert und in Aliquoten zu je 10 ml bei -20°C aufbewahrt. Sie wurde dem Kulturmedium IMDM im Verhältnis 1: 100 zugesetzt.

-
- **Natriumpyruvat (NaPyr)** *Seromed, München*

Eine sterile 0,1 M NaPyr-Lösung (Bestell-Nr. L0473) wurde bei 4°C aufbewahrt und dem Kulturmedium im Verhältnis 1: 100 zugesetzt.
 - **Penicillin-/Streptomycinlösung** *Gibco, Karlsruhe*

Als weiterer Zusatz für Zellkulturmedien wurde eine sterile Antibiotikallösung von 10⁴ U/ml Penicillin und 10 mg/ml Streptomycin (Bestell-Nr. 04305140H) im Verhältnis 1: 100 verwendet. Endkonzentration: 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin.
 - **Gey's Lysepuffer**

Zur selektiven hypotonen Lyse durch osmotischen Schock von Erythrocyten in Milzzellpräparationen wurde eine 0,83%-ige Ammoniumchloridlösung folgender Zusammensetzung verwendet:

NH ₄ Cl	8,290 g/l
KHCO ₃	1,000 g/l
EDTA	0,037 g/l
 - **Trypanblaulösung** *Roth, Karlsruhe*

Trypanblau ist ein sogenannter Vitalfarbstoff, der tote Zellen anfärbt. Lebende Zellen mit intakter Membran nehmen diesen Farbstoff nicht auf. Die gebrauchsfertige Lösung zur Bestimmung der Lebendzellzahl in Zellsuspensionen wurde durch Mischung der Lösungen A und B im Verhältnis 5: 1 hergestellt.

Lösung A:	0,2% (w/v) Trypanblau in VE-Wasser
Lösung B:	4,25% (w/v) NaCl in VE-Wasser
 - **Fötale Kälberserum (FCS, fetal calf serum)**

FCS wurde zur Kultivierung von Zellen dem MEM- und IMDM-Medium zugesetzt. Es stellt eine Quelle von größtenteils unbekanntem Wachstumsfaktoren dar. FCS wurde von verschiedenen Firmen bezogen und nach unseren eigenen Toxizitäts- und Eignungsprüfungen für die Zellkultur verwendet. Die gelieferten Seren waren steril und frei von Mycoplasmen laut Angabe der Hersteller. FCS wurde vor Gebrauch jeweils 30 Minuten bei 56°C im Wasserbad hitzebehandelt. Dies diente der Inaktivierung von Komplementkomponenten. Anschließend wurde FCS in 100 ml aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

2. METHODEN

Zur Vermeidung von Kontaminationen der Zellkulturen mit Luftkeimen (Pilzsporen, Bakterien) wurden die Arbeiten mit Zellkulturen an sterilen Werkbänken unter Verwendung steriler Glas- bzw. Plastikgeräte durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Inkubatoren bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt in gesättigter Wasserdampf-atmosphäre. Unter diesen Bedingungen bleibt der physiologische pH-Wert der CO₂/Bicarbonat gepufferten Medien konstant.

2.1 Methoden der Zellkultur

2.1.1 Präparation von Zellen aus lymphatischen Organen der Maus

Die Mäuse wurden durch Genickbruch getötet. Alle anschließenden Präparationsschritte erfolgten unter sterilen Bedingungen.

- **Milz**

Milzen wurden einerseits als Quelle von APCs zur Stimulation langzeitkultivierter T-Lymphocyten von nicht immunisierten Tieren und andererseits zur Charakterisierung der Immunreaktion (Proliferation, Cytokinbildung) nach Immunisierung von Mäusen verwendet. Nach der Entnahme wurde das Organ in eisgekühltem MEM + 2% FCS aufbewahrt. Die Homogenisierung der Milzen erfolgte durch Zerdrücken mit dem Kolben einer 1 ml Spritze durch ein feinmaschiges Metallsieb (60 gauge) oder wahlweise durch Zerreiben zwischen zwei geschliffenen Objektträgern. Die entstandene Zellsuspension wurde mehrfach kräftig resuspendiert und anschließend für 10 Minuten bei 4°C aufbewahrt. Dies ermöglichte das Absetzen von Bindegewebsaggregaten. Danach wurden die im Überstand enthaltenen Zellen in ein neues Röhrchen überführt und 10 Minuten bei 300 x g (4°C) zentrifugiert. Das Zellsediment wurde zur Lyse der Erythrocyten für eine Minute in 1 ml Gey's Lysepuffer (37°C) pro Milz resuspendiert. Der Lysevorgang wurde durch Zugabe von 10 ml eisgekühltem MEM + 2% FCS gestoppt, um eine Schädigung weiterer Zellen zu vermeiden. Anschließend wurden die Milzzellen zweimal gewaschen (Zentrifugieren bei 300 x g und erneutes Resuspendieren in 10 ml MEM + 2% FCS) und die Zellzahl bestimmt. Die durchschnittliche Ausbeute lag zwischen 5-10 x 10⁷ Zellen pro Milz.

- **Lymphknoten**

Die Lymphknotenzellen wurden aus nach Immunisierung vergrößerten mandibularen, poplitealen und inguinalen Lymphknoten gewonnen. Analog der Präparation von Milzen wurde hieraus eine Einzelzellsuspension hergestellt, welche *ex vivo* mit dem zur Immunisierung verwendeten Antigen restimuliert wurde.

2.1.2 Bestimmung der Lebendzellzahl und der Zellvitalität

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurde ein Aliquot der Zellsuspension mit physiologischer Trypanblau-Lösung verdünnt. Dabei wurden tote Zellen blau gefärbt, während lebende Zellen den Farbstoff aufgrund ihrer intakten Zellmembran nicht aufnahmen. Mittels einer Neubauer-Zählkammer (Kammertiefe: 0,1 mm) wurden Zellen gezählt. Die Anzahl der lebenden Zellen eines Großquadrates, bestehend aus 16 Einzelquadraten (N), multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor (V) und der Kammerkonstante (10^4), ergab die Anzahl der lebenden Zellen pro ml ($N \times V \times 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$).

2.1.3 Separation von CD4⁺ T-Zellen

Die Separation von CD4⁺ T-Zellen erfolgte mit Hilfe des VarioMACS-Trennsystems nach indirekter magnetischer Markierung der CD4-Moleküle.

- **Materialien:** *Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach*

VarioMACS-Separator	Nr. 431-02
MS ⁺ -Trennsäulen	Nr. 422-01
Streptavidin-MicroBeads	Nr. 481-01

- **MACS-Puffer:**

BSA	0,1%
EDTA	5 mM
NaN ₃	0,01%
in PBS [1 x]	

- **Antikörper:**

H129.19-biotinyliert	(Ratte-anti-Maus-CD4-bio)
----------------------	---------------------------

Zur selektiven Anreicherung von CD4⁺ T-Zellen aus einer Gesamtpopulation von Milzzellen wurde den Tieren die Milz entnommen und gemäß II.2.1.1 präpariert. Je nach Experiment wurden entweder mehrere Milzen von Tieren derselben Experimentalgruppe gemeinsam oder einzeln präpariert. Verbleibende Bindegewebsaggregate und tote Zellen wurden entfernt, indem die Zellen über eine mit Watte gestopfte, sterile Pasteur-Pipette filtriert wurden. 1×10^8 Milzzellen wurden in 0,5 ml MACS-Puffer mit H129.19-biotinyliert (5 µg/ml), resuspendiert und 12 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden 3 ml MACS-Puffer zugegeben und die

Zellen zentrifugiert (300 x g, 5 min, 4°C). Die Zellen wurden 10 min bei 4°C mit Streptavidin-MicroBeads (1: 25 in MACS-Puffer, 0,5 ml) inkubiert, gründlich resuspendiert und auf eine äquilibrierte MS⁺-Trennsäule (im VarioMACS-Magneten) gegeben. Die Säule wurde zweimal mit 1 ml MACS-Puffer gespült, dann aus dem Magneten entfernt und die Zellen mit 1 ml MACS-Puffer eluiert. Das Eluat wurde auf eine neue Säule aufgetragen und die Separation entsprechend wiederholt. Zum Schluß wurden die auf der Säule gebundenen Zellen mit 1 ml Testmedium eluiert, gezählt, auf 1 x 10⁷ Zellen/ml eingestellt und bis zur Stimulation bei 4°C aufbewahrt. Die durchflußcytometrische Analyse (siehe II.2.4) nach dieser Separation ergab für CD4⁺ T-Zellen eine Reinheit von > 98%.

2.1.4 Antigen-spezifische Stimulation von T-Zellen

Diese Testansätze dienen dazu, antigen-spezifische T-Zellantworten zu charakterisieren. Hierzu wurden Milz- oder Lymphknotenzellen, bzw. gereinigte CD4⁺ T-Zellen *ex vivo* mit hitzedenaturiertem CII (80°C für 20 Minuten, im Wasserbad) in einer Konzentration von 50 µg/ml restimuliert. Als antigen-präsentierende Zellen für die Stimulation von CD4⁺ T-Zellen wurden Milzzellen aus syngenen, nicht immunisierten Mäusen verwendet. Die Milzzellen wurden zur Unterdrückung der Eigenproliferation radioaktiv bestrahlt ([¹³⁷Cs], Dosis: 2000 rad). Die dabei induzierten DNA-Strangbrüche verhinderten eine korrekte DNA-Replikation und somit die Zellteilung. Die Funktion der Antigen-präsentation bleibt erhalten. In einigen Experimenten wurden verschiedene synthetische CII-Peptide als Antigen verwendet. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in 24 oder 48well Zellkulturplatten bei einer Zelldichte von 1 x 10⁶ Zellen/ml. Als Kulturmedium diente IMDM + 5% FCS. Als Negativkontrolle verblieben einige Ansätze ohne Zugabe von Antigen. Als Positivkontrolle (Zellvitalität) wurden einige T-Zellen polyklonal stimuliert (siehe II.2.1.5). Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Ansetzen der Kulturen (24h, 48h, 72h, 96h) wurden Proben der Kulturüberstände entnommen und der Gehalt an IFN-γ, IL-4 und IL-5 mittels ELISA bestimmt.

2.1.5 Polyklonale Stimulation von CD4⁺ T-Zellen

T-Zellen können *in vitro* durch die Quervernetzung der T-Zellrezeptoren auf ihrer Oberfläche mittels eines Antikörpers polyklonal aktiviert werden. Hierzu wurden aus den Milzen angereinigte CD4⁺ T-Zellen (siehe II.2.1.3) durch an die Kulturplatten (96well- bzw. 24well-Platten) gebundenen anti-CD3-Antikörper (145-2C11, 10 µg/ml) bzw. anti-TCR-Vβ₁₂-Antikörper (MR11-1, 10 µg/ml) in Abwesenheit von APCs aktiviert. Die Entnahme der Kulturüberstände zur Bestimmung von Cytokinen (IFN-γ, IL-4, IL-5) erfolgte meist nach 24 Stunden.

2.1.6 Entwicklung antigenspezifischer T_H1- und T_H2-Populationen aus naiven CD4⁺ T-Zellen

Für die Studien zur Differenzierung von T-Zellen wurden in der vorliegenden Arbeit naive CD4⁺ T-Zellen aus den Milzen von TCR-βtg-Mäusen angereinigt. Die T-Zellen (1x10⁶ Zellen/ml) wurden *in vitro* (24well-Platten) entweder mit denaturiertem CII (50 μg/ml) oder mit dem glykosylierten Ratten-CII-Peptid₂₅₆₋₂₇₁/HyK-βGal₂₆₄ in der Anwesenheit von APCs und in Gegenwart von IL-12 (10 ng/ml) oder IL-4 (1 x 10³ U/ml) primär aktiviert. Diese Behandlung führte zum Wachstum und zur Differenzierung der T-Zellen. In Gegenwart von IL-12 entwickelten sich Zellen vom T_H1-Typ und in Anwesenheit von IL-4 Zellen vom T_H2-Typ. Am vierten Tag wurden die T-Zellen in frischem Kulturmedium auf eine andere Zellkulturplatte umgesetzt. In einigen Fällen wurden die endogen gebildeten primären Cytokine bestimmt. Dazu wurde am Tag 4 der Stimulation 0,5 ml Kulturüberstand entnommen und bis zur Auswertung bei -20°C aufbewahrt. Nach zwei weiteren Tagen (Tag 6 nach Primärstimulation) wurde die Differenzierung der Zellen charakterisiert. Dazu wurden die Zellen polyklonal restimuliert (siehe II.2.1.5) und die nach 24 Stunden sekundär gebildeten Cytokine im ELISA bestimmt.

2.1.7 Langzeitkultivierung der CII-spezifischen CD4⁺ T-Zelllinie

Die selbst entwickelte CII-spezifische CD4⁺ T_H1-Zelllinie (CII-Vβ₁₂) wurde aus mit CII/CFA immunisierten TCR-βtg-Mäusen etabliert. Diese Linie erkennt das glykosylierte Ratten-CII-Peptid₂₅₆₋₂₇₁/HyK-βGal₂₆₄ in Kombination mit MHC-Klasse-II-Aα^qAβ^q-Molekülen. Die CII-Vβ₁₂-Linie wurde über Monate *in vitro* kultiviert. Zur Expansion wurde sie mit bestrahlten Milzzellen (2000 rad) und denaturiertem CII (50μg/ml) in IMDM + 5% FCS restimuliert und ab dem dritten Tag nach der Restimulation mit IL-2-haltigem Kulturmedium (10 ng/ml) mehrmals pro Woche gefüttert. Ab der dritten bis vierten Woche nach der Restimulation stellten die T-Zellen ihr Wachstum ein und kehrten wieder in einen Ruhezustand zurück. Sie wurden dann nur noch einmal pro Woche gefüttert.

2.1.8 Proliferationstest

Die Proliferation von Lymphocyten wurde über den Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin (³H-TdR) in die DNA der sich teilenden Zellen ermittelt. Lymphocyten wurden unter verschiedenen Bedingungen in Mikrotiterplatten stimuliert. Während der letzten 18-20 Stunden eines Versuchsansatzes wurden die Kulturen mit 0,1 μCi ³H-TdR/well (durch Zugabe eines Tropfens (10 μl) einer 1: 50 vorverdünnten ³H-TdR-Lösung pro well mittels einer 1 ml Spritze und einer 32 x 0,7 mm Kanüle) markiert und die Kulturplatten danach bei -20°C eingefroren, um die Zellmembranen zu zerstören.

Zur Auswertung wurden die Platten aufgetaut und der Inhalt der einzelnen *wells* mit Hilfe eines speziellen Zellerntegeräts (Cell Harvester 1295-001, LKB, Freiburg) durch einen Glasfaserfilter gesaugt, wobei die DNA auf dem Filter zurückgehalten wurde. Nur in die DNA eingebautes ^3H -TdR wird auf dem Filter zurückgehalten, während das lösliche ^3H -TdR durch den Filter in einen Abfallbehälter läuft. Die Filter wurden anschließend für 2-3 Minuten in einer Mikrowelle (850 W) getrocknet und zusammen mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit in einem Plastikbeutel eingeschweißt. Die Bestimmung des Einbaus von ^3H -TdR in die DNA erfolgte indirekt durch Flüssigkeitsszintillationszählung in einem β -counter (Pharmacia, Freiburg) in Form von gezählten Impulsen pro Minute (cpm = „counts per minute“). Als Maß für die Stimulation ist jeweils das arithmetische Mittel der cpm-Werte von 3 parallel angesetzten Testansätzen angegeben.

2.1.9 Bioassays zum Nachweis von Cytokinen

Ein Bioassay stellt das empfindlichste Nachweissystem für bioaktive Cytokine dar. Hierzu verwendet man Indikatorzelllinien, deren Wachstum und Proliferation vom Vorhandensein bestimmter Cytokine abhängig sind. Zum Nachweis von IL-2, IL-6, IL-15 und TNF- α wurden die aufgelisteten Indikatorzelllinien verwendet.

Indikatorzelle n	Nachweis von	Zellzahl pro well	Standard pro ml	Markierung
CTLL	IL-2	2×10^3	mrIL-2 (10 – 0,08) ng	^3H -TdR
CTLL	IL-15	2×10^3	hrIL-15 (100 – 0,8 ng)	^3H -TdR
7TD1	IL-6	3×10^3	mrIL-6 (100 – 0,8 U)	^3H -TdR
WEHI-164	TNF- α	40×10^3	hrTNF- α (200 – 0,025 ng)	MTT

Die Indikatorzellen wurden so lange mit den Verdünnungen der zu testenden Kulturüberstände inkubiert, bis die Zellen in der Negativkontrolle (Testmedium ohne Cytokinzusatz) gestorben waren (in der Regel nach 48 Stunden). Als Positivkontrolle diente die Antwort der Indikatorzellen auf das entsprechende rekombinante Cytokin. Die Proliferation der Indikatorzellen kann auf verschiedene Weise gemessen werden. Gängige Methoden sind der Einbau von ^3H -Thymidin in die neu synthetisierte DNA (siehe II.2.1.8) oder das qualitative Umsetzen einer Indikatorsubstanz durch lebende Zellen. Im letzten Fall wurde am dritten Tag zu jedem *well* ein Tropfen MTT-Substrat gegeben und 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Während dieser Zeit setzten die lebenden Zellen diese Substanz in ihren Mitochondrien zu einem Farbstoff um. Dadurch ergab sich ein Farbumschlag von gelb nach violett. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von Lysepuffer beendet. Die Zellen wurden lysiert und setzten den Farbstoff

in den Kulturüberstand frei. Die Messung erfolgte durch einen ELISA-Reader mit einem Filter von 570 nm.

2.1.10 Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen

1-5 x 10⁶ Zellen wurden in 1 ml gekühltem Einfriermedium, bestehend aus 90% FCS und 10% DMSO, aufgenommen und in Einfrier Röhrchen überführt. Diese wurden zunächst in einer mit kaltem Isopropanol gefüllten Einfrierbox bei -70°C für 24 Stunden eingefroren und dann in einem Tank mit flüssigem Stickstoff (-196°C) gelagert.

Zur Rekultivierung wurden die Zellen schnell aufgetaut, in ein Zentrifugenröhrchen mit kaltem Waschmedium (MEM + 2% FCS) überführt und 5 Minuten bei 300 x g zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in einem geeigneten Kulturmedium aufgenommen.

2.2 Produktion und Reinigung monoklonaler Antikörper

• Kultivierung der Hybridomzellen

Die Hybridomzellen MR11-1 produzieren einen Antikörper (IgG₁), der an die murine T-Zellrezeptor-Vβ₁₂-Kette spezifisch bindet (siehe II.1.4.3). Die Hybridomzellen stammen aus der Maus und wurden uns freundlicherweise von Dr. O. Kanagawa (Missouri, USA) für die weitere Kultivierung zur Verfügung gestellt. Der gereinigte Antikörper wurde *in vitro* entweder zur polyklonalen Stimulation von CD4⁺ T-Zellen oder zur Typisierung transgener Mäuse mit Hilfe der FACS-Analyse eingesetzt. Die hierfür erforderlichen großen Mengen wurden aus den Überständen der MR11-1-Zellkulturen angereinigt.

Die Kultivierung erfolgte in sterilen Plastikflaschen in einem CO₂-Inkubator bei 37°C und 10% CO₂-Gehalt in gesättigter Wasserdampf-atmosphäre. Zunächst wurde eine geringe Zellzahl (ca. 2 x 10⁷ Zellen) in 50 ml Zellkulturflaschen ausgesetzt. Das Zellkulturmedium (IMDM) enthielt 5% FCS. Diese Primärkultur hatte ein Gesamtvolumen von 8 - 10 ml. Je nach Dichte des Zellrasens, die Zellen adhäreren an der Plastikoberfläche, wurde das Medium alle 2 - 3 Tage gewechselt und der Überstand mit darin enthaltenen Zellen in einer größeren Zellkulturflasche (800 ml) gesammelt. Nach ca. 7 - 9 Tagen wurden die adhäreren Zellen durch kräftiges Resuspendieren mit einer 5 ml Glaspipette vom Boden der 50 ml Flaschen abgelöst und in eine 250 ml Zellkulturflasche überführt (Volumen der überführten Menge ca. 7 - 9 ml). In der 50 ml Flasche wurde 1 ml Zellsuspension zurückbehalten und diese mit 8 ml frischem IMDM/5% FCS aufgefüllt. Die überführten Zellen wurden dann in 250 ml Flaschen mit IMDM/2% FCS solange weiterkultiviert (Auffüllen mit gleichem Volumen), bis der Boden der Kulturflaschen mit einer Einzelzellschicht vollständig bedeckt war. Auch hier erfolgte alle 2 - 3 Tage ein Mediumwechsel. Der Überstand mit nicht-adhären Zellen wurde gleichfalls in 800 ml Zellkulturflaschen gesammelt. Nachdem der Boden der 250 ml Kulturflaschen zugewachsen

war, wurden die Zellen durch kräftiges Resuspendieren abgelöst und für einige Tage in 800 ml Flaschen überführt. In diesen großen Flaschen wurden die Zellen zweimal im Abstand von 4 Tagen durch Zusatz von 10 ml IMDM/2% FCS gefüttert. Somit wurde der relativ hohe Serumgehalt der Primärkulturen abgesenkt, da ein hoher Serumgehalt die spätere Antikörperanreinigung stört. Nach ungefähr 2 - 3 Wochen waren viele tote Zellen im Überstand dieser Kulturen zu sehen. Ist eine Kultur durch zu große Zellzahlen „überwachsen“, so führt dies zur Übersäuerung des Mediums. Unter diesen Bedingungen wurde die Kultur abgebrochen, die Zellsuspension bei 1000 x g zentrifugiert und der Überstand bis zur Antikörperanreinigung bei - 20°C aufbewahrt.

- **Ammoniumsulfatfällung der Antikörper**

Nachdem auf die oben beschriebene Weise ungefähr 5 Liter Kulturüberstand gesammelt worden waren, wurden die Antikörper durch Präzipitation mit Ammoniumsulfat (50% Sättigung, über Nacht bei 4°C) gefällt. Der Niederschlag wurde bei 7000 x g abzentrifugiert (30 min, 4°C). Im Anschluß daran wurde der Niederschlag mit 50% Ammoniumsulfat/0.1M NaHCO₃, pH 8,3 resuspendiert und erneut bei 7000 x g zentrifugiert (30 min, 4°C). Nun wurde der Niederschlag in möglichst wenig 0.1M NaHCO₃, pH 8,3 gelöst. Bei diesem Schritt wurde das Ausgangsvolumen des Zellkulturüberstandes um den Faktor 100 eingengt. Diese Lösung wurde, um partikuläre Verunreinigungen abzutrennen, erneut zentrifugiert (7000 x g) und anschließend sterilfiltriert (0,45 µm).

- **Reinigung der Antikörper**

Zur Reinigung der Antikörper wurde das Verfahren der Protein-G-Affinitätschromatographie angewandt. Protein-G stellt ein Protein des Bakteriums *Staphylococcus aureus* dar, das mit hoher Affinität an den Fc-Teil von Immunglobulinen bindet. Für die Anreinigung der MR11-1 anti-TCR-Vβ₁₂-mAK wurde eine Säule verwendet, deren Matrix aus Sepharose CL-6B bestand, an die das rekombinante Protein-G kovalent gekoppelt wurde (GammaBind® Plus Sepharose®, Pharmacia, Freiburg). Die eingengten antikörperhaltigen Proben (siehe oben) wurden auf die mit PBS [1 x] (0,2 µm) äquilibrierte Säule in 25 ml Portionen aufgetragen. Das Protein-G band die Antikörper, während andere Proteine ausgewaschen wurden. Die Antikörper wurden anschließend durch eine Änderung des pH-Wertes (pH 2,7) eluiert, da auf diese Weise die Bindung zwischen Protein-G und Antikörper aufgebrochen wird. Die Elution erfolgte durch einen linearen Gradienten des Glycin-Puffers (0,1 M Glycin, pH 2,7; sterilfiltriert 0,2 µm). Zur Neutralisation des Eluats wurde 50 µl des Neutralisationspuffers (1M Tris/HCl, pH 9,0; sterilfiltriert 0,2 µm) pro 1 ml Eluat zugegeben. Die einzelnen Trennläufe mit je 25 ml Substanz wurden in 3 Fraktionen

(Durchlauf, Eluat und Nachlauf) gesammelt und auf ihren Gehalt an anti-TCR-V β ₁₂-mAK im ELISA getestet (siehe II.2.3.4). Alle Fraktionen, die noch signifikante Mengen an Antikörpern enthielten, wurden erneut mit 50% Ammoniumsulfat gefällt (über Nacht, 4°C). Nach der Zentrifugation des Niederschlages bei 7000 x g wurde das Sediment in PBS [1 x] aufgenommen und mit Hilfe einer Sephadex[®]G-25M-Säule (PD-10, Pharmacia, Freiburg) von der hohen Salzkonzentration, die im Anschluß an eine Ammoniumsulfatfällung auftreten kann, befreit. Anschließend wurde der Proteingehalt durch Messung der Absorption (280 nm) im Photometer bestimmt. Eine IgG-Lösung einer Konzentration von 1,0 mg/ml zeigt eine Extinktion von 1,4 (Literaturwert). Die Antikörper wurden auf 8,8 mg/ml eingestellt, sterilfiltriert und in 1 ml Aliquoten bei - 70°C bis zum Gebrauch aufbewahrt.

2.3 ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)

Zum quantitativen Nachweis von Antikörpern in Seren oder Hybridomüberständen bzw. von Cytokinen in den Kulturüberständen von T-Zellen wurde die ELISA-Methode angewandt.

- **Cytokin-ELISA**

Der Cytokin-ELISA wurden nach der indirekten Methode (*sandwich*-Prinzip) durchgeführt. Zunächst wurde ein spezifischer Primärantikörper an die Oberfläche der ELISA-Platten adsorbiert. Dieser „fing“ anschließend das Cytokin aus den zugegebenen Kulturüberständen. Nun erfolgte die Zugabe eines mit Biotin markierten Sekundärantikörpers, der ebenfalls für das nachzuweisende Cytokin spezifisch war, jedoch ein anderes Epitop erkannte. Im nächsten Schritt wurde enzymgekoppeltes Streptavidin zugegeben, das mit sehr hoher Affinität an Biotin bindet. Die in dieser Arbeit verwendeten Sekundärantikörper waren alle an SA-HPO (Meerrettichperoxidase) gekoppelt. Der letzte Schritt bestand aus einer enzymatisch katalysierten Farbreaktion. Das Chromogen ABTS wurde oxidiert und veränderte hierbei seine Farbe von hellgrün nach dunkelgrün. Diese optische Veränderung wurde photometrisch quantifiziert.

- **Immunglobulin-ELISA**

Zum Nachweis und zur Quantifizierung von spezifischen IgG-Antikörpern im Serum wurde die direkte ELISA-Methode angewandt. Hierbei wurde das spezifische Antigen direkt an die ELISA-Platte adsorbiert und die Seren in einem zweiten Schritt titriert. Im Serum enthaltene antigenspezifische Antikörper konnten dadurch an das betreffende Antigen binden. Der Nachweis dieser Antikörper erfolgte mit markierten Sekundärantikörpern, wie bei der „*sandwich*“-Methode beschrieben. Die Spezifität der verwendeten Sekundärantikörper

ermöglichte eine Isotyp- und Subklassenbestimmung der im Serum enthaltenen antigenspezifischen Antikörper.

2.3.1 Allgemeines zur Durchführung von ELISA

- Die Cytokin-spezifischen ELISAs wurden üblicherweise auf Nunc-Maxisorb-, die Antikörper-spezifischen ELISAs auf Greiner-Platten durchgeführt.
- Die Adsorption der Primärreagenzien (Antikörper, Antigene) an die ELISA-Platten erfolgte in 50 $\mu\text{l/well}$ „Coating-Puffer“ für 30 min bei 37°C oder über Nacht bei 4°C.
- Nach Ausklopfen der Lösung wurden freie Bindungsstellen der Platte durch die Zugabe von 100 $\mu\text{l/well}$ „Block-Puffer“ für 30 min bei 37°C abgesättigt.
- Danach, sowie nach jedem weiteren Schritt wurden die Platten zweimal mit ELISA-Waschpuffer gewaschen.
- Als nächstes erfolgte die Zugabe der verschiedenen Verdünnungen der Überstände bzw. Seren (1: 5-er Schritte) und der Standards (1: 2-er Schritte) in ELISA-Puffer (50 $\mu\text{l/well}$, 60 min, 37°C). Bei manchen ELISAs wurde über Nacht bei 4°C inkubiert, um die Sensitivität zu steigern. Aus den Seren antigenspezifisch immunisierter Mäuse wurden Standardseren definiert. Der Gehalt an Gesamt-Ig, IgG₁, IgG_{2a} und IgG_{2b} wurde willkürlich in Einheiten pro Milliliter Serum (U/ml) definiert. Eine Einheit spezifischer Antikörper pro Milliliter Serum (1 U/ml) ergab eine Absorption von 0.5 (OD 414 nm) bei der entsprechenden Verdünnungsstufe.
- Die biotinylierten Sekundärreagenzien (Antiseren) wurden in 50 $\mu\text{l/well}$ ELISA-Puffer für 30 min bei 37°C zugegeben (der optimale Verdünnungsfaktor variierte je nach Charge und wurde in Vortests bestimmt). Dieser und der nächste Inkubationsschritt sollte nicht verlängert werden, da es zu unspezifischen Bindungen mit höherem Leerwert in der Negativkontrolle kommen kann.
- Danach erfolgte die Zugabe von SA-HPO in ELISA-Puffer (50 $\mu\text{l/well}$) für 30 min bei 37°C.
- Schließlich wurde 50 μl ABTS (1 mg/ml) in Citratpuffer mit H₂O₂ (0,0075%) pro *well* zugegeben und bei Raumtemperatur für mindestens 30 min inkubiert (bis sich die Standardkurve gut entwickelt hat).
- Die abschließende photometrische Messung (Absorption bei 414 nm) erfolgte an einem ELISA-Reader. Zur Quantifizierung wurde die „Mikrowin“-Software (4-log-parameter) verwendet.

2.3.2 Übersicht der verwendeten Puffer und Reagenzien

- **„Coating“-Puffer**

Dieser Puffer wurde zur Beschichtung der ELISA-Platten mit Antikörpern oder Antigenen verwendet. Der Puffer besteht aus 0,1 M Na_2HPO_4 bei einem pH-Wert von 9,2. Der Puffer wurde sterilfiltriert (0,2 μm) und bei 4°C aufbewahrt.

- **„Block“-Puffer**

Nach der Beschichtung von ELISA-Platten müssen die noch freien Bindungsstellen abgesättigt werden. Dieser Schritt wird als „Blocken“ bezeichnet. Hierzu wurden je nach ELISA-System verschiedene Lösungen verwendet. Blockpuffer für alle Antigen-spezifischen ELISA war eine frisch angesetzte 2%-ige Lösung aus Magermilchpulver in VE-Wasser.

- **ELISA-Waschpuffer**

Dieser Puffer bestand aus 125 ml PBS [10 x] + 10 ml Tween-20 und wurde mit VE-Wasser auf 10 l aufgefüllt. Er wurde zum Waschen der ELISA-Platten nach jedem einzelnen Reaktionsschritt verwendet.

- **ELISA-Puffer**

ELISA-Puffer bestand aus PBS [1 x] + 0,1% Tween-20.

- **Streptavidin-Meerrettichperoxidase-konjugiert (SA-HPO)** (siehe II.1.2) wurde in PBS [1 x] + 0,1% Tween 20 (1/10.000) angesetzt.

- **Citratpuffer**

Für die Entwicklung der ELISA-Tests wurden Peroxidase-(HPO)-gekoppelte Reagenzien (SA-HPO, Antikörper-HPO) verwendet. Die Enzymreaktionen erfolgten in folgendem Puffer:

40 mM Zitronensäure

60 mM Na_2HPO_4

pH 4,4

- **ABTS** (siehe II.1.2)

ABTS ist ein Substrat für HPO-gekoppelte Reagenzien. ABTS wurde in Citratpuffer gelöst. Die Umsetzung von ABTS durch HPO ergab eine grüne Färbung der Testlösung. Die Extinktion wurde bei 414 nm mit Hilfe eines Photometers bestimmt.

2.3.3 Übersicht der verwendeten Antikörper

Nachweis von Cytokinen

Cytokin	Primärreagenz	Sekundärreagenz	Standard	Sensitivität
IL-4	1D11 (3µg/ml)	24G2-bio. (0,5µg/ml)	200-1,56 U/ml	3 U/ml
IL-5	TRFK5 (1µg/ml)	TRFK4-bio. (1µg/ml)	20-0,3 U/ml	1-2 U/ml
IFN-γ	R4-6A2 (1µg/ml)	AN18.17.26-bio. (1µg/ml)	80-0,625 U/ml	2-3 U/ml

Nachweis von CII-spezifischen Antikörpern im Serum

Ig	Primärreagenz	Sekundärreagenz	Standard	Sensitivität
Gesamt-Ig	CII (10µg/ml)	Schaf-anti-Maus-Ig-bio. (1: 1000)	20-0,31U/ml	0,6 U/ml
IgG ₁	CII (10µg/ml)	Sch.-a.-M.-IgG ₁ -bio. (1: 4000)	20-0,31U/ml	0,6 U/ml
IgG _{2a}	CII (10µg/ml)	Sch.-a.-M.-IgG _{2a} -bio. (1: 4000)	20-0,31U/ml	0,6 U/ml
IgG _{2b}	CII (10µg/ml)	Sch.-a.-M.-IgG _{2b} -bio. (1: 3000)	20-0,31U/ml	0,6 U/ml

2.3.4 Nachweis von anti-TCR-Vβ₁₂-mAK im ELISA (anti-Maus-Ig-ELISA)

Um den Gehalt an Maus-anti-TCR-Vβ₁₂-mAK in den Kulturüberständen der Hybridomzellen MR11-1 und den einzelnen Proben während der Reinigungssequenzen zu testen, wurde ein Schaf-anti-Maus-ELISA etabliert. Die Durchführung dieses ELISA erfolgte entsprechend des oben beschriebenen Protokolls. Die Primärantikörper, mit denen die ELISA-Platten beschichtet wurden (10 µg /ml), stammten aus einer Antiserumprobe (Schaf-anti-Maus-Ig) aus Schafen, die mit Maus-Ig immunisiert worden waren. Diese Antikörper wurden mit Hilfe einer Affinitätschromatographie von H. D. Dr. habil. E. Schmitt, Institut für Immunologie, Mainz, gereinigt. Nach Titration der zu testenden Überstände wurde eine biotin-konjugierte Schaf-anti-Maus-Ig-Präparation verwendet. Als interner Standard diente eine Probe mit bekanntem Gehalt an Maus-Ig. Anschließend wurde mit SA-HPO inkubiert und durch die Gabe von ABTS eine Farbreaktion ausgelöst.

2.4 Fluoreszenzcytologische Untersuchungen (FACS-Studien)

Die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle auf Zellen kann mittels direkter oder indirekter Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Fluoreszenzcytologische Untersuchungen wurden mit Antikörpern gegen Oberflächenmoleküle durchgeführt (siehe II.1.4.4), die entweder

direkt mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert waren oder indirekt mittels markierter Sekundärreagenzien. In der vorliegenden Arbeit wurden als Fluoreszenzfarbstoffe Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und Phycoerythrin (PE) verwendet. In einem FACScan Durchflußcytometer (*fluorescence activated cell sorter*, Becton-Dickinson, Mountain View, CA, USA) wurden die Fluoreszenzfarbstoffgruppen mit einem Argon-Laserstrahl (488 nm) angeregt und die Lichtemission gemessen. Detektiert wurde hierbei die Stärke der Ableitung der Zellen im elektrischen Feld, die proportional zur Menge der gebundenen Fluoreszenzmoleküle und damit zur Dichte des spezifisch zu detektierenden Antigens auf der Zelloberfläche ist. Da diese Detektion auf Einzelzellebene geschieht, liefert die FACS-Analyse nicht nur eine qualitative Aussage über die Anwesenheit bestimmter Oberflächenantigene, sondern läßt auch auf das Ausmaß der Expression des Antigens auf den einzelnen Zellen schließen. Als Ergebnis ist die relative Anzahl der fluoreszierenden Zellen gegen die Intensität der Fluoreszenz (10^0 - 10^4) dargestellt.

2.4.1 Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll

Die mononucleären Zellen des peripheren Blutes wurden aus dem Gesamtblut durch eine Ficoll[®]-Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Hierzu wurden Mäusen Blutproben entnommen (siehe II.3.5), in 0,5 ml EDTA-Puffer (30mM EDTA in PBS [1 x] + 0,01% NaN₃, 0,2 µm) aufgenommen und mit 2,5 ml MEM + 2% FCS verdünnt. Die Proben wurden über 3 ml Ficoll[®] (Seromed, Biochrom KG, Berlin, Dichte = 1,077) geschichtet und zentrifugiert (600 x g, 20 min, 4°C). Um ein Zusammenbrechen des Gradienten zu verhindern, wurde die Zentrifuge langsam beschleunigt und der Lauf ohne Bremse beendet. Erythrocyten und polymorphkernige Leukocyten oder Granulocyten besitzen eine größere Dichte und wurden durch den Ficoll[®] hindurch zentrifugiert, während mononucleäre Zellen (Lymphocyten und einige Monocyten) darüber eine Interphase bildeten und von der Grenzschicht mit einer Pasteurpipette entnommen wurden. Die Zellen wurden in ein neues Röhrchen überführt und mit 10 ml MEM + 2% FCS gewaschen. Nach der Zentrifugation (300 x g, 5 min, 4°C) wurden die Zellen in 100 µl FACS-Puffer aufgenommen und bis zur durchflußcytometrischen Analyse bei 4°C aufbewahrt.

2.4.2 Nachweis von Zelloberflächenmolekülen mittels FACS

Die Typisierung der TCR-βtg Mäuse erfolgte durch indirekte Doppelfluoreszenzfärbung von TCR-Vβ₁₂ und CD4. Die Vorbereitung der zu testenden Zellen wurde nach folgendem Schema bei RT durchgeführt:

- Die mononucleären Zellen des peripheren Blutes ($2-10 \times 10^5/well$) wurden auf eine 96well-Spitzbodenplatte überführt, abzentrifugiert (940 x g, 1 min), die Überstände dekantiert und die Zellen in jeweils 50 μ l FACS-Puffer (PBS [1 x] + 2% FCS + 1% NaN₃, 0,2 μ m) mit anti-TCR-V β ₁₂-mAK (10 μ g/ml) oder Isotypkontroll-Antikörper (Maus-IgG₁, Sigma) resuspendiert. Die Isotypkontrolle diente später der Einstellung des Durchflußcytometers und der Bestimmung der unspezifischen Fluoreszenz.
- Nach der Inkubation (15 min) wurden die Zellen abzentrifugiert (940 x g, 1 min), zweimal mit 100 μ l FACS-Puffer gewaschen und anschließend mit Ziege-anti-Maus-IgG₁-FITC (1 μ g/ml, 15 min) inkubiert.
- Nach erneutem zweimaligem Waschvorgang wurden die Zellen in je 50 μ l FACS-Puffer mit Phycoerythrin-konjugiertem anti-CD4-Antikörper (GK1.5-PE, 1 μ g/ml) oder zur Kontrolle mit einem irrelevanten PE-konjugierten Ratten-Immunglobulin 15 min inkubiert.
- Danach wurden die Zellen abzentrifugiert (940 x g, 1 min), zweimal mit 100 μ l FACS-Puffer gewaschen und mit 100 μ l Fixierungspuffer (0,7%-igem Paraformaldehyd in FACS-Puffer) inkubiert.
- Nach der Inkubation (5 min) wurden die Zellen abzentrifugiert (940 x g, 1 min), zweimal mit 100 μ l FACS-Puffer gewaschen und anschließend mit 400 μ l FACS-Puffer/Ansatz in FACS-Röhrchen überführt. Bis zur durchflußcytometrischen Analyse wurden die Zellen bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt, um das Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe zu verhindern.
- Die Messungen erfolgten an einem FACScan. Nach Ausgrenzung der toten Zellen über Größe und Granulierung wurden 1×10^4 Zellen pro Probe gemessen und mit der CellQuest Software (Becton-Dickinson, Mountain View, CA, USA) analysiert. Der Marker für die statistische Analyse der Daten wurde aufgrund der Isotypkontrolle festgelegt.

Die Untersuchung der Expression verschiedener MHC-Klasse-II-Haplotypen (I-A^q bzw. I-A^b) von F2-Hybridmäusen erfolgte ebenfalls mit Hilfe der FACS-Analyse. Die Durchführung dieses Tests geschah entsprechend des oben beschriebenen Protokolls. Die Zellen wurden mit einem biotinylierten anti-I-A^q-Antikörper (oder einem Kontroll-Antikörper) markiert. Zur Detektion der Bindung dieses Antikörpers an die Zellen erfolgte abschließend eine Inkubation mit Streptavidin-Phycoerythrin und die Bestimmung der roten Fluoreszenz des Phycoerythrin im FACScan. Zum Nachweis der Expression von MHC-Klasse-II-A^b-Haplotyp wurden die Zellen mit einem FITC-konjugierten anti-I-A^b-Antikörper markiert und die grüne Fluoreszenz bestimmt.

2.5 Molekularbiologische Experimente

2.5.1 Puffer und Reagenzien

- **Agarose**

Roth, Karlsruhe

Zur Herstellung der Elektrophoresegele wurde Agarose (NEEO, Bestell-Nr. 2267.2) verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung von PCR-Produkten erfolgte in einem 1,5%-igem Agarosegel (in [1 x] TAE-Puffer).

- **dNTP** (2'-Desoxynucleosid-5'-Triphosphat)

Gibco, USA

dNTP stellt ein Gemisch aus dATP, dCTP, dGTP und dTTP dar. Es wurde eine 10 mM Stammlösung in autoklaviertem H₂O angesetzt.

- **EDTA** (siehe II.1.2)

EDTA wurde als 0,5 M Stammlösung angesetzt. Der pH-Wert wurde mit 10 M NaOH auf pH 8 eingestellt und die Lösung autoklaviert.

- **Ethidiumbromid**

Eine 1%-ige Lösung wurde in VE-Wasser angesetzt, 10 min im Ultraschallbad behandelt und bei 4°C in einer dunklen Flasche aufbewahrt.

- **MgCl₂**

PanSystems, Nürnberg

Die für die PCR benötigte MgCl₂-Lösung (25 bzw. 50 mM) wurde im Set mit der Taq DNA-Polymerase bezogen.

- **Molekulargewichtsmarker**

MBI FermentasLitauen

Als Standard für die Gelelektrophorese von PCR-Fragmenten wurde eine 100 bp-Leiter (GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus) verwendet.

- **NaCl**

Roth, Karlsruhe

NaCl wurde als 5 M Stammlösung in VE-Wasser angesetzt und autoklaviert.

- **[10 x] PCR-Puffer**

PanSystems, Nürnberg

Der [10 x] PCR-Puffer wurde im Set mit der Taq DNA-Polymerase bezogen.

- **PCR-Wasser**

Als PCR-Wasser wurde autoklaviertes VE-Wasser verwendet.

- **Proteinase K** (siehe II.1.2)

Proteinase K wurde als 10 mg/ml Stammlösung angesetzt und bei -20°C aufbewahrt.

- **Natriumdodecylsulfat (SDS)**

Roth, Karlsruhe

SDS wurde als 20%-ige Stammlösung in VE-Wasser angesetzt.

- **Schwanzpuffer**

Dieser Puffer diente zur Isolierung genomischer DNA.

50 mM Tris/HCl, pH 8	(Stammlösung 1: 20)
100 mM EDTA, pH 8	(Stammlösung 1: 5)
100 mM NaCl	(Stammlösung 1: 50)
1% SDS	(Stammlösung 1: 20)
in PCR-Wasser	

- **Taq-DNA-Polymerase**

PanSystems, Nürnberg

Taq-DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus YTI* wurde als natives Enzym in einer Konzentration von 1 U/ μl eingesetzt.

- **TAE-Puffer**

[1 x] TAE-Puffer wurde als Elektrophorese-Laufpuffer verwendet und durch Verdünnung (1: 50) mit VE-Wasser aus einer [50 x] konzentrierten Stammlösung folgender Zusammensetzung hergestellt:

Tris	242 g
EDTA	37,2 g
Essigsäure	57,1 ml
mit VE-Wasser auf 1 l auffüllen, pH 8,5	

- **TE-Puffer**

TE-Puffer diente der Aufbewahrung der DNA. Der hohe pH-Wert verhindert die Hydrolyse der DNA und das EDTA schützt die DNA vor einer DNase-Restriktion.

10 mM Tris/HCl, pH 8	(Stammlösung 1: 100)
1 mM EDTA, pH 8	(Stammlösung 1: 500)
in H ₂ O	

- **Tris/HCl (Tris(Hydroxymethyl)-Aminomethan)**

Roth, Karlsruhe

Tris/HCl wurde als 1 M Stammlösung in VE-Wasser angesetzt, der pH mit konzentrierter HCl auf pH 8 eingestellt und die Lösung autoklaviert.

2.5.2 Primer

Alle Primer wurden von der Firma Roth (Karlsruhe) bezogen, in einer Konzentration von 100 μ M in TE-Puffer gelöst, aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

β -Actin: 5' - CTTTGATGTCACGCACGATTTC - 3' (sense) Amplikon: 538 bp
5' - GTGGGCCGCTCTAGGCAC - 3' (antisense)

Neomycin: 5' - TCAGCGCAGGGGCGCCCGTTCTTT - 3' (sense) Amplikon: 375 bp
5' - ATCGACAAGACCGGCTTCCATCCGA - 3' (antisense)

IFN- γ : 5' - AGA AGTAAGTGGAAGGGCCCAGAAG - 3' (sense) Amplikon: 220 bp
5' - AGGGAAACTGGGAGAGGAGAAATAT - 3' (antisense)

2.5.3 Isolierung genomischer DNA

Die Experimente zur Analyse des Genotyps von F2-Hybridmäusen hinsichtlich des IFN- γ -Gens wurden mit genomischer DNA durchgeführt. Das Verfahren zur Isolierung der genomischen DNA erfolgte nach folgendem Schema:

- Eine Gewebeprobe wurde mit einem Ohrstanzer (Fischer Scientific) aus dem Ohr entnommen und in ein steriles Eppendorfgefäß überführt. Das Gewebe wurde in jeweils 18 μ l Schwanzpuffer + 2 μ l Proteinase K-Stammlösung (10 mg/ml) aufgenommen und über Nacht bei 55°C im Wasserbad inkubiert.
- Danach wurden 480 μ l 10mM Tris/HCl bzw. PCR-Wasser zugegeben und die Lösung gut gevortext. Zur besseren Löslichkeit der DNA wurde die Lösung für 2 min auf 90°C erhitzt. Die DNA-Lösung wurde bei 4°C aufbewahrt und in der PCR unverdünnt eingesetzt.

2.5.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Bei der Polymerasekettenreaktion (PCR) kommt es durch Wiederholung der Reaktionsfolge, bestehend aus DNA-Denaturierung, DNA-Primer-Hybridisierung (*annealing*) und DNA-Synthese (*elongation*), nach jedem Reaktionsschritt zu einer Verdoppelung der DNA und damit bei einer Kettenreaktion zu einer exponentiellen, selektiven, etwa 10^6 - 10^7 -fachen Anreicherung der durch die Oligonucleotide flankierten DNA-Sequenzen. Die Methode der PCR erlaubt den Nachweis qualitativer Unterschiede genomischer DNA bestimmter Gene. In der vorliegenden Arbeit wurde die Typisierung von F2-Hybridmäusen bezüglich des IFN- γ -Gens mit Hilfe der PCR-Analyse durchgeführt.

Alle PCR-Reaktionen wurden in einem Volumen von 50 μl in einem 0,5 ml-Reaktionsgefäß durchgeführt. Jeder DNA-Probe (2 μl) wurde folgendes Gemisch zugesetzt:

[10 x] PCR-Puffer	5 μl
MgCl ₂ [25 mM]	5 μl
dNTP [10 mM]	1 μl
5'- und 3'-Primer [je 5 pmol/ μl]	2 μl
PCR-Wasser	34,8 μl
Taq [5 U/ μl]	0,2 μl

Alle Ansätze wurden mit 50 μl eines leichten Mineralöls überschichtet, um eine Verdunstung während der PCR-Reaktion zu verhindern. Die Amplifizierung der DNA erfolgte in einem Thermocycler (OmniGene, MWG-Biotech) nach folgendem Temperaturprofil:

	Zyklus 1	Zyklus 2-29	Zyklus 30
DNA-Denaturierung	93°C 5 min	93°C 30 sec	93°C 30 sec
DNA-Primer-Hybridisierung	55°C 30 sec	55°C 30 sec	55°C 30 sec
DNA-Synthese	72°C 1 min	72°C 1 min	72°C 3 min

Nach 30 PCR-Zyklen wurde ein Aliquot von 20 μl aus jeder Probe für die Analyse der Amplifikationsprodukte entnommen und mit 4 μl [6 x] Ladepuffer (MBI Fermentas, Litauen) versetzt. Die Proben wurden in einem 1,5%-igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, mit einer 0,01%-igen Ethidiumbromid-Lösung für 5 min gefärbt und unter UV-Licht mittels eines Densitometers (GelPrint 2000i, BioPhotonics Co) fotografiert und digitalisiert abgespeichert. Unter den beschriebenen PCR-Bedingungen wurden nur spezifische Amplifikationsprodukte (Amplikons) detektiert.

3. TIEREXPERIMENTE

3.1 Tiere

In den verschiedenen Experimenten wurden Mäuse mehrerer Inzuchtstämme verwendet. Alle Tiere wurden im institutseigenen Tierstall gezüchtet. Zu Beginn der Versuche waren die Tiere 8 - 12 Wochen alt. Das Geschlecht der jeweils verwendeten Tiere ist in den Legenden der Abbildungen angegeben.

-
- **DBA/1-Mäuse (H-2^a)** *Charles River Wiga GmbH (Sulzfeld)*
 - **TCR- β tg-Mäuse (H-2^a)** *Dr. L. Mori, Exp. Immunologie, Kantonsspital (Basel)*
 - **C57BL/6-Mäuse (H-2^b)** *Zentralinstitut für Versuchstierforschung (Hannover)*
 - **IFN- γ KO (H-2^b)** *The Jackson Laboratory (USA)*
 - **IFN- γ -Rezeptor KO (H-2^b)** *Prof. Dr. Kaufmann, Immunologie, Universität (Ulm)*

3.2 Antigene und Adjuvantien

- **Kollagen-Typ-II (CII, aus Hühner-Sternum)** *Sigma, Deisenhofen*

Lyophilisiertes CII wurde unter sterilen Bedingungen unter Rühren in eiskalter Essigsäure (0,01M, 0,2 μ m) gelöst, aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt. Natives CII wurde für Immunisierungen und zum Nachweis CII-spezifischer Antikörper verwendet; *ex vivo* Stimulationen von Milzzellen wurden mit hitzedenaturiertem CII (80°C für 20 Minuten, im Wasserbad) durchgeführt, zuvor erfolgte unter sterilen Bedingungen eine Neutralisation der CII-Präparationen mit NaOH [0,1M]).

- **Komplettes Freundsches Adjuvans** *Difco, Detroit, USA*
(*complete Freund's adjuvant, CFA*):

CFA besteht aus Mineralöl und abgetöteten Bakterien (*Mycobacterium tuberculosis*, Stamm H37 RA, 10 μ g/ml) und löst eine Entzündungsreaktion an der Injektionsstelle aus, welche häufig von der Bildung ulzerierender Granulome (Abszesse) begleitet wird. Diese können metastasieren und somit Antigen systemisch im Körper verteilen.

- **Inkomplettes Freundsches Adjuvans** *Difco, Detroit, USA*
(*incomplete Freund's adjuvant, IFA*):

IFA besteht aus den gleichen Komponenten wie CFA, enthält aber keine Mycobakterien.

3.3 Immunisierung von Mäusen, Induktion einer Arthritis

Zur Induktion einer CIA wurden Mäuse des DBA/1- bzw. TCR- β tg-Stammes mit nativem heterologem CII immunisiert. Zur Immunisierung wurde eine Emulsion aus gleichen Teilen einer wässrigen CII-Lösung (4 mg/ml in 0,01M Essigsäure, 1: 1 mit PBS [1 x] verdünnt) und der Adjuvanslösung (entweder CFA oder IFA) hergestellt. Die Vermischung der CII-Lösung mit dem Adjuvans erfolgte unter Kühlung auf Eis mit Hilfe eines Ultraturrax. Die fertige Emulsion enthielt eine Konzentration von 500 μ g/ml CII. Jedem Tier wurden 200 μ l dieser

Emulsion (entspricht 100 µg CII) intradermal (i.d.) injiziert. Die Injektionen erfolgten mittels Spritze (1 ml) und Kanüle (0,40 x 12 mm, 27G x 1/2" Luer-Lock) in die Haut beider Ohrmuscheln und an einer Stelle des Rückenfalls in der Nähe der Schwanzbasis. Tiere des DBA/1-Stammes erhielten nach drei Wochen eine zusätzliche intraperitoneale (i.p.) Injektion von CII gelöst in PBS [1 x] (100 µg CII/Tier).

3.4 Arthritisinzidenz und Schwere der Erkrankung

Die Mäuse wurden regelmäßig auf makroskopisch sichtbare Veränderungen im Bereich der Extremitäten untersucht. Als Arthritis-positiv galten solche Mäuse, bei denen entweder eine beginnende Schwellung im Bereich des Knöchels oder der Pfote erkennbar war, oder mindestens ein peripheres Gelenk eine Schwellung zeigte. Die Bewertung der Schwere einer Arthritis basierte auf folgendem Schema:

Klinische Bewertung der CII-induzierten Arthritis

0	normale Gelenke
1	Schwellung an ein bis maximal zwei Interphalangeal-Gelenken
2	Schwellung von mehr als zwei Interphalangeal-Gelenken <i>oder</i> Schwellung im Bereich des Knöchels bzw. der Pfote
3	massiv ausgeprägte Schwellung des Knöchelbereiches und des Metatarsus/-carpus
4	extensive Schwellung der gesamten Pfote vom Knöchel bis zu den distalen Interphalangeal-Gelenken, eingeschränkte Beweglichkeit

Entsprechend der dargestellten Klassifizierung wurde für sämtliche Extremitäten aller Individuen einer Experimentalgruppe ein Einzelindex (pro Pfote) vergeben. Aus der Summe der vier Einzelindizes (für vier Pfoten) ergab sich der Arthritisindex (maximal 16) für Einzeltiere. Der mittlere Arthritisindex errechnete sich durch Addition der Arthritisindizes aller Tiere einer Experimentalgruppe, dividiert durch die Gesamtzahl der Tiere dieser Experimentalgruppe. Die Arthritis-Schwere kommt als mittlerer Arthritisindex zum Ausdruck; die Inzidenz der CIA ist in Prozent kranker Tiere angegeben.

3.5 Blutentnahme zur Bestimmung antigenspezifischer Antikörper im Serum

In einigen Experimenten wurde immunisierten Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten (3 bis 4 Wochen nach der Immunisierung und am Ende des jeweiligen Experiments) durch Verletzung der Schwanzvene mit einer Rasierklinge Blut entnommen. Das Vollblut wurde bei Raumtemperatur für 30 - 60 Minuten und anschließend bei 4°C für weitere 30 - 60

Minuten stehengelassen. Das Serum wurde vom Blutkuchen getrennt, 10 Minuten zentrifugiert (1000 x g) und der zellfreie Überstand (Serum) individuell entnommen und bei - 20°C aufbewahrt. Die Bestimmung der in den Seren vorhandenen Menge an antigenspezifischen Antikörpern erfolgte mittels ELISA.

3.6 Zellübertragung

Um zu prüfen, ob Zellen von Mäusen, die transgen für die TCR- β -Kette sind, welche aus einem CII-spezifischen, arthritogenen T-Zellklon stammt, einen arthritogenen Charakter aufweisen, wurden Zelltransferexperimente durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden Milzzellen (MZ) oder polyklonal aktivierte (siehe II.2.1.5) CD4⁺ T-Zellen von TCR- β tg-Mäusen auf Wildtyp DBA/1-Empfängertiere übertragen. Die Übertragung der Zellen erfolgte durch eine intravenöse (i.v.) Injektion. Es wurden 5×10^7 Milzzellen bzw. 5×10^6 CD4⁺ T-Zellen in 200 μ l PBS [1 x] pro Maus transferiert. Kontrolltiere wurden mit PBS [1 x] i.v. behandelt. Anschließend wurden die Tiere mit CII/CFA immunisiert (siehe II.3.3), um eine Arthritis auszulösen.

