

Aus dem Lehrstuhl Innere Medizin I
Leitung: Prof. Dr. Martina Müller-Schilling
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

**Untersuchung zur Neuroimmunmodulation der Expression und Funktion des
IL-7/IL-7R α Systems auf Maus-B-Zellen –
Bedeutung im Kontext der Arthritis**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Judith Maria Anthofer

2012

Aus dem Lehrstuhl Innere Medizin I
Leitung: Prof. Dr. Martina Müller-Schilling
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

**Untersuchung zur Neuroimmunmodulation der Expression und Funktion des
IL-7/IL-7R α Systems auf Maus-B-Zellen –
Bedeutung im Kontext der Arthritis**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Judith Maria Anthofer

2012

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten Reichert
1. Berichterstatter:	PD Dr. med. Georg Pongratz
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Susanne Grässel
Tag der mündlichen Prüfung:	24. Mai 2013

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Rheumatoide Arthritis	1
1.2 Sympathisches Nervensystem – Grundlagen	4
1.2.1 Die Bedeutung des sympathischen Nervensystems bei der Rheumatoiden Arthritis	6
1.3 B-Zelle.....	8
1.3.1 Die Bedeutung der B-Zelle bei der rheumatoiden Arthritis	9
1.3.2 Modulation der B-Zell Funktion durch das SNS.....	11
1.4 Das IL-7/IL-7 Rezeptor System – Grundlagen	12
1.4.1 Regulation der IL-7R Expression.....	16
1.4.2 Die Bedeutung des IL-7/ IL-7R Systems bei der Arthritis.....	17
1.4.3 IL-7 Rezeptor auf B-Zellen	18
1.5 Ziel der Arbeit	19
2 Material und Methoden	20
2.1 Tierhaltung	20
2.2 Methoden.....	20
2.2.1 Herkunft und Präparation der Zellen	20
2.2.2 Durchflusszytometrie	23
2.2.2.1 Färbung von Zelloberflächenantigenen	24
2.2.2.2 Färbung von intrazellulären Antigenen	28
2.3 Auswertung, Statistik	30
3 Ergebnisse	31
3.1 Der IL-7 Rezeptor auf humanen B-Zellen	31
3.2 Charakterisierung von IL-7R α positiven Maus B-Zellen.....	32
3.2.1 Expression von CD127 an der Zelloberfläche	33
3.2.2 Einfluss der Stimulation auf intrazelluläre Signalwege	35
3.2.2.1 Die Sensitivität von Western Blot und Immunopräzipitation scheint zu gering, um phosphoryliertes STAT5 zu detektieren	35
3.2.2.2 Durchflusszytometrische Messung von pSTAT5 und pERK. 35	
3.2.2.2.1 Aktivierung von B-Zellen in Anwesenheit von Cortisol oder eines β_2 -AR hemmt die Bildung von pSTAT5 nach Stimulation mit IL-7	36

3.2.2.2.2 pERK-Gehalt in Maus B-Zellen.....	38
4 Diskussion	40
4.1 IL-7R auf humanen B-Zellen.....	40
4.2 Regulation der IL-7R positiven B-Zellen	41
4.3 Ausblick	43
5 Zusammenfassung	44
6 Literaturverzeichnis	46
7 Danksagung	59
8 Lebenslauf.....	60

Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Aminoactinomycin
AK	Antikörper
AKT	Proteinkinase B
AR	Adrenozeptoren
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BCR	B-Zell Rezeptor
BL	Baseline
BSA	bovines Serum Albumin
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
C II	Kollagen Typ II
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CCP	zyklische zitruillierte Proteine
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CLPs	<i>common lymphoid progenitor cells</i>
CREB	<i>cAMP-response-element-binding-protein</i>
CRP	C-reaktives Protein
DAG	Diacylglycerin
DC	dendritische Zellen
DM	Diabetes mellitus
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERK	Extrazellulär-Signal-regulierte-Kinase
FCS	fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat

FL	Fluoreszenzkanal
FS	Vorwärtsstreulicht, <i>forward scatter</i>
GABP	<i>GA binding protein</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GK	Glukokortikoide
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor</i>
GRB 2	<i>growth factor receptor-bound protein 2</i>
GTP	Guanosintriphosphat
HANS-Achse	Hypothalamus-Autonomes Nervensystem-Achse
HHN-Achse	Hypophysen-Hypothalamus-Nebennieren-Achse
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-7R α	Interleukin-7 Rezeptor α
IP3	Inositol-3-Phosphat
JAK	Janus-Kinase
LP	Lymphopoietin
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein Kinase
MCP	Metacarpophalangealgelenke
MCV	mutiertes-citrulliniertes-Vimentin
MEK	Mitogen-aktivierte Protein Kinase Kinase
MFI	<i>mean fluorescence intensity</i>
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MMP	Metalloproteinasen
MS	Multiple Sklerose
NK-Zellen	natürliche Killerzellen

NS	Nervensystem
OA	Osteoarthritis
P/S	Penicillin/Streptomycin
PBGF	<i>pre-B-cell growth factor</i>
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin
pERK	phosphoryliertes ERK
PI-3-K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP	proximale Interphalangealgelenke
PKA	Proteinkinase A
PNS	peripheres Nervensystem
PSNS	parasympathisches Nervensystem
pSTAT5	phosphoryliertes STAT5
RA	Rheumatoide Arthritis
Raf	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
RAG	<i>recombinase-activating-gene</i>
Ras	<i>rat sarcoma</i>
RF	Rheumafaktor
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SH	Src-Homologie
SNP	Einzelnukleotidpolymorphismus
SNS	sympathisches Nervensystem
SOCS-1	<i>suppressor of cytokine signal 1</i>
SOS	GTP-Austauschfaktor <i>son of sevenless</i>

SS	Seitwärtsstreulicht, <i>side scatter</i>
STAT	Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription
Th-Zelle	T-Helferzelle
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TSLP	<i>thymic stromal lymphopoietin</i>
ZNS	zentrales Nervensystem
γ c	<i>common cytokine gamma chain</i>

1 Einleitung

1.1 Rheumatoide Arthritis

Die Rheumatoide Arthritis (RA) gilt als die häufigste entzündlich-rheumatische Erkrankung (1), die mit einer Prävalenz von 0,5-2% ca. 1% der erwachsenen Bevölkerung betrifft. Aufgrund einer chronisch-destruierenden Entzündung der Gelenke, Sehnenscheiden und Bursae leiden die Patienten unter Schmerz, Schwellung und Steifheit an den betroffenen Stellen. Unbehandelt führt dies zu Gelenksdestruktion und -deformation mit Funktionsverlust. Prädilektionsstellen der RA sind die kleinen Gelenke der Hände und Füße, insbesondere die Finger-mittelgelenke (proximale Interphalangealgelenke, PIP), Fingergrundgelenke (Metacarpophalangealgelenke, MCP), Hand- und Zehengrundgelenke mit meist symmetrischem Befall. Zudem können auch die mittelgroßen und großen Extremitätengelenke, das Kiefergelenk und die Zervikalwirbelsäule betroffen sein. Desweiteren können extraartikuläre Manifestationen hinzukommen (1, 2, 3). Obwohl das Krankheitsbild der RA schon in der Antike bekannt war, von Dr. Augustin Jacob Landré-Beauvais 1800 erstmals beschrieben wurde und 1859 von Dr. Alfred Baring Garrod schließlich als „rheumatoide Arthritis“ benannt wurde, ist seine genaue Ätiologie und Pathogenese bis heute nicht endgültig geklärt. Jedoch ist man sich darüber einig, dass es sich bei der RA um eine komplexe multifaktorielle Systemerkrankung handelt, die durch zahlreiche exogene und/oder endogene Auslöser, vor dem Hintergrund einer genetischen Prädisposition entsteht. Es konnte gezeigt werden, dass neben der Assoziation von Umweltfaktoren wie Zigarettenkonsum (4, 5), dem weiblichen Geschlecht (6) und höherem Alter (7), auch genetische Faktoren eine Rolle bei der Entstehung der RA spielen (2, 1). Die Histopathologie, auf die an späterer Stelle eingegangen wird, die Klinik und auch die Laborwerte der Patienten mit dieser multifaktoriellen Systemerkrankung, verdeutlichen jedoch die entzündliche, und daraus folgend die autoimmune Komponente der RA. Neben den typischen Entzündungszeichen Dolor (Schmerz), Calor (Er-

wärmung), Rubor (Rötung), Tumor (Schwellung) und Functio laesa (Funktionsverlust) an den betroffenen Gelenken, findet sich eine erhöhte Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) und ein erhöhtes C-reaktives Protein (CRP) im Blut von Patienten. 1940 wurde von Dr. Erik Waaler der sogenannte Rheumafaktor (RF) in RA-Patientenserum entdeckt (8), ein Immunglobulin (Ig) M-Antikörper, der gegen das Fc-Fragment von IgG gerichtet, mit diesem Immunkomplexe bildet und somit ein Autoantikörper ist. Neben dem eher unspezifischen RF sind sowohl systemisch als auch im Gelenk noch weitere Autoantikörper bei einem Anteil der Patienten nachweisbar, die mit deutlich höherer Sensitivität das Vorliegen einer RA anzeigen. Der gebräuchlichste klinische Marker neben dem RF sind Antikörper gegen zitruillierte Proteine (anti-CCP Antikörper) die bei >50% der Patienten in der Frühphase der Erkrankung oder sogar lange Zeit vor dem klinischen Erkrankungsbeginn nachweisbar sind (3), was auf eine pathogenetische Rolle dieser Antikörper und eine Bedeutung von B-Zellen, die diese Antikörper produzieren, bei der Krankheitsentstehung hinweist. Histopathologisch findet man in den betroffenen Gelenken eine immense Hyperplasie und eine Infiltration des Synoviums mit immunkompetenten Zellen. Dazu gehören T-Zellen, B-Zellen, Monozyten und neutrophile Granulozyten, die im entzündeten Gelenk Zytokine wie z. B. Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF α) und Interleukin-1 (IL-1), Chemokine, Antikörper, Endopeptidasen und andere Faktoren sezernieren. Hinzu kommt eine intensive Vaskularisation, welche die sonst Gefäß- und Lymphozyten-freie Synovialmembran verdickt. Diese und andere Prozesse führen zur Pannusbildung, eine pathologisch verdickte Synovialis, die den Knorpel und Knochen überwächst, und zu einem Zytokinmilieu führt, welches Monozyten, Neutrophile, Fibroblasten und Osteoklasten dazu anregt, mittels Metalloproteinasen (MMPs) und Endopeptidasen, Knorpel- und Knochengewebe anzugreifen (1). Als ein Grund für die inflammatorischen Vorgänge in den betroffenen Geweben wird das Vorhandensein von Rheumafaktoren und anderen Autoantikörpern gesehen. Die gebildeten Immunkomplexe mit körpereigenen Strukturen aktivieren die Komplementkaskade und die Infiltration der Gewebe mit immunkompetenten Zellen. Die

Wichtigkeit dieser Vorgänge für die Pathogenese der Erkrankung ist allerdings nicht endgültig geklärt. Produzenten dieser autoreaktiven Antikörper sind Plasmazellen, aktivierte und differenzierte B-Zellen. Neben der lokalen Entzündungsreaktion sind bei der RA auch deutlich entzündlich-systemische Veränderungen nachweisbar. Mittlerweile ist bekannt, dass neben dem Immunsystem auch weitere Steuerungs- und Regulationssysteme an jeder Entzündungsreaktion beteiligt sind. Hierbei kommt der Hypophysen-Hypothalamus-Nebennieren-Achse (HHN-Achse) und der Hypothalamus-Autonomes Nervensystem-Achse (HANS-Achse) eine große Bedeutung zu. Die drei an der Entzündung im Wesentlichen beteiligten Systeme – das Immunsystem, das Nervensystem und das endokrine System – sind stark vernetzt. Ein Ausdruck dieser Vernetzung ist, dass Immunzellen sowohl Hormone als auch Neurotransmitter, und umgekehrt, auch endokrine Zellen und Neurone verschiedene Zytokine produzieren können und mit entsprechenden Hormon- und Neurotransmitterrezeptoren ausgestattet sind (9, 10, 11, 12, 13, 14). In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass diese Systeme auch bei chronischen Entzündungsvorgängen und damit z.B. für die Pathogenese der RA von großer Bedeutung sind und die Effektoren des endokrinen Systems (u.a. Glukokortikoide) und des neuronalen Systems (u.a. Noradrenalin) über systemische Rückkopplungskreise den lokalen synovialen Entzündungsprozess modulieren (15, 16, 17, 18). Schon in den 1940er Jahren begann die Ära der Glukokortikoide als immunmodulierende Therapeutika, 1949 als Antirheumatikum an die Öffentlichkeit gebracht (19, 9) und seither aus der Therapie der RA und anderen entzündlichen Erkrankungen nicht mehr wegzudenken. Es ist bekannt, dass Glukokortikoide u.a. durch Stimulation von IL-10, Hemmung der TNF-Produktion (20) und weiterer proinflammatorischer Proteine zu einer Hemmung der Proliferation und Aktivität von Immunzellen führen und dadurch ihre antiinflammatorische Wirkung entfalten (21). In der akuten Phase der RA bewirken proinflammatorische Zytokine (z. B. TNF, IL-1, IL-6, IL-2) eine Aktivierung der HHN-Achse, die anfangs noch mit einer adäquaten Kortisolproduktion reagiert. Während der Krankheitsentwicklung wird, v.a. die Kortisolproduktion je-

doch unverhältnismäßig zurückgefahren und es existieren, relativ zum Ausmaß der Entzündung, zu niedrige Kortisolspiegel (16). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass bei der chronischen Entzündung eine effiziente systemische Kortisolkonzentration in Kooperation mit Noradrenalin, als wichtigster Vertreter der sympathischen Neurotransmitter, proinflammatorische Mediatoren im Gelenk vermindern können und somit die Entzündungsvorgänge im Synovialgewebe reduzieren (16).

1.2 Sympathisches Nervensystem – Grundlagen

Das Nervensystem (NS) kann auf verschiedene Weise gegliedert werden. Zum einen wird es in ein zentrales Nervensystem (ZNS) und in ein peripheres Nervensystem (PNS) unterteilt. Eine weitere Unterteilung erfolgt in ein somatisches und ein vegetatives Nervensystem (auch autonomes und viszerales NS genannt). Das somatische NS dient der willkürlichen Ausführung der Motorik und der bewussten Wahrnehmung der peripheren Sensibilität, wohingegen das autonome NS unwillkürliche und unbewusste Vorgänge und Funktionen, wie z.B. Herz- und Darmtätigkeit, Stoffwechsel, Blutdruck und Durchblutung oder die Sekretion von Drüsen, überwacht und steuert (7). Das autonome NS setzt sich aus dem sympathischen Nervensystem (SNS), dem parasympathischen Nervensystem (PSNS) und dem enterischen NS zusammen, wobei sich das enterische NS auf die Wand des Gastrointestinaltraktes beschränkt und somit eine Ausnahme darstellt, auf die hier nicht weiter eingegangen wird. Meist agieren Sympathikus und Parasympathikus als Antagonisten und bis auf wenige Ausnahmen werden alle Organe und Körperregionen von beiden Anteilen des autonomen NS innerviert und gesteuert. Während der Parasympathikus eine trophotrope Wirkung auf den Körper hat, steuert der Sympathikus energiemobilisierende und aktivitätssteigernde Funktionen und entfaltet somit eine ergotrope Wirkung auf den Organismus (7, 22). Höchstes gemeinsames Steuerzentrum ist der Hypothalamus im Zwischenhirn. Weitere wichtige, dem Hypothalamus untergeordnete Zentren liegen im Hirnstamm (9). Desweiteren besitzen SNS und PSNS eigene Zentren, die sich in Hirn-

stamm und Sakralmark (PSNS) und im Thorakolumbalmark (SNS) befinden. In diesen Zentren sitzen die entsprechenden ersten efferenten Neurone, welche das ZNS verlassen und in peripheren, organnahen, parasymphatischen Ganglien oder in prävertebralen, sympathischen Ganglien auf ein zweites Neuron umgeschaltet werden. Das zweite, postganglionäre Neuron erreicht anschließend das Erfolgsorgan. Die beiden Systeme unterscheiden sich zudem in ihren Transmittern, die sie in ihren Zielstrukturen ausschütten. Das PSNS benutzt Acetylcholin, sowohl im ersten als auch im zweiten Neuron, und auch das SNS benutzt diesen Transmitter in seinen präganglionären Neuronen (22). Jedoch verwendet es eine Vielzahl von verschiedenen Substanzen als Transmitter zwischen zweitem Neuron und Zielstruktur. Neben Molekülen wie Enkephalin, Adenosintriphosphat (ATP) oder Neuropeptid Y, sind die Katecholamine Dopamin, Adrenalin und vor allem Noradrenalin die wichtigsten und am häufigsten vorkommenden Vertreter (9). Die verschiedenen Botenstoffe besitzen wiederum jeweils mehrere Rezeptoren, mit denen sie kommunizieren können, und welche unterschiedliche Wirkungen am Zielorgan ausüben. Die meisten Neurotransmitter wirken über G-Proteingekoppelte Rezeptoren, die ihre Wirkung in der Zelle über nachgeschaltete *second messenger* ausüben (23, 9). Zu diesen *second messengern* gehören z.B. zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) oder Inositol-3-Phosphat (IP3). Abhängig von der Menge der Transmitter, von ihrer Affinität zum Rezeptor oder von der Expression der Rezeptoren auf der Zelle, vermitteln die jeweiligen Rezeptoren entweder eine stimulierende oder eine hemmende Wirkung. Dadurch kann derselbe Ligand unterschiedliche Effekte, über unterschiedliche Signalwege, an der Zielzelle hervorrufen, was im Folgenden am Beispiel der α_1 -, α_2 - und β -Adrenozeptoren (AR) gezeigt werden soll. Sie stellen drei Unterklassen der Adrenozeptoren dar, die durch ihre natürlichen Liganden Adrenalin und Noradrenalin aktiviert werden können, wobei Adrenalin eine höhere Affinität zu β -adrenergen Rezeptoren aufweist. Noradrenalin hingegen stimuliert bevorzugt α -adrenerge Rezeptoren und nimmt erst bei höheren Konzentrationen Einfluss auf die β -Adrenozeptoren (14). α_1 -Adrenozeptoren unterteilen sich in vier Subtypen,

die alle $G_{q/11}$ -Protein-gekoppelte Rezeptoren sind, die über die Phospholipase C β die *second messenger* Diacylglycerin (DAG) und IP3 aktivieren. IP3 bewirkt die Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER), DAG aktiviert die Proteinkinase C und dadurch andere intrazelluläre Proteine (24, 7). α_2 -Adrenozeptoren sind meist an inhibitorische $G_{i/o}$ -Proteine gekoppelt, die ihr Effektormolekül, das Transmembranenzym Adenylatzyklase, hemmen und somit die Synthese des *second messenger* cAMP (24, 7). β -Adrenozeptoren mit ihren drei Subtypen wirken im Gegensatz dazu stimulierend auf ihr Effektormolekül. Ihr G_s -Protein aktiviert die Adenylatzyklase, die cAMP synthetisiert, welches wiederum die Proteinkinase A (PKA) aktiviert (24, 7). Die Proteinkinase A ist eine Serin-/Threoninkinase, die u.a. Schlüsselenzyme des Intermediärstoffwechsels, der Hormonbiosynthese, die Aktivität von Ionenkanälen oder die Transkription cAMP-abhängiger Gene reguliert (23). Durch *radio-ligand-binding*-Studien konnte gezeigt werden, dass auch immunkompetente Zellen wie z.B. B- und T-Lymphozyten Adrenozeptoren, v.a. β_2 -AR, exprimieren (25). Aber auch für andere Neurotransmitter, die neben Noradrenalin aus sympathischen Nervenendigungen freigesetzt werden können, sind Rezeptoren auf Immunzellen nachgewiesen worden (26, 14, 27). Da die sympathischen Nervenfasern entlang der Blutgefäße verlaufen, sind sie fast überall im menschlichen Körper anzutreffen, auch in primären und sekundären lymphatischen Organen, wo sympathische Nervenfasern enge synaptische Beziehungen zu den darin vorhandenen Immunzellen aufbauen (28, 29), was einen direkten Einfluss auf diese Immunzellen nahe legt.

