

Der adoptive zelluläre Gentransfer in einem Mausmodell der rheumatoiden Arthritis

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereich 08 Biologie und Chemie
der Justus-Liebig Universität Gießen

aus dem

Lehrstuhl für Innere Medizin
mit Schwerpunkt Rheumatologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Ulrich Purath

aus Halle/Saale in Sachsen-Anhalt

Halle, den 01. 05. 2010

Diese Arbeit wurde am Institut für Rheumatologie und klinische Immunologie des Lehrstuhls für Innere Medizin mit Schwerpunkt Rheumatologie der Justus-Liebig-Universität Gießen angefertigt.

Erstgutachter: Prof. Dr. Michael Martin

Lehrstuhl für Immunologie des Fachbereichs Biologie

Justus-Liebig-Universität Gießen

Zweitgutachter: Prof. Dr. Ulf Müller-Ladner

Lehrstuhl für Innere Medizin mit Schwerpunkt Rheumatologie des

Fachbereichs Medizin

Justus-Liebig-Universität Gießen

Termin der Disputation: 17.08. 2010

Inhalt

Zusammenfassung	01
1. Einleitung	03
1.1 Die rheumatoide Arthritis	03
1.1.1 Medizinische und ökonomische Bedeutung der RA	03
1.1.2 Ätiologie und Pathogenese der RA	04
1.1.3 Therapie der RA	09
1.2 Ansatz und Ziele dieser Arbeit	12
1.2.1 Der adoptive zelluläre Gentransfer	12
1.2.2 Experimentelle Grundlagen und Ansatz dieser Arbeit	13
1.2.3 Ziele dieser Arbeit	15
2. Material und Methoden	17
2.1 Material	17
2.1.1 Geräte	17
2.1.2 Chemikalien	17
2.1.2.1 Abkürzungsverzeichnis der verwendeten Chemikalien	18
2.1.2.2 Lösungen und Puffer	19
2.1.2.3 Zellkulturmedien	24
2.1.3 Antikörper und Enzyme	25
2.1.4 Primer	26
2.1.5 Kommerzielle Kits	26
2.1.6 Zellmaterial	27
2.1.7 Versuchstiere	27
2.1.8 Patientenmaterial	27
2.1.9 Software	28
2.2 Methodik	27
2.2.1 Zellkultur	29
2.2.1.1 Bakterienkultur für die Plasmidvermehrung	29
2.2.1.2 Kulturbedingungen für die verwendeten Zellen	29
2.2.1.3 Kultur muriner DC aus Vorläuferzellen des Knochenmarks	29
2.2.1.4 Kultur humaner dendritischer Zellen aus Vorläuferzellen des peripheren Blutes	30

2.2.1.5	Markierung humaner DC mit Resovist	30
2.2.2	Tiermodelle	31
2.2.2.1	Modell der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA)	31
2.2.2.2	SCID-Maus Modell der RA	32
2.2.3	Das lentivirale Vektorsystem und adoptiver zellulärer Gentransfer	32
2.2.3.1	Das lentivirale Vektorkonstrukt pHR-IG	32
2.2.3.2	Herstellung der konzentrierten Virussuspension	33
2.2.3.3	Bestimmung der Viruskonzentration	34
2.2.3.4	Bestimmung des <i>multiplicity of infection</i> (MOI) Werts für die lentivirale Transduktion	34
2.2.3.5	Lentivirale Transduktion muriner DC	34
2.2.3.6	Adoptiver Transfer lentiviral transduzierter DC	35
2.2.4	DNA- und RNA-Analytik	35
2.2.4.1	Isolation von RNA aus murinem Gewebe	35
2.2.4.2	Isolation von genomischer DNA aus murinem Gewebe	36
2.2.4.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	37
2.2.4.4	PCR an genomischer DNA	37
2.2.4.5	Reverse Transkription der RNA	38
2.2.4.6	Quantitative <i>real-time</i> PCR	39
2.2.4.7	Agarose-Gelelektrophorese	39
2.2.4.8	Quantifizierung von Nukleinsäuren	39
2.2.5	Histologie und Immunhistologie	39
2.2.5.1	Gefrierschnitt-Histologie	39
2.2.5.2	Paraffinschnitt-Histologie	40
2.2.5.3	Immunhistochemischer Nachweis von eGFP	40
2.2.5.4	Hämatoxylin/Eosin- und Giemsa-Färbungen	41
2.2.5.5	Berlinerblau Färbung	41
2.2.5.6	Digitale Bildanalyse	41
2.2.6	Western Blot	43
2.2.7	ELISA	43
2.2.8	Durchflußzytometrie	43
2.2.9	Statistik	44

3. Ergebnisse	46
3.1 Transduktion der Vehikelzellen und Expression des inserierten genetischen Materials	46
3.2 Untersuchung des Migrationsverhaltens der DC	49
3.3 Wirkung des ACGT auf den Krankheitsverlauf im CIA-Modell	51
3.4 Wirkung des ACGT auf die Gelenkdestruktion auf histologischer Ebene	55
3.5 Wirkung des ACGT auf Aktivitätsmarker der Arthritis im Blutserum	57
3.6 Wirkung des ACGT auf die lokale und systemische Expression pro- und antientzündlicher Zytokine	59
4. Diskussion	67
4.1 Lentiviral transduzierte BM-DC als Vehikelzellen für einen gezielten Gentransfer im Modell der CIA	67
4.2 Der DC-basierte ACGT im CIA Modell in der Literatur	71
4.3 Wirksamkeit der verwendeten antientzündlichen Moleküle und Bedeutung der Kombinationstherapie	75
4.4 Perspektiven für die humane Anwendung des ACGT	79
5. Literaturverzeichnis	81
6. Abkürzungen	94

Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1.1 Schematische Darstellung der von der RA hauptsächlich betroffenen Gelenke und Organe	04
Abb. 1.2 Darstellung der artikulären Zerstörung im rheumatoiden Gelenk	08
Abb. 1.3: Vereinfachte Darstellung der Regulationsprozesse im rheumatoiden Gelenk	11
Abb. 2.1: Vektorkarte des lentiviralen pHR-IG Konstrukts	33
Abb. 2.2: Histologische Analyse der Gelenkdestruktion durch Computer-gestützte Flächenmessung am Beispiel eines Metatarsophalangealgelenks	42
Abb. 3.1: Transduktionseffizienz des lentiviralen Vektors pHR-IG in murinen BM-DC	48
Abb. 3.2: Markergen- und Insertexpression in lentiviral transduzierten BM-DC in einem repräsentativem Experiment	48
Abb. 3.3: Einfluss der lentiviralen Transduktion auf den Phänotyp muriner BM-DC	49
Abb. 3.4: Immunhistologischer Nachweis von eGFP Expression in den Pfoten CIA-erkrankter	

Mäuse	50
Abb. 3.5: Berlinerblau Färbung Partikel-beladener humaner DC im SCID-Mausmodell	
der RA	51
Abb. 3.6: Verlauf des klinischen Schweregrads der CIA in den Einzelexperimenten	53-55
Abb. 3.7: Auswertung der Flächenverhältnisse nach Experiment und Behandlungsgruppen	56
Abb. 3.8: Verhältnis von klinischem und histologischem Schweregrad der Arthritis	57
Abb. 3.9: Konzentration von IL-12 und anti-Kollagen Typ II Antikörpern im Serum ACGT-behandelter Versuchstiere	58
Abb. 3.10: Lokale Expression pro- und antientzündlicher Zytokine auf RNA-Ebene in den Pfoten, der Milz und den Lymphknoten	60-62
Abb. 3.11: Aus den einzelnen Experimenten zusammengefaßte Daten der lokalen Zytokinexpression auf RNA-Ebene in den Pfoten, der Milz und den Lymphknoten	64-66
Abb. 4.1: Verlauf des klinischen Arthritis-Schweregrads im CIA-Modell unter ACGT in publizierten Studien anderer Arbeitsgruppen und in der vorliegenden Arbeit	74

Verzeichnis der Tabellen

Tab. 2.1: Liste der Antikörper und Enzyme	25
Tab. 2.2: Liste der verwendeten Primer	26
Tab. 2.3: Liste der eingesetzten kommerziellen Kits	26
Tab. 2.4: Liste der eingesetzten Software	28
Tab. 2.5: Wertungssystem für die Kollagen-induzierte Arthritis	31
Tab. 2.6: Standardprotokoll der PCR	37
Tab. 2.7: Protokoll für die PCR-Reaktion an genomischer DNA	38
Tab. 2.8: Standardansatz für die reverse Transkription (20 µl Volumen)	38
Tab. 2.9: Standardreaktionsprogramm für die RT-PCR	38
Tab. 3.1: Auflistung der Behandlungsgruppen in den Einzelexperimenten CIA1-CIA6	47

Zusammenfassung

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist durch chronische Entzündung des Synoviums und die daraus resultierende Zerstörung der Gelenkstruktur und -funktion charakterisiert. Der Einsatz von Biologika mit antientzündlicher Wirkung hat die Therapieoptionen für RA-Patienten erheblich verbessert. Durch Variation dieses Ansatzes sollte die Wirksamkeit weiter verbessert werden, indem sowohl eine veränderte Methode der Therapiegabe angewandt als auch verschiedene therapeutische Moleküle in Kombination verabreicht wurden. Der adoptive zelluläre Gentransfer (*adoptive cellular gene transfer*, ACGT) ist ein experimentelles Verfahren, welches genetisch modifizierte Zellen zum Transport therapeutisch wirksamer Gene an den Krankheitsherd und zur lokalen Expression dieser Gene einsetzt. Unreife dendritische Zellen (*immature dendritic cells*, iDC) sind hochmobile, den Organismus patrouillierende Zellen, die positiv chemotaktisch auf in Entzündungsgebieten ausgeschüttete Chemokine reagieren. Daher wurden iDC als Vehikelzellen eingesetzt, um die Gene für ein modifiziertes anti-TNF α -Antikörpermolekül (*anti-TNF-single chain variable fragment*, anti-TNF-scFv), die p40-Untereinheit von Interleukin-12 (IL-12 p40) und Galectin-1 (Gal-1) in entzündete Gelenke zu transportieren und lokal zu exprimieren. Die anti-inflammatorische Wirkung dieser Genprodukte sollte das Fortschreiten der Krankheit im Mausmodell der Kollagen-induzierten Arthritis (*collagen-induced arthritis*, CIA) lindern bzw. zur Remission führen. Beim Auftreten erster Symptome nach Induktion der CIA wurde die Therapie in Form einer Injektion der genetisch modifizierten iDC als Mono-, Zweifach- oder Dreifachkombination verabreicht. Verglichen mit den Monotherapien wurde eine schützende Wirkung der Kombinationstherapien in Bezug auf die Gelenkzerstörung beobachtet, die in hohem Maße von den kombinierten Genen abhängig war. Insgesamt zeigte die hier untersuchte Variante des ACGT als Therapie nur geringe Wirksamkeit. Die Auswertung der Daten und der Vergleich mit methodisch ähnlich gelagerten publizierten Arbeiten legt eine zu geringe Dosis der therapeutischen Genprodukte als Erklärung der niedrigen Wirksamkeit nahe.

Summary

Rheumatoid arthritis is characterized by chronic inflammation of the synovium leading to progressive joint destruction and impaired mobility. The use of biological agents with anti-inflammatory properties has improved rheumatoid arthritis therapy significantly. This project aimed to improve this approach by changing the method of drug administration and combining different molecules into a concerted therapy. Genetically modified bone marrow derived dendritic cells were used as

vehicle cells for the *in vivo* delivery and production of therapeutic proteins, a method referred to as adoptive cellular gene therapy. Immature dendritic cells (iDC) are highly mobile cells that patrol the body and have the ability to migrate to sites of inflammation following a chemokine gradient. Therefore, iDC were used in this project to locally deliver an anti-TNF-single chain variable fragment, the p40 subunit of IL-12 and Galectin-1 (Gal-1) to inflamed joints for the purpose of relieving collagen-induced arthritis (CIA) and ideally inducing complete remission. Therapy was administered as monotherapy or as a combination of two or three treatments after manifestation of the first clinical symptoms of disease. In comparison to the different monotherapies, combination therapy - depending on the combination of genes - resulted in an improved protection against joint destruction. However, the overall therapeutic efficacy was low. Analysis of the data and a comparison with the data from published studies on cellular gene therapy in arthritis suggest that the low efficacy could be due to a failure to deliver an effective dose of therapeutic protein by the method chosen for this study.

1. Einleitung

1.1 Die Rheumatoide Arthritis

1.1.1 Medizinische und ökonomische Bedeutung der RA

Die RA ist die häufigste entzündliche Gelenkerkrankung und eine der häufigsten Autoimmunerkrankungen. Sie betrifft etwa 0,2 bis 1% der Bevölkerung weltweit. Der Anteil der Frauen unter den Erkrankten übertrifft den der Männer um etwa das 3fache und der Häufigkeitsgipfel liegt zwischen dem 35. und 45. Lebensjahr (Gabriel *et al.*, 1999; Camona *et al.*, 2002; Zeng *et al.*, 2008).

Die RA kann bereits in der Kindheit und Adoleszenz ausbrechen und auch erstmals in höherem Alter auftreten. Die Erkrankung führt zu schweren Beeinträchtigungen der Lebensqualität (Chorus *et al.*, 2003; Eaton *et al.*, 2006). Ferner liegt die Lebenserwartung von RA-Patienten unter dem Durchschnitt der Gesamtbevölkerung. Die Ursache dafür liegt zum Teil in der Beteiligung innerer Organe bei schweren systemischen Verlaufsformen, ist zum Teil aber auch eine Folge der therapeutischen Immunmodulation (Curtis *et al.*, 2007; Kaplan 2006; Baecklund *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 1996; Wolfe *et al.*, 1994).

Die allgemeine Erhöhung der Lebenserwartung in der Bevölkerung lässt eine Steigerung in der Zahl der Arthritisfälle und in der Krankheitsdauer erwarten. Die mit der Krankheit verbundene Einschränkung der Mobilität und damit der Produktivität stellt eine erhebliche sozioökonomische Belastung dar (Albers *et al.*, 1999; Lajas *et al.*, 2003). Bisher angewandte Therapien führen oft nicht zu einer vollständigen Remission. Die durch die chronische Natur der Krankheit erforderlichen Langzeit-Therapien bergen für die Patienten das Risiko ernster Nebenwirkungen und verursachen hohe Kosten für das Gesundheitssystem (Yelin *et al.*, 2007; Ruolf *et al.*, 2003). Effektivere Therapien für die RA sind daher von großem Interesse, um die Prognose der Erkrankung nachhaltig zu verbessern, die Erwerbsfähigkeit zu erhalten, sowie langfristig die Therapiekosten zu senken.

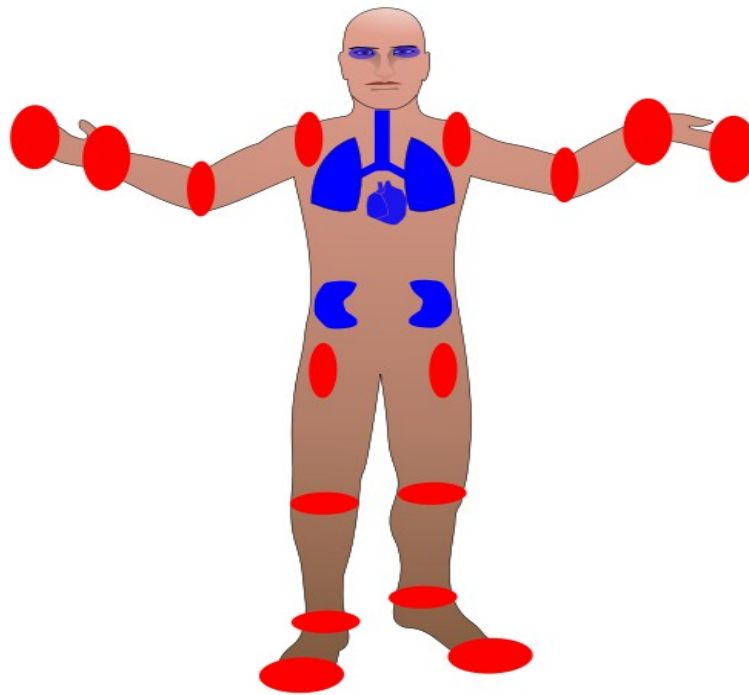


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der von der rheumatoiden Arthritis hauptsächlich betroffenen Gelenke und Organe. Die RA tritt meistens in symmetrischer Weise auf und breitet sich mit fortschreitender Krankheitsdauer auf zahlreiche Gelenke aus. Die am häufigsten betroffenen Gelenkregionen sind rot markiert. Typisch ist ein Befall der kleinen Gelenke der Hände und Füße. In schweren Fällen systemischer Entzündung können auch innere Organe betroffen sein, in erster Linie Augen, Herz, Lunge, Nieren (blau), Gefäßsystem (Vaskulitis) und Nervensystem.

1.1.2 Ätiologie und Pathogenese der RA

Die RA ist eine Autoimmunerkrankung, die durch eine entzündliche Aktivierung und immunvermittelte Schädigung des synovialen Gelenkgewebes gekennzeichnet ist. Von der RA betroffene Gelenke sind chronisch oder phasenweise entzündet. Die mit der Entzündung verbundenen Effekte wie Einwanderung zahlreicher Immunzellen in das Gelenk, veränderte lokale Zytokinexpression und abnormale Zellaktivierung sind wesentliche Elemente in der weiteren Krankheitsentwicklung. Die Krankheit breitet sich im Verlauf meistens symmetrisch auf weitere Gelenke aus. Der autoimmune Entzündungsprozeß führt zu einer Zerstörung der Integrität und damit der Funktionsfähigkeit der Gelenke durch Erosion des Gelenkknorpels und des juxtaartikulären Knochens. Als rheumatische Systemerkrankung betrifft die RA in einem Teil der Fälle auch die inneren Organe und ist daher mit erhöhten Sterblichkeitsraten verbunden (Buch und Emery, 2002).

Die Ursache der RA ist bislang nicht vollständig geklärt. Gegenwärtig wird von einer genetischen

Prädisposition der Patienten ausgegangen, die unter dem Einfluss eines oder mehrerer Umweltfaktoren in die Entwicklung einer persistierenden Entzündung der Gelenke mündet (Barton *et al.*, 2008; Pedersen *et al.*, 2007; Klareskog *et al.*, 2006; Mitterski *et al.*, 1994).

Die genetische Basis der Krankheit wurde auf Grund der statistischen Häufung der RA bei bestimmten Populationen (Hirsch *et al.*, 1998) und Familien (Alarcon-Segovia *et al.*, 2005), sowie anhand der Ergebnisse von Zwillingsstudien postuliert (Bellamy *et al.*, 1992; Silman und Pearson, 2002). Das durch die wissenschaftliche Entwicklung ermöglichte Genscreening betroffener Populationen führte zur Identifikation einer Reihe von in der RA differenziert regulierter Gene. Für einen Teil dieser Gene konnte ein signifikanter Einfluss auf die Entwicklung und Schwere der Krankheit nachgewiesen werden. Die stärkste bisher gefundene Korrelation besteht mit Elementen der humanen Leukozyten-Antigen (HLA) Genfamilie, im Besonderen mit Allelen des HLA-DRB1-Gens, die eine bestimmte Aminosäuresequenz kodieren. Dieser Zusammenhang wird als „shared epitope“ Hypothese bezeichnet (Barnetsche *et al.*, 2008). Andere Kandidatengene weisen einen weniger deutlichen Zusammenhang mit der Krankheitsentwicklung auf. Die bisherigen Ergebnisse sind ein starker Hinweis auf eine polygenetische Grundlage der Prädisposition zur RA (van der Pouw Kraan TC *et al.*, 2003). Erkenntnisse über den Zusammenhang zwischen einem spezifischen genetischen Hintergrund und der Ausprägung der Krankheit stehen noch am Anfang. Die Bandbreite an Symptomen und Schweregraden der RA sowie die Bandbreite der Reaktionen auf Medikamente bei verschiedenen Patienten scheint ebenfalls zum Teil auf dem genetischen Hintergrund zu beruhen (Symmons, 2005).