3.7 Behandlung mit immunmodulatorischen Agenzien

3.7.1 Behandlung mit IL-12-Antagonist

Untersuchungen zur möglichen Beteiligung von endogenem IL-12 an der durch Immunisierung mit CII in CFA induzierten Arthritis wurden mit dem Homodimer der IL-12p40-Kette, einem Antagonist des IL-12-Heterodimers, an TCR- β tg-Mäusen durchgeführt. Die Behandlungen mit dem IL-12-Antagonisten IL-12(p40)₂ wurden am Tag der Immunisierung (Tag 0) begonnen. Über einen Zeitraum von 2 Wochen erhielten die Tiere einer Versuchsgruppe jeden zweiten Tag eine i.p. Injektion von IL-12(p40)₂ gelöst in PBS [1 x]. Die injizierte Menge betrug 40 μ g IL-12(p40)₂ pro Injektion in einem Volumen von 100 μ l. Kontrolltiere wurden mit CII in CFA immunisiert und erhielten 100 μ l PBS [1 x].

An den TCR- β tg-Mäusen wurden darüber hinaus Experimente durchgeführt, bei denen die Behandlung mit dem IL-12-Antagonisten erst nach Auftreten klinischer Symptome begonnen wurde (Gabe von 40 μ g IL-12(p40)₂ in 100 μ l PBS [1 x] jeden zweiten Tag über einen Zeitraum von 8 Tagen).

3.7.2 IFN- γ und IL-12-Behandlung

Um die in IFN- γ -defizienten F2-Hybridmäusen F2 (IFN- γ ^{-/-}) beobachtete Phänomene kontrollieren zu können, wurden die Tiere mit CII in CFA immunisiert und anschließend mit exogenem IFN- γ behandelt. Insgesamt erhielten die Tiere 4 i.p. Injektionen von IFN- γ (1,25

$\mu\text{g}/100\ \mu\text{l}$ Maus, gelöst in PBS [1 x], täglich).

Zur Charakterisierung der Wirkung von IL-12 auf antigenspezifische Immunreaktionen von F2 (IFN- γ ^{-/-})-Mäusen wurden CII/IFA-immunisierte Tiere mit IL-12 behandelt. Die Verabreichung von IL-12 (200 ng/ 100 μl Maus, gelöst in PBS [1 x], i.p.) erfolgte an 5 aufeinanderfolgenden Tagen, beginnend am Tag der Immunisierung. Tiere der Kontrollgruppe erhielten PBS [1 x].

3.7.3 Behandlung mit anti-CD4- bzw. anti-CD44-Antikörpern

Mit dem Ziel die CD4⁺ T-Zellen zu eliminieren, wurden CII/CFA-immunisierte Mäuse mit dem anti-CD4-Antikörper GK1.5 behandelt. Die Tiere erhielten am Tag der Immunisierung eine i.p. Injektion von anti-CD4-mAK (300 $\mu\text{g}/100\ \mu\text{l}$ Maus). Zur Kontrolle erhielten Tiere der zweiten Gruppe ein irrelevantes Ratten-Immunglobulin (rat Ig).

Um die Migration aktivierter Leukocyten in periphere Gewebe zu inhibieren, wurden die TCR- β tg-Mäuse am Tag 7 nach der Immunisierung mit CII in CFA mit einem anti-CD44-Antikörper (IM7) behandelt. Die Behandlung erfolgte an 12 aufeinanderfolgenden Tagen (jeweils 100 $\mu\text{g}/100\ \mu\text{l}$ Injektion). Kontrolltiere erhielten die gleiche Menge Ratten-Immunglobulin.

3.7.4 Dexamethason-Behandlung und Behandlung mit anti-IFN- γ -Antikörpern

Eine therapeutische Behandlung mit dem Glukokortikoid Dexamethason (Dex) erfolgte erst nach dem Auftreten klinischer Arthritissymptome. Die in der Regel einwöchige Behandlung bestand aus Injektionen von 100 μg Dex in 100 μl PBS [1 x] pro Tag an 7 aufeinanderfolgenden Tagen. Kontrolltiere wurden nach dem gleichen Schema mit PBS [1 x] behandelt.

In einigen Experimenten wurde Dex in Kombination mit dem anti-CD4- und/oder anti-IFN- γ -Antikörper und/oder IL-12(p40)₂ verabreicht. Die Injektion des anti-CD4-Antikörpers (GK1.5, 300 $\mu\text{g}/100\ \mu\text{l}$ / Maus, i.p.) erfolgte am Tag der letzten Dex-Injektion. Die Behandlung mit IL-12(p40)₂ wurde einen Tag nach der Eliminierung der CD4⁺ T-Zellen initiiert und über 8 Tage aufrechterhalten (40 μg in 100 μl PBS [1 x] pro Tier jeden 2. Tag, i.p.).

Die Gabe von anti-IFN- γ -Antikörper (XMG1.2) wurde nach dem gleichen Schema wie für IL-12(p40)₂ durchgeführt (500 μg in 100 μl PBS [1 x] pro Tier jeden 2. Tag, i.p.). Kontrolltiere erhielten statt des anti-IFN- γ -Antikörpers die gleiche Menge Ratten-Ig.

III. ERGEBNISSE

1. VERGLEICH VON DBA/1- UND TCR- β tg-MÄUSEN BEI DER INDUKTION EINER ARTHRITIS

Die vorliegende Arbeit diene der Untersuchung von T-Zell-vermittelten Mechanismen, welche an der Induktion einer Kollagen-Typ-II-induzierten Arthritis (CIA) beteiligt sind. Zu diesem Zweck wurden DBA/1-Mäuse verwendet, die transgen für die T-Zellrezeptor (TCR) β -Kette eines CII-spezifischen, arthritogenen T-Zellklons sind.

Ursprünglich wurden TCR- β tg-Mäuse von L. Mori auf dem für CIA nicht suszeptiblen genetischen Hintergrund des SWR/J-Stammes entwickelt (154). Es konnte jedoch gezeigt werden, daß F1-Hybridmäuse zwischen dem für CIA suszeptiblen Stamm DBA/1 und den TCR- β tg SWR/J-Mäusen eine schwere Arthritis mit höherer Inzidenz entwickeln als nicht transgene F1-Hybride (154). Dies läßt vermuten, daß die Expression der TCR- β -Kette die Entstehung einer CIA fördert. Um dies zu prüfen, wurden die transgenen Tiere mit dem DBA/1-Stamm 12 mal rückgekreuzt und die Entwicklung einer Arthritis vergleichend mit Wildtyp-DBA/1-Mäusen untersucht.

Die Expression der transgenen TCR- β -Kette wurde mittels eines Antikörpers, der die transgene TCR- β -Kette erkennt (anti-TCR-V β_{12} -mAK), mittels FACS-Analyse getestet. Die FACS-Ergebnisse (Abb. 1) zeigen, daß in TCR- β tg-Mäusen 97% der CD4⁺ T-Zellen aus dem peripheren Blut die transgene TCR- β -Kette exprimieren. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß ca. 13% der CD8⁺ T-Zellen ebenfalls diese Kette besitzen. Im Gegensatz zu transgenen Tieren zeigen T-Zellen aus dem peripheren Blut von DBA/1-Mäusen nur eine geringe Expression dieser β -Kette (7% der CD4⁺ und 2% der CD8⁺ T-Zellen). Insgesamt wurde in TCR- β tg-Mäusen eine reduzierte Anzahl von CD4⁺ T-Zellen (30% der peripheren Blutlymphocyten = PBL) im Vergleich zu DBA/1-Mäusen (42% der PBL) beobachtet.

Außerdem muß betont werden, daß TCR- β tg-Tiere nur für die TCR- β - nicht aber für die TCR- α -Kette des arthritogenen T-Zellklons transgen sind. Dies bedeutet, daß T-Zellen dieser Mäuse verschiedene endogene TCR- α -Ketten exprimieren. Dadurch haben nicht alle T-Zellen die gleiche Spezifität, sondern besitzen ein relativ diverses Spezifitätsspektrum.

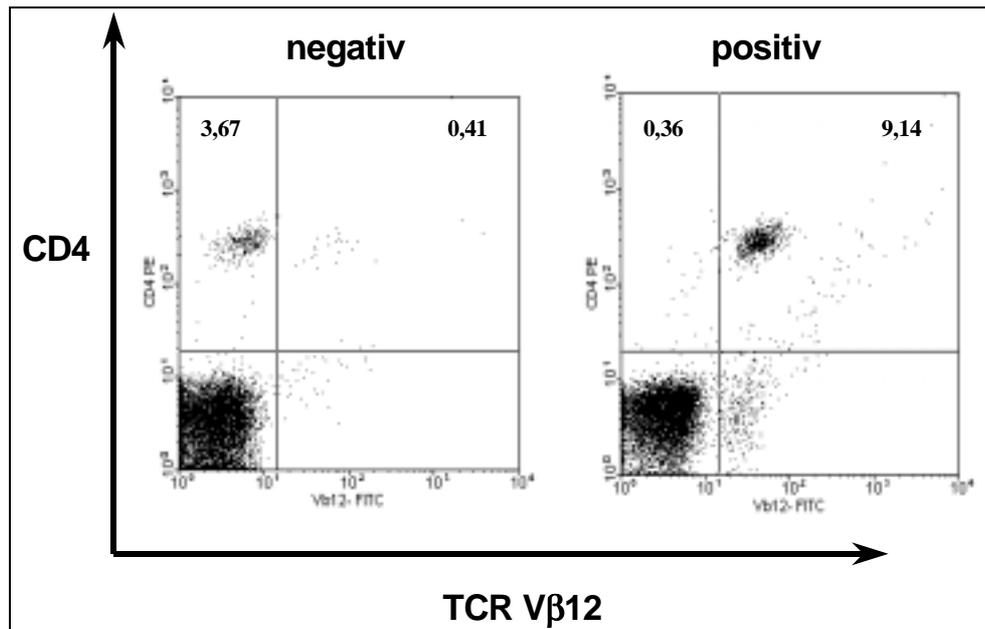


Abb. 1: Typisierung von TCR-βtg-Mäusen - FACS-Studien zur Expression der transgenen TCR-Vβ₁₂-Kette auf CD4⁺ T-Lymphocyten. Die mononucleären Zellen des peripheren Blutes wurden wie unter II.2.4.1 beschrieben aus dem Gesamtblut der Mäuse durch eine Ficoll[®]-Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Die Fluoreszenzmarkierung des CD4-Moleküls und der TCR-Vβ₁₂-Kette erfolgte entsprechend II.2.4.2. In der Darstellung repräsentiert jeder Punkt die CD4- und TCR-Vβ₁₂-Ketten-Expression einer individuellen Zelle. Die Quadrantenmarker wurden anhand von Kontrollfärbungen mit irrelevanten Antikörpern festgelegt (nicht gezeigt).

Mäuse, in welchen die Majorität (mehr als 90%) der CD4⁺ T-Zellen aus dem peripheren Blut die transgene TCR-Vβ₁₂-Kette exprimierten, wurden als „positiv“ bewertet und als TCR-βtg-Mäuse bezeichnet. Tiere, die im FACS als „negativ“ für die TCR-Vβ₁₂-Kette typisiert wurden (ca. 7% der CD4⁺ T-Zellen zeigten die Expression der TCR-Vβ₁₂-Kette), wurden für weitere Experimente nicht verwendet.

1.1 Immunisierung mit CII in CFA führt bei TCR-βtg-Mäusen zur Entstehung einer schweren destruktiven Arthritis in einem kürzeren Zeitraum und mit höherer Inzidenz im Vergleich zu DBA/1-Mäusen

Eine Kollagen-Typ-II-induzierte Arthritis wurde durch intradermale Immunisierung von transgenen und Wildtyp DBA/1-Mäuse mit in komplettem Freundschens Adjuvans (CFA) emulgiertem CII ausgelöst. DBA/1-Tiere erhielten nach 3 Wochen eine zusätzliche intraperitoneale Sekundäinjektion desselben Antigens in physiologischer Lösung (PBS). Dabei wurde das in Abb. 2 dargestellte Immunisierungsschema verwendet.

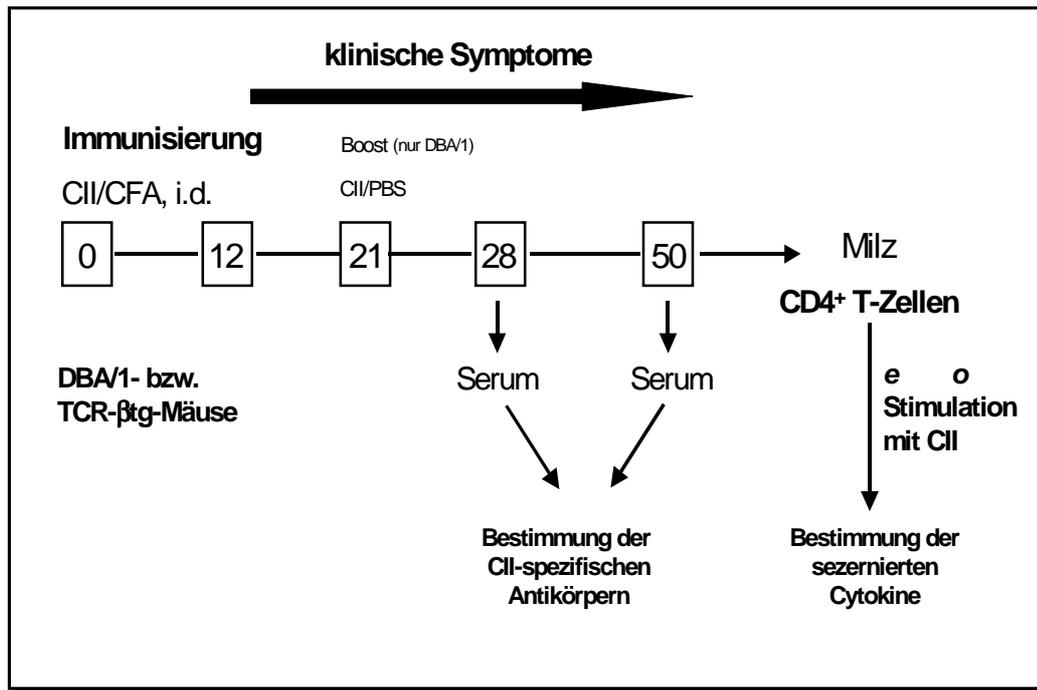


Abb. 2: *in vivo*-Experimental-Modell einer CIA. Zur Auslösung einer CIA wurden männliche TCR-βtg- bzw. DBA/1-Tiere im Alter von 8 - 12 Wochen mit CII immunisiert (Tag 0). Die Immunisierung erfolgte durch i.d. Applikation einer Emulsion von CFA mit wässriger CII-Lösung (s. II.3.3). DBA/1-Tiere erhielten an Tag 21 zusätzlich eine i.p. Injektion von CII in physiologischer Lösung (PBS, Boost*). Jede Maus wurde über einen längeren Zeitraum (Tag 12-50) auf das Auftreten von Symptomen einer CIA untersucht (s. II.3.4). Darüber hinaus wurde immunisierten Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten (3 bis 4 Wochen nach der Immunisierung und am Ende des jeweiligen Experiments) Blut entnommen (s. II.3.5) und auf den Gehalt an CII-spezifischen Antikörpern (humorale CII-spezifische Immunantwort) untersucht (s. II.2.3). Ferner wurden am Versuchsende die Milzen präpariert (s. II.2.1.1), CD4⁺ T-Zellen angereinigt (s. II.2.1.3), *ex vivo* mit CII stimuliert (s. II.2.1.4) und die Cytokinbildung untersucht (s. II.2.3), um die CII-spezifische T-Zellantwort zu charakterisieren.

Derartig behandelte Tiere wurden über einen längeren Zeitraum (beginnend ca. 2 Wochen nach der Primärimmunisierung) hinsichtlich der Entwicklung klinischer Symptome einer Arthritis (Rötung und Schwellung von Fingern, Zehen und Gelenken) beobachtet.

Auf dem unten gezeigten Bild (Abb. 3) ist eine gesunde Hinterpfote einer DBA/1-Maus mit schlanken Zehen und dünnen Knöcheln zu sehen. Auf dem unteren Foto ist eine entzündete Hinterpfote abgebildet, an der alle Zehen und Knöchel geschwollen sind. Dieser Zustand wird mit einem Arthritisindex von 4 Punkten für diese Pfote bewertet.



Abb. 3: Klinische Symptome einer CIA. Dargestellt sind die Gelenke einer gesunden (oben) und einer kranken (unten) Hinterpfote (vergrößert).

Die in Tab.1 dargestellten Ergebnisse zeigen, daß im Gegensatz zu normalen DBA/1-Mäusen, welche mindestens zweimal immunisiert werden müssen (siehe Immunisierungsschema in Abb. 2) und nur zu ca. 60% (bei Schwankungen zwischen 50% und 70% in den einzelnen Experimenten) bis Tag 40 reagieren, dagegen 100% der transgenen Tiere schon nach der Primärimmunisierung innerhalb von 2-4 Wochen eine CIA entwickeln, ohne daß hier eine zweite Injektion von CII notwendig war. Außerdem konnte die aus der Literatur bekannte höhere Suszeptibilität für CIA von männlichen im Vergleich zu weiblichen Tieren bei TCR- β tg-Mäusen nicht beobachtet werden.

Tage nach Immunisierung	DBA/1	TCR β tg
14	0/25 (0%)	10/13 (77%)
28	4/25 (16%)	13/13 (100%)
40	15/25 (60%)	13/13 (100%)

Tabelle 1: Vergleich der Inzidenz einer Arthritis bei CII in CFA-immunisierten DBA/1- und TCR β tg-Mäusen. Männliche und weibliche DBA/1- und TCR β tg-Tiere wurden mit CII in CFA i.d. immunisiert. DBA/1-Tiere erhielten an Tag 21 zusätzlich eine i.p. Injektion von CII in PBS. Die CIA-Inzidenz ist als Verhältnis kranker Mäuse zur Gesamtzahl der Mäuse einer Gruppe (Absolutzahlen und in Prozent) angegeben. Die Daten sind aus 3 unabhängigen Experimenten zusammengefasst.

Die Immunisierung mit CII in CFA führte bei TCR β tg-Mäusen früher und mit höherer Inzidenz zur Entstehung einer Arthritis im Vergleich zu nicht transgenen DBA/1-Mäusen.

Neben der Inzidenz war bei TCR- β tg-Mäusen auch die klinische Symptomatik der CIA viel stärker ausgeprägt. Während bei DBA/1-Mäusen überwiegend einzelne Fingergelenke geschwollen waren (Arthritisindex von 4-8 Punkten), wurde bei transgenen Mäusen eine Schwellung der gesamten Pfote unter Beteiligung mehrerer Gelenke beobachtet (Arthritisindex von 10-16 Punkten). Dies ist in Abb. 4 dargestellt.

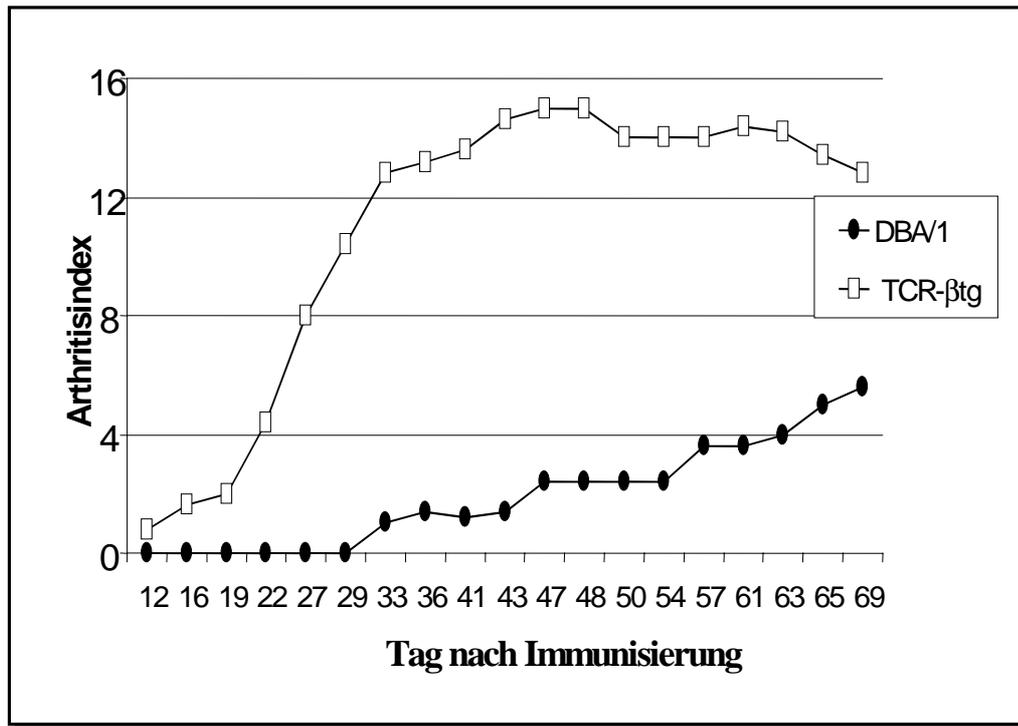


Abb. 4: Klinische Ausprägung einer Arthritis in mit CII in CFA immunisierten DBA/1- und TCR- β tg-Mäusen. Jeweils 5 männliche und 5 weibliche Mäuse (pro Gruppe) der Stämme DBA/1 (●) und TCR- β tg (□) wurden mit CII in CFA i.d. immunisiert. Nach 3 Wochen erhielten die DBA/1-Mäuse eine zusätzliche i.p. Injektion von CII in PBS. Die Entwicklung klinischer Symptome einer Arthritis wurde bis zum Tag 69 nach Immunisierung beobachtet. Die Ausprägung einer Arthritis ist als mittlerer Arthritisindex (s. II.3.4) dargestellt.

Die Immunisierung mit CII in CFA führte bei TCR- β tg-Mäusen zur Entstehung eines wesentlich schwereren klinischen Verlaufs einer CIA im Vergleich zu nicht transgenen DBA/1-Mäusen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die CIA in TCR- β tg-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp DBA/1-Mäusen durch eine 100%-ige Inzidenz, früheres Auftreten und einen schweren chronischen Verlauf charakterisiert ist (Tab. 2).

Mausstamm	Inzidenz	Tag des Krankheitsausbruchs	Schwere
TCR- β tg	100%	12-14	12-16
DBA/1	50-70%	28-40	4-8

Tabelle 2: Vergleich der CIA-Entwicklung in DBA/1- und TCR- β tg-Mäusen, die mit CII in CFA immunisiert worden waren. Dargestellt ist die Zusammenfassung von 3 unabhängigen Experimenten. Die CIA-Inzidenz ist als Verhältnis kranker Mäuse zur Gesamtzahl der Mäuse einer Gruppe (in Prozent) angegeben. Die Ausprägung einer Arthritis ist als mittlerer Arthritisindex (s. II.3.4) dargestellt. Darüber hinaus ist der Tag des Krankheitsausbruchs angegeben.

TCR- β tg-Mäuse entwickelten nach Immunisierung mit CII in CFA eine Arthritis mit 100%-iger Inzidenz, früherem Auftreten und einem schwereren klinischen Verlauf als nicht transgene DBA/1-Mäuse.

1.2 Immunisierung von TCR- β tg-Mäusen mit CII in CFA führt zu einer gesteigerten zellulären und humoralen CII-spezifischen Immunantwort im Vergleich zu DBA/1-Mäusen

Zur Charakterisierung der CII-spezifischen Immunreaktion wurden den Mäusen an Tag 28 und am Ende des Versuchs Blutproben entnommen. Die gewonnenen Seren wurden dann mittels ELISA auf ihren Gehalt an CII-spezifischen Antikörpern verschiedener IgG-Subklassen untersucht (humorale Immunantwort). Ferner wurden am Versuchsende die Milzen bzw. die peripheren Lymphknoten präpariert, CD4⁺ T-Zellen mit Hilfe eines magnetischen Zellseparators (MACS) gereinigt und mit CII stimuliert. In den nach 96 Stunden entnommenen Kulturüberständen wurde anschließend der Gehalt verschiedener Cytokine (IFN- γ , IL-2, IL-4 und IL-5) mittels ELISA bestimmt (zelluläre Immunantwort).

1.2.1 Immunisierung von TCR- β tg-Mäusen mit CII in CFA führt zur Entwicklung IFN- γ -produzierender CII-spezifischer CD4⁺ T-Zellen

Die Ergebnisse der *ex vivo* Restimulationen zeigen (Abb. 5), daß die Immunisierung von TCR- β tg-Mäusen mit CII/CFA zu einer starken IFN- γ -Bildung durch CII-

spezifische CD4⁺ T-Zellen führt, während die CD4⁺ T-Zellen von DBA/1-Tieren eine deutlich geringere (20-fach) IFN- γ -Produktion zeigen.

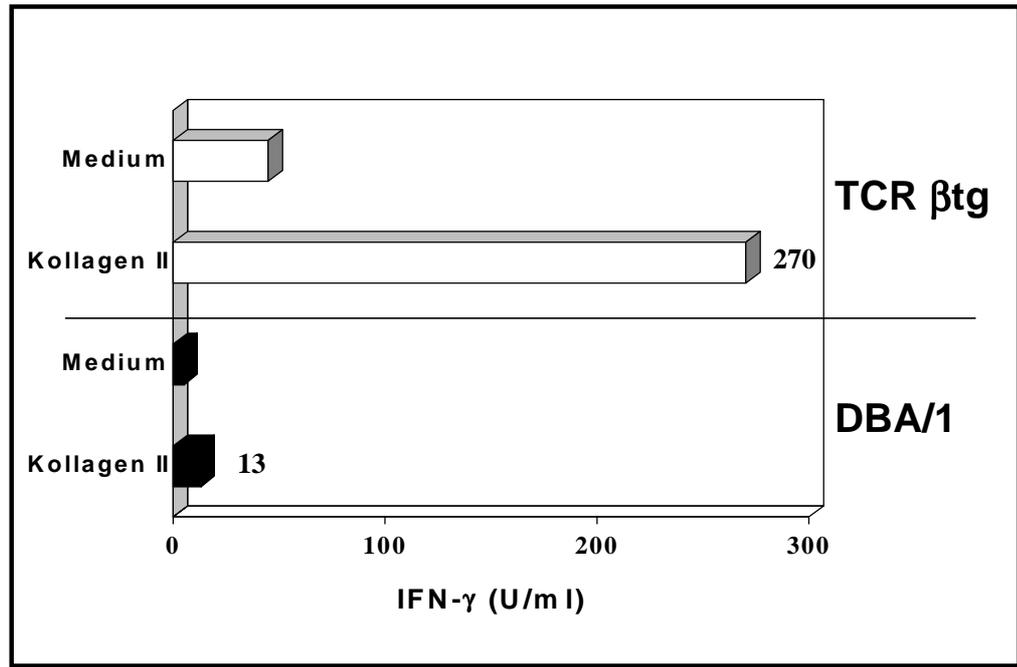


Abb. 5: Bestimmung von IFN- γ in den Überständen CII-spezifisch aktivierter CD4⁺ T-Zellen von CII in CFA immunisierten DBA/1- und TCR- β tg-Mäusen. An Tag 20 nach Immunisierung wurden von mit CII in CFA DBA/1- (■) und TCR- β tg- (□) Mäusen jeweils vier Tiere pro Gruppe getötet und die Milzen präpariert. Aus den Milzen wurden CD4⁺ T-Zellen entsprechend II.2.1.3 isoliert. CD4⁺ T-Zellen (2×10^6 Zellen/ml) wurden ex vivo mit oder ohne CII (50 μ g/ml) in Gegenwart von syngenen bestrahlten Milzzellen (APC) (1×10^6 Zellen/ml) stimuliert. In den nach 96 Stunden entnommenen Überständen wurde anschließend der Gehalt an IFN- γ mittels ELISA bestimmt. Die Werte sind in U/ml angegeben.

Die Immunisierung von TCR- β tg-Mäusen mit CII in CFA führte zu einer erhöhten IFN- γ -Produktion durch CII-spezifische CD4⁺ T-Zellen verglichen mit solchen aus DBA/1-Mäusen.

Typische T_H2-Cytokine, wie IL-4 und IL-5, konnten nicht nachgewiesen werden. Möglicherweise sind T_H1-Zellen bei TCR- β tg-Mäusen an der Entstehung der CIA entscheidend beteiligt.

Neben der stark ausgeprägten zellulären Immunantwort gegen CII zeigte sich bei TCR- β tg-Mäusen auch eine deutlich verstärkte CII-spezifische humorale Reaktion. Die Daten eines repräsentativen Experiments sind in Abb. 6 dargestellt. Diese Angaben sind Mittelwerte und beziehen sich auf alle Tiere einer Gruppe. Die Immunisierung von transgenen Tieren mit CII/CFA führt zu einer 3- bis 5-fach höheren Bildung von CII-spezifischen Antikörpern, die jedoch eine ähnliche Isotypverteilung wie bei Wildtyp-Mäusen aufweisen.

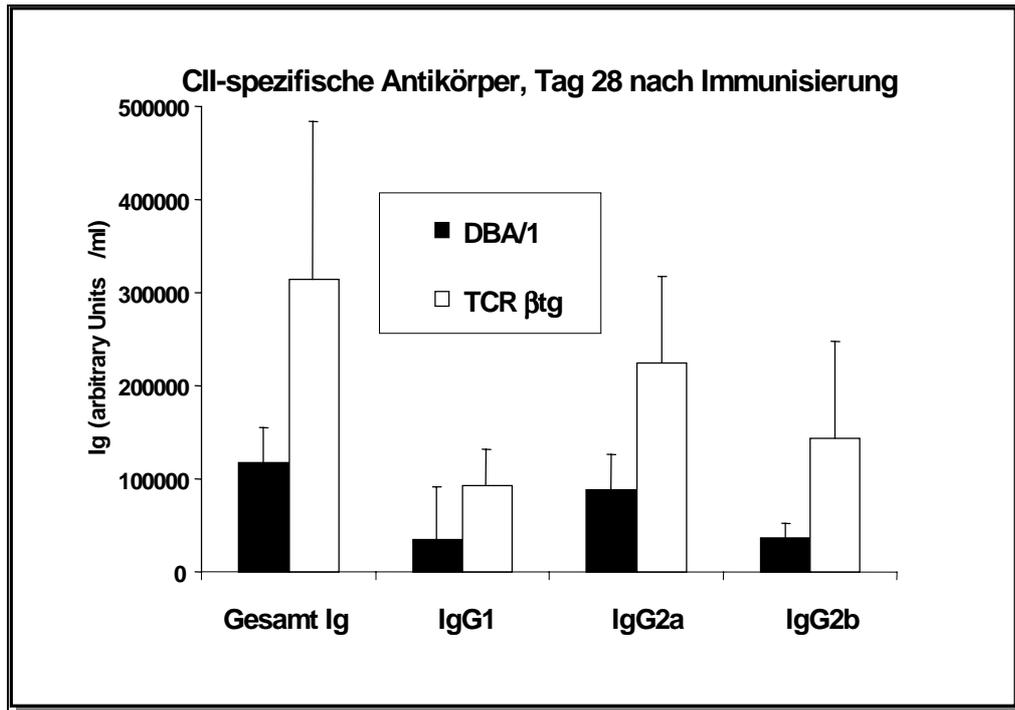


Abb. 6: Bestimmung der Serumtiter CII-spezifischer Antikörper bei mit CII in CFA immunisierten DBA/1- und TCR-βtg-Mäusen. Männliche DBA/1- (■) und TCR-βtg- (□) Tiere wurden mit CII in CFA i.d. immunisiert. Nach 3 Wochen erhielten DBA/1-Mäuse eine zusätzliche i.p. Injektion von CII in PBS. An Tag 28 nach Primärimmunisierung wurden die Tiere geblutet, das Serum gewonnen und die Titer CII-spezifischer Antikörper einschließlich der IgG₁-, IgG_{2a}- und IgG_{2b}-Subklassen mittels ELISA bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte der verschiedenen IgG-Subklassen der Tiere der einzelnen Versuchsgruppe. Die Werte sind in arbitrary U/ml angegeben.

Die Immunisierung von TCR-βtg-Mäusen mit CII in CFA führte zu einer verstärkten Bildung CII-spezifischer Antikörper aller Subklassen verglichen mit DBA/1-Mäusen.

Es muß betont werden, daß eine Korrelation zwischen der Menge der gebildeten CII-spezifischen Antikörper und der Arthritis-Schwere beobachtet wurde. Dies unterstützt die Annahme, daß auch Antikörper bei der Auslösung einer CIA eine bedeutende Funktion haben.

Die Ergebnisse zeigen klar, daß bei TCR-βtg-Mäusen eine im Vergleich zu normalen DBA/1-Mäusen verstärkte zelluläre (CII-induzierte IFN-γ-Bildung) und humorale (CII-spezifische Antikörperproduktion) Immunantwort gegen CII erfolgt. Dies erlaubt den Schluß, daß eine erhöhte Frequenz von CII-spezifischen T-Zellen in TCR-βtg-Mäusen die Arthritis-Entstehung fördert.

1.2.2 Polyklonale T-Zell-Aktivierung durch die *in vivo* Gabe von anti-CD3-mAK oder CFA induziert keine Arthritis bei TCR- β tg-Mäusen

Trotz der vermutlich höheren Frequenz selbstreaktiver CII-spezifischer T-Zellen in der Peripherie (z.B. in Blut, Milz und Lymphknoten) entwickeln TCR- β tg-Mäuse keine spontane Arthritis. Dies kann ein Hinweis dafür sein, daß autoreaktive Zellen dieser Mäuse stringent kontrolliert und funktionell ruhig gestellt sind. Es stellte sich die Frage, ob durch die polyklonale Aktivierung der T-Zellen transgener Mäuse arthritisisähnliche Symptome ausgelöst werden können. Die Versuche ergaben, daß die *in vivo* Gabe von anti-CD3-mAK, welcher an den CD3-Komplex der T-Zelle bindet und ein Antigen-unabhängiges Aktivierungssignal auslöst, keine Arthritis verursachte. Außerdem entwickelten TCR- β tg-Mäuse, die mit CFA ohne CII immunisiert worden waren, keine Arthritis (Abb. 7).

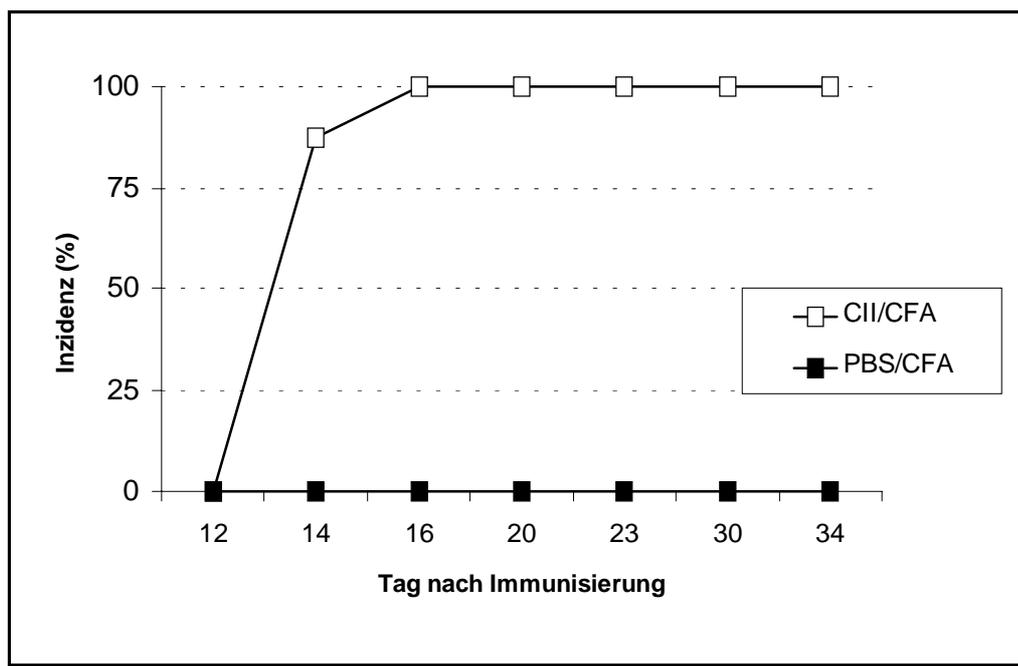


Abb. 7: Induktion einer Arthritis in TCR- β tg-Mäusen benötigt eine Immunisierung mit CII in CFA. Männliche TCR- β tg-Tiere wurden mit CII in CFA (□) oder mit PBS in CFA (■) i.d. immunisiert und auf die Entwicklung klinischer Symptome einer Arthritis bis Tag 34 nach Immunisierung untersucht. Dargestellt ist das Verhältnis kranker Mäuse zur Gesamtzahl der Mäuse einer Gruppe (in Prozent).

Die Immunisierung von TCR- β tg-Mäusen mit CFA ohne CII induzierte keine Arthritis.

Wie oben erwähnt enthält CFA Mineralöl und abgetötete Mycobakterien. Es ist bekannt, daß die Öl-Fraktion die Phagozytose von Makrophagen verstärkt. Zusätzlich aktivieren die bakteriellen Produkte Makrophagen und DCs und regen sie zur Produktion verschiedener proinflammatorischer Cytokine wie IL-6, TNF- α und IL-12 an. Dies fördert die Aktivierung von T-Zellen, die spezifisch für Antigenbestandteile der Adjuvansmischung sind. Allerdings führt es nicht zur Aktivierung der CII-spezifischen T-Zellen. Betrachtet man die in Abb. 7 dargestellten Ergebnisse, so stellt man fest, daß die CFA-induzierte Aktivierung von T-Zellen (in Abwesenheit von CII) in TCR- β tg-Mäusen für die Entwicklung einer Arthritis allein nicht ausreichend ist. Dafür könnte es zwei Gründe geben. Erstens kann aufgrund der Expression verschiedener endogener TCR- α -Ketten die Frequenz der CII-spezifischen T-Zellen in diesen Mäusen nicht hoch genug sein, um ohne antigenspezifische, klonale Expansion dieser Zellen eine Arthritis auszulösen. Zweitens ist, wie oben erwähnt, die humorale CII-spezifische Antwort ebenfalls für die Entwicklung einer CIA von entscheidender Bedeutung. Die Untersuchungen von Blutproben transgener Mäuse, welche mit CFA ohne CII immunisiert wurden, ergaben, daß CII-spezifische Antikörper nicht nachweisbar waren. Zusammenfassend kann man sagen, daß zur Induktion einer Arthritis in TCR- β tg-Mäusen eine primäre Aktivierung durch CII notwendig ist.

1.3 Zellübertragung von TCR- β tg-Mäusen fördert die humorale CII-spezifische Immunantwort und führt zu einer schweren Arthritis mit höherer Inzidenz bei DBA/1-Mäusen

Desweiteren wurde untersucht, ob durch Zelltransfer von TCR- β tg-Mäusen auf Wildtyp DBA/1-Empfängertiere eine Arthritis induziert werden kann. Zu diesem Zweck wurden Milzzellen (MZ) transgener Mäuse als Quelle arthritogener T-Zellen präpariert und ohne weitere Manipulation intravenös (i.v.) in DBA/1-Mäuse transferiert. Kontrolltiere wurden mit PBS i.v. behandelt. Anschließend folgte eine Immunisierung der Tiere aller Gruppen mit CII in CFA, da eine antigenspezifische Aktivierung der T-Zellen zur Auslösung einer CIA nötig ist (siehe oben). Der Verlauf der daraus resultierenden Arthritis ist in Abb. 8 dargestellt.

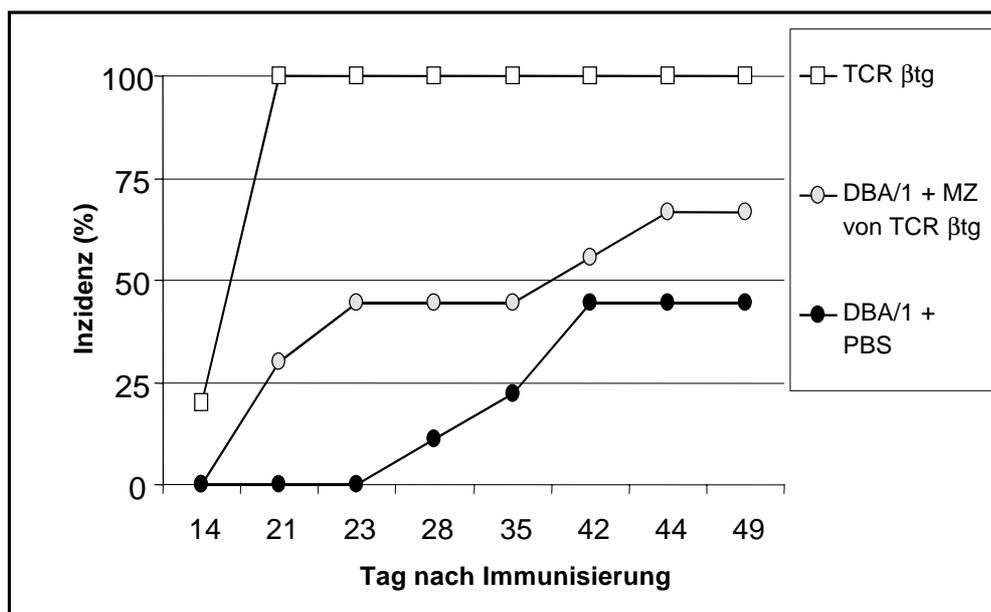


Abb. 8: Auswirkung eines Zelltransfers von Milzzellen aus TCR-βtg-Mäusen auf die Entwicklung einer Arthritis bei DBA/1-Mäusen. Männliche DBA/1-Tiere (10 pro Gruppe) wurden an Tag 0 mit CII in CFA i.d. immunisiert und in zwei Gruppen aufgeteilt. An Tag 1 wurde Tieren der ersten Gruppe (○) jeweils 5×10^7 Milzzellen, die aus nicht immunisierten TCR-βtg-Mäusen isoliert worden waren, intravenös injiziert. Tieren der zweiten (Kontroll-) Gruppe (●) wurde statt der Zellen PBS i.v. injiziert. An Tag 21 erhielten DBA/1-Mäuse eine zusätzliche i.p. Injektion von CII in PBS. Zum Vergleich wurde eine Arthritis in TCR-βtg-Mäusen (□) (5 Mäuse) durch Immunisierung mit CII in CFA (Tag 0) ausgelöst. Die Entwicklung klinischer Zeichen einer Arthritis wurde bis Tag 49 nach Immunisierung verfolgt. Dargestellt ist das Verhältnis kranker Mäuse zur Gesamtzahl der Mäuse einer Gruppe (in Prozent).

Die Übertragung von Milzzellen TCR-βtg-Mäuse auf Wildtyp DBA/1-Mäuse steigerte die Arthritisinzidenz der Empfängertiere.

Es stellte sich heraus, daß Milzzellen transgener Tieren arthritogene Eigenschaften hatten und signifikant die Schwere und Inzidenz der resultierenden CIA bei DBA/1-Mäusen beeinflussten. Die Tiere der Kontrollgruppe zeigten an Tag 23 nach der Primärimmunisierung noch keine klinischen Symptome, während die Arthritisinzidenz bei Tieren, die MZ transgener Mäusen empfangen hatten, bei 45% lag (Abb. 8). Darüber hinaus wurde auch die Schwere der Arthritismanifestation durch den Zelltransfer stark beeinflusst. So zeigten Kontrolltiere überwiegend Schwellungen an einzelnen Gelenken, während Tiere, denen MZ transferiert worden waren, schwere destruktive Veränderungen an mehreren Gelenken aufwiesen. Allerdings blieben sowohl die Schwere als auch die Inzidenz der CIA deutlich unter den Werten der TCR-βtg-Tiere.

Die Untersuchung des an Tag 23 entnommenen Blutes ergab (Abb. 9), daß die Antikörperbildung gegen CII in Empfängertieren im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant (2- bis 3-fach) erhöht war. Allerdings muß betont werden, daß der Titer CII-spezifischer Antikörper bei diesen Tieren jedoch niedriger (1,5- bis 2-fach) als bei CII/CFA immunisierten TCR- β tg-Mäusen war.

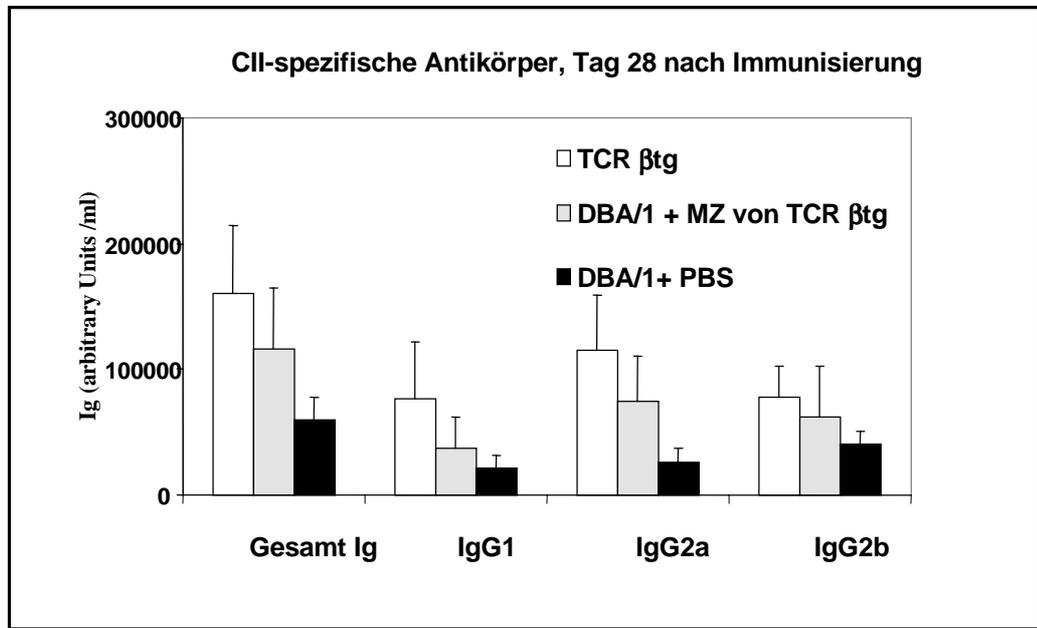


Abb. 9: Auswirkung eines Zelltransfers von Milzzellen TCR- β tg-Mäusen auf DBA/1-Mäuse auf die humorale CII-spezifische Immunantwort der Rezipienten. Männliche DBA/1-Tiere (10 pro Gruppe) wurden an Tag 0 mit CII in CFA i.d. immunisiert und in zwei Gruppen aufgeteilt. An Tag 1 wurde Tieren der ersten Gruppe (□) jeweils 5×10^7 Milzzellen, die aus nicht immunisierten TCR- β tg-Mäusen isoliert worden waren, intravenös injiziert. Tieren der zweiten (Kontroll-) Gruppe (■) wurde statt der Zellen PBS i.v. injiziert. An Tag 21 erhielten die DBA/1-Mäuse eine zusätzliche i.p. Injektion von CII in PBS. Zum Vergleich wurde eine Arthritis in TCR- β tg-Mäusen (□) (5 Mäuse) durch Immunisierung mit CII in CFA (Tag 0) ausgelöst. An Tag 28 nach Primärimmunisierung wurden die Tiere geblutet, das Serum gewonnen und die Titer CII-spezifischer Antikörper einschließlich der IgG₁-, IgG_{2a}- und IgG_{2b}-Subklassen mittels ELISA bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte der verschiedenen IgG-Subklassen der Tiere der einzelnen Versuchsgruppe. Die Werte sind in arbitrary U/ml angegeben.

Die Übertragung von Milzzellen TCR- β -transgener Mäuse auf Wildtyp DBA/1-Mäuse förderte die Bildung CII-spezifischer Antikörper unabhängig von den Subklassen.

Diese Transferversuche zeigten, daß die Übertragung von Milzzellen transgener Mäuse auf normale DBA/1-Mäuse sowohl die Antikörperbildung gegen CII als auch die Schwere und die Inzidenz der resultierenden CIA signifikant erhöht. Somit eignen sich die Zellen der TCR- β tg-Tiere, welche durch eine relativ hohe Frequenz von CII-spezifischen T-Zellen charakterisiert sind, zum Arthritistransfer auf syngene DBA/1-Rezipienten.

2. MANIPULATION DER T-ZELL-ANTWORT *IN VITRO*

Aufgrund verschiedener experimenteller Hinweise wird angenommen, daß im CIA Modell T_H1 -Zellen eine direkte pathogene Funktion haben, während T_H2 -Zellen eher suppressive Eigenschaften aufweisen (92;103-105;107;161). Allerdings wurde der Einfluß der verschiedenen T_H -Subpopulationen auf die Induktion einer CII-spezifischen Immunreaktion und auf die daraus resultierenden Konsequenzen für die Entwicklung einer Arthritis bisher noch nicht vollständig aufgeklärt. Um die funktionellen Effekte dieser Zellen genauer untersuchen zu können, wäre es wünschenswert, T-Zellen in Kultur beliebig zu T_H1 oder T_H2 differenzieren zu können. Dann sollte man durch Transferexperimente Aufschluß darüber bekommen, ob und auf welche Weise der Verlauf einer solchen Autoimmunkrankheit beeinflußt werden kann, und ob die selektive Aktivierung von T_H1 -Zellen die Entstehung der Krankheit fördert bzw. T_H2 -Zellen die Entstehung der Arthritis verhindern. Das Problem besteht darin, daß die Frequenz von CII-spezifischen T-Zellen in Wildtyp-DBA/1-Mäusen zu gering ist (geschätzt: $1/10^4$), um sie in Kultur primär durch ihr Antigen stimulieren zu können. Dies könnte jedoch bei TCR- β tg-Mäusen möglich sein, da bei diesen eine erhöhte Frequenz CII-spezifischer T-Zellen zu vermuten ist.

2.1 Polyklonale Primäraktivierung von $CD4^+$ T-Zellen aus TCR- β tg-Mäusen durch anti-TCR-V β_{12} -Antikörper

Zuerst wurde versucht, $CD4^+$ T-Zellen, die aus den Milzen der TCR- β tg-Mäusen isoliert worden waren, *in vitro* primär durch einen immobilisierten Antikörper zu aktivieren, der die transgene TCR- β -Kette erkennt (anti-TCR-V β_{12} -mAK). Es zeigte sich (siehe Abb. 10), daß die polyklonale Primäraktivierung dieser Zellen zu einer ausgeprägten IFN- γ -Produktion führte.

Weiterhin wurde eine negative Korrelation zwischen der Dosis des verwendeten Antikörpers und der IFN- γ -Synthese beobachtet. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, daß die T-Zellen um so schneller abstarben (bei hohen Dosen von Antikörper), je stärker sie aktiviert wurden. An Tag 6 nach der primären Aktivierung wurden die $CD4^+$ T-Zellen sekundär mit CII restimuliert. In den nach 48 Stunden abgenommenen Kulturüberständen wurde die Menge an IFN- γ mittels ELISA ermittelt. Die Untersuchung der Kulturüberstände ergab, daß primär polyklonal-aktivierte $CD4^+$ T-Zellen aus TCR- β tg-Mäusen sich nicht durch CII aktivieren lassen und auch kein IFN- γ

produzieren. Somit sind derartig aktivierte $CD4^+$ T-Zellen aus TCR- β tg-Mäusen nicht CII-spezifisch.

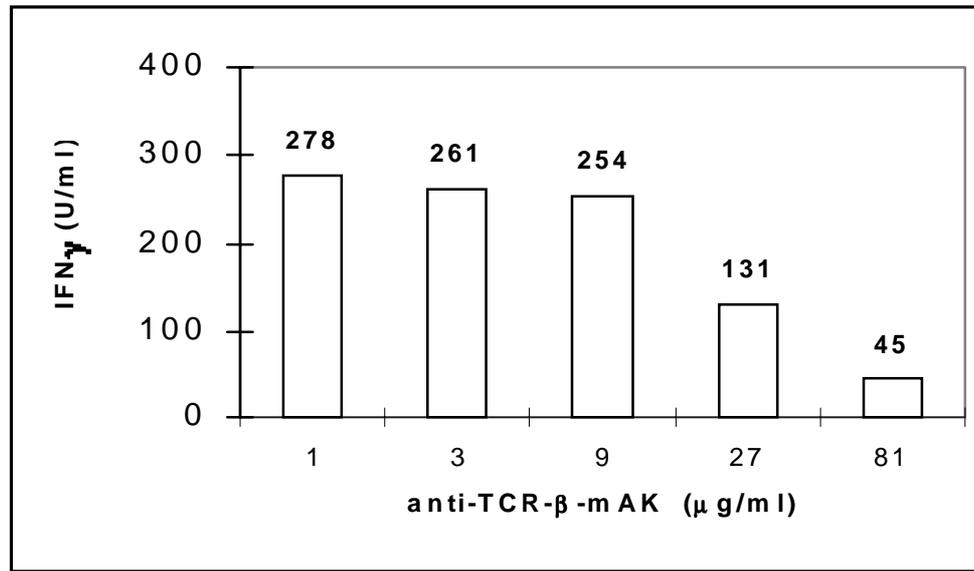


Abb. 10: Bestimmung von IFN- γ in den Überständen polyklonal durch anti-TCR- $V\beta_{12}$ -Antikörper aktivierter $CD4^+$ T-Zellen von nicht immunisierten TCR- β tg-Mäusen. $CD4^+$ T-Zellen (1×10^6 Zellen/ml) wurden aus den Milzen von nicht immunisierten TCR- β tg-Tieren entsprechend II.2.1.3 isoliert und *in vitro* mit immobilisierten monoklonalen anti-TCR- $V\beta_{12}$ -Antikörpern in den angegebenen Konzentrationen stimuliert. In den nach 48 Stunden entnommenen Überständen wurde anschließend der Gehalt an IFN- γ mittels ELISA bestimmt. Die Werte sind in U/ml angegeben.

Die polyklonale Aktivierung der $CD4^+$ T-Zellen durch anti-TCR- $V\beta_{12}$ -Antikörper aus nicht immunisierten TCR- β tg-Mäusen führte zu einer starken IFN- γ Produktion.

Da TCR- β tg-Mäuse möglicherweise einen erhöhten Anteil arthritogener T-Zellen haben (siehe III.1.1), stellte sich die Frage, ob polyklonal aktivierte $CD4^+$ T-Zellen dieser Mäuse einen arthritogenen Charakter aufweisen. Um dieses zu prüfen, wurden aus den Milzen von TCR- β tg-Mäusen isolierte $CD4^+$ T-Zellen *in vitro* primär durch anti-TCR- $V\beta_{12}$ -mAK aktiviert und an Tag 8 in Wildtyp DBA/1-Empfängertiere i.v. transferiert. Anschließend wurden die Tiere mit CII/CFA immunisiert, um eine Arthritis auszulösen. Die Ergebnisse zeigten, daß die Übertragung von polyklonal aktivierten $CD4^+$ T-Zellen aus TCR- β tg-Mäusen die Entstehung einer Arthritis bei DBA/1-Mäusen nicht förderte. Darüber hinaus ergab die Untersuchung der Antikörperbildung gegen CII in den Rezipienten im Vergleich zu DBA/1-Kontrolltieren, die mit PBS behandelt worden waren, keine signifikanten Unterschiede. Unter Berücksichtigung der erhaltenen Daten läßt sich der Schluß ziehen, daß die $CD4^+$ T-Zellen aus TCR- β tg-Mäusen

antigenspezifisch aktiviert werden müssen, um eine arthritogene Funktion erfüllen zu können.

2.2 Antigen-spezifische Primäraktivierung von $CD4^+$ T-Zellen aus TCR- β tg-Mäusen durch CII

In Rahmen dieser Versuchsreihe wurden aus den Milzen von TCR- β tg-Mäusen $CD4^+$ T-Zellen isoliert und es wurde versucht, diese *in vitro* primär antigenspezifisch zu aktivieren. Zu diesem Zweck wurden $CD4^+$ T-Zellen in Gegenwart von syngenen bestrahlten Milzzellen, die als antigenpräsentierende Zellen dienten, und CII für 4 Tage inkubiert (Abb. 11).