1.2.1 Die Bedeutung des sympathischen Nervensystems bei der Rheumatoiden Arthritis

Seine peripheren Wirkungen entfaltet das adrenerge System nicht nur über die sympathischen postganglionären Nervenendigungen, sondern auch über die Stimulation des Nebennierenmarks durch die HHN-Achse. Von dort werden Katecholamine in die Blutbahn freigesetzt und wirken auf diese Weise als freie Hor-

mone. So kommen die Effektoren des SNS zum einen über die Blutbahn in Kontakt mit den Immunzellen, zum anderen über die sympathischen noradrenergen Nervenfasern, die bis in die Synovialmembran der Gelenke reichen. Neurotransmitter des SNS sind in adäquaten Konzentrationen über α -AR, β -AR, A₂-Adenosinrezeptoren und μ -Opioidrezeptoren antiinflammatorisch wirksam (27, 30), wobei in erster Linie der β_2 -AR auf Immunzellen exprimiert wird (31). Über diese Rezeptoren hemmen Katecholamine die Proliferation von T-Lymphozyten (32), bewirken die Apoptose von Lymphozyten in Peripherie und Thymus (33), haben Einfluss auf die Organverteilung immunkompetenter Zellen (33) oder deren Funktionen. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass Noradrenalin, je nach Konzentration und Kontext, die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF, Interferon- γ oder IL-1 hemmt, und die von antiinflammatorischen Zytokinen wie IL-10 steigert (27, 26), oder das Ausmaß der Antikörperproduktion von B-Zellen reguliert (34, 35, 36, 37). Die Tatsache, dass der Sympathikotonus (die Feuerrate des SNS) bei Tieren und Menschen, die an RA erkrankt sind, erhöht ist, zeigt eine Beteiligung des SNS an der Erkrankung. Jedoch kann ihm keine rein antiinflammatorische Rolle zugeschrieben werden. Vielmehr scheint seine pro- oder antiinflammatorische Aktivität u.a. vom Krankheitszeitpunkt abzuhängen, was am Tiermodell gezeigt werden konnte (38). Mäuse, bei denen eine Arthritis durch Kollagen Typ II ausgelöst wurde, wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten sympathektomiert. Der Verlust des Sympathikus vor der Immunisierung mit Kollagen Typ II führte zu verminderten Krankheitssymptomen, wohingegen das Ausschalten des SNS zu einem Zeitpunkt, an dem die RA schon aktiv war, in einer Verschlechterung des Krankheitsgeschehens resultierte. Diese Ergebnisse lassen auf eine proinflammatorische Rolle in der Frühphase, und auf eine antiinflammatorische Rolle in der Spätphase der Erkrankung schließen. Desweiteren wurde gezeigt, dass die sympathische Innervation im chronisch-entzündeten Synovialgewebe von RA-Patienten verloren geht (39). Dies kann demzufolge ebenfalls als proinflammatorischer Mechanismus gesehen werden, da eine adäquate Immunsuppression über β -adrenerge Mechanismen (hohe

NoradrenalinKonzentration) wegfällt und eine Immunstimulation über α -adrenerge Mechanismen (niedrige NoradrenalinKonzentration) verstärkt wird.

1.3 B-Zelle

Lange Zeit spielte die B-Zelle eine untergeordnete Rolle im Zusammenhang mit der RA, was sich jedoch mit dem erfolgreichen therapeutischen Einsatz des anti-*cluster of differentiation* (CD) 20 Antikörpers Rituximab änderte (40, 41). Die B-Zelle ist Teil des erworbenen (adaptiven) Immunsystems, welches durch das angeborene Immunsystem aktiviert wird. Das angeborene Immunsystem ist für die initiale Phase der Abwehr von Pathogenen bestimmt. Zu ihm werden, neben der natürlichen Barriere von Haut und Schleimhäuten, dem Komplementsystem und den Akut-Phase-Proteinen, folgende Zellen gerechnet: Granulozyten, Mastzellen, natürliche Killerzellen (NK-Zellen), Monozyten und Makrophagen (9). Es kann sofort auf antigene Stimuli reagieren, eine Inflammation auslösen und anschließend das adaptive Immunsystem durch Antigenpräsentation und Kostimulation aktivieren. Neben den B-Zellen gehören die T-Zellen zu den spezifischen Zellen der adaptiven Immunantwort. B- und T-Zellantwort unterscheiden sich wiederum stark voneinander, und welcher immunologische Pfad eingeschlagen wird, hängt von unzähligen immunologischen, endokrinen und neuronalen Faktoren ab. Die Aktivierung der B-Zellen erfolgt entweder T-Zell-abhängig oder unabhängig. Eine T-Zell-unabhängige Aktivierung findet durch sog. T-Zell-unabhängige Antigene wie z.B. Polysaccharide statt. Voraussetzung für die T-Zell-abhängige Aktivierung ist zum einen, dass die B-Zelle selbst das Antigen an ihrem B-Zell-Rezeptor gebunden hat, und zum anderen, dass sie dieses Antigen der T-Helferzelle mittels ihres Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)-II-Moleküls in prozessierter Form an der Oberfläche präsentiert (42, 20). Mit Hilfe ihres T-Zell-Rezeptors bindet die T-Helferzelle (Th-Zelle) daran, schüttet Zytokine aus und geht weitere kostimulatorische Bindungen mit der B-Zelle ein. Dies bewirkt die Differenzierung der B-Zelle zur Antikörper-produzierenden Plasmazelle und deren klonalen Proliferation. Während die B-Lymphozyten selbst zwar auch Antikörper (v.a.

IgM, IgD) herstellen können, sind die Antikörper-produzierenden, kurzlebigen und langlebigen Plasmazellen in der Lage, weitere Immunglobulinisotypen wie z.B. IgG, IgE und IgA in großen Mengen zu sezernieren (42). Die Antikörper binden spezifisch an Antigene, aktivieren je nach Isotyp unterschiedlich stark das Komplementsystem und helfen bei der Phagozytose der Antigene. Darüber hinaus sind B-Lymphozyten jedoch auch selbst zur Antigenpräsentation und zur Zytokinproduktion in der Lage oder können zu Gedächtniszellen differenzieren, die zu einer schnellen Immunantwort bei einer zweiten Antigenexposition beitragen. Ebenso wie die T-Zellen, exprimieren auch B-Zellen populationspezifische Oberflächenmarker, die abhängig von ihrem Reifestadium oder ihrer Untergruppe auf den Zellen vorzufinden sind. Bekannteste dieser Oberflächenmarker für B-Zellen sind CD19, CD20 und B220.

1.3.1 Die Bedeutung der B-Zelle bei der rheumatoiden Arthritis

Das Vorhandensein von Autoantikörpern wie RF, anti-CCP oder anti-mutiertes-citrulliniertes Vimentin (MCV) sowie das gute Ansprechen auf eine B-Zell-Depletion, v.a. bei anti-CCP und RF positiven Patienten, legt eine Beteiligung der B-Zelle an der Pathogenese der RA nahe. Die Autoantikörper aktivieren das Komplementsystem und andere immunologische Effektorzellen wie T-Zellen, Monozyten oder Granulozyten werden in das betroffene Gewebe gelockt, schütten ihrerseits Zytokine und Chemokine aus, proliferieren und tragen zur Aufrechterhaltung der pathologischen Entzündungssituation bei. Ein wichtiges weiteres Antigen, gegen das im Rahmen der RA ebenfalls Antikörper gebildet werden können, ist das Kollagen Typ II (CII), welches hauptsächlich in Gelenkknorpel vorkommt. Antikörper gegen das CII (anti-CII) werden in Tiermodellen dazu benutzt, in gesunden Tieren eine Arthritis zu induzieren. Sowohl im Serum der erkrankten Tiere, als auch in Seren von RA-Patienten, konnten anti-CII-Antikörper detektiert werden (43), die dieselben Epitope in Mensch und Tier erkannten (44), was die Hypothese der pathogenetischen Rolle von Autoantikörpern in der RA unterstützt (34). Auch der Einfluss von IgE Antikörpern auf die RA wird disku-

tiert, da gezeigt wurde, dass Mastzellen eine entscheidende Rolle bei der Arthritis von Mäusen spielen (45) und eine IgE-vermittelte Typ I Allergie in der Krankheitsentstehung beteiligt sein könnte. Zudem besteht eine Assoziation zwischen der Entwicklung von extraartikulären Symptomen und erhöhten IgE-Serumspiegeln sowie perivaskulären IgE-Ablagerungen in der Haut von RA Patienten (46). Trotz dieser Hinweise auf eine Rolle von Antikörpern in der Pathogenese der RA konnten bisher noch keine Autoantikörper gefunden werden, die ein erkrankungsspezifisches Epitop besitzen. Dies führte zu der Annahme, dass Antikörper entweder nur eine Begleiterscheinung der ablaufenden Entzündung sind, oder dass es eine Vielzahl unterschiedlicher Antikörper gibt, die individuell in verschiedenen Mustern auftreten und mehrere Antigene oder Epitope angreifen (34, 47, 48) um den Entzündungsprozess am Laufen zu halten. Wie bereits erwähnt, können B-Zellen neben ihrer Hauptaufgabe, der Antikörperproduktion, auch auf andere Weise Einfluss auf den Entzündungsprozess nehmen. So ist heute bekannt, dass B-Lymphozyten sowohl immunregulatorische Zytokine wie IL-2, Interferon (INF)- γ , IL-12 und IL-4 (49), aber auch Zytokine wie TNF, IL-10 und IL-6 bilden und sezernieren (50, 51, 34). Vor diesem Hintergrund können die B-Zellen nicht mehr nur als ausführende, sondern auch als regulierende und dirigierende Zellen gesehen werden, mit T-Zell-ähnlichen Funktionen. Insbesondere die Beteiligung an der Sekretion der Zytokine TNF, IL-6 und IL-10, die eine bedeutende Rolle in der RA spielen, zeigt die Wichtigkeit dieser Funktion der B-Zellen. Die vermehrte IL-6-Produktion in Patienten mit RA und in Mäusen mit Kollagen Typ II-induzierter Arthritis (52, 53, 54), eine signifikante Korrelation der Serum IL-6 Aktivität mit der Konzentration von IgM- und IgF-RF (55, 56) und die positive Auswirkung der anti-IL-6 Rezeptor Therapie (57, 58), sind nur ein paar Beispiele für die proinflammatorische Wirkung des IL-6 in der RA. Die Tatsache, dass IL-6 ein potenter Stimulator der polyklonalen B-Zell-Proliferation und Autoantikörper-Produktion ist (59), könnte darauf hindeuten, dass die B-Zellen auf diesem Wege eine Selbstaktivierung vornehmen. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass unter der Therapie mit dem anti-IL-6 Rezeptor Antikörper Tocilizumab® bei

RA-Patienten eine signifikante Abnahme von Gedächtniszell-, IgG- und IgA-B-Zell-Untergruppen stattfindet. Gleichzeitig sind die Serum IgG- und IgA-Spiegel signifikant gesunken (60). Diese Daten verdeutlichen die Korrelation von IL-6 mit der pathologischen Hyperaktivität der B-Zelle in der RA. Auch IL-10 gilt als B-Zell-Stimulator, der die MHC-II Expression hochreguliert und die Überlebensfähigkeit der Zelle unterstützt (61). Im Gegensatz zu TNF oder IL-6 gilt IL-10 allerdings im Allgemeinen als ein antiinflammatorisches Zytokin. In Mäusen mit Kollagen Typ II induzierter Arthritis konnte durch den Transfer von IL-10 produzierenden B-Zellen die Krankheit entweder verhindert oder deren Verlauf deutlich verbessert werden (62, 63), sodass den verwendeten IL-10 produzierenden B-Zellen eine anti-arthritische Wirkung zugeschrieben wurde. Diese und andere Beispiele zeigen, dass die pathogenetische Rolle der B-Zelle in der RA bei weitem nicht auf die Antikörperproduktion von Plasmazellen begrenzt ist.

1.3.2 Modulation der B-Zell Funktion durch das SNS

Wie bereits eingangs erwähnt, exprimieren B-Zellen auf ihrer Oberfläche u.a. funktionsfähige β_2 -adrenerge Rezeptoren und sind so in der Lage, Signale des sympathischen Nervensystems zu erhalten (64). Die Funktionalität dieser Rezeptoren konnte gezeigt werden, indem sie durch Noradrenalin stimuliert wurden, was in einer cAMP-Anreicherung in der Zelle resultierte (35) und zur Aktivierung der nachfolgenden Signaltransduktionswege führte (65). Darüber hinaus zeigte die Stimulation dieser β_2 -adrenergen Rezeptoren mit Noradrenalin oder eines seiner Agonisten, dass die Produktion von IgM und IgG₁ sowie IgE vom SNS reguliert wird und dass diese Antikörper unter Noradrenalinmangel weniger gebildet werden (35, 37). Dies führt zu der Annahme, dass Noradrenalin eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung einer primären Th₂-Zell-abhängigen-Antikörper-Reaktion der B-Zelle spielt. Dies wird u.a. auch dadurch verdeutlicht, dass der cAMP/PKA/ *cAMP response element binding protein* (CREB)-Signalweg auch in die MHC-II Expression auf B-Lymphozyten involviert ist und diese steigert (66, 67). Die Antigenpräsentation und T-Zell-Stimulation wird neben der MHC-II Expres-

sion noch auf anderem Wege vom SNS reguliert. Nach Stimulation von β_2 -AR wurde eine erhöhte CD86 Expression auf B-Zellen bemerkt (31). Das CD86-Molekül stimuliert zum einen CD4+ T-Zellen über eine Interaktion mit CD28-Molekülen auf den T-Zellen, und zum anderen bewirkt eine CD86-Stimulation eine erhöhte IgG1 und IgE Produktion der B-Zelle (68). Der cAMP/ PKA/ CREB-Signalweg beeinflusst jedoch nicht nur die Antikörperproduktion und MHC-II Expression, sondern auch die IL-10 Produktion der B-Zellen (69, 70).

1.4 Das IL-7/IL-7 Rezeptor System – Grundlagen

Interleukin 7 (IL-7) wird u.a. auch Lymphopoietin 1 (LP-1) oder *pre-B-cell growth factor* (PBGF) genannt. Das IL-7 Gen ist auf Chromosom 8q12-13 lokalisiert, besteht aus sechs Exons und neun Introns (71), und codiert für ein 152 Aminosäuren (AS) langes, 25 kD schweres Glykoprotein (72). Es gilt als Zytokin der Hämatopoetin-Familie, zu der u.a. auch IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, *Granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF), IL-9 und IL-13 gehören (71), und dessen Tertiärstruktur sich aus vier α -Helices zusammensetzt. Erstmals wurde es Ende der 80er Jahre isoliert und durch seine essentielle Rolle in der Aufrechterhaltung der lymphatischen Progenitorzell-Population im Knochenmark gekennzeichnet (73). Daher gilt IL-7 als hämatopoetischer Wachstumsfaktor, der ein wichtiger Modulator der T- und B-Lymphopoese ist. IL-7 stimuliert die Differenzierung von hämatopoetischen multipotenten Stammzellen in lymphatische Progenitorzellen, insbesondere die Entstehung von pre-pro B-Zellen aus *common lymphoid progenitor*-Zellen (CLPs) (74). Des Weiteren stimuliert IL-7 die Proliferation von T-, B- und NK-Zellen, und reguliert deren Entwicklung und Überleben. Sezerniert wird das Zytokin von Stromazellen des Knochenmarkes und des Thymus, aber auch von Keratinozyten (75), dendritischen Zellen (76), Hepatozyten (77) und endothelialen Zellen des Darmes (78). Der Rezeptor für IL-7 besteht aus zwei Komponenten. Zum einen aus der *common cytokine gamma chain* (γ_c), die u.a. auch von IL-2, IL-4, IL-9 und IL-15 als Rezeptor benutzt wird (79). Zum anderen aus der IL-7 Rezeptor alpha (IL-7R α)-Kette, auch CD127 genannt. Den IL-

7R α wird zusätzlich von *Thymic Stromal Lymphopoietin* (TSLP) als Komponente für seinen Rezeptor benutzt. Die γ_c wird ubiquitär auf lymphozytären Zellen exprimiert, da sie, wie oben erwähnt, Bestandteil mehrerer Interleukin-Rezeptoren ist. Daher gilt die Identifikation von IL-7R α auf Zellen als Zeichen für eine IL-7-Bindung und nachfolgende Signalweiterleitung. Im Allgemeinen kann der IL-7R α auf unreifen B-Zellen bis in das frühe pre-B-Zell-Stadium identifiziert werden, auf Thymozyten und auf den meisten reifen T-Zellen (80). Wie auch andere Mitglieder der Hämatopoietin-Rezeptorfamilie, ist auch IL-7R α ein Typ 1-Membran-Glykoprotein, das so gefaltet ist, dass es die Bindung von α -helikalen Zytokinen ermöglicht. Die 220 AS lange extrazelluläre Domäne des Rezeptors weist große Homologien mit anderen Rezeptoren dieser Familie auf. Seine transmembranäre Domäne umfasst 25 AS und der intrazelluläre Anteil 195 AS (71, 81). Dieser wichtige Anteil für die intrazelluläre Weiterleitung der Signale enthält jedoch keine intrinsische Tyrosinkinaseaktivität, sodass die Rekrutierung zytoplasmatischer Kinasen notwendig ist. Die IL-7-Signaltransduktion beinhaltet mehrere solcher nicht membrangebundener Tyrosinkinase-Signalwege, die mit dem intrazellulären Anteil des Rezeptors assoziieren. Zu diesen gehören der Janus-Kinase/ Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription (JAK/STAT)-Signalweg, der Phosphoinositid-3-Kinase-(PI3-K)-Signalweg, der mitogenaktivierte Proteinkinase/Extrazellulär-Signal-regulierte-Kinase (MAPK/ERK)-Signalweg und verschiedenen Tyrosinkinasen der src-Familie (82). Am Anfang der Signalweiterleitung steht die Bindung des Interleukin-7 an den IL-7R α , was zu einer Heterodimerisation mit der γ_c führt, welche ebenfalls Bindungsstellen für IL-7 besitzt (83). Dies führt zu der Aktivierung der γ_c assoziierten Janus-Kinase (JAK) 3 und der IL-7R α assoziierten JAK 1 (84). Die aktivierten JAK-Proteine phosphorylieren anschließend Tyrosinreste des zytoplasmatischen Anteils der IL-7R α -Kette, was zu einer Rekrutierung von Molekülen führt, die eine Src-Homologie 2 (SH2) tragen, wie z.B. STAT5, und in geringerem Maße STAT1 und STAT3 (85). Der Ausgangspunkt der Aktivierung dieser intrazellulären Moleküle ist, wie oben erwähnt, der zytoplasmatische Anteil des IL-7R, insbesondere

die IL-7R α -Kette, die aus verschiedenen Domänen besteht. Besonderes Augenmerk wurde zum einen auf eine Zellmembran nahe Domäne, die Box1, gelegt, da sie als Bindungsstelle der JAK1 gilt (86), und Studien mit T-Zell-Linien gezeigt haben, dass der Verlust der Box1 mit einem rapiden Zelltod einhergeht (87). Ebenfalls zum Zellarrest und anschließenden Zelltod haben Mutationen in der Tyrosin-reichen Domäne geführt (87), was daher von Interesse ist, da vermutet wird, dass sowohl der JAK/STAT als auch der PI3K/Proteinkinase B (AKT) Signalweg aus dieser Domäne entspringen (88). Da in der vorliegenden Arbeit das phosphorylierte STAT5 und ERK zum Funktionsnachweis von IL-7 Rezeptoren verwendet wurden, sollen die Signalwege dieser beiden Moleküle im Folgenden kurz dargestellt werden. Im Falle des JAK/STAT Signalweges wird der Tyrosinrest der JAK/STAT Domäne von der Jak1 phosphoryliert, die daraufhin gebundenen STAT Moleküle, in Verbindung mit dem IL-7 Signalweg vor allem STAT5a und STAT5b, werden ebenfalls phosphoryliert und dimerisieren. In dieser Form sind sie in der Lage, in den Zellkern zu translozieren und dort die Expression verschiedener Gene, die bei der Proliferation und dem Überleben der Zelle involviert sind, zu modulieren. Beispiele solcher Gene sind BCL-X und c-myc (89) (s. Abbildung 1).