Als auslösende und verstärkende Faktoren der RA werden bakterielle oder virale Infektionen, Gelenkverletzungen, *molecular mimicry* und bestimmte Lebensgewohnheiten wie Rauchen und Übergewicht diskutiert (Symmons *et al.*, 1997; Edwards und Cooper, 2006). Auch hormonelle Einflüsse scheinen eine Rolle bei der RA zu spielen, wie ein höherer Anteil an Frauen unter den Erkrankten, eine in vielen Fällen zu beobachtende Remission der RA in der Schwangerschaft und eine Angleichung der Neuerkrankungen von Männern und Frauen im höheren Alter zeigen (Forslind *et al.*, 2007; Tengstrand *et al.*, 2004; Hazes, 1991). Die wichtigsten Umweltfaktoren, für die eine pathogenetische Rolle angenommen wird, sollen mit ihren Wirkmechanismen hier kurz angesprochen werden.

Als ein wichtiger ätiologischer Faktor werden häufig Infektionen diskutiert. Vor allem das Epstein-Barr-Virus (EBV) wird dabei immer wieder in Betracht gezogen, da bei einem Teil der RA-Patienten abgelaufene oder frische Infektionen mit EBV und anderen Viren nachgewiesen werden konnten (Mehraein *et al.*, 2004; Murai *et al.*, 1999). Auch verschiedene Bakterien und

Mycoplasmen werden als verantwortliche infektiöse Agenzien vermutet (Ebringer *et al.*, 2006; Zentilin *et al.*, 2002; van der Heiden *et al.*, 2000).

Der angenommene Wirkmechanismus eines physischen Traumas als auslösender Faktor der RA postuliert eine durch Abnutzung bzw. Verletzung des Gelenks vermittelte Freisetzung von Matrixbestandteilen, die normalerweise nicht für das Immunsystem frei zugänglich vorliegen. Diese Matrixbestandteile werden vom Immunsystem irrtümlich als fremd erkannt und somit eine Immunreaktion ausgelöst (Al-Allaf *et al.*, 2001; Neidhart *et al.*, 2000).

Die Theorie des *molecular mimicry* in der Pathogenese der RA ist eng mit der Infektionstheorie verbunden und postuliert, dass gegen Moleküle des menschlichen Organismus, die mit Molekülen pathogener Organismen sequenzverwandt sind, eine Immunreaktion ausgelöst wird. Speziell die *heat shock proteins* (HSP) wurden in diesem Zusammenhang näher untersucht. Einige humane HSPs sind hochgradig sequenzhomolog zu Proteinen von *Mycoplasma tuberculosis* oder Proteinen des EBV. Dementsprechend könnten HSP-reaktive T-Zellen und Antikörper eine fehlgeleitete Immunreaktion auslösen (Ramirez *et al.*, 2005; Massa *et al.*, 2002).

Bisher ist es nicht gelungen, die dargestellten Theorien schlüssig auf die Gesamtheit der Patienten anzuwenden. Die somit weiterhin ungeklärte Ätiologie macht eine kausale Therapie schwierig. Die bisher verfügbaren RA-Therapien sind daher symptombezogen und auf diejenigen entzündlichen Prozesse gerichtet, die bis dato als relevant für die Pathogenese identifiziert werden konnten.

Erste äußere Zeichen der RA sind Schmerz und Schwellung der Gelenke. Dies ist das Ergebnis der Immunaktivität im Synovium, die durch beginnende Hyperplasie der Synovialzellen, verstärkte Gefäßneubildung und Einwanderung von Immunzellen charakterisiert ist.

Die wichtigsten gebildeten Zytokine dieser Phase sind TNF α , IL-1, Interferon γ (IFN γ), IL-2 und IL-6. Diese Zytokine dienen der Rekrutierung und Aktivierung von Immunzellen sowie der Stimulation der Zytokin- und Chemokinproduktion. Die Zahl von T-Zellen, B-Zellen, Natürlichen Killerzellen (NK), Makrophagen, DC und Mastzellen im Synovium steigt stark an. Einwandernde CD4⁺ T-Zellen werden aktiviert und die Entwicklung eines Th1 Phänotyps induziert. Die Aktivierung von CD4⁺ Zellen wird durch IL-2 angeregt und die spezifische Entwicklungsrichtung durch weitere Zytokine beeinflusst.

Für T-Helferzellen (Th) sind verschiedene, durch das Zytokin-Expressionsmuster definierte Entwicklungsrichtungen beschrieben. Th1-Zellen vermitteln eine zytotoxische, T-Zell-basierte inflammatorische Immunreaktion. Th2-Zellen vermitteln eine humorale, B-Zell basierte

Immunreaktion. Das lokale Umfeld der Zytokinexpression im arthritischen Gelenk mit hohen Spiegeln von IFN γ und IL-12 begünstigt eine Th1-Entwicklung der einwandernden T-Helfer-Zellen. Diese Th1-Zellen gelten als eines der treibende Elemente in einem Regulationsnetz, welches für die chronische Entzündung und die daraus resultierende Zerstörung des Gelenks verantwortlich ist (Müller-Ladner *et al.*, 2005). Die wichtigsten zellulären Bestandteile dieses Netzwerkes sollen kurz erwähnt werden.

T-Zellen spielen eine wichtige regulierende Rolle in der Pathogenese. Die im arthritischen Gelenk vorhandenen Subpopulationen an T-Zellen tragen durch ihr Zytokinprofil und die von ihnen vermittelten Zell-Zell-Interaktionen zu einer Chronifizierung der Entzündung bei. So spielen T-Zellen eine Rolle in der Aktivierung von Makrophagen und regen deren Zytokinexpression an. Obwohl der Hauptteil der im rheumatischen Gelenk gefundenen Zytokine von anderen Zelltypen produziert wird, haben die T-Zellen auf diese Weise einen wichtigen Anteil an der Pathogenese der RA. Das schubartige Wiederauftreten der Arthritis nach einer zeitweiligen Remission, wie es für die humane RA typisch ist, beruht möglicherweise auf der Aktivität von T-Gedächtniszellen (Miossec, 2008).

B-Zellen sind die Quelle autoreaktiver Antikörper in der RA. Das Auftreten dieser Antikörper vor den klinischen Symptomen unterstreicht die wichtige Rolle dieser Zellen für die Progression der Krankheit. Im rheumatischen Gelenk fungieren B-Zellen als Zytokinproduzenten und sind neben den T-Zellen am Aufbau tertiärer lymphatischer Strukturen im Synovium beteiligt, die bei einem Teil der RA-Patienten beobachtet werden können. Es wird vermutet, dass diese Strukturen an der Aufrechterhaltung der chronischen Entzündung beteiligt sind. B-Gedächtniszellen sind möglicherweise am Wiederaufflammen der RA nach einer Remission beteiligt (Edwards und Cambridge, 2006).

Monozyten/Makrophagen gehören neben den synovialen Fibroblasten zu den wichtigsten Quellen proinflammatorischer Zytokine im rheumatischen Gelenk. Sie sind wesentlich am Knochenabbau beteiligt. Monozyten können sich unter dem Einfluss des Botenstoffs RANKL (receptor activator of nuclear factor kappa B ligand) zu Osteoklasten entwickeln. Die makrophagenartigen Zellen der Synovialmembran scheinen im Verlauf der RA eine Resistenz gegen Apoptose auszubilden (Kinne *et al.*, 2007).

Synoviale Fibroblasten (RASf) sind ein zentraler Faktor für die RA-Progression. Sie produzieren einen wesentlichen Teil der im rheumatischen Gelenk gefundenen Zytokine. Im Verlauf der RA wird die Proliferation der RASf erheblich angeregt, während die Induzierbarkeit von Apoptose

wesentlich zurückgeht. Dies führt zur Bildung des verdickten, aktivierten Synoviums, des sogenannten Pannus. Der stoffwechselaktive Pannus entwickelt ein die Krankheitsprogression begünstigendes hypoxisches Lokalmilieu und wächst zerstörend in den Knorpel und juxtaartikulären Knochen ein. Die RASF produzieren dazu große Mengen an Matrix abbauenden Enzymen. Jüngste Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe haben als einen Mechanismus der Ausbreitung der RA auf weitere Gelenke die Migration von RASF über das Blutgefäßsystem nachgewiesen (Lefevre *et al.*, 2009, Neumann *et al.*, 2004).

Die einzelnen Elemente des hier skizzierten Regulationsnetzwerkes sind über komplexe Mechanismen miteinander verbunden. Die wechselseitigen Einflüsse und die große Zahl der beteiligten Moleküle erschweren jedoch ein vollständiges Verständnis der kausalen und temporären Zusammenhänge.

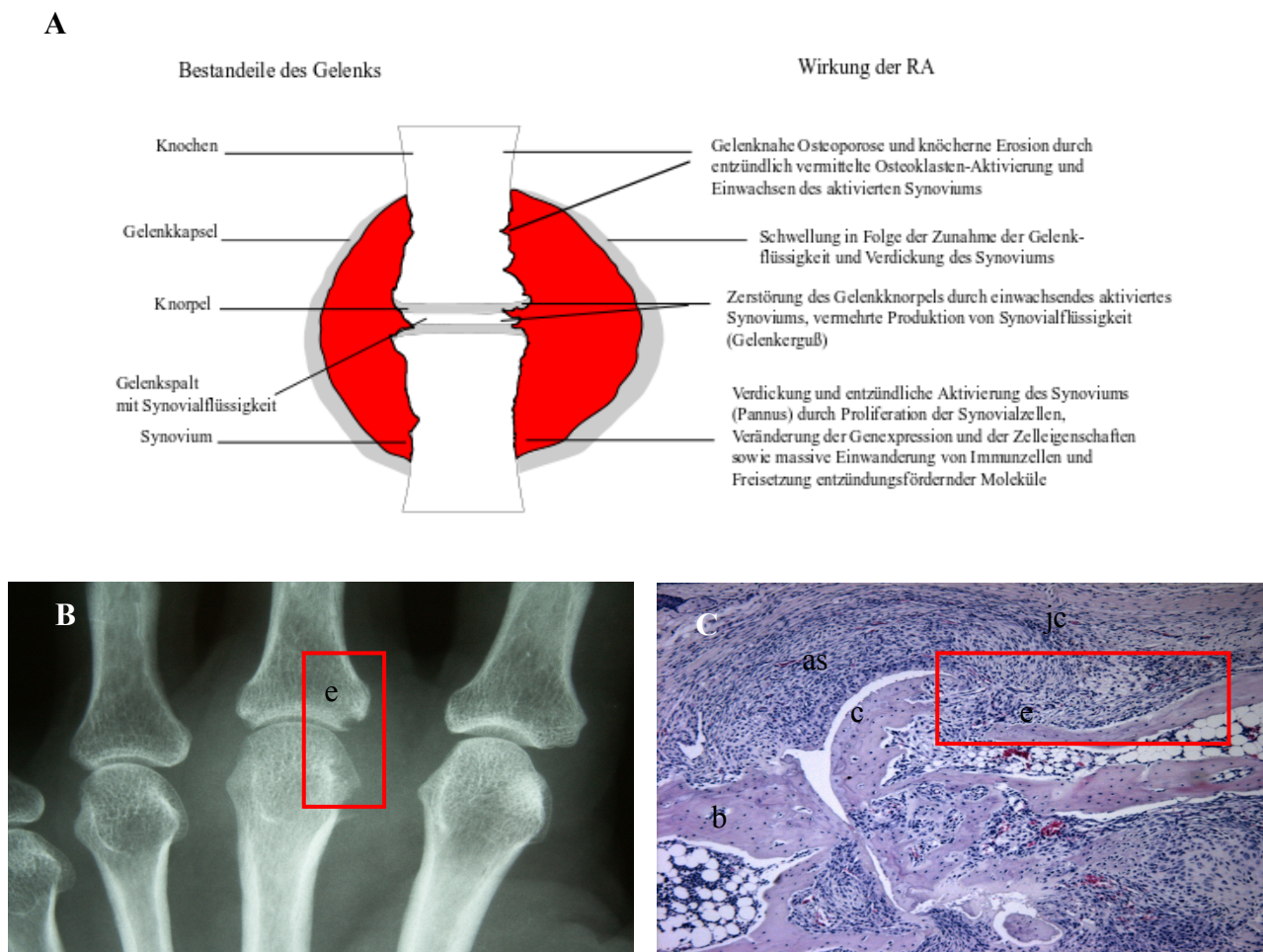


Abbildung 1.2: Darstellung der artikulären Zerstörung im rheumatoiden Gelenk. **(A)** Schematische Darstellung eines arthritischen Gelenks und der durch die RA bewirkten lokalen Effekte. **(B)** Knorpelerosion (e) durch aktiviertes Synovium in der radiologischen Darstellung. **(C)** Hämatoxylin/Eosin-Färbung eines Gewebeschnitts aus einem arthritischen Gelenk. Das aktivierte Synovium (as) wächst in Knorpel (c) und Knochen (b) ein, wodurch größere Erosionszonen (e - rote Rahmen) entstehen.

1.1.3 Therapie der RA

Da die Ätiologie der RA, wie oben dargestellt, nicht vollständig geklärt ist und die RA damit nicht kausal behandelt werden kann, zielt die gegenwärtige Therapie auf eine symptomatische Linderung des Entzündungsprozesses und auf eine Verhinderung der Progression ab. Die verwendeten Medikamente unterdrücken oder modifizieren auf verschiedene Weise die pathogenen Autoimmunprozesse, wodurch der Aufbau und die Erhaltung des destruktiven Regulationsnetzwerkes im rheumatischen Gelenk gestört werden. Die eingesetzten Medikamente umfassen Analgetika, nichtsteroidale Antiphlogistika, Corticosteroide und Basistherapeutika einschließlich der seit 2000 eingesetzten Biologika.

Analgetika einschließlich der Opiate sind den Krankheitsverlauf nicht direkt beeinflussende Medikamente, welche jedoch im Bedarfsfall zur Schmerzlinderung verabreicht werden.

Nichtsteroidale Antiphlogistika (*nonsteroidal anti-inflammatory drugs*, NSAID) lindern neben den Schmerzen zu einem gewissen Grad auch die Entzündungsaktivität im Gelenk. Die Wirkungen treten schnell ein, sind jedoch nicht anhaltend und zur Therapie der systemischen Entzündungsaktivität unzureichend. Die NSAID erzielen ihre Wirkung über die Hemmung des Enzyms Cyclooxygenase 2 (COX2). Es gibt spezifische COX2-Hemmer und Medikamente, die sowohl COX1 als auch COX2 hemmen. Die Hemmung von COX1 ist jedoch für die antiphlogistische Wirkung als RA-Medikament nicht notwendig. Die bedeutsamsten Nebenwirkungen der NSAID, eine Schädigung der Magenschleimhaut und der Nieren, werden durch unspezifische COX1-Hemmung verstärkt. (Rao und Knaus, 2008).

Corticosteroide sind synthetische Varianten der Steroidhormone und effektive Entzündungshemmer. Häufig verwendete Präparate sind Prednisolon, Methylprednisolon und Triamcinolon. Sie werden bei hoher Krankheitsaktivität verabreicht, da sie eine rasch einsetzende, potente Entzündungshemmung bewirken. Die Wirkung der Corticosteroide ist durch ihren Eingriff in den normalen Hormonhaushalt und die Immunabwehr bei langfristiger Anwendung dosisabhängig mit ernsthaften Nebenwirkungen wie erhöhtem Infektionsrisiko, Diabetes, hohem Blutdruck, Gewichtszunahme und Osteoporose verbunden (Hillier, 2007).

Basistherapeutika (*disease modifying antirheumatic drugs*, DMARD) sind Medikamente, die den Entzündungsgrad in arthritischen Gelenken nachhaltig lindern und damit die destruktiven Prozesse aufhalten. Auch die systemische Entzündungsaktivität wird reduziert. DMARD benötigen in der

Regel mehrere Wochen, bis ihre Wirkung eintritt, sind aber langfristig wirksam. Beispiele sind Methotrexat, Leflunomid und Sulfasalazin. In der RA Therapie stellen die DMARD die zentrale Grundlage der Therapie dar und werden nach Bedarf in einem multimodalen Behandlungskonzept mit anderen Medikamenten und physikalischen Maßnahmen kombiniert. Methotrexat stellt momentan den Goldstandard der Basistherapie dar (Donahue *et al.*, 2008).

Biologika stellen die jüngste Entwicklung der Therapieforschung dar. Es handelt sich dabei um Varianten natürlicher Proteine wie Zytokine, Rezeptoren oder Antikörper. Die meisten Biologika greifen in die zytokinvermittelte Regulation des Immunsystems ein. Sie sind die derzeit effektivsten Mittel zur Verhinderung von Gelenkschäden. Die relativ aufwendige Entwicklung und Herstellung macht sie auch zu den kostenintensivsten Medikamenten. Bisher sind die TNF-Blocker Infliximab, Etanercept, Adalimumab, Golimumab, Certolizumab pegol, der IL-1-Blocker Anakinra und der IL-6-Blocker Tocilizumab für die klinische Anwendung zugelassen (Chen *et al.*, 2006; Fleischmann *et al.*, 2006). Andere Konzepte sind die Costimulationshemmung mit Abatacept und die B-Zell Depletion mittels Rituximab. Die Gabe von Biologika kann zu verschiedenen Nebenwirkungen führen. Eine größere Zahl von Patienten reagiert auf die Medikamentengabe mit leichter Entzündung und Schmerzen an der Injektionsstelle. Spezielle Risiken sind eine erhöhte Gefahr opportunistischer Infektionen sowie bei Therapie mit TNF-Blockern die Reaktivierung einer latenten Tuberkulose. Vereinzelt können auch kardiovaskuläre Nebenwirkungen oder Anämie auftreten. Darüberhinaus wird eine mögliche Begünstigung bösartiger Neubildungen weiterhin kontrovers diskutiert (Furst *et al.*, 2006).

Die ursprüngliche Philosophie der Medikamentengabe war die eskalierende Therapie, in der mit weniger aggressiven Medikamenten und niedrigen Dosierungen begonnen wurde und entsprechend der Progression der Krankheit eine Therapieintensivierung vorgenommen wurde. Auf diese Weise sollten die Nebenwirkungen minimiert werden. In jüngerer Zeit wird eine aggressivere Therapie bei neu diagnostizierter RA vorgezogen, in der schon früh höhere Dosierungen und Kombinationstherapien verabreicht werden. Dies führt zu deutlich verbesserten Langzeitprognosen, was mit hoher Wahrscheinlichkeit auf der frühen und aggressiven Unterdrückung der systemischen und lokalen Entzündungsprozesse beruht (Saag *et al.*, 2008; Smolen und Steiner, 2003; Redlich *et al.*, 2003).

Trotz der großen Fortschritte in der Therapie und neu verfügbaren Medikamenten stellt die RA weiterhin eine große therapeutische Herausforderung dar. Die verwendeten Medikamente haben oft signifikante Nebenwirkungen und nur begrenzte Wirksamkeit. Auch auf die neuen Biologika spricht

ein Teil der Patienten nicht an. Eine vollständige Remission der RA, d.h. eine vollständige Rückbildung der klinischen Symptome, wird zwar verschiedentlich erreicht, bleibt jedoch häufig nicht langfristig erhalten. Eine langfristige Medikation ist bisher unverzichtbar, ein Absetzen der Medikamente kann zu einem erneuten Krankheitsschub führen. Durch die Langzeitgabe steigt die Inzidenz von Nebenwirkungen. Entsprechend müssen neue molekulare Ziele und Methoden zur Verabreichung der Therapeutika gefunden werden, um die Effizienz und Verträglichkeit der Therapie zu erhöhen.