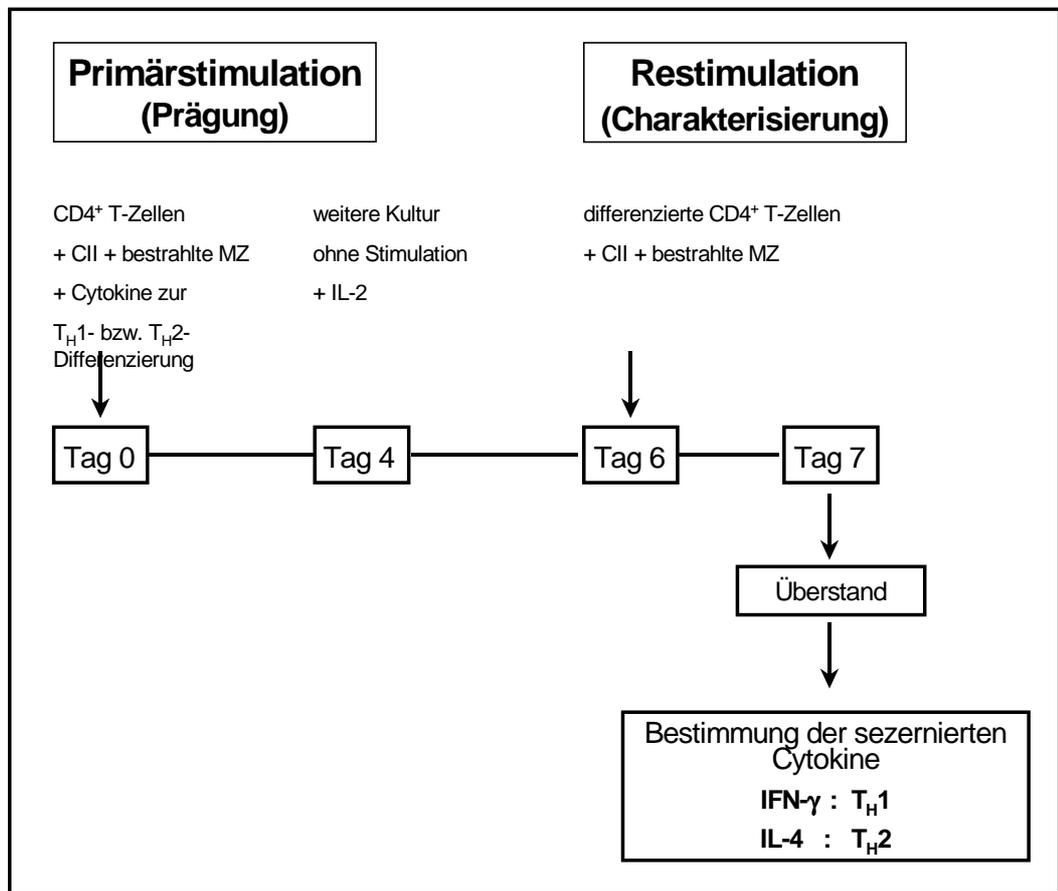


Abb. 11: Schematischer Ablauf der *in vitro*-Experimente zur antigen-spezifischen Primäraktivierung von $CD4^+$ T-Zellen aus TCR- β tg-Mäusen. $CD4^+$ T-Zellen (2×10^6 Zellen/ml) wurden aus den Milzen von nicht immunisierten TCR- β tg-Tieren entsprechend II.2.1.3 isoliert und *in vitro* mit CII (50 μ g/ml) in Gegenwart von syngenen bestrahlten Milzzellen (1×10^6 Zellen/ml) stimuliert. Während dieser Primärstimulation (Prägung) wurde dem Kulturmedium Cytokine zur T_H1- bzw. T_H2-Differenzierung zugesetzt. Nach vier Tagen wurden die Zellen geerntet und ohne weitere Stimulation in IL-2-Medium (100 U/ml) kultiviert. An Tag 6 wurden die Zellen (2×10^6 /ml) mit CII in Gegenwart von syngenen bestrahlten Milzzellen (1×10^6 Zellen/ml) restimuliert und nach 24 Stunden die Kulturüberstände entnommen. Der Gehalt an IFN- γ und IL-4 wurde mittels ELISA bestimmt.

Gleichzeitig wurden verschiedenen Cytokine als Wachstums- und Differenzierungsfaktoren hinzugegeben. An Tag 6 nach Primäraktivierung wurden die T-Zellen durch CII mit APCs restimuliert. An Tag 7 abgenommene Kulturüberstände wurden auf den Gehalt verschiedener Cytokine mittels ELISA untersucht, um den Differenzierungszustand der T-Zellen zu testen. In diesem Zusammenhang diente die Produktion von IFN- γ als Marker für T_H1-Zellen und IL-4 als Marker für T_H2-Zellen.

In Abb. 12 ist die sekundäre Produktion dieser Cytokine dargestellt.

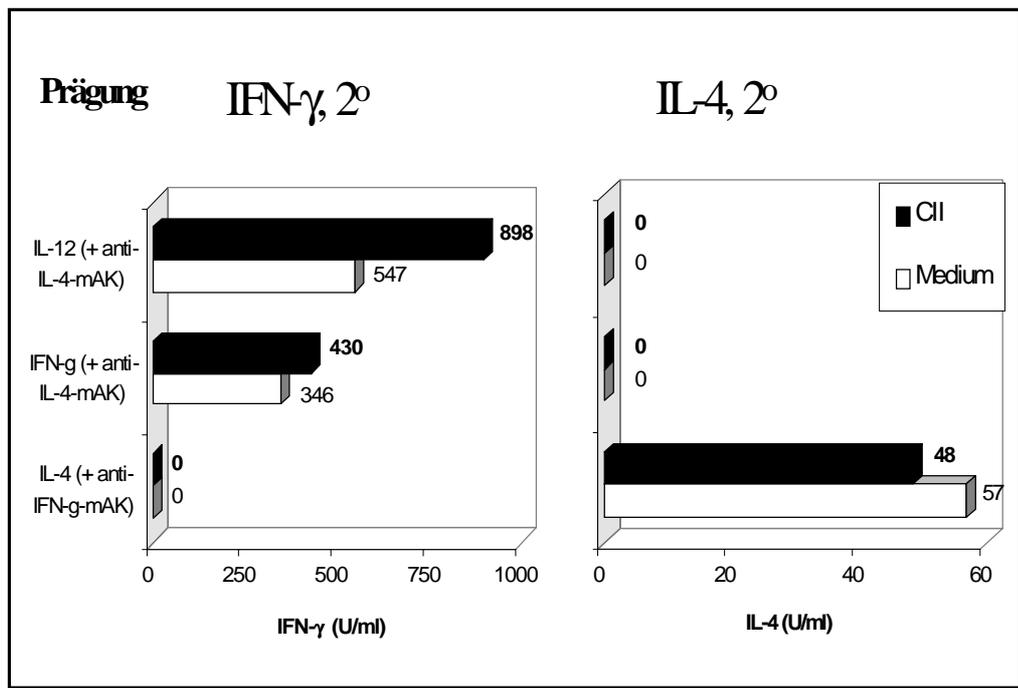


Abb. 12: Aktivierung durch CII und Differenzierung unter dem Einfluß verschiedener Cytokine der CD4⁺ T-Zellen aus TCR- β tg-Mäusen. CD4⁺ T-Zellen (2×10^6 Zellen/ml) wurden aus den Milzen von nicht immunisierten TCR- β tg-Tieren entsprechend II.2.1.3 isoliert und *in vitro* mit CII (50 μ g/ml) in Gegenwart von syngenem bestrahlten Milzzellen (1×10^6 Zellen/ml) stimuliert. Während dieser Primärstimulation (Prägung) wurde dem Kulturmedium Cytokine IL-12 (1000 U/ml), IFN- γ (100 U/ml), IL-4 (1000 U/ml), sowie monoklonale Antikörper, anti-IL-4 (10 μ g/ml) oder anti-IFN- γ (10 μ g/ml), zugesetzt. Nach vier Tagen wurden die Zellen geerntet und ohne weitere Stimulation kultiviert, zwei Tage später mit (■) oder ohne (□) CII in Gegenwart von syngenem bestrahlten Milzzellen restimuliert und nach weiteren 24 Stunden die sezernierten Cytokine in Kulturüberständen mittels ELISA bestimmt. Dargestellt ist die sekundäre Produktion von IFN- γ und IL-4. Die Werte sind in U/ml angegeben.

IL-12 und IFN- γ induzierten eine starke T_H1-Differenzierung, charakterisiert durch eine hohe sekundäre IFN- γ -Produktion. Im Gegensatz dazu induzierte IL-4 eine starke T_H2-Differenzierung, die durch eine sekundäre IL-4-Produktion charakterisiert ist. Allerdings waren die zur T_H1 bzw. T_H2 ausdifferenzierten T-Zellen nicht CII-spezifisch.

Die oben dargestellten Ergebnissen lassen deutliche Unterschiede erkennen. T-Zellen, welche während der primären Aktivierung mit exogenem IL-4 und anti-IFN- γ -mAK inkubiert worden waren, produzierten IL-4 und kein IFN- γ . Im Gegensatz dazu produzierten T-Zellen, die mit exogenem IFN- γ bzw. IL-12 in Kombination mit anti-IL-4-mAK kultiviert worden waren, große Menge an IFN- γ und kein IL-4. Somit lassen sich die CD4⁺ T-Zellen aus TCR- β tg-Mäusen *in vitro* sowohl zu T_H2- als auch zu T_H1-Zellen differenzieren. Vergleicht man allerdings die Menge der Cytokine, die in Abwesenheit von Antigen produziert wird (T-Zellen mit APCs), kommt man zu der Schlußfolgerung, daß diese Cytokinproduktion nicht CII-spezifisch war. Ein Grund hierfür könnte die zu niedrige Frequenz CII-reaktiver T-Zellen aufgrund von Kombinationen der transgenen TCR- β -Kette mit einem breiten Spektrum verschiedener endogener TCR- α -Ketten sein. Weiterhin könnte die Affinität der CII-reaktiven Klone infolge der Toleranz gegen das murine CII niedrig sein. Schließlich könnte die Effizienz mit der CII aufgrund seiner tripelhelicalen Struktur von antigenpräsentierenden Zellen prozessiert und präsentiert wird, relativ gering sein.

2.2.1 Primäraktivierung von CD4⁺ T-Zellen aus TCR- β tg-Mäusen durch das CII-Peptid₂₅₆₋₂₇₁/HyK- β Gal₂₆₄

Um den Verlauf einer CIA manipulieren zu können, ist es wichtig, die T-Zellen der TCR- β tg-Mäuse in Kultur primär CII-spezifisch zu aktivieren (s. III.2.1.1). Allerdings zeigte sich im Verlauf dieser Arbeit, daß eine antigenspezifische Primäraktivierung CD4⁺ T-Zellen aus TCR- β tg-Mäusen durch CII nicht möglich ist. Von anderen Antigenen, die eine komplexe Struktur besitzen, wie z.B. Ovalbumin, ist bekannt, daß das native Protein im Hinblick auf seine Präsentation weniger wirksam ist als ein schon prozessiertes Peptid-Fragment (392). Aus diesem Grund sollte versucht werden, die T-Zellen der transgenen Mäuse in Kultur durch entsprechende CII-Peptide primär zu stimulieren. Von L. Mori waren schon Untersuchungen zur Charakterisierung des CII-Epitops durchgeführt worden, welches von den CD4⁺ T-Zellen der TCR- β tg-Mäuse erkannt wird. Dabei war aber nur eine Eingrenzung auf ein 74 Aminosäuren langes CII-Fragment möglich (nicht publizierte Daten). Aus der Literatur ist bekannt, daß die meisten aus DBA/1-Mäusen isolierten T-Zellklone ein Peptid im Bereich 256-270 erkennen (162;163).

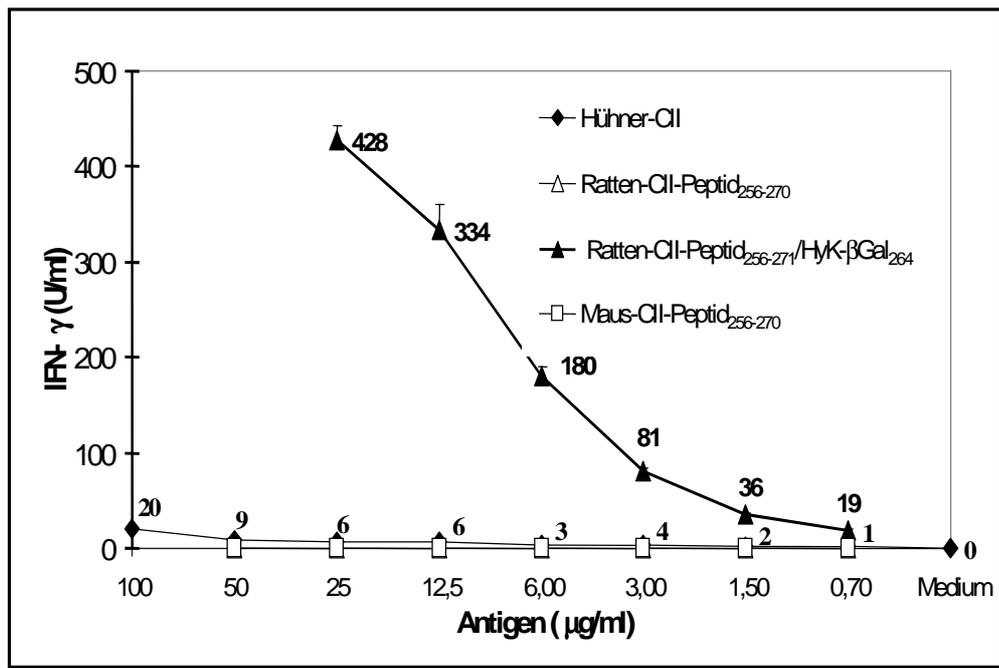


Abb. 13: Produktion von IFN- γ durch eine CII-spezifische T-Zelllinie nach Aktivierung mit verschiedenen Kollagen-Peptiden. T-Zellen der CII-spezifischen Zelllinie (CII-V β ₁₂) (2×10^5 Zellen/well) wurden in Gegenwart von syngenen bestrahlten Milzzellen (1×10^5 Zellen/well) mit verschiedenen Antigenen stimuliert: Hühner-CII (◆), Ratten-CII-Peptid₂₅₆₋₂₇₀ (△), Ratten-CII-Peptid₂₅₆₋₂₇₁/HyK- β Gal₂₆₄ (▲) und Maus-CII-Peptid₂₅₆₋₂₇₀ (□). In den nach 48 Stunden entnommenen Überständen wurde der Gehalt an IFN- γ mittels ELISA bestimmt. Die Werte sind in U/ml angegeben.

Ratten-CII-Peptid₂₅₆₋₂₇₁/HyK- β Gal₂₆₄ induzierte eine starke IFN- γ Produktion bei der CII-spezifischen T-Zelllinie CII-V β ₁₂.

Zur Identifizierung des von den TCR- β tg-Mäusen erkannten CII-Peptids diente eine CII-spezifische T-Zelllinie, die aus mit CII/CFA immunisierten transgenen Mäusen isoliert und durch wiederholte Restimulation mit CII in Kultur entwickelt wurde. Mit Hilfe dieser T-Zelllinie wurden synthetische Peptide entsprechend dem von Holmdahl *et al.* bekannten Sequenzbereich, nämlich CII₂₅₆₋₂₇₀, getestet. Hier ist anzumerken, daß in CII verschiedene Lysin- und Prolinreste posttranslational zu Hydroxylysin bzw. Hydroxyprolin oxidiert und diese z. T. nachfolgend glykosyliert werden. Ein solcher Lysinrest befindet sich in Position 264 des CII-Peptids₂₅₆₋₂₇₀. Ebenfalls von Holmdahl *et al.* wurde nachgewiesen, daß die Mehrzahl der CII-spezifischen CD4⁺ T-Zellen, die sich nach Immunisierung mit Ratten-CII in CFA in DBA/1-Mäusen entwickeln, nicht spezifisch für die Grundsequenz des oben genannten Peptids mit Lysin in Position 264 sind, sondern für ein glykosyliertes Derivat mit β -Galactosyl-hydroxylysin in Position 264 (HyK- β Gal₂₆₄) (164-166).

Auch in unserem Fall erwiesen sich die unmodifizierten Peptide Ratten-CII-Peptid₂₅₆₋₂₇₀ oder Maus-CII-Peptid₂₅₆₋₂₇₀, als nicht stimulatorisch für die CII-spezifische T-Zelllinie. Dr. B. Löhr und Prof. H. Kunz gelang es, das glykosylierte Peptid, Ratten-CII-Peptid₂₅₆₋₂₇₁/HyK-βGal₂₆₄, zu synthetisieren. Es zeigte sich, daß die CII-spezifische T-Zelllinie nach Stimulation mit diesem CII-Peptid proliferierte und große Mengen an IFN-γ produzierte (Abb. 13).

In Kontrollversuchen konnte dagegen durch andere Peptide, wie z.B. durch das Influenza Peptid N4 oder das unglykosylierte Ratten-CII-Peptid, keine IFN-γ-Bildung induziert werden. Darüber hinaus inhibierte ein anti-MHC-Klasse-II-A^q-Antikörper die durch das glykosylierte CII-Peptid induzierte IFN-γ-Produktion (Abb. 14).

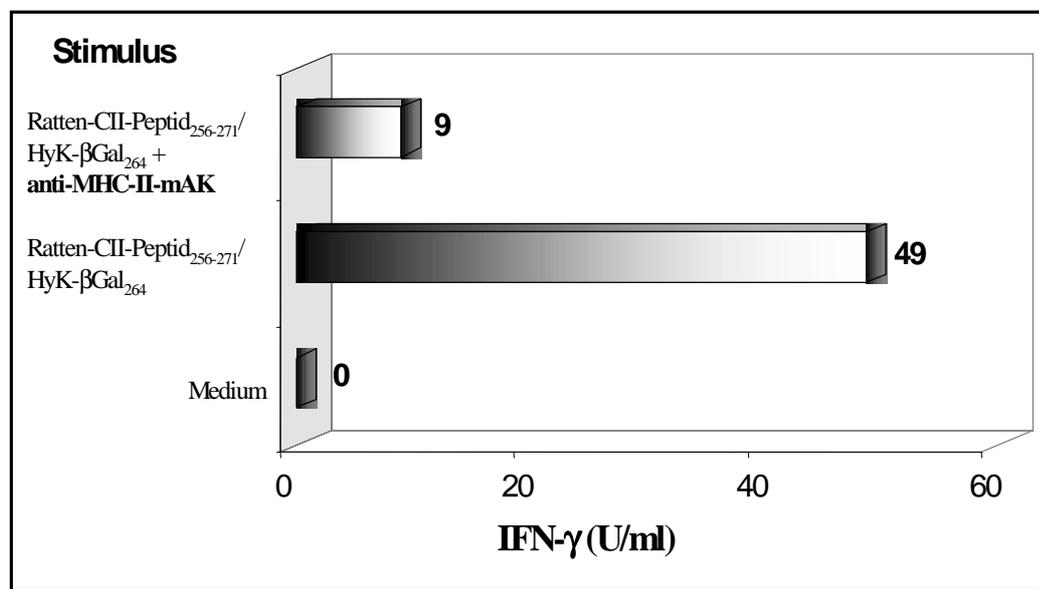


Abb. 14: Einfluß einer MHC-Klasse-II-Blockade auf die Produktion von IFN-γ einer mit Ratten-CII-Peptid₂₅₆₋₂₇₁/HyK-βGal₂₆₄ aktivierten CII-spezifischen T-Zelllinie. T-Zellen der CII-spezifischen Zelllinie (CII-Vβ₁₂) (2×10^5 Zellen/well) wurden in Gegenwart von syngenen bestrahlten Milzzellen (1×10^5 Zellen/well) mit oder ohne Ratten-CII-Peptid₂₅₆₋₂₇₁/HyK-βGal₂₆₄ (1 μg/ml) stimuliert. Einige Kulturen enthielten zusätzlich einen monoklonalen Antikörper, der gegen Maus-MHC-Klasse-II-Moleküle-I-A^q (1/50) gerichtet war. In den nach 48 Stunden entnommenen Überständen wurde der Gehalt an IFN-γ mittels ELISA bestimmt. Die Werte sind in U/ml angegeben.

Die Blockade der MHC-Klasse-II-Moleküle inhibierte die durch Ratten-CII-Peptid₂₅₆₋₂₇₁/HyK-βGal₂₆₄ induzierte IFN-γ-Produktion bei der CII-spezifischen T-Zelllinie.

Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß das CII-Peptid₂₅₆₋₂₇₁/HyK-βGal₂₆₄ spezifisch von der T-Zelllinie CII-Vβ₁₂ erkannt wird. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß das Peptid imstande ist, CD4⁺ T-Zellen aus mit CII/CFA immunisierten TCR-βtg-Mäusen

effizienter zu aktivieren als denaturiertes CII, da es eine höhere Proliferation (Abb. 15) und stärkere IFN- γ -Bildung induzierte.

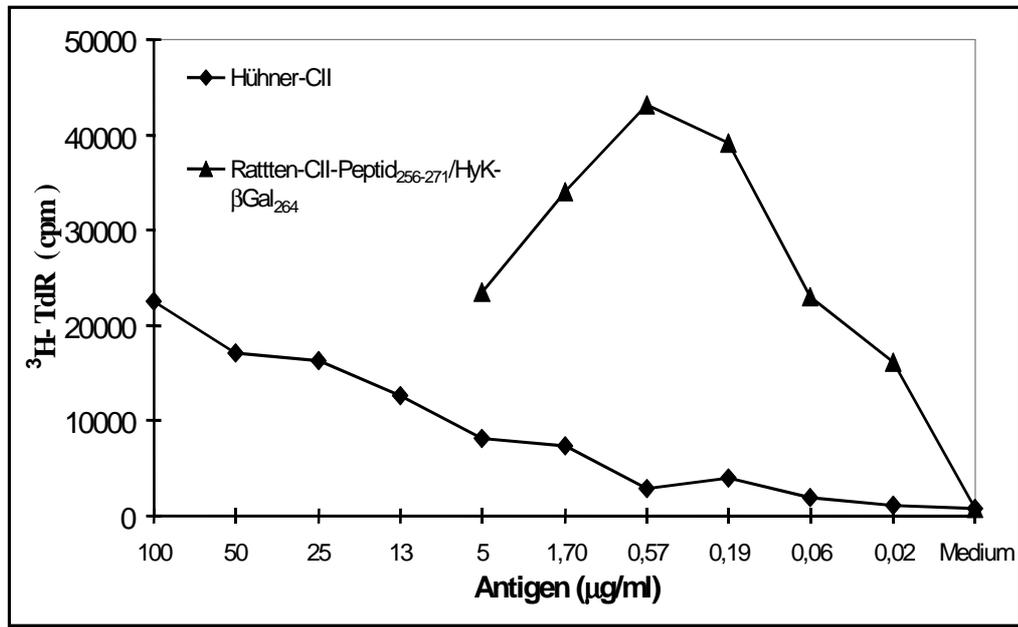


Abb. 15: Proliferation der CD4⁺ T-Zellen nach *ex vivo* Stimulation mit Ratten-CII-Peptid₂₅₆₋₂₇₁/HyK-βGal₂₆₄. CD4⁺ T-Zellen wurden aus den Milzen von TCR-βtg-Tieren, die mit CII in CFA immunisiert worden waren, an Tag 7 nach Immunisierung isoliert (s. II.2.1.3). Die CD4⁺ T-Zellen (4×10^5 Zellen/well) wurden in 96well Flachbodenplatten mit sygenen bestrahlten Milzzellen (1×10^5 Zellen/well) und entweder denaturiertem Hühner-CII (◆) oder Ratten-CII-Peptid₂₅₆₋₂₇₁/HyK-βGal₂₆₄ (▲) in den angegebenen Konzentrationen für 3 Tage stimuliert. Für die letzten 24 Stunden wurde den Kulturen zur Bestimmung der Proliferation ³H-TdR zugegeben. Dargestellt ist der Einbau von ³H-TdR in cpm.

Die *ex vivo* Stimulation mit Ratten-CII-Peptid₂₅₆₋₂₇₁/HyK-βGal₂₆₄ führte zu einer verstärkten Proliferation CII-spezifischer CD4⁺ T-Zellen aus mit CII in CFA immunisierten TCR-βtg-Mäusen verglichen mit denaturiertem Hühner-CII.

Es handelt sich also bei diesem Peptid, wie bei DBA/1-Mäusen, um ein Hauptepitop von CII für die T-Zellen der TCR-βtg-Tiere.

Darüber hinaus wurden aus den Milzen von TCR-βtg-Mäusen isolierte CD4⁺ T-Zellen *in vitro* primär mit diesem Peptid antigenspezifisch aktiviert und in Gegenwart verschiedener Cytokine zu T_H1- bzw. T_H2-Zellen differenziert (siehe Abb. 11). Die Untersuchung der sekundären Kulturüberstände ergab, daß einerseits T-Zellen, die während der primären Aktivierung durch CII-Peptid mit exogenem IL-12 stimuliert worden waren, große Menge an IFN- γ und kein IL-4 produzierten (Abb. 16), andererseits T-Zellen, welche mit exogenem IL-4 während des Antigen-Primings kultiviert worden waren, IL-4, aber kein IFN- γ produzierten. Es muß betont werden, daß

im Gegensatz zur Primäraktivierung von CD4⁺ T-Zellen aus TCR-βtg-Mäusen mit dem gesamt-CII (siehe III.2.2) bei der Primärstimulation mit dem Peptid CII-spezifische T-Zellen aktiviert werden (Abb. 16).

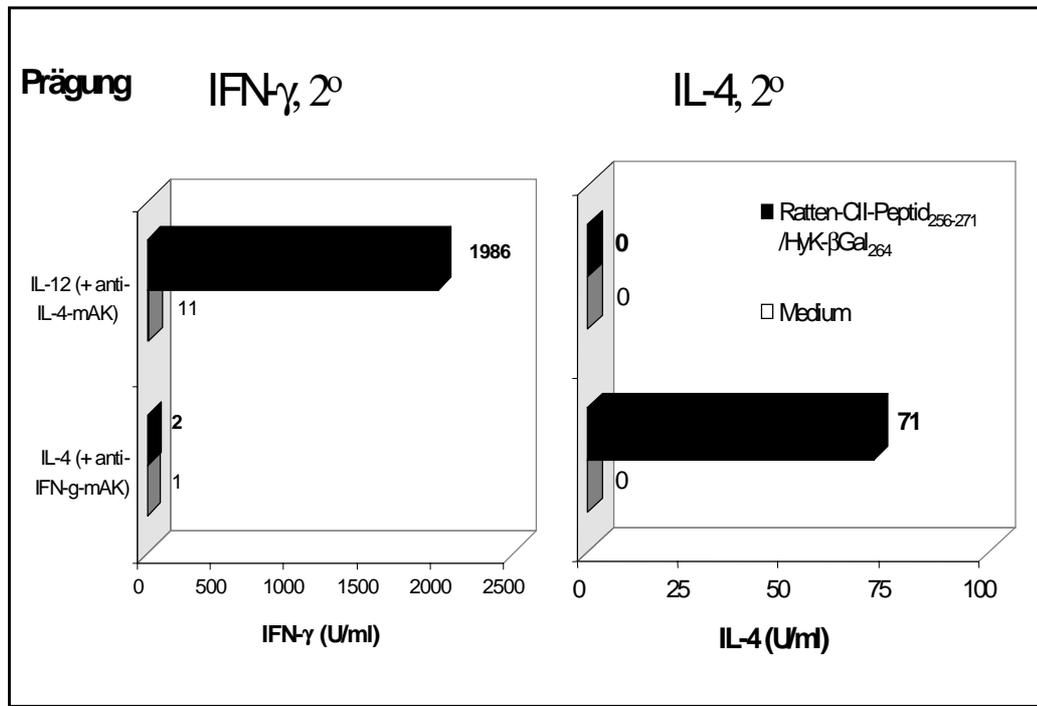


Abb. 16: Aktivierung der CD4⁺ T-Zellen aus TCR-βtg-Mäusen durch Ratten-CII-Peptid₂₅₆₋₂₇₁/HyK-βGal₂₆₄ und Differenzierung unter dem Einfluß verschiedener Cytokine. CD4⁺ T-Zellen (2×10^6 Zellen/ml) wurden aus den Milzen von nicht immunisierten TCR-βtg-Tieren isoliert (s. II.2.1.3) und *in vitro* mit Ratten-CII-Peptid₂₅₆₋₂₇₁/HyK-βGal₂₆₄ (12,5 µg/ml) und syngenem bestrahlten Milzzellen (1×10^6 Zellen/ml) in Gegenwart von anti-CD28-mAK (20 µg/ml) (zur besseren Aktivierung der T-Zellen) stimuliert. Während dieser Primärstimulation (Prägung) wurde dem Kulturmedium die Cytokine IL-12 (1000 U/ml) oder IL-4 (1000 U/ml), sowie die monoklonalen Antikörper anti-IL-4 (10 µg/ml) oder anti-IFN-γ (10 µg/ml) zugesetzt. Nach vier Tagen wurden die Zellen geerntet und ohne weitere Stimulation kultiviert, zwei Tage später mit (■) oder ohne (□) Ratten-CII-Peptid₂₅₆₋₂₇₁/HyK-βGal₂₆₄ in Gegenwart von syngenem bestrahlten Milzzellen restimuliert und nach weiteren 24 Stunden im ELISA die sezernierten Cytokine in Kulturüberständen bestimmt. Dargestellt ist die sekundäre Produktion von IFN-γ und IL-4. Die Werte sind in U/ml angegeben.

Die Primärstimulation mit Ratten-CII-Peptid₂₅₆₋₂₇₁/HyK-βGal₂₆₄ aktivierte CII-spezifische CD4⁺ T-Zellen, die sich unter dem Einfluß von IL-12 zu T_H1-Zellen, charakterisiert durch eine hohe sekundäre IFN-γ-Produktion, bzw. von IL-4 zu T_H2-Zellen, die durch eine sekundäre CII-spezifische IL-4-Produktion gekennzeichnet sind, differenzierten.

Somit lassen sich die CD4⁺ T-Zellen aus TCR-βtg-Mäusen *in vitro* primär antigenspezifisch aktivieren und sowohl zu T_H1- als auch zu T_H2-Zellen differenzieren. Diese Versuche konnten jedoch nicht weitergeführt werden, da zu geringe Mengen des sehr aufwendig zu synthetisierenden Peptids zur Verfügung standen.

3. DIE BEDEUTUNG VON IL-12 UND IFN- γ FÜR DIE INDUKTION EINER CIA

Viele Untersuchungen deuten darauf hin, daß vor allem T_H1-Zellen entscheidend an der Entstehung einer CIA beteiligt sind (120;155;156;167). In diesem Zusammenhang sind Cytokine, die an der Induktion der T_H1-Zellantwort beteiligt sind, wie z.B. IL-12, oder die für T_H1-Zellen charakteristisch sind, wie z.B. IFN- γ , von herausragender Bedeutung.

Im CIA-Modell konnte gezeigt werden, daß die Entstehung dieser Erkrankung durch die Gabe von exogenem IFN- γ beschleunigt wird (167), während sie durch die Neutralisation des endogen gebildeten IFN- γ inhibiert werden kann (156). Darüber hinaus fördert IL-12 die Erkrankung in Inzidenz und Schweregrad (120), während durch die gleichzeitige Neutralisation von IFN- γ , das durch IL-12 induziert wird, die arthritsfördernde-Wirkung von IL-12 völlig aufgehoben wird (168). Diese Daten unterstützen die Annahme, daß diesen beiden Cytokinen eine essentielle Rolle bei der Entstehung einer CIA zukommt.

Im Hinblick auf die beschriebene wichtige Rolle von IL-12 und IFN- γ für die Arthritisentwicklung stellte sich die Frage, ob es durch Blockierung oder Ausschaltung dieser Cytokine möglich ist, die Entwicklung einer CIA zu unterdrücken.

3.1 Verzögertes Auftreten und abgeschwächte Symptomatik einer CIA durch in vivo-Neutralisation von IL-12

Zuerst wurde versucht, IL-12, das möglicherweise im Verlauf der entstehenden Immunreaktion endogen gebildet wird, zu neutralisieren, um so eventuell das Auftreten einer CIA verhindern zu können. IL-12 kann durch die Anwendung neutralisierender anti-IL-12-Antikörper inhibiert werden (169-172). Allerdings besteht bei mehrmaligen *in vivo* Behandlungen mit Antikörpern die Gefahr, daß eine Immunantwort gegen die Antikörper als Fremdprotein ausgelöst wird, die im schlimmsten Fall zum anaphylaktischen Schock führen kann. Außerdem können eventuell entstehende anti-idiotypische Antikörper die Wirkung der zur Therapie eingesetzten anti-IL-12-Antikörper neutralisieren.

Eine weitere Möglichkeit zur Inhibition von IL-12 besteht in der Anwendung des IL-12p40-Homodimers. Die IL-12p40-Kette kommt in drei Formen vor: als Bestandteil des IL-12-Heterodimers, als freies p40-Monomer oder als Disulfid-gebundenes p40-

Homodimer (IL-12(p40)₂). Im murinen System binden p40-Homodimere mit einer ähnlichen Affinität an den IL-12-Rezeptor wie das IL-12-Heterodimer. IL-12(p40)₂ vermittelt aber keine Signalweiterleitung. Somit kann das p40-Homodimer als ein IL-12-Antagonist wirken, da es mit dem IL-12-Heterodimer um die Rezeptorbindung konkurriert (173-175).

Zuerst wurden TCR-βtg-Mäuse, welche mit CII/CFA immunisiert worden waren, direkt nach der Immunisierung mit dem p40-Homodimer in verschiedenen Konzentrationen und unterschiedlich lange behandelt. Aufgrund der Ergebnisse dieser Experimente erschien es sinnvoll, folgendes Behandlungsschema anzuwenden: Die Induktion einer CIA erfolgte durch intradermale Primärimmunisierung (Tag 0) der TCR-βtg-Mäuse mit in CFA emulgiertem CII. Anschließend erhielten die Tiere einer Versuchsgruppe über einen Zeitraum von 2 Wochen jeden 2. Tag eine intraperitoneale Injektion von IL-12(p40)₂ (40 µg/Injektion). Tiere der Kontrollgruppe wurden nach dem gleichen Schema behandelt, erhielten jedoch PBS anstelle von IL-12(p40)₂. In Abb. 17 ist der Verlauf einer daraus resultierenden Arthritis (klinische Symptome) dargestellt.

An Tag 16, dem Ende der p40-Homodimer-Behandlung, zeigten bereits 100% der Tiere der Kontrollgruppe schwere Arthritissymptome. Demgegenüber waren IL-12(p40)₂-behandelte Tiere nicht betroffen. Im weiteren Verlauf des Experiments erreichte die Inzidenz der IL-12(p40)₂-behandelten Gruppe ebenfalls 100% (an Tag 30), allerdings waren die Unterschiede hinsichtlich der Arthritisschwere noch bis zum Ende des Versuches (Tag 58) deutlich zu sehen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Behandlung von TCR-βtg-Mäusen mit IL-12(p40)₂ die Entwicklung einer CIA um ca. zwei Wochen verzögert und zu deutlich abgeschwächten Krankheitssymptomen führt, aber nicht die Entstehung einer CIA verhindern kann.

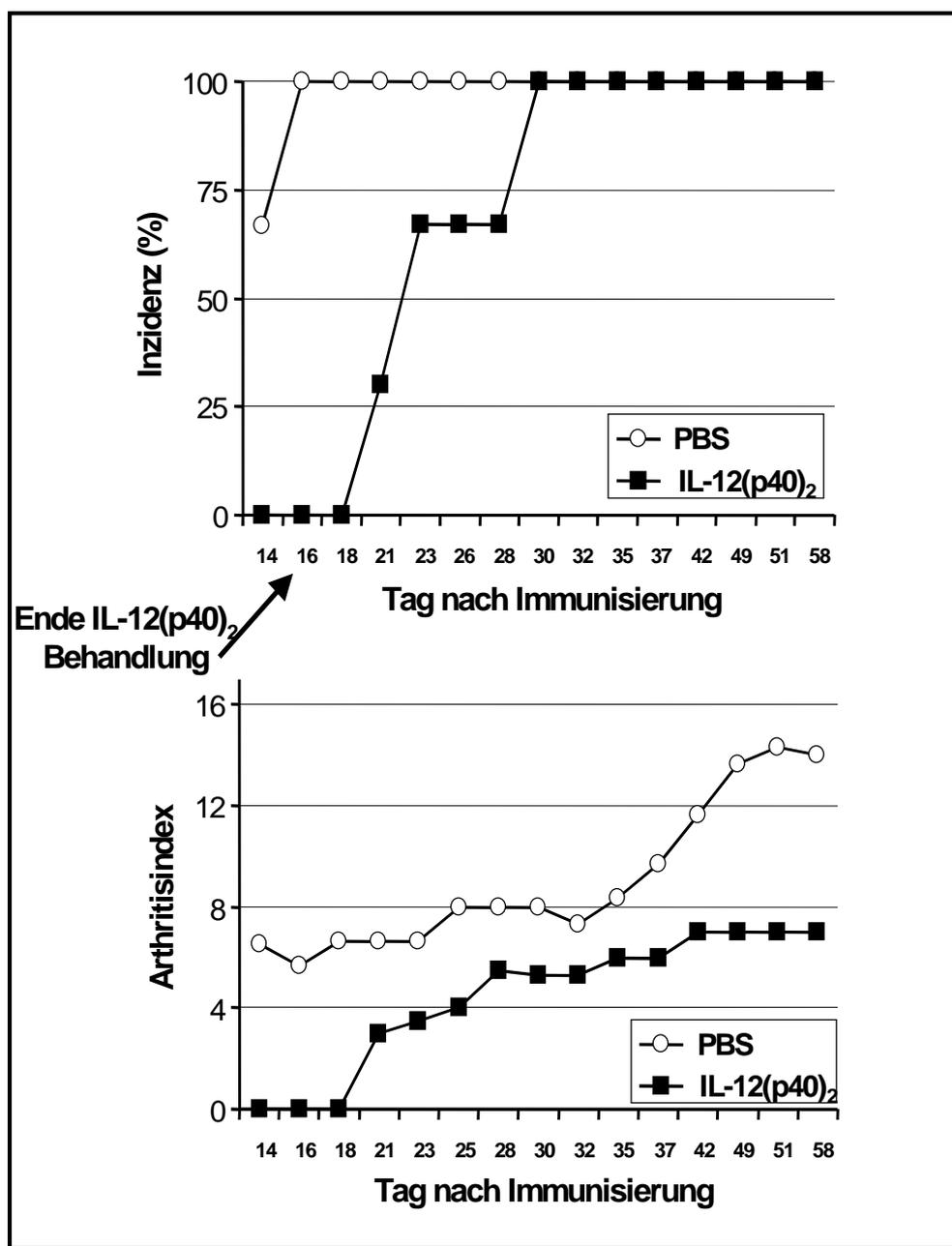


Abb. 17: Auswirkung einer Behandlung mit dem IL-12-Antagonisten IL-12(p40)₂ auf die Entwicklung einer CIA bei TCR- β tg-Mäusen. Männliche TCR- β tg-Mäuse wurden mit CII in CFA i.d. immunisiert und in zwei Gruppen aufgeteilt. Den Tieren der ersten Gruppe (■) wurde IL-12(p40)₂ (40 μ g pro Maus) beginnend am Tag der Immunisierung über einen Zeitraum von 2 Wochen jeden zweiten Tag i.p. verabreicht. Die letzte Injektion von IL-12(p40)₂ erfolgte an Tag 16. Tiere der zweiten Gruppe (Kontrollgruppe) (○) wurden nach dem gleichen Schema behandelt, erhielten jedoch PBS anstelle von IL-12(p40)₂. Die Entwicklung klinischer Symptome einer Arthritis wurde bis Tag 58 nach Immunisierung verfolgt. Dargestellt ist die CIA-Inzidenz als Verhältnis kranker Mäuse zur Gesamtzahl der Mäuse einer Gruppe (in Prozent). Darüber hinaus ist die Ausprägung einer Arthritis als mittlerer Arthritisindex (s. II.3.4) angegeben

Eine Behandlung mit IL-12(p40)₂ verzögerte die Entwicklung einer CIA und verminderte die Schwere der Krankheit.

3.2 Auswirkung der *in vivo* Neutralisation von IL-12 während der CIA-Induktion auf die zelluläre und humorale Immunantwort gegen CII

Zur Charakterisierung der zellulären Immunreaktion gegen CII wurden den Tieren der Versuchs- (IL-12(p40)₂-behandelten) und Kontroll- (PBS-behandelten) Gruppen die Milzen entnommen und die darin enthaltenen T-Zellen isoliert und *ex vivo* mit CII stimuliert. In den nach 96 Stunden erhaltenen Kulturüberständen wurde der Gehalt an IFN- γ mittels ELISA ermittelt. Die in Abb. 18 dargestellten Daten zeigen, daß die Milzzellen beider Gruppen nach polyklonaler Stimulation mit anti-TCR-V β ₁₂-Antikörper die gleiche Menge an IFN- γ produzierten. Vergleicht man die CII-spezifische IFN- γ -Produktion, stellt man fest, daß eine *in vivo* IL-12(p40)₂-Behandlung zu einer 6-fach geringeren IFN- γ -Bildung führte. Somit resultiert aus einer *in vivo* Neutralisation von IL-12 eine supprimierte Entwicklung von CII-spezifischen T_H1-Zellen.

Darüber hinaus wurden am Ende der IL-12(p40)₂-Behandlung und nach dem Versuchsende Serum von allen Tieren entnommen und individuell auf den Gehalt an CII-spezifischen Antikörpern verschiedener Subklassen untersucht, um mögliche Veränderungen der humoralen CII-spezifischen Immunantwort feststellen zu können. Allerdings wurden nur marginale Unterschiede bei der CII-spezifischen Antikörperproduktion zwischen IL-12(p40)₂-behandelten und Tieren der Kontrollgruppe festgestellt. Somit zeigte eine *in vivo* Neutralisation von IL-12 keinen signifikanten Effekt auf die humorale Immunreaktion gegen CII.

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, daß endogen gebildetes IL-12 bei der Induktion der CIA eine wichtige Rolle spielt. Allerdings muß betont werden, daß IL-12 indirekt über IFN- γ wirken kann, da seine Neutralisation eine erniedrigte Bildung von IFN- γ zur Folge hat. Es stellte sich daher die Frage, ob und in welchem Ausmaß IFN- γ , verglichen mit IL-12, an der Entwicklung arthritogener T_H1-Zellen und damit einer Arthritis beteiligt ist. Hinsichtlich der Funktion von IFN- γ für die Arthritsentwicklung gibt es in der Literatur widersprüchliche Befunde. Einerseits kann die Neutralisation von IFN- γ bei der Induktion einer CIA den Krankheitsverlauf abschwächen (156). Andererseits wurde publiziert, daß in Mäusen, die defizient für die IFN- γ -Rezeptor- α -Kette sind und die somit nicht auf IFN- γ reagieren können, eine schwere destruktive Arthritis mit höherer Inzidenz als in Wildtyptieren induzierbar ist (158;159). IFN- γ

scheint also einerseits essentiell für die Entstehung einer CIA zu sein, während sich andererseits das Fehlen seines Rezeptors eher verschlimmernd auswirkt. Zur Klärung der Funktion von IFN- γ für die Entstehung einer CIA wurden Mäuse untersucht, die defizient für die Produktion von IFN- γ (IFN- γ KO) sind.

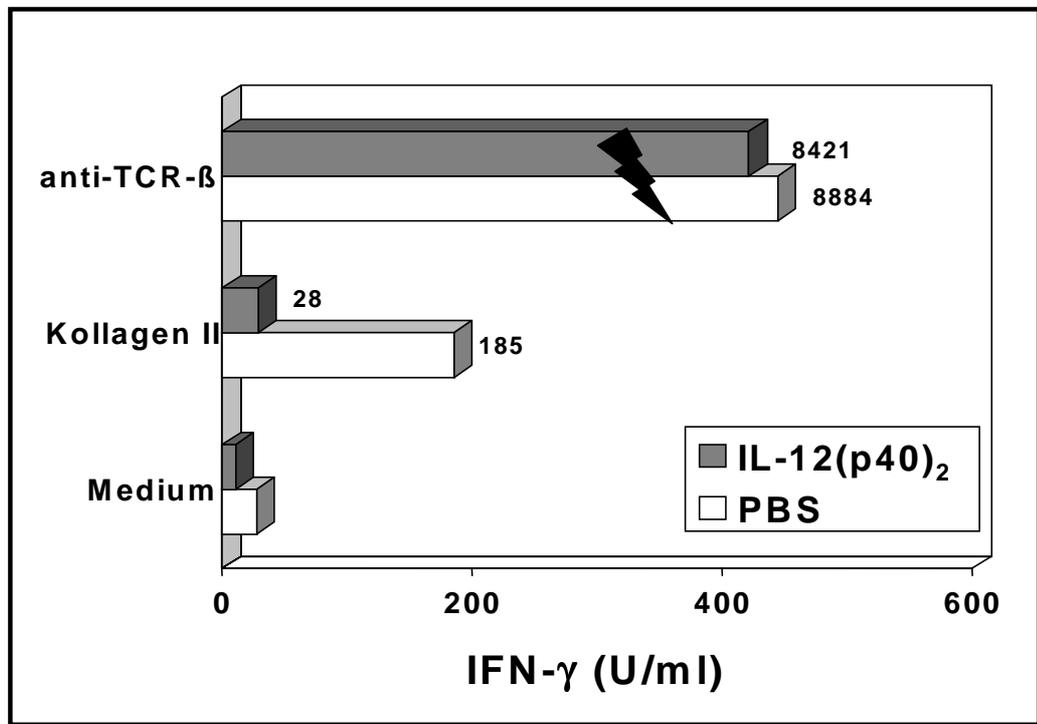


Abb. 18: Auswirkung einer Behandlung mit dem IL-12-Antagonisten IL-12(p40)₂ auf die zelluläre CII-spezifische Immunantwort. Männliche TCR- β tg-Mäuse wurden mit CII in CFA i.d. immunisiert und in zwei Gruppen aufgeteilt, wovon der einen der IL-12-Antagonist IL-12(p40)₂ (■), der anderen als Kontrolle PBS (□) beginnend am Tag der Immunisierung, über einen Zeitraum von 2 Wochen jeden zweiten Tag i.p. verabreicht wurde. Die letzte Injektion erfolgte an Tag 16. Am Versuchsende wurden aus den Mäusen der beiden Gruppen die Milzen präpariert. Einzelzellsuspensionen (2×10^6 Zellen/ml) wurden *ex vivo* mit oder ohne CII (50 μ g/ml) kultiviert. Zur Kontrolle wurden die Milzzellen polyklonal mit immobilisierten monoklonalen anti-TCR-V β ₁₂-Antikörpern (10 μ g/ml) stimuliert. In den nach 96 Stunden entnommenen Überständen wurde anschließend der Gehalt an IFN- γ mittels ELISA bestimmt. Die Werte sind in U/ml angegeben.

Eine Behandlung mit IL-12(p40)₂ supprimierte die Entwicklung von CII-spezifischen T_H1-Zellen.

3.3 Charakterisierung der Arthritisinduktion in TCR- β g F2-Hybridmäusen, die kein IFN- γ produzieren können

Da IFN- γ -defiziente Mäuse ursprünglich auf dem für eine CIA nicht suszeptiblen genetischen Hintergrund des C57Bl/6-Stammes (MHC-Klasse-II-A^b-Haplotyp) entwickelt wurden, war es notwendig, F2-Hybride der Parentalstämme C57Bl/6-IFN- γ KO und DBA/1-TCR- β g zu züchten (Abb. 19).

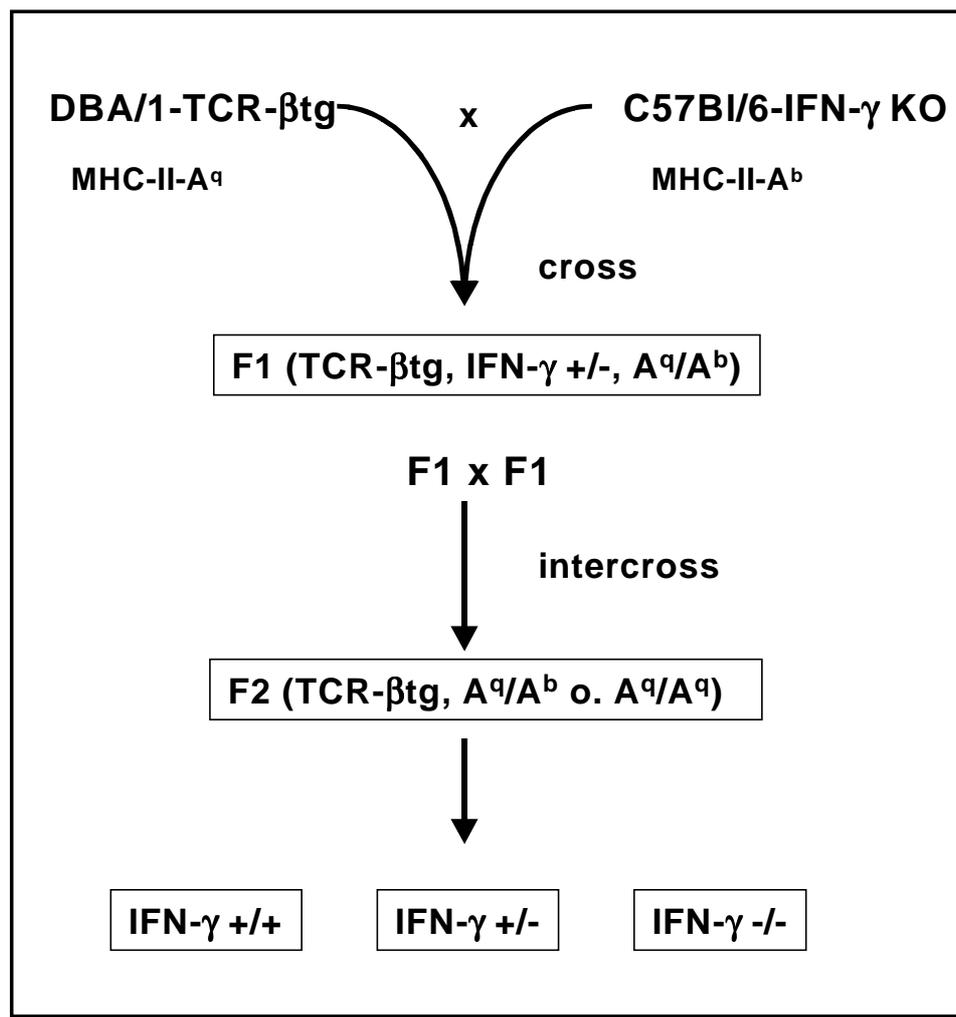


Abb. 19: Schematischer Ablauf der Generierung von IFN- γ -defizienten TCR- β -transgenen F2-Hybridmäusen. IFN- γ -defiziente Mäuse auf dem für CIA nicht suszeptiblen genetischen Hintergrund des C57Bl/6-Stammes wurden mit TCR- β g-Mäusen, die auf dem für CIA suszeptiblen DBA/1-Hintergrund waren, gekreuzt. Daraus resultierende F1-Hybridmäuse wurden auf die Expression der transgenen TCR- β -Kette mittels FACS getestet. Positiv bewertete Tiere wurden für eine weitere Kreuzung (*intercross*) verwendet. F2-Hybridmäuse wurden aufgrund der Expression der transgenen TCR- β -Kette und den für CIA suszeptiblen MHC-Klasse-II- A^a-Haplotyp selektioniert. Die genomische DNA dieser F2-Tiere wurde auf das Wildtyp- (+) bzw. knock-out- (-) Allel des IFN- γ -Gens mittels PCR untersucht.

DBA/1-TCR- β tg-Mäuse besitzen den MHC-Klasse-II-A^q-Haplotyp und entwickeln wie oben gezeigt sehr rasch nach Immunisierung mit CII in CFA eine schwere Arthritis. Daraus resultierende F2-Hybridmäuse wurden auf die Expression der transgenen TCR- β -Kette und den MHC-Klasse-II-Haplotypen (A^b und A^q) mittels FACS getestet. F2-Hybridmäuse, welche die transgene TCR- β -Kette exprimierten, wurden mit CII in CFA immunisiert (siehe Abb. 2) und auf die Entwicklung einer Arthritis untersucht. F2-Tiere, die im FACS als negativ für den MHC-Klasse-II-A^q-Haplotyp typisiert wurden (A^b/A^b), entwickelten unabhängig vom IFN- γ -Gen-Locus keine Arthritis. Dies kann dadurch erklärt werden, daß die T-Zellen TCR- β -transgener Tiere ursprünglich auf den MHC-Klasse-II-A^q-Haplotyp restringiert sind und ihr Antigen nur in Kombination mit A^q erkennen können. Aus diesen Gründen wurden A^b/A^b-typisierte Hybridmäuse für weitere Experimente nicht verwendet.

Weiterhin wurde die genomische DNA dieser Tiere auf das Wildtyp- (IFN- γ ⁺) bzw. knock-out- (IFN- γ ⁻) Allel des IFN- γ -Gens mittels PCR untersucht. In Abb. 20 sind die Ergebnisse einer solchen Typisierung dargestellt.

F2-Tiere, welche die transgene TCR- β -Kette in Kombination mit dem MHC-Klasse-II-A^q-Haplotyp exprimierten und nur das knock-out-Allel des IFN- γ -Gens aufwiesen, wurden als F2 (IFN- γ ^{-/-}) bezeichnet. Sie repräsentierten weniger als 10% aller getesteten F2-Hybriden.

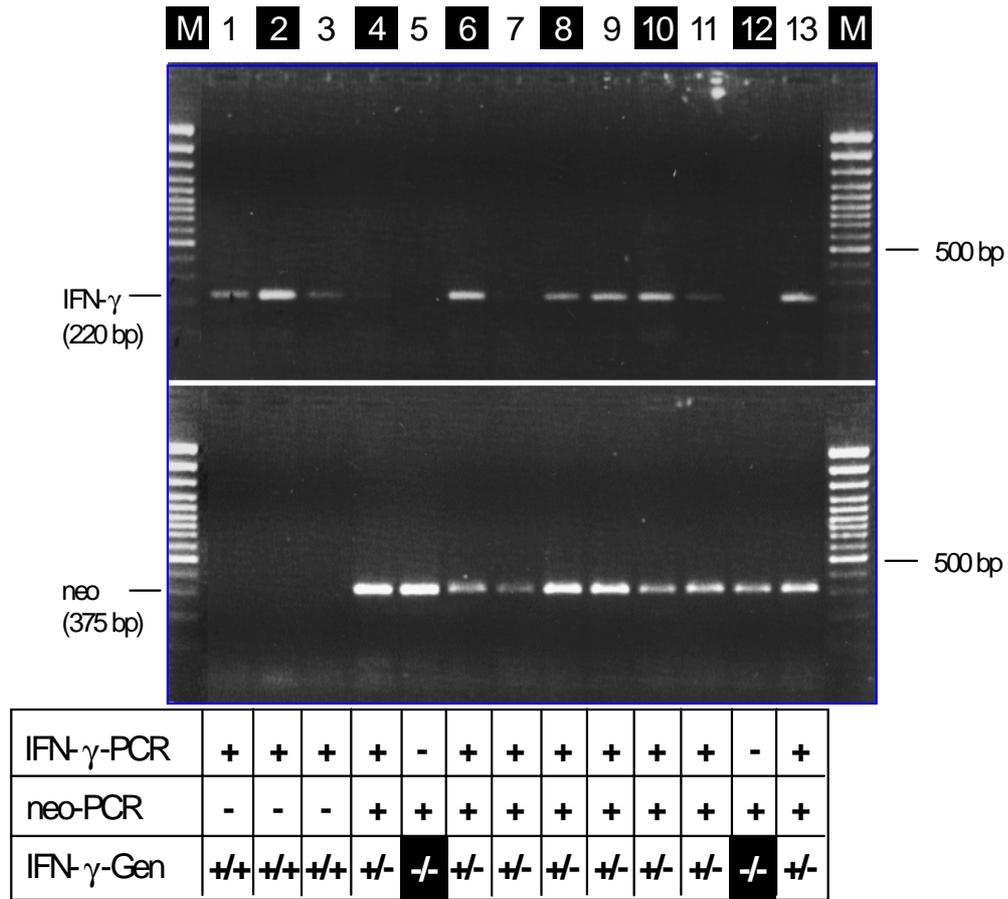


Abb. 20: PCR-Analyse der genomischen DNA von F2-Hybridmäusen hinsichtlich des IFN- γ -Gens. Die genomische DNA von F2-Hybridmäusen, die die transgene TCR- β -Kette in Kombination mit MHC-Klasse-II-A^q- Haplotyp exprimierten (s. Abb. 19) wurde entsprechend II.2.5.3 isoliert und eine PCR mit Primer für **Wildtyp- (IFN- γ , Amplikon: 220 bp)** bzw. für das **knock-out- (Neomycin, Amplikon: 375 bp)** Allel des IFN- γ -Gens durchgeführt (s. II.2.5.4). Bei der auf jedem Gel als Standard gezeigten DNA-Leiter ist der 1500 bp-Marker (M) doppelt konzentriert. Die auf Agarose-Gelen aufgetrennten PCR-Produkte wurden nach Färbung mit Ethidiumbromid unter UV-Licht fotografiert. Dargestellt sind die in der PCR amplifizierten Fragmente von 13 getesteten F2-Hybridmäusen.