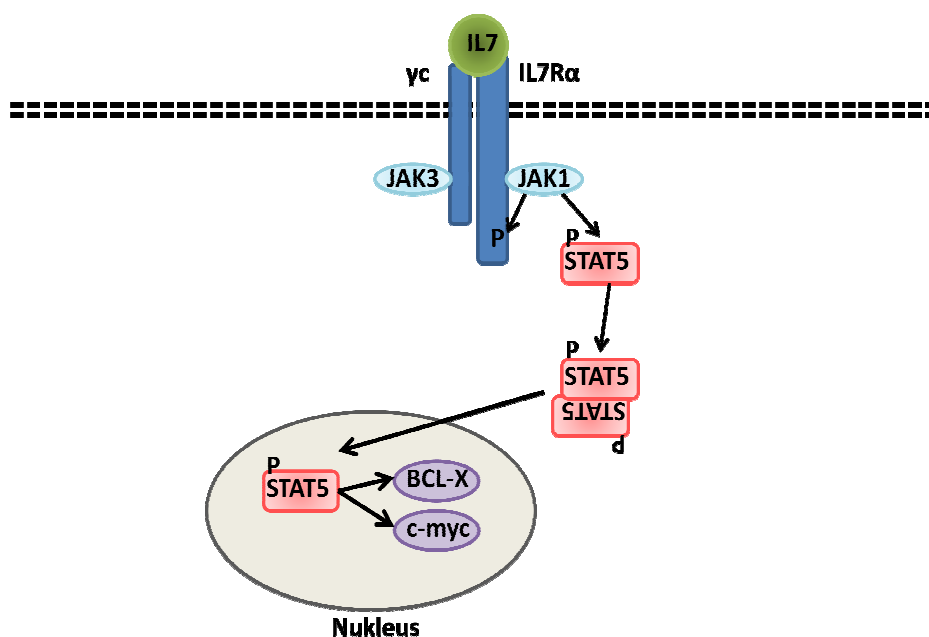


Abbildung 1: Janus-Kinase/ Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription (JAK/STAT)-Signalweg. Der Tyrosinrest der JAK/STAT Domäne des IL-7 Rezeptors wird von der JAK1 phosphoryliert (P), die daraufhin gebundenen STAT Moleküle, in Verbindung mit dem IL-7 Signalweg vor allem STAT5, werden ebenfalls phosphoryliert und dimerisieren. In dieser Form sind sie in der Lage, in den Zellkern zu translozieren und dort die Expression verschiedener Gene, die bei der Proliferation und dem Überleben der Zelle involviert sind, zu modulieren. Beispiele solcher Gene sind BCL-X und c-myc.

Der Aktivierung der Extrazelluläres-Signal-regulierten Kinase (ERK) gehen unterschiedliche Signalwege voraus. An dieser Stelle soll der Ras (*Rat Sarcoma*)-Raf (*Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*)-MAPK-Signalweg dargestellt werden. Diese Signalkaskade beginnt mit der Bindung des IL-7 an seinen Rezeptor, was die Phosphorylierung von Tyrosinresten seiner intrazellulären Domäne bewirkt. Das zytosolische Adapterprotein *growth factor receptor-bound protein 2* (GRB2) besitzt, wie das STAT5, eine SH2-Domäne, mit der es an die phosphorylierten Tyrosinreste andockt (90), was zu einer Aktivierung des Guanosintriphosphat (GTP)-Austauschfaktors *Son of Sevenless* (SOS), der einen Komplex mit GRB2 bildet, führt (91). Der SOS bewirkt die Freisetzung von Guanosindiphosphat (GDP) im Austausch gegen GTP an der nachfolgenden Ras-GTPase, welche in ihrem aktivierten Zustand wiederum die Raf-Kinase aktiviert (92). Diese Kinase phosphoryliert ihrerseits die nachfolgende Mitogen-aktivierte Protein Kinase Kinase (MEK), die wie der Name impliziert die Mitogen-aktivierte Protein Kinase (MAPK) phosphoryliert. Die ERK gehören zur Familie der MAPK, werden manchmal synonym gebraucht, stellen aber bestimmte Untergruppen dieser Kinasen dar. Im weiteren phosphorylieren MAPK bzw. ERK unterschiedliche Moleküle, die Einfluss auf die Transkription im Zellkern nehmen und auf diese Weise das Überleben, die Differenzierung und die Proliferation der Zelle beeinflussen (93) (s. Abbildung 2).

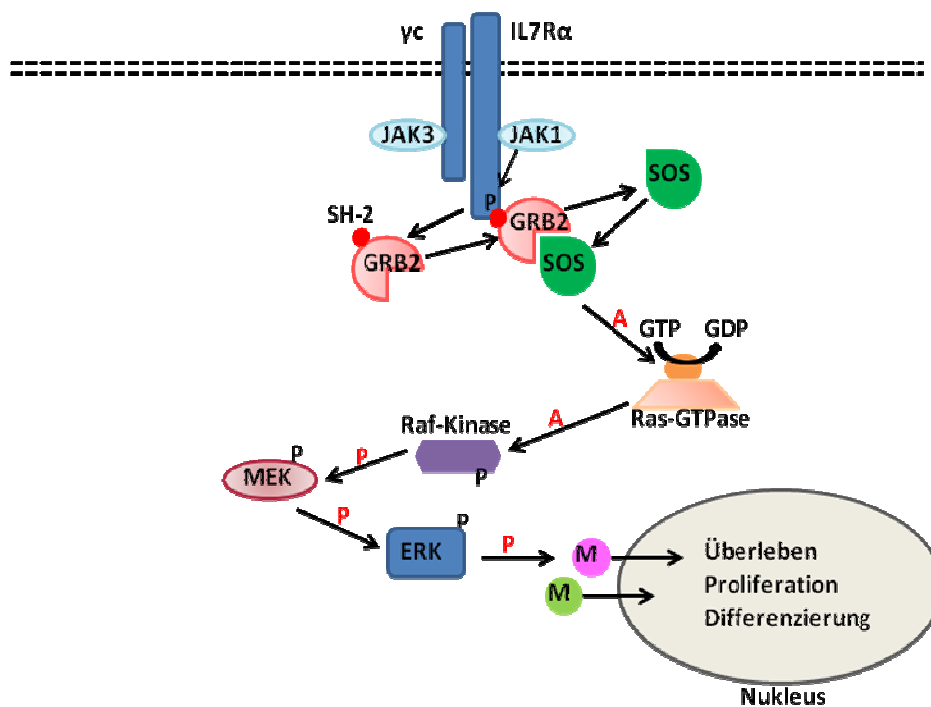


Abbildung 2: Mitogen-aktivierte Protein Kinase/Extrazellulär-Signal-regulierte-Kinase (MAPK/ERK)-Signalweg. An dieser Stelle soll der *Rat Sarcoma (Ras)-Rapidly Accelerated Fibrosarcoma (Raf)-MAPK-Signalweg* dargestellt werden. Die Bindung des Interleukin 7 (IL-7) an seinen Rezeptor bewirkt die Phosphorylierung (P) von Tyrosinresten seiner intrazellulären Domäne. Das zytosolische Adapterprotein *growth factor receptor-bound protein 2 (GRB2)* besitzt eine Src-Homologie 2 (SH2)-Domäne, mit der es an die phosphorylierten Tyrosinreste andockt, was zu einer Aktivierung des Guanosintriphosphat (GTP)-Austauschfaktors *Son of Sevenless (SOS)*, der einen Komplex mit GRB2 bildet, führt. Der SOS bewirkt die Freisetzung von Guanosindiphosphat (GDP) im Austausch gegen GTP an der nachfolgenden Ras-GTPase, welche in ihrem aktivierten Zustand wiederum die Raf-Kinase aktiviert. Diese Kinase phosphoryliert ihrerseits die nachfolgende Mitogen-aktivierte Protein Kinase Kinase (MEK), die die Mitogen-aktivierte Protein Kinase (MAPK) phosphoryliert. Im weiteren phosphorylieren MAPK bzw. ERK unterschiedliche Moleküle (M), die Einfluss auf die Transkription im Zellkern nehmen und auf diese Weise das Überleben, die Differenzierung und die Proliferation der Zelle beeinflussen.

1.4.1 Regulation der IL-7R Expression

Die Regulation des IL-7/IL-7R Systems wird an vielen unterschiedlichen Punkten moduliert. Hierzu gehören die Rezeptor Expression, die Signalwege und deren Einbettung in das Netzwerk einer Vielzahl anderer Mediatoren, die Transkription

und deren positiver oder negativer Rückmeldung auf genetischer Ebene. Erste konkrete Ergebnisse über Faktoren, die die Expression des IL-7R auf B-Zellen regulieren, konnten in Bezug auf die Stimulation mit Glukokortikoiden erreicht werden. Kurz nach der Stimulation führte dies zu einer vermehrten Expression des Rezeptors auf reifen B-Zellen (94). Dieser Effekt der Glukokortikoide konnte auch in T-Zellen beobachtet werden (95).

1.4.2 Die Bedeutung des IL-7/ IL-7R Systems bei der Arthritis

Zusammen mit seinem IL-7-Rezeptor, insbesondere mit dessen α -Kette, wurde das IL-7 in den letzten Jahren mit mehreren Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht. So konnte im Falle der Multiplen Sklerose (MS) gezeigt werden, dass der Einzelnukleotidpolymorphismus (SNP) rs6897932 im IL-7R α Gen einen Suszeptibilitätsfaktor für die MS darstellt (73). In diesem Zusammenhang wurden im IL-7 Gen ebenfalls SNPs gefunden, die in MS-Patienten-Kollektiven signifikant häufiger vorkamen (96). Aber auch mit der Colitis ulcerosa konnte das IL-7/IL-7R α System in Zusammenhang gebracht werden (97), was an der chronischen Colitis im Maus-Modell untersucht wurde. Dabei zeigte sich, dass IL-7 ein Schlüsselenzym in der Regulation der Homöostase und des Überlebens peripherer CD4+T-Effektor-Gedächtniszellen darstellt, und dass eine zusätzliche IL-7R α Expression auf diesen CD4+T-Zellen eine entscheidende Rolle in der Entwicklung und Aufrechterhaltung der Colitis ulcerosa spielt (98, 99). Der rs6897932 SNP wurde zudem ebenfalls mit Diabetes mellitus Typ I (DM Typ I) (100), und chronisch inflammatorischen Arthropathien (101) in Verbindung gebracht. Mehrere weitere Studien unterstützen die Hypothese, dass das IL-7/ IL-7-R System auch eine Rolle bei der RA spielt. In einer Untersuchung von Serum und Synovialflüssigkeit von RA und Osteoarthritis (OA) Patienten wurde ein signifikant höherer IL-7 Spiegel, sowohl in Serum als auch in Synovialflüssigkeit von RA Patienten gefunden (72). Eine Überproduktion von IL-7 löst im Maus-Modell eine Arthritis aus (102), und bei der CII-induzierten Arthritis bei Mäusen hatte eine IL-7R α -Blockade eine Arthritis-inhibierende Wirkung (103). Die Blockade

verbesserte signifikant klinische Zeichen der Arthritis in Kombination mit einer radiologischen Verbesserung der Gelenkdestruktion. Der Rückgang der Gelenkentzündung und -zerstörung war assoziiert mit der Abnahme der T-Zellzahl und der Konzentration T-Zell-abhängiger Zytokine, wie Interferon γ , IL-5 und IL-17, und der Abnahme proinflammatorischer Zytokine und anderer Faktoren, die mit Gewebszerstörung assoziiert werden (TNF α , IL-1 β , IL-6) (103). Diese Studie zeigt eine klare Korrelation des IL-7R mit der Pathogenese der experimentellen Arthritis, und auch in weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass das Ausmaß der Entzündung mit der Höhe der IL-7 Expression korreliert (72, 104). IL-7 hat zudem einen positiven Effekt auf die Entwicklung von lymphatischem Gewebe. Eine gesteigerte Expression von IL-7 bewirkte im Maus-Modell ein verbessertes Überleben von lymphatisches-Gewebe-induzierenden Zellen, die wiederum zu einer vermehrten Bildung von Peyer-Plaques und ektopischen Lymphknoten führten (105). Dass die Aktivität des IL-7 Signalweges eine Rolle für die lymphatische Neogenese im RA Synovium spielt, konnte bestätigt werden, indem bevorzugte Aktivierung des IL-7 Signalwegs in ektopischen lymphatischen Strukturen in Synovialgewebe festgestellt wurde (106). Aber auch auf zellulärer Ebene nimmt IL-7 Einfluss auf die Pathogenese der RA. Es besitzt mehrere Wirkungen in Bezug auf die T-Zelle, u. a. auf deren Proliferation, Co-Stimulation und Differenzierung (72). Zusätzlich werden auch dendritische Zellen (DC), deren Entwicklung, Reifung und Funktion als Antigen präsentierende Zelle teilweise von IL-7 kontrolliert (107), im Maus-Modell konnte die DC-Funktion unter IL-7 Therapie in vivo gesteigert werden (108), und sowohl die DC als auch die T-Zelle werden in Hinblick auf ihre Zytokin Produktion von IL-7 beeinflusst (72).

1.4.3 IL-7 Rezeptor auf B-Zellen

Lange Zeit wurde davon ausgegangen, dass B-Zellen lediglich in ihren früheren Entwicklungsphasen einen IL-7R exprimieren, diesen jedoch mit der Differenzierung zur pre-B-Zelle verlieren. Die Notwendigkeit des IL-7 und dessen Rezeptor für die B-Zellen in ihren frühen Entwicklungsphasen konnte von mehreren Studi-

en bestätigt werden, mit der Konsequenz, dass supraphysiologische Interleukin-7 Spiegel die B-Vorläuferzellzahl im Maus-Modell sogar erheblich steigern können (109). Neben seinem Effekt auf die Proliferation der sich entwickelnden B-Zellen, übt IL-7 zudem Einfluss auf die B-Zell-Rezeptor (BCR)-Entwicklung und Neuordnung der Gene des BCR aus. Zusätzlich konnte der Stimulation des IL-7R α eine Rolle in Bezug auf die Immunglobulin Reorganisation auf genetischer Ebene zugeschrieben werden (110). Daten Ende der 90er Jahre haben das erste Mal gezeigt, dass die IL-7R α -Kette nicht nur auf B-Zell-Vorstufen zu finden ist, sondern auch auf reifen B-Zellen in Keimzentren nachgewiesen werden kann (111). Auf diesen B-Zellen konnte durch IL-7 eine RAG (*recombinase-activating-gene*)-Reexpression induziert werden, und eine IL-7R α -Blockade unterdrückte die V-D-J Rekombination in diesen B-Zellen (111, 71), was die Rolle des IL-7 in der Immunglobulin Reorganisation auch in reifen B-Zellen zeigt. Neuere Daten haben nun gezeigt, dass zum einen die Stimulation mit Glukokortikoiden zu der Reexpression des IL-7R α auf reifen B-Zellen führen kann (94). Zum anderen, dass CD19- und B-220-positive, d.h. reife B-Zellen auch außerhalb von Keimzentren, nämlich in Synovialgewebe von Arthritis-Patienten, CD127 auf ihrer Oberfläche tragen können (112).

1.5 Ziel der Arbeit

Sowohl das sympathische Nervensystem als auch die B-Zelle spielen eine klare pathogenetische Rolle im Krankheitsgeschehen der RA. Auch IL-7 konnte eine Bedeutung in der Pathogenese der RA zugewiesen werden. In diesem Kontext sollte in der vorliegenden Arbeit das Vorhandensein von CD127 auf reifen humanen und murinen B-Zellen untersucht werden. Desweiteren sollte die Funktionalität des IL-7R α und des IL-7R-Signalpfads nach Stimulation von B-Zellen mit IL-7 untersucht werden und der Einfluss sympathomimetischer Stimuli auf die Expression des IL-7R sowie die IL-7R-Signaltransduktion bestimmt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Tierhaltung

Alle Versuche wurden mit männlichen DBA-1 Mäusen oder C57 B6 Mäusen durchgeführt. Die Mäuse wurden gemäß des Deutschen Tierschutzgesetzes bei einer Temperatur von 22°C und einem 12 Stunden Tag/Nacht Zyklus und freiem Zugang zu Futter und Wasser gehalten.

2.2 Methoden

2.2.1 Herkunft und Präparation der Zellen

Mindestens acht Wochen alte Mäuse wurden in einer CO₂-Kammer getötet. Das Fell der Mäuse wurde mit Ethanol desinfiziert, die Bauchhöhle wurde anschließend mit Präparationsbesteck (Aesculap, Heidelberg) eröffnet und die Milz wurde entnommen. Diese wurde sofort in, auf Eis stehende, phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) (ohne Calcium und Magnesium, PAA Laboratories, Pasching, Österreich) überführt. Für jeden Versuchsansatz wurden zwei Milzen verwendet. Nach der Splenektomie wurden die gekühlten Milzen unter der Sterilbank (Heraeus Instruments GmbH, Hanau)¹ mit Hilfe des Stempels einer 2 ml-Spritze (BD Biosciences, Heidelberg) durch ein Zellsieb (70 µm, BD Biosciences, Heidelberg) in ein 50 ml Röhrchen (Falcon, BD Biosciences, Heidelberg) mit sterilem PBS passiert, um die Zellen von Bindegewebe zu befreien. Nach mehrmaligem Spülen mit PBS wurde das Röhrchen auf 50 ml aufgefüllt und für 10 min bei 4°C und 1400 Umdrehungen pro Minute (rpm) zentrifugiert (Zentrifuge: Megafuge 1.0R,

¹ Alle Arbeitsschritte bis zur Inkubation der Zellen im Brutschrank wurden unter der Sterilbank vorgenommen.