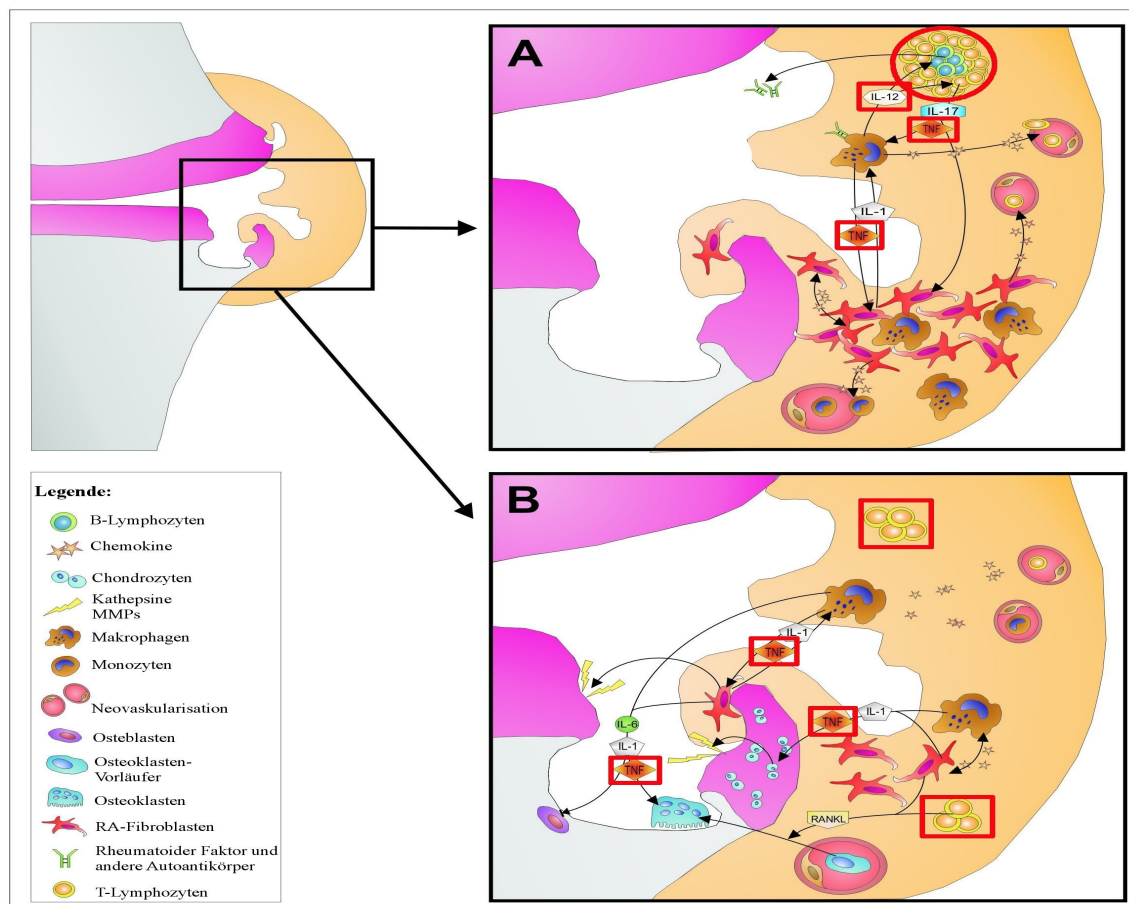


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der zellulären und molekularen Prozesse im rheumatischen Gelenk (modifiziert nach Tarner). (A) Die Entzündungsreaktion im synovialen Gewebe führt zu einem veränderten Expressions- und Proliferationsverhalten der Zellen, der Rekrutierung und Aktivierung von Immunzellen, sowie verstärkter Neovaskularisation. Die zellulären Elemente dieses Prozesses sind über ein komplexes Regulationsnetz miteinander verbunden, über welches die RA aufrechterhalten und vorangetrieben wird. (B) Im fortgeschrittenen Stadium der RA werden der Gelenkknorpel und der darunter liegende Knochen und Knorpel angegriffen, und schrittweise zerstört. Damit geht die Struktur und Funktion der betroffenen Gelenke zunehmend verloren. In der vorliegenden Arbeit sollten molekulare und zelluläre Schlüsselmechanismen dieses Prozesses (markiert durch rote Rahmen) gehemmt und so die Arthritis behandelt werden. Ein modifiziertes anti-TNF Antikörpermolekül (anti-TNF-scFv) und die Zytokin-Untereinheit IL-12p40 sollten die Wirkung der Zytokine TNF α und IL-12 vermindern. Zudem sollte durch das Protein Galectin-1 eine vermehrte Apoptose aktivierter T-Zellen ausgelöst werden.

1.2 Ansatz und Ziele dieser Arbeit

1.2.1 Der adoptive zelluläre Gentransfer

Das Prinzip des ACGT wurde maßgeblich im Labor von Prof. Fathman an der Stanford Universität entwickelt. Der ACGT ist eine Methode der lokalen Gentherapie mit Hilfe gezielt *in vivo* migrierender „Vehikelzellen“. Diese Vehikelzellen werden *ex vivo* mit einer das therapeutisch wirksame Produkt kodierenden DNA-Sequenz beladen und dem Empfänger durch Injektion verabreicht. Im Empfängerorganismus sollen die Zellen eigenständig in entzündete Gewebe einwandern, dort akkumulieren und das therapeutisch wirksame Produkt produzieren (Slavin *et al.*, 2002).

Der ACGT bietet die Möglichkeit, verschiedene Sicherheitsprobleme und technische Schwierigkeiten anderer Gentherapieverfahren zu vermeiden. Eines der wichtigsten technischen Probleme in der Gentherapie ist eine effiziente und kontrollierbare Lieferung der rekombinanten DNA an den Zielort. Die direkte Gabe freier DNA oder viraler Vektoren an den Empfänger kann durch unkontrollierte Einlagerung in das Genom des Empfängerorganismus oder durch Wechselwirkung mit Elementen des Genoms zu einer krankhaften Veränderung der Zellen führen. Die Immunreaktion des Empfängers auf den verwendeten Vektor kann ebenfalls Probleme verursachen. Zudem gibt es keine verlässliche Möglichkeit zur Kontrolle einer erfolgreichen genetischen Modifikation der Zielzellen (Tarner *et al.*, 2004).

Die im ACGT verwendeten, *ex vivo* modifizierten Zellen können in der Kultur mit Hilfe geeigneter Marker auf erfolgreichen Gentransfer, auf das Maß der Genexpression und auf krankhafte Veränderungen untersucht werden, bevor sie dem Empfänger verabreicht werden. Dadurch wird ein höheres Maß an Kontrolle erreicht. Die Migration der Zellen in entzündete Gewebe führt zu einer lokalisierten Expression und Abgabe der kodierten therapeutischen Proteine, wodurch systemische Nebenwirkungen potentiell vermindert werden. Die Möglichkeit zur Verwendung körpereigener Zellen des Empfängers, d.h. Zellen, die dem Empfänger zuvor entnommen, gentechnisch verändert und anschließend wieder verabreicht werden, umgeht immunologische Kompatibilitätsprobleme (Tarner *et al.*, 2006).

Die wesentlichen Schwierigkeiten bei der Anwendung des ACGT liegen in der Verfügbarkeit geeigneter Zellen und dem technischen Aufwand der Methode. Die experimentelle Anwendung dieser Methode setzt ein voll ausgestattetes Zellkulturlabor voraus, die klinische Anwendung ein

GCP (*good clinical practice*) zertifiziertes Reinraumlabor. Für den ACGT geeignete Zellen müssen verschiedene Eigenschaften vereinen. Dazu gehören eine Kultivierbarkeit *in vitro*, eine effiziente Transduzierbarkeit, keine oder begrenzte Vermehrungsfähigkeit, Mobilität im Empfängerorganismus und die Fähigkeit zur zielgerichteten Migration und Akkumulation (*homing*).

Die Zellen des Immunsystems sind nach diesen Kriterien als Vehikelzellen geeignet. Sie sind mobil und wandern typischerweise in Entzündungsherde ein. Des weiteren existieren für zahlreiche Zellen des Immunsystems etablierte Kulturmethoden.

Der ACGT ist bereits in verschiedenen Modellsystemen von Autoimmunkrankheiten zur Anwendung gekommen, u. a. in der Kollagen-induzierten Arthritis (*collagen-induced arthritis*, CIA) (Nakajima *et al.*, 2003; Tarner *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2001 und 2002; Morita *et al.*, 2001), in der experimentellen autoimmunen Encephalomyelitis (Costa *et al.*, 2001) und in dem Diabetesmodell der *non-obese diabetic* (NOD) *mice* (Creusot *et al.*, 2008).

1.2.2 Experimentelle Grundlagen und Ansatz dieser Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte der ACGT im Modell der CIA angewendet werden. Murine dendritische Zellen (DC) wurden als Vehikelzellen verwendet, um therapeutisch wirksame Gene in entzündete Gelenke zu transportieren und dort zu exprimieren. Der grundsätzliche Ansatz entspricht der etablierten Therapie mit Biologika, indem biologische oder quasibiologische Moleküle eingesetzt werden, um in die Regulationsvorgänge der autoimmunen Entzündung einzugreifen. Durch die Verabreichung der Therapie mittels *ex vivo* transduzierter Vehikelzellen sollte eine bedarfsgerechte lokale und anhaltende Wirkung erreicht werden, im Gegensatz zu der systemischen Wirkung und Notwendigkeit einer wiederholten Verabreichung bei den Biologika. Zudem sollte die Kombination verschiedener therapeutischer Moleküle die Effektivität des ACGT erhöhen.

Diese Arbeit baut auf früheren Experimenten der Arbeitsgruppe auf, bei denen T-Zell Hybridome als Vehikelzellen im Mausmodell der CIA eingesetzt wurden (Smith *et al.*, 2003; Tarner *et al.* 2002; Nakajima *et al.*, 2001). Die CIA besitzt große klinische und histologische Ähnlichkeit zur humanen RA und gilt als Standardmodell in der RA-Forschung. Die CIA wird durch Immunisierung eines genetisch suszeptiblen Mausstammes mit artfremdem Kollagen und gleichzeitiger unspezifischer Stimulation des Immunsystems ausgelöst. Dadurch wird eine progrediente Gelenkentzündung mit deutlich sichtbarer Schwellung der Pfoten induziert, die mit Pannusbildung verbunden ist und zur Zerstörung der Gelenke führt.

In den früheren Experimenten wurden T-Zell Hybridome retroviral transduziert, um ein Anti-TNF α -Einzelkettenfragment (*single-chain variable fragment*, scFv) und die Zytokinuntereinheit IL-12p40 zu exprimieren. Von beiden Molekülen ist eine immunmodulierende Wirkung zu erwarten. Die Zellen wurden den Versuchstieren nach dem Auftreten der ersten Symptomen intravenös (*i.v.*) verabreicht. Mittels Biolumineszenz-Bildgebung und molekularbiologischer Methoden konnte eine Akkumulation der Vehikelzellen in den Pfoten und in der Milz gezeigt werden. Der T-Zell Hybridom-basierte ACGT erbrachte eine Linderung des Krankheitsverlaufs und eine erhöhte Wirksamkeit bei kombinierter Gabe beider Gene. Auf Grund ihres kanzerogenen Potentials sind die T-Zell-Hybridome jedoch nur für die basiswissenschaftliche Anwendung als Vehikelzellen geeignet (Nakajima *et al.*, 2001, Tarner *et al.*, 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurden daher dendritische Zellen als Vehikelzellen untersucht. Unreife dendritische Zellen (iDC) patrouillieren den Organismus und phagozytieren Proteinmaterial, welches nach Ausreifen der DC zur Auslösung einer Immunantwort präsentiert wird. Im nichtaktivierten Zustand sind die iDC sehr mobil und reagieren positiv chemotaktisch auf in Entzündungsgebieten ausgeschüttete Chemokine. Für die RA wurde eine Akkumulation und längere Verweildauer von iDC in entzündeten Gelenken beschrieben. Zudem sind die iDC nicht teilungsfähig. Diese Eigenschaften lassen sie als Vehikelzellen geeignet erscheinen (Jongbloed *et al.*, 2006; Lutzky *et al.*, 2007).

Die Wirksamkeit der bisherigen Basistherapeutika ist bei einer Anwendung als Monotherapie nur begrenzt. Eine Kombination verschiedener Therapeutika ist aufgrund der oben dargestellten komplexen autoimmunen Entzündungsmechanismen deutlich besser wirksam. Dementsprechend wurde in der vorliegenden Arbeit zwecks Verbesserung der Effektivität eine Kombinations-Gentherapie untersucht.

Für die Experimente wurden drei Genprodukte gewählt, für die eine antientzündliche Wirkung zu erwarten ist, und zwar ein anti-TNF α scFv, IL-12p40 und Galectin 1.

Das **anti-TNF α scFv** ist eine proteinbindende strukturelle Untereinheit eines gegen TNF α gerichteten Antikörpers. TNF α ist ein proinflammatorisches Zytokin, das in der Pathogenese der RA eine wichtige Rolle spielt. Das scFv entspricht in seiner molekularen Wirkung den etablierten anti-TNF α Antikörpern, ist jedoch als deutlich kleineres Molekül für die Anwendung in der Gentherapie besser geeignet, da die entsprechende Gensequenz die Kapazität des verwendeten Vektors nicht

überschreitet (Elliott *et al.*, 1993; Smith *et al.*, 2003).

IL-12 p40 ist eine Untereinheit des proentzündlichen Zytokins IL-12, das einen von der TNF α -Aktivität unabhängigen Mechanismus der Entzündung vermittelt. Dieses Zytokin besteht als Heterodimer aus zwei Untereinheiten, IL-12p40 und IL-12p35. Die rezeptorbindende Untereinheit des Zytokins ist IL-12p40. Die Bindung von IL-12p40 als Monomer oder Homodimer an den Rezeptor führt nicht zur Auslösung eines spezifischen Signals. Somit resultiert die Überexpression von IL-12p40 in einer Hemmung der IL-12 Wirkung (Abdi, 2002).

Galectin-1 ist ein Mitglied der Galectin-Familie. Die Galectine sind eine Familie β -Galactosid-bindender Proteine, die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen vermitteln. Für die RA-Therapie ist die durch Galectin-1 vermittelte Induktion von Apoptose in aktivierten T-Zellen interessant. Ein therapeutischer Einsatz von Galectin-1 lässt daher eine entzündungshemmende Wirkung erwarten (Rabinovich *et al.*, 1999; Hernandez und Baum, 2002).

In den Experimenten der vorliegenden Arbeit wurden iDC aus dem Knochenmark von Spendertieren isoliert, mit einem der genannten drei therapeutischen Gene mittels eines lentiviralen Vektors transduziert und adoptiv in an CIA erkrankte Versuchstiere transferiert. Die Kombinations-Gentherapie wurde in Form gemischter Zellpopulationen verabreicht. Der Krankheitsverlauf dieser Tiere wurde über einen Zeitraum von 30 Tagen beobachtet. Danach wurden Pfoten und innere Organe entnommen, um den histologischen Zustand der Gelenke und das Expressionsniveau relevanter Moleküle auf RNA- und Proteinebene zu bestimmen.

1.2.3 Ziele dieser Arbeit

Durch die für diese Arbeit durchgeführten Experimente sollten die folgenden Fragen beantwortet werden:

1. Lässt sich der ACGT mit DC als Vehikelzellen als wirksames therapeutisches Konzept in der CIA etablieren?
 - 1.1 Sind die injizierten Zellen in den entzündeten Gelenken nachweisbar?
 - 1.2 Ist eine Linderung des klinischen Krankheitsverlaufs und der histologischen Schäden in den Therapiegruppen feststellbar?
 - 1.3 Welche Auswirkungen zeigen sich bei den molekularen Markern?

2. Kann die Therapieeffizienz durch die Kombination verschiedener Moleküle verbessert werden?
 - 2.1 Ist das Krankheitsbild in Therapiegruppen mit Zweifach- und Dreifachkombinationstherapie deutlicher vermindert? Lässt sich durch eine Dreifachkombination eine bessere Wirkung erzielen als mit den verschiedenen Zweifachkombinationen?
 - 2.2 Welche Auswirkungen zeigen sich histologisch und in der Expression relevanter Moleküle im Vergleich zwischen den einzelnen Therapievarianten?
3. Kann ein lokaler Effekt der Therapie auf molekularer Ebene nachgewiesen werden?
 - 3.1 Wie verhält sich die lokale Expression RA-relevanter Zytokine in den Gelenken im Verhältnis zur Expression dieser Zytokine in Organen des Immunsystems bei den verschiedenen Behandlungsgruppen?

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Biofuge pico Eppendorf-Zentrifuge (Heraeus, Hanau, Deutschland)

Biofuge Primo R Eppendorf-Zentrifuge (Heraeus, Hanau, Deutschland)

BioPhotometer (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland)

FACSCalibur Durchflußzytometer (BD Biosciences, San Jose, USA)

ELISA reader Sunrise (Tecan, Crailsheim, Deutschland)

Elektrophoresekammer (Werkstätte, Kerckhoff-Klinik, Deutschland)

GenAmp PCR System 9700 Thermocycler (Applied Biosystems Applera, Darmstadt, Deutschland)

Genelink Gel-Dokumentation (Syngene, Cambridge, Großbritannien)

Kryostat CM3050S (Leica, Wetzlar, Deutschland)

LC Carousel Centrifuge 2.0 (Roche, Mannheim, Deutschland)

Lightcycler 1.5 (Roche, Mannheim, Deutschland)

Mikroskop Leica DMIRB (Leica, Wetzlar, Deutschland)

MR 3001 heizbarer Magnetrührer (Heidolph, Schwabach, Deutschland)

Multifuge 3 S-R Zellkultur-Zentrifuge (Heraeus, Hanau, Deutschland)

Nanodrop ND 2000 Spektrophotometer (PEQLAB, Erlangen, Deutschland)

Palm MicroBeam Lasermikroskop (Carl Zeiss AG, Göttingen, Deutschland)

Schwingkugelmühle (Retsch, Haan, Deutschland)

Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer System (Bio-Rad, München, Deutschland)

Ultrazentrifuge (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland)

2.1.2 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von Axxora (Lörrach, Deutschland), Biomol (Hamburg, Deutschland), Fluka (Buchs, Schweiz), Merck (Darmstadt, Deutschland), Peprotech (Hamburg, Deutschland), Roche (Mannheim, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) bezogen. Zellkulturmedien wurden von PAA (Wien, Österreich), PAN (Aidenbach, Deutschland) und Cellgenix (Freiburg, Deutschland) bezogen.

2.1.2.1 Abkürzungsverzeichnis der verwendeten Chemikalien

2-ME	β -Mercaptoethanol
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BSA	Bovines Serum Albumin
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CAPS	3-[Cyclohexylamino]-1 Propan schweflige Säure
CFA	komplettes Freund'sches Adjuvans
CsCl	Cäsiumchlorid
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FCS	fötales Kalbsserum (<i>fetal calf serum</i>)
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IFA	inkomplettes Freund'sches Adjuvans
IMDM	<i>Iscove's modified Dulbecco's medium</i> Zellkulturmedium
LPS	Lipopolysaccharid
MeOH	Methanol
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
PBS	Phosphate Buffered Saline=Phosphat-gepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Zellkulturmedium
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	<i>saline sodium citrate</i> Puffer
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

2.1.2.2 Lösungen und Puffer

Lösungen und Puffer wurden mit Wasser aus einer Reinwasseranlage (MilliQ Biocell, Millipore, Schwalbach, Deutschland) angesetzt. Sterilfiltration, falls benötigt, wurde mit 0,22 µm Filtern (Becton Dickinson, Franklin, USA) durchgeführt.