Mäuse, in welchen sich nur das Wildtyp-Allel des IFN- γ -Gens amplifizieren ließ (IFN- γ -PCR +, Neomycin-PCR -), wurden als homozygot (+/+) für das Wildtyp IFN- γ -Allel bezeichnet. Tiere, die in der PCR als „positiv“ sowohl für Wildtyp- als auch für das knock-out-Allel des IFN- γ -Gens (IFN- γ -PCR +, Neomycin-PCR +) typisiert wurden, erhielten die Bezeichnung heterozygot (+/-) für das Wildtyp IFN- γ -Allel. Tiere, in welchen sich nur das knock-out-Allel des IFN- γ -Gens amplifizieren ließ (IFN- γ -PCR -, Neomycin-PCR +), wurden als (-/-) für das Wildtyp IFN- γ -Allel bezeichnet.

3.3.1 Immunisierung von F2 (IFN- $\gamma^{-/-}$)-Mäusen mit CII in CFA führt nicht zur Entstehung einer Arthritis

Als (IFN- $\gamma^{-/-}$) typisierte TCR- β tg F2-Hybridmäuse wurden vergleichend mit entsprechenden Tieren, welche entweder homozygot (IFN- $\gamma^{+/+}$) oder heterozygot (IFN- $\gamma^{+/-}$) für das Wildtyp IFN- γ -Gen-Allel waren, auf die Entstehung einer CIA untersucht. Von den F2 (IFN- $\gamma^{+/+}$)- bzw. F2 (IFN- $\gamma^{+/-}$)-Hybriden entwickelten nach Immunisierung mit CII/CFA nur 45% der Tiere (7 von 17 IFN- $\gamma^{+/+}$; und 16 von 36 IFN- $\gamma^{+/-}$) eine unterschiedlich stark manifestierte Arthritis (Abb. 21).

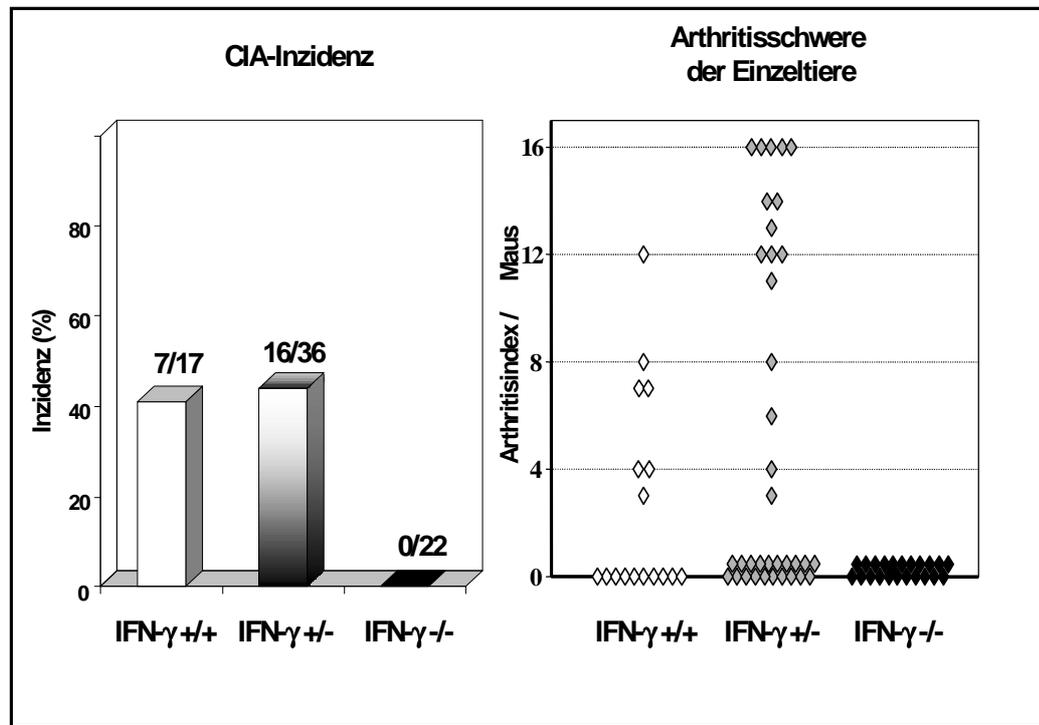


Abb. 21: Entwicklung einer CIA in F2-Hybridmäusen nach Immunisierung mit CII in CFA. Männliche und weibliche F2-Hybridmäuse wurden mit CII in CFA i.d. immunisiert. Die Entwicklung klinischer Symptomen einer Arthritis wurde bis Tag 42 nach der Immunisierung beobachtet. Dargestellt ist die Zusammenfassung von 5 Experimenten. Die CIA-Inzidenz ist angegeben als Verhältnis kranker Mäuse zur Gesamtzahl der Mäuse einer Gruppe (in Prozent). Die Ausprägung einer Arthritis ist als individueller Arthritisindex der Einzeltiere (s. II.3.4) dargestellt.

F2 (IFN- $\gamma^{-/-}$)-Mäuse entwickelten nach Immunisierung mit CII in CFA keine Arthritis.

Somit entwickelten F2-Hybridtiere im Gegensatz zu TCR- β tg DBA/1-Mäusen keine CIA mit 100%-iger Inzidenz. Dies könnte durch die Segregation von Suszeptibilitätsgenen im genetischen Hintergrund des suszeptiblen DBA/1- und des nicht suszeptiblen C57Bl/6-Stammes bedingt sein (siehe oben). Dagegen entwickelte

keine der F2 (IFN- $\gamma^{-/-}$)-Mäuse eine Arthritis. Diese Ergebnisse demonstrieren, daß endogenes IFN- γ eine Voraussetzung für die Arthritisentwicklung ist.

3.3.2 Arthritis-Resistenz von F2 (IFN- $\gamma^{-/-}$)-Mäusen korreliert mit einer verminderten humoralen CII-spezifischen Immunantwort

Zur Charakterisierung der CII-spezifischen humoralen Immunreaktion wurden F2 (IFN- $\gamma^{-/-}$)-Mäusen Blutproben entnommen und auf CII-spezifische Antikörper untersucht. Die in Abb. 22 dargestellten Ergebnisse zeigen, daß im Vergleich zu F2 (IFN- $\gamma^{+/+}$)-Hybriden F2 (IFN- $\gamma^{-/-}$)-Mäuse eine stark reduzierte Bildung CII-spezifischer Antikörper aufwiesen. Diese Unterschiede wurden sowohl bei den CII-spezifischen Gesamtantikörpern (18-fach geringer) als auch bei den IgG₁-Antikörpern (17-fach geringer) und bei den von IFN- γ abhängigen IgG_{2a}-Antikörpern (150-fach geringer) beobachtet.

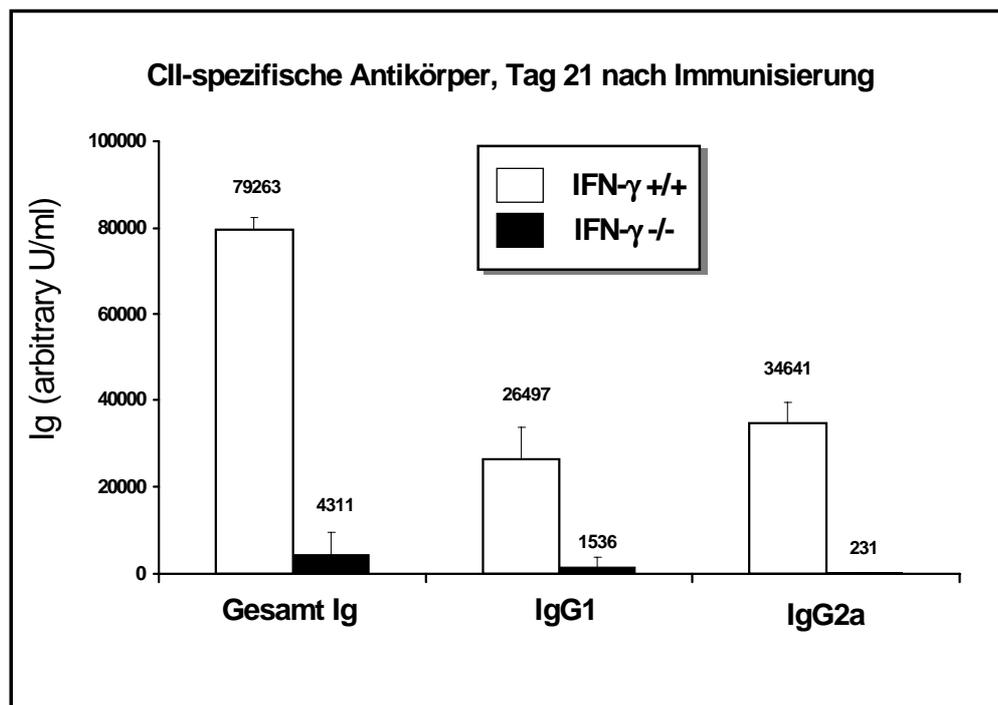


Abb. 22: Bestimmung der Serumtiter CII-spezifischer Antikörper bei F2-Hybridmäusen nach Immunisierung mit CII in CFA. Männliche und weibliche IFN- $\gamma^{-/-}$ (■) und IFN- $\gamma^{+/+}$ (□) F2-Mäuse wurden mit CII in CFA i.d. immunisiert. An Tag 21 wurden die Tiere geblutet, Serum gewonnen und die Titer CII-spezifischer Antikörper mittels ELISA bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte für Gesamtimmunglobulin, IgG₁ und IgG_{2a} der Tiere der einzelnen Versuchsgruppen. Die Werte sind in arbitrary U/ml angegeben.

Die Immunisierung von F2 (IFN- $\gamma^{-/-}$)-Hybridmäusen mit CII in CFA führte zu einer vergleichsweise geringen Bildung CII-spezifischer Antikörper aller Subklassen.

Daraus ergab sich die Hypothese, daß F2 (IFN- $\gamma^{-/-}$)-Mäuse einen allgemeinen Defekt in der Immunreaktion gegen CII aufweisen könnten. Zur Klärung dieser Vermutung wurde die T_H-Zell-Reaktivität gegen CII von F2 (IFN- $\gamma^{-/-}$)-Mäusen untersucht.

3.3.3 Immunisierung von F2 (IFN- $\gamma^{-/-}$)-Mäusen mit CII in CFA führt zur Entwicklung IL-2-produzierender CII-spezifischer CD4⁺ T-Zellen

Zur Charakterisierung der CII-spezifischen zellulären Immunreaktion wurden die aus den Milzen bzw. Lymphknoten von F2 (IFN- $\gamma^{-/-}$)-Mäusen isolierten CD4⁺ T-Zellen *ex vivo* mit CII stimuliert und die Proliferation bzw. IL-2-Produktion gemessen. Die Bestimmung von IL-2 in den entnommenen Kulturüberständen erfolgte mittels Bioassay (siehe II 2.1.9).

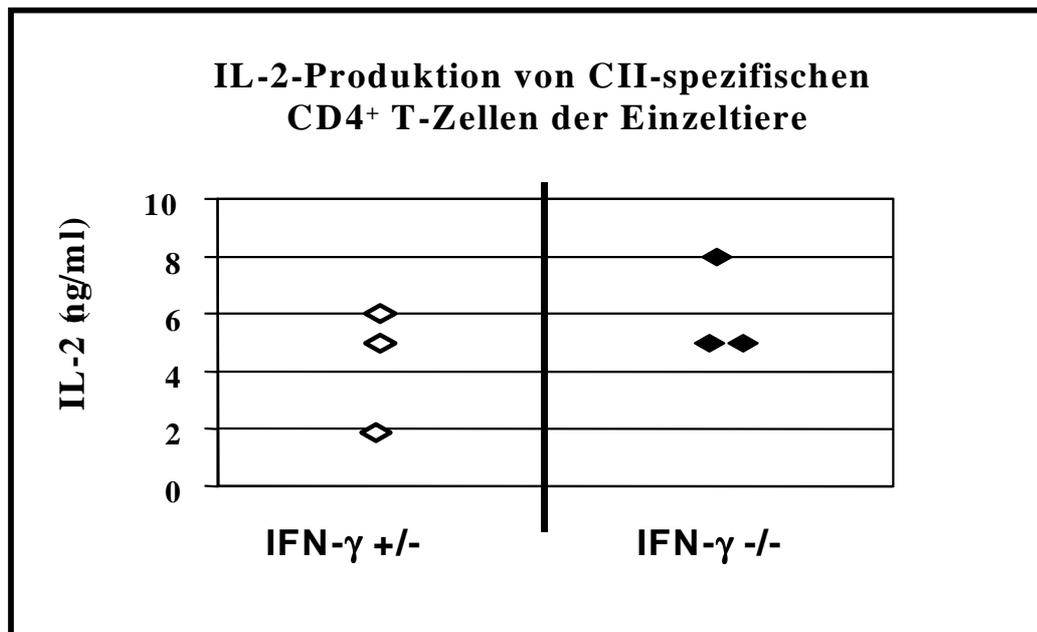


Abb. 23: Bestimmung von IL-2 in den Überständen CII-spezifisch aktivierter CD4⁺ T-Zellen von F2-Hybridmäusen, die mit CII in CFA immunisiert worden waren. Männliche und weibliche F2-Hybridmäuse wurden mit CII in CFA i.d. immunisiert. An Tag 21 nach der Immunisierung wurden von IFN- $\gamma^{-/-}$ (■) und IFN- $\gamma^{+/+}$ (□) F2-Mäusen jeweils drei Tiere pro Gruppe getötet und die Milzen präpariert. Aus den Milzen wurden die CD4⁺ T-Zellen entsprechend II.2.1.3 isoliert. CD4⁺ T-Zellen (2×10^6 Zellen/ml) wurden *ex vivo* mit CII (50 μ g/ml) in Gegenwart von syngenen bestrahlten Milzzellen (APC) (1×10^6 Zellen/ml) stimuliert. In den nach 48 Stunden entnommenen Kulturüberständen wurde anschließend der Gehalt an IL-2 mit Hilfe eines Bioassays (s. II.2.1.9) bestimmt. Die Werte sind in ng/ml angegeben.

Die Immunisierung von F2 (IFN- $\gamma^{-/-}$)-Hybridmäusen mit CII in CFA führte zu einer etwa gleichen IL-2-Produktion durch CII-spezifische CD4⁺ T-Zellen verglichen mit F2 (IFN- $\gamma^{+/+}$)-Hybridmäusen. Dieser Befund wies darauf hin, daß T_H-Zellen der F2 (IFN- $\gamma^{-/-}$)-Mäusen keinen prinzipiellen Defekt in der T-Zellreaktivität gegen CII besaßen.

Die Ergebnisse zeigten klar, daß sich CD4⁺ T-Zellen von F2 (IFN- γ ^{-/-})-Mäusen durch CII aktivieren ließen und die gleiche IL-2-Menge wie CD4⁺ T-Zellen von F2 (IFN- γ ^{+/+})-Hybriden produzierten (Abb. 23).

Darüber hinaus wurde kein Unterschied in der CII-spezifischen Proliferation von CD4⁺ T-Zellen von F2 (IFN- γ ^{-/-})-Mäusen im Vergleich zu F2 (IFN- γ ^{+/-})- oder F2 (IFN- γ ^{+/+})-Hybriden beobachtet. Dies erlaubte den Schluß, daß die Immunisierung mit CII in CFA die Entwicklung CII-spezifischer CD4⁺ T-Zellen in F2 (IFN- γ ^{-/-})- und F2 (IFN- γ ^{+/-} bzw. IFN- γ ^{+/+})-Hybriden in vergleichbarer Weise förderte. Somit zeigten T_H-Zellen dieser Tiere keinen Defekt in der Immunreaktion gegen CII.

3.3.4 Behandlung von F2 (IFN- γ ^{-/-})-Mäusen mit exogenem IFN- γ während der CIA-Induktion führt zu einer schweren Arthritis

Im Gegensatz zu Studien, die mit IFN- γ -Rezeptor-defizienten Mäusen durchgeführt wurden (158;159), sind Untersuchungen mit IFN- γ -defizienten Mäusen wesentlich besser zu kontrollieren, da durch die Applikation von exogenem IFN- γ geprüft werden kann, ob die in diesen Tieren beobachteten Phänomene wirklich von IFN- γ abhängig sind. Deshalb wurden in den folgenden Versuchen F2 (IFN- γ ^{-/-})-Mäuse mit CII in CFA immunisiert und mit exogenem IFN- γ behandelt (Abb. 24).

Die dargestellten Ergebnisse demonstrieren, daß F2 (IFN- γ ^{-/-})-Tiere, welche zusätzlich während der Immunisierung vier i.p. Injektionen von IFN- γ (1,25 μ g/pro Maus, täglich) erhielten, eine schwere Arthritis mit 50%-iger Inzidenz entwickelten. Im Gegensatz dazu wiesen F2 (IFN- γ ^{-/-})-Tiere der Kontrollgruppe, die mit PBS behandelt wurden, keine arthritischen Symptome auf. Außerdem wurde beobachtet, daß die Gabe von exogenem IFN- γ die Produktion von CII-spezifischen Antikörpern in F2 (IFN- γ ^{-/-})-Mäusen steigerte. Diese Ergebnisse zeigen, daß die Arthritis-Resistenz der F2 (IFN- γ ^{-/-})-Tiere nicht auf einem sekundären Defekt dieser Mäuse beruht und daß IFN- γ offensichtlich essentiell für die Entwicklung einer CIA ist.

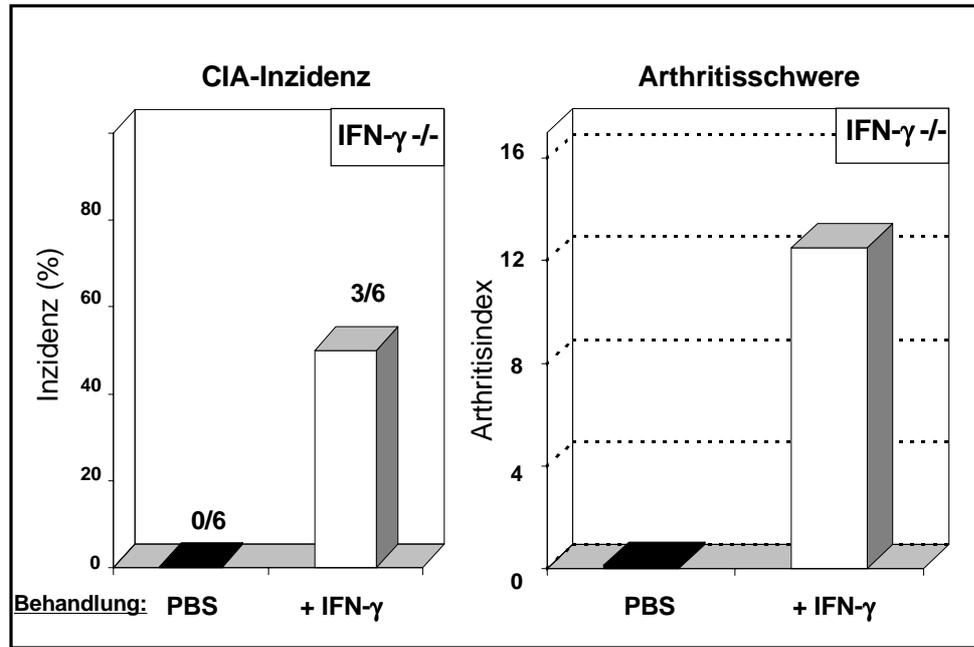


Abb. 24: Auswirkung einer *in vivo* Behandlung mit exogenem IFN- γ auf die Entwicklung einer CIA bei F2-Hybridmäusen. Männliche und weibliche F2 (IFN- γ -/-)-Hybridmäuse wurden mit CII in CFA intradermal immunisiert und in zwei Gruppen aufgeteilt. Den Tieren der ersten Gruppe (\square) wurde IFN- γ (1,25 μ g pro Maus) vier mal beginnend am Tag der Immunisierung (Tag 0-3) i.p. verabreicht. Tiere der zweiten Gruppe (Kontrollgruppe) (\blacksquare) wurden nach dem gleichen Schema behandelt, erhielten jedoch PBS anstelle von IFN- γ . Die Entwicklung klinischer Zeichen einer Arthritis wurde bis Tag 42 nach der Immunisierung verfolgt. Dargestellt ist die CIA-Inzidenz als Verhältnis kranker Mäuse zur Gesamtzahl der Mäuse einer Gruppe (in Prozent). Darüber hinaus ist die Ausprägung einer Arthritis als mittlerer Arthritisindex (s. II.3.4) angegeben.

Eine Behandlung mit exogenem IFN- γ führte zur Entwicklung einer schweren Arthritis in F2 (IFN- γ -/-)-Mäusen.

3.3.5 IFN- γ -unabhängige Arthritis-induzierende Wirkung von IL-12 in F2 (IFN- γ -/-)-Mäusen

Da IL-12 die T_H1-Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen induziert, wurde diesem Cytokin eine essentielle Beteiligung bei der Auslösung und Aufrechterhaltung einer CIA zugesprochen (120). So konnte gezeigt werden, daß die Gabe von IL-12 in Kombination mit CII/IFA in DBA/1-Mäusen zur Ausbildung einer starken zellulären und humoralen Immunreaktion gegen CII führte, welche in einer schweren destruktiven Arthritis resultierte (120). Allerdings konnte auch gezeigt werden, daß neutralisierende anti-IFN- γ -Antikörper die Entstehung der T_H1-Zellen *in vivo* auch in Gegenwart von IL-12 verhindern und somit den Ausbruch einer CIA unterbinden (168). Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse wurde angenommen, daß die Effekte von IL-12

bezüglich der Entwicklung einer Arthritis von IFN- γ abhängig sind (168). Im Gegensatz dazu zeigen Studien mit IFN- γ -Rezeptor-defizienten Mäusen, die eine schwere destruktive Arthritis mit höherer Inzidenz als in Wildtyp-Tieren entwickeln, daß in solchen Mäusen eine CIA durch die Neutralisierung von IL-12 verhindert werden kann (170). IL-12 kommt in diesem Modell also eine direkte, von IFN- γ unabhängige Funktion bei der Induktion einer CIA zu (170). Es stellte sich die Frage, in welchem Ausmaß IL-12, verglichen mit IFN- γ , an der Entwicklung arthritogener T_H1-Zellen und somit der Entstehung einer Arthritis beteiligt ist. Zur Klärung dieser Frage wurden F2 (IFN- $\gamma^{-/-}$)-Mäuse mit CII in IFA immunisiert und erhielten anschließend fünf i.p. Injektionen von IL-12 (200 ng/pro Maus, täglich). Im Gegensatz dazu wurden die Tiere der Kontrollgruppe mit CII in CFA immunisiert ohne zusätzliche Applikation von IL-12. Die Tiere der Kontrollgruppe entwickelten bis einschließlich Tag 42 nach der Immunisierung keine Arthritis (Abb. 25).

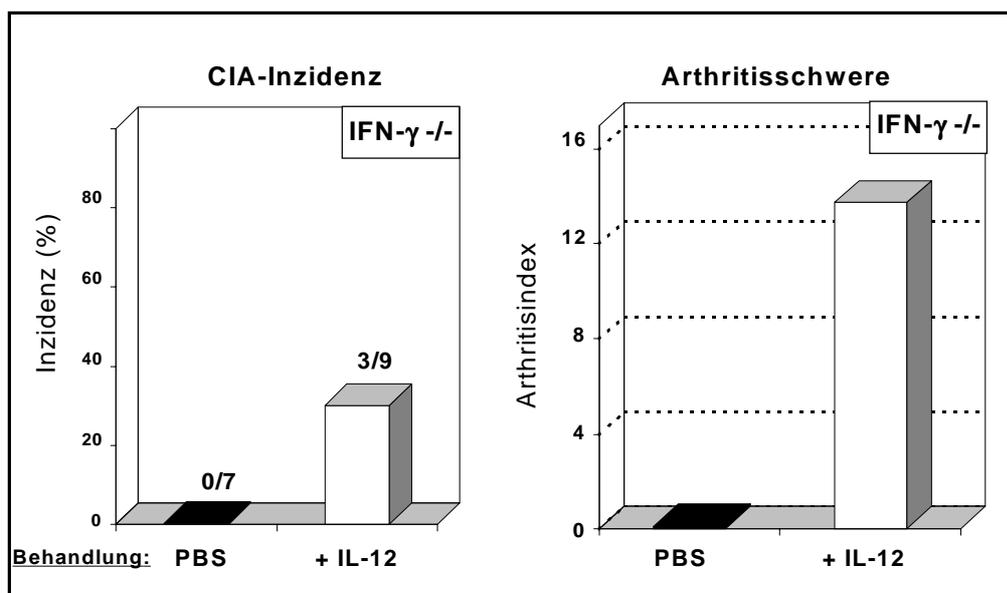


Abb. 25: Auswirkung einer *in vivo* Behandlung mit IL-12 auf die Entwicklung einer CIA bei F2-Hybridmäusen. Männliche und weibliche F2 (IFN- $\gamma^{-/-}$)-Tiere der Versuchsgruppe (□) wurden mit CII in IFA intradermal immunisiert und erhielten beginnend am Tag der Immunisierung (Tag 0-4) fünf i.p. Injektionen von IL-12 (200 ng pro Maus). Tiere der Kontrollgruppe (■) wurden mit CII in CFA immunisiert ohne exogene IL-12-Gabe. Die Entwicklung klinischer Symptome einer Arthritis wurde bis Tag 42 nach der Immunisierung verfolgt. Dargestellt ist die Zusammenfassung von 2 Experimenten. Die CIA-Inzidenz ist als Verhältnis kranker Mäuse zur Gesamtzahl der Mäuse einer Gruppe (in Prozent) dargestellt. Darüber hinaus ist die Ausprägung einer Arthritis als mittlerer Arthritisindex (s. II.3.4) angegeben

Eine Behandlung mit IL-12 führte zur Entwicklung einer schweren Arthritis in F2 (IFN- $\gamma^{-/-}$)-Mäusen. IL-12 konnte auch unabhängig von IFN- γ die Induktion einer CIA vermitteln.

Zum gleichen Zeitpunkt zeigten 50% der Tiere, die zusätzlich mit IL-12 behandelt worden waren, Zeichen einer schweren Arthritis. Somit führte die Behandlung mit IL-12 von F2 (IFN- γ ^{-/-})-Mäusen zur Entwicklung einer CIA. Da solche Mäuse kein IFN- γ bilden können, kann IL-12 offensichtlich auch unabhängig von IFN- γ die Induktion einer CIA vermitteln. IL-12 scheint somit eine zweifache Bedeutung bei der Entstehung einer CIA zuzukommen, zum einen als direkter Induktor, wie am Beispiel der F2 (IFN- γ ^{-/-})-Mäuse nachgewiesen wurde, und zum anderen als starker Promoter der IFN- γ -Bildung in normalen Mäusen.

3.3.6 Untersuchungen zur Induktion der Synthese von inflammatorischen Cytokinen durch LPS-Gabe bei IFN- γ R KO- und IFN- γ KO-Mäusen

Aus der Literatur war bekannt, daß IFN- γ die Aktivierung von Makrophagen fördert und die Synthese von verschiedenen Cytokinen beeinflusst (176-180). So wurde beschrieben, daß IFN- γ die TNF- α -Produktion bei aktivierten Makrophagen induziert. Darüber hinaus wurde gezeigt, daß IFN- γ die Bildung von IL-12 bei Monocyten steigert, indem es die IL-12-Gen-Transkription direkt fördert (82;181-185). Da in IFN- γ -defizienten Mäusen (IFN- γ KO) kein IFN- γ gebildet wird, wäre es möglich, daß solche Mäuse einen weiteren Defekt in der Synthese weiterer Cytokine besitzen. Aus diesem Grund wurde in einer weiteren Versuchsreihe die Produktion inflammatorischer Cytokine, wie TNF- α , IL-6, IL-12 und IL-15, die durch die Gabe diverser mikrobieller Substanzen induziert wurden, bei IFN- γ R KO- und IFN- γ KO-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen untersucht. Zu diesem Zweck wurden peritoneale Exsudat-Zellen (PEC) verwendet, welche über ihre Adhärenz selektioniert wurden und laut den Ergebnissen der histologischen Färbung zu ca. 70% aus Monocyten bestanden. PEC wurden mit Lipopolysaccharid (LPS), Paraformaldehyd-fixierten Staphylokokken (SAC) sowie einer Kombination der beiden stimuliert. LPS ist ein Bestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien und ein wirksames Endotoxin, welches Monocyten bzw. Makrophagen zur Bildung von TNF- α , IL-1, IL-6 und IL-12 anregt. In den nach 16, 24 und 48 Stunden entnommenen Kulturüberständen wurde der Gehalt verschiedener Cytokine mittels ELISA (IL-12) bzw. Bioassay (TNF- α , IL-6 und IL-15) gemessen. In keinem der getesteten Kulturüberstände konnte IL-12 nachgewiesen werden. Dies lag wahrscheinlich an der nicht ausreichenden Empfindlichkeit der

angewandten Methode zum Nachweis von IL-12, das unter diesen Stimulationsbedingungen gebildet wurde. Hinsichtlich der Produktion von TNF- α , IL-6 und IL-15 konnte gezeigt werden, daß die Synthese dieser Cytokine durch LPS und insbesondere durch eine Kombination von LPS und SAC induziert werden konnte. Bezüglich der IL-15-Synthese wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen IFN- γ R KO-, IFN- γ KO- und Wildtyp-Mäusen festgestellt. Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, daß PEC von IFN- γ KO-Mäusen ca. 5-fach weniger TNF- α und ca. 25-fach weniger IL-6 im Vergleich zu IFN- γ R KO-Mäusen produzierten (Abb. 26).

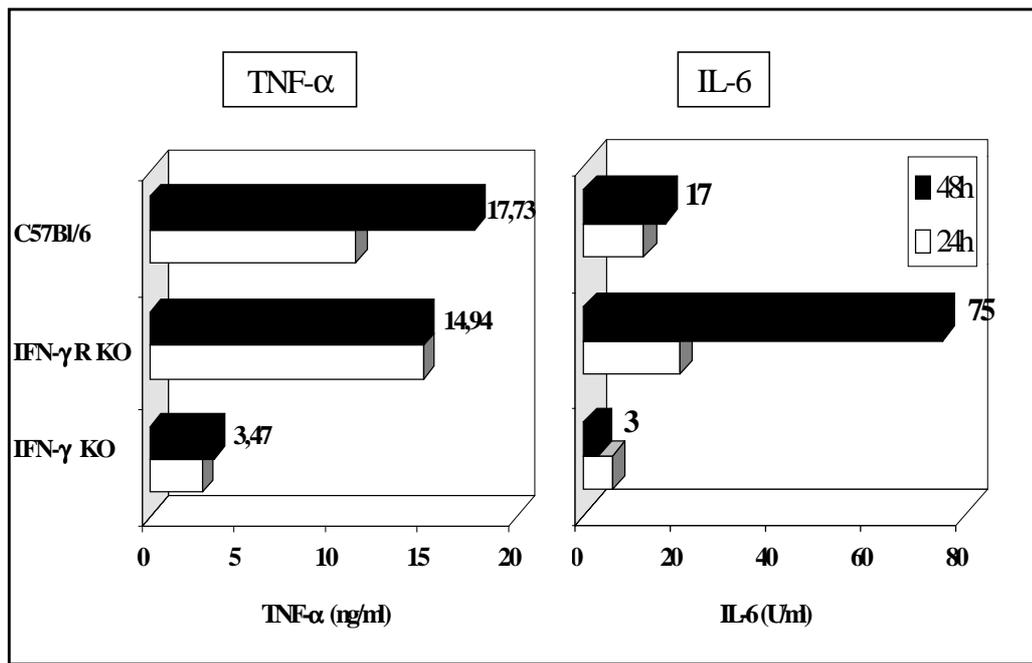


Abb. 26: Vergleich der LPS-induzierten Synthese von inflammatorischen Cytokinen bei IFN- γ KO- und IFN- γ R KO-Mäusen. Peritoneale Exsudat-Zellen (PECs) (3×10^6 Zellen/ml) wurden von IFN- γ KO-, IFN- γ R KO- und C57Bl/6-Mäusen isoliert, über ihre Adhärenz selektioniert und *in vitro* mit LPS (5 μ g/ml) in Anwesenheit von Paraformaldehyd-fixierten Staphylokokken (SAC: 0,1%) aktiviert. Die Bestimmung des TNF- α - und IL-6-Gehalts in den nach 24 (\square) und 48 (\blacksquare) Stunden entnommenen Kulturüberständen erfolgte mittels Bioassays (s. II.2.1.9). Angegeben sind die Mittelwerte von jeweils 3 unabhängigen Aktivierungsansätzen.

PECs von IFN- γ KO-Mäusen wiesen eine geringere Synthese von TNF- α und IL-6 im Vergleich zu IFN- γ R KO- und Wildtyp-C57Bl/6-Mäusen auf.

Vergleicht man die Synthese dieser Cytokine mit Wildtyp-Mäusen, sieht man, daß sie ebenfalls deutlich niedriger ist (4-fach geringer für TNF- α und 6-fach geringer für IL-6). Dies erlaubt den Schluß, daß in IFN- γ KO-Mäusen die Synthese von inflammatorischen Cytokinen als Folge der Stimulation mit verschiedenen mikrobiellen Produkten reduziert ist. Eine mögliche Erklärung dafür wäre eine verstärkte Produktion

von IL-10 in den IFN- γ KO-Mäusen. IL-10 ist als ein sehr potenter Inhibitor der Synthese von verschiedenen inflammatorischen Cytokinen bekannt (182). Um dies zu prüfen, wurden die unter den oben beschriebenen Stimulationsbedingungen gewonnenen Kulturüberstände auf ihren Gehalt an IL-10 mit Hilfe der ELISA-Technik untersucht. Es zeigte sich, daß die IL-10-Produktion in den IFN- γ KO-Mäusen tatsächlich wesentlich höher war als in IFN- γ R KO- oder in Wildtyp-Mäusen (Abb. 27).

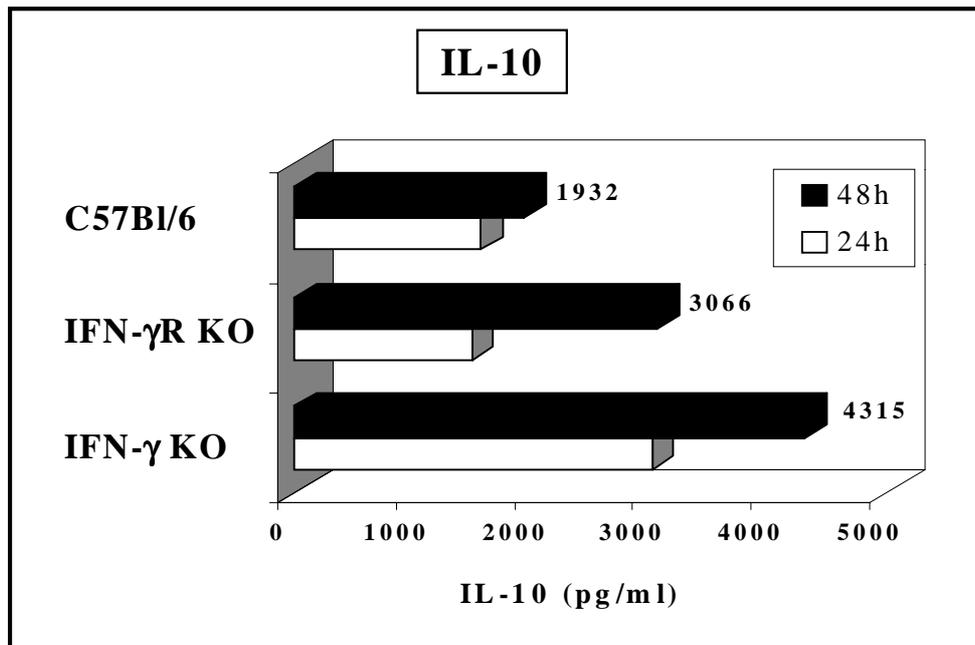


Abb. 27: Vergleich der LPS-induzierten Synthese von IL-10 bei IFN- γ KO- und IFN- γ R KO-Mäusen. Peritoneale Exsudat-Zellen (PECs) (3×10^6 Zellen/ml) wurden von IFN- γ KO-, IFN- γ R KO- und C57Bl/6-Mäusen isoliert, über ihre Adhärenz selektioniert und *in vitro* mit LPS (5 μ g/ml) in Anwesenheit von Paraformaldehyd-fixierten Staphylokokken (SAC: 0,1%) aktiviert. Die Bestimmung des IL-10-Gehalts in den nach 24 (\square) und 48 (\blacksquare) Stunden entnommenen Kulturüberständen erfolgte mittels ELISA. Angegeben sind die Mittelwerte von jeweils 3 unabhängigen Aktivierungsansätzen.

PECs von IFN- γ KO-Mäusen wiesen eine erhöhte IL-10-Synthese im Vergleich zu IFN- γ R KO- und Wildtyp-C57Bl/6-Mäusen auf.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß IFN- γ KO-Mäuse eine geringe Synthese von inflammatorischen Cytokinen (TNF- α und IL-6) und eine erhöhte IL-10-Produktion aufweisen. Diese Ergebnisse zeigen, daß, obwohl IFN- γ R KO- und IFN- γ KO-Mäuse einen gemeinsamen Defekt hinsichtlich der IFN- γ -Funktion besitzen (die ersten auf der Ebene des Rezeptors, die zweiten auf der Ebene der Produktion), die Immunreaktion dieser Mäuse möglicherweise unterschiedlich ist.

4. THERAPEUTISCHE ANSÄTZE ZUR BEHANDLUNG EINER CIA

Da TCR- β tg-Mäuse eine schwere chronische Arthritis entwickeln, stellen sie ein Modell für die Untersuchung der Wirksamkeit verschiedener immuntherapeutischer Maßnahmen dar. In einer Reihe von Experimenten wurde zuerst versucht, während der Induktionsphase die durch T_H-Zellen vermittelten Immunreaktionen zu unterbinden, indem T_H-Zellen mittels eines anti-CD4-Antikörpers eliminiert wurden, oder indem deren Migration durch einen anti-CD44-Antikörper blockiert wurde.

4.1 Untersuchungen zur Depletion von CD4⁺ T-Zellen während der CIA-Induktion in TCR- β tg- und DBA/1-Mäusen

Viele Untersuchungen deuten darauf hin, daß vor allem CD4⁺ T-Zellen entscheidend an der Induktion einer CIA beteiligt sind (146;186-191). Mit dem Ziel, die Entwicklung einer Arthritis zu unterdrücken, wurden CD4⁺ T-Zellen mit Hilfe eines monoklonalen anti-CD4-Antikörpers *in vivo* depletiert. Hierzu wurden TCR- β tg-Mäuse mit CII/CFA immunisiert und in zwei Gruppen unterteilt. Tiere der ersten Gruppe erhielten im Anschluß an eine Immunisierung eine i.p. Injektion eines anti-CD4-mAK (300 μ g/Maus), Tiere der zweiten Gruppe wurden zur Kontrolle anstelle des anti-CD4-mAK mit einem irrelevanten Ratten-Immunglobulin (rat-Ig) behandelt. Derartig behandelte Tiere wurden auf die Anzahl der CD4⁺ T-Zellen im peripheren Blut mittels FACS-Analyse kontrolliert. Bis etwa Tag 7 waren in den anti-CD4-behandelten Mäusen keine CD4⁺ T-Zellen nachweisbar. Neben den Wirkungen auf die humorale und zelluläre CII-spezifische Immunantwort wurde untersucht, inwieweit die Elimination der CD4⁺ T-Zellen die Symptome einer CIA bei TCR- β tg-Mäusen beeinflußt.

4.1.1 Depletion von CD4⁺ T-Zellen in TCR- β tg-Mäusen verzögert die Entstehung einer Arthritis und führt zu einem abgeschwächten Krankheitsverlauf

Die in Abb. 28 dargestellten Daten zeigen, daß 13 Tage nach der Immunisierung 50% der TCR- β tg-Tiere der Kontrollgruppe (CII/CFA + rat-Ig) eine Arthritis entwickelten, während keines der mit anti-CD4-mAK behandelten Tiere arthritische Symptome zeigte. An Tag 18 erkrankten in der Kontrollgruppe alle Tiere an z.T. schwerer Arthritis. In der anti-CD4-behandelten Gruppe wies noch immer keines der Tiere Symptome einer Arthritis auf. Allerdings entwickelte sich auch in dieser Gruppe

die Krankheit zu einem späteren Zeitpunkt, was mit dem Wiedererscheinen der CD4⁺ T-Zellen im Blut korrelierte.

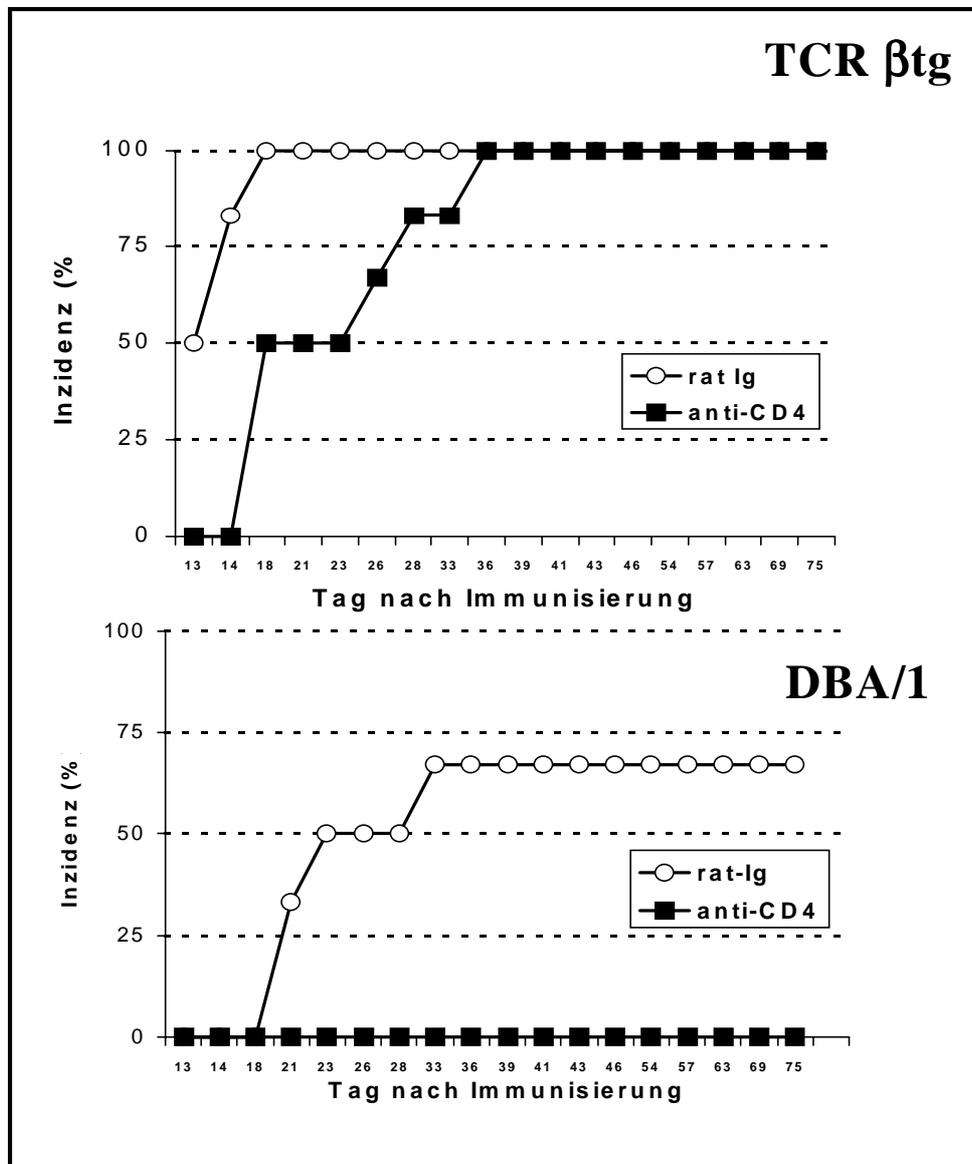


Abb. 28: Auswirkung einer Depletion von CD4⁺ T-Zellen auf die Entwicklung einer CIA bei TCR- β tg- und DBA/1-Mäusen. Männliche TCR- β tg- und DBA/1-Mäuse wurden mit CII in CFA i.d. immunisiert und in je zwei Gruppen aufgeteilt. Den Tieren der ersten Gruppe (■) wurde im Anschluß an die Immunisierung eine Injektion eines monoklonalen anti-CD4-Antikörper (300 μ g pro Maus) i.p. verabreicht. Tiere der zweiten Gruppe (Kontrollgruppe) (○) wurden nach dem gleichen Schema behandelt, erhielten jedoch ein irrelevantes Ratten-Immunglobulin (rat Ig). Nach 3 Wochen erhielten DBA/1-Mäuse eine zusätzliche i.p. Injektion von CII in PBS. Die Entwicklung klinischer Zeichen einer Arthritis wurde bis Tag 75 nach Immunisierung verfolgt. Dargestellt ist die CIA-Inzidenz als Verhältnis kranker Mäuse zur Gesamtzahl der Mäuse einer Gruppe (in Prozent).

Eine Behandlung mit anti-CD4-Antikörpern verhinderte in DBA/1-Mäusen vollständig die Entwicklung einer CIA. Im Gegensatz dazu wurde die Krankheitsentwicklung in TCR- β tg-Mäusen durch diese Behandlung nur um etwa eine Woche verzögert.

Im Gegensatz dazu blieb in DBA/1-Mäusen die Krankheitsentwicklung durch die anti-CD4-Behandlung dauerhaft unterdrückt (Abb. 28). Dieser Unterschied könnte auf die niedrigere Frequenz pathogener T-Zellen in den normalen Mäusen, verglichen mit den TCR- β tg-Mäusen, zurückzuführen sein. Insgesamt sprechen diese Befunde für eine entscheidende Bedeutung von T-Helferzellen.

4.1.2 Die humorale CII-spezifische Immunantwort wird durch die Depletion von CD4⁺ T-Zellen nur in DBA/1-, nicht aber in TCR- β tg-Mäusen, vollständig gehemmt

Um mögliche Veränderungen der humoralen CII-spezifischen Immunantwort nach einer anti-CD4-Behandlung feststellen zu können, wurden den Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten Blutproben entnommen und diese auf CII-spezifische Antikörper mit Hilfe eines ELISA untersucht. Die in Abb. 29 dargestellten Ergebnisse zeigen, daß sowohl DBA/1- als auch TCR- β tg-Mäuse, die mit anti-CD4-mAK behandelt wurden, im Vergleich zu Kontrolltieren (rat-Ig) eine starke Suppression der CII-spezifischen Antikörper-Produktion aufwiesen. Diese Verminderung wurde bei allen Immunglobulinsubklassen beobachtet.

Allerdings läßt sich nur in DBA/1-, nicht aber in TCR- β tg-Mäusen, die humorale CII-spezifische Immunantwort durch eine anti-CD4-Behandlung vollständig hemmen. So ist beispielsweise an Tag 14 nach dieser Behandlung der CII-spezifische Gesamtantikörpertiter bei DBA/1-Mäusen um das 700-fache reduziert, im Vergleich zur 3-fachen Verminderung bei den TCR- β tg-Tieren. Es muß betont werden, daß in den anti-CD4-behandelten Tieren die Zahl der CD4⁺ T-Zellen im peripheren Blut, laut FACS-Untersuchungen, an Tag 14 schon wieder auf 30% des Normalwertes angestiegen war. Da die TCR- β tg- im Vergleich zu DBA/1-Mäusen vermutlich eine erhöhte Frequenz von CII-spezifischen T-Zellen besitzen, kann man erwarten, daß die humorale Immunantwort gegen CII direkt nach dem Wiedererscheinen der CD4⁺ T-Zellen im Blut dieser Mäuse auch stärker als in DBA/1-Mäusen gefördert werden kann. Da sich in DBA/1-Mäusen die Bildung von CII-spezifischen Antikörpern, welche eine entscheidende Bedeutung in der Pathogenese der CIA haben, drastisch hemmen ließ, blieb die Arthritis durch die Eliminierung der CD4⁺ T-Zellen in diesen Mäusen dauerhaft unterdrückt. Im Gegensatz dazu wurde die Krankheitsentwicklung in TCR- β tg-Mäusen durch diese Behandlung nur um eine Woche verzögert, was mit einer

ausgeprägten humoralen Reaktion gegen CII korrelierte. Es wird deshalb angenommen, daß die vermutlich höhere Frequenz arthritogener T-Lymphocyten in TCR- β tg-Mäusen den kurativen Effekt der anti-CD4-Behandlung durchbricht.

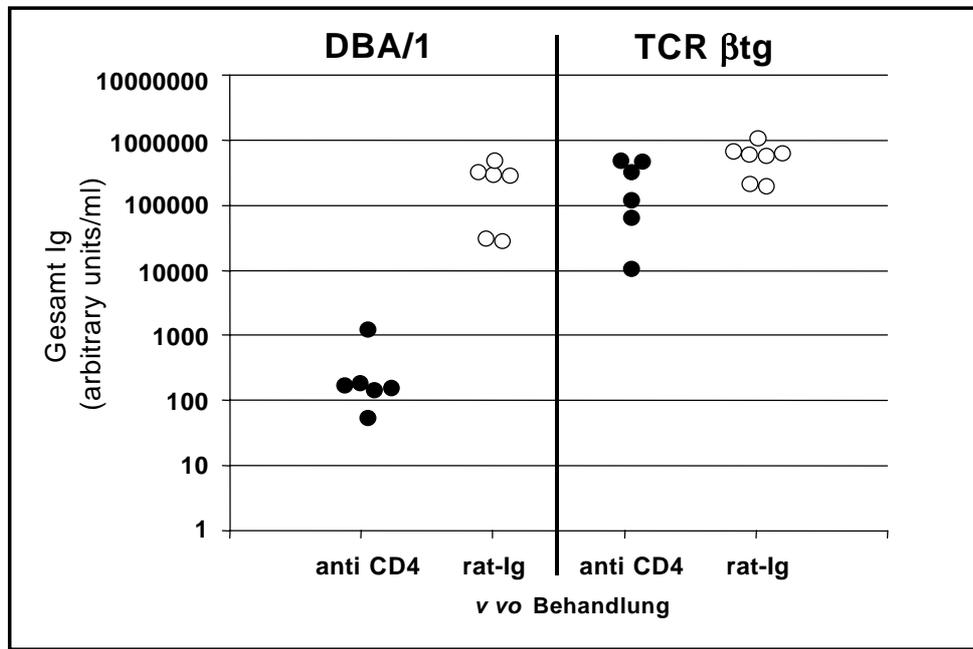


Abb. 29: Auswirkung einer Depletion von CD4⁺ T-Zellen auf die humorale Immunantwort gegen CII bei TCR- β tg- und DBA/1-Mäusen. Männliche TCR- β tg- und DBA/1-Mäuse wurden mit CII in CFA i.d. immunisiert und in je zwei Gruppen aufgeteilt. Den Tieren der ersten Gruppe (●) wurde im Anschluß an die Immunisierung eine Injektion eines monoklonalen anti-CD4-Antikörpers (300 μ g pro Maus) i.p. verabreicht. Tiere der zweiten Gruppe (Kontrollgruppe) (○) wurden nach dem gleichen Schema behandelt, erhielten jedoch ein irrelevantes Ratten-Immunglobulin (rat Ig). An Tag 14 nach Immunisierung wurden die Tiere geblutet, Serum gewonnen und die Titer CII-spezifischer Antikörper mittels ELISA bestimmt. Gezeigt sind die Werte für Gesamtimmunglobulin der Einzeltiere der verschiedenen Gruppen. Die Werte sind in arbitrary U/ml angegeben.

Eine Behandlung mit anti-CD4-Antikörpern hemmte in DBA/1-Mäusen vollständig die humorale Immunantwort gegen CII. Im Gegensatz dazu wurde die Bildung von CII-spezifischen Antikörper in TCR- β tg-Mäusen durch diese Behandlung nur leicht vermindert.

4.1.3 Hinweise auf eine T_H2-Umwandlung von CD4⁺ T-Zellen nach der Behandlung mit depletierendem anti-CD4-Antikörper bei DBA/1-Mäusen

Da die T_H1-Zellen entscheidend an der Entstehung einer Arthritis beteiligt zu sein scheinen, wäre es möglich, daß der kurative Effekt der anti-CD4-Behandlung in DBA/1-Mäusen auf einer bevorzugten Entwicklung einer die Arthritis unterdrückenden T_H2-Reaktion anstelle einer arthritogener T_H1-Reaktion zurückzuführen ist. Um dies zu

prüfen, wurden aus den Milzen bzw. Lymphknoten von DBA/1-Mäusen isolierte CD4⁺ T-Zellen *ex vivo* antigenspezifisch durch CII bzw. polyklonal durch anti-CD3-mAK stimuliert und die Produktion verschiedener Cytokine gemessen. Die IFN- γ -Produktion diente in diesem Zusammenhang als ein Marker für T_H1-Zellen, IL-4 und IL-5 dagegen für T_H2-Zellen. Die Ergebnisse zeigten deutlich, daß polyklonal aktivierte CD4⁺ T-Zellen von anti-CD4-behandelten Mäusen wesentlich mehr IL-4 und IL-5 produzierten (Abb. 30) als die der Kontrollgruppe (rat-Ig).

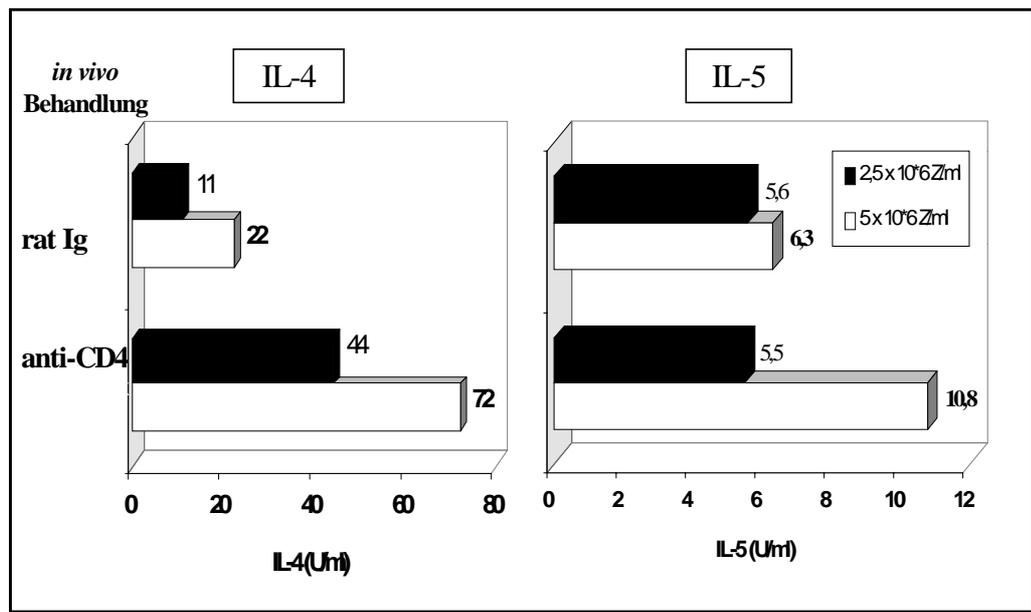


Abb. 30: Auswirkung einer Behandlung mit depletierendem anti-CD4-Antikörper auf die zelluläre Immunantwort bei DBA/1-Mäusen. Männliche DBA/1-Mäuse wurden mit CII in CFA i.d. immunisiert und in zwei Gruppen aufgeteilt. Den Tieren der ersten Gruppe wurde im Anschluß an die Immunisierung eine Injektion eines monoklonalen anti-CD4-Antikörper (300 µg pro Maus) i.p. verabreicht. Tiere der zweiten Gruppe (Kontrollgruppe) wurden nach dem gleichen Schema behandelt, erhielten jedoch ein irrelevantes Ratten-Immunglobulin (rat Ig). An Tag 21 nach der Immunisierung wurden jeweils drei Tiere pro Gruppe getötet und die Milzen präpariert. Einzelzellsuspensionen (2,5 x 10⁶ Zellen/ml) (■) und (5 x 10⁶ Zellen/ml) (□) wurden *ex vivo* mit immobilisierten monoklonalen anti-CD3-Antikörpern (10 µg/ml) polyklonal stimuliert. In den nach 48 Stunden entnommenen Überständen wurde anschließend der Gehalt an IL-4 und IL-5 mittels ELISA bestimmt. Die Werte sind in U/ml angegeben.