Heraeus Instruments GmbH, Hanau)². Anschließend wurde der Überstand dekantiert und auf das Zellpellet 5 ml Erythrozyten Lysepuffer (Buffer EL, Quiagen, Hilden) gegeben. Die Zellen wurden darin resuspendiert und für 4 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Danach wurde die Lysereaktion mit 50 ml PBS abgestoppt und die Zellsuspension erneut zentrifugiert. Das Zellpellet wurde nun in 10 ml MACS-Puffer (PBS, 5% fetales Kälberserum (FCS, Sigma-Aldrich, Steinheim), 2 mM EDTA) aufgenommen, davon wurden 10 µl mit einer Pipette in ein 1,5 ml Eppendorf Cup (Eppendorf, Hamburg) gegeben und mit 90 µl Trypanblaulösung (0,4%, SIGMA-Aldrich, Steinheim) vermischt. 10 µl dieser Suspension wurden in eine Neubauer Zählkammer (Brand, Wertheim) pipettiert und unter dem Mikroskop (DM IRB, Leica, Germany) ausgezählt. Währenddessen wurden die Zellen ein drittes Mal zentrifugiert. Danach wurden sie, dem Protokoll des *B-Cell Isolation Kit mouse* (MACS Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) folgend, weiterbehandelt. Hierzu wurde das Zellpellet in 40 µl MACS Puffer pro 10⁷ Zellen resuspendiert und 10 µl pro 10⁷ Zellen des Biotin *Antibody Cocktails* (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) hinzugefügt. Dieser Cocktail enthielt Biotin markierte Antikörper (AK) gegen *cluster of differentiation* (CD) 43 (LY-48), CD4 (L3T4), und Ter-119, die an alle Zellen, außer den reifen B-Zellen, banden, da diese kein CD43 exprimieren. Die Biotin-markierten Zellen wurden später von magnetisch gekoppelten AK erfasst, was dazu führte, dass die unmarkierten B-Zellen selektioniert wurden, da diese nicht magnetisch waren und durch das Magnetfeld (siehe unten) hindurchflossen. Die Zellsuspension wurde gut durchmischt und für 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden 30 µl MACS Puffer pro 10⁷ Zellen und 20 µl anti-Biotin *MicroBeads*, magnetisch markierte Antikörper (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) pro 10⁷ Zellen hinzugefügt. Nachdem ein zweites Mal unter den gleichen Bedingungen inkubiert wurde, wurden die

² Falls nicht anders im Text angegeben, wurde immer für 10 min bei 4°C und 1400 rpm zentrifugiert.

Zellen mit 1-2 ml MACS Puffer pro 10^7 Zellen gewaschen. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgekippt, das Zellpellet in 500 μ l pro 10^8 Zellen resuspendiert, und mit der magnetischen Separation fortgefahren. Die benötigte Separationssäule (MACS *Separation Columns*, 25 MS, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) und ein zusätzlicher Zellfilter (MACS *Pre-Separation Filters*, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach), wurden in ein Magnetfeld eingeführt (MACS *Multistand*, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) und mit 500 μ l MACS Puffer gespült. Danach wurde die Zellsuspension in die Separationssäule gegeben. Die unmarkierten, deshalb unmagnetischen B-Zellen, die durch die Säule durchflossen, wurden darunter in Medium (500 ml RPMI 1640 Medium (mit L-Glutamin, PAA Laboratories, Pasching, Österreich), 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin (P/S, Paa The Cell Culture company, Pasching), 10 ml 2 mM HEPES-Puffer (Sigma-Aldrich, Steinheim), 0,05 g Ascorbinsäure, 1,75 μ l/ 50 μ M)) aufgefangen. Alle anderen Zellen, die einen Biotin Rezeptor hatten, wurden in der Säule magnetisch festgehalten. Zum Schluss wurde drei Mal mit je 500 μ l MACS Puffer gespült. Nach der Isolation der B-Zellen wurden diese auf 10 ml mit dem gleichen Medium aufgefüllt und die Zellzahl nochmals ermittelt. Daraufhin wurden die Zellen ein letztes Mal zentrifugiert, um dann das Zellpellet in die von der Zellzahl abhängige Mediummenge zu überführen. Die Konzentration der Zellen im Medium betrug etwa 4×10^6 Zellen pro ml. Um zu kontrollieren, ob sich tatsächlich nur B-Zellen im Ansatz befanden, wurden dreimal jeweils 100 μ l aus der Zellsuspension in 1,5 ml Eppendorf Cups pipettiert. Die darin enthaltenen Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie auf die Zelloberflächenantigene CD19, B220 und CD127 untersucht. Der genaue Versuchsablauf ist unter dem Punkt „Durchflusszytometrie“ beschrieben (siehe unten). Die B-Zellsuspension wurde in 6- oder 12-Well-Platten (Falcon, BD Biosciences, Heidelberg) in einer Konzentration von etwa 4×10^6 Zellen pro ml auf 5 Wells verteilt und in jedes Well wurde Interleukin (IL)-4 (Recombinant Murine IL-4, Pepro Tech, Hamburg) in einer Endkonzentration von 1 ng/ml und anti-CD40 Antikörper (CD40 pure, functional grade mouse, MACS Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) in einer Endkonzentra-

tion von 5 µg/ml zugegeben. Ein Teil der Wells wurden mit Cortisol (SIGMA-Aldrich, Steinheim), Terbutalin (SIGMA-Aldrich, Steinheim) (Konzentration jeweils: 10^{-6} M), Phenylephrin (RBI Research Biochemical International, Natick, USA) oder Clonidin (SIGMA-Aldrich, Steinheim) (Konzentration jeweils $5 \cdot 10^{-6}$ M) versetzt (s. Abbildung 3).

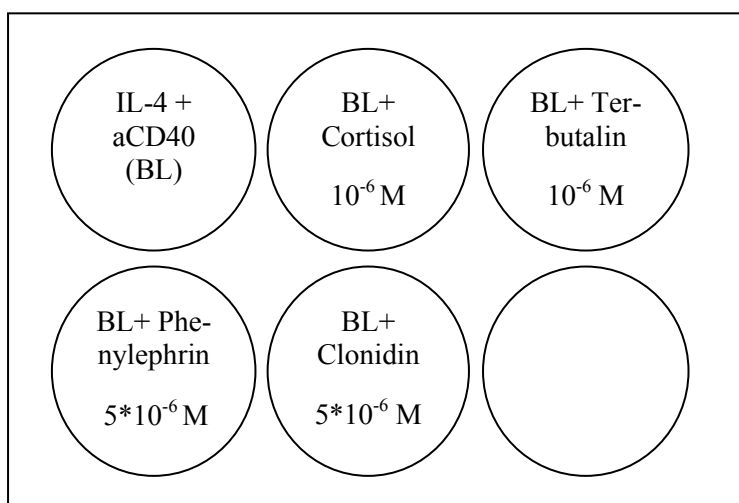


Abbildung 3: Schema der Plattenbelegung einer 6-Well-Platte. Fünf Wells wurden mit B-Zellsuspension in einer Konzentration von $4 \cdot 10^6$ Zellen pro ml befüllt. Jedes Well wurde mit Interleukin-4 und anti-CD40 Antikörper inkubiert. Zusätzlich wurden vier Wells mit Cortison, Terbutalin (Konzentration jeweils: 10^{-6} M), Phenylephrin oder Clonidin (Konzentration jeweils $5 \cdot 10^{-6}$ M) versetzt. BL, Baseline

Anschließend wurde die Platte für sechs Tage bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde aus jedem Well eine Probe entnommen um die Expression von IL-7 Rezeptor (CD127) nach der Inkubation mittels Durchflusszytometrie zu bestimmen.

2.2.2 Durchflusszytometrie

Die Methode der Durchflusszytometrie erlaubt es, Zellen in Suspension nach ihrer Größe und Granularität zu messen. Zusätzlich ist es möglich Oberflächenantigene oder andere Zellmoleküle durch Fluoreszenzfarbstoff-markierte Antikörper zu

detektieren. Dies geschieht, indem die Zellen in einem linearen Strom durch eine Messkammer fließen und dort einen Lichtstrahl (Laser) kreuzen. Trifft eine Zelle einen Lichtstrahl, streut sie das Licht. Ihre Größe, Membranfaltung und Granularität beeinflussen die Streuung, welche von zwei Detektoren gemessen wird. Die Strahlen, die nach vorne abgelenkt werden (Vorwärtsstreulicht, *Forward Scatter*, FS) geben Aufschluss über die Größe der Zellen, die Strahlen, die senkrecht zum Laser verlaufen (Seitwärtsstreulicht, *Side Scatter*, SS), über die Granularität. Die Fluoreszenzfarbstoffe werden durch den Laser zur Emission angeregt. Je nach Farbstoff haben diese Signale unterschiedliche Wellenlängen, die in unterschiedlichen Kanälen gemessen werden. In der hier vorliegenden Arbeit wurde ein Coulter Epics XL Durchflusszytometer von Beckman Coulter (Krefeld) verwendet. Alle Antikörper waren entweder mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC, Exzitation 488 nm, Emission 518 nm), welches im Fluoreszenzkanal 1 (FL1) gemessen wurde, oder mit Phycoerythrin (PE, Exzitation 488 nm, Emission 575 nm), welches im Fluoreszenzkanal 2 (FL2) gemessen wurde, markiert. Die Auswertung erfolgte mittels Win MDI Version 2.8 und Expo32 Version 1.2.

2.2.2.1 Färbung von Zelloberflächenantigenen

a) Expression von CD127 auf humanen Synoviozyten von RA und OA Patienten
Aus Gewebeproben von RA und OA Patienten, bei denen in der Asklepios Klinik, Bad Abbach ein Kniegelenkersatz vorgenommen wurde, wurden Synoviozyten isoliert. Die Isolation wurde von Labormitarbeitern durchgeführt und wurde bereits in Veröffentlichungen der Arbeitsgruppe beschrieben (16). Die Zellen wurden einem größeren Teil der Forschungsgruppe zur Verfügung gestellt. Ein Anteil der Synoviozyten wurde mittels Durchflusszytometrie auf die Expression von IL-7 Rezeptor α (CD127) auf humanen B-Zellen untersucht. Die Oberflächenantigene CD19, CD20, und CD127 wurden mit folgenden Antikörpern gefärbt: Isotyp Kontrolle Maus IgG1 κ PE (BD Pharmingen, Heidelberg), Isotyp Kontrolle Maus IgG1 κ FITC (BD Pharmingen, Heidelberg), Maus-anti-human CD19 PE AK (MACS, Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach), Maus-anti-human CD20 FITC AK

(Klon 2H7, BD Pharmingen, Heidelberg), Maus-anti-human CD127 PE AK (Klon hIL-7R-M21, BD Pharmingen, Heidelberg). Es wurden drei Proben bearbeitet, wobei die erste als Isotyp Kontrolle (PE und FITC markiert) diente. Die zweite wurde zur Selektion der B-Zellen aus den Synoviozyten, mit Hilfe der Färbung der CD19 und CD20 Oberflächenantigene, benötigt. Die dritte Probe wurde mit anti-CD20 und anti-CD127 AK gefärbt, um den prozentualen Anteil der IL7-Rezeptor tragenden B-Zellen zu ermitteln. Nachdem die Zellen anfangs mit PBS gewaschen und anschließend zentrifugiert wurden, wurde auf das Zellpellet jeweils 5 µl des AK gegeben und für 15 min im Dunkeln bei 4°C inkubiert. Die Proben wurden wieder mit PBS gewaschen, zentrifugiert und in 500 µl PBS resuspendiert. Fünf Minuten vor der Messung wurde in die Proben jeweils 5 µl 7-Aminoactinomycin (7-AAD, BD Pharmingen, Heidelberg) gegeben, ein Avitalfarbstoff, der nur in tote Zellen eindringen kann, und diese somit auf dem FL3-Kanal (Exzitation 488 nm, Emission 647 nm) detektierbar macht. Es konnten somit selektiv lebende Zellen analysiert werden. Die Zellen wurden nun im Durchflusszytometer analysiert. Die *gating*-Strategie war die gleiche wie bei den Maus-B-Zellen und ist in Abbildung 4 (siehe unten) dargestellt.

b) Expression von CD127 auf Maus B-Zellen

Um die unterschiedliche Veränderung der Expression von IL7-Rezeptoren α (CD127) auf B-Zellen, die unter Einfluss von Cortisol und unterschiedlichen Sympathomimetika standen, festzustellen, wurden die Proben, die vor und nach der Inkubation der isolierten Maus-B-Zellen entnommen wurden, mithilfe des Durchflusszytometers untersucht. Hierfür wurden vor der Inkubation drei Proben aus den frisch isolierten B-Zellen entnommen und zentrifugiert (8 min, 4°C, 2000 rpm). Anschließend wurde das erste Röhrchen mit einer PE markierten Isotyp Kontrolle (Isotyp Control Rat IgG2a PE, eBioscience, Frankfurt) und einer Fluoresceinisothiocyanat (FITC) markierten Isotyp Kontrolle (Isotyp Control Rat IgG2a FITC, Immunotech, Beckman Coulter, Krefeld) gefärbt. Das zweite Röhrchen wurde mit einem monoklonalen anti-Maus CD19 PE AK (Klon 1D3, BD Pharmingen, Heidelberg) und einem monoklonalen anti-Maus CD45/B220 FITC

AK (Klon RA3-6B2, BD Pharmingen, Heidelberg) gefärbt. Dies diente zur Kontrolle der erfolgreichen B-Zell-Isolation (Abb. 4). Das dritte Röhrchen wurde wieder mit demselben B220 Antikörper und einem anti-Maus CD127 PE AK (Klon A7R34, eBioscience, NatuTec, Frankfurt) gefärbt. Alle Antikörper waren aus der Ratte und es wurden jeweils 5 μ l des Antikörpers auf das zuvor zentrifugierte und vom Überstand befreite Zellpellet pipettiert. Nach fünfzehn minütiger Inkubationszeit bei 4°C im Dunkeln wurde die Probe mit 1 ml PBS aufgefüllt, zentrifugiert und dekantiert. Das übrig gebliebene Zellpellet wurde in 500 μ l PBS resuspendiert und stand nun für die Messung mit dem Durchflusszytometer bereit. Fünf Minuten vor der Messung wurde in die Proben ebenfalls jeweils 5 μ l 7-AAD gegeben. Es konnten somit selektiv lebende Zellen analysiert werden (Abb. 4). Nach sechs Tagen wurde aus jedem der fünf Ansätze (siehe oben) eine Probe entnommen. Zusätzlich wurde eine Probe für die Isotyp Kontrolle entnommen, sodass sechs Proben bearbeitet wurden. Die Arbeitsschritte waren alle identisch zu denen vor der Inkubation, die fünf Proben wurden mit denselben Isotyp Kontrollen, B220-, CD19- und CD127-Antikörpern gefärbt, und ebenfalls die lebenden Zellen mithilfe von 7-AAD selektioniert. Die *gating*-Strategie ist in Abbildung 4 dargestellt.

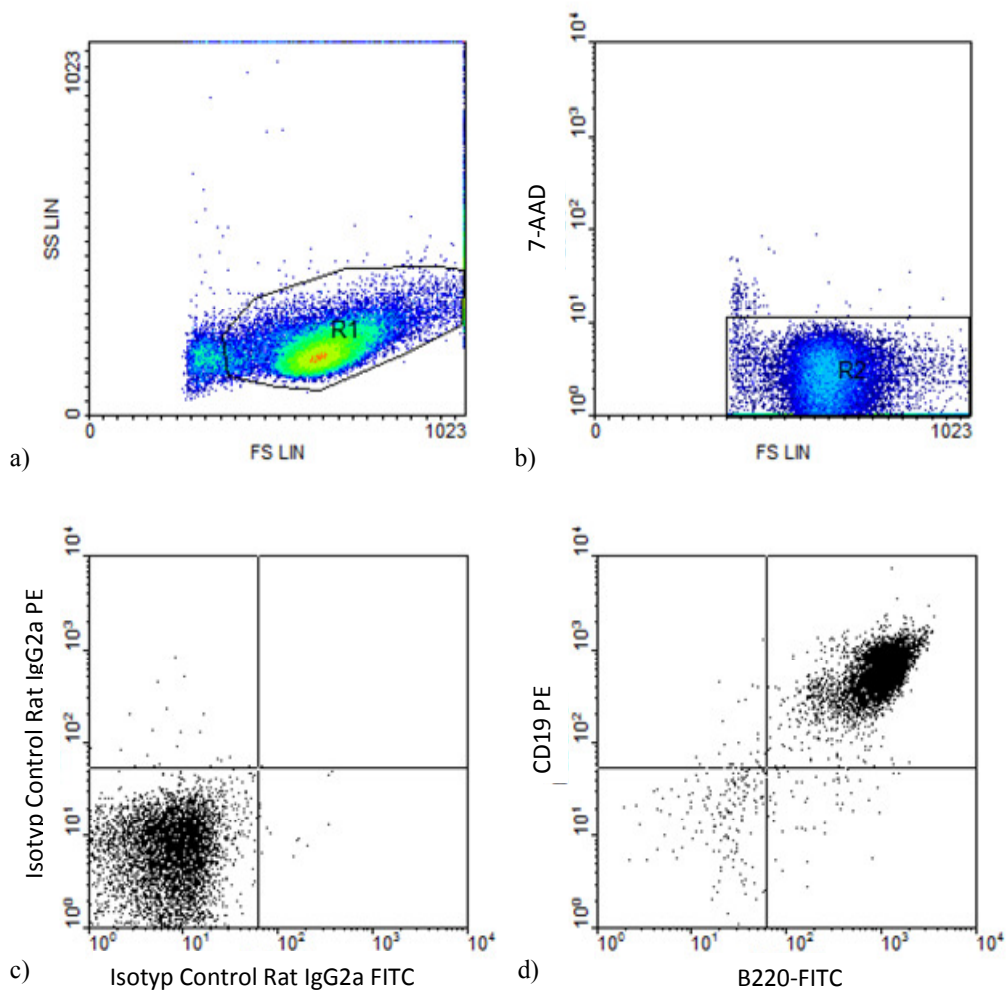


Abbildung 4: Darstellung der *gating*-Strategie für die Messung von Zelloberflächenantigenen auf Maus-B-Zellen. a) *Density Plot:* Lymphozytenpopulation. Mit Hilfe des SS (Seitwärtsstreulicht, *Side Scatter*,) auf der y-Achse und FS (Vorwärtsstreulicht, *Forward Scatter*,) auf der x-Achse wurden die Lymphozyten selektiert und *gated*. R1, Region 1 beinhaltet die Lymphozytenpopulation. b) *Density Plot:* Lebende Lymphozyten. Die mit 7-Aminoactinomycin (7-AAD) gefärbten Lymphozyten aus R1 wurden im Fluoreszenz (FL)3-Kanal, der auf der y-Achse aufgetragen wurde, gemessen. Die lebenden Zellen gaben kein Fluoreszenzsignal im FL3-Kanal ab, und kamen deshalb am unteren Ende der y-Achse zu liegen. Diese vitalen Lymphozyten wurden in R2 (Region 2) *gated*. Nur Zellen, die in R1 und R2 enthalten waren, wurden in die weitere Analyse einbezogen; c) Isotyp-Kontrolle mit Isotyp Control Rat IgG2a Phycoerythrin (PE) Antikörper (AK) und Isotyp Control Rat IgG2a Fluoresceinisothiocyanat (FITC) AK und d) B-Zell-Kontrolle mit B220 FITC AK und CD19 PE AK: x-Achse: FL1, gibt FITC-Signal wider, y-Achse: FL2, gibt PE-Signal wider. In der Isotyp Kontrolle wurde das Gate so gesetzt, dass die

ganze Punktwolke im linken unteren Quadranten war. Alle späteren Messungen eines Versuches wurden mit diesem Gate durchgeführt.