Acrylamid-Bisacrylamid-Stammlösung

30% Acrylamid

0,8% Bisacrylamid

Aqua dest.

10 M Ammoniumacetat

38,54 g Ammoniumacetat

ad 50 ml mit Aqua bidest.

10% BSA in PBS (Stocklösung)

50 ml BSA-Lösung (50 mg/ml)

450 ml PBS

Sterilfiltration

2,5 M CaCl₂

36,75 g CaCl₂(2H₂O)

100 ml Aqua bidest.

Sterilfiltration

1x CAPS-Puffer

10% 10x CAPS-Puffer

10% Methanol

Aqua bidest.

10x CAPS-Puffer

100 mM CAPS

0,05% SDS

25 mM Chloroquin-Vorratslösung

1289,8 mg

100 ml Aqua bidest.

Sterilfiltration

0,1% DEPC-H₂O

1 ml DEPC

1000 ml H₂O

autoklavieren

0,5 M EDTA (Stocklösung)

93,06 g EDTA

500 ml PBS

Autoklavieren

FACS (*fluorescence activated cell sorting*)-Puffer

50 ml 10% BSA-Stocklösung

450 ml PBS

1% Eosin

20 g Eosin

2000 ml Aqua bidest.

einige Tropfen 96% Essigsäure

Sterilfiltration

Hämatoxylin-Färbelösung (Stocklösung)

1 g Hämatoxylin

in 1000 ml H₂O lösen

0,1 g Natriumjodat

50 g Kalialaun

vollständig lösen

50 g Chloralhydrat

1 g Zitronensäure

2xHBS

4 g NaCl

0,19 g KCl

2,4 g HEPES

0,06 g Na_2HPO_4

ad 250 ml H_2O

auf pH 7,12 einstellen

Sterilfiltration

MACS (*magnetic activated cell sorting*)-Puffer

25 ml 10% BSA-Stocklösung

2 ml EDTA-Stocklösung, 0,5 M

473 ml PBS

2-ME-Stocklösung

10 ml RPMI

14 μl 2-ME

10x MOPS-Puffer

200 mM MOPS

50 mM Natriumacetat

5 mM EDTA

auf pH 7 einstellen

Sammelgel-Puffer

60,56 g Tris-Base

4 g SDS

1000 ml Aqua bidest.

auf pH 6,76

10% SDS

10 g SDS

100 ml Aqua bidest..

SDS-Laufpuffer

30,3 g Tris-Base

144 g Glycin

10 g SDS

1000 ml Aqua bidest.

4x SDS-Probenpuffer

8% SDS

40% Glycerin

250 mM TRIS/HCl

bläuen mit Bromphenolblau

SDS-Sammelgel

3 ml Aqua dest.

0,75 ml 40% Acrylamid-Bisacrylamid-Stammlösung

1,25 ml 1x CAPS-Puffer

7 µl TEMED

7 µl APS

SDS-Trenngel

1,25 ml Aqua dest.

3,75 ml 40% Acrylamid-Bisacrylamid-Stammlösung

4 ml 60% Glycerin

3 ml 1x CAPS-Puffer

17 µl TEMED

17 µl APS

20x SSC

87,65 g NaCl

44,11 g Natriumzitat

in 500 ml Aqua bidest.. lösen

auf pH 7 einstellen

50x TAE-Stocklösung

242 g Tris

57,1 ml Essigsäure
100 ml 0,5 M EDTA
ad 1000 ml Aqua bidest..

TBS-T Puffer

100 mM TRIS
0,9% NaCl
0,1% Tween 20

TE-Puffer, pH 7,6

5 ml Tris, 1 M
1 ml EDTA, 0,5 M
494 ml Aqua bidest.

Trenngel-Puffer

181,6 g Tris-Base
4 g SDS
1000 ml Aqua bidest.
auf pH 8,8 einstellen

1 M Tris

60,55 g Tris Base
500 ml Aqua bidest.
Autoklavieren

Verdauungslösung für Gewebeverdau

1,21 g Tris
62,5 µl 1 M NaCl
2 ml 0,5 M EDTA
add 1000 ml Aqua bidest..
Sterilfiltration

Waschlösung für Gewebeverdau

50 ml 20xSSC
20 ml 0,5M EDTA

ad 1000 ml Aqua bidest.

Sterilfiltration

2.1.2.3 Zellkulturmedien

Cellgro-Medium

500 ml Cellgro

5 ml Penicillin/Streptomycin (100x)

faktorhaltiges Cellgro-Medium

500 ml Cellgro

5 ml Penicillin/Streptomycin (100x)

20 ng/ml GM-CSF

10 ng/ml IL-4

IMDM-C

450 ml IMDM

50 ml FCS

5 ml L-Glutamin

5 ml Penicillin/Streptomycin (100x)

faktorhaltiges IMDM-C

IMDM-C

10 ng/ml GM-CSF

10 ng/ml IL-4

RPMI-C

450 ml RPMI

50 ml FCS

5 ml nichtessentielle Aminosäuren (100x)

5 ml HEPES

5 ml (Natriumpyruvat)

5 ml Penicillin/Streptomycin (100x)

5 ml L-Glutamin (100x)

2 ml 2-ME-Stocklösung

faktorhaltiges RPMI-C

RPMI-C

10 ng/ml GM-CSF

10 ng/ml IL-4

Lysogeny broth (LB) Nährmedium für Bakterien

10 g Trypton

5 g Hefeextrakt

10 g NaCl

ad 1 l mit H₂O

auf pH7 einstellen

autoklavieren

2.1.3 Antikörper und Enzyme

Tabelle 2.1: Liste der Antikörper und Enzyme

Name	Vertreiber	Herkunft	Konzentration
anti-CD11c R-Phycoerythrin (R-PE)	Caltag (Burlingame, USA)	Ratte	1:100 (FACS)
anti-CD14	HyCult biotechnology (PB Uden, Niederlande)	Maus	1:100 (FACS)
anti-CD14 R-PE-Cyanin 5 (Cy5)	Acris Antibodies (Hiddenhausen, Deutschland)	Maus	1:100 (FACS)
anti-CD80 R-PE	Caltag (Burlingame, USA)	Maus	1:100 (FACS)
anti-CD86 R-PE	Caltag (Burlingame, USA)	Maus	1:100 (FACS)
anti-mouse Galectin-1	R&D Systems (Wiesbaden, Deutschland)	Ratte	1 µg/ml (Western Blot)
anti-GFP	Molecular Probes (Leiden, Niederlande)	Maus	1:50 (Immunhistologie)
anti-MHCII	Caltag (Burlingame, USA)	Maus	1:100 (FACS)
anti-Ly-6G and Ly-6C (Gr.1)	BD Biosciences (Erembodegem, Belgien)	Ratte	10µl/10x10 ⁶ Zellen (Zellaufreinigung)
anti-CD45R/B220	BD Biosciences (Erembodegem, Belgien)	Ratte	4µl/10x10 ⁶ Zellen (Zellaufreinigung)
anti-CD3	BD Biosciences (Erembodegem, Belgien)	Ratte	3µl/10x10 ⁶ Zellen (Zellaufreinigung)
<i>horseradish peroxidase</i> (HRPO)-anti-Ratte	BD Biosciences (Erembodegem, Belgien)	Ziege	1:200 (Western Blot)

Sekundärantikörper			
anti-Maus-PE-Sekundärantikörper	BD Biosciences (Erembodegem, Belgien)	Ziege	1:500 (FACS)

2.1.4 Primer

Tabelle 2.2: Liste der verwendeten Primer

Name	Sequenz (5'-3')	Annealing-Temperatur	Produkt-Länge
GAPDH2-fw	AAC GAC CCC TTC ATT GAC	50-51°C	191 bp
GAPDH2-rev	TCC ACG ACA TAC TCA GCA C	50-51°C	191 bp
GFP-4-fw	AAG CAG CAC GAC TTC TTC A	51°C	257 bp
GFP-4-rev	TTC ACC TTG ATG CCG TTC	51°C	257 bp
IL-4-fw	TCT GTA GGG CTT CCA AGG T	50°C	200 bp
IL-4-rev	GAT GCT CTT TAG GCT TTC CAG	50°C	200 bp
IL-10-fw	GCA CTA CCA AAG CCA CAA AG	50°C	87 bp
IL-10-rev	TCA GTA AGA GCA GGC AGC ATA	50°C	87 bp
IFNg-fw	TGC TGA TGG GAG GAG ATG T	51°C	171 bp
IFNg-rev	TCA TTC GGG TGT AGT CAC AGT T	51°C	171 bp
pHR-RRE-right	AGG TAT CTT TCC ACA GCC AGG	50°C	200 bp
pHR-RRE-left	GTT CTT GGG AGC AGC AGG AA	50°C	200bp
TN3-fw	GAA ACA CAA GAT GCT GGG ACA	51°C	200 bp
TN3-rev	CTG GAA AGG TCT GAA GGT AGG AA	51°C	200 bp

2.1.5 Kommerzielle Kits

Tabelle 2.3: Liste der eingesetzten kommerziellen Kits

Bezeichnung	Hersteller
Absolute QPCR Sybr Green Mix	Thermo Fischer Scientific (Epsom, Großbritannien)
Collagen Type II Antibody ELISA, Mouse IgG	MD Biosciences (Egg bei Zürich, Schweiz)
DNeasy Blood and Tissue Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Färbekit: Berlinerblau, Eisen(III)-Nachweis	Baack Laborbedarf (Schwerin, Deutschland)
Giemsa-Färbelösung	Merck (Darmstadt, Deutschland)
HotstarTaq Master Mix Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Maxiprep-Plasmid-Präparation-Kit	QBioGene (Illkirch, Frankreich)
QiaAmp DNA Mini Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Qiaprep Maxiprep-Plasmidisolationskit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Qiaprep Miniprep-Plasmidisolationskit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Qiaquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Quantikine Mouse IL-12 ELISA Kit	R&D Systems (Minneapolis, USA)

Quantikine Mouse TNF α ELISA Kit	R&D Systems (Minneapolis, USA)
RNeasy Midi-Präparation-Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
RNeasy Mini-Präparation-Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Vectastain AEC-Substrate Kit	Vector Laboratories (Burlingame, USA)
Vectastain DAB-Substrate Kit	Vector Laboratories (Burlingame, USA)

2.1.6 Zellmaterial

Murine BM-DC wurden aus Vorläuferzellen im Knochenmark von DBA/1-Mäusen kultiviert. Humane DC wurden aus Leukozytenapheresen der Universität Giessen kultiviert. Die Zelllinie *human embryonic kidney* (HEK) *cells* 293T (Graham *et al.*, 1977) wurde aus dem Labor von Professor Fathman (Stanford University, Palo Alto, USA) bezogen.

2.1.7 Versuchstiere

Alle Versuchstiere wurden von Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) bezogen. Die Experimente zur Therapie der CIA wurden mit männlichen Mäusen der Linie DBA/1 durchgeführt. Für die Experimente zum Migrationsverhalten humaner DC wurden weibliche Mäuse der Linie C.B-17/lcr Crl-SCID verwendet.

2.1.8 Patientenmaterial

Humanes Gewebematerial wurde von der orthopädischen Universitätsklinik der Justus-Liebig Universität Gießen (Gießen, Deutschland) und der Abteilung für Orthopädie des Markus-Krankenhaus Frankfurt (Frankfurt, Deutschland) bezogen. Das Material wurde ausschließlich bei medizinisch indizierten Gelenkersatz-Operationen entnommen. Positive Ethikvoten zur Verwendung humanen Gewebematerials und humaner Zellen liegen vor (Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Universität Gießen, Voten Nr. 66/08, 134/09).

2.1.9 Software

Tabelle 2.4: Liste der eingesetzten Software

Software	Hersteller
Biostat	AnalystSoft Inc (Vancouver, Kanada)
Calc	Sun Microsystems (Santa Clara, USA)
Cellquest Pro	Becton Dickinson (Franklin, USA)
Excel	Microsoft (Redmond, USA)
Gnu Image Manipulation Programm	Gimp Development Team (www.gimp.org)
Impress	Sun Microsystems (Santa Clara, USA)
Inkscape	The Inkscape Team (www.inkscape.org)
Internet Explorer	Microsoft (Redmond, USA)
Lightcycler Software 3.5.3	Roche (Mannheim, Deutschland)
Mozilla Firefox	Mozilla Foundation (Mountain View, USA)
OligoAnalyzer	Integrated DNA Technologies (Coralville, USA)
PALM RoboSoftware	Carl Zeiss AG (Göttingen, Deutschland)
PCR now	UT Southwestern Medical Center and RCE Region IV Computational Biology Group (Dallas, USA)
Photoshop	Adobe (San Jose, USA)
Readseq	Don Gilbert, University of Indiana (Bloomington, USA)
WinMDI 2.8	Joseph Trotter
Word	Microsoft (Redmond, USA)
Writer	Sun Microsystems (Santa Clara, USA)

2.2 Methodik

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Bakterienkultur für die Zellvermehrung

Chemisch kompetente *Escherichia coli* (*E. coli*) Bakterien (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) wurden nach dem Protokoll des Herstellers mit den lentiviralen Plasmiden transformiert und unter kontinuierlichem Schütteln in LB-Medium bei 37° C bis zu einer optischen Dichte von 0,8 vermehrt. Für den Ausstrich auf Agar-Platten wurde dem Medium 2% Agar zugefügt und in Petrischalen ausgegossen. Die Inkubation ausplattierter Bakterien erfolgte bei 37° C. Die Plasmide wurden mit Plasmid-Isolationskits von Qiagen (Hilden, Deutschland) oder Sigma (Taufkirchen, Deutschland) nach dem Protokoll des jeweiligen Herstellers gewonnen.

2.2.1.2 Kulturbedingungen für die verwendeten Zellen

HEK 293T Zellen wurden in IMDM-C unter Kulturbedingungen von 6% CO₂ und 96% Luftfeuchtigkeit angezogen. Murine DC wurden in RPMI-C bei 10% CO₂ und 96% Luftfeuchtigkeit unter Zugabe von je 10 ng/ml GM-CSF und IL-4 (Peprotech, Hamburg, Deutschland) kultiviert. Humane DC wurden in Cellgro Medium unter Zugabe von je 10 ng/ml GM-CSF und IL-4 (Peprotech, Hamburg, Deutschland) bei 10% CO₂ und 96% Luftfeuchtigkeit kultiviert.

2.2.1.3 Kultur muriner DC aus Vorläuferzellen des Knochenmarks

Männlichen DBA/1 Mäusen wurden die Ober- und Unterschenkelknochen der Hinterläufe entnommen und in eine RPMI-C Medium enthaltende Petrischale überführt. Die Knochen wurden mittels einer 3 ml Spritze und 23G Nadel mit sterilem PBS durchgespült, um das Knochenmark zu entfernen. Die erhaltene Zellsuspension wurde durch wiederholtes Aufziehen durch eine 21G Nadel vereinzelt und durch ein Zellsieb mit 70 µm Porengröße (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) in ein 50 ml Falcongefäß überführt. Das Falcongefäß wurde mit RPMI-C vollständig aufgefüllt und zentrifugiert (400 g, 5 min., 4°C). Das Zellpellet wurde in 20 ml Erythrozytenlyse-Puffer (Qiagen, Hilden, Deutschland) resuspendiert und für 2 Minuten inkubiert, die Lyse mit 20 ml RPMI-C gestoppt und erneut zentrifugiert (400 g, 5 min., 4° C). Der Vorgang wurde nach Bedarf wiederholt. Nach wiederholter Waschung der Zellen mit 0,5% BSA wurde das erhaltene Zellpellet in einer Konzentration von 10x10⁶/ml in 0,5% BSA aufgenommen. Der Zellsuspension wurde zur

Depletion von Granulozyten, B-Zellen und T-Zellen mit den biotinylierten Antikörpern anti-Ly6G und Ly-6C, anti-CD45R/B220 und anti-CD3 für 30 min. auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen zentrifugiert (400 g, 5 min., 4° C) und zweimal mit 0,5% BSA gewaschen. Die Zellen wurden auf eine Konzentration von $10 \times 10^6 / 950 \mu\text{l}$ gebracht und mit 50 μl Streptavidin-gekoppelter Dynabeads (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) pro 10×10^6 Zellen aufgefüllt. Die Zellen wurden unter Schütteln für 40 Minuten bei 4°C inkubiert und das Zellgemisch anschließend mit Hilfe eines Dynatech Separatormagneten in einer 5 minütigen Inkubation bei 4°C getrennt. Der beadfreie Überstand wurde im Separator abgenommen, in 0,5% BSA gewaschen und erneut mit den Beads inkubiert. Anschließend wurde der beadfreie Überstand in faktorhaltiges RPMI-C aufgenommen und in 6 Well Platten mit je 2×10^6 Zellen in 4 ml Kulturmedium pro Well ausgesät. In 48stündigen Intervallen wurde das Kulturmedium zur Hälfte abgenommen und abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in frischem Medium mit der verdoppelten Endkonzentration an Faktoren aufgenommen und den Kulturschalen wieder zugesetzt. Am Tag 4 der Kultur erfolgte die lentivirale Transduktion (vgl. Abschnitt 2.2.5.4).

2.2.1.4 Kultur humaner dendritischer Zellen aus Vorläuferzellen des peripheren Bluts

Von der Universitätsklinik Gießen wurden Leukozyten aus Apheresaten von gesunden Blutspendern bezogen und bei 400 g für 5 Minuten zentrifugiert. Nach der Lyse residualer Erythrozyten in Analogie zu den murinen BM-DC wurde das erhaltene Zellpellet in einer Konzentration von $10 \times 10^6 / \text{ml}$ in 0,5% BSA aufgenommen und mit anti-CD14 Dynabeads in einem Volumenverhältnis von 1:20 versetzt. Damit wurden CD14+ Monozyten positiv selektiert und die beadgebundenen CD14+ Zellen in Cellgro Kulturmedium mit den Faktoren GM-CSF (20 ng/ml) und IL-4 (10 ng/ml) aufgenommen. Die Aussaat erfolgte in 6 Well-Platten mit 4 ml Kulturmedium pro Well in einer Zellkonzentration von $1 \times 10^6 / \text{ml}$. In 48stündigen Intervallen wurde das Kulturmedium zur Hälfte abgenommen und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in frischem Medium mit der doppelten Endkonzentration an Faktoren aufgenommen und den Kulturschalen wieder zugesetzt. Am Tag 6 der Kultur wurden die Zellen durch Zentrifugieren des Mediumüberstandes (400 g, 5 min, 4°C) und intensives Waschen der Kulturschalen mit PBS geerntet. Ein Aliquot der Zellen wurde für die FACS-Analyse verwendet.

2.2.1.5 Markierung humaner DC mit Resovist

Humane DC wurden nach dem oben dargestellten Protokoll aus CD14+ Monozyten kultiviert. An Tag 2 der Zellkultur wurde dem Wechselmedium Resovist (Bayer Schering, Berlin, Deutschland),

ein ferromagnetische Partikel enthaltendes Kontrastmittel für die Magnet-Resonanz-Tomographie, in einer Konzentration von 100 µg/ml zugegeben. Nach 36 h erfolgte ein Mediumwechsel mit faktorhaltigem Cellgro Medium ohne Resovist-Zusatz. Die durch Phagozytose des Resovist mit eisenhaltigen Partikeln angereicherten DC wurden SCID-Mäusen mit humanen Synovialimplantaten (vgl. Abschnitt 2.2.3) *i.p.* injiziert. Nach einem Beobachtungszeitraum von einer bzw. drei Wochen wurden die eisenhaltigen Zellen in histologischen Schnitten durch Berlinerblau-Färbung nachgewiesen.