Eine Behandlung mit anti-CD4-Antikörpern führte in DBA/1-Mäusen zu einer verstärkten Bildung von T_H2-Cytokinen (IL-4 und IL-5) durch polyklonal aktivierten Milzzellen dieser Tiere.

Allerdings muß betont werden, daß keine antigenspezifische Produktion von IL-4 oder IL-5 nachgewiesen werden konnte. Unerwarteterweise führte die anti-CD4-Behandlung aber auch zu einer Steigerung der IFN- γ -Produktion der polyklonal aktivierten CD4⁺ T-Zellen. Aufgrund dieser Ergebnisse kann angenommen werden, daß

durch eine anti-CD4-Behandlung in DBA/1-Mäusen eine Mischantwort (sowohl T_H2 als auch T_H1) der T-Zellen gefördert wird, welche die Entstehung einer Arthritis verhindert.

4.2 Eine Hemmung der Migration von aktivierten T-Zellen in periphere Gewebe während der CIA-Induktion in TCR- β g-Mäusen blockiert die Entstehung einer Arthritis

Um die Entstehung einer CIA zu inhibieren, wurde in einer weiteren Reihe von Experimenten versucht, die Migration verschiedener Leukocyten in periphere Gewebe zu inhibieren. Zu diesem Zweck wurde ein anti-CD44* -Antikörper eingesetzt, der an aktivierte T-Zellen bindet und deren Einwanderung u.a. in die Gelenke blockiert.

4.2.1 Behandlung von TCR- β g-Mäusen mit anti-CD44-mAK supprimiert die Entstehung einer Arthritis

Um den Einfluß einer anti-CD44-Behandlung auf die Entwicklung einer CIA zu testen, wurden TCR- β g-Mäuse mit CII in CFA immunisiert und in zwei Gruppen unterteilt. Tiere der ersten Gruppe erhielten nach einer Woche (ab Tag 7) täglich eine i.p. Injektion von anti-CD44-Antikörper (100 μ g/Maus pro Injektion). An Tag 18 erfolgte die letzte Gabe. Zur Kontrolle wurden die Tiere der zweiten Gruppe mit einem irrelevanten Ratten-Antikörper behandelt. Die in Abb. 31 dargestellten Ergebnisse zeigen, daß die Entwicklung einer CIA während der anti-CD44-Behandlung (Tag 12-18) vollständig blockiert war. Allerdings traten innerhalb weniger Tage nach dem Ende der Behandlung schwere Arthritissymptome bei allen Tieren dieser Gruppe auf. Dieses Ergebnis weist darauf hin, daß an der Induktion einer CIA offensichtlich T-Lymphocyten beteiligt sind und diese an den Ort der Entzündungsreaktion wandern müssen.

* CD44 = bindet Hyaluronsäure und vermittelt die Adhäsion und das *homing* der Lymphocyten in Gewebe

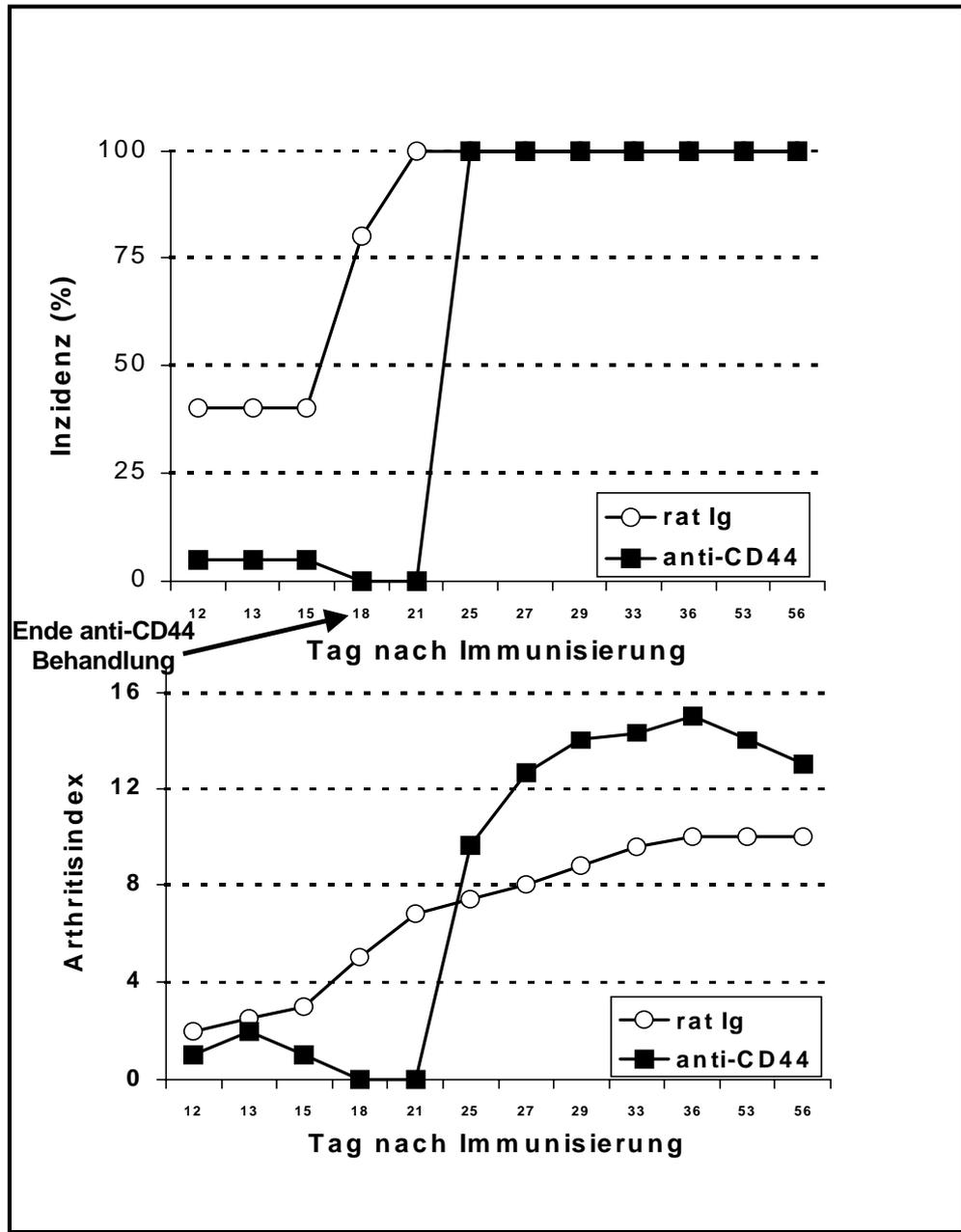


Abb. 31: Auswirkung einer Behandlung mit anti-CD44-Antikörpern auf die Entwicklung einer CIA bei TCR-βtg-Mäusen. Männliche und weibliche TCR-βtg-Mäuse wurden mit CII in CFA i.d. immunisiert und in zwei Gruppen aufgeteilt. Den Tieren der ersten Gruppe (■) wurde ab Tag 7 bis Tag 18 nach der Immunisierung täglich eine Injektion von anti-CD44-Antikörper (100 µg pro Maus) i.p. verabreicht. Tiere der zweiten Gruppe (Kontrollgruppe) (○) wurden nach dem gleichen Schema behandelt, erhielten jedoch ein irrelevantes Ratten-Immunoglobulin (rat Ig). Die Entwicklung klinischer Zeichen einer Arthritis wurde bis Tag 56 nach Immunisierung verfolgt. Dargestellt ist die CIA-Inzidenz als Verhältnis kranker Mäuse zur Gesamtzahl der Mäuse einer Gruppe (in Prozent). Darüber hinaus ist die Ausprägung einer Arthritis als mittlerer Arthritisindex (s. II.3.4) angegeben.

Eine Behandlung mit anti-CD44-Antikörpern in TCR-βtg-Mäusen supprimierte die Entwicklung einer CIA. Allerdings war der kurative Effekt dieser Behandlung auf die Dauer der Medikation beschränkt.

4.2.2 Behandlung von TCR- β tg-Mäusen mit anti-CD44-mAK zeigt keine Auswirkung auf die humorale CII-spezifische Immunantwort

Zur Charakterisierung der CII-spezifischen humoralen Immunantwort wurden von anti-CD44-behandelten Mäusen Blutproben entnommen und auf den Gehalt an CII-spezifischen Antikörpern untersucht. Die in Abb. 32 dargestellten Daten zeigen, daß die anti-CD44-Behandlung in TCR- β tg-Mäusen keinen Einfluß auf die Bildung CII-spezifischer Antikörper verschiedener Klassen und speziell der Subklassen IgG_{2a} und IgG₁ hatte.

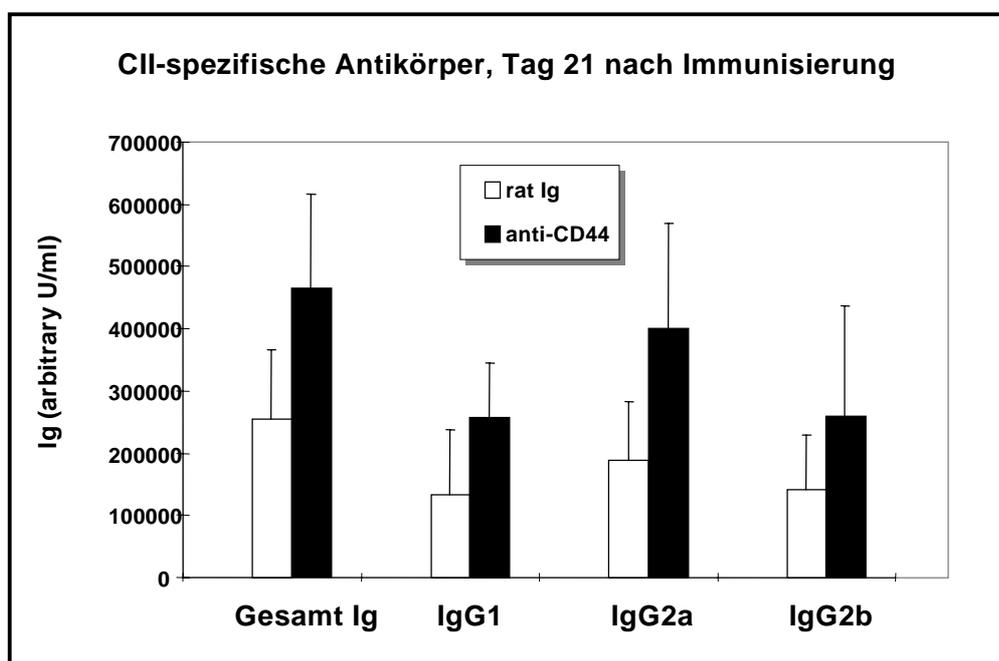


Abb. 32: Auswirkung einer Behandlung mit anti-CD44-Antikörpern auf die humorale Immunantwort gegen CII bei TCR- β tg-Mäusen. Männliche und weibliche TCR- β tg-Mäuse wurden mit CII in CFA i.d. immunisiert und in zwei Gruppen aufgeteilt. Den Tieren der ersten Gruppe (■) wurde ab Tag 7 bis Tag 18 nach der Immunisierung täglich eine Injektion von anti-CD44-Antikörper (100 μ g pro Maus) i.p. verabreicht. Tiere der zweiten Gruppe (Kontrollgruppe) (□) wurden nach dem gleichen Schema behandelt, erhielten jedoch ein irrelevantes Ratten-Immunglobulin (rat Ig). An Tag 21 nach Immunisierung wurden die Tiere geblutet, Serum gewonnen und die Titer CII-spezifischer Antikörper einschließlich der IgG₁-, IgG_{2a}- und IgG_{2b}-Subklassen mittels ELISA bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der verschiedenen IgG-Subklassen der Tiere der einzelnen Versuchsgruppe. Die Werte sind in arbitrary U/ml angegeben.

Eine Behandlung mit anti-CD44-Antikörpern in TCR- β tg-Mäusen hatte keinen inhibitorischen Einfluß auf die Bildung CII-spezifischer Antikörper.

Darüber hinaus wurden keine signifikanten Unterschiede bei der zellulären Immunreaktion auf CII zwischen anti-CD44-behandelten und Kontrolltieren beobachtet. Dies erlaubt den Schluß, daß die Inhibition der Migration von aktivierten T-Zellen in periphere Gewebe keine signifikante Auswirkung auf die humorale und zelluläre Immunantwort gegen CII hat.

4.3 Versuche zur kombinierten Arthritistherapie durch Dexamethason und diverse immunomodulatorische Agenzien

In einer weiteren Reihe von Experimenten sollte versucht werden, in TCR- β tg-Mäusen eine etablierte CIA zu therapieren, d.h. die Mäusen sollten erst dann behandelt werden, wenn sie schon CIA-Symptome aufwiesen. Da schon die Induktion einer CIA durch singuläre Maßnahmen (IL-12(p40)₂ oder anti-CD4) nicht zu inhibieren war, sollten die therapeutischen Maßnahmen in einer Kombination verschiedener Behandlungsmethoden bestehen. Vorrangiges Ziel war die schnelle Suppression der schon etablierten Entzündungsreaktion durch eine Glukokortikoid-Behandlung. Anschließend sollte versucht werden, durch weitere immunomodulatorische Maßnahmen (anti-CD4, anti-IFN- γ , IL-12(p40)₂) die wiederaufflammenden CIA-Symptome auf möglichst niedrigem Niveau zu stabilisieren oder sogar die Tiere symptomfrei zu halten.

4.3.1 Dexamethason-Behandlung einer etablierten Arthritis bei TCR- β tg-Mäusen führt zu einer effizienten Unterdrückung der Krankheitssymptome

Es ist bekannt, daß Glukokortikoide die Phagocytose hemmen, zum Absterben der Lymphocyten in Lymphknoten führen, die Kapillardurchlässigkeit vermindern und die Invasion antigenspezifischer Zellen in periphere Gewebe abschwächen (192;193). Darüber hinaus hemmen sie die Produktion verschiedener Cytokine, wie z.B. IL-1, IL-2, MAF (*macrophage activating factor*), MIF (*migration inhibitory factor*), welche für die klonale Expansion von B- und T-Lymphocyten und die Aktivierung von Makrophagen essentiell sind (194;195). Dadurch wird die allgemeine Reaktionsfähigkeit des Immunsystems auf verschiedenen Ebenen gehemmt. Aus diesen Gründen wurde versucht, die an CIA-erkrankten Mäuse mit dem Glukokortikoid Dexamethason (Dex) zu behandeln, um die unerwünschte Immunreaktion zu mindern. Hierzu wurden TCR- β tg-Mäuse mit CII/CFA immunisiert und erst nach dem Auftreten klinischer Symptome

in zwei Gruppen unterteilt. Tiere der ersten Gruppe erhielten täglich eine Injektion von Dexamethason (i.p. 100 µg/Maus), Tiere der zweiten Gruppe wurden zur Kontrolle mit PBS behandelt. Die in Abb. 33 dargestellten Daten zeigen, daß Dexamethason schon nach drei Injektionen die klinischen Symptome einer CIA vollständig unterdrücken konnte, während alle Tiere der Kontrollgruppe schwere Arthritis Symptome aufwiesen. Allerdings entwickelten alle Tiere der Dex-behandelten Gruppe schon 3 Tage nach dem Absetzen der Behandlung (Tag 21) wieder Symptome einer Arthritis.

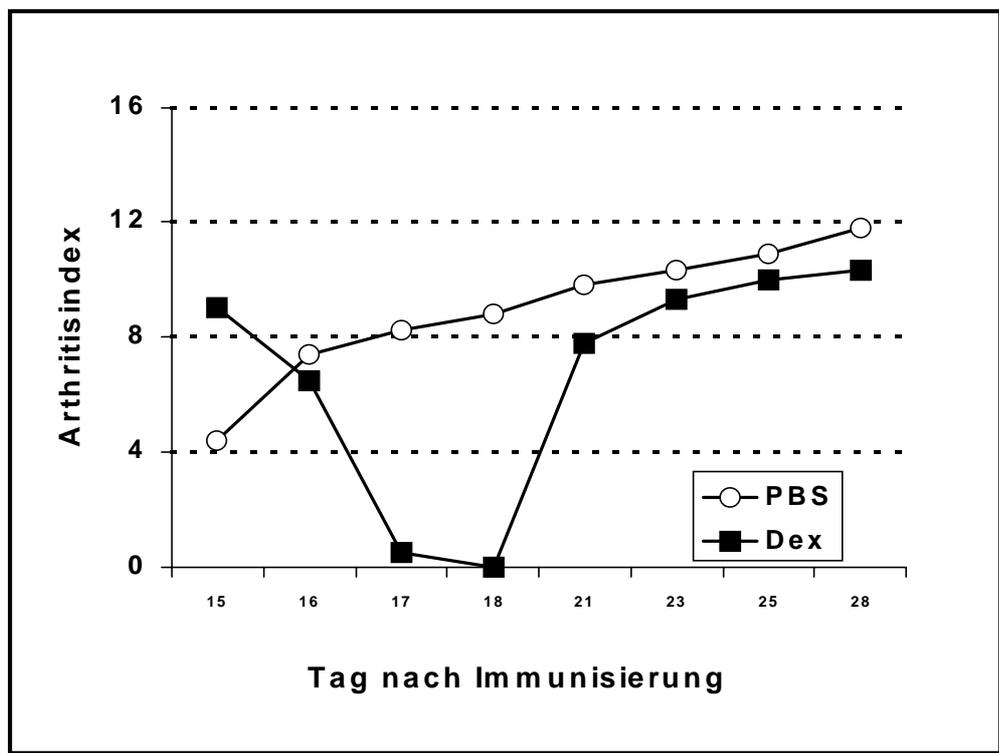


Abb. 33: Auswirkung einer Behandlung mit Dexamethason auf eine etablierte Arthritis bei TCR-βtg-Mäusen. Männliche und weibliche TCR-βtg-Mäuse wurden mit CII in CFA i.d. immunisiert und an Tag 15 nach dem Auftreten klinischer Symptome einer CIA in zwei Gruppen unterteilt. Den Tieren der ersten Gruppe (■) wurde täglich bis Tag 18 eine Injektion von Dexamethason (100 µg pro Maus) i.p. verabreicht. Tiere der zweiten Gruppe (Kontrollgruppe) (○) wurden nach dem gleichen Schema behandelt, erhielten jedoch PBS. Die Entwicklung klinischer Symptome einer Arthritis wurde bis Tag 28 nach Immunisierung verfolgt. Dargestellt ist die Ausprägung einer Arthritis als mittlerer Arthritisindex (s. II.3.4).

Eine Behandlung mit Dexamethason konnte eine etablierte Arthritis bei TCR-βtg-Mäusen effizient supprimieren. Allerdings war der kurative Effekt dieser Behandlung auf die Dauer der Medikation beschränkt.

Da die Wirkung der Glukokortikoide bei zellulären Immunreaktionen nicht primär auf einer Beeinflussung dieser Immunprozesse beruht, sondern weitgehend auf der

Hemmung der durch die Immunreaktion verursachten entzündlichen Prozesse, ist der kurative Effekt der Dexamethason-Behandlung auf die Dauer der Medikation beschränkt.

Neben den Wirkungen auf die klinische Entwicklung einer CIA wurde untersucht, inwieweit eine Dexamethason-Behandlung die humorale und zelluläre CII-spezifische Immunantwort beeinflusst. Es zeigte sich, daß Dexamethason die Proliferation der CII-spezifischen T-Zellen hemmt. Darüber hinaus reduziert es die Gammaglobulin-Synthese und unterdrückt die humorale Immunantwort gegen CII.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Dexamethason-Behandlung durch ihre immunsuppressive Wirkung zur schwächeren Ausprägung der Arthritissymptome führt, dies allerdings auf die Dauer der Behandlung beschränkt ist. Nach diesen Voruntersuchungen erschien es für eine Therapie einer etablierten Arthritis sinnvoll, die Entzündungsreaktion mit Hilfe von Dexamethason zu unterdrücken und zusätzlich verschiedene immunmodulatorische Agenzien einzusetzen.

4.3.2 Behandlung mit einer Kombination von Dexamethason mit anti-CD4-Antikörper zeigt keine verstärkte Supprimierung einer etablierten Arthritis

Wie oben erwähnt, scheinen die T_H1 -Zellen an der Entstehung und Aufrechterhaltung einer CIA entscheidend beteiligt zu sein. In diesem Zusammenhang wäre es zur Therapie dieser Krankheit wünschenswert, die bereits ausdifferenzierten autoantigenspezifischen T_H1 -Zellen zu eliminieren. Zu diesem Zweck wurden erkrankte TCR- β tg-Mäuse durch die Dexamethason-Behandlung transient von den CIA-Symptomen befreit (wie in III.4.3.1 beschrieben). Während der letzten Dex-Injektion (Tag 18) wurden die Tiere einer Gruppe mit einem depletierenden anti-CD4-Antikörper behandelt (300 μ g/Maus), um die bereits ausdifferenzierten CII-spezifischen T_H1 -Zellen zu eliminieren. Tiere der zweiten Gruppe wurden zur Kontrolle anstelle des anti-CD4-mAK mit einem irrelevanten Ratten-Immunglobulin (rat-Ig) behandelt. Die in Abb. 34 dargestellten Daten zeigen, daß schon 3 Tage nach Absetzen der Behandlung alle Tiere der Kontroll-Gruppe (Dex + rat-Ig) schwere Symptome einer Arthritis zeigten, während Tiere, die zusätzlich mit dem anti-CD4-mAK behandelt wurden, schwächere Arthritissymptome aufwiesen. Allerdings waren die Unterschiede hinsichtlich der Arthritis schwere nicht signifikant.

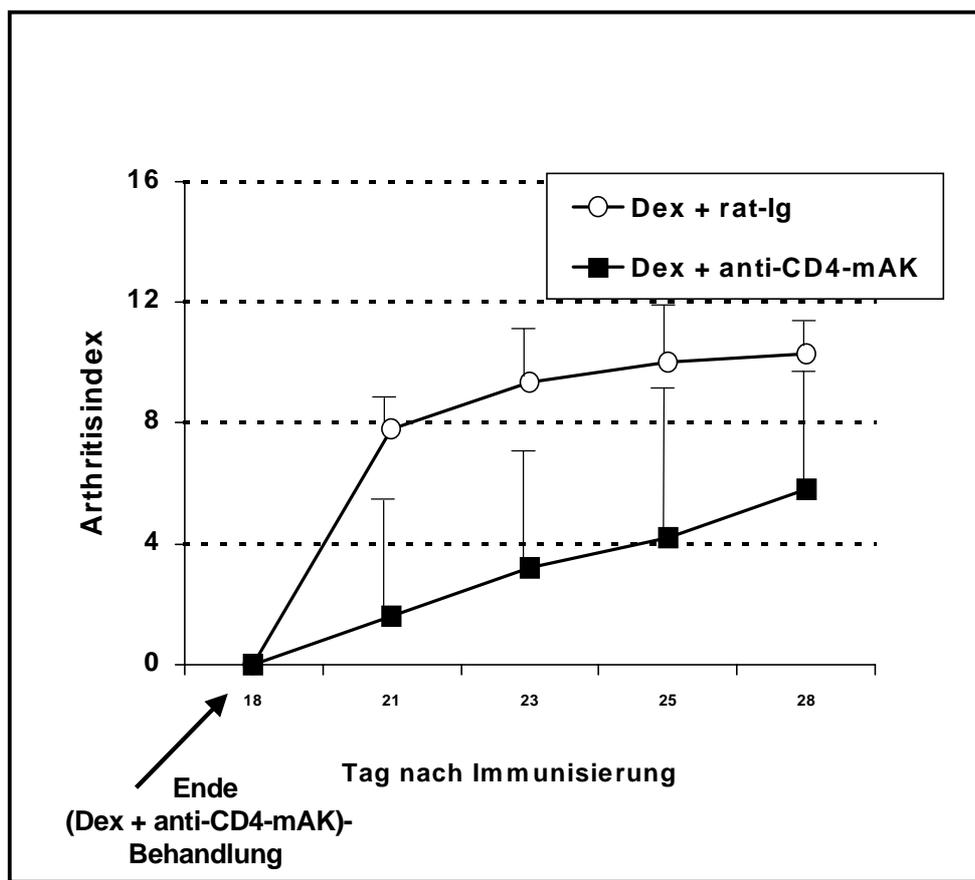


Abb. 34: Auswirkung einer kombinierten Behandlung mit Dexamethason und depletierendem anti-CD4-Antikörper auf eine etablierte Arthritis bei TCR- β tg-Mäusen. Männliche und weibliche TCR- β tg-Mäuse wurden mit CII in CFA i.d. immunisiert und an Tag 15 nach dem Auftreten klinischer Symptome in zwei Gruppen unterteilt. Den Tieren der ersten Gruppe (■) wurde täglich eine Injektion von Dexamethason (100 μ g pro Maus) i.p. verabreicht. Darüber hinaus erhielten sie im Anschluß an die letzte Gabe von Dexamethason (Tag 18) eine i.p. Injektion eines monoklonalen anti-CD4-Antikörpers (300 μ g pro Maus). Tiere der zweiten Gruppe (Kontrollgruppe) (○) wurden nach dem gleichen Schema mit Dexamethason behandelt, erhielten jedoch anstelle des anti-CD4-Antikörpers ein irrelevantes Ratten-Immunglobulin (rat Ig). Die Entwicklung klinischer Zeichen einer Arthritis wurde bis Tag 28 nach der Immunisierung verfolgt. Dargestellt ist die Ausprägung einer Arthritis als mittlerer Arthritisindex (s. II.3.4).

Eine Kombination der Dexamethason-Behandlung mit der Gabe von anti-CD4-Antikörper konnte eine etablierte Arthritis bei TCR- β tg-Mäusen nicht dauerhaft supprimieren.

Somit erbrachte die Kombination der Dexamethason-Behandlung mit der Gabe von anti-CD4-Antikörper keine dauerhafte Supprimierung einer etablierten Arthritis. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, daß der supprimierende Effekt von Dexamethason auf die Bildung der für T_H1 -Differenzierung verantwortlichen Cytokine, wie z.B. IL-12 und IFN- γ , direkt nach Absetzen der Behandlung aufgehoben wird. Dies kann letztendlich zu einer erneuten T_H1 -Entwicklung von neu entstehenden CII-spezifischen T-Zellen

führen, die für das Wiederaufflammen der Krankheit verantwortlich sind. Deshalb wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit versucht, eine Therapie zu entwickeln, welche die bereits ausdifferenzierten autoantigenspezifischen T_H1-Zellen eliminiert und eine weitere Differenzierung von T_H1-Zellen wirkungsvoll verhindert und somit möglicherweise eine bereits etablierte Arthritis heilen könnte. Zu diesem Zweck wurde die Dexamethason- und anti-CD4-Behandlung mit einer anti-IFN- γ - und/oder einer IL-12(p40)₂-Behandlung kombiniert.

4.3.3 Kombination einer Dexamethason- und einer anti-CD4-Behandlung und gleichzeitige Neutralisation von IL-12 und IFN- γ führt zu einer dauerhaften Stabilisierung der Symptome auf niedrigem Niveau

In dieser Reihe von Experimenten wurden TCR- β tg-Mäuse mit CII/CFA immunisiert und nach dem Auftreten klinischer Symptome mit Dexamethason täglich eine Woche lang behandelt (i.p. 100 μ g/Maus). Am folgenden Tag erhielten Tiere der Versuchsgruppe eine i.p. Injektion von anti-CD4-Antikörper, Tiere der Kontrollgruppe wurden anstelle des anti-CD4-mAK mit rat-Ig behandelt. Am nächsten Tag wurden die Tiere der Versuchsgruppe in drei weitere Gruppen unterteilt. Tiere der ersten Versuchsgruppe erhielten über einen Zeitraum von 8 Tagen jeden 2. Tag eine intraperitoneale Injektion von IL-12(p40)₂ (40 μ g/Injektion). Tiere der zweiten Versuchsgruppe wurden nach dem gleichen Schema behandelt, erhielten jedoch anti-IFN- γ -Antikörper (500 μ g/Maus) anstelle des IL-12(p40)₂. Tiere der dritten Versuchsgruppe wurden sowohl mit IL-12(p40)₂ als auch mit dem anti-IFN- γ -Antikörper behandelt. Es zeigte sich, daß die Kombination von Dexamethason- und anti-CD4-Behandlung mit den einzelnen Agenzien zu keiner dauerhaften Verbesserung des Krankheitsbildes führte. Die in Abb. 35 dargestellten Daten zeigen, daß Dexamethason und eine Depletion der CD4⁺ T-Lymphocyten zusammen mit einer gleichzeitigen Neutralisation von IL-12 und IFN- γ , auch nach Absetzen der Behandlung eine dauerhafte Stabilisierung der Symptome auf relativ niedrigem Niveau beobachtet werden konnte.

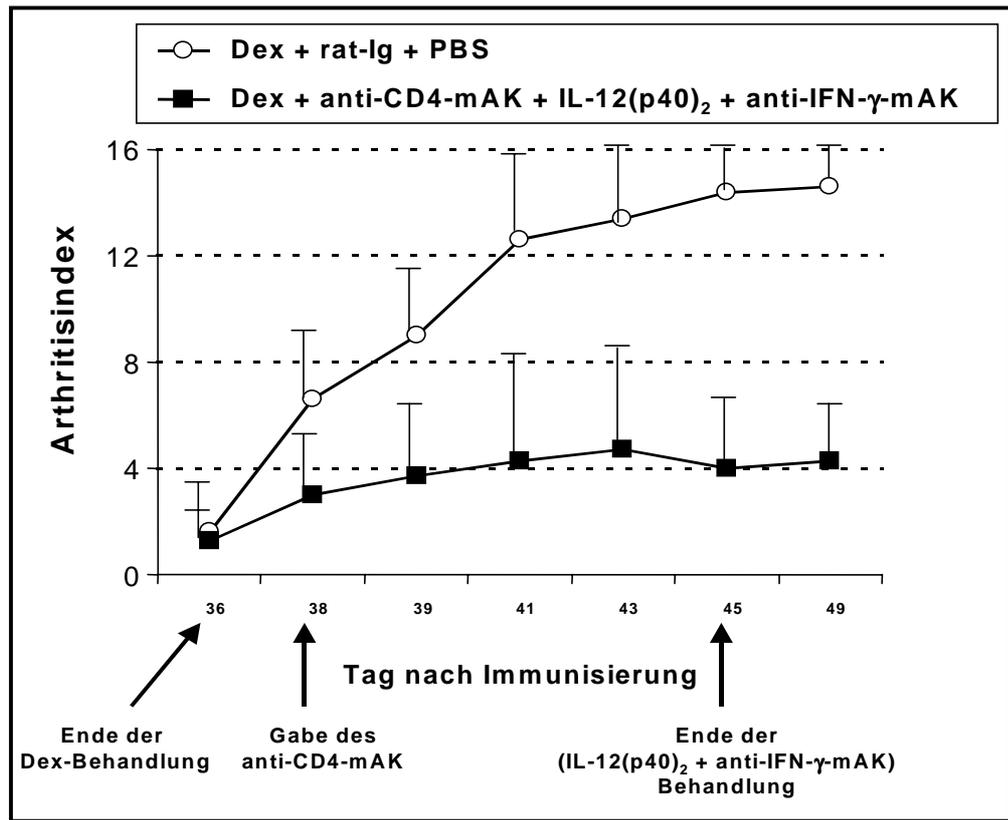


Abb. 35: Auswirkung einer Kombination von einer Dexamethason- und anti-CD4-Behandlung mit gleichzeitiger Neutralisation von IL-12 und IFN- γ auf eine etablierte Arthritis bei TCR- β tg-Mäusen. Männliche und weibliche TCR- β tg-Mäuse wurden mit CII in CFA i.d. immunisiert und an Tag 28 nach dem Auftreten klinischer Symptome einer CIA mit Dexamethason (100 μ g pro Maus) täglich eine Woche lang i.p. behandelt. Den Tieren der ersten Gruppe (Versuchsgruppe) (■) wurde am Tag nach der letzten Gabe von Dexamethason (Tag 38) eine i.p. Injektion eines monoklonalen anti-CD4-Antikörpers (300 μ g pro Maus) verabreicht. Ab dem nächsten Tag (Tag 39) erhielten die Tiere dieser Gruppe über einen Zeitraum von 8 Tagen jeden zweiten Tag eine i.p. Injektion IL-12(p40)₂ (40 μ g pro Maus) und anti-IFN- γ -Antikörper (500 μ g pro Maus). Die letzte Injektion erfolgte an Tag 45. Tiere der zweiten Gruppe (Kontrollgruppe) (○) wurden nach dem gleichen Schema mit Dexamethason behandelt, erhielten jedoch anstelle des anti-CD4-Antikörpers ein irrelevantes Ratten-Immunoglobulin (rat Ig), und PBS anstelle des IL-12(p40)₂ und des anti-IFN- γ -Antikörpers. Die Entwicklung klinischer Zeichen einer Arthritis wurde bis Tag 49 nach Immunisierung verfolgt. Dargestellt ist die Ausprägung einer Arthritis als mittlerer Arthritisindex (s. II.3.4).

Eine Kombination von einer Dexamethason- und anti-CD4-Behandlung mit gleichzeitiger Neutralisation von IL-12 und IFN- γ blockierte die weitere Entwicklung einer etablierten Arthritis bei TCR- β tg-Mäusen.

Die Induktion einer CIA beruht also auf einer ganzen Reihe von Faktoren, was letztendlich dazu führt, daß eine erfolgreiche Therapie dieser Krankheit wahrscheinlich nicht durch Einzelmaßnahmen, sondern nur durch eine Kombination verschiedener Behandlungsmethoden möglich sein wird.

IV. DISKUSSION

1. DIE BEDEUTUNG VON CD4⁺ T-ZELLEN FÜR DIE ENTSTEHUNG EINER KOLLAGEN-TYP-II-INDUZIERTEN ARTHRITIS (CIA)

Die Immunisierung von Mäusen mit Kollagen-Typ-II (CII) führt zu Gelenkentzündungen, die in ihrem Verlauf der Rheumatoiden Arthritis (RA) beim Menschen ähnlich sind (112;115). Die Ätiologie und Pathogenese dieser Erkrankung konnten bisher nur teilweise aufgeklärt werden. Es gilt jedoch als gesichert, daß autoreaktive CD4⁺ T-Zellen eine zentrale Rolle bei der Induktion dieser Krankheit spielen (143;196). Der Befund, daß die Synovialmembran der betroffenen Gelenke mit CII-spezifischen CD4⁺ T-Zellen infiltriert ist (197), unterstützt diese Annahme. Obwohl es sich als schwierig erwiesen hat, CII-spezifische T-Zellen *ex vivo* klonal zu expandieren, ist es trotzdem in Einzelfällen gelungen, autoreaktive T-Zelllinien zu etablieren und durch adoptiven Transfer dieser Zellen eine schwach ausgeprägte, transiente Arthritis zu induzieren (126;142;144;196). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß der Transfer CII-spezifischer CD4⁺ T-Zellen (nicht jedoch von CD8⁺ Zellen) für die Induktion einer Arthritis in SCID^{*}-Mäusen essentiell ist (146). Weiterhin ergaben Studien mit sublethal bestrahlten und mit athymischen Nacktmäusen, daß zelluläre Immunreaktionen an der Entstehung einer Arthritis beteiligt sind (198;199). Der vor kurzem publizierte Befund, daß $\alpha\beta$ -T-Zell-defiziente Mäuse, die aufgrund genetischer Manipulationen keine TCR- $\alpha\beta$ -positiven T-Zellen generieren können, keine CIA entwickeln (187), unterstreicht die wichtige Rolle von CD4⁺ T-Zellen für die Pathogenese dieser Krankheit. Basierend auf den Ergebnissen früherer Studien (189;200) und den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten mit anti-CD4-Antikörpern zur Ausschaltung der CD4⁺ T-Lymphocyten (s. III.4.1) konnte gezeigt werden, daß diesen Zellen eine zentrale Bedeutung bei der Pathogenese der CIA zukommt (186).

Die wichtige Funktion von CD4⁺ T-Zellen spiegelt sich auch in der MHC-Klasse-II-Abhängigkeit wider. Am Beispiel der CIA konnte die Gruppe von R. Holmdahl (201) nachweisen, daß bestimmte MHC-Klasse-II-Moleküle für die Suszeptibilität oder Resistenz gegenüber dieser Autoimmunkrankheit entscheidend sind (202;203). Die maßgeblichen I-A^q- und I-A^p-Moleküle unterscheiden sich in 4 Aminosäuren der I-A β -

* SCID = schwerer kombinierter Immundefekt als Folge eines genetisch bedingten Defekts, der dazu führt,

Kette*, welche in der Bindungsgrube für Peptide lokalisiert sind und daher die Interaktion mit antigenen Peptiden stark beeinflussen (204). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß Mäuse, die transgen für die beim Menschen mit hohem Arthritisrisiko assoziierten MHC-Klasse-II-Allele DR4 und DQ8 sind, nach Immunisierung mit CII eine CIA mit höherer Inzidenz und schwererem klinischen Verlauf entwickeln als nicht transgene Kontrolltiere (205-210). Darüber hinaus sind diese Tiere vollkommen resistent gegen die Induktion einer CIA, wenn sie keine T_H-Zellen besitzen (207). Dieser Befund belegt damit ebenfalls, daß die Entstehung dieser Krankheit offensichtlich von der Aktivierung und Expansion autoreaktiver CD4⁺ T-Zellen abhängig ist.

Möglicherweise kann die CIA nur durch ein begrenztes Repertoire bestimmter T-Zell-Klone hervorgerufen werden. Untersuchungen der Expression von Gensegmenten des TCR ergaben, daß CII-spezifische arthritogene T-Zellen bevorzugt V β 8.2, V β 6 und V β 1 in Kombination mit V α 11.1, V α 8.3 und V α 22.1 exprimieren (148;149;211-213). Ferner belegen *in vivo*-Studien mit neutralisierenden Antikörpern gegen V β 8.2 die Beteiligung dieser T-Zellen an der Pathogenese der CIA. Sowohl die präventive als auch die therapeutische Gabe von anti-V β 8.2-Antikörpern führte zur einer abgeschwächten Symptomatik mit einer geringeren Anzahl betroffener Gelenke (149). Darüber hinaus wurde berichtet, daß SWR/J-Mäuse, welche das für eine CIA permissive I-A^q-Molekül exprimieren und gleichzeitig eine genetisch bedingte Depletion bestimmter TCR-V β -Gensegmente haben, gegen die Induktion einer CIA resistent sind (151;153). Es wurde angenommen, daß die Resistenz dieses Stammes auf dem Fehlen der entsprechenden V β -Gensegmente beruht. Von L. Mori *et al.* wurde deshalb die V β 12-Kette eines CII-spezifischen, arthritogenen T-Zellklons in SWR/J-Mäusen transgen exprimiert (154). Trotzdem erwiesen sich die transgenen Mäuse als CIA-resistent (154). Später wurde allerdings herausgefunden, daß die CIA-Resistenz von SWR/J-Mäusen (I-A^q) primär auf einem Defekt der fünften Komplementkomponente (C5) beruht (214). Ob die Deletion von V β -Gensegmenten für die Arthritisresistenz eine Rolle spielt, konnte daher nicht geklärt werden. Es konnte allerdings gezeigt werden, daß TCR- β -transgene F1-Hybride mit dem DBA/1-Stamm, F1 (SWR/J x DBA/1), eine erhöhte Suszeptibilität für CIA zeigten (154). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß die erhöhte Expression bestimmter TCR-V β -Gensegmente sehr wahrscheinlich eine wesentliche Komponente

daß keine Antikörper oder T-Zellrezeptoren produziert werden können.

* Das I-A-Molekül besteht aus einem nichtkovalenten Komplex der α - und β -Ketten.

bezüglich der Empfänglichkeit gegenüber einer CIA ist. Mit dem Ziel, ein Mausmodell mit hoher Suszeptibilität für CIA zu etablieren, wurden transgene F1-Hybride, F1 (SWR/J x DBA/1), 12 mal mit dem für CIA suszeptiblen Stamm DBA/1 rückgekreuzt und auf die Entwicklung einer Arthritis vergleichend mit Wildtyp-DBA/1-Mäusen untersucht.

Aufgrund der allelischen Exklusion (*allelic exclusion*) unterdrückt die transgene TCR- β -Kette weitere Genomordnungen für die TCR- β -Kette und verhindert somit die Expression von endogenen TCR- β -Ketten. Als Folge exprimieren die TCR- β tg-Mäuse die transgene β -Kette auf fast allen ihren T-Zellen. So zeigen die Ergebnisse der FACS-Analyse, daß 97% der CD4⁺ T-Zellen aus dem peripheren Blut dieser Tiere die transgene TCR- β -Kette exprimieren (s. III.1). Darüber hinaus findet man transgene T-Zellen in der Milz und in den Lymphknoten der TCR- β tg-Mäuse. Im Gegensatz zu transgenen Tieren zeigen die CD4⁺ T-Zellen aus den peripheren Organen von Wildtyp-DBA/1-Mäusen nur eine geringe Expression dieser β -Kette. Es muß allerdings betont werden, daß diese Mäuse nicht transgen für die TCR- α -Kette des arthritogenen T-Zellklons sind, so daß die T-Zellen kombiniert mit der transgenen TCR- β -Kette verschiedene endogene TCR- α -Ketten exprimieren. Die TCR- β tg-T-Zellen besitzen daher ein breites Spezifitätsspektrum und es muß davon ausgegangen werden, daß nur ein geringer Anteil der T-Zellen der TCR- β tg-Tiere CII-spezifisch sind. TCR- β -transgene Tiere entwickeln jedoch nach Immunisierung mit CII in CFA eine Arthritis mit 100%-iger Inzidenz, früherem Auftreten und einem schwereren chronischen Verlauf verglichen mit nicht transgenen Kontrolltieren (s. III.1.1). Als Folge einer solchen Immunisierung wurde eine 20-fach stärkere IFN- γ -Bildung der CII-spezifischen CD4⁺ T-Zellen TCR- β tg-Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-DBA/1-Tieren beobachtet (s. III.1.2.1). Bei nicht transgenen Tieren war die Krankheit schwächer ausgeprägt, mit späterem Auftreten, zeigte eine niedrigere Inzidenz (ca. 50 – 70%), war geschlechtsabhängig und nur vorübergehend. Weiterhin zeigten die Experimente des adoptiven Transfers, daß Milzzellen transgener Tiere, welche als Quelle CII-spezifischer T-Zellen dienen, arthritogene Eigenschaften hatten und die Schwere und Inzidenz einer CIA bei Wildtyp-DBA/1-Empfängertieren signifikant verstärkten (s. III.1.3). Somit fördert die Expression der arthritogenen TCR- β -Kette die Entstehung einer CIA. Vor kurzem publizierte Daten zeigen, daß DBA/1-Mäuse, welche transgen für die T-Zellrezeptor-V β 8.2- und V α 11.1-Ketten sind, die von den meisten, bisher isolierten,

arthritogenen T-Zell-Klonen exprimiert werden, eine schwere Arthritis mit früherem Auftreten entwickeln als die nicht transgenen Tiere (148), stützen unseren Ergebnissen.

2. MECHANISMEN DER ENTSTEHUNG UND KONTROLLE VON AUTOREAKTIVEN T-LYMPHOCYTEN

Trotz der vermutlich höheren Frequenz CII-spezifischer T-Zellen in der Peripherie (z.B. in Blut, Milz und Lymphknoten) entwickeln TCR- β tg-Mäuse jedoch spontan keine Arthritis. Dies kann ein Hinweis dafür sein, daß das Schicksal der potentiell autoreaktiven T-Lymphocyten in diesen Mäusen durch Toleranz-Mechanismen kontrolliert wird. Schon im Thymus setzen Mechanismen zur Kontrolle autoreaktiver T-Zellen ein. Die T-Lymphocyten unterliegen im Verlauf ihrer Reifung einer *zentralen Toleranz* gegenüber körpereigenen Molekülen. Hierbei werden T-Zellen, welche Rezeptoren mit einer hohen Affinität für Selbstantigene besitzen, deletiert (*negative Selektion*) (215-217). Die Tatsache, daß in den TCR- β tg-Mäusen eine reduzierte Anzahl von CD4⁺ T-Zellen (30% der peripheren Blutlymphocyten = PBL) im Vergleich zu Wildtyp-DBA/1-Mäusen (42% der PBL) beobachtet wurde, könnte als Hinweis dafür gewertet werden, daß hochaffine CII-spezifische T-Zellen möglicherweise durch klonale Deletion aus dem Repertoire entfernt wurden. Demgegenüber werden potentiell autoreaktiven T-Zellen mit niederaffinen Rezeptoren für Eigenantigene, inklusive CII, eventuell nicht deletiert und in die Peripherie entlassen. Diese T-Zellen findet man dann im peripheren Blut, in der Milz und in den Lymphknoten der TCR- β tg-Tiere. Der Befund, daß TCR- β tg-Mäuse sich normal entwickeln und solange gesund bleiben, bis man ihre T-Zellen gezielt durch ein heterologes Antigen (Hühner-Kollagen-Typ-II) aktiviert, liefert einen Hinweis darauf, daß potentiell autoreaktive T-Zellen einen Teil des normalen T-Zell-Repertoires darstellen und in gesunden Individuen vorhanden sein können.

Es gibt zusätzlich zur zentralen Toleranz noch periphere Toleranzmechanismen, die autoaggressive T-Zellen unterdrücken können, falls solche Zellen der Selektion im Thymus entgangen sind. Die funktionelle Inaktivierung (*Anergie*) autoreaktiver T-Zellen stellt einen Mechanismus der *peripheren Toleranz* dar (216;218;219). Die Anergie kann durch fehlende kostimulatorische Signale, wie z.B. die fehlende Interaktion zwischen CD28-Molekülen und B7-Molekülen bei gleichzeitiger Aktivierung über den T-Zellrezeptor ausgelöst werden (220-222). Funktionell inaktivierte T-Zellen zeigen eine

deutlich verminderte Expression ihres T-Zellrezeptors und der kostimulatorischen Moleküle auf der Zelloberfläche. Sie können auch durch ihr spezifisches Antigen nicht mehr effizient aktiviert werden (219). Allerdings kann die Anergie der Zellen in Kultur mit hohen Dosen von IL-2 aufgehoben werden. Der Befund, daß sich CD4⁺ T-Zellen aus TCR- β tg-Mäusen *in vitro* primär durch das glykosylierte Ratten-CII-Peptid₂₅₆₋₂₇₁/HyK- β Gal₂₆₄ stimulieren lassen (s. III.2.2.1), welches in diesem Bereich der Aminosäuresequenz mit dem zur Arthritis-Induktion verwendeten Hühner-CII identisch ist, zeigt, daß zumindest gegen dieses heterologe CII keine Toleranz existiert. Dies schließt natürlich nicht aus, daß es gegenüber dem entsprechenden Peptid von Maus-CII, das sich in nur einer Aminosäure von dem oben genannten Ratten-CII-Peptid unterscheidet, eine mehr oder minder ausgeprägte Toleranz gibt.

Aktive *Suppression* autoreaktiver T-Zellen ist ein weiterer Mechanismus der peripheren Toleranz. Mehrere Studien deuten auf die Existenz regulatorischer T-Zellen mit der Fähigkeit zur aktiven Suppression autoreaktiver T-Zellen hin (12;223-225). So konnte im Colitis-Modell gezeigt werden, daß CD4⁺ T-Suppressor-Zellen die Aktivierung und Expansion von pathogenen CD4⁺ T_H1-Zellen in der Peripherie kontrollieren (60;226-229). Die T-Suppressor-Zellen wurden durch niedrige Expression von CD45RB und hohe Produktion von IL-4 und TGF- β charakterisiert (227;229). In weiteren Studien konnte gezeigt werden, daß einerseits durch Übertragung von T-Suppressor-Zellen eine Toleranz aufgebaut werden kann, andererseits eine Deletion dieser T-Zellen zu verstärkten Reaktionen gegen körpereigenes Gewebe führt (230-233).

Über die molekularen Signale, die die Entstehung der T-Suppressor-Zellen steuern, ist bisher nichts bekannt. Es mehren sich die Hinweise, daß CD4⁺ T-Suppressor-Zellen durch die hohe Expression der α -Kette des IL-2-Rezeptors (CD25) charakterisiert sind (232). Ferner können bestimmte Autoimmunreaktionen durch den Transfer regulatorischer CD25⁺ T-Zellen unterdrückt werden. Möglicherweise ist ein Signal über IL-2 bzw. den IL-2-Rezeptor für die Entwicklung bzw. die Funktion dieser T-Zellen von Bedeutung, da in IL-2-defizienten-Mäusen (234) oder nach Neutralisation von IL-2 (235) verschiedene Autoimmunerkrankungen spontan auftreten. Darüber hinaus kann die supprimierende Wirkung der regulatorischen CD25⁺ T-Zellen durch hohe Dosen von IL-2 weitgehend aufgehoben werden. Es ist bisher unbekannt, ob solche regulatorischen T-Zellen im CIA-Modell eine Rolle spielen.

Das Phänomen der *oralen Toleranz* liefert ein weiteres Beispiel für die

Mechanismen der peripheren Toleranz. Nach oraler Gabe von Autoantigenen kann es zur lokalen Immunreaktion in der Darmschleimhaut und zur Entwicklung von CD4⁺ T-Zellen kommen, die keine Erkrankung hervorrufen und darüber hinaus autoreaktive pathogene Zellen supprimieren können (12;13;228;236-239). Diese T-Zellen produzieren erhöhte Mengen an IL-4 und TGF- β (14;226;229;240), IL-4 ist aber für die Unterdrückung der Erkrankung nicht von Bedeutung, da sich eine orale Toleranz auch in IL-4-defizienten-Mäusen auslösen läßt (241). Dagegen hebt die Neutralisation von TGF- β die Wirksamkeit der regulatorischen T-Zellen weitgehend auf (226;229). Auch im CIA-Modell konnte gezeigt werden, daß durch eine orale Verabreichung von CII bzw. CII-Peptiden in DBA/1-Mäusen der Krankheitsausbruch verhindert und sogar bei einem bereits etablierten Krankheitsbild eine gewisse Suppression beobachtet werden kann (242-246).

Neben den aktiven Suppressormechanismen ist von Bedeutung, daß potentiell autoreaktive T-Zellen nicht aktiviert werden können, wenn ihr Antigen nicht durch professionelle APCs geeignet präsentiert wird. Wichtig ist auch, daß die meisten Körperzellen keine akzessorischen T-Zell-aktivierenden Moleküle tragen, so daß selbst bei einer Bindung über den TCR keine Immunantwort induziert wird. So wurde gezeigt, daß Mäuse, welche ein bestimmtes Protein des Lymphocytären-Chorionmeningitis-Virus (LCMV) auf den β -Zellen des Pankreas transgen exprimieren (247;248) und gleichzeitig alle T-Zellen einen transgenen TCR mit Spezifität für dieses LCMV-Protein tragen, gesund blieben (247;248). Dieses Phänomen wurde als *immunologische Ignoranz* bezeichnet, da die autoreaktiven T-Zellen vorhanden waren, ohne gegen in der Peripherie exprimierte Antigene zu reagieren (216). Allerdings waren die T-Zellen dieser transgenen Tiere nicht anergisch, da sie sich *in vitro* durch entsprechende LCMV-Proteine, welche von professionellen APCs präsentiert worden waren, normal aktivieren ließen. Im Fall der in dieser Arbeit verwendeten TCR- β tg-Mäuse verbleiben die potentiell autoreaktiven CII-spezifischen T-Zellen möglicherweise in einem Zustand der immunologischen Ignoranz, da außerhalb des Knorpels nur wenige Komplexe aus CII-Peptid und MHC-Klasse-II-Molekül vorkommen (83). Diese reichen nicht aus, um potentiell autoreaktive CII-spezifische T-Zellen zu aktivieren und spontan eine Arthritis auszulösen. Werden die T-Zellen jedoch gezielt aktiviert, z.B. durch eine Immunisierung mit heterologem CII in CFA, dann könnten sie in alle Gewebe einwandern, auch in den Knorpelbereich, wo sie ihr spezifisches Antigen treffen.

Die Tatsache, daß T-Zellen APCs töten, wenn diese keine kostimulatorischen Moleküle tragen, zeigt, daß ohne Kostimulation nicht nur die Initiation, sondern auch eine Aufrechterhaltung einer Autoimmunreaktion nicht möglich ist (249). Es stellt sich die Frage, wie Reaktionen gegen körpereigenes Gewebe ausgelöst und aufrechterhalten werden können: In diesem Zusammenhang könnten unterschiedliche bakterielle bzw. virale Infektionen eine auslösende Funktion haben. So wurde in zahlreichen Studien beschrieben, daß autoreaktive und potentiell pathogen wirkende T-Zellen während oder nach einer erfolgreichen Bekämpfung von verschiedenen bakteriellen oder viralen infektiösen Agenzien aktiviert werden können. Ferner lassen sich in verschiedenen Tiermodellen experimentelle Autoimmunkrankheiten auslösen, indem man mit gewebespezifischen Antigenen, kombiniert mit bakterienhaltigen Adjuvantien (z.B. CFA), immunisiert (250). In Abwesenheit von Bakterien wird eine viel geringere Induktionsrate und ein abgeschwächtes Krankheitsbild beobachtet. Auch am Beispiel der CIA konnte sowohl in früheren Studien (111;119;120;251) als auch in dieser Arbeit gezeigt werden, daß die bakteriellen Bestandteile (Mycobakterien) im CFA eine entscheidende Bedeutung für die Auslösung der Autoimmunreaktion haben, da die Verwendung von Adjuvantien ohne bakteriellen Bestandteile (IFA) selbst in TCR- β tg-Mäusen keine CIA auslöst.

Es stellt sich die Frage, wie eine Immunantwort aufgrund einer Infektion die Auslösung einer Autoimmunkrankheit fördern kann. Möglicherweise kann dafür einerseits das sogenannte *molekulare Mimikry* und andererseits die *bystander Aktivierung* verantwortlich gemacht werden. *Molekulares Mimikry* bedeutet, daß bestimmte Determinanten mikrobieller oder viraler Antigene in ihrer Sequenz bzw. Struktur zufällig große Ähnlichkeit mit körpereigenen Molekülen aufweisen (247;248;250;252;253). Im Rahmen der gegen die Mikroorganismen gerichteten Immunreaktion entstehen Lymphocyten, die mit Eigenantigenen kreuzreagieren. Diese Lymphocyten werden nach erfolgreicher Eliminierung der Mikroorganismen weiterhin durch die Eigenantigene aktiviert und können dadurch zum Auftreten von Autoimmunerkrankungen führen.

Die *bystander Aktivierung* stellt einen weiteren Mechanismus dar, über den diverse Mikroorganismen die Entwicklung von Autoimmunerkrankungen fördern können (254). Dieser Effekt steht in Zusammenhang mit der Fähigkeit zur Induktion verschiedener kostimulatorischer Mediatoren durch mikrobielle Produkte wie LPS, Lipopeptide,

Hitze-Schock-Proteine und bakteriellen DNA-Sequenzen (82;255-258). Derartige Produkte aktivieren Makrophagen und dendritische Zellen und regen diese zur Bildung und Sekretion inflammatorischer Cytokine wie TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12 und IL-15 an (256;257). Diese Cytokine können einerseits die Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle z.B. auf Endothelzellen und die Freisetzung von Chemokinen bewirken (97-100), andererseits fördern sie die Aktivierung, Differenzierung und klonale Expansion antigenspezifischer T-Zellen (64;65;67;69). Als Folge sezernieren aktivierte T-Zellen in einem positiven Rückkopplungsmechanismus verschiedene entzündungsfördernde Cytokine, wie z.B. IFN- γ , die wiederum die Aktivierung antigenpräsentierender Zellen fördern und die Expression von MHC-Klasse-II- bzw. verschiedener kostimulatorischer Moleküle steigern (53). Somit können aufgrund einer erhöhten kostimulierenden Aktivität der antigenpräsentierenden Zellen, welche nur wenige autoantigene Moleküle exprimieren, autoreaktive T-Zellen aktiviert werden, in das Zielgewebe einwandern und dort Gewebszerstörungen hervorrufen (259). Darüber hinaus scheint im Rahmen der *bystander Aktivierung* die Freisetzung von IL-2 von großer Bedeutung zu sein, da durch eine lokal hohe Konzentration an IL-2 die klonale Anergie bzw. die aktive Suppression autoreaktiver T-Zellen überwunden werden kann. Über diese Mechanismen kann eine gegen Mikroorganismen gerichtete Immunreaktion als Nebeneffekt die Aktivierung und Expansion latent vorhandener autoreaktiver T-Lymphocyten bewirken (260). Allerdings wurde in den in dieser Arbeit verwendeten TCR- β tg-Tieren die krankheitsfördernde Wirkung einer *bystander Aktivierung* nicht beobachtet. Obwohl diese Tiere sehr wahrscheinlich eine erhöhte Frequenz von potentiell autoreaktiven T-Zellen haben, reichte eine Injektion von CFA ohne CII nicht aus, um arthritogene T-Lymphocyten zu aktivieren und eine Arthritis auszulösen (s. III.1.2.2). Vor kurzem publizierte Daten, die zeigen, daß eine lokale Entzündung nicht ausreichend ist, um die nicht für das betreffende Antigen spezifischen T-Zellen zu aktivieren (261), unterstützen unsere Ergebnisse. Hingegen führte eine gezielte Aktivierung der T-Zellen durch CII in CFA zur Entwicklung von akuten Krankheitssymptomen (s. III.1.1). Somit ist offensichtlich zur Induktion einer Arthritis auch bei TCR- β tg-Mäusen sowohl ein für die Aktivierung ausreichendes kostimulatorisches Signal als auch ein geeignetes Zielantigen notwendig.