2.2.2.2 Färbung von intrazellulären Antigenen

Nach der sechstägigen Inkubation der Maus-B-Zellen bei 37 °C wurden von den fünf Behandlungsgruppen jeweils drei Proben entnommen. Jeweils eine vor der Stimulation mit IL-7 und zwei weitere Proben 10 min und 30 min bzw. 60 min nach der Stimulation. Anschließend wurden die Zellen mit Formalin (Merck, KGaA, Darmstadt) fixiert und mit Methanol (Merck KGaA, Darmstadt) perforiert, um die intrazellulären Moleküle pSTAT5 bzw. phosphorylierte *extracellular signal-related kinase* (pERK) mit Antikörpern färben zu können (113, 114). Diese Arbeitsschritte wurden folgendermaßen durchgeführt: Für die erste Probe wurde zum Zeitpunkt Null ca. fünf Mio. Zellen entnommen.³ Hierfür wurde die Zellsuspension gut durchmischt und die Probe in ein 1,5 ml Eppendorf Cup überführt. In dieses wurde die zur Probe identische Menge an 1,5%igem Formaldehyd (37% Formalin, PBS) gegeben, auf dem Vortexer (Bio Vortex V1, Kisker, Steinfurt) durchmischt und auf Eis gestellt. Der übrige Ansatz wurde mit 20 ng/ml recombinantem murinem IL-7 (R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt) stimuliert. Nach 10, 30 und 60 Minuten wurden weitere Proben entnommen und diese wurden ebenfalls mit 1,5%igem Formaldehyd fixiert. Nachdem die Proben mindestens 10 min mit Formalin fixiert wurden, wurden sie für 8 min bei 2000 rpm und 4°C zentrifugiert, anschließend vom Überstand befreit und auf das Pellet 500 µl eiskalten Methanol gegeben. Nachdem die Suspension kurz auf dem Vortexer

³ Die Menge der entnommenen Proben richtete sich nach der Anfangszellzahl und -menge, die aufgrund des unterschiedlichen B-Zell Gehaltes der Maus Milzen variierte. Im Durchschnitt wurden 100 Millionen Zellen aus zwei Maus Milzen isoliert und somit waren in jedem Ansatz ca. 20 Millionen Zellen. Dieser wurde jeweils durch 3 dividiert, da aus jedem Ansatz drei Proben entnommen wurden, in denen schließlich ca. 5 Millionen Zellen enthalten waren.

durchmischt wurde, wurden die Proben wieder für 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden an diesem Punkt entweder bei -20°C bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt oder zentrifugiert. Alle folgenden Zentrifugationen wurden nun für 11 min bei 2000 rpm und 4°C vorgenommen. Nachdem der Methanol-Überstand dekantiert wurde, wurden die Zellen nochmals mit PBS und 1% BSA (Bovines Serum Albumin, Sigma, Deisenhofen) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen entweder mit einem pSTAT5 Antikörper (Anti-phospho-STAT5A/B (Tyr694/699, Klon A11W), Upstate, Millipore, Schwalbach) oder pERK Antikörper (p44/42 MAPK (ERK1/2, Klon 137F5), Cell Signaling Technology, New England Biolabs, Frankfurt) und eine Probe mit einer Isotyp Kontrolle (Rabbit IgG Isotyp Control, abcam, Cambridge, UK) gefärbt. Die Primärantikörper wurden in einer 1:100 Verdünnung eingesetzt (Anfangskonzentration von pERK Antikörper: $98\ \mu\text{g/ml}$), $100\ \mu\text{l}$ wurden auf jedes Zellpellet gegeben und für 30 min bei 4°C inkubiert. Die Isotyp Kontrolle wurde, bevor ebenfalls $100\ \mu\text{l}$ einer 1:100 Verdünnung eingesetzt wurden, zuvor um den Faktor 50 verdünnt, da die Anfangskonzentration $5\ \text{mg/ml}$ betrug. Nach einem Waschschrift wurde ein zweiter Antikörper (Polyclonal Goat Anti-Rabbit IgGs/ Biotinylated, Dako, Hamburg) eingesetzt, der mit Biotin markiert war. Hierfür wurden $100\ \mu\text{l}$ einer 1:200 Verdünnung auf das Zellpellet gegeben und für 30 min bei 4°C inkubiert. Zum Schluss wurde mit PE markiertem Streptavidin (Streptavidin/ RPE, Dako, Hamburg) gefärbt, das auf gleiche Weise wie der Sekundärantikörper verwendet wurde und an das Biotin gebunden hat. Diese beiden Schritte wurden eingesetzt, um das Signal in der Durchflusszytometrie-Messung zu verstärken, da nur von einem geringen pSTAT5 und pERK Gehalt in den Zellen ausgegangen wurde. Nach einem letzten Waschschrift wurden die Proben analysiert und mittels Histogramm ausgewertet.

2.3 Auswertung, Statistik

Zum Test der Hypothesen wurden jeweils mindestens fünf unabhängige Versuche durchgeführt. Die genaue Anzahl durchgeführter, unabhängiger Versuche ist in

den jeweiligen Abbildungen, bzw. Legenden aufgeführt. Ein Vergleich von zwei Gruppen wurde mittels Mann-Whitney-U Test vorgenommen. Beim Vergleich mehrerer Gruppen wurde eine Varianzanalyse (ANOVA) mit post-hoc Test (Bonferroni) durchgeführt. Ein p-Wert von < 0.05 wurde als signifikant erachtet. Die statistische Auswertung sowie die Erstellung der Graphen erfolgte mittels Sigma Plot (Version 11, Systat Software Inc., Chicago, USA). Die Auswertung und Darstellung der FACS Ergebnisse erfolgte mittels Win MDI (Version 2.9, Joseph Trotter, USA) und FloJo (Version 7.6, TriStar Inc., Ashland, USA).

3 Ergebnisse

3.1 Der IL-7 Rezeptor auf humanen B-Zellen

Studien der letzten Jahre konnten zeigen, dass der IL-7 Rezeptor nicht nur auf B-Zell-Vorstufen exprimiert wird, sondern auch auf reifen B-Zellen (111). Es wurden erhöhte Spiegel von IL-7 in Serum und Synovialflüssigkeit von Patienten mit RA im Vergleich zu denen von Patienten mit OA gefunden (72). Desweiteren konnten Hartgring et al. im Maus-Modell die Arthritis-inhibierende Wirkung einer IL-7R α -Blockade zeigen (103). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde von unserer Arbeitsgruppe Synovialgewebe aus Gelenken von OA und RA Patienten mittels Immunhistochemie auf das Vorhandensein von IL-7R α + B-Zellen untersucht. In beiden Patientengruppen wurde diese Zellpopulation detektiert. Desweiteren konnte bei diesen Untersuchungen gezeigt werden, dass sich in Synovialgewebe von RA Patienten im Vergleich zu OA Patienten deutlich mehr IL-7R α positive B-Zellen befinden (Abbildung 5a). Um festzustellen, ob es sich um eine relative oder absolute Erhöhung der IL-7R α + Zellen handelt, wurde in dieser Arbeit mittels Durchflusszytometrie der Anteil IL-7R α + B-Zellen in Synovialzellen bestimmt. Es zeigte sich, dass der prozentuale Anteil der CD127-tragenden B-Zellen in OA und RA Gewebe gleich hoch ist. In beiden Patientengruppen tragen etwa 3 % der B-Zellen einen IL-7R α (Abbildung 5b). Hieraus kann die Hypothese formuliert werden, dass IL-7R α positive B-Zellen in jedem Entzündungsinfiltrat mit gleichem Anteil enthalten sind und dies kein Spezifikum bei der RA darstellt, dass jedoch der Gesamtanteil an Entzündungszellen in RA Gewebe höher ist als in OA Gewebe.

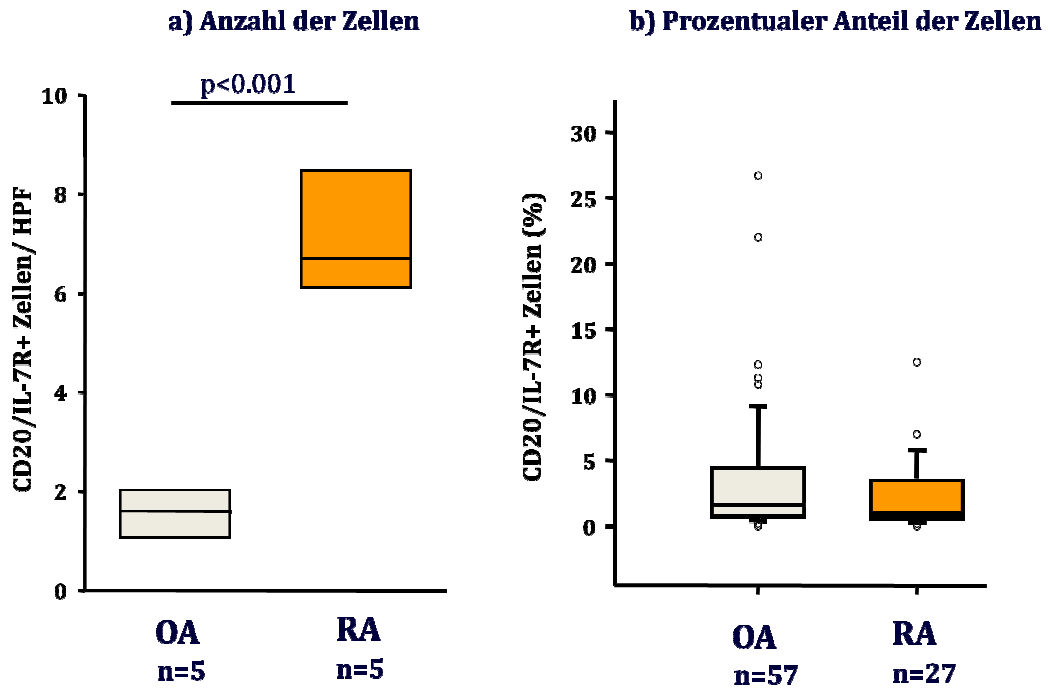


Abbildung 5a): Anzahl der IL-7R α positiven B-Zellen pro Gesichtsfeld (high power field (HPF)). In Gewebe von Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA) wurden mehr IL-7R α positive B-Zellen mittels Immunhistochmie detektiert, als in Gewebe von Patienten mit Osteoarthritis (OA). Der p-Wert wurde mittels Mann-Whitney-U Test ermittelt. **b):** Der prozentuale Anteil der IL-7R α positiven B-Zellen an der Gesamtzellzahl wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Messungen ergaben, dass der prozentuale Anteil dieser Zellpopulation in RA- und OA-Gewebe gleich hoch war.

3.2 Charakterisierung von IL-7R α positiven Maus B-Zellen

Die Funktion der IL-7R α positiven B-Zellen in der Arthritis wurde parallel in der Kollagen Typ II Modellarthritis an Mäusen untersucht. Nach der Induktion der Arthritis mit Kollagen Typ II wurden den Mäusen mit IL-7 stimulierte B-Zellen injiziert, was einen proinflammatorischen Effekt auf die CII-Arthritis hatte. Wurden die B-Zellen jedoch vor der Stimulation mit IL-7 während der Inkubationsperiode mit Noradrenalin stimuliert und anschließend den Mäusen verabreicht, war die proinflammatorische Wirkung aufgehoben. Diese Ergebnisse führten zunächst zu der Hypothese, dass IL-7R α durch die Stimulation der B-Zellen mit Noradrenalin herunterreguliert wird.

Zunächst musste gezeigt werden, dass auch Maus B-Zellen IL-7R α exprimieren, gleichzeitig sollte getestet werden, ob die Expression dieser Rezeptoren nach Inkubation mit Noradrenalin verändert wird. Hierzu wurden Maus B-Zellen wie in Abschnitt 2.2.1 beschrieben, isoliert und anschließend stimuliert.

3.2.1 Expression von CD127 an der Zelloberfläche

Vor der Stimulation mit anti-CD40 und IL-4 und nach sechs Tagen Kultur wurde die Expression der IL-7 Rezeptoren auf den B-Zellen mittels Durchflusszytometrie untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass der prozentuale Anteil der CD127 positiven B-Zellen nach der Stimulation im Vergleich zum Ausgangswert gestiegen war (Abbildung 6).

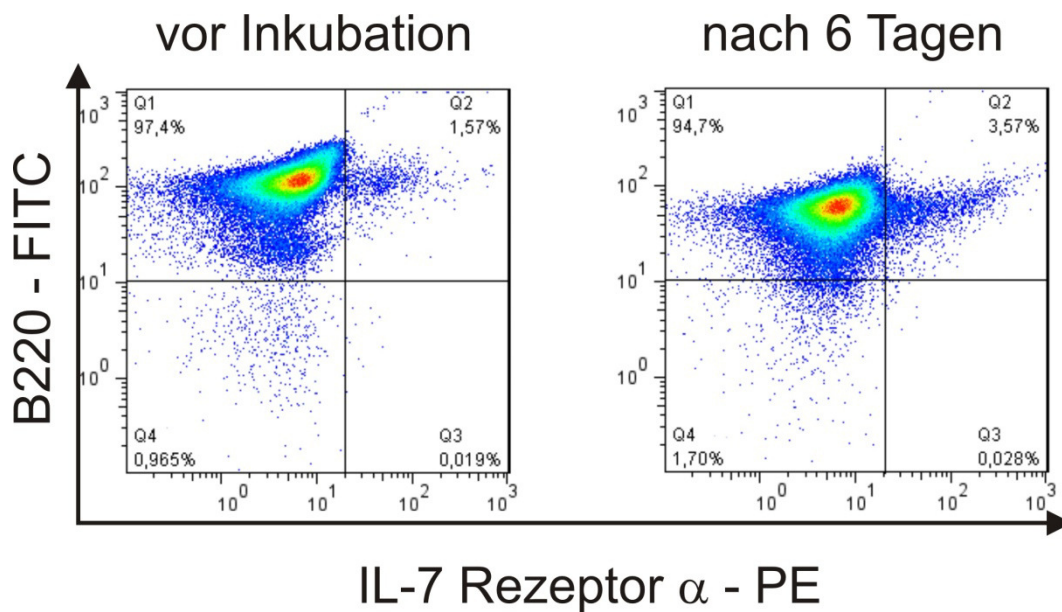


Abbildung 6: Bestimmung des Interleukin-7 (IL-7) Rezeptor α auf B-Zellen. Die IL-7 Rezeptor α (IL-7R α) positiven B-Zellen befinden sich im rechten oberen Quadranten. a) IL-7R α positive B-Zellen vor der Inkubation mit anti-*cluster of differentiation* (CD) 40 (anti-CD40) und Interleukin-4 (IL-4). Der prozentuale Anteil der IL-7R α positiven B-Zellen beträgt in diesem Beispiel 1,57 %. b) IL-7R α positive B-Zellen nach sechs Tagen Inkubation mit anti-CD40 und IL-4. Der prozentuale Anteil der IL-7R α positiven B-Zellen stieg in diesem Beispiel auf 3,57%. x-Achse: Fluoreszenzkanal (FL)1, gibt Phycoerythrin (PE)-Signal wider; y-Achse: FL2, gibt Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-Signal wider.

Die zusätzliche Stimulation der Zellen mit β_2 -, α_1 - oder α_2 -Adrenozeptor Agonisten sowie Koinkubation mit Cortisol zeigte keinen Einfluss auf den prozentualen Anteil IL-7R + B-Zellen nach sechs Tagen Kultur (Abbildung 7a). Allerdings steigerte sich die Dichte der IL-7R auf den B-Zellen sowohl nach alleiniger Stimulation mit anti-CD40 und IL-4, als auch nach zusätzlicher Stimulation mit β_2 -, α_1 - oder α_2 -Adrenozeptor Agonisten signifikant (Abbildung 7b).

a) prozentualer Anteil IL-7R α positiver B-Zellen b) Dichte der IL7-R α auf B-Zellen

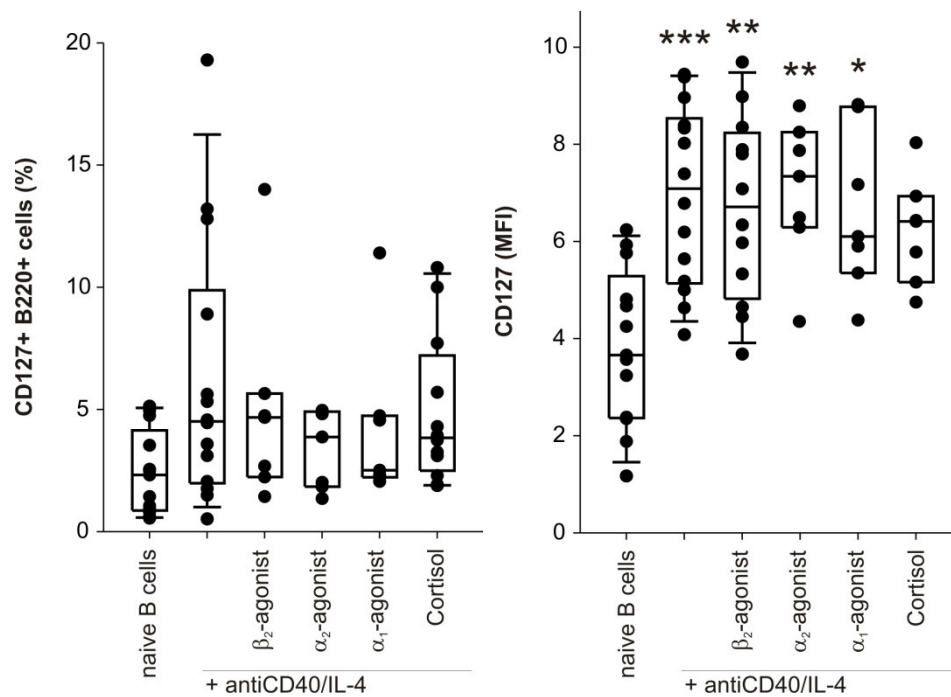


Abbildung 7: Bestimmung von CD127 (Interleukin7-Rezeptor α , IL-7R α) und B220 auf B-Zellen mittels Durchflusszytometrie. Gemessen wurden die Zellen vor der Inkubation (*naive B cells*), Zellen, die nur mit anti-cluster of differentiation (CD)40 und Interleukin-4 (aCD40+IL-4) stimuliert worden waren, und Proben die zusätzlich jeweils mit Cortisol, Terbutalin (β_2 -agonist), Phenylepinephrin (α_1 -agonist) oder Clonidin (α_2 -agonist) stimuliert worden waren. P-Werte wurden mittels ANOVA und Boferroni post-hoc Test bestimmt. **a):** Der prozentuale Anteil der IL-7R+ B-Zellen ist nach der Aktivierung der B-Zellen leicht erhöht. Dieses Niveau lässt sich jedoch weder durch die Koinkubation mit α - oder β -Adrenozeptor Agonisten noch durch Cortisol verändern.

b): Die Dichte der IL-7R auf den B-Zellen (*mean fluorescence intensity*, MFI) wird sowohl nach alleiniger Stimulation mit anti-CD40 und IL-4, als auch mit zusätzlicher Stimulation mit β_2 -, α_1 - oder α_2 -Adrenozeptor Agonisten signifikant (*) gesteigert.