2.2.2 Tiermodelle

2.2.2.1 Modell der Kollagen-induzierten Arthritis

Mäusen der Linie DBA/1 wurde im Alter zwischen 5 und 8 Wochen an Tag 1 eine Emulsion aus 100 µg bovinem Kollagen II (2 mg/ml Lösung, MD Biosciences, Egg bei Zürich, Schweiz) und 50 µl doppelt konzentriertem *complete Freund's adjuvant* (CFA) von Sigma (Taufkirchen, Deutschland) subkutan (*s.c.*) in die Schwanzbasis injiziert. An Tag 21 wurde eine Boosterimmunisierung mit einer Emulsion aus 100 µg bovinem Kollagen II und 50 µl *incomplete Freund's adjuvant* (IFA), ebenfalls Sigma, auf gleiche Weise durchgeführt. An Tag 25 wurde eine Lipopolysaccharide (LPS)-Lösung (Sigma) in einer Menge von 40 µg/Tier intraperitoneal (*i.p.*) verabreicht, um einen synchronisierten Krankheitsausbruch mit klinisch manifestierten Symptomen an Tag 27/28 nach Erstimmunisierung zu erreichen.

Der klinische Schweregrad der Arthritis und die klinische Wirksamkeit der Therapie wurden über einen Beobachtungszeitraum von 30 Tagen nach Zellinjektion durch tägliche visuelle Inspektion der Schwellung der Mäusepfoten bestimmt. Zu diesem Zweck wurde ein etabliertes Bewertungssystem übernommen. Dieses System ordnet jeder Pfote 5 mögliche Werte zu, wie in Tabelle 2.5 angegeben.

Tabelle 2.5: Wertungssystem für die Kollagen-induzierte Arthritis

Schweregrad	Kriterium
0	keine sichtbare Schwellung
1	Rötung und/oder milde Schwellung einzelner oder mehrerer Zehen
2	Schwellung von Vorderfuß oder Ferse
3	gemeinsame Schwellung mehrerer Teile des Fußes
4	Schwellung des gesamten Fußes, Deformation

Für die Auswertung wurde der addierte Gesamtwert aller Pfoten eines Tieres (Maximalwert 16) ver-

wendet. Da die Tiere bei Therapiebeginn individuell unterschiedliche Schweregrade aufweisen, wurde zum Vergleich der Therapiewirkung ein normierter Schweregrad als Differenz aus dem täglich bestimmten Wert und dem Wert zum Zeitpunkt des Zelltransfers gebildet.

2.2.2.2 SCID-Mausmodell der RA

Das SCID-Maus Modell der RA ermöglicht die Untersuchung pathophysiologischer Mechanismen der RA an vitalem humanem Gelenkgewebe (Müller-Ladner *et al.*, 1996; Neumann *et al.*, 2002). Dazu werden synoviale Explantate oder isolierte RASF zusammen mit intaktem Gelenkknorpel immundefizienten C.B-17/lcr Crl-SCID Mäusen subkutan implantiert (Judex *et al.*, 2001; Neumann *et al.*, 2002). Aufgrund der *severe combined immunodeficiency* (SCID) Erkrankung können die Tiere die Implantate nicht abstoßen, so dass das vitale humane Gewebe ein Gelenkmodell in den SCID-Mäusen darstellt, bei dem es im Rahmen einer 60tägigen Inkubationszeit zur aktiven Invasion der RASF in den Knorpel kommt. Das humane Synovialgewebe und der Knorpel werden im Rahmen von routinemäßig durchgeführten Gelenkersatz-Operationen bei RA-Patienten gewonnen. Für die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden benutzfertige SCID-Mäuse mit entsprechenden Implantaten von der Forschungsleiterin unserer Arbeitsgruppe, Frau Dr. Neumann, zur Verfügung gestellt.

2.2.3 Das lentivirale Vektorsystem und adoptiver zellulärer Gentransfer

2.2.3.1 Das lentivirale Vektorkonstrukt pHR-IG

Das lentivirale Vektorkonstrukt pHR-IG (Abb. 2.1) wurde von Dr. Karine Breckpot an der Universität Brüssel entwickelt (Breckpot *et al.*, 2007) und unserer Arbeitsgruppe freundlicherweise zur Verfügung gestellt. pHR-IG ist ein HIV-1 basierter, selbstinhibierender (SIN) Vektor. Aus Sicherheitsgründen ist dabei die genetische Information des Virus auf 3 Plasmide verteilt: pVSVG kodiert ein Glycoprotein des *vesicular stomatitis virus*, pDelta die Hüll- und Verpackungsgene und pHR-IG als der eigentliche Vektor kodiert das Markergen eGFP und ist Träger des jeweiligen *inserts*. Es trägt von der ursprünglichen Virus-Information die Long Terminal Repeat (LTR)-Sequenzen, das Verpackungssignal, ein teilweise deletiertes gruppenspezifisches Antigen (*gag*), das Rev-Responsive Element (RRE) und die kerntransportfördernde *trip*-Sequenz sowie eine Teilsequenz des *pol*-Gens von HIV. Das entstehende infektiöse Viruspartikel enthält an genetischer Information nur das Vektorplasmid pHR-IG.

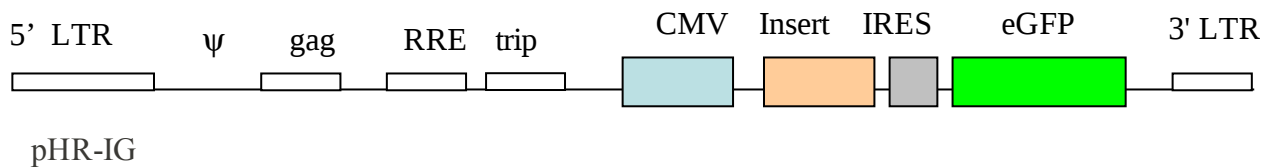


Abb. 2.1: Vektorkarte des lentiviralen pHR-IG Konstrukts (nach Breckpot, 2001). Durch Verwendung einer *internal ribosomal entry site* (IRES) entsteht ein bicistronisches Konstrukt, das eine Expression des Markers *enhanced green fluorescent protein* (eGFP) und des jeweiligen inserts (anti-TNF scFv, Galectin-1 oder IL-12p40) in äquimolarem Verhältnis ermöglicht. LTR: *long terminal repeat*; ψ : Verpackungssignal; ga: Glycoprotein A; RRE: *Rev response element*; trip: *central polypurine tract + termination sequence*; CMV: Cytomegalovirus Promoter.

Als *inserts* wurden jeweils die kodierenden Gensequenzen für IL-12p40, Galectin-1 und anti-TNF scFv mit Standard-Klonierungsverfahren eingebracht und die entstehenden Vektoren als pHR-IL-12 p40, pHR-Gal1 und pHR-anti-TNF scFv bezeichnet. Die kodierenden Sequenzen wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Fathman an der Stanford University zur Verfügung gestellt.

2.2.3.2 Herstellung der konzentrierten Virussuspension

Die produzierenden Zellen wurden chemisch durch die CaPO_4 Präzipitation transfiziert. Dazu wurden HEK 293T Zellen in einer Zelldichte von $1,5 \times 10^6$ auf 100 mm Platten ausgesät und über Nacht inkubiert. Am Transfektionstag wurde das Kulturmedium durch chloroquinhaltiges Medium ($25 \mu\text{M}/\text{ml}$) ersetzt. Anschließend wurde ein DNA-Gemisch aus dem das Insert kodierenden Plasmid pHR-IG und den Virusstrukturprotein kodierenden Plasmiden pDelta und pVSVG im Verhältnis $45 \mu\text{g} : 30 \mu\text{g} : 15 \mu\text{g}$ mit Wasser auf ein Volumen von $2185 \mu\text{l}$ gebracht. Diesem Ansatz wurden $315 \mu\text{l}$ einer $2,5 \text{ M}$ CaCl_2 Lösung tropfenweise zugegeben und für 5 Minuten inkubiert. Nach der Inkubation wurde dem Ansatz unter ständiger Durchmischung $2,5 \text{ ml}$ $2\times$ HBS tropfenweise zugegeben und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Ein einzelner Ansatz wurde auf drei 100 mm Zellkulturplatten flächendeckend tropfenweise verteilt. Nach 8 - 14 Stunden Inkubation im Brutschrank wurde das chloroquinhaltige Medium durch faktorhaltiges IMDM-C ersetzt. Etwa 48 Stunden nach Wechsel des Transfektionsmediums wurde das virushaltige Medium abgenommen und 10 Minuten bei $1.350 \text{ U}/\text{min.}$ zentrifugiert, um Zellreste zu pelletieren. Der Überstand wurde ultrazentrifugiert ($19.500 \text{ U}/\text{min.}$, $2:20 \text{ h}$, 4°C). Das dadurch erhaltene Viruspellet wurde durch Pipettieren in IMDM ohne Zusätze aufgenommen und bei -20°C gelagert.

2.2.3.3 Bestimmung der Viruskonzentration

HEK 293T Zellen wurden in 6-Well Platten in einer Konzentration von 1×10^5 pro Well ausgesät. Nach einem Tag in Kultur wurde der Mittelwert für die Zellzahl pro Well aus 3 Wells bestimmt. Jede zu testende konzentrierte Virussuspension wurde in einer Verdünnungsreihe (1:300, 1:1500, 1:7500) in protaminsulfathaltigem IMDM-C (10 ng/ml Endkonzentration) angesetzt. Pro Well wurde das Medium durch 1 ml virushaltiges Medium ersetzt und die Platten inkubiert. Nach 24 Stunden wurde 1 ml IMDM-C zugefügt und für weitere 12 Stunden inkubiert. Der Prozentanteil transduzierter Zellen wurde durchflußzytometrisch bestimmt. Die *transforming units* (TU) wurden aus dem Anteil transduzierter Zellen und der Zellzahl zum Zeitpunkt der Transduktion nach folgender Formel bestimmt:

$$\frac{\text{Prozent transduzierter Zellen} \times \text{Zellzahl zum Zeitpunkt der Transduktion (Millionen)}}{100 \times \text{Transduktionsvolumen (ml)} \times \text{Verdünnungsfaktor}} = \text{TU / ml}$$

2.2.3.4 Bestimmung des multiplicity of infection (MOI) Werts für die lentivirale Transduktion

Murine DC wurden nach dem in Abschnitt 2.2.4 dargestellten Protokoll kultiviert und an Tag 4 in einer Konzentration von $0,5 \times 10^6$ pro Well auf 6-Well Platten ausgesät. Nach einem Tag Inkubation wurden die DC mit einer Verdünnungsreihe des lentiviralen Vektors in protaminsulfathaltigem RPMI-C transduziert. An Tag 6 wurden der Transduktionserfolg und der Anteil toter Zellen durchflußzytometrisch bestimmt. Erfolgreich transduzierte Zellen wurden anhand ihrer Expression des Markergens eGFP identifiziert, tote Zellen durch Anfärbung mit Propidiumjodid. Die Virusverdünnung mit der besten Balance zwischen transduzierten Zellen und Überlebensrate der Zellen wurde für weitere Experimente verwendet. Der auf diese Weise ermittelte MOI Wert für den Vektor pHR-IG lag bei 12.

2.2.3.5 Lentivirale Transduktion muriner DC

An Tag 4 der Kultur muriner DC aus Knochenmark wurde das RPMI-C durch frisches faktorhaltiges RPMI-C (20 ng/ml statt 10 ng/ml GM-CSF und IL-4; 0,5ml pro Well) ersetzt. Der virale Vektor wurde gemäß der Zahl zu transduzierender Wells mit protaminsulfathaltigem RPMI-C versetzt (20 ng/ml; 0,5ml/Well). Der abgenommene Kulturüberstand wurde zentrifugiert und die erhaltenen Zellpellets wurden in dem virushaltigen Medium aufgenommen und auf die Wells verteilt, was zu einer Endkonzentration von 10 ng/ml für Protaminsulfat führte. Nach 3 Stunden Inkubation wurde 1

ml faktorhaltiges RPMI-C zu jedem Well gegeben. Nach weiteren 12 Stunden wurde das gesamte Medium durch frisches faktorhaltiges RPMI-C ersetzt und für weitere 36 Stunden inkubiert.

2.2.3.6 Adoptiver Transfer lentiviral transduzierter DC

An Tag 28 nach Erstimmunisierung der Mäuse wurden die transduzierten DC, die sich in Tag 6 der Zellkultur befanden, durch ausgiebige PBS-Spülung geerntet. Aliquots der verschiedenen Transduktionsgruppen wurden für die FACS-Auswertung abgesondert. Zellen für die Injektion wurden gemäß des FACS-Ergebnisses in sterilem NaCl aufgenommen, um eine Konzentration von etwa 1 Million transduzierter Zellen pro 200 µl Injektionsvolumen zu erreichen. Die Kombinationstherapien wurden als Mischungen von Zellen aus verschiedenen Transduktionsgruppen verabreicht. Die gesamte Zellkonzentration lag für die Kombinationstherapien wie die Konzentration für die Monotherapien bei 1 Million transduzierter Zellen pro Tier. Die Zellen wurden in die Schwanzvene injiziert. Insgesamt wurden sechs Experimente durchgeführt, die als CIA1 bis CIA6 bezeichnet wurden (vgl. Tab. 3.1).

Die Zuordnung der Versuchstiere zu den Behandlungsgruppen erfolgte während der Zellinjektion sequentiell. Alle Tiere erhielten eine fortlaufende Nummer und wurden dem Versuchsleiter zum Zelltransfer in zufälliger Reihenfolge angereicht. Die Injektion von Placebo (physiologische Kochsalzlösung) und therapeutischen DC-Zellsuspensionen erfolgten dann in fester Reihenfolge abwechselnd durch den Versuchsleiter. Die Zuordnung zu den Behandlungsgruppen wurde protokolliert und die Notation für die Dauer des Beobachtungszeitraums verwahrt, um eine unbeeinflusste Beurteilung des klinischen Schweregrads der Arthritis während des 30tägigen Beobachtungszeitraumes zu gewährleisten.

2.2.4 DNA- und RNA-Analytik

2.2.4.1 Isolation von RNA aus murinem Gewebe

Nach der Euthanasie der Versuchstiere mittels CO₂-Insufflation wurden murine Gewebe entnommen und für die Extraktion von RNA homogenisiert. Vor dem Umzug der Arbeitsgruppe von der Universität Regensburg an die Universität Gießen/Kerckhoff-Klinik Bad Nauheim wurde die Gewebhomogenisierung mithilfe eines Rotor-Stator-Homogenisators durchgeführt. Die Vorderpfoten, Lymphknoten und Milzen wurden dazu je nach Größe in 2 - 5 ml TRIzol Reagenz (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) in 15 ml Falcon Gefäßen aufgenommen und homogenisiert. Die Extraktion aus dem Homogenisat erfolgt mithilfe des TRIzol Reagenz durch Zugabe von Chloroform und an-

schließende Präzipitation mit Isopropylalkohol nach Vorgabe des Herstellerprotokolls. Der Nachteil des Homogenisierungsverfahrens besteht darin, dass sich die Hülse des Homogenisators mit den rotierenden Messern zwischen den Anwendungen nur schwierig reinigen und frei von RNase halten lässt. Somit kann es unter Umständen zum Übertragen von Geweberesten zwischen den einzelnen Präparaten und zur Kontamination mit RNase kommen.

Nach dem Umzug nach Bad Nauheim stand eine Kugelmühle (Retsch, Haan, Deutschland) zur Verfügung. Diese bietet den Vorteil, dass die einzelnen Gewebepräparate jeweils mit separaten Aliquots steriler, RNase-freier Edelstahlkugeln homogenisiert werden können. Dazu werden die Gewebepräparate auf ca. 250 mg zugeschnitten und in 600 µl RNA-stabilisierenden RLT-Puffer (RNeasy-Midi-Kit bzw. RNeasy-Mini-Kit, beide Qiagen, Hilden, Deutschland) aufgenommen. Für die RNA-Isolation aus Mauspfoten wurden zwei Vorderpfoten oder eine einzelne Hinterpfote verwendet. Für die Isolation aus Lymphknoten wurden 2 - 3 Lymphknoten präpariert und gemeinsam eingesetzt. Die entnommenen Gewebe wurden bei -80°C gelagert. Für die Isolation wurden den Eppendorf-Gefäßen die Edelstahlkugeln von 5 mm Durchmesser zugegeben und die Gewebe in der Kugelmühle homogenisiert (3000 U/min., 3 x 4 min.). Das Homogenisat wurde zentrifugiert (10.000 g, 10 min, 4° C), der Überstand für die Isolation der RNA aus Milzen und Pfoten in 15 ml Falcongefäße überführt und mit RLT-Puffer auf 4 ml aufgefüllt. Die Isolation der RNA aus den Lymphknoten wurde in 2 ml Eppendorf-Gefäßen in einem Volumen von 1 ml RLT-Puffer durchgeführt. Die weitere RNA-Isolation erfolgte gemäß der Menge an Material mit dem RNeasy-Midi-Kit oder RNeasy-Mini-Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach dem jeweiligen Protokoll des Herstellers.

2.2.4.2 Isolation von genomischer DNA aus murinem Gewebe

In Tissue Tek O.C.T. (Sakura Finetech, Staufen, Deutschland) kryokonservierte Gewebeblöcke wurden aus der Lagerung bei -80°C in 10 ml PBS überführt und für 10 Minuten bei 40°C unter mehrfachem Invertieren erwärmt. Anschließend wurde der Waschvorgang mit frischem PBS mehrfach bei Raumtemperatur wiederholt, die freigelegten Gewebe in frischem PBS pelletiert (500 g, 5 min.) und anschließend in Proteinase K-haltiger Verdauungslösung über Nacht bei 50° C unter leichtem Schütteln bis zur vollständigen Auflösung des Gewebes inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Verdauungslösung mit einem gleichen Volumen an Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (Roth, Karlsruhe, Deutschland) vermischt und zentrifugiert (2.000 g, 10 min., 4° C) und die innere von drei sich bildenden Phasen mit einer Pipette entfernt und verworfen. Nach zweimaliger Wiederholung wurde der erhaltene Rückstand mit einer äquivalenten Menge Chloroform/Isoamylalkohol (Roth) versetzt, zentrifugiert (2.000 g, 10 min., 4° C) und die innere Phase verworfen. Der

Rückstand wurde erneut mit einem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol versetzt. Nach der Zentrifugation (2.000 g, 10 min., 4°C) wurde die obere Phase in ein neues Gefäß überführt und mit 0,1 Volumen 3 M Natriumazetat sowie 2 Volumen 100% Ethanol (-20° C) für 30 Minuten bei -80°C inkubiert. Das durch anschließende Zentrifugation (2.000 g, 10 min., 4° C) gewonnene Pellet wurde in 1 ml 70% Ethanol resuspendiert, erneut zentrifugiert, bei Raumtemperatur getrocknet und schließlich in Aqua bidest. gelöst.

2.2.4.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die PCR wurden *template*-DNA, *sense*- und *antisense-primer* und HotStarTaq Master Mix (Qiagen, Hilden, Deutschland) oder SuperPCR Mix (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) gemäß des Protokolls des jeweiligen Herstellers angesetzt. Das verwendete Standardprogramm ist in Tab. 2.6 dargestellt.

Tabelle 2.6: Standardprotokoll der PCR

Reaktionsschritt		Temperatur	Zeit
Dehybridisierung		94°C	300 s
Reaktionszyklus, Wiederholung 25x	Dehybridisierung	94°C	15 s
	Primerhybridisierung	primerspezifisch	15 s
	Elongation	72°C	20 s
Elongation		72°C	600 s

2.2.4.4 PCR an genomischer DNA

Um die Präsenz der transferierten rekombinanten DNA in der genomischen DNA der Versuchstiere nachzuweisen, wurden zwei aufeinander folgende PCR-Reaktionen durchgeführt, da mit einem sehr geringen Anteil der gesuchten Sequenz an der Gesamtmenge der isolierten genomischen DNA gerechnet werden musste. In der ersten Reaktion wurden die Schritte für Dehybridisierung und *primer annealing* verlängert, um der speziellen Natur der genomischen DNA als *template* Rechnung zu tragen (Tab. 2.7). An das erste Programm wurde eine zweite Reaktion nach Standardprotokoll mit dem erhaltenen Reaktionsprodukt als *template* angeschlossen (Tab. 2.6).