3. DIE BEDEUTUNG VON ANTIKÖRPERN FÜR DIE ENTSTEHUNG EINER CIA

Wie schon in der Einleitung erwähnt, kommt den CII-spezifischen Antikörpern ebenfalls eine wichtige Rolle in der Pathogenese der CIA zu. So wurde beschrieben, daß einerseits eine ausgeprägte zelluläre (CII-induzierte IFN- γ -Bildung) Immunantwort gegen CII allein nicht ausreicht, um eine CIA auszulösen (262). Andererseits kann durch einen adaptiven Transfer von CII-spezifischem Antiserum (134) bzw. Antikörpern, welche aus solchen Antiseren gereinigt worden waren (133) oder monoklonalen Antikörpern gegen CII (263), in CIA-suszeptiblen Tieren eine transiente CIA induziert werden (135;264;265). Weiterhin kann eine CIA nicht induziert werden, wenn die B-Zellen mit Hilfe eines monoklonalen anti-IgM-Antikörpers depletiert werden und somit die humorale Komponente der CII-spezifischen Immunantwort blockiert wird (131;132). Der vor kurzem publizierte Befund, daß B-Zell-defiziente Mäuse gegenüber der Induktion einer CIA vollkommen resistent sind (130), belegt definitiv die Notwendigkeit von B-Zellen für die Auslösung dieser Krankheit.

Es stellt sich die Frage, wie CII-spezifische Antikörper die Entstehung einer Arthritis fördern können. Die Ergebnisse zahlreicher Studien zeigen, daß das normale B-Zell-Repertoire potentiell autoreaktive B-Zellen mit der Fähigkeit zur Produktion von CII-spezifischen IgM-Antikörpern enthält (266-270). Diese Zellen werden jedoch nicht aktiviert und zum Klassenwechsel nach IgG angeregt, da die CII-spezifischen T-Zell-Partner entweder aufgrund der negativen Selektion im Thymus fehlen oder infolge einer klonalen Anergie bzw. einer aktiven Suppression funktionell inaktiviert worden sind. Gelingt es jedoch, die CII-spezifischen T-Zellen zu aktivieren, z.B. durch eine Immunisierung mit CII in CFA, interagieren sie mit den CII-spezifischen B-Zellen und es kommt zur Bildung von CII-spezifischen IgG-Antikörpern. Wie aus der Literatur bekannt ist, sind viele der im Verlauf einer Immunantwort entstehenden gegen heterologes CII gerichteten Antikörper kreuzreaktiv mit dem autologen CII des Gelenkknorpels (122;268;271). Diese Antikörper bilden zusammen mit autologem CII Immunkomplexe, die im Knorpel entzündliche Veränderungen hervorrufen. Letztlich kann dies zur Zerstörung des Knorpels führen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß TCR- β tg-Mäuse im Vergleich zu normalen DBA/1-Mäusen nach einer Immunisierung mit CII in CFA eine 3- bis 5-fach höhere Menge an CII-spezifischen Antikörpern produzieren (s. III.1.2.1). Dies steht möglicherweise im Zusammenhang mit der vermutlich erhöhten Frequenz CII-

spezifischer T_H-Zellen dieser Tiere. Die Tatsache, daß TCR-βtg-Mäuse einerseits eine stark ausgeprägte humorale Immunreaktion gegen CII zeigen und andererseits eine schwere chronische Arthritis entwickeln, ist ein starker Hinweis auf die pathogene Rolle CII-spezifischer Antikörper bei der CIA. Die Tatsache, daß eine aggressiv andauernde Arthritis nur durch Transfer von CII-spezifischem Serum zusammen mit aktivierten CD4⁺ T-Zellen übertragen werden kann (129;272) deutet darauf hin, daß ein Zusammenspiel von CII-spezifischen T- und B-Zellen notwendig ist, um eine schwere CIA zu induzieren. Die entscheidende Bedeutung der Interaktion zwischen B- und T-Zellen für die Entwicklung einer CIA konnte in Studien zur Blockade der Interaktion zwischen CD154 (= CD40L) auf aktivierten T-Zellen und seinem Rezeptor CD40 auf B-Zellen belegt werden (132). Dies steht im Einklang mit Ergebnissen früherer Studien (189;273-276) und den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten zur Depletion von CD4⁺ T-Zellen (s. III.4.1), die zeigen, daß sich durch die Behandlung mit anti-CD4-Antikörpern in DBA/1-Mäusen die Bildung von CII-spezifischen Antikörpern und die Entwicklung einer CIA vollständig hemmen läßt. Im Gegensatz dazu wurde die Krankheitsentwicklung in TCR-βtg-Mäusen durch diese Behandlung nur um eine Woche verzögert (s. III.4.1.1). Dies steht vermutlich im Zusammenhang mit der ausgeprägten humoralen Reaktion gegen CII in den anti-CD4-behandelten TCR-βtg-Mäusen (s. III.4.1.2). Die Bildung von CII-spezifischen Antikörpern dieser Tiere wird aufgrund der vermutlich hohen Frequenz von CII-spezifischen T-Zellen direkt nach dem Wiedererscheinen der CD4⁺ T-Zellen im Blut stark gefördert. Insgesamt sprechen diese Befunde für eine entscheidende Beteiligung von CII-spezifischen Antikörpern in der Pathogenese der CIA.

4. DIE ROLLE DES CD44-MOLEKÜLS IN DER PATHOGENESE EINER CIA

Basierend auf den Ergebnissen der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente mit neutralisierenden Antikörpern gegen CD44 (s. III.4.2) konnte gezeigt werden, daß eine stark ausgeprägte humorale Immunreaktion gegen CII allein keine ausreichende Voraussetzung für die Auslösung der CIA ist. CD44 ist ein 90 kDa schweres transmembranes Glykoprotein, das vorwiegend auf aktivierten T-Zellen exprimiert wird und an Hyaluronsäure, eine Hauptkomponente der extrazellulären Matrix, bindet. Die Ergebnisse zahlreicher Untersuchungen zeigen, daß das CD44-Molekül im

Synovialgewebe von Patienten mit RA stark exprimiert wird (277-279). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß die Interaktion zwischen dem CD44-Molekül und der Hyaluronsäure eine starke und schnelle Expression von VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) (CD106) auf Synovialzellen induziert (278). Diese Befunde weisen darauf hin, daß das CD44-Molekül eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Arthritis spielt. Ferner belegen die Ergebnisse früherer Studien (280-283) und die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente mit anti-CD44-Antikörpern (s. III.4.2) die Beteiligung von CD44 an der Induktion einer CIA. Eine Behandlung mit anti-CD44-Antikörpern blockiert die Auswanderung und Migration u.a. von aktivierten T-Zellen aus dem Gefäßsystem in periphere Gewebe. Die Bildung der CII-spezifischen Antikörpern, die eine Kooperation von T- und B-Zellen in den sekundären lymphatischen Organen (Lymphknoten, Milz) benötigt, läßt sich allerdings durch eine solche Behandlung nicht hemmen (s. III.4.2.2). Die Entstehung einer Arthritis wird jedoch so lange unterdrückt, wie diese Behandlung fortgesetzt wird (s. III.4.2.1). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß offensichtlich die Einwanderung von aktivierten T-Lymphocyten in die Gelenke für die Induktion einer CIA notwendig ist. Dies steht im Einklang mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die zeigen, daß eine Entzündungsreaktion des Knorpels durch eine Behandlung mit Antikörpern gegen Adhäsionsmoleküle, die ebenfalls essentiell für die Migration aktivierter T-Zellen sind, erfolgreich verhindert werden kann (284;285).

Es stellt sich nun die Frage, wie die Einwanderung von aktivierten CII-spezifischen T-Lymphocyten in Gelenke die Auslösung einer lokalen Entzündungsreaktion des Knorpels bewirken kann. Wie schon erwähnt, exprimieren aktivierte T-Zellen CD44-Moleküle, die ihrerseits, infolge einer Interaktion mit Hyaluronsäure, die Expression von VCAM-1 auf Synovialzellen steigern könnte. VCAM-1 bindet an das $\alpha_4\beta_1$ -Integrin VLA-4 (*very late antigene-4*) auf der Oberfläche aktivierter T-Zellen. Somit könnte es die Adhäsion der T-Zellen im Knorpel verstärken. Die aktivierten T-Zellen sezernieren Cytokine, wie beispielsweise TNF- α und IFN- γ . Diese können wiederum die Expression von VCAM-1, ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*) (CD54) und Chemokinen wie RANTES fördern. Dies verstärkt die weitere Migration der aktivierten T-Zellen in den Gelenkbereich. Gleichzeitig sammeln sich aufgrund der Adhäsion an E-Selektin und einer erhöhten Konzentration von Chemokinen wie MIP-1 β und MCP-1, welche ebenfalls durch TNF- α und IFN- γ induziert werden, auch Monocyten und Neutrophile

in diesem Bereich. Aufgrund einer Aktivierung, z.B. durch IFN- γ , schütten diese eine Reihe von Entzündungsmediatoren wie Matrixmetalloproteinasen (z.B. Kollagenase und Stromlysin), NO, Peroxid und Sauerstoffradikale aus und verursachen somit eine Entzündungsreaktion im Knorpelbereich.

5. DIE BEDEUTUNG VERSCHIEDENER SUBPOPULATIONEN DER T-HELPERZELLEN FÜR DIE ENTSTEHUNG UND AUFRECHTERHALTUNG EINER CIA

Wie in der Einleitung erwähnt, lassen sich die T-Helferzellen aufgrund des Musters der gebildeten Cytokine in zwei funktionell unterschiedliche Hauptpopulationen unterteilen, die als T_H1- und T_H2-Zellen bezeichnet werden (3). T_H1-Zellen produzieren IFN- γ , IL-2 und TNF- α und vermitteln die sogenannten zellulären Immunreaktionen. T_H2-Zellen hingegen sezernieren IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 und IL-13 und unterstützen eher humorale Immunreaktionen (1;4). Ein wesentlicher Befund ist in diesem Zusammenhang, daß die Entwicklung vieler Autoimmunkrankheiten durch eine falsch balancierte T-Helferzellentwicklung ausgelöst wird (60;61;286).

Im Modell der CIA wird aufgrund verschiedener experimenteller Hinweise angenommen, daß eine präferentielle Aktivierung von T_H1-Zellen zu einer autoaggressiven zellulären Immunreaktion führt, welche letztendlich die Arthritis Symptome auslöst (120;155;156;286). Diesbezüglich konnte gezeigt werden, daß die meisten der aus den lokalen Lymphknoten von DBA/1-Mäusen, die zuvor mit CII in CFA immunisiert worden waren, generierten T-Zelllinien bevorzugt IFN- γ produzieren. Im Gegensatz dazu scheint eine CII-spezifische zelluläre Immunantwort vom T_H2-Typ nicht mit einer CII-induzierten Gelenkserkrankung assoziiert zu sein. Sie kann sogar einen krankheitsunterdrückenden Effekt bei einer CIA vermitteln. So resultierte im Modell der CIA aus einer *in vivo* Neutralisation von IL-4 eine Verstärkung der Krankheitssymptome (287-289). Es konnten ebenfalls supprimierende Effekte von exogen verabreichtem IL-4 nachgewiesen werden (290;291). Als Folge einer solchen Behandlung war der Krankheitsausbruch verzögert und die Symptomatik deutlich schwächer ausgeprägt. Die protektiven Effekte von IL-10, einem weiteren Cytokin, welches u.a. von T_H2-Zellen produziert wird, waren im Modell der CIA sowohl indirekt durch neutralisierende Antikörper gegen IL-10 (102), als auch direkt durch *in vivo* Gabe von IL-10 (92;287;292;293) nachgewiesen worden. Diese Ergebnisse unterstreichen die supprimierende Wirkung dieser T_H2-Cytokine auf die Induktion einer CIA.

Weiterhin ergaben Untersuchungen zur Cytokin-Expression von CII-spezifischen T-Zellen, welche aus DBA/1-Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Immunisierung mit CII in CFA isoliert worden waren, daß sich das Muster der gebildeten Cytokine während des Verlaufs der CIA von einem früheren T_H1- zu einem späteren T_H2-Typ ändert (294). Darüber hinaus korrelierte das T_H2-Cytokinmuster in der Spätphase einer CIA bei DBA/1-Mäusen mit der Rückbildung der Krankheitssymptome (294). Im Gegensatz dazu entwickelten mit CII in CFA immunisierte TCR-βtg-Mäuse eine Arthritis mit chronischem Krankheitsverlauf. Dies legt die Vermutung nahe, daß eine Balance zwischen T_H1- und T_H2-Zellen für den selbstlimitierenden CIA-Verlauf bei DBA/1-Mäusen von Bedeutung ist, und daß ein Übergewicht an T_H1-Zellen eine Ursache für den unkontrollierten aggressiven Verlauf dieser Krankheit bei TCR-βtg-Mäusen sein könnte.

Weiterhin berichtete die Arbeitsgruppe von M. Londei, daß eine Behandlung von TCR-βtg-Mäusen mit einem nicht depletierenden Antikörper gegen das CD4-Molekül, der die Funktion des CD4-Moleküls blockiert, ohne die CD4⁺ T-Zellen zu deletieren, die Inzidenz der CIA von 100% auf 40% senkte (200;295). Damit assoziiert war eine Verschiebung der Immunreaktion vom T_H1- zum T_H2-Typ, da die Lymphknotenzellen von derartig behandelten TCR-βtg-Mäusen eine erhöhte Menge an IL-5 und eine geringere Menge an IFN-γ verglichen mit Kontrolltieren produzierten (200;295). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit unseren Daten, die zeigen, daß eine Behandlung mit einem depletierenden anti-CD4-Antikörper ebenfalls die Bildung von IL-4 und IL-5 verstärkt (s. III.4.1.3). Somit fördert diese Behandlung eine bevorzugte Entwicklung einer T_H2-Reaktion anstelle einer krankheitsassoziierten T_H1-Reaktion und verhindert die Entstehung einer CIA. Diese Ergebnisse implizieren, daß T_H2-Zellen nicht krankheitsauslösend sind. Allerdings läßt sich daraus nicht schließen, daß CII-spezifische T_H2-Zellen gegenüber T_H1-Zellen als Suppressor-Zellen wirken. Der protektive Effekt einer anti-CD4-Behandlung könnte ausschließlich eine Folge der reduzierten T_H1-Antwort sein. Die Frage, ob CII-reaktive T_H2-Zellen eine durch CII-spezifische T_H1-Zellen induzierte Arthritis unterdrücken können, kann nur durch Experimente geklärt werden, bei denen CII-spezifische T_H1- und T_H2-Zellen zusammen adoptiv transferiert werden. Zu diesem Zweck wurde versucht, CD4⁺ T-Zellen aus TCR-βtg-Mäusen *in vitro* zu CII-spezifischen T_H1- bzw. T_H2-Zellen zu differenzieren (s. III.2.2). Jedoch zeigte sich im Verlauf dieser Arbeit, daß eine antigenspezifische

Primäraktivierung der CD4⁺ T-Zellen aus TCR-βtg-Mäusen durch das gesamte CII-Molekül nicht möglich ist (s. III.2.2). Gründe dafür könnten die zu geringe Frequenz CII-reaktiver T-Zellen aufgrund von Kombinationen der transgenen TCR-β-Kette mit einem breiten Spektrum verschiedener endogener TCR-α-Ketten sein, eine niedrige Affinität der CII-reaktiven T-Zellen infolge einer Toleranz gegen das murine CII oder die relativ geringe Effizienz, mit der CII aufgrund seiner tripelhelicalen Struktur von antigenpräsentierenden Zellen *in vitro* aufgenommen, prozessiert und präsentiert wird. Es war nicht möglich, die beiden ersten Hypothesen zu prüfen, da zum ersten kein monoklonaler anti-Vα8.2-Antikörper vorhanden war, der die ursprüngliche TCR-α-Kette des CII-spezifischen, arthritogenen K-102-T-Zellklons erkennt, zum zweiten murines CII nicht zur Verfügung stand. Dagegen war es möglich, das Problem einer schlechten Präsentation des gesamten CII-Moleküls dadurch zu umgehen, daß man ein schon „vorprozessiertes CII-Peptid“ für die Stimulation von CD4⁺ T-Zellen aus TCR-βtg-Mäusen verwenden kann. Das von den T-Zellen dieser Mäuse erkannte CII-Epitop war allerdings nicht charakterisiert worden. Andererseits war aber aus der Literatur bekannt, daß die meisten aus DBA/1-Mäusen isolierten T-Zellklone ein CII-Peptid im Bereich 256-270 der CII-Polypeptidkette erkennen (296;297). Es wurde daher versucht, CD4⁺ T-Zellen von TCR-βtg-Mäusen *ex vivo* mit diesem synthetisch hergestellten CII-Peptid₂₅₆₋₂₇₀ zu aktivieren (s. III.2.2.1). Hier ist anzumerken, daß laut Literatur die Mehrzahl der CII-spezifischen T-Zellklone ein posttranslational modifiziertes CII-Peptid₂₅₆₋₂₇₀ erkennen, in dem der Lysinrest an Position 264 posttranslational zu Hydroxylysin oxidiert ist und außerdem einen β-Galaktosidrest trägt (164-166). Dieses glykosylierte Peptid, Ratten-CII-Peptid₂₅₆₋₂₇₁/HyK-βGal₂₆₄, wurde freundlicherweise von B. Löhr und Prof. H. Kunz (Institut für Organische Chemie, Mainz) synthetisiert. Es zeigte sich, daß dieses Peptid imstande war, CD4⁺ T-Zellen aus TCR-βtg-Mäusen *in vitro* primär spezifisch zu aktivieren und sie dabei in Gegenwart verschiedener Cytokine sowohl zum T_H1- als auch zum T_H2-Typ zu differenzieren (s. III.2.2.1). Es muß allerdings darauf hingewiesen werden, daß die für Transferexperimente notwendige Menge an CII-spezifischen, zum T_H1- bzw. T_H2-Typ ausdifferenzierten, T-Zellen (geschätzt: 3 x 10⁶ Zellen pro Maus) nicht hergestellt werden konnte, da die Proliferation der *in vitro* durch das glykosylierte CII-Peptid aktivierten T-Zellen sehr gering war. Darüber hinaus standen nur geringe Mengen des sehr aufwendig herzustellenden glykosylierten CII-Peptids zur Verfügung. Aus diesen Gründen konnten

die Transferexperimente von CII-spezifischen T_H-Subpopulationen nicht weitergeführt werden.

6. DIE BEDEUTUNG VON IL-12 UND IFN- γ FÜR DIE INDUKTION EINER CIA

Wie schon erwähnt wurde, sind T_H1-Zellen wahrscheinlich entscheidend an der Entstehung einer CIA beteiligt. Da IL-12 und IFN- γ bekanntermaßen die Entwicklung von T_H1-Zellen fördern und IFN- γ darüber hinaus das charakteristische, von T_H1-Effektorzellen produzierte Cytokin ist, wurde die Frage untersucht, ob diese Cytokine für die Entwicklung und die Aufrechterhaltung einer CIA notwendig sind.

Für IL-12 war bekannt, daß einerseits seine Verabreichung die Induktion einer CIA beschleunigt (120;168;298) und andererseits durch Neutralisation von endogen gebildetem IL-12 eine CIA verhindert (169;172;298) werden kann. Der Befund, daß IL-12-defiziente DBA/1-Mäuse nur verzögert eine CIA mit abgeschwächtem Krankheitsverlauf entwickeln (299), belegt die Beteiligung von IL-12 in diesem Krankheitsmodell, zeigt aber ebenfalls, daß IL-12 für CIA-Induktion nicht essentiell ist. Weiterhin konnte sogar bei einer etablierten CIA eine Unterdrückung der Krankheit durch Agonisten des β_2 -Adrenorezeptors (z.B. Salbutamol) erreicht werden, deren Wirkung auf einer Hemmung der Bildung von IL-12 beruht (300). In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von endogen gebildetem IL-12 durch den IL-12-Antagonisten IL-12(p40)₂* neutralisiert (s. III.3.1). Dadurch konnte das Auftreten von Symptomen verzögert und diese stark abgeschwächt werden. Da CD4⁺ T-Zellen aus IL-12(p40)₂-behandelten Tieren nach *ex vivo* Stimulation mit CII weniger IFN- γ bildeten als entsprechende Kontrollen (s. III.3.2), lassen diese Befunde darauf schließen, daß das IL-12p40-Homodimer *in vivo* tatsächlich zur Neutralisation von IL-12 führt. Unsere Befunde bestätigen die krankheitsfördernde Wirkung von IL-12 auf die Entwicklung einer CIA und stehen im Einklang mit der Beobachtung von M. Gately, daß die *in vivo* Gabe von IL-12p40-Homodimer allein oder in Kombination mit anti-IL-12-Antikörpern die Entwicklung einer EAE supprimiert. Auch von anderen Autoren wurde die Bedeutung von IL-12 in Modellen für Autoimmunkrankheiten, insbesondere der EAE

* IL-12p40 ist neben IL-12p35 ein Bestandteil des IL-12-Heterodimers. In Abwesenheit von IL-12p35 kann IL-12p40 sowohl als Monomer als auch Dimer, IL-12(p40)₂, vorkommen. Letzteres interagiert mit der β 1-Kette des IL-12-Rezeptors, ohne ein Signal zu induzieren und wirkt so als physiologischer IL-12-Antagonist.

(69;71;72;301;302) und der IDDM in NOD-Mäusen (66;73;75;303) nachgewiesen, bei denen ebenfalls T_H1-Zellen an der Pathogenese entscheidend beteiligt sind.

Die Tatsache, daß die Hemmung der IL-12-Wirkung durch den IL-12-Antagonisten nach unseren Ergebnissen die Entstehung der CIA nicht vollständig verhindern kann (s. III.3.1), ließ vermuten, daß IL-12 nicht der einzige entscheidende Faktor in der Pathogenese einer CIA ist. Studien an IL-12-defizienten-DBA/1-Mäusen, die zeigen, daß trotz einer defekten IL-12-Synthese diese Tiere nach wie vor eine CIA, wenn auch abgeschwächt, entwickeln können, unterstützen diese Hypothese (299).

IL-12 und IFN- γ sind über mehrere positive Rückkopplungsmechanismen miteinander verbunden. IL-12 induziert direkt die Bildung von IFN- γ durch T- und NK-Zellen und fördert die Entwicklung IFN- γ -produzierender T_H1-Zellen (304). IFN- γ seinerseits verstärkt die Bildung von IL-12 durch Makrophagen und DCs und erhöht die Reaktivität gegenüber IL-12 (15;181;305-308). Darüber hinaus ist IFN- γ eines der wichtigsten proinflammatorischen Cytokine mit Wirkung auf viele Zelltypen. Daher könnte IFN- γ ebenfalls eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der CIA zukommen. Darüber hinaus legt der Befund, daß durch die Neutralisation von IFN- γ die arthritsfördernde Wirkung von IL-12 bei einer CIA völlig aufgehoben wird (168), die Hypothese nahe, daß der in dieser Arbeit beobachtete protektive Effekt der Neutralisation von IL-12 durch das IL-12(p40)-Homodimer ausschließlich eine Folge der reduzierten IFN- γ -Bildung sein könnte. Es stellte sich daher die Frage, ob und in welchem Ausmaß IFN- γ , verglichen mit IL-12, an der Entwicklung arthritogener T_H1-Zellen und damit an einer Arthritis beteiligt ist. Hinsichtlich der Funktion von IFN- γ für die Entwicklung der CIA gibt es in der Literatur widersprüchliche Befunde. Einerseits konnte gezeigt werden, daß IFN- γ die Pathogenese einer CIA fördert. So wurde beschrieben, daß lokale intraartikuläre bzw. systemische Applikationen von IFN- γ zu einem beschleunigten Auftreten einer CIA führen (155;167). Darüber hinaus berichtete die Gruppe von C. Fournier, daß die Neutralisation von IFN- γ in der Frühphase einer CIA das Auftreten der Erkrankung verzögert und zu einem abgeschwächten Krankheitsverlauf führt (156). Somit scheint IFN- γ bei der CIA eine krankheitsinitiierende Rolle zuzukommen.

Diametral gegensätzlich zu diesen Daten wurde berichtet, daß IFN- γ sogar einen krankheitsunterdrückenden Effekt bei einer CIA vermitteln kann, da die langfristige, systemische Applikation von IFN- γ in hohen Dosen ab dem Zeitpunkt des

Krankheitsausbruchs zu einer schwächeren Arthritissymptomatik, und umgekehrt die Behandlung mit einem neutralisierenden anti-IFN- γ -Antikörper in der Spätphase einer CIA zu einer Verschlimmerung der Symptome führt (156;157;177). Darüber hinaus wurde vor kurzem publiziert, daß in IFN- γ -Rezeptor-defizienten Mäusen eine schwere destruktive Arthritis mit höherer Inzidenz als in Wildtyp-Tieren induzierbar ist (158-160). IFN- γ scheint also einerseits wichtig für die Entstehung einer CIA zu sein (155;156;167), während sich andererseits das Fehlen seines Rezeptors eher verschlimmernd auswirkt (158-160).

Im Hinblick auf diese offensichtlichen Widersprüche wurde die Arthritissuszeptibilität in TCR- β tg-Mäusen untersucht, die gleichzeitig einen Defekt im IFN- γ -Gen besitzen und daher kein IFN- γ synthetisieren können. Um die sehr zeitaufwendige Einkreuzung des IFN- γ -Defektgens auf die TCR- β tg-Maus mit DBA/1-Hintergrund zu umgehen, wurden F2-Hybride zwischen einem IFN- γ -defizienten Stamm (C57Bl/6-Hintergrund) und dem TCR- β -transgenen Stamm (DBA/1-Hintergrund) untersucht (s. III.3.3). Es zeigte sich, daß alle IFN- γ -defizienten, TCR- β -transgene F2-Hybride mit dem suszeptiblen MHC-Haplotyp I-A^q resistent gegen CIA waren (s. III.3.3.1). IFN- γ ist demnach notwendig für die Induktion einer CIA.

Hier ist anzumerken, daß im Fall von IFN- γ -defizienten F2-Hybridmäusen die Resistenz gegen CIA auch durch die Einflüsse der Segregation von Suszeptibilitätsgenen im genetischen Hintergrund* des suszeptiblen DBA/1- und des nicht suszeptiblen C57Bl/6-Stammes bedingt sein könnten. Diese Einflüsse sind bei nicht IFN- γ -defizienten F2-Hybridmäusen in einer verminderten Inzidenz und unterschiedlich stark manifestierten Arthritissymptomen zu sehen (s. III.3.3.1). Allerdings belegt die Tatsache, daß durch die Gabe von exogenem IFN- γ in IFN- γ -defizienten F2-Hybridmäusen eine schwere Arthritis mit gleicher Inzidenz wie in nicht IFN- γ -defizienten F2-Hybridtieren induziert werden kann (s. III.3.3.4), daß die völlige Arthritisresistenz der ersteren tatsächlich eine Folge der Abwesenheit von IFN- γ ist. Unsere Daten bestätigen die entscheidende Rolle von IFN- γ in der Pathogenese einer CIA, allerdings stehen sie im Gegensatz zu der Beobachtung, daß IFN- γ -Rezeptor-defiziente DBA/1-Mäuse verglichen mit Wildtyp-Mäusen eine schwere destruktive Arthritis mit höherer Inzidenz entwickeln (158-160). Diese Diskrepanz hat ihre Parallele

* Hintergrund-Gene = große Anzahl von Genen außerhalb des MHC-Komplexes

in teilweise widersprüchlichen Ergebnissen hinsichtlich der Rolle von IFN- γ für die Entwicklung von T_H1-Zellen. So wurde in Studien an IFN- γ -Rezeptor-defizienten Mäusen gezeigt, daß eine Entwicklung von T_H1-Zellen möglich ist, obwohl IFN- γ in diesen Mäusen nicht wirksam sein sollte (309;310). Am Beispiel einer Infektion dieser Mäuse mit dem *Pseudorabies*-Virus konnte zudem demonstriert werden, daß es auch ohne die Wirkung von IFN- γ zur endogenen Synthese von IL-12 kommt, und daß das Virus-induzierte IL-12 in der Lage ist, die Entwicklung von T_H1-Zellen in gleichem Maße wie bei Wildtyp-Mäusen zu fördern (309;311;312). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß IFN- γ -Rezeptor-defiziente C57Bl/6-Mäuse parallel zu einer starken *Leishmania major* Infektion eine zelluläre Immunantwort vom T_H1-Typ entwickeln (310). Dies steht im Widerspruch zu Beobachtungen an IFN- γ -defizienten Mäusen auf C57BL/6-Hintergrund, die als Folge einer *L. major* Infektion eine Immunreaktion vom T_H2-Typ mit schwererer Erkrankung entwickelten (313) bzw. bei einer *Influenza*-Virusinfektion eine verstärkte virusspezifische Bildung von IL-4 und IL-5 der *ex vivo* stimulierten CD4⁺ T-Zellen zeigten (312). Diese Ergebnisse lassen die Schlußfolgerung zu, daß, obwohl IFN- γ -Rezeptor- und IFN- γ -defiziente Mäuse einen gleichartigen, auf einem Funktionsverlust von IFN- γ basierenden Phänotyp aufweisen sollten, gewisse Unterschiede in den Immunreaktionen dieser Mäuse bestehen. Eine befriedigende Erklärung für diesen Widerspruch gibt es bisher nicht. Die in den zitierten Arbeiten verwendeten Mäuse besitzen einen genetischen Defekt in der α -Kette des IFN- γ -Rezeptors. Es könnte die Möglichkeit bestehen, daß die genetisch intakte β -Kette dieses Rezeptors entweder allein oder kombiniert mit einem anderen unbekanntem Protein noch eine gewisse Restaktivität gegenüber IFN- γ hat. *In vitro* Experimente mit T-Zellen dieser Mäuse lieferten aber dafür bisher keine Hinweise (H. D. Dr. habil. E. Schmitt, persönliche Mitteilung). Von besonderem Interesse ist in diesem Zusammenhang der kürzlich publizierte Befund, wonach IFN- γ -Rezeptor-defiziente Mäuse, bei denen das Gen für die β -Kette des IFN- γ -Rezeptors inaktiviert wurde, phänotypisch weitgehend mit den IFN- γ -defizienten Mäusen identisch sind. Dieser Befund würde die Annahme unterstützen, daß IFN- γ -Rezeptor- α -Kette-defiziente Mäuse nicht völlig unreaktiv gegenüber IFN- γ sind.

Eine weitere Möglichkeit wäre, daß IFN- γ -defiziente F2-Hybridmäuse einen Defekt in der Antigenpräsentation besitzen, da in Abwesenheit von funktionell aktivem IFN- γ eine geringere Expression von MHC-Molekülen beschrieben wurde (177;314), welche

zu einer ungenügenden Antigenpräsentation führen könnte. Die Tatsache, daß die Entwicklung CII-spezifischer IL-2-produzierender CD4⁺ T-Zellen in IFN- γ -defizienten F2-Hybridmäusen vergleichbar zu nicht IFN- γ -defizienten F2-Hybridtieren war (s. III.3.3.3), zeigt, daß auch in IFN- γ -defizienten F2-Tieren eine ausreichende Antigenpräsentation stattfindet.

Laut unseren Ergebnissen war sowohl das Auftreten einer CIA (s. III.3.3.1) als auch die humorale CII-spezifische Antwort (s. III.3.3.2) von IFN- γ abhängig. Aus der Literatur ist bekannt, daß IFN- γ entscheidend am Antikörperklassenwechsel nach IgG_{2a} beteiligt ist (315). Dies steht im Einklang mit früheren Ergebnissen, wonach insbesondere CII-spezifischen IgG_{2a}-Antikörpern eine essentielle Rolle in der Pathogenese der CIA zukommt (137;316) und weiterhin eine CIA nicht zu induzieren ist, wenn die humorale Komponente der CII-spezifischen Immunantwort blockiert wird (132;317). Somit würde auch die stark reduzierte Bildung CII-spezifischer Antikörper in IFN- γ -defizienten F2-Hybridmäusen die Resistenz gegen eine CIA erklären. Die verminderte humorale Immunantwort dieser Tiere gegen CII läßt sich jedoch durch die Gabe von exogenem IFN- γ aufheben (s. III.3.3.4). Diese Ergebnisse belegen daher, daß die humorale Immunreaktion gegen CII von IFN- γ abhängig ist.

Wie schon oben erwähnt, zeigen sowohl die Ergebnisse früherer Studien (282-285) als auch unsere Daten, daß die Einwanderung von Lymphocyten in Gelenke für die Initiation einer CIA notwendig ist. IFN- γ kann seinerseits die Synthese von Chemokinen wie z.B. IP-10 induzieren. IFN-induzierbares Protein-10 (IP-10) gehört zur CXC-Chemokin*-Familie und wirkt chemotaktisch auf aktivierte T-Zellen (318;319). Ferner erhöht dieses Protein die Adhäsion von aktivierten T-Zellen an Endothelzellen (320;321). Darüber hinaus kann IFN- γ die Expression des Chemokin-Rezeptors CCR1** fördern, welcher präferentiell auf T_H1-Zellen exprimiert wird, und somit die Einwanderung von T_H1-Zellen in periphere Gewebe unterstützt (57). Weiterhin zeigen vor kurzem publizierte Studien, daß die Synthese von zwei während der CIA hoch exprimierten Chemokinen, RANTES und MCP-1***, sowohl in IFN- γ - als auch in IFN-

* Chemokine werden aufgrund der Struktur der aminoterminalen Cysteine in 4 Klassen (CXC, CC, C und CX3C) unterteilt. CXC: 2 Cysteine (C) werden durch eine andere Aminosäure (X) getrennt.

** sogenannte „Sieben Transmembran-Domänen-Rezeptoren“. Bis heute sind mindestens 8 CC-Rezeptoren (CCR) kloniert und charakterisiert worden. CCR1 bindet die CC-Chemokine MCP-2 und MCP3.

*** RANTES (*regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted*) und MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) gehören zur CC-Chemokin-Familie und fördern die Wanderung der Monocyten.

γ -Rezeptor-defizienten Mäusen nicht nachgewiesen werden konnte (322). Somit wäre es möglich, daß die Arthritisresistenz von IFN- γ -defizienten F2-Hybridmäusen auf einer verminderten Einwanderung von Lymphocyten in die Gelenke entweder auf eine veränderte Expression von Chemokin-Rezeptoren oder eine geringe Synthese von Chemokinen in diesen Tieren zurückzuführen ist.

IFN- γ ist eines der wichtigsten Cytokine zur Aktivierung von Makrophagen. Neben anderen Effekten wird durch IFN- γ in aktivierten Makrophagen die Bildung von TNF- α induziert und die Synthese von IL-12 erheblich gesteigert (177;178). Darüber hinaus zeigten frühere Studien an IFN- γ -defizienten Mäusen, daß die Bildung von TNF- α , IL-1 α , IL-6 und IL-12 nach Stimulation mit bakteriellen Produkten, verglichen mit Wildtyp-Mäusen, drastisch reduziert war (185;314). Da jedes der vier erwähnten Cytokine an der Pathogenese einer CIA beteiligt zu sein scheint (92;120;323-329), könnte die verminderte Synthese dieser Cytokine in IFN- γ -defizienten F2-Hybridmäusen ebenfalls ein wichtiger Faktor der Arthritisresistenz sein. Hinweise hierfür liefern auch unsere Beobachtungen, daß in IFN- γ -defizienten Mäusen die Produktion von TNF- α und IL-6 nach Stimulation mit bakteriellen Produkten im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen herabgesetzt war (s. III.3.3.6). Dies korrelierte mit der verstärkten Produktion von IL-10 in IFN- γ -defizienten Mäusen (s. III.3.3.6), welches als ein sehr potenter Inhibitor von Entzündungsreaktionen bekannt ist. IL-10 hat die Fähigkeit, die Cytokinsynthese in Makrophagen, T- und NK-Zellen sowie verschiedene akzessorische Funktionen von Makrophagen zu inhibieren (330;331). Zum Beispiel konnte in mehreren Studien gezeigt werden, daß IL-10 ein sehr potenter Inhibitor der IL-12-Synthese von Makrophagen (182;332-334) und dendritischen Zellen (304) ist. IL-10 stellt somit ein Cytokin dar, welches die Entwicklung und Aktivierung von T_H1-Zellen unterdrücken kann (335). Ein wesentlicher Befund in diesem Zusammenhang ist, daß die Entwicklung von Autoimmunkrankheiten u.a. wahrscheinlich durch die Balance zwischen IL-10 und IL-12 kontrolliert zu werden scheint (336). Dies ließ die Vermutung zu, daß IFN- γ -defiziente F2-Hybridmäuse möglicherweise kaum IL-12 produzieren, welches nicht ausreicht, um eine CIA in diesen Tieren zu induzieren. Tatsächlich ergaben Versuche, bei denen zu Beginn der Immunisierung IL-12 exogen appliziert wurde (s. III.3.3.5), daß auch IFN- γ -defiziente F2-Hybridmäuse unter diesen Bedingungen eine schwere Arthritis entwickeln können. Dieser Befund steht im Einklang mit Daten, wonach IL-12 die Synthese von IL-10 supprimiert (336). Da IFN- γ -

defiziente F2-Hybridmäuse kein IFN- γ bilden können, kann IL-12 offensichtlich auch unabhängig von IFN- γ die Induktion einer CIA vermitteln. Die Tatsache, daß in IFN- γ -Rezeptor-defizienten Mäusen eine CIA durch die Neutralisation von IL-12 verhindert werden kann, unterstreicht eine von IFN- γ unabhängige Funktion von IL-12 in der Pathogenese einer CIA. IL-12 scheint somit eine zweifache Bedeutung bei der Entstehung einer CIA zuzukommen, zum einen als direkter Induktor der Krankheit, wie am Beispiel der IFN- γ -defizienten F2-Hybridmäuse nachgewiesen wurde, zum anderen als starker Promoter der IFN- γ -Bildung in normalen Mäusen. Über die Mechanismen, durch die IL-12 in Abwesenheit von IFN- γ eine schwere destruktive Arthritis auslösen kann, ist bisher nichts bekannt. Allerdings könnte der von IFN- γ unabhängige, arthritsfördernde Effekt von IL-12 im Zusammenhang mit einer verstärkten Synthese von TNF- α bzw. von induzierbarer NO-Synthase (iNOS) stehen. Hinweise hierfür liefern Studien an IFN- γ -defizienten Mäusen, die zeigen, daß die Behandlung mit exogenem IL-12 nach einer Infektion mit *Leishmania donovani* die Synthese von TNF- α und iNOS fördert. Somit konnten die mit IL-12 behandelten Tiere in Abwesenheit von funktionell aktivem IFN- γ die Infektion kontrollieren (337;338). Ob die Induktion einer CIA in IFN- γ -defizienten F2-Hybridmäusen ein direkter Effekt von IL-12 ist oder durch TNF- α vermittelt wird, ist nicht klar. In diesem Zusammenhang wäre es interessant zu wissen, ob durch eine Behandlung mit exogenem TNF- α eine CIA in IFN- γ -defizienten Mäusen bzw. in Mäusen, die sowohl für IFN- γ - als auch für IL-12-defizient sind, induziert werden kann.

7. THERAPEUTISCHE ANSÄTZE ZUR BEHANDLUNG EINER CIA

Wie schon oben erwähnt, entwickeln TCR- β tg-Mäuse eine schwere chronische Arthritis (s. III.1.1). Sie stellen daher ein besonders anspruchsvolles Modell für die Untersuchung der Wirksamkeit verschiedener immuntherapeutischer Maßnahmen dar. Wie auch bei anderen Autoimmunkrankheiten richtet sich bei einer CIA die Immunantwort gegen körpereigene Antigene (CII). Das Behandlungsziel ist diese Antwort abzuschwächen, um Gewebeschäden und Funktionsstörungen zu verhindern. Unser vorrangiges Behandlungskonzept bestand darin, die erkrankten Mäuse zunächst durch eine entzündungshemmende Therapie, z.B. durch die Gabe von Glukokortikoiden, wie Dexamethason, transient von den CIA-Symptomen zu befreien

und zusätzlich verschiedene immunmodulatorische Agenzien einzusetzen, um eine pathologische Immunantwort in eine harmlose Reaktion umzuwandeln bzw. zu unterdrücken (s. III.4.3).

Glukokortikoide entfalten ihre Wirkung über intrazelluläre Rezeptoren, die in jeder Körperzelle exprimiert werden und die Transkription spezifischer Gene regulieren. Sie verringern die Produktion von Entzündungsmediatoren wie Cytokinen (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α , GM-CSF), Chemokinen (*macrophage activating factor*, *migration inhibitory factor*), Prostaglandinen (Phospholipase A₂, Cyclooxygenase Typ 2) und Stickstoffmonoxid (192;339). Sie blockieren die Einwanderung von Entzündungszellen an den Ort der Entzündung, indem sie die Kapillardurchlässigkeit senken und die Expression der entsprechenden Adhäsionsmoleküle verhindern (193;339). Weiterhin fördern sie bei Leukocyten und Lymphocyten die Apoptose (340;341). Ferner ist die starke Hemmung, welche Glukokortikoide auf die Phagozytose ausüben (339), von besonders großer Bedeutung.

Darüber hinaus existieren Hinweise, daß Glukokortikoide zu einer polarisierten T-Helferzellendifferenzierung führen, indem sie eine T_H1-zellvermittelte Immunität antagonisieren, entweder durch eine direkte Hemmung der IFN- γ -Synthese (342) oder indirekt, indem sie einerseits die Expression der IL-12-Rezeptor- β_2 -Kette auf T_H1-Zellen inhibieren (343) und andererseits die IL-12-Produktion senken. Somit fördern Glukokortikoide indirekt eine T-Zellendifferenzierung zum T_H2-Typ (194;195). Auf molekularer Ebene scheint für die cytokinhemmende Wirkung von Dexamethason die Fähigkeit essentiell zu sein, die Funktion von Transkriptionsfaktoren wie STAT-4 und NF- κ B zu inhibieren, welche die Biosynthese von IFN- γ und IL-12 kontrollieren (342;344). Darüber hinaus wurde gezeigt, daß Glukokortikoide die Reifung von dendritischen Zellen hemmen. Unreife DCs können ihrerseits die Entwicklung von IFN- γ -produzierenden T_H1-Zellen verhindern und fördern sie die Entwicklung von IL-10-produzierenden regulatorischen T-Zellen (345).

Somit greifen Glukokortikoide auf vielfältige Weise in das Entzündungsgeschehen und in zelluläre Immunreaktionen ein. Da alle der oben erwähnten Entzündungsmediatoren an der Pathogenese einer CIA beteiligt zu sein scheinen (346), erschien es sinnvoll, das Glukokortikoid Dexamethason zur Therapie einer etablierten Arthritis einzusetzen, um die akute Entzündungsreaktion zu unterdrücken und die autoreaktive Immunreaktion zu mindern. Unseren Ergebnissen nach führte die

Dexamethason-Therapie bei TCR- β g-Mäusen zu einer Verminderung der Krankheitssymptome – gemessen wurde die Inzidenz und die Schwere der Arthritis (s. III.4.3.1). Außerdem wurde sowohl die zelluläre als auch die humorale Immunantwort gegen CII vermindert (s. III.4.3.1). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Studien an RA-Patienten, die zeigen, daß die Behandlung mit Glukokortikoiden ebenfalls zur Verminderung der Autoimmunreaktion führt (339). Auch Immunsuppressiva, wie z.B. Methotrexat^{*}, können den Krankheitsverlauf positiv beeinflussen (347-349).

Neben einer entzündungshemmenden Therapie mit Glukokortikoiden, welche die allgemeine Reaktionsfähigkeit des Immunsystems auf verschiedenen Ebenen hemmt, werden auch spezifische Maßnahmen zur Hemmung der einzelnen Entzündungsmediatoren zur Therapie einer etablierten Arthritis angewendet. So wird z.B. durch eine Behandlung mit einer Reihe von Inhibitoren der Matrixmetalloproteinasen, wie z. B. Lipoxin A₄ und SLPI, versucht, eine Arthritis zu therapieren (350-354). Eine weitere Möglichkeit zur Arthritistherapie liefert die Anwendung von Inhibitoren, welche die Cyclooxygenase^{**} Typ 2 spezifisch inhibieren und somit die Prostaglandin-Synthese vermindern (355;356).

Es muß ausdrücklich darauf hingewiesen werden, daß es sich bei der Anwendung der entzündungshemmenden Substanzen um eine rein symptomatische Therapie handelt, welche die Ursache der Entzündung nicht beseitigt. Dies erklärt, warum der in dieser Arbeit beobachtete krankheitsunterdrückende Effekt der Dexamethason-Behandlung nur auf die Dauer der Medikation beschränkt war (s. III.4.3.1). Darüber hinaus hat der Einsatz von Glukokortikoiden den Nachteil, daß sowohl schädigende als auch schützende Funktionen des Immunsystems in gleicher Weise unterdrückt werden. Diese Eigenschaft und weitere Nebenwirkungen sind so gravierend, daß die Behandlung nicht ständig fortgesetzt werden kann, was dann umgehend zum erneuten Auftreten der Symptome führt.

Es stellte sich also die Frage, wie man die Immunantwort kontrollieren kann, so daß einerseits die krankheitsbedingte Entzündungsreaktion abgeschwächt, andererseits aber

^{*} Methotrexat (MTX) greift als Antimetabolit in den Folsäurestoffwechsel ein. Durch Bindung an das Enzym Dihydrofolatreduktase wird die intrazelluläre Reduktion von Folat zu Tetrahydrofolat und damit der für die Biosynthese von Thymidin und der Purine notwendige C1-Stoffwechsel blockiert. Die verminderte DNA- und RNA-Synthese führt zu Funktionsverlust und Zelltod.

^{**} Cyclooxygenasen sind Enzyme, welche die Synthese von Prostaglandinen regulieren. Bis heute sind zwei Isoenzyme COX-1 und COX-2, bekannt. COX-1 wird konstitutiv exprimiert, COX-2 hingegen wird durch einen Entzündungsstimulus, wie z.B. IL-1 und bakterielle Produkte, in Makrophagen, Endothelzellen und Synovialzellen induziert und sorgt für eine gesteigerte Synthese von Prostaglandinen

Schäden durch die toxischen Nebenwirkungen des Medikamentes vermieden werden können. In diesem Zusammenhang erschien es sinnvoll für eine Therapie einer etablierten Arthritis, die Entzündungsreaktion mit Hilfe von Dexamethason kurzfristig zu unterdrücken und zusätzlich verschiedene immunomodulatorische Agenzien einzusetzen.

CD4⁺ T-Zellen sind ein besonders attraktives Ziel für eine Immuntherapie einer CIA, da sie eine aktive, dominierende Rolle bei der Auslösung dieser Krankheit zu spielen scheinen. In diesem Zusammenhang wäre es zur Therapie dieser Krankheit wünschenswert, die krankheitsverursachenden CD4⁺ T-Zellen spezifisch anzugreifen. Der Einsatz von anti-CD4-Antikörpern bietet im Gegensatz zu Glukokortikoiden die Möglichkeit, Immunreaktionen auf eine viel spezifischere, nicht toxische Weise zu beeinflussen. Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang der Befund, daß ein nicht depletierender anti-CD4-Antikörper, den man nach dem Auftreten einer CIA verabreicht hat, in TCR- β tg-Tieren das Krankheitsbild verbessert (200). Diese Unterdrückung der Krankheitsentwicklung ist auf CD4⁺ T-Zellen zurückzuführen, die für T_H2-Zellen typische Cytokine produzieren. Möglicherweise begünstigt die Gegenwart von anti-CD4-Antikörpern zu diesem Zeitpunkt die Differenzierung zu T_H2-Zellen, weil die Stärke der Wechselwirkung zwischen APCs und reaktiven T-Zellen herabgesetzt wird, da solche Antikörper die Bindung zwischen CD4- und MHC-Klasse-II-Molekülen inhibieren. Diese Daten stehen im Einklang mit Studien an RA-Patienten, die ebenfalls einen therapeutisch wirksamen Effekt der Behandlung mit dem nicht deplatierenden anti-CD4-Antikörper erkennen ließen (357).

Die Blockade der Interaktion von MHC-Klasse-II-Molekül und T-Zellrezeptor liefert eine weitere Möglichkeit, die Aktivierung von T-Zellen zu verhindern. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, daß sowohl die Gabe von anti-TCR-V β 8.2-Antikörpern (358-360) als auch von synthetischen Polypeptiden, welche die Struktur der komplementaritätsbestimmenden Region 3* (complementarity determining region 3 = CDR3) von krankheitsassoziierten T-Zellrezeptoren imitieren, die T-Zellaktivierung hemmt und eine in Gang gesetzte Zerstörung des Knorpels aufhalten kann (361-364). Neuerdings wird versucht, durch die Behandlung mit synthetischen immunodominanten CII-Peptiden oder mit veränderten CII-Peptiden (*altered peptide ligands*), welche

im Rahmen einer Entzündungsreaktion.

* Komplementaritätsbestimmende Regionen sind die hypervariablen Schleifen am Ende einer V-Domäne von T-Zellrezeptoren, die die Antigenbindungsstelle bilden und die Spezifität des TCRs festlegen.

ebenfalls antagonistisch auf die T-Zellaktivierung wirken, CII-spezifische T-Zellen zu anergisieren und somit eine Reduktion der Krankheitsaktivität zu erreichen (365-367).

Es muß hier betont werden, daß eine erfolgreiche Behandlung einer bereits etablierten Arthritis sehr schwierig ist. Dies zeigte sich bei der kombinierten Behandlung von Dexamethason mit einem depletierenden anti-CD4-Antikörper. Auch sie erbrachte keine dauerhafte Suppression einer etablierten Arthritis bei TCR- β tg-Mäusen (s. III.4.3.2). Die anti-CD4-Therapie alleine, welche die Induktion einer CIA erfolgreich verhinderte (s. III.4.1.1), versagte, wenn das Krankheitsbild bereits voll ausgebildet war. Diesbezüglich ergaben Studien an RA-Patienten, denen die CD4⁺ T-Zellen depletiert worden waren, widersprüchliche Ergebnisse. Einerseits wurde über eine positive Wirkung dieser Therapie berichtet (368), andererseits zeigen Daten anderer Studien, daß diese Therapie zur Verschlimmerung der Symptome führt (369). Diese Diskrepanz könnte durch Ergebnisse späterer Untersuchungen erklärt werden, die zeigen, daß die Behandlung mit anti-CD4-Antikörpern im humanen System bevorzugt zur Eliminierung zirkulierender naiver T-Zellen führt, hingegen werden ausdifferenzierte IFN- γ -produzierende T_H1-Zellen nicht depletiert (370).

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit dafür, daß sich durch eine anti-CD4-Therapie keine signifikante Verminderung der Krankheitssymptome bei einer bereits etablierten CIA erzielen läßt (s. III.4.3.2) wäre, daß CD4⁺ T-Zellen im späteren Krankheitsverlauf, im Gegensatz zur Induktionsphase, keine große Bedeutung mehr haben, d.h. daß pathogene Prozesse in der Spätphase dieser Erkrankung eventuell weitgehend unabhängig von CD4⁺ T-Zellen ablaufen (99;371). Hinweise hierfür liefern Experimente zur Blockade von TNF- α und IL-1, welche überwiegend von aktivierten synovialen Makrophagen sezerniert werden (61;325-327;372-376). Diese Cytokine aktivieren die Osteoklasten und Chondrocyten des Synoviums, welche dann ihrerseits große Mengen an FGF (*fibroblast growth factor*) und GM-CSF produzieren. Diese Faktoren wiederum wirken stimulierend auf Makrophagen und fördern die weitere Synthese von TNF- α und IL-1. Somit scheint der in Gang gesetzte Entzündungsprozeß im Knorpel unabhängig von den Effektorfunktionen der T_H-Zellen zu sein. So ist möglicherweise zu erklären, warum auch nach Zerstörung pathogener T_H-Zellen infolge einer Behandlung mit anti-CD4-Antikörpern der Krankheitsprozeß noch für lange Zeit aufrechterhalten werden kann. Im Hinblick auf die dominierende Rolle von TNF- α und IL-1 in der Spätphase einer Arthritis konnte in zahlreichen Studien gezeigt werden, daß

sich durch die Blockade dieser Cytokine eine Abschwächung der Arthritissymptome erzielen läßt. So führt die Neutralisation von TNF- α entweder durch anti-TNF- α -Antikörper oder durch Anwendung von Fusionsproteinen mit löslichen TNF- α -Rezeptoren (p55 und p75) (sTNFR-Ig) sowohl im CIA-Modell (325;360;375-378) als auch bei RA-Patienten (326;374;375) in beeindruckender Weise zu einer temporären Verminderung der Symptome. Ferner wurde berichtet, daß die Blockade von IL-1 entweder durch anti-IL-1-Antikörper oder einen IL-1-Rezeptor-Antagonisten (IL-1Ra) bei einer CIA ebenfalls therapeutischen Nutzen hat (327;360;375). Allerdings muß darauf hingewiesen werden, daß die Wirkung solcher Behandlungsmethoden, ähnlich wie bei der Therapie mit Glukokortikoiden, auf der Hemmung der entzündlichen Prozesse beruht und auf die Dauer der Medikation beschränkt ist. Wie berichtet, gelingt es nur durch eine Apoptose-Induktion der am Entzündungsprozeß des Knorpels beteiligten Zellen infolge einer intraartikulären CD95L^{*}-Gentherapie, den in Gang gesetzten Zerstörungsprozeß dauerhaft zu unterdrücken (379;380).

In weiteren experimentellen Ansätzen zur Behandlung einer CIA wird versucht, mit einer Cytokintherapie die Immunreaktion so zu beeinflussen, daß die Immunantwort von einem krankheitsverursachenden auf einen krankheitssupprimierenden Weg umgeleitet wird (381;382). So konnte gezeigt werden, daß durch eine direkte Injektion von rekombinantem IL-10 bzw. TGF- β in das betroffene Gewebe, wodurch auf mehreren Ebenen die Pathogenese einer CIA gehemmt werden könnte, die Entzündung unterdrückt und eine Rückbildung von Krankheitssymptomen erreicht werden kann (383-385). Darüber hinaus werden diese entzündungshemmenden Cytokine in Kombinationstherapien zusammen mit Glukokortikoiden oder dem sTNFR-Ig bei der Therapie einer CIA eingesetzt (324;378;386-388). Studien zur Therapie mit IFN- β lieferten bei einer CIA ebenfalls positive Ergebnisse. Der genaue Wirkungsmechanismus ist allerdings nicht geklärt (389;390).

In der vorliegenden Arbeit wurden ebenfalls Versuche zur Therapie einer bereits etablierten Arthritis durch Neutralisation der endogen gebildeten Cytokine IL-12 und IFN- γ durchgeführt (s. III.4.3.3). Die anti-Cytokin-Behandlung erfolgte jedoch erst ,nachdem die akute Entzündungsreaktion durch Dexamethason unterdrückt und anschließend die CD4⁺ T-Zellen durch eine einmalige Behandlung mit anti-CD4-

* CD95L ist ein Protein der TNF-Familie, das an CD95 auf aktivierten Zellen bindet und Apoptose induziert.