3.2.2 Einfluss der Stimulation auf intrazelluläre Signalwege

Die Koinkubation der B-Zellen mit Adrenozeptor Agonisten zeigte keine spezifische Regulation der Rezeptorexpression an der Zelloberfläche. Es wurde deshalb im Weiteren die Hypothese untersucht, dass die intrazelluläre Antwort auf die Stimulation der IL-7R α mit IL-7 durch Noradrenalin verändert wird. Hierfür wurden der STAT5- und der ERK-Signalweg verwendet, wobei bei beiden Signalwegen eine Phosphorylierung der STAT5- bzw. der ERK-Moleküle aus einer Aktivierung des CD127 resultieren sollte.

3.2.2.1 Die Sensitivität von Western Blot und Immunopräzipitation scheint zu gering, um phosphoryliertes STAT5 zu detektieren

Da nach Stimulation des IL-7R eine Phosphorylierung von STAT5 stattfindet, sollte pSTAT5 mittels Western Blot in mit IL-4 und anti-CD40 sowie mit oder ohne Noradrenalin aktivierten und anschließend mit IL-7 stimulierten B-Zellen detektiert werden. Es gelang jedoch nicht pSTAT5 mittels Western Blot spezifisch nachzuweisen. Mittels Immunopräzipitation wurde versucht, die Konzentration des pSTAT5 in der Proteinlösung zu erhöhen, es konnte aber auch hierdurch keine eindeutige pSTAT5-Bande auf dem Blot identifiziert werden.

3.2.2.2 Durchflusszytometrische Messung von pSTAT5 und pERK

Der Nachweis von phosphoryliertem STAT5 gelang mittels intrazellulärer Färbung in der Durchflusszytometrie (Beispiel pSTAT5, Abbildung 8). Die B-Zellen wurden zunächst erneut für fünf Tage wie in Abschnitt 2.2.1 behandelt. Nach Stimulation mit IL-7 wurde zum Zeitpunkt 0 min, 10 min und 30 min bei Bestimmung von pSTAT5, bzw. nach 0 min, 10 min und 60 min, bei Bestimmung von pERK eine Probe entnommen. Anschließend wurden die intrazellulären Moleküle

pSTAT5 oder pERK mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern, wie in Abschnitt 2.2.2.2 beschrieben, gefärbt.

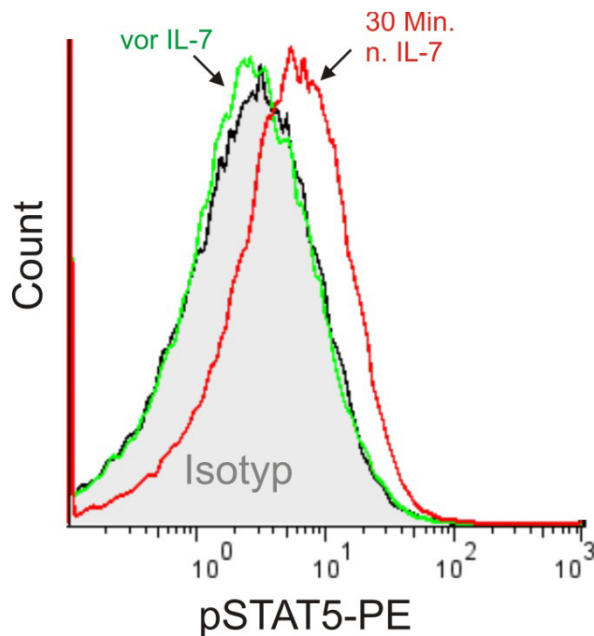


Abbildung 8: Nachweis von phosphoryliertem Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription 5 (pSTAT5) Molekül in B-Zellen mittels intrazellulärer Färbung in der Durchflusszytometrie nach Stimulation mit Interleukin-7 (IL-7). Grün: B-Zellen die für sechs Tage mit anti-*cluster of differentiation* (CD) 40 (anti-CD40) und Interleukin-4 (IL-4) inkubiert wurden (vor IL-7) und daraufhin direkt auf ihren intrazellulären pSTAT5 Gehalt untersucht wurden. Rot: B-Zellen die für sechs Tage mit anti-CD40 und IL-4 inkubiert wurden und daraufhin für 30 min mit IL-7 stimuliert und anschließend auf ihren pSTAT5 Gehalt untersucht wurden. Nach der Stimulation stieg der intrazelluläre pSTAT5 Gehalt. x-Achse: gibt das Phycoerythrin (PE)-Signal des pSTAT5-Antikörpers wider. y-Achse: gibt die Anzahl der gemessenen Signale wider (Count).

3.2.2.2.1 Aktivierung von B-Zellen in Anwesenheit von Cortisol oder eines β_2 -AR hemmt die Bildung von pSTAT5 nach Stimulation mit IL-7

Es wurden insgesamt fünf unabhängige Versuche auf die unter 3.2.2.2 geschilderte Art und Weise durchgeführt. Die Stimulation mit Cortisol oder Terbutalin zeigte im Vergleich zu nur mit anti-CD40 und IL-4 aktivierten B-Zellen eine verminderte pSTAT5-Bildung nach IL-7 Stimulation im zeitlichen

Verlauf (Abbildung 9a). Dies lässt darauf schließen, dass ein β_2 -AR- oder Cortisol-Stimulus den Signalpfad unterhalb des IL-7R derart verändert, dass die pSTAT5-Bildung vermindert wird. Die Veränderungen nach Stimulation mit dem α_1 -AR Agonisten Phenylephrin und dem α_2 -AR Agonisten Clonidin unterschieden sich statistisch nicht von der Kontrollgruppe (Abbildung 9b).

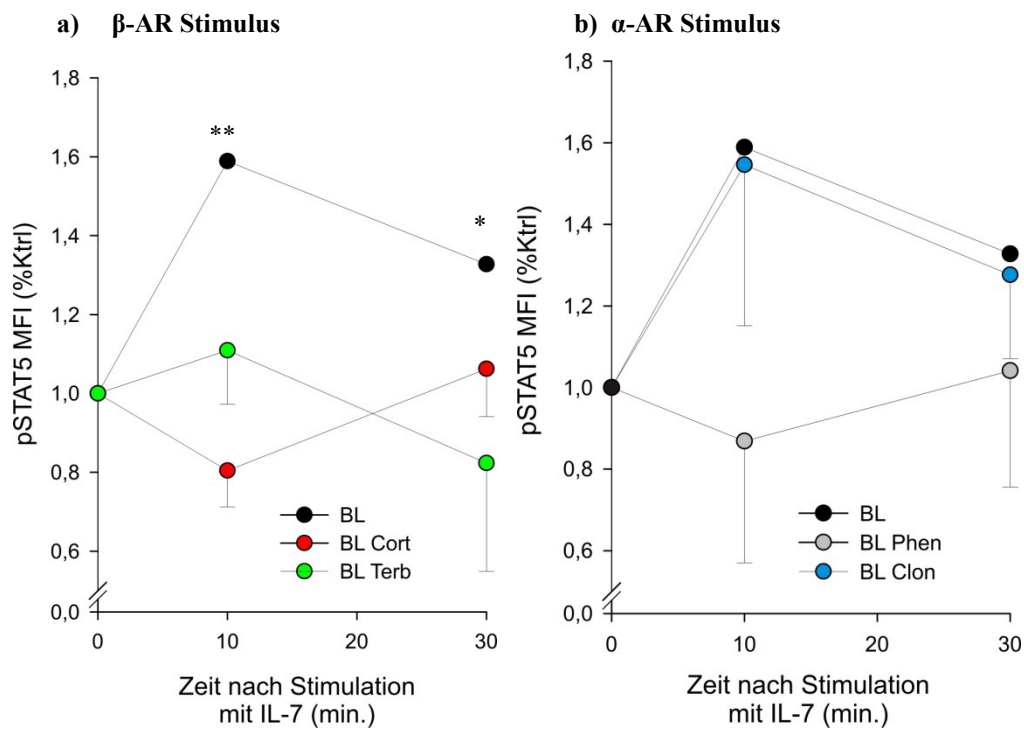


Abbildung 9: Der zeitliche Verlauf des phosphorylierte Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription (pSTAT5)-Gehaltes (*Mean fluorescence intensity* (MFI)) in Interleukin-7 Rezeptor positiven B-Zellen vor Stimulation (0 min) und 10 min und 30 min nach Stimulation mit Interleukin 7 (20 ng/ml). **a)** Stimulation von β -Adrenozeptoren (β -AR), **b)** Stimulation von α -Adrenozeptoren (α -AR). Die Aktivierung von B-Zellen in Anwesenheit von Cortisol (BL Cort, 10^{-6} M) oder Terbutalin (BL Ter, 10^{-6} M) verhinderte jeweils eine Bildung von pSTAT5 nach IL-7 Stimulation. Dahingegen zeigte die Inkubation mit Clonidin (BL Clon, $5 \cdot 10^{-6}$ M) keine Veränderung und auch Phenylephrin (BL Phen, $5 \cdot 10^{-6}$ M) zeigte im Vergleich zur alleinigen Inkubation mit Interleukin-4 (1 ng/ml) und anti-CD40 (5 μ g/ml) (BL) keinen statistischen Unterschied. ANOVA (*General linear model*) mit post-hoc Analyse (siehe ANOVA-Tabelle). **p=0,001; *p<0,05. Daten aus fünf unabhängigen Experimenten sind zusammengefasst.

3.2.2.2.2 pERK-Gehalt in Maus B-Zellen

In der Literatur ist neben der Phosphorylierung von STAT5 nach Stimulation des IL-7R auch eine Aktivierung des MAPK/ERK Signalpfades beschrieben (115). Es wurde deshalb der Gehalt an phosphoryliertem ERK-Molekül (pERK) in den jeweiligen Proben mittels Durchflusszytometrie wie unter 3.2.2.2 beschrieben in fünf unabhängigen Versuchen untersucht (Abbildung 10). Jedoch konnten im Falle des pERK-Gehaltes generell nur minimale Veränderungen festgestellt werden, sodass der Aussagewert dieser Untersuchungen im Vergleich zu denen des pSTAT5 von fraglicher biologischer Relevanz ist. Im Falle des pERK verhinderte die Vorinkubation der B-Zellen mit Cortisol ebenfalls die Bildung von pERK nach Stimulation mit IL-7. Die Vorinkubation mit Terbutalin hatte jedoch den gegenteiligen Effekt im Vergleich zu pSTAT5 (vergleiche Abbildung 9a und Abbildung 10a). Ein α -AR Stimulus zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die pERK Bildung nach IL-7 Stimulation (Abbildung 10b).

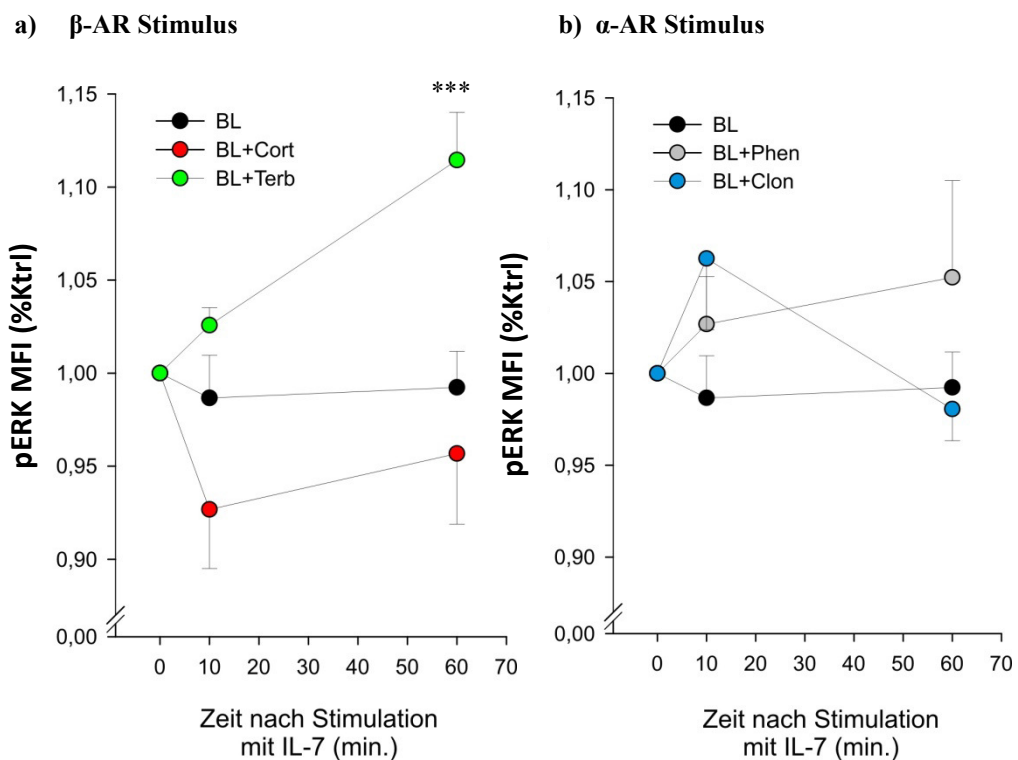


Abbildung 10: Der zeitliche Verlauf des phosphorylierten Extrazellulär-Signal-regulierte-Kinase (pERK) Gehaltes (*mean fluorescence intensity* (MFI)) in B-Zellen vor Stimulation (0 min), 10 min und 60 min nach Stimulation mit Interleukin-7 (20 ng/ml). **a)** Stimulation von β -Adrenozeptoren (β AR), **b)** Stimulation von α -Adrenozeptoren (α -AR). Die Inkubation mit Cortisol (BL Cort, 10^{-6} M) verhinderte eine Bildung von pERK zum Zeitpunkt 10 min, nach 60 min unterschied sich der pERK Gehalt jedoch nicht mehr von der Kontrollgruppe (BL). Die Vorinkubation mit Terbutalin (BL Ter, 10^{-6} M) führte jedoch zu einer vermehrten ERK-Phosphorylierung im Vgl. zu der Kontrollgruppe. Nach Phenylephrin (BL Phen, $5 \cdot 10^{-6}$ M) und Clonidin (BL Clon, $5 \cdot 10^{-6}$ M) Behandlung zeigte sich keine Änderung der pERK-Bildung nach IL-7 Stimulation im Vergleich zur alleinigen Inkubation mit Interleukin-4 (1 ng/ml) und anti-CD40 (5 μ g/ml) (BL). ANOVA (*general linear model*) mit post-hoc test (siehe ANOVA-Tabelle). *** $p < 0,001$. Daten aus fünf unabhängigen Experimenten sind zusammengefasst.

4 Diskussion

Bei der rheumatoiden Arthritis handelt es sich um eine komplexe Systemerkrankung. Studien der letzten Jahrzehnte haben verdeutlicht, dass multiple Faktoren an ihrer Ätiologie und Pathogenese beteiligt sind. Die komplexe Interaktion des endokrinen Systems, des Nervensystems und des Immunsystems rückt im Zusammenhang mit der RA immer weiter in den Vordergrund. In dieser Arbeit wurde der Einfluss des sympathischen Nervensystems auf die Expression und Funktion von IL-7 Rezeptoren auf B-Zellen im Kontext der Arthritis untersucht.

4.1 IL-7R auf humanen B-Zellen

Nachdem lange Zeit davon ausgegangen wurde, dass CD127 nur auf B-Zell-Vorstufen exprimiert wird, wurden in jüngerer Zeit auch reife CD19 und B220 tragende B-Zellen in Synovialgewebe von Arthritispatienten entdeckt, die CD127 auf ihrer Oberfläche exprimieren (112). Diese Daten konnten in unserer Arbeitsgruppe bestätigt werden. Sowohl bei Patienten mit RA als auch mit OA befanden sich IL-7R α positive, reife B-Zellen im Synovialgewebe betroffener Gelenke. Bei diesen immunhistochemischen Untersuchungen stellte sich zudem heraus, dass im Synovialgewebe der RA Patienten deutlich mehr IL-7R α positive, reife B-Zellen vorhanden sind, als im Gewebe von OA Patienten. Ergebnisse der Untersuchung von Zellsuspensionen aus diesen Geweben zeigten jedoch, dass der prozentuale Anteil der IL-7R positiven Zellen in beiden Kollektiven gleich hoch war. Auch bei der OA handelt es sich um eine chronische Entzündung des Gelenks, vermutlich aber nicht ausgelöst durch Autoimmunphänomene sondern durch dauernde mechanische Alterationen (116). Diese Ergebnisse zeigen somit, dass im Synovialgewebe von RA Patienten zwar mehr IL-7R + B-Zellen vorhanden sind, diese aber wohl in jedem Entzündungsinfiltrat, z.B. in OA Gelenken, mit dem gleichen prozentualen Anteil vorkommen. Zusätzlich zu mehr IL-7R + B-Zellen ist die IL-7 Konzentration in Serum und Synovialflüssigkeit von RA Patienten im Vergleich zu der von OA Patienten erhöht (72). Studien, die zeigten, dass IL-7 Arthritis im Maus-Modell auslöst (102) oder eine Blockade des IL-7R α in der

Kollagen-Typ II induzierten Arthritis die Arthritiszeichen verbessert (103), führen zu der Hypothese, dass die IL-7R positiven B-Zellen ebenfalls proinflammatorische Funktion haben. Diese Annahme wurde im Maus-Modell von unserer Gruppe bestätigt (unveröffentlichte Daten).

4.2 Regulation der IL-7R positiven B-Zellen

In dem oben erwähnten Maus-Modell bewirkte die Stimulation von B-Zellen mit IL-7 eine Verschlechterung der Kollagen-Typ II induzierten Arthritis. Im Gegensatz dazu bewirkte die Vorbehandlung der B-Zellen mit Noradrenalin trotz Stimulation mit IL-7 im gleichen Ansatz keine Veränderung des Arthritisschweregrades. Dies führte zu der Annahme, dass das sympathische Nervensystem über einen adrenergen Stimulus mit dem IL-7/IL-7R-System der B-Zelle interagiert und somit den Verlauf der Arthritis günstig beeinflusst. Bereits in der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass das sympathische Nervensystem über seinen Hauptneurotransmitter Noradrenalin antiinflammatorische Wirkung auf die RA haben kann (26, 32, 38, 35, 33, 39, 30, 31, 36, 34, 37, 27). Mit den folgenden Versuchen sollte deshalb untersucht werden, ob das IL-7/IL-7R-System auf der B-Zelle eine Verbindung zwischen Nervensystem und Immunsystem darstellt, ob es sich auf den B-Zellen um funktionstüchtige Rezeptoren handelt, und ob und wie diese auf sympathomimetische Stimuli reagieren. Es konnte keine Änderung der Expression des IL-7R α auf Maus B-Zellen unter dem Einfluss adrenerger Stimuli festgestellt werden. Zum einen sind eine Vielfalt von Interaktionen des IL-7/IL-7R α -Systems mit anderen intrazellulären Signalwegen bekannt (117), zum anderen ist bekannt, dass die Genexpression des IL-7R α u.a. durch die Transkriptionsfaktoren *GA binding protein* (GABP) und PU.1 reguliert wird (118, 119, 120). Ein Zusammenhang zwischen diesen Transkriptionsfaktoren und den Signalwegen adrenerger Rezeptoren wurde bisher jedoch nicht beschrieben, so dass eine Regulation der Expression des IL-7R α vor diesem Hintergrund nicht zu erwarten war.