Tabelle 2.7: Protokoll für die PCR-Reaktion an genomischer DNA

Reaktionsschritt		Temperatur	Zeit
Dehybridisierung		94°C	300 s
1. Reaktionszyklus, Wiederholung 10x	Dehybridisierung	94°C	60 s
	Primerhybridisierung	primerspezifisch	25 s
	Elongation	72°C	25 s
	Dehybridisierung	94°C	20 s
	Primerhybridisierung	primerspezifisch	25 s
	Elongation	72°C	25 s
2. Reaktionszyklus, Wiederholung 25x			
Elongation		72°C	600 s

2.2.4.5 Reverse Transkription der RNA

Reverse Transkription (RT-PCR, Tab. 2.8 und 2.9) wurde an aus den Organen der Versuchstiere isolierter Gesamt-RNA durchgeführt, um die erhaltene cDNA als *template* für quantitative *real-time* PCR (qRT-PCR) einzusetzen. Es wurden 1.000 ng (in Einzelfällen 500 ng) RNA für jede Reaktion eingesetzt.

Tabelle 2.8: Standardansatz für die RT-PCR (20 µl Volumen)

Reagenz	Vertreiber	eingesetztes Volumen
AMV-Puffer	Promega (Madison, USA)	4 µl
Random-Hexamer-Primer	Roche (Mannheim, Deutschland)	1 µl
10 mM dNTP	Roche (Mannheim, Deutschland)	1 µl
RNase Inhibitor	Roche (Mannheim, Deutschland)	0,8 µl
AMV Reverse Transkriptase	Promega (Madison, USA)	2 µl
Wasser-mRNA-Gemisch	1.000 ng mRNA-Konzentration	ad 20 µl

Tabelle 2.9: Standardreaktionsprogramm für die RT-PCR

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
Primerhybridisierung	25°C	10 min
Elongation	42°C	60 min
Dehybridisierung und Enzymdeaktivierung	99°C	5 min

2.2.4.6 Quantitative *real-time* PCR

Für die Durchführung der qRT-PCR wurde das SybrGreen-Kit von Qiagen (Hilden, Deutschland) im Lightcycler 1.5 von Roche (Mannheim, Deutschland) verwendet. Einzelansätze wurden mit 50 Volumenprozent Mastermix, 0,5 µmol *primer* sowie MgCl₂, Wasser und *complementary DNA* (cDNA) gemäß den durch den *primer* bedingten Reaktionsparametern angesetzt. Als *template* wurden 2 µl cDNA aus einer RT-PCR an Gesamt-RNA aus murinem Gewebe verwendet. Die Effizienzprüfung zur Bestimmung der Reaktionsbedingungen und *primer*-Qualität wurden über eine *template*-Verdünnungsreihe und Erstellung einer Kurve der Ct Werte durchgeführt. Der akzeptable Effizienzbereich wurde als Steigung der Effizienzkurve von $2,00 \pm 0,5$ festgelegt. Die *template* Konzentration wurde relativ gegen ein *housekeeping*-Gen bestimmt und in *arbitrary units* angegeben.

2.2.4.7 Agarose-Gelelektrophorese

DNA wurde in 1% Agarose-Gel in 1x TAE-Puffer getrennt. RNA wurde in einem denaturierenden Gel (1% Agarose, 6% Formaldehyd, 10% 10x MOPS-Puffer) in 1x MOPS-Puffer getrennt. Die Dokumentation wurde mit einem Genelink Gel-Dokumentationssystem (Syngene, Cambridge, Großbritannien) durchgeführt. Als Größenmarker wurden GeneRuler DNA Marker 100 bp oder 1 kb verwendet (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland).

2.2.4.8 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Konzentration und Qualität von Nukleinsäuren wurden mit dem Nanodrop-ND-1000 System von Peqlab (Erlangen, Deutschland) bestimmt. Das Nanodrop-System ist ein spezifisch für die Quantifizierung von Nukleinsäuren und Proteinen in wässriger Lösung angepasstes computergestütztes Photometer, das ohne Verwendung von Küvetten arbeitet. Die Messungen erfolgen an ein bis zwei Mikrolitern der zu messenden Probe. Das System ermittelte die Absorption bei 260 nm und 280 nm sowie ein Absorptionsspektrum von 220 nm bis 350 nm, um Verunreinigungen zu entdecken. Die Berechnung der Nukleinsäurekonzentration erfolgt automatisch durch die integrierte Software.

2.2.5 Histologie und Immunhistologie

2.2.5.1 Gefrierschnitt-Histologie

Die den Versuchstieren entnommenen Pfoten, Lymphknoten und Milzen wurden in vorgefertigten

Formen mit Tissue-Tek O.C.T. Medium (Sakura Finetek, Staufen, Deutschland) eingebettet, auf flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C gelagert. Schnittpräparate der so erhaltenen Blöcke wurden auf einem Kryostat CM3050S (Leica, Wetzlar, Deutschland) angefertigt und auf Superfrost-Objektträger (Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland) aufgebracht.

2.2.5.2 Paraffinschnitt-Histologie

Um die Gelenkzerstörung auf histologischer Ebene zu bewerten, wurde von allen Versuchstieren jeweils die rechte Hinterpfote in Paraffin eingebettet, gefärbt und mit einem Laser Microbeam Mikroskop und der PALM RoboSoftware (beides Carl Zeiss AG, Göttingen, Deutschland) ausgewertet. Die entnommene Pfote wurde 24 Stunden in Formalin fixiert, 1 Woche in 20% ETDA-Lösung dekalifiziert, in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50%, 70%, 96%, 100%, jeweils 1 h) dehydriert und abschließend in Xylol gespült (dreimal je 1 h). Dann wurden drei Wechsel von Paraplast (McCormick Scientific, St. Louis, USA) bei 60°C durchgeführt, ebenfalls für je eine Stunde bzw. über Nacht für den letzten Wechsel. Abschließend wurden die Pfoten in auf 60°C erwärmtem Paraplast in Einbettformen (Polysciences, Eppelheim, Deutschland) oder Einbettkassetten (Medite Medizintechnik, Burgdorf, Deutschland) positioniert und bei Raumtemperatur gelagert. Um die für die Auswertung der arthritischen Veränderungen der Gelenke notwendige Qualität der Schnittpräparate zu gewährleisten, wurden die Schnitte von einem erfahrenen Mitarbeiter des Instituts für Pathologie der Universität Giessen erstellt.

2.2.5.3 Immunhistochemischer Nachweis von eGFP

Gefrierschnittpräparate der Pfoten, Milzen und Lymphknoten wurden für 5 Minuten bei Raumtemperatur in PBS gewaschen. Für die Blockierung unspezifischer Bindungen wurde Ziegennormalserum (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) im Verhältnis 1:10 verdünnt und für alle folgenden Schritte, die unter Zusatz von Normalserum stattfanden, eingesetzt. Die PBS-gewaschenen Objektträger wurden mit einem Papiertuch getrocknet und die Präparate mit verdünntem Ziegennormalserum bedeckt. Nach 30 Minuten Inkubation wurde das Normalserum mit einem Papiertuch abgenommen und durch eine in Normalserum verdünnte Antikörperlösung ersetzt. Als Primärantikörper wurde ein Maus-anti-GFP Antikörper (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) eingesetzt (1:50 Verdünnung in Normalserum, 1 h Inkubation). Nach Waschen der Objektträger (3 x 5 min. in PBS bei Raumtemperatur) wurden die Präparate mit Histofine Simple Stain Anti-Mouse and Rabbit (Nichirei, Tokyo, Japan), einem Polymer-Antikörper-HRP-Komplex, der als Sekundärantikörper diente, bedeckt. Nach Inkubation von 45 Minuten bis zu 2 Stunden wurden die Objektträger erneut gewaschen (3 x 5 min. in PBS, Raumtemperatur). Die Nachweisreaktion wurde mit dem Vectastain

AEC-Substrate Kit oder dem DAB-Substrate Kit (beide Vector Laboratories, Burlingame, USA) nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die Farbentwicklung wurde mit einem Mikroskop (Leica DMIRB, Leica, Wetzlar, Deutschland) beobachtet und durch Spülen in PBS beendet.

2.2.5.4 Hämatoxylin/Eosin- und Giemsa-Färbungen

Ungefärbte Gefrierschnittpräparate wurden bei Raumtemperatur für 5-10 Minuten in Hämatoxylin-Färbelösung inkubiert, kurz in Leitungswasser gespült und in Eosin-Färbelösung überführt. Nach erneutem kurzen Spülen in Leitungswasser wurden die Objektträger durch eine Alkoholreihe geführt (50%, 70%, 80% und 96% EtOH, anschließend 3x Xylol, je Einzelschritt 5 min.) und mit Entellan-Einschlußmedium (Merck, Darmstadt, Deutschland) eingedeckelt.

Immunhistochemisch gefärbte Gefrierschnittpräparate wurden für 5-10 Minuten in Hämatoxylin-Färbelösung inkubiert, in Leitungswasser kurz entfärbt und mit Aquatex-Einschlußmedium (Merck) eingedeckelt.

In Paraffin eingebettete Schnittpräparate wurden mit kommerziell erhältlicher Giemsa-Färbelösung (Merck) gefärbt. Die Objektträger wurden bei Raumtemperatur für 3 - 5 Minuten in Methanol gespült, anschließend mit 1 : 10 in Wasser verdünnter Giemsa-Färbelösung bedeckt, dann mehrfach kurz in frischem PBS gespült und getrocknet, abschließend mit Aquatex (Merck) eingedeckelt.

2.2.5.5 Berlinerblau Färbung

Der Nachweis von mit Eisenpartikeln beladenen humanen DC in Gefrierschnittpräparaten humaner Synovialimplantate aus SCID-Mäusen wurde mit der Berlinerblau Reaktion geführt. Dazu wurde das kommerziell erhältliche Färbesystem Berlinerblau, Eisen(III)-Nachweis (Baack Laborbedarf, Schwerin, Deutschland) verwendet. Die enthaltenen Reagenzien umfassen eine 5% Kaliumhexacyanoferrat(II)-Lösung und 10% Salzsäurelösung für die Nachweisreaktion der eisenhaltigen Partikel (Blaufärbung) sowie eine Kernechtrotlösung zur Färbung der Zellbestandteile in verschiedenen Rotabstufungen gemäß ihres pH-Wertes.

2.5.5.6 Digitale Bildanalyse

Zwecks Bestimmung des Ausmaßes der histologischen Gelenkzerstörung wurden die Bildung aktivierte Synoviums, die Größe der erosiven Knochenveränderungen sowie das Ausmaß der artikulären Knorpeldegradation untersucht. In verschiedenen publizierten Studien wurden für die histologische Analyse semiquantitative Beurteilungssysteme verwendet, bei denen die genannten Parameter in der Regel als leicht, mittelgradig oder schwer bewertet werden. Diese Systeme sind jedoch we-

sentlich von der Erfahrung des Untersuchers abhängig und die Schweregrade weniger eindeutig definiert als beispielsweise das in Abschnitt 2.2.2.1 dargestellte Bewertungssystem für den klinischen Schweregrad der CIA. Daher wurde eine digitale Bildanalyse angewendet. Dazu wurden die Paraffinschnitte der jeweils rechten Hinterpfoten der Versuchstiere mit dem digitalen Kamerasystem eines Palm MicroBeam Laser-Mikrodissektions-Mikroskop (Carl Zeiss AG, Göttingen, Deutschland) aufgenommen und in mehreren Schnitten jeweils verschiedene Flächenmaße mithilfe der zugehörigen Palm RoboSoftware bestimmt (Abb. 2.2). Diese Flächenmaße umfassten im einzelnen die Gesamtfläche verschiedener Gelenke (oberes Sprunggelenk, Talonavikulargelenk und ein Metatarsophalangeal- oder Interphalangealgelenk), die Fläche des aktivierten Synovialgewebes, die Flächen der einzelnen knöchernen Erosionen, die Gesamtfläche des artikulären Knorpels in den jeweiligen genannten Gelenken (violett in der Giemsa-Färbung) sowie die Fläche der Knorpelareale mit Matrixdegradation (Verlust der Giemsa-Färbung). Die Flächenmaße des aktivierten Synoviums und die addierten Flächenmaße der einzelnen Erosionen eines Gelenks wurden in Relation zur gesamten Fläche des jeweiligen Gelenks gesetzt, um eine Vergleichbarkeit zwischen großen und kleinen Gelenken zu ermöglichen. Die Fläche des degradierten Knorpels wurde dagegen für die einzelnen Gelenke in Relation zur Fläche des gesamten Knorpels des Gelenks gesetzt. Die erhaltenen prozentualen Messwerte für die Parameter aktiviertes Synovium, Erosion und Knorpeldegradation wurden dann zum Vergleich der Behandlungsgruppen eingesetzt.

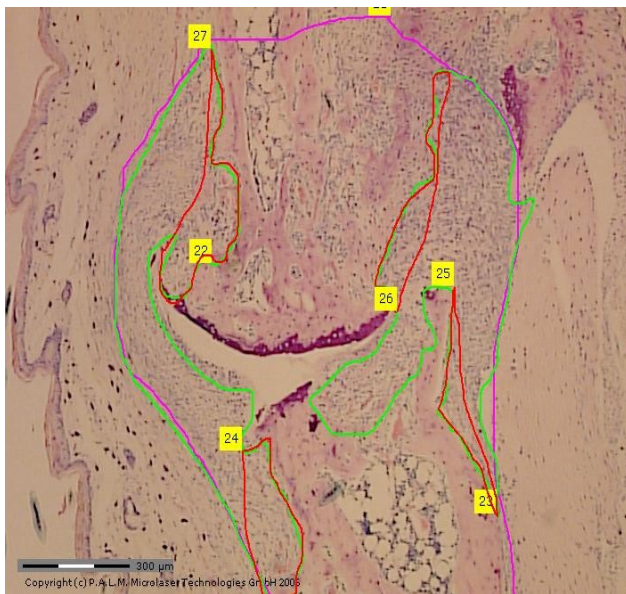


Abbildung 2.2: Histologische Analyse der Gelenkdestruktion durch Computer-gestützte Flächenmessung am Beispiel eines Metatarsophalangealgelenks. Markierung der zu bewertenden Flächen: Pink umrahmte Abschnitte markieren die Gesamtfläche des Gelenks, grün die Pannusfläche, rot die erodierten Bereiche der Knochen. Die Markierung zerstörten Knorpels wurde in einer anderen Vergrößerungsstufe vorgenommen und ist hier nicht gezeigt. Paraffinschnitt, Giemsa-Färbung, 50fache Vergrößerung.

2.2.6 Western Blot

Da kein kommerzieller ELISA für Galectin-1 zur Verfügung steht, wurde die Expression von Galectin-1 in der Kultur durch transduzierte BM-DC im Western Blot geprüft. Ein SDS-Gel (Sammegel) wurde in einer Bio-Rad Gelapparatur (Bio-Rad, München, Deutschland) angesetzt. 25 µl Kulturüberstand transduzierter BM-DC der drei Transduktionsgruppen, der 48 h nach der Transduktion abgenommen wurde, und 5 ng rekombinantes Galectin-1 wurden in SDS Probenpuffer aufgenommen und auf das Gel aufgetragen. Nach einem Gel-Lauf von 3 Stunden in SDS-Laufpuffer wurde das Gel in die Bio-Rad *semi-dry blotting* Apparatur überführt, um die Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran zu übertragen. Die PVDF-Membran wurde vor Aufbau der *blotting* Apparatur in 100% Methanol benetzt und in 1x CAPS-Puffer gelagert. Nach etwa einer Stunde wurde die *blotting* apparatur demontiert und das Gel in TBS-T Puffer mit Roti-Block (Roth, Karlsruhe, Deutschland) für 1 bis 2 Stunden bei 4°C inkubiert. Ein in frischem TBS-T Puffer/Roti-Block verdünnter anti-Galectin-1 Antikörper (1µg/ml, R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland) wurde danach für eine Inkubation unter leichter Agitation über Nacht auf die Membran gegeben. Am folgenden Tag wurde die Membran dreimal in TBS-T Puffer/Roti-Block gewaschen. Ein HRPO-gekoppelter sekundärer Antikörper (BD Biosciences, Erembodegen, Belgien) wurde 1:200 in TBS-T Puffer/Roti-Block verdünnt zu der Membran gegeben und für 2 Stunden bei -4°C auf einem Rollmixer inkubiert. Abschließend wurde die Membran dreimal mit TBS-T Puffer/Roti-Block gewaschen. Die Nachweisreaktion wurde mit ECL Plus (GE Healthcare, München, Deutschland) durchgeführt.

2.2.7 ELISA

Es wurden *sandwich*-ELISA mit ELISA-Komplettsets für TNF α , IL-12 (beide R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland) und anti-Kollagen Typ II Antikörper (MD Biosciences, Egg bei Zürich, Schweiz) gemäß der Protokolle der Hersteller durchgeführt. Für die Untersuchungen an Serum der Versuchstiere wurde unmittelbar vor der Euthanasie Blut aus dem retroorbitalen Venenplexus in Eppendorfgefäße entnommen und zentrifugiert (10.000 g, 5 min.). Das gewonnene Serum wurde bis zur Analyse bei -20° C gelagert.

2.2.8 Durchflußzytometrie

Durchflußzytometrie (*fluorescence activated cell sorting*, FACS) wurde zur Überprüfung der Transfektionseffektivität und Transduktionseffektivität, sowie zur Analyse des Phänotyps der DC

anhand ihrer Oberflächenmarker verwendet. Es stand ein FACSCalibur Durchflußzytometer mit der Software Cellquest Pro (beides BD Biosciences, San Jose, USA) zur Verfügung.

Während der Virusernte (vgl. Abschnitt 2.2.3.2 und 2.2.3.3) wurden Aliquots der HEK 293T Zellen getrennt nach Transfektionsgruppe in FACS-Puffer aufgenommen, zweimal gewaschen (300 g, 5 min.) und in FACS-Puffer resuspendiert. In der Durchflußzytometrie wurde der Anteil eGFP-exprimierender Zellen bestimmt.

Während der Ernte der transduzierten murinen BM-DC wurden vor dem adoptiven Zelltransfer (vgl. Abschnitt 2.2.3.6) Aliquots der transduzierten DC getrennt nach Transduktionsgruppe abgesondert und zweimal in FACS-Puffer gewaschen (400 g, 5 min.). Die Zellen wurden in 500 µl FACS-Puffer resuspendiert und fünffach aliquotiert. Den Einzelansätzen wurden jeweils PE-markierte Antikörper gegen CD11c, anti-CD80 oder anti-CD86 oder ein unmarkierter anti-MHC II Antikörper (Verdünnung 1:100, Inkubation 30 min. auf Eis; alle Caltag, Burlingame, USA) zugesetzt. Der anti-MHC II-Antikörper wurde in einem zweiten Schritt mit einem PE-gekoppelten Sekundärantikörper (BD Biosciences, Erembodegen, Belgien) inkubiert (15 Minuten auf Eis). In der Durchflußzytometrie wurden anhand der Antikörperbindung der Phänotyp und anhand der eGFP-Fluoreszenz die Transduktionseffizienz bestimmt.