Antikörper vorübergehend eliminiert worden waren. Diese Vorgehensweise beruhte auf der Arbeitshypothese, daß nach weitgehender Depletion der CD4⁺ T-Zellen und damit auch der krankheitsassoziierten T_H1-Effektorzellen die Neuentwicklung solcher Zellen durch Neutralisation der T_H1-induzierenden Cytokine IL-12 und IFN- γ vermieden und die CII-spezifische Immunantwort in eine pathologisch unschädliche Richtung (z.B. bevorzugte Differenzierung von T_H2-Zellen) umgelenkt werden könnte. Tatsächlich gelang es durch diese Kombinationstherapie auch nach Absetzen der Behandlung, die Symptome auf niedrigem Niveau dauerhaft zu stabilisieren (s. III.4.3.3). Analoge Untersuchungen mit dem Ziel einer Modulation der Entwicklung von T_H-Zellen, allerdings in umgekehrter Richtung von etablierten T_H2- zu T_H1-Zellen, wurden von Heinzel und Mitarbeitern am Infektionsmodell mit *L. major* durchgeführt (392). Eine Depletion der CD4⁺ T-Zellen alleine war ebenfalls nicht ausreichend, um die Balance zwischen in diesem Modell nicht schützenden T_H2- zugunsten schützender T_H1-Zellen zu verschieben. Dies gelang jedoch bei zusätzlicher Behandlung mit anti-IL-4-Antikörpern und rekombinantem IL-12. Damit war es möglich, die krankheitsassoziierte T_H2-Reaktion in eine infektionssupprimierende T_H1-Reaktion umzuwandeln (391).

Die diskutierten Ergebnisse dokumentieren eindrucksvoll die Komplexität der Pathogenese einer CIA, was vermuten läßt, daß eine erfolgreiche Therapie dieser Krankheit wahrscheinlich nicht durch Einzelmaßnahmen, sondern nur durch Kombination verschiedener Behandlungsmethoden möglich sein wird.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Die Immunisierung von Mäusen bestimmter Mausstämme (z.B. DBA/1) mit Kollagen-Typ-II (CII) führt zu Gelenkentzündungen, die in ihrem Verlauf der Rheumatoiden Arthritis (RA) beim Menschen ähnlich sind. Die Pathogenese der RA ist bis heute nicht geklärt. Es gibt allerdings Hinweise, daß sowohl CII-spezifische CD4⁺ T-Lymphocyten als auch CII-spezifische Antikörper entscheidend an der Induktion und Aufrechterhaltung dieser sehr wahrscheinlich autoimmunen Erkrankung beteiligt sind.

Die vorliegende Arbeit diene hauptsächlich der Untersuchung von T-Zell-vermittelten Mechanismen, die an der Induktion einer CII-induzierten Arthritis (CIA) beteiligt sind. Darüber hinaus sollten Möglichkeiten einer kurativen Intervention, insbesondere durch Manipulation der beteiligten T-Zellen, getestet werden. Zu diesem Zweck wurden DBA/1-Mäuse verwendet, die transgen für die T-Zellrezeptor (TCR) β -Kette eines CII-spezifischen, arthritogenen T-Zellklons sind. Im Gegensatz zu normalen DBA/1-Mäusen, die mindestens zweimal immunisiert werden müssen und nur zu 50% erkranken, entwickeln 100% der transgenen Tiere schon nach der Primärimmunisierung innerhalb von 2-4 Wochen eine CIA mit schweren klinischen Symptomen. Damit assoziiert ist eine im Vergleich zu normalen DBA/1-Mäusen verstärkte zelluläre (CII-induzierte IFN- γ -Bildung) und humorale (CII-spezifische Antikörperproduktion) Immunantwort. Transferversuche zeigten, daß die Übertragung von Milzzellen transgener Mäuse auf normale DBA/1-Mäuse sowohl die Antikörperbildung gegen CII als auch die Schwere und die Inzidenz der resultierenden CIA signifikant erhöht.

Viele Untersuchungen deuten darauf hin, daß vor allem T_H1-Zellen entscheidend an der Entstehung einer CIA beteiligt sind. In diesem Zusammenhang sind besonders die T_H1-Cytokine TNF- α und IFN- γ von herausragender Bedeutung. Während die Funktion von TNF- α als einem essentiellen Mediator der unmittelbaren Entzündungsreaktion bei der RA unbestritten ist, gibt es widersprüchliche Befunde hinsichtlich der Funktion von IFN- γ . Einerseits kann die Neutralisation von IFN- γ bei der Induktion einer CIA die Entstehung der Krankheit vollständig inhibieren, andererseits wurde publiziert, daß in Mäusen, die defizient für die IFN- γ -Rezeptor- α -Kette sind und die somit nicht auf IFN- γ reagieren können, eine schwere destruktive Arthritis mit hoher Inzidenz induzierbar ist. IFN- γ scheint also einerseits essentiell für die Entstehung einer CIA zu sein, während sich andererseits das Fehlen seines

Rezeptors eher verschlimmernd auswirkt. Zur Klärung der Funktion von IFN- γ wurden in der vorliegenden Arbeit die oben erwähnten TCR- β -transgenen (TCR- β tg) Mäuse mit Mäusen gekreuzt, die defizient für die Produktion von IFN- γ (IFN- γ KO) sind. Es zeigte sich, daß keine der verwendeten F2 (IFN- γ KO, TCR- β tg)-Mäuse nach Immunisierung Symptome einer CIA entwickelten. Da bei der Behandlung mit IFN- γ ein Großteil dieser Tiere eine CIA entwickelte, konnte gezeigt werden, daß dieser Befund nicht auf einem sekundären Defekt der F2-Mäuse beruhte. Offensichtlich scheint IFN- γ also essentiell für die Entstehung einer CIA zu sein. Unerwarteterweise führte aber auch die Behandlung mit IL-12 von F2 (IFN- γ KO, TCR- β tg)-Mäusen zur Entwicklung einer CIA. Da solche Mäuse kein IFN- γ bilden können, kann IL-12 offensichtlich auch unabhängig von IFN- γ die Induktion einer CIA vermitteln. IL-12 scheint somit eine zweifache Bedeutung bei der Entstehung einer CIA zuzukommen, einerseits als direkter Induktor, wie am Beispiel der IFN- γ KO-Mäuse nachgewiesen werden konnte, und andererseits als starker Promoter der IFN- γ -Bildung in normalen DBA/1-Mäusen.

In einer weiteren Reihe von Experimenten wurde versucht, die Entstehung einer CIA zu unterdrücken. Zu diesem Zweck wurde zuerst ein IL-12-Antagonist, (IL-12(p40)₂), der aus einem Homodimer der IL-12p40-Kette besteht, eingesetzt. Die Behandlung von TCR- β tg DBA/1-Mäusen mit IL-12(p40)₂ verzögerte die Entwicklung einer CIA um zwei Wochen und führte zu deutlich abgeschwächten Krankheitssymptomen, konnte aber nicht die Induktion einer CIA verhindern. In einem zweiten Versuch wurde die Wirkung von anti-CD44-Antikörpern getestet, welche die Migration aktivierter T-Lymphocyten in das periphere Gewebe inhibieren. Während der Behandlung mit diesen Antikörpern wurde die Entwicklung einer CIA vollständig blockiert. Nach dem Ende der Behandlung traten allerdings innerhalb von drei Tagen schwere Arthritissymptome bei allen behandelten Tieren auf. Dieses Ergebnis weist darauf hin, daß an der Induktion einer CIA offensichtlich T-Lymphocyten beteiligt sind und diese lokal am Ort der Entzündungsreaktion vorhanden sein müssen. Schließlich wurde versucht, direkt die beteiligten CD4⁺ T-Lymphocyten unter Verwendung von depletierenden anti-CD4-Antikörpern bei der Induktion einer CIA zu eliminieren. Diese Behandlung führte im Fall normaler DBA/1-Mäuse dazu, daß keine CIA induziert werden konnte. Im Fall der TCR- β tg DBA/1-Mäuse traten aber Arthritissymptome parallel mit dem Wiedererscheinen der CD4⁺ T-Lymphocyten im Blut auf. Die höhere Frequenz arthritogener CD4⁺ T-Lymphocyten, die vermutlich in den TCR- β tg DBA/1-

Mäusen vorhanden ist, durchbricht somit den kurativen Effekt der anti-CD4-Behandlung.

In einem weiteren Ansatz wurde versucht, in TCR- β g-Mäusen eine etablierte CIA zu therapieren. Da schon die Induktion einer CIA durch singuläre Maßnahmen (IL-12(p40)₂, anti-CD4) nicht zu inhibieren war, sollten die therapeutischen Maßnahmen in einer Kombination verschiedener Behandlungsmethoden bestehen. Vorrangiges Ziel war die schnelle Suppression der Arthritissymptome. Dies gelang mit Hilfe des Glukokortikoids Dexamethason. Allerdings sind die Nebenwirkungen einer solchen Behandlung so gravierend, daß sie nach etwa einer Woche unterbrochen werden muß, was umgehend zum erneuten Auftreten der Symptome führt. Dexamethason wurde deshalb mit einer anti-CD4-, anti-IFN- γ - und einer IL-12(p40)₂-Behandlung kombiniert. Die Kombination von Dexamethason mit den einzelnen Agenzien führte zu keiner Verbesserung des Krankheitsbildes. Wurde Dexamethason allerdings zusammen mit einer Depletion der CD4⁺-T-Lymphocyten und einer gleichzeitigen Neutralisation von IL-12 und IFN- γ eingesetzt, konnte auch nach Absetzen der Behandlung eine dauerhafte Stabilisierung der Symptome auf relativ niedrigem Niveau beobachtet werden.

Die Induktion einer CIA beruht also auf einer ganzen Reihe von Faktoren, was letztendlich dazu führt, daß eine erfolgreiche Therapie einer solchen Krankheit nicht durch Einzelmaßnahmen, sondern nur durch Kombination verschiedener Behandlungsmethoden möglich sein wird.

VI. LITERATUR

1. **Seder, R.A. and W.E. Paul.** 1994. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. *Annu.Rev.Immunol.* 12:635-73:635.
2. **Rocken, M., J.H. Saurat, and C. Hauser.** 1992. A common precursor for CD4+ T cells producing IL-2 or IL-4. *J.Immunol.* 148:1031.
3. **Mosmann, T.R., H. Cherwinski, M.W. Bond, M.A. Giedlin, and R.L. Coffman.** 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J.Immunol.* 136 :2348.
4. **Romagnani, S.** 1997. The Th1/Th2 paradigm. *Immunol.Today* 18 :263.
5. **Fiorentino, D.F., M.W. Bond, and T.R. Mosmann.** 1989. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J.Exp.Med.* 170:2081.
6. **Sornasse, T., P.V. Larenas, K.A. Davis, J.E. de Vries, and H. Yssel.** 1996. Differentiation and stability of T helper 1 and 2 cells derived from naive human neonatal CD4+ T cells, analyzed at the single-cell level. *J.Exp.Med.* 184:473.
7. **Zhai, Y., R.M. Ghobrial, R.W. Busuttill, and J.W. Kupiec-Weglinski.** 1999. Th1 and Th2 cytokines in organ transplantation: paradigm lost? *Crit.Rev.Immunol.* 19:155.
8. **Katsikis, P.D., S.B. Cohen, M. Londei, and M. Feldmann.** 1995. Are CD4+ Th1 cells pro-inflammatory or anti-inflammatory? The ratio of IL-10 to IFN-gamma or IL-2 determines their function. *Int.Immunol.* 7:1287.
9. **Firestein, G.S., W.D. Roeder, J.A. Laxer, K.S. Townsend, C.T. Weaver, J.T. Hom, J. Linton, B.E. Torbett, and A.L. Glasebrook.** 1989. A new murine CD4+ T cell subset with an unrestricted cytokine profile. *J.Immunol.* 143:518.
10. **Mosmann, T.R. and S. Sad.** 1996. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more [see comments]. *Immunol.Today* 17:138.
11. **Bucy, R.P., L. Karr, G.Q. Huang, J. Li, D. Carter, K. Honjo, J.A. Lemons, K.M. Murphy, and C.T. Weaver.** 1995. Single cell analysis of cytokine gene coexpression during CD4+ T-cell phenotype development. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 92:7565.
12. **Chen, Y., V.K. Kuchroo, J. Inobe, D.A. Hafler, and H.L. Weiner.** 1994. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* 265:1237.
13. **Letterio, J.J. and A.B. Roberts.** 1998. Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu.Rev.Immunol.* 16:137-61:137.
14. **Weiner, H.L.** 1997. Oral tolerance: immune mechanisms and treatment of autoimmune diseases. *Immunol.Today* 18:335.
15. **Pernis, A., S. Gupta, K.J. Gollob, E. Garfein, R.L. Coffman, C. Schindler, and P. Rothman.** 1995. Lack of interferon gamma receptor beta chain and the prevention of interferon gamma signaling in TH1 cells [see comments]. *Science* 269:245.
16. **Groux, H., T. Sornasse, F. Cottrez, J.E. de Vries, R.L. Coffman, M.G. Roncarolo, and H.**

- Yssel. 1997. Induction of human T helper cell type 1 differentiation results in loss of IFN-gamma receptor beta-chain expression. *J.Immunol.* 158:5627.
17. **Lichtman, A.H., J. Chin, J.A. Schmidt, and A.K. Abbas.** 1988. Role of interleukin 1 in the activation of T lymphocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 85:9699.
 18. **Xu, D., W.L. Chan, B.P. Leung, Huang Fp, R. Wheeler, D. Piedrafita, J.H. Robinson, and F.Y. Liew.** 1998. Selective expression of a stable cell surface molecule on type 2 but not type 1 helper T cells. *J.Exp.Med.* 187:787.
 19. **Bonecchi, R., G. Bianchi, P.P. Bordinon, D. D'Ambrosio, R. Lang, A. Borsatti, S. Sozzani, P. Allavena, P.A. Gray, A. Mantovani, and F. Sinigaglia.** 1998. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J.Exp.Med.* 187:129.
 20. **Jung, S. and D.R. Littman.** 1999. Chemokine receptors in lymphoid organ homeostasis. *Curr.Opin.Immunol.* 11:319.
 21. **Sallusto, F., D. Lenig, C.R. Mackay, and A. Lanzavecchia.** 1998. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J.Exp.Med.* 187:875.
 22. **Foy, T.M., A. Aruffo, J. Bajorath, J.E. Buhlmann, and R.J. Noelle.** 1996. Immune regulation by CD40 and its ligand GP39. *Annu.Rev.Immunol.* 14:591-617:591.
 23. **Boussiotis, V.A., J.G. Gribben, G.J. Freeman, and L.M. Nadler.** 1994. Blockade of the CD28 co-stimulatory pathway: a means to induce tolerance. *Curr.Opin.Immunol.* 6:797.
 24. **Alderson, M.R., R.J. Armitage, T.W. Tough, L. Strockbine, W.C. Fanslow, and M.K. Spriggs.** 1993. CD40 expression by human monocytes: regulation by cytokines and activation of monocytes by the ligand for CD40. *J.Exp.Med.* 178:669.
 25. **Perrin, P.J., A. Lovett-Racke, S.M. Phillips, and M.K. Racke.** 1999. Differential requirements of naive and memory T cells for CD28 costimulation in autoimmune pathogenesis. *Histol.Histopathol.* 14:1269.
 26. **Boise, L.H., A.J. Minn, P.J. Noel, C.H. June, M.A. Accavitti, T. Lindsten, and C.B. Thompson.** 1995. CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity.* 3:87.
 27. **Lenschow, D.J., T.L. Walunas, and J.A. Bluestone.** 1996. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu.Rev.Immunol.* 14:233-58:233.
 28. **Walunas, T.L., C.Y. Bakker, and J.A. Bluestone.** 1996. CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation [published erratum appears in J Exp Med 1996 Jul 1;184(1):301]. *J.Exp.Med.* 183:2541.
 29. **Pfeiffer, C., J. Stein, S. Southwood, H. Ketelaar, A. Sette, and K. Bottomly.** 1995. Altered peptide ligands can control CD4 T lymphocyte differentiation in vivo. *J.Exp.Med.* 181:1569.
 30. **Constant, S., C. Pfeiffer, A. Woodard, T. Pasqualini, and K. Bottomly.** 1995. Extent of T cell receptor ligation can determine the functional differentiation of naive CD4+ T cells. *J.Exp.Med.* 182:1591.
 31. **Locksley, R.M., S.L. Reiner, F. Hatam, D.R. Littman, and N. Killeen.** 1993. Helper T cells

without CD4: control of leishmaniasis in CD4-deficient mice. *Science* 261:1448.

32. **Wack, A., P. Corbella, N. Harker, K. Roderick, T. Norton, K. Williams, O. Williams, and D. Kioussis.** 1999. Th cells and Th2 responses can develop in the absence of MHC class II-CD4 interactions. *J.Immunol.* 163:1162.
33. **Rulifson, I.C., A.I. Sperling, P.E. Fields, F.W. Fitch, and J.A. Bluestone.** 1997. CD28 costimulation promotes the production of Th2 cytokines. *J.Immunol.* 158:658.
34. **Freeman, G.J., V.A. Boussiotis, A. Anumanthan, G.M. Bernstein, X.Y. Ke, P.D. Rennert, G.S. Gray, J.G. Gribben, and L.M. Nadler.** 1995. B7-1 and B7-2 do not deliver identical costimulatory signals, since B7-2 but not B7-1 preferentially costimulates the initial production of IL-4. *Immunity.* 2:523.
35. **Xu, H., P.S. Heeger, and R.L. Fairchild.** 1997. Distinct roles for B7-1 and B7-2 determinants during priming of effector CD8+ Tc1 and regulatory CD4+ Th2 cells for contact hypersensitivity. *J.Immunol.* 159:4217.
36. **De Becker, G., V. Moulin, F. Tielemans, F. De Mattia, J. Urbain, O. Leo, and M. Moser.** 1998. Regulation of T helper cell differentiation in vivo by soluble and membrane proteins provided by antigen-presenting cells. *Eur.J.Immunol.* 28:3161.
37. **Hutloff, A., A.M. Dittrich, K.C. Beier, B. Eljaschewitsch, R. Kraft, I. Anagnostopoulos, and R.A. Kroczeck.** 1999. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* 397:263.
38. **Watts, T.H. and M.A. DeBenedette.** 1999. T cell co-stimulatory molecules other than CD28. *Curr.Opin.Immunol.* 11:286.
39. **Delespesse, G., C.E. Demeure, L.P. Yang, Y. Ohshima, D.G. Byun, and U. Shu.** 1997. In vitro maturation of naive human CD4+ T lymphocytes into Th1, Th2 effectors. *Int.Arch.Allergy Immunol.* 113:157.
40. **Muraille, E. and O. Leo.** 1998. Revisiting the Th1/Th2 paradigm. *Scand.J.Immunol.* 47:1.
41. **Paludan, S.R.** 1998. Interleukin-4 and interferon-gamma: the quintessence of a mutual antagonistic relationship. *Scand.J.Immunol.* 48:459.
42. **Murphy, K.M.** 1998. T lymphocyte differentiation in the periphery. *Curr.Opin.Immunol.* 10:226.
43. **Nakamura, T., R.K. Lee, S.Y. Nam, E.R. Podack, K. Bottomly, and R.A. Flavell.** 1997. Roles of IL-4 and IFN-gamma in stabilizing the T helper cell type 1 and 2 phenotype. *J.Immunol.* 158:2648.
44. **Kubo, M., M. Yamashita, R. Abe, T. Tada, K. Okumura, J.T. Ransom, and T. Nakayama.** 1999. CD28 costimulation accelerates IL-4 receptor sensitivity and IL-4-mediated Th2 differentiation. *J.Immunol.* 163:2432.
45. **Bach, E.A., S.J. Szabo, A.S. Dighe, A. Ashkenazi, M. Aguet, K.M. Murphy, and R.D. Schreiber.** 1995. Ligand-induced autoregulation of IFN-gamma receptor beta chain expression in T helper cell subsets. *Science* 270:1215.
46. **O'Garra, A.** 1998. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity.* 8:275.
47. **Macatonia, S.E., N.A. Hosken, M. Litton, P. Vieira, C.S. Hsieh, J.A. Culpepper, M. Wysocka,**

-
- G. Trinchieri, K.M. Murphy, and A. O'Garra.** 1995. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J.Immunol.* 154:5071.
48. **Lederer, J.A., V.L. Perez, L. DesRoches, S.M. Kim, A.K. Abbas, and A.H. Lichtman.** 1996. Cytokine transcriptional events during helper T cell subset differentiation. *J.Exp.Med.* 184:397.
49. **Ohshima, Y. and G. Delespesse.** 1997. T cell-derived IL-4 and dendritic cell-derived IL-12 regulate the lymphokine-producing phenotype of alloantigen-primed naive human CD4 T cells. *J.Immunol.* 158:629.
50. **Szabo, S.J., N.G. Jacobson, A.S. Dighe, U. Gubler, and K.M. Murphy.** 1995. Developmental commitment to the Th2 lineage by extinction of IL-12 signaling. *Immunity.* 2:665.
51. **Breit, S., M. Steinhoff, K. Blaser, C.H. Heusser, W. Sebald, A.D. Levine, and M. Rocken.** 1996. A strict requirement of interleukin-4 for interleukin-4 induction in antigen-stimulated human memory T cells. *Eur.J.Immunol.* 26:1860.
52. **Abbas, A.K., K.M. Murphy, and A. Sher.** 1996. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383:787.
53. **Boehm, U., T. Klamp, M. Groot, and J.C. Howard.** 1997. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu.Rev.Immunol.* 15:749-95:749.
54. **Cuff, C.A., J. Schwartz, C.M. Bergman, K.S. Russell, J.R. Bender, and N.H. Ruddle.** 1998. Lymphotoxin alpha3 induces chemokines and adhesion molecules: insight into the role of LT alpha in inflammation and lymphoid organ development. *J.Immunol.* 161:6853.
55. **Romagnani, S.** 1995. Biology of human TH1 and TH2 cells. *J.Clin.Immunol.* 15:121.
56. **Allen, J.E. and R.M. Maizels.** 1997. Th1-Th2: reliable paradigm or dangerous dogma? [see comments]. *Immunol.Today* 18:387.
57. **Sallusto, F., A. Lanzavecchia, and C.R. Mackay.** 1998. Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Immunol.Today* 19:568.
58. **Wardlaw, A.J., F.S. Symon, and G.M. Walsh.** 1994. Eosinophil adhesion in allergic inflammation. *J.Allergy Clin.Immunol.* 94:1163.
59. **Galli, S.J., J.R. Gordon, and B.K. Wershil.** 1993. Mast cell cytokines in allergy and inflammation. *Agents Actions Suppl.* 43:209-20:209.
60. **Fowell, D., F. Powrie, A. Saoudi, B. Seddon, V. Heath, and D. Mason.** 1995. The role of subsets of CD4+ T cells in autoimmunity. *Ciba.Found.Symp.* 195:173-82; discussion 182-8:173.
61. **Feldmann, M., F.M. Brennan, and R. Maini.** 1998. Cytokines in autoimmune disorders. *Int.Rev.Immunol.* 17:217.
62. **Wekerle, H., K. Kojima, J. Lannes-Vieira, H. Lassmann, and C. Linington.** 1994. Animal models. *Ann.Neurol.* 36 Suppl:S47-53:S47.
63. **Peterson, J.D., B. Pike, M. McDuffie, and K. Haskins.** 1994. Islet-specific T cell clones transfer diabetes to nonobese diabetic (NOD) F1 mice. *J.Immunol.* 153:2800.
64. **Trinchieri, G.** 1998. Immunobiology of interleukin-12. *Immunol.Res.* 17:269.

-
65. **Scott, P. and G. Trinchieri.** 1997. IL-12 as an adjuvant for cell-mediated immunity. *Semin.Immunol.* 9:285.
 66. **Trinchieri, G.** 1998. Proinflammatory and immunoregulatory functions of interleukin-12. *Int.Rev.Immunol.* 16:365.
 67. **Trinchieri, G.** 1997. Function and clinical use of interleukin-12. *Curr.Opin.Hematol.* 4:59.
 68. **Gately, M.K., L.M. Renzetti, J. Magram, A.S. Stern, L. Adorini, U. Gubler, and D.H. Presky.** 1998. The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. *Annu.Rev.Immunol.* 16:495-521:495.
 69. **Trembleau, S., T. Germann, M.K. Gately, and L. Adorini.** 1995. The role of IL-12 in the induction of organ-specific autoimmune diseases. *Immunol.Today* 16:383.
 70. **Constantinescu, C.S., B. Hilliard, M. Wysocka, E.S. Ventura, M.K. Bhopale, G. Trinchieri, and A.M. Rostami.** 1999. IL-12 reverses the suppressive effect of the CD40 ligand blockade on experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J.Neurol.Sci.* 171:60.
 71. **Constantinescu, C.S., M. Wysocka, B. Hilliard, E.S. Ventura, E. Lavi, G. Trinchieri, and A. Rostami.** 1998. Antibodies against IL-12 prevent superantigen-induced and spontaneous relapses of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J.Immunol.* 161:5097.
 72. **Leonard, J.P., K.E. Waldburger, and S.J. Goldman.** 1995. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against interleukin 12. *J.Exp.Med.* 181:381.
 73. **Rothe, H., V. Burkart, A. Faust, and H. Kolb.** 1996. Interleukin-12 gene expression is associated with rapid development of diabetes mellitus in non-obese diabetic mice. *Diabetologia* 39:119.
 74. **Nicoletti, F., R. Di Marco, P. Zaccone, G. Magro, M. Di Mauro, S. Grasso, and P.L. Meroni.** 1999. Endogenous interleukin-12 only plays a key pathogenetic role in non- obese diabetic mouse diabetes during the very early stages of the disease. *Immunology* 97:367.
 75. **Trembleau, S., G. Penna, E. Bosi, A. Mortara, M.K. Gately, and L. Adorini.** 1995. Interleukin 12 administration induces T helper type 1 cells and accelerates autoimmune diabetes in NOD mice. *J.Exp.Med.* 181:817.
 76. **Fuss, I.J., T. Marth, M.F. Neurath, G.R. Pearlstein, A. Jain, and W. Strober.** 1999. Anti-interleukin 12 treatment regulates apoptosis of Th1 T cells in experimental colitis in mice [see comments]. *Gastroenterology* 117 :1078.
 77. **Rapoport, M.J., A. Jaramillo, D. Zipris, A.H. Lazarus, D.V. Serreze, E.H. Leiter, P. Cyopick, J.S. Danska, and T.L. Delovitch.** 1993. Interleukin 4 reverses T cell proliferative unresponsiveness and prevents the onset of diabetes in nonobese diabetic mice. *J.Exp.Med.* 178:87.
 78. **Racke, M.K., A. Bonomo, D.E. Scott, B. Cannella, A. Levine, C.S. Raine, E.M. Shevach, and M. Rocken.** 1994. Cytokine-induced immune deviation as a therapy for inflammatory autoimmune disease. *J.Exp.Med.* 180:1961.
 79. **Miossec, P., P. Chomarat, J. Dechanet, J.F. Moreau, J.P. Roux, P. Delmas, and J. Banchereau.** 1994. Interleukin-4 inhibits bone resorption through an effect on osteoclasts and proinflammatory cytokines in an ex vivo model of bone resorption in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 37:1715.

-
80. **D'Andrea, A., X. Ma, M. Aste-Amezaga, C. Paganin, and G. Trinchieri.** 1995. Stimulatory and inhibitory effects of interleukin (IL)-4 and IL-13 on the production of cytokines by human peripheral blood mononuclear cells: priming for IL-12 and tumor necrosis factor alpha production. *J.Exp.Med.* 181:537.
 81. **Oriss, T.B., S.A. McCarthy, M.A. Campana, and P.A. Morel.** 1999. Evidence of positive cross-regulation on Th1 by Th2 and antigen- presenting cells: effects on Th1 induced by IL-4 and IL-12. *J.Immunol.* 162:1999.
 82. **Skeen, M.J., M.A. Miller, T.M. Shinnick, and H.K. Ziegler.** 1996. Regulation of murine macrophage IL-12 production. Activation of macrophages in vivo, restimulation in vitro, and modulation by other cytokines. *J.Immunol.* 156:1196.
 83. **Imhoff, A.B., G.M. Ottl, A. Burkart, and S. Traub.** 1999. [Autologous osteochondral transplantation on various joints]. *Orthopade.* 28:33.
 84. **Zvaifler, N.J.** 1973. The immunopathology of joint inflammation in rheumatoid arthritis. *Adv.Immunol.* 16:265.
 85. **Janossy, G., G. Panayi, O. Duke, M. Bofill, L.W. Poulter, and G. Goldstein.** 1981. Rheumatoid arthritis: a disease of T-lymphocyte/macrophage immunoregulation. *Lancet* 2:839.
 86. **Pillinger, M.H. and S.B. Abramson.** 1995. The neutrophil in rheumatoid arthritis. *Rheum.Dis.Clin.North Am.* 21:691.
 87. **Sack, U., H. Kuhn, I. Kampfer, M. Genest, S. Arnold, G. Pfeiffer, and F. Emmrich.** 1996. Orthotopic implantation of inflamed synovial tissue from RA patients induces a characteristic arthritis in immunodeficient (SCID) mice. *J.Autoimmun.* 9:51.
 88. **Tarkowski, A., L. Klareskog, H. Carlsten, P. Herberts, and W.J. Koopman.** 1989. Secretion of antibodies to types I and II collagen by synovial tissue cells in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 32:1087.
 89. **Stastny, P.** 1978. Association of the B-cell alloantigen DRw4 with rheumatoid arthritis. *N.Engl.J.Med.* 298:869.
 90. **Gregersen, P.K., J. Silver, and R.J. Winchester.** 1987. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 30:1205.
 91. **Silman, A.J., A.J. MacGregor, W. Thomson, S. Holligan, D. Carthy, A. Farhan, and W.E. Ollier.** 1993. Twin concordance rates for rheumatoid arthritis: results from a nationwide study. *Br.J.Rheumatol.* 32:903.
 92. **Feldmann, M., F.M. Brennan, and R.N. Maini.** 1996. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu.Rev.Immunol.* 14:397-440:397.
 93. **Feldmann, M., F.M. Brennan, R.O. Williams, A.P. Cope, D.L. Gibbons, P.D. Katsikis, and R.N. Maini.** 1992. Evaluation of the role of cytokines in autoimmune disease: the importance of TNF alpha in rheumatoid arthritis. *Prog.Growth Factor.Res.* 4:247.
 94. **Alvaro-Gracia, J.M., N.J. Zvaifler, and G.S. Firestein.** 1990. Cytokines in chronic inflammatory arthritis. V. Mutual antagonism between interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha on HLA-DR expression, proliferation, collagenase production, and granulocyte macrophage colony-stimulating factor production by rheumatoid arthritis synoviocytes. *J.Clin.Invest.* 86:1790.

-
95. **Butler, D.M., A.M. Malfait, L.J. Mason, P.J. Warden, G. Kollias, R.N. Maini, M. Feldmann, and F.M. Brennan.** 1997. DBA/1 mice expressing the human TNF-alpha transgene develop a severe, erosive arthritis: characterization of the cytokine cascade and cellular composition. *J.Immunol.* 159:2867.
 96. **Dinarello, C.A.** 1997. Interleukin-1. *Cytokine.Growth Factor.Rev.* 8:253.
 97. **Feldmann, M.** 1996. What is the mechanism of action of anti-tumour necrosis factor-alpha antibody in rheumatoid arthritis? *Int.Arch.Allergy Immunol.* 111:362.
 98. **Akahoshi, T., C. Wada, H. Endo, K. Hirota, S. Hosaka, K. Takagishi, H. Kondo, S. Kashiwazaki, and K. Matsushima.** 1993. Expression of monocyte chemotactic and activating factor in rheumatoid arthritis. Regulation of its production in synovial cells by interleukin-1 and tumor necrosis factor. *Arthritis Rheum.* 36:762.
 99. **Cope, A.P.** 1998. Regulation of autoimmunity by proinflammatory cytokines. *Curr.Opin.Immunol.* 10:669.
 100. **Taylor, P.C., A.M. Peters, E. Paleolog, P.T. Chapman, M.J. Elliott, R. McCloskey, M. Feldmann, and R.N. Maini .** Reduction of chemokine levels and leukocyte traffic to joints by tumor necrosis factor alpha blockade in patients with rheumatoid arthritis [In Process Citation]. *Arthritis Rheum.*2000.Jan.;43.(1.):38.-47. 43:38.
 101. **Londei, M., C.M. Savill, A. Verhoef, F. Brennan, Z.A. Leech, V. Duance, R.N. Maini, and M. Feldmann.** 1989. Persistence of collagen type II-specific T-cell clones in the synovial membrane of a patient with rheumatoid arthritis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 86:636.
 102. **Kasama, T., R.M. Strieter, N.W. Lukacs, P.M. Lincoln, M.D. Burdick, and S.L. Kunkel.** 1995. Interleukin-10 expression and chemokine regulation during the evolution of murine type II collagen-induced arthritis. *J.Clin.Invest.* 95:2868.
 103. **Miltenburg, A.M., J.M. van Laar, R. de Kuiper, M.R. Daha, and F.C. Breedveld.** 1992. T cells cloned from human rheumatoid synovial membrane functionally represent the Th1 subset. *Scand.J.Immunol.* 35:603.
 104. **Simon, A.K., E. Seipelt, and J. Sieper.** 1994. Divergent T-cell cytokine patterns in inflammatory arthritis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 91 :8562.
 105. **Schulze-Koops, H., P.E. Lipsky, A.F. Kavanaugh, and L.S. Davis.** 1995. Elevated Th1- or Th0-like cytokine mRNA in peripheral circulation of patients with rheumatoid arthritis. Modulation by treatment with anti-ICAM-1 correlates with clinical benefit. *J.Immunol.* 155:5029.
 106. **Feldmann, M., F.M. Brennan, and R. Maini.** 1998. Cytokines in autoimmune disorders [In Process Citation]. *Int.Rev.Immunol.* 17:217.
 107. **Miossec, P., M. Naviliat, d.A. Dupuy, J. Sany, and J. Banchereau.** 1990. Low levels of interleukin-4 and high levels of transforming growth factor beta in rheumatoid synovitis. *Arthritis Rheum.* 33:1180.
 108. **Cremer, M.A., E.F. Rosloniec, and A.H. Kang.** 1998. The cartilage collagens: a review of their structure, organization, and role in the pathogenesis of experimental arthritis in animals and in human rheumatic disease. *J.Mol.Med.* 76:275.
 109. **Trentham, D.E., A.S. Townes, and A.H. Kang.** 1977. Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis. *J.Exp.Med.* 146:857.

-
110. **Trentham, D.E.** 1988. Collagen arthritis in rats, arthritogenic lymphokines and other aspects. *Int.Rev.Immunol.* 4:25.
 111. **Courtenay, J.S., M.J. Dallman, A.D. Dayan, A. Martin, and B. Mosedale.** 1980. Immunisation against heterologous type II collagen induces arthritis in mice. *Nature* 283:666.
 112. **Wooley, P.H., H.S. Luthra, J.M. Stuart, and C.S. David.** 1981. Type II collagen-induced arthritis in mice. I. Major histocompatibility complex (I region) linkage and antibody correlates. *J.Exp.Med.* 154:688.
 113. **Bakker, N.P., M.G. van Erck, C. Zurcher, P. Faaber, A. Lemmens, M. Hazenberg, R.E. Bontrop, and M. Jonker.** 1990. Experimental immune mediated arthritis in rhesus monkeys. A model for human rheumatoid arthritis? *Rheumatol.Int.* 10:21.
 114. **Cathcart, E.S., K.C. Hayes, W.A. Gonnerman, A.A. Lazzari, and C. Franzblau.** 1986. Experimental arthritis in a nonhuman primate. I. Induction by bovine type II collagen. *Lab.Invest.* 54:26.
 115. **Trentham, D.E.** 1982. Collagen arthritis as a relevant model for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 25:911.
 116. **Myers, L.K., E.F. Rosloniec, M.A. Cremer, and A.H. Kang.** 1997. Collagen-induced arthritis, an animal model of autoimmunity. *Life Sci.* 61 :1861.
 117. **Holmdahl, R., L. Jansson, E. Larsson, K. Rubin, and L. Klareskog.** 1986. Homologous type II collagen induces chronic and progressive arthritis in mice. *Arthritis Rheum.* 29:106.
 118. **Stuart, J.M., M.A. Cremer, S.N. Dixit, A.H. Kang, and A.S. Townes.** 1979. Collagen-induced arthritis in rats. Comparison of vitreous and cartilage-derived collagens. *Arthritis Rheum.* 22:347.
 119. **Ellis, J.S., B.M. Chain, A. Cooke, M.A. Ibrahim, and D.R. Katz.** 1992. Adjuvant composition determines the induction of type II collagen- induced arthritis. *Scand.J.Immunol.* 36:49.
 120. **Germann, T., J. Szeliga, H. Hess, S. Storkel, F.J. Podlaski, M.K. Gately, E. Schmitt, and E. Rude.** 1995. Administration of interleukin 12 in combination with type II collagen induces severe arthritis in DBA/1 mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 92:4823.
 121. **Wooley, P.H., H.S. Luthra, M.M. Griffiths, J.M. Stuart, A. Huse, and C.S. David.** 1985. Type II collagen-induced arthritis in mice. IV. Variations in immunogenetic regulation provide evidence for multiple arthritogenic epitopes on the collagen molecule. *J.Immunol.* 135:2443.
 122. **Holmdahl, R., L. Jansson, D. Gullberg, K. Rubin, P.O. Forsberg, and L. Klareskog.** 1985. Incidence of arthritis and autoreactivity of anti-collagen antibodies after immunization of DBA/1 mice with heterologous and autologous collagen II. *Clin.Exp.Immunol.* 62:639.
 123. **Gonzalez-Gay, M.A., G.H. Nabozny, M.J. Bull, E. Zanelli, J. Douhan, M.M. Griffiths, L.H. Glimcher, H.S. Luthra, and C.S. David.** 1994. Protective role of major histocompatibility complex class II Ebd transgene on collagen-induced arthritis. *J.Exp.Med.* 180:1559.
 124. **Gonzalez-Gay, M.A., E. Zanelli, S.D. Khare, C.J. Krco, M.M. Griffiths, H.S. Luthra, and C.S. David.** 1996. H2-A polymorphism contributes to H2-Ebeta-mediated protection in collagen-induced arthritis. *Immunogenetics* 44 :377.

-
125. **Remmers, E.F., R.E. Longman, Y. Du, A. O'Hare, G.W. Cannon, M.M. Griffiths, and R.L. Wilder.** 1996. A genome scan localizes five non-MHC loci controlling collagen-induced arthritis in rats. *Nat.Genet.* 14:82.
 126. **Andersson, M. and R. Holmdahl .** 1990. Analysis of type II collagen-reactive T cells in the mouse. I. Different regulation of autoreactive vs. non-autoreactive anti-type II collagen T cells in the DBA/1 mouse. *Eur.J.Immunol.* 20:1061.
 127. **Holmdahl, R., M. Andersson, and A. Tarkowski.** 1987. Origin of the autoreactive anti-type II collagen response. I. Frequency of specific and multispecific B cells in primed murine lymph nodes. *Immunology* 61:369.
 128. **Burkhardt, H., R. Holmdahl, R. Deutzmann, H. Wiedemann, M. von der, and S. Goodman.** 1991. Identification of a major antigenic epitope on CNBr-fragment 11 of type II collagen recognized by murine autoreactive B cells. *Eur.J.Immunol.* 21:49.
 129. **Seki, N., Y. Sudo, T. Yoshioka, S. Sugihara, T. Fujitsu, S. Sakuma, T. Ogawa, T. Hamaoka, H. Senoh, and H. Fujiwara.** 1988. Type II collagen-induced murine arthritis. I. Induction and perpetuation of arthritis require synergy between humoral and cell- mediated immunity. *J.Immunol.* 140:1477.
 130. **Svensson, L., J. Jirholt, R. Holmdahl, and L. Jansson.** 1998. B cell-deficient mice do not develop type II collagen-induced arthritis (CIA). *Clin.Exp.Immunol.* 111:521.
 131. **Helfgott, S.M., H. Bazin, A. Dessen, and D.E. Trentham.** 1984. Suppressive effects of anti-mu serum on the development of collagen arthritis in rats. *Clin.Immunol.Immunopathol.* 31:403.
 132. **Durie, F.H., R.A. Fava, T.M. Foy, A. Aruffo, J.A. Ledbetter, and R.J. Noelle.** 1993. Prevention of collagen-induced arthritis with an antibody to gp39, the ligand for CD40. *Science* 261:1328.
 133. **Stuart, J.M., M.A. Cremer, A.S. Townes, and A.H. Kang.** 1982. Type II collagen-induced arthritis in rats. Passive transfer with serum and evidence that IgG anticollagen antibodies can cause arthritis. *J.Exp.Med.* 155:1.
 134. **Stuart, J.M., K. Tomoda, T.J. Yoo, A.S. Townes, and A.H. Kang.** 1983. Serum transfer of collagen-induced arthritis. II. Identification and localization of autoantibody to type II collagen in donor and recipient rats. *Arthritis Rheum.* 26:1237.
 135. **Holmdahl, R., L. Jansson, A. Larsson, and R. Jonsson.** 1990. Arthritis in DBA/1 mice induced with passively transferred type II collagen immune serum. Immunohistopathology and serum levels of anti- type II collagen auto-antibodies. *Scand.J.Immunol.* 31:147.
 136. **Holmdahl, R., C. Bailey, I. Enander, R. Mayer, L. Klareskog, T. Moran, and C. Bona.** 1989. Origin of the autoreactive anti-type II collagen response. II. Specificities, antibody isotypes and usage of V gene families of anti- type II collagen B cells. *J.Immunol.* 142:1881.
 137. **Watson, W.C. and A.S. Townes.** 1985. Genetic susceptibility to murine collagen II autoimmune arthritis. Proposed relationship to the IgG2 autoantibody subclass response, complement C5, major histocompatibility complex (MHC) and non-MHC loci. *J.Exp.Med.* 162:1878.
 138. **Ey, P.L., G.J. Russell-Jones, and C.R. Jenkin.** 1980. Isotypes of mouse IgG--I. Evidence for 'non-complement-fixing' IgG1 antibodies and characterization of their capacity to interfere with IgG2 sensitization of target red blood cells for lysis by complement. *Mol.Immunol.*

17:699.

139. **Wang, Y., S.A. Rollins, J.A. Madri, and L.A. Matis.** 1995. Anti-C5 monoclonal antibody therapy prevents collagen-induced arthritis and ameliorates established disease. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 92:8955.
140. **Manoury-Schwartz, B., G. Chiochia, and C. Fournier.** 1995. Processing and presentation of type II collagen, a fibrillar autoantigen, by H-2q antigen-presenting cells. *Eur.J.Immunol.* 25:3235.
141. **Michaelsson, E., M. Holmdahl, A. Engstrom, H. Burkhardt, A. Scheynius, and R. Holmdahl.** 1995. Macrophages, but not dendritic cells, present collagen to T cells. *Eur.J.Immunol.* 25:2234.
142. **Holmdahl, R., M. Andersson, T.J. Goldschmidt, K. Gustafsson, L. Jansson, and J.A. Mo.** 1990. Type II collagen autoimmunity in animals and provocations leading to arthritis. *Immunol.Rev.* 118:193-232:193.
143. **Holmdahl, R., L. Klareskog, K. Rubin, J. Bjork, G. Smedegard, R. Jonsson, and M. Andersson.** 1986. Role of T lymphocytes in murine collagen induced arthritis. *Agents Actions* 19:295.
144. **Brahn, E. and D.E. Trentham.** 1989. Experimental synovitis induced by collagen-specific T cell lines. *Cell Immunol.* 118:491.
145. **Williams, R.O., C. Plater-Zyberk, D.G. Williams, and R.N. Maini.** 1992. Successful transfer of collagen-induced arthritis to severe combined immunodeficient (SCID) mice. *Clin.Exp.Immunol.* 88:455.
146. **Kageyama, Y., Y. Koide, A. Yoshida, M. Uchijima, T. Arai, S. Miyamoto, T. Ozeki, M. Hiyoshi, K. Kushida, and T. Inoue.** 1998. Reduced susceptibility to collagen-induced arthritis in mice deficient in IFN-gamma receptor. *J.Immunol.* 161:1542.
147. **Taylor, P.C., C. Plater-Zyberk, and R.N. Maini.** 1995. The role of the B cells in the adoptive transfer of collagen-induced arthritis from DBA/1 (H-2q) to SCID (H-2d) mice. *Eur.J.Immunol.* 25:763.
148. **Osman, G.E., S. Cheunsuk, S.E. Allen, E. Chi, H.D. Liggitt, L.E. Hood, and W.C. Ladiges.** 1998. Expression of a type II collagen-specific TCR transgene accelerates the onset of arthritis in mice. *Int.Immunol.* 10:1613.
149. **Osman, G.E., M. Toda, O. Kanagawa, and L.E. Hood.** 1993. Characterization of the T cell receptor repertoire causing collagen arthritis in mice. *J.Exp.Med.* 177:387.
150. **Haqqi, T.M. and C.S. David.** 1990. T-cell receptor V beta genes repertoire in mice. Possible role in resistance and susceptibility to type II collagen-induced arthritis. *J.Autoimmun.* 3:113.
151. **Osman, G.E., M.C. Hannibal, J.P. Anderson, S.R. Lasky, W.C. Ladiges, and L. Hood.** 1999. FVB/N (H2(q)) mouse is resistant to arthritis induction and exhibits a genomic deletion of T-cell receptor V beta gene segments. *Immunogenetics* 49:851.
152. **Osman, G.E., M.C. Hannibal, J.P. Anderson, S. Cheunsuk, S.R. Lasky, H.D. Liggitt, W.C. Ladiges, and L.E. Hood.** 1999. T-cell receptor vbeta deletion and valpha polymorphism are responsible for the resistance of SWR mouse to arthritis induction. *Immunogenetics* 49:764.

-
153. **Vidard, L., T. Roger, J.P. Bouvet, J. Couderc, and M. Seman.** 1991. Resistance to collagen-induced arthritis in Biozzi mice is not associated with T cell receptor V beta gene polymorphism. *Eur.J.Immunol.* 21:1783.
154. **Mori, L., H. Loetscher, K. Kakimoto, H. Bluethmann, and M. Steinmetz.** 1992. Expression of a transgenic T cell receptor beta chain enhances collagen- induced arthritis. *J.Exp.Med.* 176:381.
155. **Mauritz, N.J., R. Holmdahl, R. Jonsson, P.H. Van der Meide, A. Scheynius, and L. Klareskog.** 1988. Treatment with gamma-interferon triggers the onset of collagen arthritis in mice. *Arthritis Rheum.* 31:1297.
156. **Boissier, M.C., G. Chiochia, N. Bessis, J. Hajnal, G. Garotta, F. Nicoletti, and C. Fournier.** 1995. Biphasic effect of interferon-gamma in murine collagen-induced arthritis. *Eur.J.Immunol.* 25:1184.
157. **Williams, R.O., D.G. Williams, M. Feldmann, and R.N. Maini.** 1993. Increased limb involvement in murine collagen-induced arthritis following treatment with anti-interferon-gamma. *Clin.Exp.Immunol.* 92:323.
158. **Vermeire, K., H. Heremans, M. Vandeputte, S. Huang, A. Billiau, and P. Matthys.** 1997. Accelerated collagen-induced arthritis in IFN-gamma receptor- deficient mice. *J.Immunol.* 158:5507.
159. **Manoury-Schwartz, B., G. Chiochia, N. Bessis, O. Abehsira-Amar, F. Batteux, S. Muller, S. Huang, M.C. Boissier, and C. Fournier.** 1997. High susceptibility to collagen-induced arthritis in mice lacking IFN- gamma receptors. *J.Immunol.* 158:5501.
160. **Matthys, P., K. Vermeire, T. Mitera, H. Heremans, S. Huang, D. Schols, C. De Wolf-Peeters, and A. Billiau.** 1999. Enhanced autoimmune arthritis in IFN-gamma receptor-deficient mice is conditioned by mycobacteria in Freund's adjuvant and by increased expansion of Mac-1+ myeloid cells. *J.Immunol.* 163:3503.
161. **Quayle, A.J., P. Chomarat, P. Miossec, J. Kjeldsen-Kragh, O. Forre, and J.B. Natvig.** 1993. Rheumatoid inflammatory T-cell clones express mostly Th1 but also Th2 and mixed (Th0-like) cytokine patterns. *Scand.J.Immunol.* 38:75.
162. **Myers, L.K., J.M. Seyer, J.M. Stuart, K. Terato, C.S. David, and A.H. Kang.** 1993. T cell epitopes of type II collagen that regulate murine collagen- induced arthritis. *J.Immunol.* 151:500.
163. **Michaelsson, E., M. Andersson, A. Engstrom, and R. Holmdahl.** 1992. Identification of an immunodominant type-II collagen peptide recognized by T cells in H-2q mice: self tolerance at the level of determinant selection. *Eur.J.Immunol.* 22:1819.
164. **Michaelsson, E., V. Malmstrom, S. Reis, A. Engstrom, H. Burkhardt, and R. Holmdahl.** 1994. T cell recognition of carbohydrates on type II collagen. *J.Exp.Med.* 180:745.
165. **Kjellen, P., U. Brunsberg, J. Broddefalk, B. Hansen, M. Vestberg, I. Ivarsson, A. Engstrom, A. Svejgaard, J. Kihlberg, L. Fugger, and R. Holmdahl.** 1998. The structural basis of MHC control of collagen-induced arthritis; binding of the immunodominant type II collagen 256-270 glycopeptide to H-2Aq and H-2Ap molecules. *Eur.J.Immunol.* 28:755.
166. **Corthay, A., J. Backlund, J. Broddefalk, E. Michaelsson, T.J. Goldschmidt, J. Kihlberg, and R. Holmdahl.** 1998. Epitope glycosylation plays a critical role for T cell recognition of type II collagen in collagen-induced arthritis. *Eur.J.Immunol.* 28:2580.

-
167. **Cooper, S.M., S. Sriram, and G.E. Ranges.** 1988. Suppression of murine collagen-induced arthritis with monoclonal anti- Ia antibodies and augmentation with IFN-gamma. *J.Immunol.* 141:1958.
 168. **Germann, T., H. Hess, J. Szeliga, and E. Rude.** 1996. Characterization of the adjuvant effect of IL-12 and efficacy of IL-12 inhibitors in type II collagen-induced arthritis. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 795:227.
 169. **Butler, D.M., A.M. Malfait, R.N. Maini, F.M. Brennan, and M. Feldmann.** 1999. Anti-IL-12 and anti-TNF antibodies synergistically suppress the progression of murine collagen-induced arthritis. *Eur.J.Immunol.* 29:2205.
 170. **Matthys, P., K. Vermeire, T. Mitera, H. Heremans, S. Huang, and A. Billiau.** 1998. Anti-IL-12 antibody prevents the development and progression of collagen-induced arthritis in IFN-gamma receptor-deficient mice. *Eur.J.Immunol.* 28:2143.
 171. **Parks, E., R.M. Strieter, N.W. Lukacs, J. Gauldie, M. Hitt, F.L. Graham, and S.L. Kunkel.** 1998. Transient gene transfer of IL-12 regulates chemokine expression and disease severity in experimental arthritis. *J.Immunol.* 160:4615.
 172. **Malfait, A.M., D.M. Butler, D.H. Presky, R.N. Maini, F.M. Brennan, and M. Feldmann.** 1998. Blockade of IL-12 during the induction of collagen-induced arthritis (CIA) markedly attenuates the severity of the arthritis. *Clin.Exp.Immunol.* 111:377.
 173. **Mattner, F., S. Fischer, S. Guckes, S. Jin, H. Kaulen, E. Schmitt, E. Rude, and T. Germann.** 1993. The interleukin-12 subunit p40 specifically inhibits effects of the interleukin-12 heterodimer. *Eur.J.Immunol.* 23:2202.
 174. **Heinzel, F.P., A.M. Hujer, F.N. Ahmed, and R.M. Rerko.** 1997. In vivo production and function of IL-12 p40 homodimers. *J.Immunol.* 158:4381.
 175. **Wang, X., V.L. Wilkinson, F.J. Podlaski, C. Wu, A.S. Stern, D.H. Presky, and J. Magram.** 1999. Characterization of mouse interleukin-12 p40 homodimer binding to the interleukin-12 receptor subunits. *Eur.J.Immunol.* 29:2007.
 176. **Faggioli, L., M. Merola, J. Hiscott, A. Furia, R. Monese, M. Tovey, and M. Palmieri.** 1997. Molecular mechanisms regulating induction of interleukin-6 gene transcription by interferon-gamma. *Eur.J.Immunol.* 27:3022.
 177. **Billiau, A., H. Heremans, K. Vermeire, and P. Matthys.** 1998. Immunomodulatory properties of interferon-gamma. An update. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 856:22.
 178. **Yi, A.K., J.H. Chace, J.S. Cowdery, and A.M. Krieg.** 1996. IFN-gamma promotes IL-6 and IgM secretion in response to CpG motifs in bacterial DNA and oligodeoxynucleotides. *J.Immunol.* 156:558.
 179. **Jacobson, N.G., S.J. Szabo, M.L. Guler, J.D. Gorham, and K.M. Murphy.** 1995. Regulation of interleukin-12 signal transduction during T helper phenotype development. *Res.Immunol.* 146:446.
 180. **Bradley, L.M., D.K. Dalton, and M. Croft.** 1996. A direct role for IFN-gamma in regulation of Th1 cell development. *J.Immunol.* 157:1350.
 181. **Ma, X., H. Riemann, G. Gri, and G. Trinchieri.** 1998. Positive and negative regulation of interleukin-12 gene expression. *Eur.Cytokine.Netw.* 9:54.