Interessanterweise fand sich nur bei den Zellen, die mit Cortisol in einer Konzentration von 10^{-6} M simuliert wurden eine signifikante Änderung der Rezeptordichte auf den B-Zellen, bei gleichem prozentualem Anteil. Im Vergleich zu den Zellen die lediglich mit aCD40 und IL-4 inkubiert wurden, inhibierte Cortisol die Steigerung der Dichte des CD127 auf den B-Zellen. Ergebnisse anderer Studien haben gezeigt, dass Glukokortikoide die Expression des IL-7R auf T- und B-Zellen induzieren bzw. die Dichte des IL-7R α auf der Zelloberfläche und die Dichte der IL-7R α mRNA in den Zellen erhöhen (94, 95, 121). In diesen Studien war der Anstieg der IL7-R α Expression jedoch nur in den ersten 12 Stunden nach Inkubation mit Dexamethason nachweisbar, bei den B-Zellen wurde bereits nach neun Stunden gemessen, danach fiel er wieder ab. Gemessen wurde die *mean fluorescence intensity* (MFI) des IL-7R α auf Maus B-Zellen aus der Milz mittels Durchflusszytometrie. Im Falle der IL-7R α mRNA war der Anstieg sogar nur in den ersten zwei Stunden nach Inkubation messbar, was die Autoren zu dem Schluss kommen ließ, dass der IL-7R α Gehalt nach Stimulation mit Glukokortikoiden (GK) zwar rasch, aber nur vorübergehend ansteigt (95). Wie erwähnt wurde ebenfalls eine Erhöhung der mRNA nachgewiesen, was nahelegt, dass GKs die Transkription des IL-7R α Gens direkt induzieren (94). Da in unserem Versuchsansatz die Änderung des IL-7R α Gehaltes erst sechs Tage nach Inkubation mit Cortisol gemessen wurde, wäre es denkbar, dass der stimulierende Effekt des Cortisol bereits wieder abgeklungen war oder sich langfristig gegenteilig auswirkt. Zusammenfassend bewirkt Cortisol kurzfristig einen Anstieg, längerfristig jedoch eine verminderte Expressionsdichte von IL-7R auf B-Zellen. Dadurch könnte die verminderte Phosphorylierung von STAT5 und ERK nach IL-7 Stimulus unter vorheriger Stimulation mit Cortisol erklärt werden. Dies könnte, neben den bekannten (21, 20), ein weiterer antiinflammatorischer Mechanismus des Cortisol im Rahmen der Entzündung/Arthritis darstellen, und gleichzeitig die Rolle des IL-7 als immun-stärkenden Mediator bekräftigen (6). Eine signifikante Inhibition der STAT5 Phosphorylierung nach IL-7 Stimulus konnte nur mit Vorbehandlung der B-Zellen durch Terbutalin und Cortisol erreicht werden. Vergli-

chen mit den Ergebnissen aus dem Maus-Modell der Kollagen Typ-II Arthritis, könnte dies bedeuten, dass β_2 -AR-Stimuli in die Signaltransduktion des IL-7R negativ eingreifen und dadurch eine Verminderung der pSTAT5-Produktion bewirken mit der Folge einer Verminderung von proinflammatorischen Signalen bei der CII Arthritis. Der genaue Interaktionspunkt der beiden Signalwege ist momentan noch nicht klar. Ein bekannter negativer Regulator des IL-7 Signalwegs ist *Suppressor of cytokine signal 1* (SOCS-1) (122), aber hier besteht keine bekannte Verbindung zum cAMP/PKA Signalpfad. Eine Möglichkeit wäre eine Interaktion über den p38 MAPK Pfad, der durch Stimulation von β_2 -AR auf B-Zellen aktiviert werden kann (37, 123). Da man weiß, dass der IL-7 Signalpfad auf einen funktionierenden p38 MAPK Signalweg angewiesen ist (124), wäre eine Konkurrenz um die p38 MAPK denkbar. Auch eine indirekte Einflussnahme über ein anti-inflammatorisches IL-10 Signal wäre denkbar, denn man weiß, dass die Stimulation von β_2 -AR auf aktivierten B-Zellen die Expression von anti-inflammatorischem Interleukin 10 steigern kann (125).

4.3 Ausblick

Um die bisherigen Ergebnisse zu validieren, könnten zum einen Untersuchungen von Genprodukten des STAT5-Signalweges durchgeführt werden, um die proinflammatorischen Faktoren zu identifizieren, die für die Verschlechterung der Arthritis verantwortlich sind, und die nach einem β_2 -AR Stimulus herabreguliert werden. Zum anderen könnte die IL-10 Produktion in Bezug auf IL-7 und β_2 -AR Stimulation gemessen werden, um die oben genannte These zu validieren. Dieser Ansatz könnte zudem an menschlichen B-Zellen durchgeführt werden, mit der Fragestellung, ob IL-7R + B-Zellen auch beim Menschen proinflammatorisch wirken und die gleichen Signalwege und Faktoren beeinflussen wie bei der Maus. Würde dies zutreffen, könnte ein therapeutisches Ziel die selektive Blockade dieser IL-7R + B-Zellen in vivo sein, um die starken Nebenwirkungen der unselektiven B-Zell-Blockade durch Rituximab, welche auch antiinflammatorische B-Zellen blockiert, zu vermeiden.

5 Zusammenfassung

Bei der rheumatoiden Arthritis (RA) handelt es sich um eine Multisystemerkrankung, deren komplexe Pathogenese noch immer nicht völlig verstanden ist. Immunsystem, Nerven- und endokrines System des Körpers spielen für den Verlauf der Erkrankung eine Rolle. In dieser Arbeit wurde der Einfluss des sympathischen Nervensystems auf den Interleukin-7 Rezeptor (IL-7R α) auf B-Zellen untersucht. Da im Maus-Modell der Kollagen Typ-II-induzierten Arthritis eine Verschlechterung der Erkrankung nach Transfer von IL-7-stimulierten B-Zellen gezeigt werden konnte, bestand die Annahme, dass der IL-7R auf B-Zellen einen proinflammatorischen Einfluss im Kontext der Arthritis ausübt. Wurden die B-Zellen jedoch in Anwesenheit des Neurotransmitters Noradrenalin aktiviert, war der proinflammatorische Effekt nach Stimulation von B-Zellen mit IL-7 nicht mehr vorhanden. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb, neben dem Nachweis von IL-7R α auf humanen und Maus B-Zellen, untersucht, weshalb eine Aktivierung der B-Zellen unter dem Einfluss von Noradrenalin die Wirkung der IL-7 Stimulation aufhebt. Die erste Hypothese war, dass durch die adrenerge Stimulation eine Veränderung der Rezeptor-Expression auf der Oberfläche von B-Zellen erfolgt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass zwar die Aktivierung von B-Zellen mit anti-CD40 und IL-4 eine Erhöhung der IL-7R α Expression auf B-Zellen bewirkt, dass dies jedoch durch einen adrenergen Stimulus nicht beeinflusst wird. Als nächstes wurde die Hypothese untersucht, dass eine Aktivierung von B-Zellen in der Anwesenheit von Noradrenalin den Signalweg unterhalb des IL-7R beeinflusst. Hierzu wurde eine Methode zur intrazellulären Bestimmung von pSTAT5 und pERK mittels Durchflusszytometrie nach Stimulation von B-Zellen mit IL-7 etabliert. Es zeigte sich, dass die Stimulation mit β_2 -adrenergen Agonisten während der Aktivierung der B-Zellen mit anti-CD40/IL-4, die IL-7 induzierte Phosphorylierung von STAT5 verminderte, wohingegen die Phosphorylierung von ERK zunahm. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die intrazelluläre Bildung von *second messengern* unterhalb des IL-7R durch Stimulation der β_2 -AR auf B-

Zellen verändert wird. Dies könnte auch eine Erklärung dafür bieten, dass IL-7R α + B-Zellen, die in Anwesenheit des sympathischen Neurotransmitters Noradrenalin aktiviert werden, ihre proinflammatorischen Eigenschaften im Maus-Modell der Arthritis verlieren. Das tiefere Verständnis dieser Zusammenhänge kann eventuell für die Entwicklung neuer therapeutischer Prinzipien bei der RA verwendet werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Gross WL, Hellmich B. Rheumatoide Arthritis. In: Böhm M, Hallek M, Schmiegel W (Hrsg.). Innere Medizin. München, Urban& Fischer Verlag, 2009, S. 792–799.
2. Forster A, Villiger P. Rheumatoide Arthritis. In: Villiger PM, Seitz M (Hrsg.). Rheumatologie in Kürze. Stuttgart, Georg Thieme Verlag, 2006, S. 57–74.
3. Baenkler HW. Rheumatologie. In: Bob A, Bob K (Hrsg.). Duale Reihe Innere Medizin. Stuttgart, Georg Thieme Verlag, 2009, S. 1335–1384.
4. Padyukov L, Silva C, Stolt P, Alfredsson L, Klareskog L. A gene-environment interaction between smoking and shared epitope genes in HLA-DR provides a high risk of seropositive rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2004;50(10):3085–92.
5. Sugiyama D, Nishimura K, Tamaki K, Tsuji G, Nakazawa T, Morinobu A, et al. Impact of smoking as a risk factor for developing rheumatoid arthritis: a meta-analysis of observational studies. *Ann. Rheum. Dis* 2010;69(1):70–81.
6. Alamanos Y, Drosos AA. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* 2005;4(3):130–36.
7. Saller H. Neurovegetative Regulationen. In: Klinke R, Pape HC, Silbernagel S (Hrsg.). Physiologie. Stuttgart, Georg Thieme Verlag, 2005, S. 785–800.
8. Waaler E. On the occurrence of a factor in human serum activating the specific agglutination of sheep blood corpuscles. 1939. *APMIS* 2007;115(5):422-38; discussion 439.
9. Straub RH (Hrsg.). Lehrbuch der klinischen Pathophysiologie komplexer chronischer Erkrankungen, Band 1: Physiologische Grundlagen. Göttingen, Vandenhoeck & Ruprecht, 2007.
10. Blalock JE. Shared ligands and receptors as a molecular mechanism for communication between the immune and neuroendocrine systems. *Ann. N. Y. Acad. Sci* 1994;741:292–98.
11. Garza HH, Carr DJ. Neuroendocrine peptide receptors on cells of the immune system. *Chem. Immunol* 1997;69:132–54.

12. Miller AH, Spencer RL, Pearce BD, Pisell TL, Azrieli Y, Tanapat P, et al. Glucocorticoid receptors are differentially expressed in the cells and tissues of the immune system. *Cell. Immunol* 1998;186(1):45–54.
13. Sanders VM, Straub RH. Norepinephrine, the beta-adrenergic receptor, and immunity. *Brain Behav. Immun* 2002;16(4):290–332.
14. Pongratz G, Sanders VM. Rezeptoren für Neurotransmitter und Hormone auf und in Immunzellen. In: Straub RH (Hrsg.). *Lehrbuch der klinischen Pathophysiologie komplexer chronischer Erkrankungen, Band 1: Physiologische Grundlagen*. Göttingen, Vandenhoeck & Ruprecht, 2007, S. 47–55.
15. Härle P, Cutolo M, Schölmerich J, Straub RH. Rheumatoide arthritis - pathogenetische bedeutung der neuroendokrinen achsen und des peripheren nervensystems. *Med. Klin. (Munich)* 2002;97(12):720–29.
16. Straub RH, Günzler C, Miller LE, Cutolo M, Schölmerich J, Schill S. Anti-inflammatory cooperativity of corticosteroids and norepinephrine in rheumatoid arthritis synovial tissue in vivo and in vitro. *FASEB J* 2002;16(9):993–1000.
17. Besedovsky HO, del Rey A. Central and peripheral cytokines mediate immune-brain connectivity. *Neurochem. Res* 2011;36(1):1–6.
18. Besedovsky HO, del Rey A. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocr. Rev* 1996;17(1):64–102.
19. Hench PS, Kendall EC, Slocumb CH, Polley HF. Effects of cortisone acetate and pituitary ACTH on rheumatoid arthritis, rheumatic fever and certain other conditions. *Arch Intern Med (Chic)* 1950;85(4):545–666.
20. Schütt C, Bröker B. *Grundwissen Immunologie, 1. Auflage*. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag, 2006.
21. Leung DYM, Bloom JW. Update on glucocorticoid action and resistance. *J. Allergy Clin. Immunol* 2003;111(1):3-22; quiz 23.
22. Trepel M. *Neuroanatomie, Struktur und Funktion, 3. Auflage*. München, Urban& Fischer Verlag, 2004.

23. Deutzmann R. Mechanismen der Signaltransduktion. In: Rassow R, Hauser K, Deutzmann R (Hrsg.). Duale Reihe, Biochemie. Stuttgart, Georg Thieme Verlag, 2006, S. 544–565.
24. Härle P. Signaltransduktion der Noradrenalin-vermittelten Geninduktion. In: Straub RH (Hrsg.). Lehrbuch der klinischen Pathophysiologie komplexer chronischer Erkrankungen, Band 1: Physiologische Grundlagen. Göttingen, Vandenhoeck & Ruprecht, 2007, S. 60–64.
25. Kohm AP, Sanders VM. Norepinephrine and beta 2-adrenergic receptor stimulation regulate CD4+T and B lymphocyte function in vitro and in vivo. *Pharmacol. Rev.* 2001(53):487–525.
26. Elenkov I, Wilder R, Chrousos G, Vizi E. The sympathetic nerve- an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol. Rev.* 2000(52(4)):595–638.
27. Schauenstein K, Liebmann P. Regulation von Immunfunktionen durch Katecholamine. In: Straub RH (Hrsg.). Lehrbuch der klinischen Pathophysiologie komplexer chronischer Erkrankungen, Band 1: Physiologische Grundlagen. Göttingen, Vandenhoeck & Ruprecht, 2007, S. 91–102.
28. Weihe E, Bette M, Fink T, Romeo H, Schäfer MK. Molecular anatomical basis of interactions between nervous and immune system in health and disease. In: Schedulowski T (Hrsg.). *Psychoneuroimmunology*. New York, 1999, S. 167–183.
29. Weihe E, Schäfer MK, Bette M, Westermann J. Kommunikation zwischen Nervensystem und Immunsystem- Anatomische Grundlagen. In: Straub RH (Hrsg.). Lehrbuch der klinischen Pathophysiologie komplexer chronischer Erkrankungen, Band 1: Physiologische Grundlagen. Göttingen, Vandenhoeck & Ruprecht, 2007, S. 35–46.
30. Müller-Ladner U, Gay S. Rheumatoide Arthritis: Pathophysiologie der rheumatoiden Arthritis. In: Straub RH (Hrsg.). Lehrbuch der klinischen Pathophysiologie komplexer chronischer Erkrankungen, Band 2: Spezielle Pathophysiologie. Göttingen, Vandenhoeck & Ruprecht, 2007, S. 70–98.

31. Nance DM, Sanders VM. Autonomic innervation and regulation of the immune system (1987-2007). *Brain Behav. Immun* 2007;21(6):736–45.
32. Haas HS, Schauenstein K. Immunity, hormones, and the brain. *Allergy* 2001;56(6):470–77.
33. Mignini F, Streccioni V, Amenta F. Autonomic innervation of immune organs and neuroimmune modulation. *Auton Autacoid Pharmacol* 2003;23(1):1–25.
34. Pongratz G, Straub RH. B-cell involvement in the pathogenesis of RA-is there a contribution of the sympathetic nervous system? *Immunol. Res* 2008;40(2):148–63.
35. Kohm AP, Sanders VM. Suppression of antigen-specific Th2 cell-dependent IgM and IgG1 production following norepinephrine depletion in vivo. *J. Immunol* 1999;162(9):5299–308.
36. Podojil JR, Sanders VM. Selective regulation of mature IgG1 transcription by CD86 and beta 2-adrenergic receptor stimulation. *J. Immunol* 2003;170(10):5143–51.
37. Pongratz G, McAlees JW, Conrad DH, Erbe RS, Haas KM, Sanders VM. The level of IgE produced by a B cell is regulated by norepinephrine in a p38 MAPK- and CD23-dependent manner. *J. Immunol* 2006;177(5):2926–38.
38. Härle P, Möbius D, Carr DJJ, Schölmerich J, Straub RH. An opposing time-dependent immune-modulating effect of the sympathetic nervous system conferred by altering the cytokine profile in the local lymph nodes and spleen of mice with type II collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2005;52(4):1305–13.
39. Miller LE, Jüsten HP, Schölmerich J, Straub RH. The loss of sympathetic nerve fibers in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis is accompanied by increased norepinephrine release from synovial macrophages. *FASEB J* 2000;14(13):2097–107.
40. Edwards JC, Cambridge G. Sustained improvement in rheumatoid arthritis following a protocol designed to deplete B lymphocytes. *Rheumatology (Oxford)* 2001;40(2):205–11.

41. Edwards JCW, Szczepanski L, Szechinski J, Filipowicz-Sosnowska A, Emery P, Close DR, et al. Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med* 2004;350(25):2572–81.
42. Bauer C, Walzog B. Abwehrmechanismen des Körpers. In: Klinker R, Pape HC, Silbernagel S (Hrsg.). *Physiologie*. Stuttgart, Georg Thieme Verlag, 2005, S. 233–245.
43. Newkirk MM. Rheumatoid factors: host resistance or autoimmunity? *Clin. Immunol* 2002;104(1):1–13.
44. Burkhardt H, Koller T, Engström A, Nandakumar KS, Turnay J, Kraetsch HG, et al. Epitope-specific recognition of type II collagen by rheumatoid arthritis antibodies is shared with recognition by antibodies that are arthritogenic in collagen-induced arthritis in the mouse. *Arthritis Rheum* 2002;46(9):2339–48.
45. Lee DM, Friend DS, Gurish MF, Benoist C, Mathis D, Brenner MB. Mast cells: a cellular link between autoantibodies and inflammatory arthritis. *Science* 2002;297(5587):1689–92.
46. Clerck LS de, Westedt ML, Cats A, Vermeer BJ, Weltevreden EF, Bridts CH, et al. IgE deposition in normal skin of patients with rheumatoid arthritis in relation to clinical and laboratory findings. *Ann. Rheum. Dis* 1985;44(11):772–77.
47. Eisenberg R. Do autoantigens define autoimmunity or vice versa? *Eur. J. Immunol* 2005;35(2):367–70.
48. Bläss S, Engel JM, Burmester GR. The immunologic homunculus in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1999;42(12):2499–506.
49. Harris DP, Haynes L, Sayles PC, Duso DK, Eaton SM, Lepak NM, et al. Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. *Nat. Immunol* 2000;1(6):475–82.
50. O'Garra A, Stapleton G, Dhar V, Pearce M, Schumacher J, Rugo H, et al. Production of cytokines by mouse B cells: B lymphomas and normal B cells produce interleukin 10. *Int. Immunol* 1990;2(9):821–32.