Mit Resovist markierte humane DC (vgl. Abschnitt 2.2.1.5) wurden analog den murinen DC mit Antikörpern gegen CD14 (Acris Antibodies, Hiddenhausen, Deutschland), CD80, CD83, CD86 oder MHC II (Caltag) markiert. In der Durchflußzytometrie wurde anhand der Antikörperbindung der Phänotyp der huDC analysiert.

2.2.9 Statistik

Die Auswertung der klinischen Krankheitsaktivität zeigte eine überwiegende Verteilung der Werte auf die Extremwerte des Wertungssystems und eine breite Streuung der Werte innerhalb der einzelnen Behandlungsgruppen. Damit konnte nicht von einer Normalverteilung der untersuchten Populationen ausgegangen werden, so dass ein nicht-parametrischer statistischer Tests erforderlich war. Die niedrigen Fallzahlen in den Behandlungsgruppen und die breite Streuung der Werte sowohl in der klinischen als auch in der histologischen und molekularen Analyse führten zum Einsatz des Brown-Mood-Median-Test. Dieser Test besitzt zwar eine niedrige Teststärke, ist bei niedrigen Fallzahlen kombiniert mit großen Unterschieden in den Werten jedoch anderen Verfahren wie dem Mann-Whitney-U-Test vorzuziehen. Die Nullhypothese des Median-Tests lautet auf keinen Unter-

schied zwischen den Medianen verschiedener Stichproben. Ein p-Wert unter 0,05 bedeutet damit einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den verglichenen Versuchsgruppen. In der graphischen Darstellung der Ergebnisse wurden jeweils die Mediane der Versuchsgruppen und die Standardabweichung angegeben. Der Mediantest wurde mit der Software Biostat von AnalystSoft (Vancouver, Kanada) durchgeführt. Die Standardabweichung wurde mit dem Programm Calc (Sun Microsystems, Santa Clara, USA) bestimmt.

3. Ergebnisse

3.1 Transduktion der Vehikelzellen und Expression des inserierten genetischen Materials

Erste Vorversuche wurden mit dem retroviralen Viruskonstrukt pGC (Costa *et al.*, 2000) durchgeführt, welches von einem früheren Projekt des Arbeitsgruppenleiters übernommen wurde (Tarner *et al.*, 2002). Die mit diesem Vektor erreichten Transduktionsraten in murinen BM-DC von maximal 15 Prozent waren jedoch für die geplanten Experimente der vorliegenden Arbeit unzureichend. Um die Transduktionsrate zu verbessern, sollte zunächst ein in der Arbeitsgruppe etabliertes kommerzielles Vektorkonstrukt verwendet werden, das Adenovirus-basierte AdEasy Vektorsystem (QBiogene, Illkirch, Frankreich). Dieser Vektor transduziert Säugerzellen zuverlässig und mit hoher Effizienz. Die Klonierung des Vektorkonstrukts Ad-anti-TNF-scFv erwies sich jedoch in der Durchführung als unerwartet zeit- und kostenintensiv, so dass dieser Ansatz nicht weiter verfolgt wurde.

Stattdessen wurden die Experimente letztlich mit dem lentiviralen Vektorkonstrukt pHR-IG durchgeführt (vgl. Abb. 2.1). Im Gegensatz zu dem adenoviralen Konstrukt bietet es den Vorteil, dass das transduzierte genetische Material nicht episomal verbleibt, sondern dauerhaft in das Genom der Empfängerzelle integriert wird. Mit allen drei hergestellten Vektoren pHR-anti-TNF scFv, pHR-IL-12 p40 und pHR-Gal1 konnten die murinen BM-DC erfolgreich transduziert werden. Dabei variierten die durchflusszytometrisch anhand der eGFP-Expression bestimmbaren Transduktionsraten in Abhängigkeit vom in den Vektor inserierten inserierten genetischen Material zwischen ca. 20 - 30% für IL-12p40, 30 - 40% für anti-TNF scFv und 50 - 80% für Galectin-1 (Abb. 3.1).

Diese Variabilität der Transduktionsraten stellte sich in Verbindung mit anderen Faktoren als eine wesentliche Schwierigkeit bei den Experimenten heraus. Hinzu kam, dass die Ausbeute an BM-DC etwa $3 - 5 \times 10^6$ Zellen pro Knochenmark-Spendertier betrug. Diese relativ geringe Zellzahl, eine mangelnde Proliferation der DC *in vitro* sowie Verluste bei der Zellernte am Ende der Kultur führten zu einem hohen Bedarf an Spendertieren. Um in Anbetracht der variablen Transduktionsraten eine hinreichende Zahl an DC zur Verfügung zu haben und protokollgemäß 1×10^6 transduzierter DC pro Empfängertier adoptiv transferieren zu können, ergab sich ein notwendiges Verhältnis von Spender- zu Empfängertieren von mindestens 1 : 1,5. Durch die Variabilität der lentiviralen Transduktionsraten war es zudem zu Beginn eines Experiments nicht möglich, die effektiv verfügbare Zahl transduzierter Zellen für die einzelnen Behandlungsgruppen vorauszusehen. Dementsprechend mussten in jedem Experiment die Behandlungsgruppen anhand der verfügbaren transduzierten Zellen zusammengestellt werden, um jeden Empfängertier die geplante Menge von 1×10^6 transduzierten Zellen adoptiv transferieren zu können. Dementsprechend ergab sich für die Experi-

mente CIA1-CIA6 die in Tabelle 3.1 dargestellte heterogene Zusammensetzung von Behandlungsgruppen mit jeweils unterschiedlichen Gruppengrößen zwischen 2 und 12 Tieren.

Tabelle 3.1: Auflistung der Behandlungsgruppen in den Einzelexperimenten CIA1-CIA6

Experiment	Monotherapie	Zweifach-Kombination	Dreifach-Kombination
CIA1	anti-TNF scFv (n = 3) Galectin-1 (n = 3) IL-12p40 (n = 2) Plazebo (n = 10)	anti-TNF scFv + IL-12p40 (n = 5) Galectin-1 + IL-12p40 (n = 5) Galectin-1 + anti-TNF scFv (n = 3)	--
CIA2	Galectin-1 (n = 7) Plazebo (n = 5)	--	--
CIA3	anti-TNF scFv (n = 12) Plazebo (n = 11)	anti-TNF + IL-12p40 (n = 12)	--
CIA4	-- Plazebo (n = 7)	anti-TNF + IL-12p40 (n = 7) Galectin-1 + IL-12p40 (n = 7) Galectin-1 + anti-TNF scFv (n = 7)	--
CIA5	-- Plazebo (n = 10)	Galectin-1 + IL-12p40 (n = 7)	Galectin-1 + anti-TNF scFv + IL-12p40 (n = 10)
CIA6	Galectin-1 (n = 4) Plazebo (n = 5)	anti-TNF scFv + IL-12p40 (n = 4) Galectin-1 + IL-12p40 (n = 4)	--

Trotz der variablen Transduktionseffizienz zeigte sich für die erfolgreich transduzierten Zellen eine robuste Produktion der transgenen Proteine. Um die Größenordnung der Proteinexpression zu bestimmen, wurde für pHR-Gal1 und pHR-IL-12 p40 das exprimierte Produkt im Kulturmedium vor der Injektion in die Versuchstiere mittels ELISA bzw. Western Blot bestimmt. Abbildung 3.2 zeigt ein repräsentatives Beispiel für die Expression von IL-12p40 (ca. 800 ng/ml/1x10⁶ Zellen/24h) und anti-TNF scFV (ca. 10 ng/ml/1x10⁶ Zellen/24h)

Da das Migrationsverhalten der BM-DC in Abhängigkeit vom Reifungsgrad der Zellen variiert, wurde zusätzlich untersucht, ob die lentivirale Transduktion einen Einfluß auf den Phänotyp der Zellen ausübt. Die durchflußzytometrische Analyse zeigte eine Zunahme der Expression der costimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 sowie des für die Antigen präsentierende Funktion der DC essentiellen MHC II (Abb. 3.3), was einer Induktion der Zellreifung durch den Transduktionsprozeß entspricht.

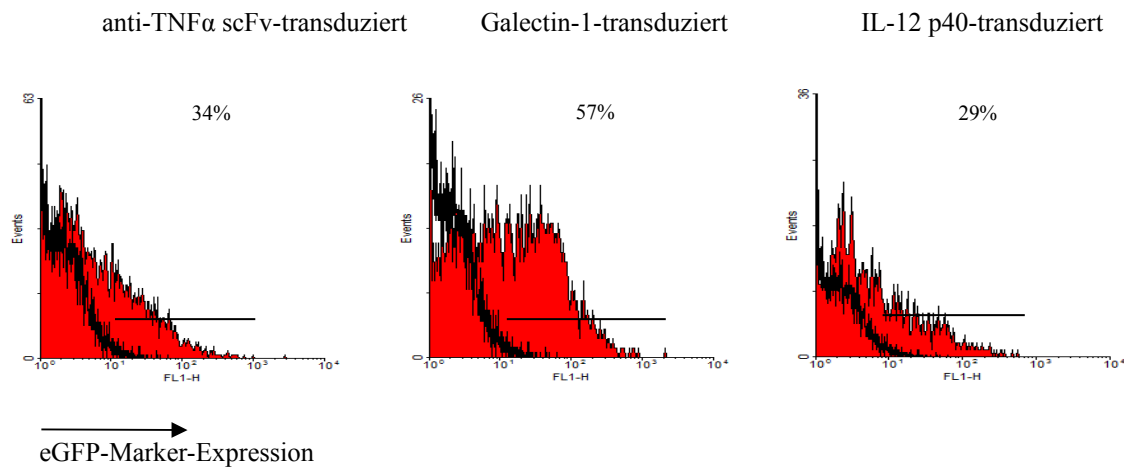


Abbildung 3.1: Transduktionseffizienz des lentiviralen Vektors pHR-IG in murinen BM-DC. Die Transduktionsrate wurde durchflußzytometrisch anhand der Expression des Markers eGFP (rot hinterlegtes Histogramm) gegenüber untransduzierten BM-DC (schwarze Histogrammlinie) bestimmt und zeigt eine Variabilität in Abhängigkeit vom jeweiligen Insert (anti-TNF scFv, Galectin-1 oder IL-12p40).

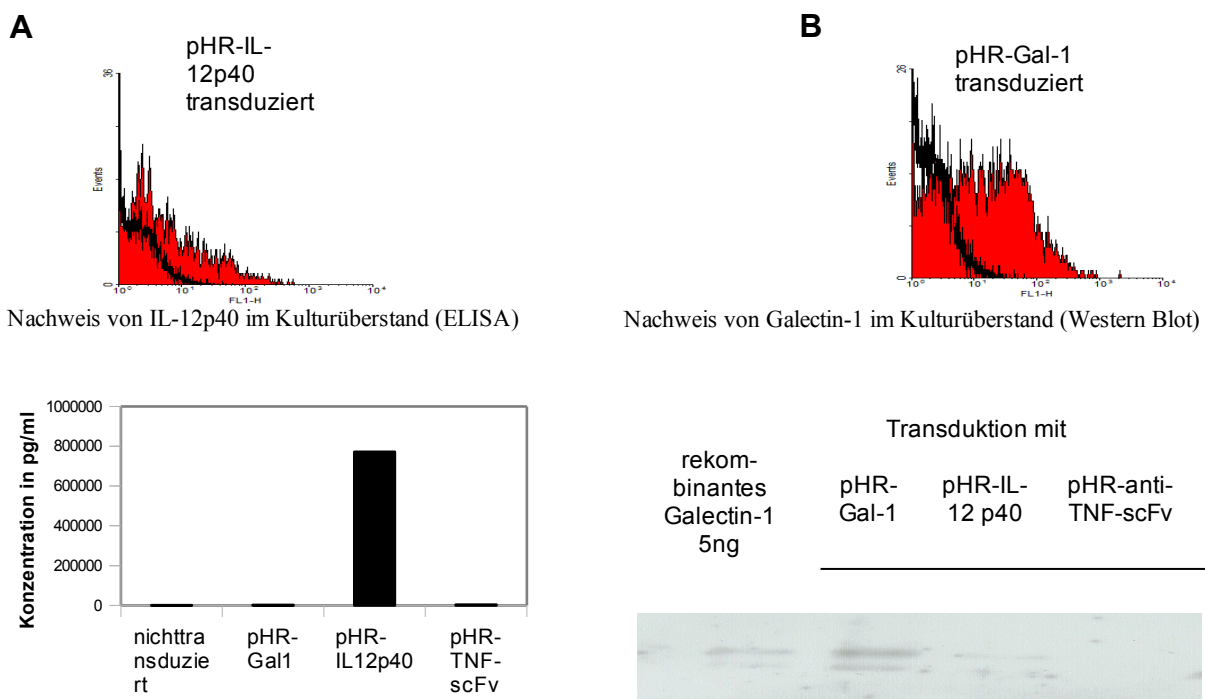
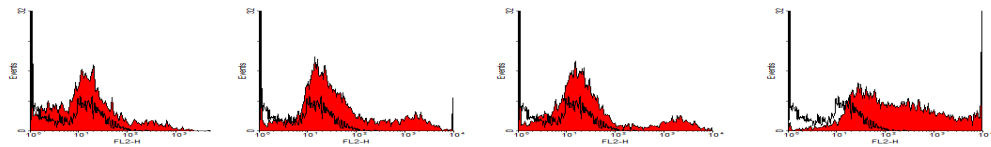
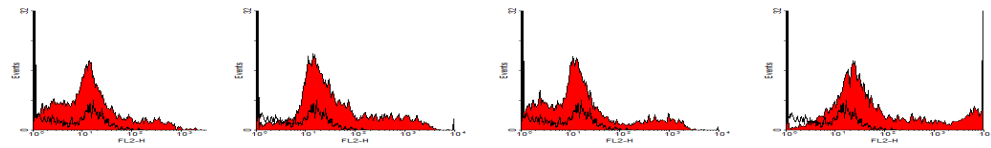


Abbildung 3.2: Markergen- und Insertexpression in lentiviral transduzierten BM-DC in einem repräsentativem Experiment. **(A)** Durchflußzytometrie und ELISA zur Bestimmung der IL12p40 Expression. Die erhaltenen Konzentrationswerte wurden auf 1×10^6 Zellen pro ml Medium und 24 Stunden normalisiert. **(B)** Durchflußzytometrie und Western Blot zur Bestimmung der Galectin-1 (Gal1) Expression. Für die Messungen wurde der Kulturüberstand am Tag des adoptiven Zelltransfers in die Versuchstiere verwendet.

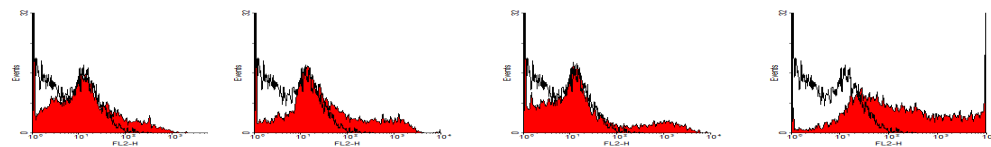
Kontrolle



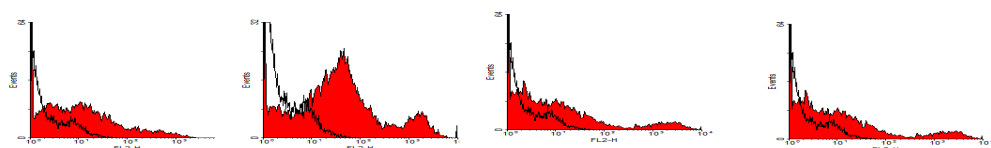
pHR-Gal1



pHR-IL-12p40



pHR-anti-TNF scFv



CD11c

CD80

CD86

MHC II

Abbildung 3.3: Einfluss der lentiviralen Transduktion auf den Phänotyp muriner BM-DC. Durchflußzytometrische Analyse unmittelbar vor Injektion in die Versuchstiere (48 h nach Transduktion) in einem repräsentativem Experiment. Die schwarzen Histogrammlinien zeigen die Isotyp-Kontrolle, die roten Histogrammflächen repräsentieren die jeweilige Expression des DC-Markers CD11c, der costimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 sowie des Antigen-präsentierenden MHC II.

3.2 Untersuchung des Migrationsverhaltens der DC

Das Konzept des ACGT setzt eine eigenständige Migration, das *homing*, der Vehikelzellen an den Krankheitsherd und eine längere Verweildauer als Produzenten der therapeutischen Proteine voraus. Dementsprechend war der Nachweis dieser Eigenschaften bei den transduzierten DC eine wesentlicher Aspekt dieser Arbeit.

Die Lokalisation der adoptiv transferierten DC in den Empfängertieren erfolgte am Ende des 30tägigen Beobachtungszeitraums nach Zelltransfer histologisch anhand des Markerproteins eGFP. Der fluoreszenzmikroskopische Nachweis des eGFP ergab aufgrund einer hohen Hintergrund-Fluoreszenz des für die Gefrierschnitt-Histologie nicht entkalkten knöchernen Gewebes keine eindeutigen Ergebnisse. Stattdessen gelang der Nachweis immunhistochemisch unter Verwendung eines anti-GFP Antikörpers.

Interessanterweise wurden die GFP-Signale im Experiment CIA1 vor allem im Bereich des subku-

tanen entzündlichen Zellinfiltrats sowie intraartikulär in der Nähe erosiver Knochenveränderungen detektiert (Abb. 3.4 A und B).

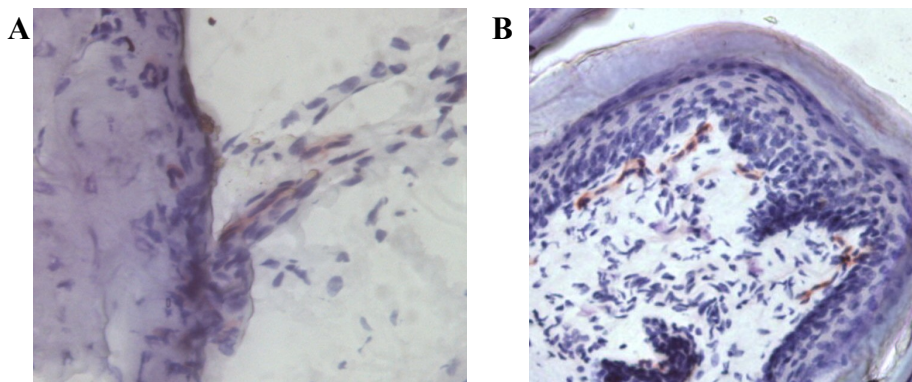


Abbildung 3.4: Immunhistologischer Nachweis von eGFP Expression in den Pfoten CIA-erkrankter Mäuse. (A) eGFP subkutan, im Bereich der entzündungsbedingten Schwellung. (B) eGFP im entzündeten Synovium in unmittelbarer Nachbarschaft zum artikulären Knochen. Vergrößerung x200, Kryoschnitt, Hämatoxylinfärbung, Nachweis mit HRP und DAB.

Allerdings gelang es in keinem der folgenden Experimente (CIA2 – CIA6), dieses Ergebnis zu reproduzieren. Eine Expression von eGFP war in keinem der histologischen Präparate aus diesen Experimenten nachweisbar. Daher wurde als alternative Methode ein Nachweis der für den lentiviralen Vektor charakteristischen *Rev response element* (RRE, vgl. Abb. 2.1) Sequenz sowie der eGFP Sequenz aus der genomischen DNA der Pfoten und lymphatischen Organe versucht. Die PCR erbrachte jedoch keinen positiven Nachweis des transferierten genetischen Materials, weder für Experiment CIA1, noch für die Folgeexperimente. Der Grund dafür ist möglicherweise ein zu geringer Anteil des Genoms der transferierten Zellen an der gesamten genomischen DNA der untersuchten Gewebe, da auch eine Wiederholung des ursprünglichen PCR-Zyklus mit dem Amplifikat keinen spezifischen Nachweis erbrachte. Anhand dieser Ergebnisse kann nicht zwischen einem silencing des CMV Promoters des lentiviralen Vektors und einem vorzeitigen Zelltod der adoptiv transferierten DC unterschieden werden.