-
182. **Aste-Amezaga, M., X. Ma, A. Sartori, and G. Trinchieri.** 1998. Molecular mechanisms of the induction of IL-12 and its inhibition by IL-10. *J.Immunol.* 160:5936.
183. **Ma, X., H. Riemann, G. Gri, and G. Trinchieri.** 1998. Positive and negative regulation of interleukin-12 gene expression. *Eur.Cytokine.Netw.* 9:54.
184. **Ma, X., J.M. Chow, G. Gri, G. Carra, F. Gerosa, S.F. Wolf, R. Dzialo, and G. Trinchieri.** 1996. The interleukin 12 p40 gene promoter is primed by interferon gamma in monocytic cells. *J.Exp.Med.* 183:147.
185. **Flesch, I.E., J.H. Hess, S. Huang, M. Aguet, J. Rothe, H. Bluethmann, and S.H. Kaufmann.** 1995. Early interleukin 12 production by macrophages in response to mycobacterial infection depends on interferon gamma and tumor necrosis factor alpha. *J.Exp.Med.* 181:1615.
186. **Banerjee, S., B.Y. Wei, K. Hillman, H.S. Luthra, and C.S. David.** 1988. Immunosuppression of collagen-induced arthritis in mice with an anti-IL-2 receptor antibody. *J.Immunol.* 141:1150.
187. **Corthay, A., A. Johansson, M. Vestberg, and R. Holmdahl.** 1999. Collagen-induced arthritis development requires alpha beta T cells but not gamma delta T cells: studies with T cell-deficient (TCR mutant) mice. *Int.Immunol.* 11:1065.
188. **Banerjee, S., C. Webber, and A.R. Poole.** 1992. The induction of arthritis in mice by the cartilage proteoglycan aggrecan: roles of CD4+ and CD8+ T cells. *Cell Immunol.* 144:347.
189. **Ranges, G.E., S. Sriram, and S.M. Cooper.** 1985. Prevention of type II collagen-induced arthritis by in vivo treatment with anti-L3T4. *J.Exp.Med.* 162:1105.
190. **Moder, K.G., H.S. Luthra, M. Griffiths, and C.S. David.** 1993. Prevention of collagen induced arthritis in mice by deletion of T cell receptor V beta 8 bearing T cells with monoclonal antibodies. *Br.J.Rheumatol.* 32:26.
191. **Moder, K.G., H.S. Luthra, R. Kubo, M. Griffiths, and C.S. David.** 1992. Prevention of collagen induced arthritis in mice by treatment with an antibody directed against the T cell receptor alpha beta framework. *Autoimmunity.* 11:219.
192. **Kelso, A. and A. Munck.** 1984. Glucocorticoid inhibition of lymphokine secretion by alloreactive T lymphocyte clones. *J.Immunol.* 133:784.
193. **Getting, S.J., R.J. Flower, and M. Perretti.** 1997. Inhibition of neutrophil and monocyte recruitment by endogenous and exogenous lipocortin 1. *Br.J.Pharmacol.* 120:1075.
194. **Blotta, M.H., R.H. DeKruyff, and D.T. Umetsu.** 1997. Corticosteroids inhibit IL-12 production in human monocytes and enhance their capacity to induce IL-4 synthesis in CD4+ lymphocytes. *J.Immunol.* 158:5589.
195. **Almawi, W.Y., O.K. Melemedjian, and M.J. Rieder.** 1999. An alternate mechanism of glucocorticoid anti-proliferative effect: promotion of a Th2 cytokine-secreting profile. *Clin.Transplant.* 13:365.
196. **Holmdahl, R., L. Klareskog, K. Rubin, E. Larsson, and H. Wigzell.** 1985. T lymphocytes in collagen II-induced arthritis in mice. Characterization of arthritogenic collagen II-specific T-cell lines and clones. *Scand.J.Immunol.* 22:295.
197. **Holmdahl, R., R. Jonsson, P. Larsson, and L. Klareskog.** 1988. Early appearance of activated

- CD4+ T lymphocytes and class II antigen-expressing cells in joints of DBA/1 mice immunized with type II collagen. *Lab.Invest.* 58:53.
198. **Hom, J.T., J.M. Stuart, J. Tovey, and J.M. Chiller.** 1986. Murine T cells reactive to type II collagen. II. Functional characterization. *J.Immunol.* 136:776.
 199. **Breedveld, F.C., R. Dynesius-Trentham, M. de Sousa, and D.E. Trentham.** 1989. Collagen arthritis in the rat is initiated by CD4+ T cells and can be amplified by iron. *Cell Immunol.* 121:1.
 200. **Mauri, C., C.Q. Chu, D. Woodrow, L. Mori, and M. Londei.** 1997. Treatment of a newly established transgenic model of chronic arthritis with nondepleting anti-CD4 monoclonal antibody. *J.Immunol.* 159:5032.
 201. **Holmdahl, R., L. Jansson, M. Andersson, and E. Larsson.** 1988. Immunogenetics of type II collagen autoimmunity and susceptibility to collagen arthritis. *Immunology* 65:305.
 202. **Holmdahl, R.** 1998. Genetics of susceptibility to chronic experimental encephalomyelitis and arthritis. *Curr.Opin.Immunol.* 10:710.
 203. **Holmdahl, R., M.E. Andersson, T.J. Goldschmidt, L. Jansson, M. Karlsson, V. Malmstrom, and J. Mo.** 1989. Collagen induced arthritis as an experimental model for rheumatoid arthritis. Immunogenetics, pathogenesis and autoimmunity. *APMIS* 97:575.
 204. **Gustafsson, K., M. Karlsson, L. Andersson, and R. Holmdahl.** 1990. Structures on the I-A molecule predisposing for susceptibility to type II collagen-induced autoimmune arthritis. *Eur.J.Immunol.* 20:2127.
 205. **Holmdahl, R., E.C. Andersson, C.B. Andersen, A. Svejgaard, and L. Fugger.** 1999. Transgenic mouse models of rheumatoid arthritis. *Immunol.Rev.* 169:161-73:161.
 206. **Andersson, E.C., B.E. Hansen, H. Jacobsen, L.S. Madsen, C.B. Andersen, J. Engberg, J.B. Rothbard, G.S. McDevitt, V. Malmstrom, R. Holmdahl, A. Svejgaard, and L. Fugger.** 1998. Definition of MHC and T cell receptor contacts in the HLA-DR4restricted immunodominant epitope in type II collagen and characterization of collagen-induced arthritis in HLA-DR4 and human CD4 transgenic mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 95:7574.
 207. **Taneja, V. and C.S. David.** 1999. HLA class II transgenic mice as models of human diseases. *Immunol.Rev.* 169:67-79:67.
 208. **Rosloniec, E.F., D.D. Brand, L.K. Myers, K.B. Whittington, M. Gumanovskaya, D.M. Zaller, A. Woods, D.M. Altmann, J.M. Stuart, and A.H. Kang.** 1997. An HLA-DR1 transgene confers susceptibility to collagen-induced arthritis elicited with human type II collagen. *J.Exp.Med.* 185:1113.
 209. **Rosloniec, E.F., D.D. Brand, L.K. Myers, Y. Esaki, K.B. Whittington, D.M. Zaller, A. Woods, J.M. Stuart, and A.H. Kang.** 1998. Induction of autoimmune arthritis in HLA-DR4 (DRB1*0401) transgenic mice by immunization with human and bovine type II collagen. *J.Immunol.* 160:2573.
 210. **Zanelli, E., C.J. Krco, J.M. Baisch, S. Cheng, and C.S. David.** 1996. Immune response of HLA-DQ8 transgenic mice to peptides from the third hypervariable region of HLA-DRB1 correlates with predisposition to rheumatoid arthritis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 93:1814.
 211. **Haqqi, T.M., X.M. Qu, and S. Banerjee.** 1995. Limited heterogeneity in T-cell receptor V beta

-
- chain gene expression in arthritic joints of BUB/BnJ (H-2q) mice--a T-cell receptor V beta a strain. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 756:221-4:221.
212. **Nabozny, G.H., M.M. Griffiths, I.J. Rimm, H.S. Luthra, and C.S. David.** 1995. Effect of constrained T-cell receptor repertoires on collagen-induced arthritis in T-cell receptor V beta transgenic and congenic mice. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 756:217-20:217.
 213. **Yoo, T.J., M.K. Lee, Y.S. Min, H.J. Chiang, K. Wang, T. Fujiyoshi, T. Watanabe, M.S. Krug, J. Seyer, and K.C. Cheng.** 1994. Epitope specificity and T cell receptor usage in type II collagen induced autoimmune ear disease. *Cell Immunol.* 157:249.
 214. **Mori, L. and G. de Libero.** 1998. Genetic control of susceptibility to collagen-induced arthritis in T cell receptor beta-chain transgenic mice. *Arthritis Rheum.* 41:256.
 215. **Heath, V.L., A. Saudi, B.P. Seddon, N.C. Moore, D.J. Fowell, and D.W. Mason.** 1996. The role of the thymus in the control of autoimmunity. *J.Autoimmun.* 9:241.
 216. **Heath, V., D. Mason, F. Ramirez, and B. Seddon.** 1997. Homeostatic mechanisms in the control of autoimmunity. *Semin.Immunol.* 9:375.
 217. **Nossal, G.J.** 1993. Tolerance and ways to break it. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 690:34-41:34.
 218. **Kisielow, P. and H. von Boehmer.** 1995. Development and selection of T cells: facts and puzzles. *Adv.Immunol.* 58:87-209:87.
 219. **Arnold, B., G. Schonrich, and G.J. Hammerling.** 1993. Multiple levels of peripheral tolerance. *Immunol.Today* 14:12.
 220. **Harding, F.A., J.G. McArthur, J.A. Gross, D.H. Raulet, and J.P. Allison.** 1992. CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature* 356:607.
 221. **Liu, Y. and P.S. Linsley.** 1992. Costimulation of T-cell growth. *Curr.Opin.Immunol.* 4:265.
 222. **Rocha, B., C. Tanchot, and H. von Boehmer.** 1993. Clonal anergy blocks in vivo growth of mature T cells and can be reversed in the absence of antigen. *J.Exp.Med.* 177:1517.
 223. **Akhtar, I., J.P. Gold, L.Y. Pan, J.L. Ferrara, X.D. Yang, J.I. Kim, and K.N. Tan.** 1995. CD4+ beta islet cell-reactive T cell clones that suppress autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J.Exp.Med.* 182:87.
 224. **Boitard, C., R. Yasunami, M. Dardenne, and J.F. Bach.** 1989. T cell-mediated inhibition of the transfer of autoimmune diabetes in NOD mice. *J.Exp.Med.* 169:1669.
 225. **Cua, D.J., D.R. Hinton, and S.A. Stohlman.** 1995. Self-antigen-induced Th2 responses in experimental allergic encephalomyelitis (EAE)-resistant mice. Th2-mediated suppression of autoimmune disease. *J.Immunol.* 155:4052.
 226. **Neurath, M.F., I. Fuss, B.L. Kelsall, D.H. Presky, W. Waegell, and W. Strober.** 1996. Experimental granulomatous colitis in mice is abrogated by induction of TGF-beta-mediated oral tolerance. *J.Exp.Med.* 183:2605.
 227. **Powrie, F., R. Correa-Oliveira, S. Mauze, and R.L. Coffman.** 1994. Regulatory interactions between CD45RBhigh and CD45RBlow CD4+ T cells are important for the balance between protective and pathogenic cell-mediated immunity. *J.Exp.Med.* 179:589.

-
228. **Fowell, D., A.J. McKnight, F. Powrie, R. Dyke, and D. Mason.** 1991. Subsets of CD4+ T cells and their roles in the induction and prevention of autoimmunity. *Immunol.Rev.* 123:37-64:37.
229. **Powrie, F., J. Carlino, M.W. Leach, S. Mauze, and R.L. Coffman.** 1996. A critical role for transforming growth factor-beta but not interleukin 4 in the suppression of T helper type 1-mediated colitis by CD45RB(low) CD4+ T cells. *J.Exp.Med.* 183:2669.
230. **Takahashi, T., Y. Kuniyasu, M. Toda, N. Sakaguchi, M. Itoh, M. Iwata, J. Shimizu, and S. Sakaguchi.** 1998. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int.Immunol.* 10:1969.
231. **Itoh, M., T. Takahashi, N. Sakaguchi, Y. Kuniyasu, J. Shimizu, F. Otsuka, and S. Sakaguchi.** 1999. Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J.Immunol.* 162:5317.
232. **Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, and M. Toda.** 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J.Immunol.* 155:1151.
233. **Sun, D., Y. Qin, J. Chluba, J.T. Epplen, and H. Wekerle.** 1988. Suppression of experimentally induced autoimmune encephalomyelitis by cytolytic T-T cell interactions. *Nature* 332:843.
234. **Sadlack, B., J. Lohler, H. Schorle, G. Klebb, H. Haber, E. Sickel, R.J. Noelle, and I. Horak.** 1995. Generalized autoimmune disease in interleukin-2-deficient mice is triggered by an uncontrolled activation and proliferation of CD4+ T cells. *Eur.J.Immunol.* 25:3053.
235. **Braley-Mullen, H., G.C. Sharp, J.T. Bickel, and M. Kyriakos.** 1991. Induction of severe granulomatous experimental autoimmune thyroiditis in mice by effector cells activated in the presence of anti-interleukin 2 receptor antibody. *J.Exp.Med.* 173:899.
236. **Marth, T., W. Strober, and B.L. Kelsall.** 1996. High dose oral tolerance in ovalbumin TCR-transgenic mice: systemic neutralization of IL-12 augments TGF-beta secretion and T cell apoptosis. *J.Immunol.* 157:2348.
237. **Thorbecke, G.J., R. Schwarcz, J. Leu, C. Huang, and W.J. Simmons.** 1999. Modulation by cytokines of induction of oral tolerance to type II collagen. *Arthritis Rheum.* 42:110.
238. **Kuruvilla, A.P., R. Shah, G.M. Hochwald, H.D. Liggitt, M.A. Palladino, and G.J. Thorbecke.** 1991. Protective effect of transforming growth factor beta 1 on experimental autoimmune diseases in mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 88:2918.
239. **Anderton, S.M., C. Burkhart, G.Y. Liu, B. Metzler, and D.C. Wraith.** 1998. Antigen-specific tolerance induction and the immunotherapy of experimental autoimmune disease. *Novartis.Found.Symp.* 215:120-31; discussion 131-6, 186-90:120.
240. **Weiner, H.L., A. Friedman, A. Miller, S.J. Houry, A. al-Sabbagh, L. Santos, M. Sayegh, R.B. Nussenblatt, D.E. Trentham, and D.A. Hafler.** 1994. Oral tolerance: immunologic mechanisms and treatment of animal and human organ-specific autoimmune diseases by oral administration of autoantigens. *Annu.Rev.Immunol.* 12:809-37:809.
241. **Garside, P., M. Steel, E.A. Worthey, A. Satoskar, J. Alexander, H. Bluethmann, F.Y. Liew,**

- and A.M. Mowat.** 1995. T helper 2 cells are subject to high dose oral tolerance and are not essential for its induction. *J.Immunol.* 154:5649.
242. **Myers, L.K., J.M. Seyer, J.M. Stuart, and A.H. Kang.** 1997. Suppression of murine collagen-induced arthritis by nasal administration of collagen. *Immunology* 90:161.
243. **Myers, L.K., D.D. Brand, X.J. Ye, M.A. Cremer, E.F. Rosloniec, M. Bodo, J. Myllyharju, T. Helaakoski, M. Nokelainen, T. Pihlajaniemi, K. Kivirikko, C.L. Yang, L. Ala-Kokko, D.J. Prockop, H. Notbohm, P. Fietzek, J.M. Stuart, and A.H. Kang.** 1998. Characterization of recombinant type II collagen: arthritogenicity and tolerogenicity in DBA/1 mice. *Immunology* 95:631.
244. **Myers, L.K., B. Tang, E.F. Rosloniec, J.M. Stuart, T.M. Chiang, and A.H. Kang.** 1998. Characterization of a peptide analog of a determinant of type II collagen that suppresses collagen-induced arthritis. *J.Immunol.* 161:3589.
245. **Chu, C.Q. and M. Londei.** 1999. Differential activities of immunogenic collagen type II peptides in the induction of nasal tolerance to collagen-induced arthritis. *J.Autoimmun.* 12:35.
246. **Staines, N.A., N. Harper, F.J. Ward, V. Malmstrom, R. Holmdahl, and S. Bansal.** 1996. Mucosal tolerance and suppression of collagen-induced arthritis (CIA) induced by nasal inhalation of synthetic peptide 184-198 of bovine type II collagen (CII) expressing a dominant T cell epitope. *Clin.Exp.Immunol.* 103:368.
247. **Oldstone, M.B., M. Nerenberg, P. Southern, J. Price, and H. Lewicki.** 1991. Virus infection triggers insulin-dependent diabetes mellitus in a transgenic model: role of anti-self (virus) immune response. *Cell* 65:319.
248. **Ohashi, P.S., S. Oehen, K. Buerki, H. Pircher, C.T. Ohashi, B. Odermatt, B. Malissen, R.M. Zinkernagel, and H. Hengartner.** 1991. Ablation of "tolerance" and induction of diabetes by virus infection in viral antigen transgenic mice. *Cell* 65:305.
249. **Lenschow, D.J. and J.A. Bluestone.** 1993. T cell co-stimulation and in vivo tolerance. *Curr.Opin.Immunol.* 5:747.
250. **Fujinami, R.S. and M.B. Oldstone.** 1985. Amino acid homology between the encephalitogenic site of myelin basic protein and virus: mechanism for autoimmunity. *Science* 230:1043.
251. **Seki, N., Y. Sudo, H. Mizuhara, K. Orito, A. Imasaki, S. Ono, T. Hamaoka, H. Senoh, and H. Fujiwara.** 1992. Type II collagen-induced murine arthritis: induction of arthritis depends on antigen-presenting cell function as well as susceptibility of host to an anticollagen immune response. *J.Immunol.* 148:3093.
252. **Oldstone, M.B.** 1987. Molecular mimicry and autoimmune disease [published erratum appears in *Cell* 1987 Dec 4;51(5):878]. *Cell* 50:819.
253. **Albani, S., E.C. Keystone, J.L. Nelson, W.E. Ollier, A. La Cava, A.C. Montemayor, D.A. Weber, C. Montecucco, A. Martini, and D.A. Carson.** 1995. Positive selection in autoimmunity: abnormal immune responses to a bacterial dnaJ antigenic determinant in patients with early rheumatoid arthritis. *Nat.Med.* 1:448.
254. **Rocken, M., J.F. Urban, and E.M. Shevach.** 1992. Infection breaks T-cell tolerance. *Nature* 359:79.
255. **Chu, R.S., O.S. Targoni, A.M. Krieg, P.V. Lehmann, and C.V. Harding.** 1997. CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity.

J.Exp.Med. 186:1623.

256. **Radolf, J.D., L.L. Arndt, D.R. Akins, L.L. Curetty, M.E. Levi, Y. Shen, L.S. Davis, and M.V. Norgard.** 1995. Treponema pallidum and Borrelia burgdorferi lipoproteins and synthetic lipopeptides activate monocytes/macrophages. *J.Immunol.* 154:2866.
257. **Halpern, M.D., R.J. Kurlander, and D.S. Pisetsky.** 1996. Bacterial DNA induces murine interferon-gamma production by stimulation of interleukin-12 and tumor necrosis factor-alpha. *Cell Immunol.* 167:72.
258. **Manetti, R., F. Annunziato, L. Tomasevic, V. Gianni, P. Parronchi, S. Romagnani, and E. Maggi.** 1995. Polyinosinic acid: polycytidylic acid promotes T helper type 1-specific immune responses by stimulating macrophage production of interferon-alpha and interleukin-12. *Eur.J.Immunol.* 25:2656.
259. **Paliard, X., S.G. West, J.A. Lafferty, J.R. Clements, J.W. Kappler, P. Marrack, and B.L. Kotzin.** 1991. Evidence for the effects of a superantigen in rheumatoid arthritis. *Science* 253:325.
260. **Henry, S.P., M.V. Templin, N. Gillett, J. Rojko, and A.A. Levin.** 1999. Correlation of toxicity and pharmacokinetic properties of a phosphorothioate oligonucleotide designed to inhibit ICAM-1. *Toxicol.Pathol.* 27:95.
261. **Krakovski, M.L. and T. Owens.** Naive T lymphocytes traffic to inflamed central nervous system, but require antigen recognition for activation. *Eur.J.Immunol.* 2000.Apr.;30.(4.):1002.-9. 30:1002.
262. **Szeliga, J., H. Hess, E. Rude, E. Schmitt, and T. Germann.** 1996. IL-12 promotes cellular but not humoral type II collagen- specific Th 1- type responses in C57BL/6 and B10.Q mice and fails to induce arthritis. *Int.Immunol.* 8:1221.
263. **Terato, K., K.A. Hasty, R.A. Reife, M.A. Cremer, A.H. Kang, and J.M. Stuart.** 1992. Induction of arthritis with monoclonal antibodies to collagen. *J.Immunol.* 148:2103.
264. **Wooley, P.H., H.S. Luthra, S.K. Singh, A.R. Huse, J.M. Stuart, and C.S. David.** 1984. Passive transfer of arthritis to mice by injection of human anti-type II collagen antibody. *Mayo Clin.Proc.* 59:737.
265. **Wooley, P.H., H.S. Luthra, C.J. Krco, J.M. Stuart, and C.S. David.** 1984. Type II collagen-induced arthritis in mice. II. Passive transfer and suppression by intravenous injection of anti-type II collagen antibody or free native type II collagen. *Arthritis Rheum.* 27:1010.
266. **Murakami, M., T. Tsubata, M. Okamoto, A. Shimizu, S. Kumagai, H. Imura, and T. Honjo.** 1992. Antigen-induced apoptotic death of Ly-1 B cells responsible for autoimmune disease in transgenic mice [see comments]. *Nature* 357:77.
267. **Tonegawa, S.** 1983. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302:575.
268. **Holmdahl, R., K. Rubin, L. Klareskog, E. Larsson, and H. Wigzell.** 1986. Characterization of the antibody response in mice with type II collagen- induced arthritis, using monoclonal anti-type II collagen antibodies. *Arthritis Rheum.* 29:400.
269. **Wen, L., S.J. Roberts, J.L. Viney, F.S. Wong, C. Mallick, R.C. Findly, Q. Peng, J.E. Craft, M.J. Owen, and A.C. Hayday.** 1994. Immunoglobulin synthesis and generalized autoimmunity in mice congenitally deficient in alpha beta(+) T cells. *Nature* 369:654.

-
270. **Ray, S.K., C. Putterman, and B. Diamond.** 1996. Pathogenic autoantibodies are routinely generated during the response to foreign antigen: a paradigm for autoimmune disease. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 93:2019.
271. **Holmdahl, R., C. Vingsbo, J.A. Mo, E. Michaelsson, V. Malmstrom, L. Jansson, and U. Brunsberg.** 1995. Chronicity of tissue-specific experimental autoimmune disease: a role for B cells? *Immunol.Rev.* 144:109-35:109.
272. **Kakimoto, K.** 1991. Collagen-induced arthritis--characteristics of the animal model and implications for the treatment of autoimmune disease. *Chin.Med.Sci.J.* 6:78.
273. **Rabinovich, G.A., G. Daly, H. Dreja, H. Tailor, C.M. Riera, J. Hirabayashi, and Y. Chernajovsky.** 1999. Recombinant galectin-1 and its genetic delivery suppress collagen-induced arthritis via T cell apoptosis. *J.Exp.Med.* 190:385.
274. **Hom, J.T., L.D. Butler, P.E. Riedl, and A.M. Bendele.** 1988. The progression of the inflammation in established collagen-induced arthritis can be altered by treatments with immunological or pharmacological agents which inhibit T cell activities. *Eur.J.Immunol.* 18:881.
275. **Williams, R.O. and A. Whyte.** 1996. Anti-CD4 monoclonal antibodies suppress murine collagen-induced arthritis only at the time of primary immunisation. *Cell Immunol.* 170:291.
276. **Williams, R.O., L.J. Mason, M. Feldmann, and R.N. Maini.** 1994. Synergy between anti-CD4 and anti-tumor necrosis factor in the amelioration of established collagen-induced arthritis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 91:2762.
277. **Charrad, R.S., Y. Li, B. Delpech, N. Balitrand, D. Clay, C. Jasmin, C. Chomienne, and F. Smadja-Joffe.** 1999. Ligation of the CD44 adhesion molecule reverses blockage of differentiation in human acute myeloid leukemia [see comments]. *Nat.Med.* 5:669.
278. **Fujii, K., Y. Tanaka, S. Hubscher, K. Saito, T. Ota, and S. Eto.** 1999. Cross-linking of CD44 on rheumatoid synovial cells up-regulates VCAM-1. *J.Immunol.* 162:2391.
279. **Haynes, B.F., L.P. Hale, K.L. Patton, M.E. Martin, and R.M. McCallum.** 1991. Measurement of an adhesion molecule as an indicator of inflammatory disease activity. Up-regulation of the receptor for hyaluronate (CD44) in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 34:1434.
280. **Nedvetzki, S., M. Walmsley, E. Alpert, R.O. Williams, M. Feldmann, and D. Naor.** 1999. CD44 involvement in experimental collagen-induced arthritis (CIA). *J.Autoimmun.* 13:39.
281. **Nedvetzki, S., M. Walmsley, E. Alpert, R.O. Williams, M. Feldmann, and D. Naor.** 1999. CD44 involvement in experimental collagen-induced arthritis (CIA). *J.Autoimmun.* 13:39.
282. **Verdrengh, M., R. Holmdahl, and A. Tarkowski.** 1995. Administration of antibodies to hyaluronanreceptor (CD44) delays the start and ameliorates the severity of collagen II arthritis. *Scand.J.Immunol.* 42:353.
283. **Mikecz, K., F.R. Brennan, J.H. Kim, and T.T. Glant.** 1995. Anti-CD44 treatment abrogates tissue oedema and leukocyte infiltration in murine arthritis. *Nat.Med.* 1:558.
284. **Cronstein, B.N. and G. Weissmann.** 1993. The adhesion molecules of inflammation. *Arthritis Rheum.* 36:147.

-
285. **Zeidler, A., R. Brauer, K. Thoss, J. Bahnsen, V. Heinrichs, D. Jablonski-Westrich, M. Wroblewski, S. Rebstock, and A. Hamann.** 1995. Therapeutic effects of antibodies against adhesion molecules in murine collagen type II-induced arthritis. *Autoimmunity*. 21:245.
286. **Kadowaki, K.M., H. Matsuno, H. Tsuji, and I. Tunru.** 1994. CD4+ T cells from collagen-induced arthritic mice are essential to transfer arthritis into severe combined immunodeficient mice. *Clin.Exp.Immunol.* 97:212.
287. **Joosten, L.A., E. Lubberts, P. Durez, M.M. Helsen, M.J. Jacobs, M. Goldman, and W.B. van den Berg.** 1997. Role of interleukin-4 and interleukin-10 in murine collagen-induced arthritis. Protective effect of interleukin-4 and interleukin-10 treatment on cartilage destruction. *Arthritis Rheum.* 40:249.
288. **Murphy, K.M., T.L. Murphy, S.J. Szabo, N.G. Jacobson, M.L. Guler, J.D. Gorham, and U. Gubler.** 1997. Regulation of IL-12 receptor expression in early T-helper responses implies two phases of Th1 differentiation: capacitance and development. *Chem.Immunol.* 68:54-69:54.
289. **Yoshino, S. and J. Yoshino.** 1998. Enhancement of T-cell-mediated arthritis in mice by treatment with a monoclonal antibody against interleukin-4. *Cell Immunol.* 185:153.
290. **Horsfall, A.C., D.M. Butler, L. Marinova, P.J. Warden, R.O. Williams, R.N. Maini, and M. Feldmann.** 1997. Suppression of collagen-induced arthritis by continuous administration of IL-4. *J.Immunol.* 159:5687.
291. **Bessis, N., J. Honiger, D. Damotte, A. Minty, C. Fournier, D. Fradelizi, and M. Boissier.** 1999. Encapsulation in hollow fibres of xenogeneic cells engineered to secrete IL-4 or IL-13 ameliorates murine collagen-induced arthritis (CIA). *Clin.Exp.Immunol.* 117:376.
292. **Walmsley, M., P.D. Katsikis, E. Abney, S. Parry, R.O. Williams, R.N. Maini, and M. Feldmann.** 1996. Interleukin-10 inhibition of the progression of established collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 39:495.
293. **Katsikis, P.D., C.Q. Chu, F.M. Brennan, R.N. Maini, and M. Feldmann.** 1994. Immunoregulatory role of interleukin 10 in rheumatoid arthritis. *J.Exp.Med.* 179:1517.
294. **Mauri, C., R.O. Williams, M. Walmsley, and M. Feldmann.** 1996. Relationship between Th1/Th2 cytokine patterns and the arthritogenic response in collagen-induced arthritis. *Eur.J.Immunol.* 26:1511.
295. **Chu, C.Q. and M. Londei.** 1996. Induction of Th2 cytokines and control of collagen-induced arthritis by nondepleting anti-CD4 Abs. *J.Immunol.* 157:2685.
296. **Krco, C.J., J. Pawelski, J. Harders, D. McCormick, M. Griffiths, H.S. Luthra, and C.S. David.** 1996. Characterization of the antigenic structure of human type II collagen. *J.Immunol.* 156:2761.
297. **Brand, D.D., L.K. Myers, K. Terato, K.B. Whittington, J.M. Stuart, A.H. Kang, and E.F. Rosloniec.** 1994. Characterization of the T cell determinants in the induction of autoimmune arthritis by bovine alpha 1(II)-CB11 in H-2q mice. *J.Immunol.* 152:3088.
298. **Joosten, L.A., E. Lubberts, M.M. Helsen, and W.B. van den Berg.** 1997. Dual role of IL-12 in early and late stages of murine collagen type II arthritis. *J.Immunol.* 159:4094.
299. **McIntyre, K.W., D.J. Shuster, K.M. Gillooly, R.R. Warriar, S.E. Connaughton, L.B. Hall,**

-
- L.H. Arp, M.K. Gately, and J. Magram.** 1996. Reduced incidence and severity of collagen-induced arthritis in interleukin-12-deficient mice. *Eur.J.Immunol.* 26:2933.
300. **Malfait, A.M., A.S. Malik, L. Marinova-Mutafchieva, D.M. Butler, R.N. Maini, and M. Feldmann.** 1999. The beta2-adrenergic agonist salbutamol is a potent suppressor of established collagen-induced arthritis: mechanisms of action. *J.Immunol.* 162:6278.
301. **Kim, S. and R.R. Voskuhl.** 1999. Decreased IL-12 production underlies the decreased ability of male lymph node cells to induce experimental autoimmune encephalomyelitis. *J.Immunol.* 162:5561.
302. **Issazadeh, S., A. Ljungdahl, B. Hojeberg, M. Mustafa, and T. Olsson.** 1995. Cytokine production in the central nervous system of Lewis rats with experimental autoimmune encephalomyelitis: dynamics of mRNA expression for interleukin-10, interleukin-12, cytolysin, tumor necrosis factor alpha and tumor necrosis factor beta. *J.Neuroimmunol.* 61:205.
303. **Falcone, M., B. Yeung, L. Tucker, E. Rodriguez, and N. Sarvetnick.** 1999. A defect in interleukin 12-induced activation and interferon gamma secretion of peripheral natural killer T cells in nonobese diabetic mice suggests new pathogenic mechanisms for insulin-dependent diabetes mellitus. *J.Exp.Med.* 190:963.
304. **Koch, F., U. Stanzl, P. Jennewein, K. Janke, C. Heufler, E. Kampgen, N. Romani, and G. Schuler.** 1996. High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10 [published erratum appears in J Exp Med 1996 Oct 1;184(4):following 1590]. *J.Exp.Med.* 184:741.
305. **Wenner, C.A., M.L. Guler, S.E. Macatonia, A. O'Garra, and K.M. Murphy.** 1996. Roles of IFN-gamma and IFN-alpha in IL-12-induced T helper cell-1 development. *J.Immunol.* 156:1442.
306. **Bohn, E. and I.B. Autenrieth.** 1996. IL-12 is essential for resistance against *Yersinia enterocolitica* by triggering IFN-gamma production in NK cells and CD4+ T cells. *J.Immunol.* 156:1458.
307. **Szabo, S.J., A.S. Dighe, U. Gubler, and K.M. Murphy.** 1997. Regulation of the interleukin (IL)-12R beta 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells. *J.Exp.Med.* 185:817.
308. **Kennedy, M.K., K.S. Picha, K.D. Shanebeck, D.M. Anderson, and K.H. Grabstein.** 1994. Interleukin-12 regulates the proliferation of Th1, but not Th2 or Th0, clones. *Eur.J.Immunol.* 24:2271.
309. **Schijns, V.E., B.L. Haagmans, E.O. Rijke, S. Huang, M. Aguet, and M.C. Horzinek.** 1994. IFN-gamma receptor-deficient mice generate antiviral Th1-characteristic cytokine profiles but altered antibody responses. *J.Immunol.* 153:2029.
310. **Swihart, K., U. Fruth, N. Messmer, K. Hug, R. Behin, S. Huang, G. Del Giudice, M. Aguet, and J.A. Louis.** 1995. Mice from a genetically resistant background lacking the interferon gamma receptor are susceptible to infection with *Leishmania major* but mount a polarized T helper cell 1-type CD4+ T cell response. *J.Exp.Med.* 181:961.
311. **Schijns, V.E., B.L. Haagmans, and M.C. Horzinek.** 1995. IL-12 stimulates an antiviral type 1 cytokine response but lacks adjuvant activity in IFN-gamma-receptor-deficient mice. *J.Immunol.* 155:2525.

-
312. **Graham, M.B., D.K. Dalton, D. Giltinan, V.L. Braciale, T.A. Stewart, and T.J. Braciale.** 1993. Response to influenza infection in mice with a targeted disruption in the interferon gamma gene. *J.Exp.Med.* 178:1725.
313. **Wang, Z.E., S.L. Reiner, S. Zheng, D.K. Dalton, and R.M. Locksley.** 1994. CD4+ effector cells default to the Th2 pathway in interferon gamma- deficient mice infected with *Leishmania major*. *J.Exp.Med.* 179:1367.
314. **Dalton, D.K., S. Pitts-Meek, S. Keshav, I.S. Figari, A. Bradley, and T.A. Stewart.** 1993. Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes [see comments]. *Science* 259:1739.
315. **Snapper, C.M., C. Peschel, and W.E. Paul.** 1988. IFN-gamma stimulates IgG2a secretion by murine B cells stimulated with bacterial lipopolysaccharide. *J.Immunol.* 140:2121.
316. **Brand, D.D., T.N. Marion, L.K. Myers, E.F. Rosloniec, W.C. Watson, J.M. Stuart, and A.H. Kang.** 1996. Autoantibodies to murine type II collagen in collagen-induced arthritis: a comparison of susceptible and nonsusceptible strains. *J.Immunol.* 157:5178.
317. **Jansson, L. and R. Holmdahl.** 1993. Genes on the X chromosome affect development of collagen-induced arthritis in mice. *Clin.Exp.Immunol.* 94:459.
318. **Luster, A.D. and J.V. Ravetch .** 1987. Genomic characterization of a gamma-interferon-inducible gene (IP-10) and identification of an interferon-inducible hypersensitive site. *Mol.Cell Biol.* 7:3723.
319. **Biddison, W.E., D.D. Taub, W.W. Cruikshank, D.M. Center, E.W. Connor, and K. Honma.** 1997. Chemokine and matrix metalloproteinase secretion by myelin proteolipid protein-specific CD8+ T cells: potential roles in inflammation. *J.Immunol.* 158:3046.
320. **Taub, D.D., A.R. Lloyd, K. Conlon, J.M. Wang, J.R. Ortaldo, A. Harada, K. Matsushima, D.J. Kelvin, and J.J. Oppenheim.** 1993. Recombinant human interferon-inducible protein 10 is a chemoattractant for human monocytes and T lymphocytes and promotes T cell adhesion to endothelial cells. *J.Exp.Med.* 177:1809.
321. **Loetscher, M., B. Gerber, P. Loetscher, S.A. Jones, L. Piali, I. Clark-Lewis, M. Baggiolini, and B. Moser.** 1996. Chemokine receptor specific for IP10 and mig: structure, function, and expression in activated T-lymphocytes [see comments]. *J.Exp.Med.* 184:963.
322. **Tran, E.H., E.N. Prince, and T. Owens.** IFN-gamma shapes immune invasion of the central nervous system via regulation of chemokines. *J.Immunol.* 2000.Mar.1.;164.(5.):2759.-68. 164:2759.
323. **Marinova-Mutafchieva, L., R.O. Williams, L.J. Mason, C. Mauri, M. Feldmann, and R.N. Maini.** 1997. Dynamics of proinflammatory cytokine expression in the joints of mice with collagen-induced arthritis (CIA). *Clin.Exp.Immunol.* 107:507.
324. **Thorbecke, G.J., R. Shah, C.H. Leu, A.P. Kuruvilla, A.M. Hardison, and M.A. Palladino.** 1992. Involvement of endogenous tumor necrosis factor alpha and transforming growth factor beta during induction of collagen type II arthritis in mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 89:7375.
325. **Quattrocchi, E., M. Walmsley, K. Browne, R.O. Williams, L. Marinova-Mutafchieva, W. Burman, D.M. Butler, and M. Feldmann.** 1999. Paradoxical effects of adenovirus-mediated blockade of TNF activity in murine collagen-induced arthritis. *J.Immunol.* 163:1000.

-
326. **Kollias, G., E. Douni, G. Kassiotis, and D. Kontoyiannis.** 1999. On the role of tumor necrosis factor and receptors in models of multiorgan failure, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and inflammatory bowel disease. *Immunol.Rev.* 169:175-94:175.
327. **Joosten, L.A., M.M. Helsen, T. Saxne, F.A. van De Loo, D. Heinegard, and W.B. van den Berg.** 1999. IL-1 alpha beta blockade prevents cartilage and bone destruction in murine type II collagen-induced arthritis, whereas TNF-alpha blockade only ameliorates joint inflammation. *J.Immunol.* 163:5049.
328. **Sasai, M., Y. Saeki, S. Ohshima, K. Nishioka, T. Mima, T. Tanaka, Y. Katada, K. Yoshizaki, M. Suemu**
, and T. Kishimoto. 1999. Delayed onset and reduced severity of collagen-induced arthritis in interleukin-6-deficient mice. *Arthritis Rheum.* 42:1635.
329. **Hom, J.T., A.M. Bendele, and D.G. Carlson.** 1988. In vivo administration with IL-1 accelerates the development of collagen-induced arthritis in mice. *J.Immunol.* 141:834.
330. **Moore, K.W., A. O'Garra, M. de Waal, P. Vieira, and T.R. Mosmann.** 1993. Interleukin-10. *Annu.Rev.Immunol.* 11:165-90:165.
331. **Bogdan, C., Y. Vodovotz, and C. Nathan.** 1991. Macrophage deactivation by interleukin 10. *J.Exp.Med.* 174:1549.
332. **Tripp, C.S., S.F. Wolf, and E.R. Unanue.** 1993. Interleukin 12 and tumor necrosis factor alpha are costimulators of interferon gamma production by natural killer cells in severe combined immunodeficiency mice with listeriosis, and interleukin 10 is a physiologic antagonist. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 90:3725.
333. **de Waal, M., C.G. Figdor, R. Huijbens, S. Mohan-Peterson, B. Bennett, J. Culpepper, W. Dang, G. Zurawski, and J.E. de Vries.** 1993. Effects of IL-13 on phenotype, cytokine production, and cytotoxic function of human monocytes. Comparison with IL-4 and modulation by IFN-gamma or IL-10. *J.Immunol.* 151:6370.
334. **D'Andrea, A., M. Aste-Amezaga, N.M. Valiante, X. Ma, M. Kubin, and G. Trinchieri.** 1993. Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *J.Exp.Med.* 178:1041.
335. **Lalani, I., K. Bhol, and A.R. Ahmed.** 1997. Interleukin-10: biology, role in inflammation and autoimmunity [published erratum appears in *Ann Allergy Asthma Immunol* 1998 Mar;80(3):A-6]. *Ann.Allergy Asthma Immunol.* 79:469.
336. **Segal, B.M., B.K. Dwyer, and E.M. Shevach.** 1998. An interleukin (IL)-10/IL-12 immunoregulatory circuit controls susceptibility to autoimmune disease. *J.Exp.Med.* 187:537.
337. **Kasama, T., J. Yamazaki, R. Hanaoka, Y. Miwa, Y. Hatano, K. Kobayashi, M. Negishi, H. Ide, and M. Adachi.** 1999. Biphasic regulation of the development of murine type II collagen- induced arthritis by interleukin-12: possible involvement of endogenous interleukin-10 and tumor necrosis factor alpha. *Arthritis Rheum.* 42:100.
338. **Taylor, A.P. and H.W. Murray.** 1997. Intracellular antimicrobial activity in the absence of interferon-gamma: effect of interleukin-12 in experimental visceral leishmaniasis in interferon-gamma gene-disrupted mice. *J.Exp.Med.* 185:1231.

-
339. **Laan, R.F., T.L. Jansen, and P.L. van Riel.** 1999. Glucocorticosteroids in the management of rheumatoid arthritis. *Rheumatology.(Oxford.)* 38:6.
340. **Thompson, C.B.** 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267:1456.
341. **Gonzalo, J.A., A. Gonzalez-Garcia, C. Martinez, and G. Kroemer.** 1993. Glucocorticoid-mediated control of the activation and clonal deletion of peripheral T cells in vivo. *J.Exp.Med.* 177:1239.
342. **Franchimont, D., J. Galon, M. Gadina, R. Visconti, Y. Zhou, M. Aringer, D.M. Frucht, G.P. Chrousos, and J.J. O'Shea.** Inhibition of Th1 immune response by glucocorticoids: dexamethasone selectively inhibits IL-12-induced Stat4 phosphorylation in T lymphocytes. *J.Immunol.*2000.Feb.15.;164.(4.):1768.-74. 164:1768.
343. **Wu, C.Y., K. Wang, J.F. McDyer, and R.A. Seder.** 1998. Prostaglandin E2 and dexamethasone inhibit IL-12 receptor expression and IL-12 responsiveness. *J.Immunol.* 161:2723.
344. **Dumont, A., S.P. Hehner, M.L. Schmitz, J.A. Gustafsson, J. Liden, S. Okret, P.T. van der Saag, S. Wissink, B. van der Burg, P. Herrlich, G. Haegeman, K. De Bosscher, and W. Fiers.** 1998. Cross-talk between steroids and NF-kappa B: what language? *Trends.Biochem.Sci.* 23:233.
345. **Matyszak, M.K., S. Citterio, M. Rescigno, and P. Ricciardi-Castagnoli.** Differential effects of corticosteroids during different stages of dendritic cell maturation [In Process Citation]. *Eur.J.Immunol.*2000.Apr.;30.(4.):1233.-42. 30:1233.
346. **Mussener, A., M.J. Litton, E. Lindroos, and L. Klareskog.** 1997. Cytokine production in synovial tissue of mice with collagen- induced arthritis (CIA). *Clin.Exp.Immunol.* 107:485.
347. **Williams, A.S., S.G. Jones, R.M. Goodfellow, N. Amos, and B.D. Williams.** 1999. Interleukin-1beta (IL-1beta) inhibition: a possible mechanism for the anti-inflammatory potency of liposomally conjugated methotrexate formulations in arthritis. *Br.J.Pharmacol.* 128:234.
348. **Neurath, M.F., K. Hildner, C. Becker, J.F. Schlaak, K. Barbulescu, T. Germann, E. Schmitt, P. Schirmacher, S. Haralambous, M. Pasparakis, K.H. Meyer Zum Buschenfelde, G. Kollias, and E. Marker-Hermann.** 1999. Methotrexate specifically modulates cytokine production by T cells and macrophages in murine collagen-induced arthritis (CIA): a mechanism for methotrexate-mediated immunosuppression. *Clin.Exp.Immunol.* 115:42.
349. **Hildner, K., S. Finotto, C. Becker, J. Schlaak, P. Schirmacher, P.R. Galle, E. Marker-Hermann, and M.F. Neurath.** 1999. Tumour necrosis factor (TNF) production by T cell receptor-primed T lymphocytes is a target for low dose methotrexate in rheumatoid arthritis. *Clin.Exp.Immunol.* 118:137.
350. **Tortorella, M.D., T.C. Burn, M.A. Pratta, I. Abbaszade, J.M. Hollis, R. Liu, S.A. Rosenfeld, R.A. Copeland, C.P. Decicco, R. Wynn, A. Rockwell, F. Yang, J.L. Duke, K. Solomon, H. George, R. Bruckner, H. Nagase, Y. Itoh, D.M. Ellis, H. Ross, B.H. Wiswall, K. Murphy, M.C.J. Hillman, G.F. Hollis, and E.C. Arner.** 1999. Purification and cloning of aggrecanase-1: a member of the ADAMTS family of proteins [see comments]. *Science* 284:1664.
351. **Sodin-Semrl, S., B. Taddeo, D. Tseng, J. Varga, and S. Fiore.** Lipoxin A4 inhibits IL-1 beta-induced IL-6, IL-8, and matrix metalloproteinase-3 production in human synovial fibroblasts and enhances synthesis of tissue inhibitors of metalloproteinases. *J.Immunol.*2000.Mar.1.;164.(5.):2660.-6. 164:2660.

-
352. **Morgunova, E., A. Tuuttila, U. Bergmann, M. Isupov, Y. Lindqvist, G. Schneider, and K. Tryggvason.** 1999. Structure of human pro-matrix metalloproteinase-2: activation mechanism revealed [see comments]. *Science* 284:1667.
353. **Song, X., L. Zeng, W. Jin, J. Thompson, D.E. Mizel, K. Lei, R.C. Billingham, A.R. Poole, and S.M. Wahl.** 1999. Secretory leukocyte protease inhibitor suppresses the inflammation and joint damage of bacterial cell wall-induced arthritis. *J.Exp.Med.* 190:535.
354. **Renggli-Zulliger, N., J. Dudler, N. Fujimoto, K. Iwata, and A. So.** 1999. Use of encapsulated cells secreting murine TIMP-2 ameliorates collagen- induced arthritis in mice. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 878:515-8:515.
355. **Seibert, K., J. Lefkowitz, C. Tripp, P. Isakson, and P. Needleman.** 1999. COX-2 inhibitors--is there cause for concern? [news; comment]. *Nat.Med.* 5:621.
356. **Gilroy, D.W., P.R. Colville-Nash, D. Willis, J. Chivers, M.J. Paul-Clark, and D.A. Willoughby.** 1999. Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties [see comments]. *Nat.Med.* 5:698.
357. **Schulze-Koops, H., L.S. Davis, T.P. Haverty, M.C. Wacholtz, and P.E. Lipsky.** 1998. Reduction of Th1 cell activity in the peripheral circulation of patients with rheumatoid arthritis after treatment with a non- depleting humanized monoclonal antibody to CD4. *J.Rheumatol.* 25:2065.
358. **Chiocchia, G., B. Manoury, M.C. Boissier, and C. Fournier.** 1993. T cell-targeted immunotherapy in murine collagen-induced arthritis. *Clin.Exp.Rheumatol.* 11 Suppl 9:S15-7:S15.
359. **Hom, J.T., T. Estridge, H. Cole, V. Gliszczynski, and A. Bendele.** 1993. Effects of various anti-T cell receptor antibodies on the development of type II collagen-induced arthritis in mice. *Immunol.Invest.* 22:257.
360. **Janson, R.W. and W.P. Arend.** 1992. Receptor-targeted immunotherapy. *Bull.Rheum.Dis.* 41:6.
361. **Haqqi, T.M., X.M. Qu, D. Anthony, J. Ma, and M.S. Sy.** 1996. Immunization with T cell receptor V beta chain peptides deletes pathogenic T cells and prevents the induction of collagen-induced arthritis in mice. *J.Clin.Invest.* 97:2849.
362. **Rosloniec, E.F., D.D. Brand, K.B. Whittington, J.M. Stuart, M. Ciubotaru, and E.S. Ward.** 1995. Vaccination with a recombinant V alpha domain of a TCR prevents the development of collagen-induced arthritis. *J.Immunol.* 155:4504.
363. **Matsumoto, Y., Y. Jee, and M. Sugisaki.** Successful TCR-based immunotherapy for autoimmune myocarditis with DNA vaccines after rapid identification of pathogenic TCR. *J.Immunol.* 2000.Feb.15.;164.(4.):2248.-54. 164:2248.
364. **Williams, W.V., Q. Fang, J.M. Von Feldt, J.D. Boyer, M. Luchi, B. Wang, and D.B. Weiner.** 1994. Immunotherapeutic strategies targeting rheumatoid synovial T-cell receptors by DNA inoculation. *Immunol.Res.* 13:145.
365. **Anderton, S.M., S. Kissler, A.G. Lamont, and D.C. Wraith.** 1999. Therapeutic potential of TCR antagonists is determined by their ability to modulate a diverse repertoire of autoreactive T cells. *Eur.J.Immunol.* 29:1850.
366. **Nicholson, L.B. and V.K. Kuchroo.** 1997. T cell recognition of self and altered self antigens. *Crit.Rev.Immunol.* 17:449.

-
367. **Wraith, D.C.** 1995. Induction of antigen-specific unresponsiveness with synthetic peptides: specific immunotherapy for treatment of allergic and autoimmune conditions. *Int.Arch.Allergy Immunol.* 108:355.
368. **Moreland, L.W., P.W. Pratt, M.D. Mayes, A. Postlethwaite, M.H. Weisman, T. Schnitzer, R. Lightfoot, L. Calabrese, D.J. Zelinger, and J.N. Woody.** 1995. Double-blind, placebo-controlled multicenter trial using chimeric monoclonal anti-CD4 antibody, cM-T412, in rheumatoid arthritis patients receiving concomitant methotrexate. *Arthritis Rheum.* 38:1581.
369. **Tak, P.P., P.A. van der Lubbe, A. Cauli, M.R. Daha, T.J. Smeets, P.M. Kluin, A.E. Meinders, G. Yanni, G.S. Panayi, and F.C. Breedveld.** 1995. Reduction of synovial inflammation after anti-CD4 monoclonal antibody treatment in early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 38:1457.
370. **Rep, M.H., B.W. van Oosten, M.T. Roos, H.J. Ader, C.H. Polman, and R.A. van Lier.** 1997. Treatment with depleting CD4 monoclonal antibody results in a preferential loss of circulating naive T cells but does not affect IFN- gamma secreting TH1 cells in humans. *J.Clin.Invest.* 99:2225.
371. **Goldschmidt, T.J., M. Andersson, V. Malmstrom, and R. Holmdahl.** 1992. Activated type II collagen reactive T cells are not eliminated by in vivo anti-CD4 treatment. Implications for therapeutic approaches on autoimmune arthritis. *Immunobiology* 184:359.
372. **Kollias, G., E. Douni, G. Kassiotis, and D. Kontoyiannis.** 1999. The function of tumour necrosis factor and receptors in models of multi- organ inflammation, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and inflammatory bowel disease. *Ann.Rheum.Dis.* 58 Suppl 1:132-9:132.
373. **Breedveld, F.** 1998. New tumor necrosis factor-alpha biologic therapies for rheumatoid arthritis. *Eur.Cytokine.Netw.* 9:233.
374. **Charles, P., M.J. Elliott, D. Davis, A. Potter, J.R. Kalden, C. Antoni, F.C. Breedveld, J.S. Smolen, G. Eberl, K. deWoody, M. Feldmann, and R.N. Maini.** 1999. Regulation of cytokines, cytokine inhibitors, and acute-phase proteins following anti-TNF-alpha therapy in rheumatoid arthritis. *J.Immunol.* 163:1521.
375. **Feldmann, M., M.J. Elliott, J.N. Woody, and R.N. Maini.** 1997. Anti-tumor necrosis factor-alpha therapy of rheumatoid arthritis. *Adv.Immunol.* 64:283-350:283.
376. **Williams, R.O., M. Feldmann, and R.N. Maini.** 1992. Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen- induced arthritis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 89:9784.
377. **Wooley, P.H., J. Dutcher, M.B. Widmer, and S. Gillis.** 1993. Influence of a recombinant human soluble tumor necrosis factor receptor FC fusion protein on type II collagen-induced arthritis in mice. *J.Immunol.* 151:6602.
378. **Kim, K.N., S. Watanabe, Y. Ma, S. Thornton, E.H. Giannini, and R. Hirsch.** Viral IL-10 and Soluble TNF Receptor Act Synergistically to Inhibit Collagen-Induced Arthritis Following Adenovirus- Mediated Gene Transfer. *J.Immunol.*2000.Feb.1.;164.(3.):1576.-1581. 164:1576.
379. **Guery, L., F. Batteux, N. Bessis, M. Breban, M.C. Boissier, C. Fournier, and G. Chiochia.** Expression of Fas ligand improves the effect of IL-4 in collagen- induced arthritis. *Eur.J.Immunol.*2000.Jan.;30.(1.):308.-315. 30:308.
380. **Zhang, H., Y. Yang, J.L. Horton, E.B. Samoilova, T.A. Judge, L.A. Turka, J.M. Wilson, and**

- Y. Chen.** 1997. Amelioration of collagen-induced arthritis by CD95 (Apo-1/Fas)-ligand gene transfer. *J.Clin.Invest.* 100:1951.
381. **Nicholson, L.B. and V.K. Kuchroo.** 1996. Manipulation of the Th1/Th2 balance in autoimmune disease. *Curr.Opin.Immunol.* 8:837.
382. **Ramshaw, I.A., S.A. Fordham, C.C. Bernard, D. Maguire, W.B. Cowden, and D.O. Willenborg.** 1997. DNA vaccines for the treatment of autoimmune disease. *Immunol.Cell Biol.* 75:409.
383. **Katsikis, P.D., C.Q. Chu, F.M. Brennan, R.N. Maini, and M. Feldmann.** 1994. Immunoregulatory role of interleukin 10 in rheumatoid arthritis. *J.Exp.Med.* 179:1517.
384. **Kuruvilla, A.P., R. Shah, G.M. Hochwald, H.D. Liggitt, M.A. Palladino, and G.J. Thorbecke.** 1991. Protective effect of transforming growth factor beta 1 on experimental autoimmune diseases in mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 88:2918.
385. **Walmsley, M., P.D. Katsikis, E. Abney, S. Parry, R.O. Williams, R.N. Maini, and M. Feldmann.** 1996. Interleukin-10 inhibition of the progression of established collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 39:495.
386. **Song, X.Y., M. Gu, W.W. Jin, D.M. Klinman, and S.M. Wahl.** 1998. Plasmid DNA encoding transforming growth factor-beta1 suppresses chronic disease in a streptococcal cell wall-induced arthritis model. *J.Clin.Invest.* 101:2615.
387. **Tsuji, F., Y. Miyake, H. Aono, Y. Kawashima, and S. Mita.** 1999. Effects of bucillamine and N-acetyl-L-cysteine on cytokine production and collagen-induced arthritis (CIA). *Clin.Exp.Immunol.* 115:26.
388. **Butler, D.M., A.M. Malfait, R.N. Maini, F.M. Brennan, and M. Feldmann.** 1999. Anti-IL-12 and anti-TNF antibodies synergistically suppress the progression of murine collagen-induced arthritis. *Eur.J.Immunol.* 29:2205.
389. **Triantaphyllopoulos, K.A., R.O. Williams, H. Tailor, and Y. Chernajovsky.** 1999. Amelioration of collagen-induced arthritis and suppression of interferon-gamma, interleukin-12, and tumor necrosis factor alpha production by interferon-beta gene therapy. *Arthritis Rheum.* 42:90.
390. **Tak, P.P., H.B. 't, M.C. Kraan, M. Jonker, T.J. Smeets, and F.C. Breedveld.** 1999. The effects of interferon beta treatment on arthritis. *Rheumatology.(Oxford.)* 38:362.
391. **Heinzel, F.P. and R.M. Rerko.** 1999. Cure of progressive murine leishmaniasis: interleukin 4 dominance is abolished by transient CD4(+) T cell depletion and T helper cell type 1- selective cytokine therapy. *J.Exp.Med.* 189:1895.
392. **Runnels, H.A., D.A. Weber, J.C. Moore, L.E. Westerman, and P.E. Jonsen.** 1997. Intact proteins can bind to class II histocompatibility molecules with high affinity. *Molecular Immunology* 34:471

ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
ABTS	2, 2-Azino-bis-(3-Ethylbenzthiazolin-6-Sulfonsäure)
ADDC	antikörperabhängige zellvermittelte Cytotoxizität
AK	Antikörper
APC(s)	antigenpräsentierende Zelle(n)
bio	biotinyliert
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
C1 bzw. C5	Komponenten des Komplementsystems
CII	Kollagen-Typ-II
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDR	<i>complementary determining region</i>
CD4	Differenzierungsmarker für T-Helferzellen
CD8	Differenzierungsmarker für cytotoxische T-Zellen
CFA	komplettes Freundsches Adjuvans
CIA	Kollagen-Typ-II-induzierte Arthritis
COX	Cyclooxygenase
cpm	<i>counts per minute</i>
DC(s)	dendritische Zelle(n)
Dex	Dexamethason
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTH	<i>delayed type hypersensitivity</i>
EAE	experimentelle allergische Enzephalomyelitis
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorter</i>
FcγRI	hochaffiner Rezeptor für IgG-Antikörper
FCS	fötale Kälberserum
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony stimulating factor</i>
³ H-TdR	Tritium-markiertes Thymidin
HLA	<i>human leukocyte antigen system</i>
HPO	<i>horse-radish peroxidase</i>
I-A ^q bzw. I-A ^b	I-Region assoziierte Antigene; (MHC-Klasse-II-Allele der Maus)

ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i>
IDDM	<i>insulin-dependent diabetes mellitus</i>
IFA	inkomplettes Freundsches Adjuvans
IFN	Interferon
IFN- γ R	Rezeptor für Interferon-gamma
Ig	Immunglobulin
IGIF	<i>IFN-γ-inducing factor</i>
IL	Interleukin
IL-1Ra	Antagonist für IL-1-Rezeptor
IL-2R	Rezeptor für Interleukin-2
IL-12p40	40 kD-Kette des heterodimeren IL-12
IMDM	<i>Iscove's modified Dulbecco's medium</i>
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IP-10	<i>Interferon-inducible protein 10</i>
i.d.	intradermal
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
kb	Kilobase
kD	Kilodalton
KO	<i>knock-out</i>
KÜS	Kulturüberstand
L	Ligand
LFA	<i>lymphocyte function-associated antigen</i>
LPS	Lipopolysaccharid
M	molar
MACS	<i>magnetic activated cell sorter</i>
MAF	<i>macrophage activating factor</i>
mAK	monoklonaler Antikörper
MCP	<i>monocyte chemoattractant protein</i>
MEM	<i>minimal essential medium</i>
MG	Molekulargewicht
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MIF	<i>migration inhibitory factor</i>
min	Minute
MIP	<i>monocyte inflammatory protein</i>
MMP	Matrixmetalloprotease(n)

Mph	Makrophagen
MS	Multiple Sklerose
MZ	Milzzellen
NF- κ B	<i>nuclear factor-κB</i>
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NMS	normales Mausserum
NOD	<i>nonobese diabetic mouse</i>
OD ₂₈₀	optische Dichte bei 280 nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBL	<i>peripheral blood lymphocytes</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PEC	peritoneale Exsudat-Zellen
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
R	Rezeptor
RA	Rheumatoide Arthritis
RANTES	<i>regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted</i>
RF	Rheumafaktor
RT	Raumtemperatur
SAC	<i>Staphylococcus aureus</i> Cowan-A, getötet und fixiert
SCID	<i>severe combined immune deficiency</i>
SF	Synovialflüssigkeit
SLE	systemischer Lupus erythematoses
STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
sTNFR	löslicher TNF-Rezeptor
TCR	T-Zellrezeptor
tg	transgen
TGF- β	<i>transforming growth factor-β</i>
T _H	T-Helferzellen
TNF	Tumor Nekrose Faktor
U	<i>unit</i>
WT	Wildtyp
VCAM	<i>vascular cell adhesion molecule</i>
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
VLA	<i>very late antigene</i>