51. Pistoia V. Production of cytokines by human B cells in health and disease. *Immunol. Today* 1997;18(7):343–50.
52. Hirano T, Matsuda T, Turner M, Miyasaka N, Buchan G, Tang B, et al. Excessive production of interleukin 6/B cell stimulatory factor-2 in rheumatoid arthritis. *Eur. J. Immunol* 1988;18(11):1797–801.
53. Houssiau FA, Devogelaer JP, van Damme J, Deuxchaisnes CN de, van Snick J. Interleukin-6 in synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritides. *Arthritis Rheum* 1988;31(6):784–88.
54. Takai Y, Seki N, Senoh H, Yokota T, Lee F, Hamaoka T, et al. Enhanced production of interleukin-6 in mice with type II collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 1989;32(5):594–600.
55. Hermann E, Fleischer B, Mayet WJ, Poralla T, Zum Meyer Büschenfelde KH. Correlation of synovial fluid interleukin 6 (IL-6) activities with IgG concentrations in patients with inflammatory joint disease and osteoarthritis. *Clin. Exp. Rheumatol*;7(4):411–14.
56. Sawada T, Hirohata S, Inoue T, Ito K. Correlation between rheumatoid factor and IL-6 activity in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol*;9(4):363–68.
57. Mihara M, Nishimoto N, Ohsugi Y. The therapy of autoimmune diseases by anti-interleukin-6 receptor antibody. *Expert Opin Biol Ther* 2005;5(5):683–90.
58. Maini RN, Taylor PC, Szechinski J, Pavelka K, Bröll J, Balint G, et al. Double-blind randomized controlled clinical trial of the interleukin-6 receptor antagonist, tocilizumab, in European patients with rheumatoid arthritis who had an incomplete response to methotrexate. *Arthritis Rheum* 2006;54(9):2817–29.
59. Hirano T. Interleukin-6 and its relation to inflammation and disease. *Clin. Immunol. Immunopathol* 1992;62(1 Pt 2):S60-5.
60. Roll P, Muhammad K, Schumann M, Kleinert S, Einsele H, Dörner T, et al. In vivo effects of the anti-interleukin-6 receptor inhibitor tocilizumab on the B cell compartment. *Arthritis Rheum* 2011;63(5):1255–64.

61. Go NF, Castle BE, Barrett R, Kastelein R, Dang W, Mosmann TR, et al. Interleukin 10, a novel B cell stimulatory factor: unresponsiveness of X chromosome-linked immunodeficiency B cells. *J. Exp. Med* 1990;172(6):1625–31.
62. Mauri C, Gray D, Mushtaq N, Londei M. Prevention of arthritis by interleukin 10-producing B cells. *J. Exp. Med* 2003;197(4):489–501.
63. Evans JG, Chavez-Rueda KA, Eddaoudi A, Meyer-Bahlburg A, Rawlings DJ, Ehrenstein MR, et al. Novel suppressive function of transitional 2 B cells in experimental arthritis. *J. Immunol* 2007;178(12):7868–78.
64. Pochet R, Delespesse G, Gausset PW, Collet H. Distribution of beta-adrenergic receptors on human lymphocyte subpopulations. *Clin. Exp. Immunol* 1979;38(3):578–84.
65. Podojil JR, Kin NW, Sanders VM. CD86 and beta2-adrenergic receptor signaling pathways, respectively, increase Oct-2 and OCA-B Expression and binding to the 3'-IgH enhancer in B cells. *J. Biol. Chem* 2004;279(22):23394–404.
66. van der Stoep N, Quinten E, van den Elsen PJ. Transcriptional regulation of the MHC class II trans-activator (CIITA) promoter III: identification of a novel regulatory region in the 5'-untranslated region and an important role for cAMP-responsive element binding protein 1 and activating transcription factor-1 in CIITA-promoter III transcriptional activation in B lymphocytes. *J. Immunol* 2002;169(9):5061–71.
67. Zhu XS, Linhoff MW, Li G, Chin KC, Maity SN, Ting JP. Transcriptional scaffold: CIITA interacts with NF-Y, RFX, and CREB to cause stereospecific regulation of the class II major histocompatibility complex promoter. *Mol. Cell. Biol* 2000;20(16):6051–61.
68. Kasprowiez DJ, Kohm AP, Berton MT, Chruscinski AJ, Sharpe A, Sanders VM. Stimulation of the B cell receptor, CD86 (B7-2), and the beta 2-adrenergic receptor intrinsically modulates the level of IgG1 and IgE produced per B cell. *J. Immunol* 2000;165(2):680–90.

69. Platzer C, Fritsch E, Elsner T, Lehmann MH, Volk HD, Prösch S. Cyclic adenosine monophosphate-responsive elements are involved in the transcriptional activation of the human IL-10 gene in monocytic cells. *Eur. J. Immunol* 1999;29(10):3098–104.
70. Pongratz G, Straub RH. The B cell, arthritis, and the sympathetic nervous system. *Brain Behav. Immun* 2010;24(2):186–92.
71. Fry TJ, Mackall CL. Interleukin-7: from bench to clinic. *Blood* 2002;99(11):3892–904.
72. Churchman SM, Ponchel F. Interleukin-7 in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2008;47(6):753–59.
73. Welch PA, Namen AE, Goodwin RG, Armitage R, Cooper MD. Human IL-7: a novel T cell growth factor. *J. Immunol* 1989;143(11):3562–67.
74. Milne CD, Paige CJ. IL-7: a key regulator of B lymphopoiesis. *Semin. Immunol* 2006;18(1):20–30.
75. Heufler C, Topar G, Grasseger A, Stanzl U, Koch F, Romani N, et al. Interleukin 7 is produced by murine and human keratinocytes. *J. Exp. Med* 1993;178(3):1109–14.
76. Kröncke R, Loppnow H, Flad HD, Gerdes J. Human follicular dendritic cells and vascular cells produce interleukin-7: a potential role for interleukin-7 in the germinal center reaction. *Eur. J. Immunol* 1996;26(10):2541–44.
77. Sawa Y, Arima Y, Ogura H, Kitabayashi C, Jiang J, Fukushima T, et al. Hepatic interleukin-7 expression regulates T cell responses. *Immunity* 2009;30(3):447–57.
78. Watanabe M, Ueno Y, Yajima T, Iwao Y, Tsuchiya M, Ishikawa H, et al. Interleukin 7 is produced by human intestinal epithelial cells and regulates the proliferation of intestinal mucosal lymphocytes. *J. Clin. Invest* 1995;95(6):2945–53.
79. Kovanen PE, Leonard WJ. Cytokines and immunodeficiency diseases: critical roles of the gamma(c)-dependent cytokines interleukins 2, 4, 7, 9, 15, and 21, and their signaling pathways. *Immunol. Rev* 2004;202:67–83.

80. Sudo T, Nishikawa S, Ohno N, Akiyama N, Tamakoshi M, Yoshida H. Expression and function of the interleukin 7 receptor in murine lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1993;90(19):9125–29.
81. He YW, Malek TR. The structure and function of gamma c-dependent cytokines and receptors: regulation of T lymphocyte development and homeostasis. *Crit. Rev. Immunol* 1998;18(6):503–24.
82. Hofmeister R, Khaled AR, Benbernou N, Rajnavolgyi E, Muegge K, Durum SK. Interleukin-7: physiological roles and mechanisms of action. *Cytokine Growth Factor Rev* 1999;10(1):41–60.
83. Ziegler SE, Morella KK, Anderson D, Kumaki N, Leonard WJ, Cosman D, et al. Reconstitution of a functional interleukin (IL)-7 receptor demonstrates that the IL-2 receptor gamma chain is required for IL-7 signal transduction. *Eur. J. Immunol* 1995;25(2):399–404.
84. Suzuki K, Nakajima H, Saito Y, Saito T, Leonard WJ, Iwamoto I. Janus kinase 3 (Jak3) is essential for common cytokine receptor gamma chain (gamma(c))-dependent signaling: comparative analysis of gamma(c), Jak3, and gamma(c) and Jak3 double-deficient mice. *Int. Immunol* 2000;12(2):123–32.
85. Yu CR, Young HA, Ortaldo JR. Characterization of cytokine differential induction of STAT complexes in primary human T and NK cells. *J. Leukoc. Biol* 1998;64(2):245–58.
86. Tanner JW, Chen W, Young RL, Longmore GD, Shaw AS. The conserved box 1 motif of cytokine receptors is required for association with JAK kinases. *J. Biol. Chem* 1995;270(12):6523–30.
87. Jiang Q, Li WQ, Hofmeister RR, Young HA, Hodge DR, Keller JR, et al. Distinct regions of the interleukin-7 receptor regulate different Bcl2 family members. *Mol. Cell. Biol* 2004;24(14):6501–13.
88. Pallard C, Stegmann AP, van Kleffens T, Smart F, Venkitaraman A, Spits H. Distinct roles of the phosphatidylinositol 3-kinase and STAT5 pathways in IL-7-mediated development of human thymocyte precursors. *Immunity* 1999;10(5):525–35.

89. Kittipatarin C, Khaled AR. Interlinking interleukin-7. *Cytokine* 2007;39(1):75–83.
90. Schulze WX, Deng L, Mann M. Phosphotyrosine interactome of the ErbB-receptor kinase family. *Mol. Syst. Biol* 2005;1:2005.0008.
91. Zarich N, Oliva JL, Martínez N, Jorge R, Ballester A, Gutiérrez-Eisman S, et al. Grb2 is a negative modulator of the intrinsic Ras-GEF activity of hSos1. *Mol. Biol. Cell* 2006;17(8):3591–97.
92. Avruch J, Khokhlatchev A, Kyriakis JM, Luo Z, Tzivion G, Vavvas D, et al. Ras activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade. *Recent Prog. Horm. Res* 2001;56:127–55.
93. Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr. Rev* 2001;22(2):153–83.
94. Shibata H, Tani-ichi S, Lee H, Maki K, Ikuta K. Induction of the IL-7 receptor alpha chain in mouse peripheral B cells by glucocorticoids. *Immunol. Lett* 2007;111(1):45–50.
95. Lee H, Shibata H, Ogawa S, Maki K, Ikuta K. Transcriptional regulation of the mouse IL-7 receptor alpha promoter by glucocorticoid receptor. *J. Immunol* 2005;174(12):7800–06.
96. Zuvich RL, McCauley JL, Oksenberg JR, Sawcer SJ, Jager PL de, Aubin C, et al. Genetic variation in the IL7RA/IL7 pathway increases multiple sclerosis susceptibility. *Hum. Genet* 2010;127(5):525–35.
97. Watanabe M, Ueno Y, Yajima T, Okamoto S, Hayashi T, Yamazaki M, et al. Interleukin 7 transgenic mice develop chronic colitis with decreased interleukin 7 protein accumulation in the colonic mucosa. *J. Exp. Med* 1998;187(3):389–402.
98. Totsuka T, Kanai T, Nemoto Y, Makita S, Okamoto R, Tsuchiya K, et al. IL-7 Is essential for the development and the persistence of chronic colitis. *J. Immunol* 2007;178(8):4737–48.

99. Shinohara T, Nemoto Y, Kanai T, Kameyama K, Okamoto R, Tsuchiya K, et al. Upregulated IL-7 receptor α expression on colitogenic memory CD4⁺ T cells may participate in the development and persistence of chronic colitis. *J. Immunol* 2011;186(4):2623–32.
100. Todd JA, Walker NM, Cooper JD, Smyth DJ, Downes K, Plagnol V, et al. Robust associations of four new chromosome regions from genome-wide analyses of type 1 diabetes. *Nat. Genet* 2007;39(7):857–64.
101. O'Doherty C, Alloza I, Rooney M, Vandembroeck K. IL7RA polymorphisms and chronic inflammatory arthropathies. *Tissue Antigens* 2009;74(5):429–31.
102. Hartgring SAY, Bijlsma JWJ, Lafeber FPJG, van Roon JAG. Interleukin-7 induced immunopathology in arthritis. *Ann. Rheum. Dis* 2006;65 Suppl 3:iii69-74.
103. Hartgring SAY, Willis CR, Alcorn D, Nelson LJ, Bijlsma JWJ, Lafeber FPJG, et al. Blockade of the interleukin-7 receptor inhibits collagen-induced arthritis and is associated with reduction of T cell activity and proinflammatory mediators. *Arthritis Rheum* 2010;62(9):2716–25.
104. van Roon JAG, Verweij MC, Wijk MW, Jacobs KMG, Bijlsma JWJ, Lafeber FPJG. Increased intraarticular interleukin-7 in rheumatoid arthritis patients stimulates cell contact-dependent activation of CD4(+) T cells and macrophages. *Arthritis Rheum* 2005;52(6):1700–10.
105. Meier D, Bornmann C, Chappaz S, Schmutz S, Otten LA, Ceredig R, et al. Ectopic lymphoid-organ development occurs through interleukin 7-mediated enhanced survival of lymphoid-tissue-inducer cells. *Immunity* 2007;26(5):643–54.
106. Timmer TCG, Baltus B, Vondenhoff M, Huizinga TWJ, Tak PP, Verweij CL, et al. Inflammation and ectopic lymphoid structures in rheumatoid arthritis synovial tissues dissected by genomics technology: identification of the interleukin-7 signaling pathway in tissues with lymphoid neogenesis. *Arthritis Rheum* 2007;56(8):2492–502.

107. Varas A, Vicente A, Sacedón R, Zapata AG. Interleukin-7 influences the development of thymic dendritic cells. *Blood* 1998;92(1):93–100.
108. Fry TJ, Christensen BL, Komschlies KL, Gress RE, Mackall CL. Interleukin-7 restores immunity in athymic T-cell-depleted hosts. *Blood* 2001;97(6):1525–33.
109. Morrissey PJ, Conlon P, Braddy S, Williams DE, Namen AE, Mochizuki DY. Administration of IL-7 to mice with cyclophosphamide-induced lymphopenia accelerates lymphocyte repopulation. *J. Immunol* 1991;146(5):1547–52.
110. Corcoran AE, Smart FM, Cowling RJ, Crompton T, Owen MJ, Venkitaraman AR. The interleukin-7 receptor alpha chain transmits distinct signals for proliferation and differentiation during B lymphopoiesis. *EMBO J* 1996;15(8):1924–32.
111. Hikida M, Nakayama Y, Yamashita Y, Kumazawa Y, Nishikawa SI, Ohmori H. Expression of recombination activating genes in germinal center B cells: involvement of interleukin 7 (IL-7) and the IL-7 receptor. *J. Exp. Med* 1998;188(2):365–72.
112. Hartgring SAY, van Roon JAG, Wenting-van Wijk M, Jacobs KMG, Jahangier ZN, Willis CR, et al. Elevated expression of interleukin-7 receptor in inflamed joints mediates interleukin-7-induced immune activation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2009;60(9):2595–605.
113. Ilangumaran S, Finan D, Rottapel R. Flow cytometric analysis of cytokine receptor signal transduction. *J. Immunol. Methods* 2003;278(1-2):221–34.
114. Krutzik PO, Nolan GP. Intracellular phospho-protein staining techniques for flow cytometry: monitoring single cell signaling events. *Cytometry A* 2003;55(2):61–70.
115. Fleming HE, Paige CJ. Pre-B cell receptor signaling mediates selective response to IL-7 at the pro-B to pre-B cell transition via an ERK/MAP kinase-dependent pathway. *Immunity* 2001;15(4):521–31.

116. Issa SN, Sharma L. Epidemiology of osteoarthritis: an update. *Curr Rheumatol Rep* 2006;8(1):7–15.
117. Palmer MJ, Mahajan VS, Trajman LC, Irvine DJ, Lauffenburger DA, Chen J. Interleukin-7 receptor signaling network: an integrated systems perspective. *Cell. Mol. Immunol* 2008;5(2):79–89.
118. DeKoter RP, Schweitzer BL, Kamath MB, Jones D, Tagoh H, Bonifer C, et al. Regulation of the interleukin-7 receptor alpha promoter by the Ets transcription factors PU.1 and GA-binding protein in developing B cells. *J. Biol. Chem* 2007;282(19):14194–204.
119. DeKoter RP, Lee H, Singh H. PU.1 regulates expression of the interleukin-7 receptor in lymphoid progenitors. *Immunity* 2002;16(2):297–309.
120. Xue H, Bollenbacher J, Rovella V, Tripuraneni R, Du Y, Liu C, et al. GA binding protein regulates interleukin 7 receptor alpha-chain gene expression in T cells. *Nat. Immunol* 2004;5(10):1036–44.
121. Franchimont D, Galon J, Vacchio MS, Fan S, Visconti R, Frucht DM, et al. Positive effects of glucocorticoids on T cell function by up-regulation of IL-7 receptor alpha. *J. Immunol* 2002;168(5):2212–18.
122. Corfe SA, Rottapel R, Paige CJ. Modulation of IL-7 thresholds by SOCS proteins in developing B lineage cells. *J. Immunol* 2011;187(7):3499–510.
123. McAlees JW, Sanders VM. Hematopoietic protein tyrosine phosphatase mediates beta2-adrenergic receptor-induced regulation of p38 mitogen-activated protein kinase in B lymphocytes. *Mol. Cell. Biol* 2009;29(3):675–86.
124. Crawley JB, Rawlinson L, Lali FV, Page TH, Saklatvala J, Foxwell BM. T cell proliferation in response to interleukins 2 and 7 requires p38MAP kinase activation. *J. Biol. Chem* 1997;272(23):15023–27.
125. Pongratz G, Melzer M, Straub RH. The sympathetic nervous system stimulates anti-inflammatory B cells in collagen-type II-induced arthritis. *Annals of the rheumatic diseases* 2011.

7 Danksagung

Danken möchte ich besonders meinem Doktorvater und Betreuer PD Dr. med. Georg Pongratz für die Überlassung des Themas und die exzellente Betreuung.

Herzlichen Dank auch an das Team im Labor und insbesondere Frau Madlen Melzer für die geduldige Unterstützung und die stete Hilfeleistung.

Meinen Eltern für ihre Förderung auf meinem Weg und während meines Studiums.

Meinem Mann Stefan für seine Geduld und seinen Beistand während meines Studiums und seine aufmunternden Worte in Zeiten der Verzweiflung.

8 Lebenslauf

PERSÖNLICHE ANGABEN:

Name: Judith Anthofer, geb. Thorwart
Geburtsdatum/-ort: 30.11.1986 in Aalen
Familienstand: verheiratet

SCHULAUSBILDUNG:

1993-1997 Grundschole Lauchheim
1997-2006 Gymnasium Bopfingen

AKADEMISCHE AUSBILDUNG:

2006-2012 Studium der Humanmedizin
Universität Regensburg
12/2012 Approbation als Ärztin

Regensburg, Dezember 2012

Judith Anthofer