Eine mögliche Übertragung des hier untersuchten Ansatzes des ACGT auf den Menschen erfordert den Nachweis einer Eignung menschlicher DC als Vehikelzellen. Zu diesem Zweck wurde auch die Migration humaner DC in rheumatisches Gelenkgewebe im SCID-Mausmodell der RA untersucht. Für das *homing*-Experiment wurden aus CD14⁺ Vorläuferzellen des peripheren Bluts kultivierte humane DC mit Eisenpartikeln beladen. Diese Art der Markierung ist mit erheblich weniger Aufwand als die Transduktion durchzuführen und erlaubt einen histologischen Nachweis adoptiv transferierter Zellen mit einer einfachen Berlinerblau Färbung. Die Partikel-beladenen Zellen

wurden den Versuchstieren 2 Wochen nach Implantation des Humangewebes *i.p.* verabreicht. Jeweils eine und drei Wochen nach Zelltransfer wurden die humanes Gewebe enthaltenden Synovialimplantate sowie Leber und Milz der SCID-Mäuse entnommen und auf ihren Gehalt Partikel-beladener Zellen untersucht.

Auch nach dem maximalen Beobachtungsraum von 21 Tagen konnten eisenbeladene Zellstrukturen dargestellt werden (Abb. 3.2). Im humanen Synovialimplantat konnten zahlreiche partikelhaltige Zellen im Bereich der RASF-vermittelten Knorpeldestruktion nachgewiesen werden, d.h., in dem Bereich, der für eine therapeutische Anwendung des ACGT das Ziel darstellt (Abb. 3.2 A). Leber und Milz enthielten ebenfalls zahlreiche transferierte Zellen, was mit der Annahme einer Migration der DC über den Blutkreislauf übereinstimmt (Abb. 3.2 B und C).

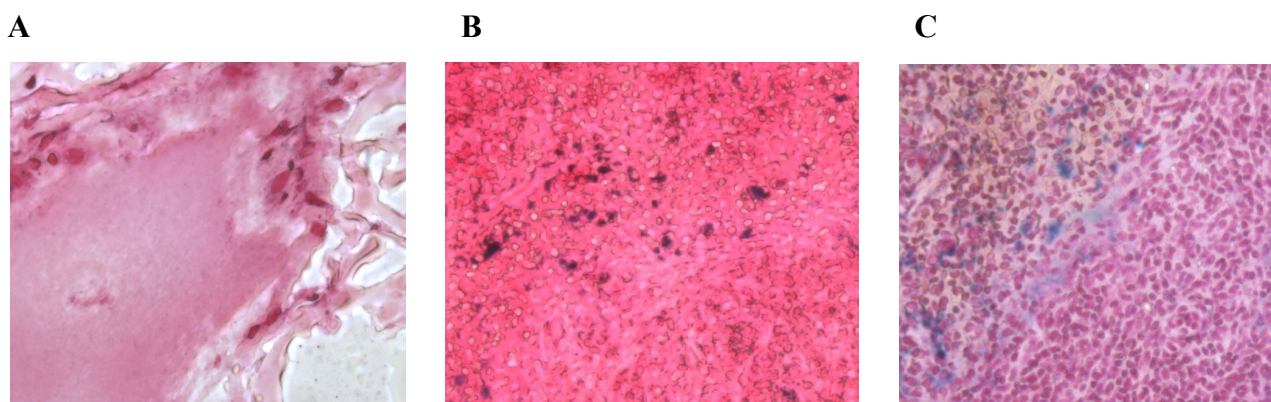


Abbildung 3.5: Berlinerblau Färbung Partikel-beladener humaner DC im SCID-Mausmodell der RA. Die ferromagnetischen Partikel sind blau gefärbt, die intensiv rote Färbung entspricht Zellkernen. (A) Humanes Synovialimplantat mit Nachweis transferierter DC im Bereich einer Erosion des humanen Knorpel durch RASF, 21 Tage nach Zellinjektion. (B) Milz, 21 Tage nach Zellinjektion. (C) Leber, 21 Tage nach Zellinjektion. Kryoschnitt, Gegenfärbung mit Kernechtrot, Vergrößerung 100x.

3.3 Wirkung des ACGT auf den Krankheitsverlauf im CIA Modell

Die Untersuchung der klinischen, histologischen und molekularen Wirksamkeit des ACGT erfolgte im etablierten Standardmodell der CIA. Die Immunisierung der Versuchstiere nach dem in Abschnitt 2.2.2.1 dargestellten Protokoll führte in allen Experimenten mit Ausnahme von CIA2 zu einer hohen Krankheitsinzidenz zwischen 82% und 97%, was für das CIA Modell üblich ist (Boissier *et al.*, 1987). Ausschließlich in Experiment CIA2 trat aus unklaren Gründen bei keinem der 12 Tiere eine Arthritis auf, so dass dieses Experiment nicht ausgewertet werden konnte.

In Abbildung 3.6 ist die Krankheitsaktivität jeweils links als Median der absoluten Schweregrade pro Behandlungsgruppe und rechts als Median des normalisierten Schweregrades pro Behandlungs-

gruppe angegeben. Der normalisierte Schweregrad errechnet sich als Differenz aus dem am Beobachtungstag bestimmten Wert und dem Ausgangswert am Tag des adoptiven Zelltransfers. Die Normalisierung ist erforderlich, um bei unterschiedlichen Ausgangs-Schweregraden zum Zeitpunkt des Therapiebeginns eine Vergleichbarkeit der weiteren Krankheitsentwicklung zwischen den Behandlungsgruppen zu ermöglichen.

Keine der verwendeten Monotherapien mit Galectin-1, IL-12 p40 und anti-TNF scFv zeigte einen erkennbaren Einfluss auf den Krankheitsverlauf. Ausschließlich im Experiment CIA6 wies die mit pHR-Galectin-1 behandelte Gruppe eine geringere Zunahme des normalisierten Schweregrads auf als die mit Placebo behandelten Tiere. Allerdings war der klinische Schweregrad bereits zu Beginn der Therapie relativ hoch und erreicht im Verlauf rasch den Höchstwert von 16, so dass eine weitere Progression nicht möglich war (Abb. 3.6 E). Diese Entwicklung wurde im Zeitverlauf durch die Therapie mit Galectin-1 nicht nachhaltig reduziert, und auch die Dynamik der Progression im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht verzögert. Somit ist letztlich nicht von einer tatsächlichen Wirkung der Galectin-1 Therapie auszugehen.

Bei der Untersuchung der Kombinationstherapien mit IL-12p40/anti-TNF scFv und Galectin-1/anti-TNF scFv zeigten sich ebenfalls keine lindernden Wirkungen auf den Krankheitsverlauf. Einzig bei den Experimenten mit der Kombination von Galectin-1 und IL-12p40 stellt sich anhand der normalisierten Schweregrade ein tendenziell milderer Krankheitsverlauf in den Experimenten CIA1, CIA4 und CIA5 dar. Die statistische Endpunktanalyse erbrachte für diesen Befund jedoch keine Signifikanz.

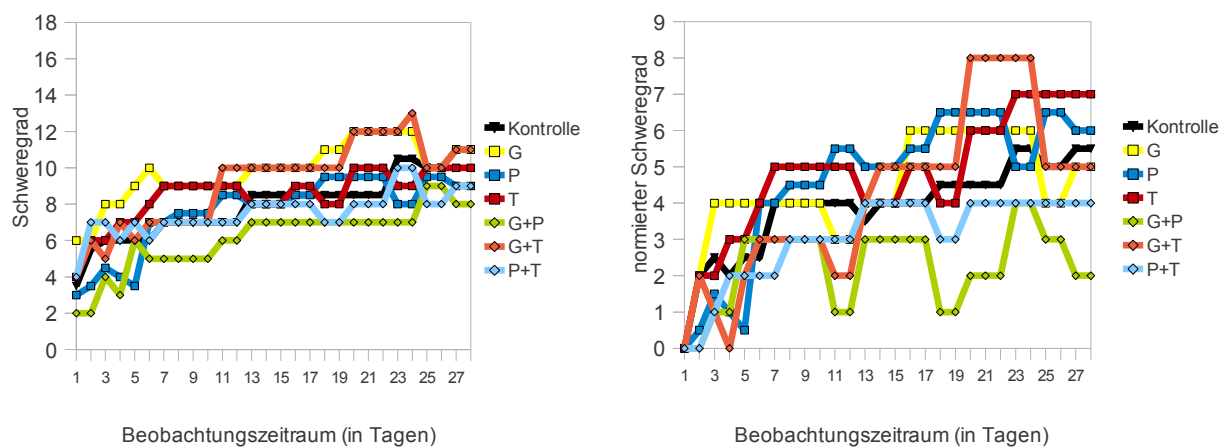
Im Experiment CIA5 war für die Kombination Galectin-1/IL-12p40 das gleiche Phänomen zu beobachten wie für die Galectin-1 Therapie in Experiment CIA6, indem der absolute Schweregrad zu Beginn der Behandlung bereits sehr hoch war und danach rasch auf einen Maximalwert nahe dem höchsten erreichbaren Wert von 16 stieg, ohne sich dann weiter zu verändern. Damit stellt sich bei der Endpunktanalyse für den normalisierten Schweregrad eine geringere Differenz im Vergleich zum Ausgangswert dar als in der Kontrollgruppe, in der der absolute Schweregrad ausgehend von einem niedrigen Anfangswert relativ weiter ansteigen konnte. In den Experimenten CIA1 und CIA4 zeigen die Verlaufskurven der absoluten Schweregrade für Galectin-1/IL-12p40 im Vergleich zur Kontrolle niedrigere Anfangs- und Endwerte, jedoch ansonsten eine vergleichbare Dynamik. Im Experiment CIA6 konnte zudem keine Wirkung für die Kombination aus Galectin-1 und IL-12p40 festgestellt werden.

Die Dreifachkombination von Galectin-1, IL-12p40 und anti-TNF scFv führte wie auch die Mono-

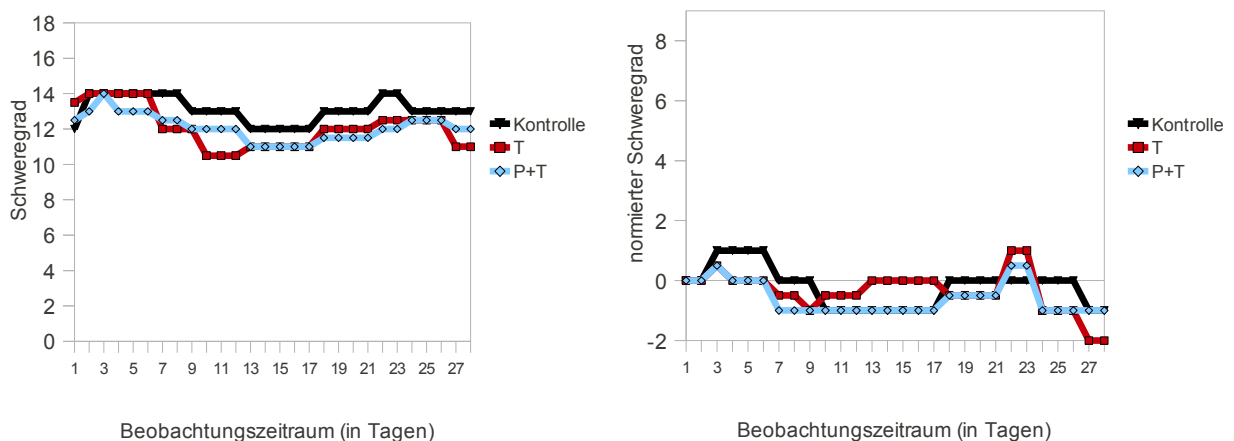
therapien und Zweifachkombinationen zu keiner Remission und auch nicht zu einer Verzögerung der klinischen Progression gegenüber der Kontrollgruppe. Insbesondere erbrachte die zusätzliche Gabe von anti-TNF scFv im Rahmen der Dreifachkombination keine verbesserte Wirkung gegenüber der Zweifachkombination von Galectin-1 und IL-12p40.

Da die statistische Auswertung durch die geringen Größen der Behandlungsgruppen eingeschränkt wurde, lässt sich abschließend nicht sicher beurteilen, ob es sich bei dem beobachteten Trend für die Kombinationstherapie aus Galectin-1 und IL-12p40 tatsächlich um eine geringfügige Wirkung oder um ein Artefakt handelt. Die oben genannten Einschränkungen sprechen gegen eine tatsächliche Wirksamkeit. Allerdings haben die histologischen und molekularen Auswertungen Befunde ergeben, die ebenfalls für eine, wenn auch geringe, Wirksamkeit der Behandlung mit Galectin-1 und IL-12p40 sprechen, wie im folgenden dargestellt wird.

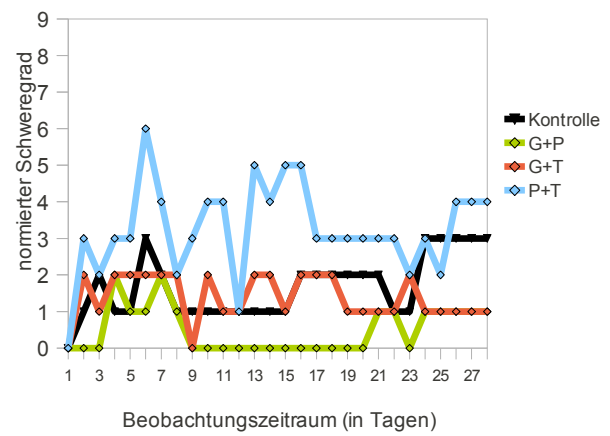
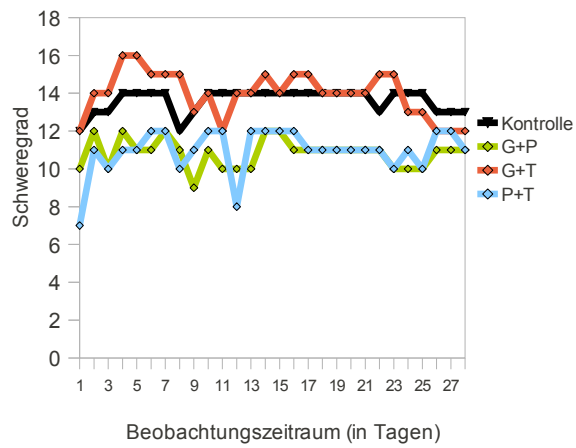
A CIA1



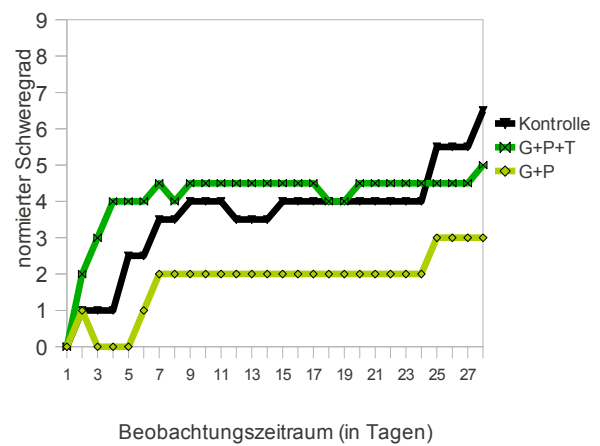
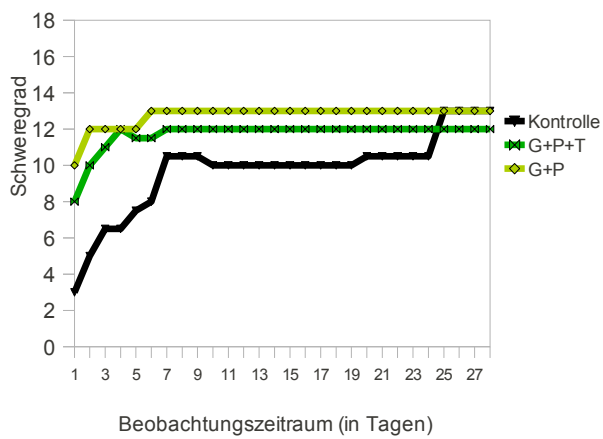
B CIA3



C CIA4



D CIA5



E CIA6

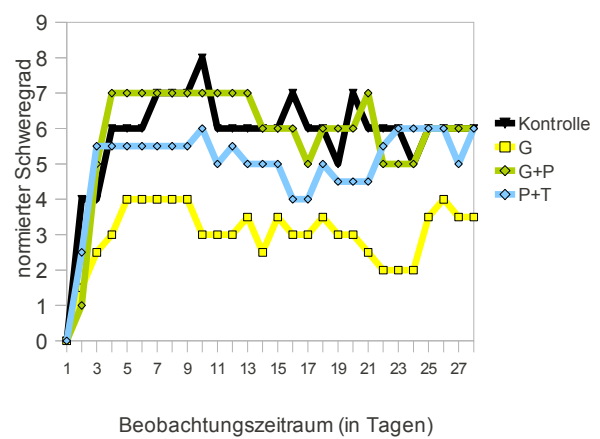
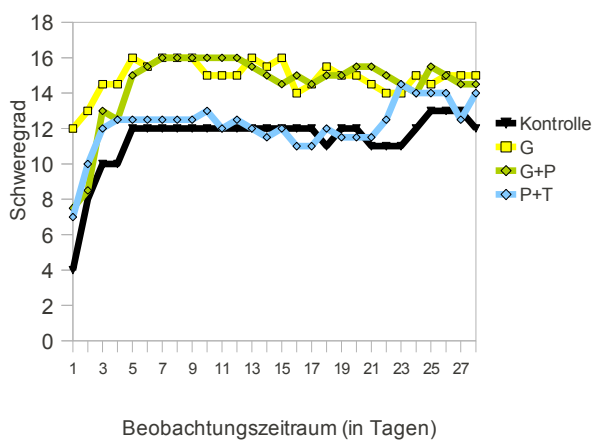


Abbildung 3.6: Verlauf des klinischen Schweregrads der CIA in den Einzelexperimenten. In der linken Spalte ist der Median der absoluten Schweregrade pro Behandlungsgruppe angegeben, rechts der Median der normalisierten klinischen Schweregrade pro Behandlungsgruppe. Der normalisierte Schweregrad wurde als die Differenz aus dem am Beobachtungstag bestimmten Schweregrad und dem Schweregrad am Tag des adoptiven Zelltransfers gebildet. Bezeichnungen der Behandlungsgruppen: **Kontrolle:** physiologische Kochsalzlösung; **P:** Monotherapie mit der IL-12 Unter-einheit p40, **T:** Monotherapie mit einem anti-TNF-scFv; **G:** Monotherapie mit Galectin-1; **P+T:** Kombinationstherapie mit IL-12p40 und anti-TNF-scFv; **G+P:** Kombinationstherapie mit IL-12p40 und Galectin-1; **G+T:** Kombinationstherapie mit anti-TNF-scFv und Galectin-1; **G+P+T:** Kombinationstherapie mit Galectin-1, IL-12p40 und anti- TNF-scFv. **(A)** Experiment CIA1: Kontrolle, n=10; P, n=2; T, n=3; pHR-Gal1, n=3; P+T, n=5; P+G, n=5; G+T, n=3. **(B)** Experiment CIA3: Kontrolle, n=11; T, n=12; P+T, n=12. **(C)** Experiment CIA4: Kontrolle, n=7; G+P, n=7; G+T, n=7; P+T, n=7. **(D)** Experiment CIA5: Kontrolle, n=10; G+P+T, n=10; G+P, n=7. **(E)** Experiment CIA6: Kontrolle, n=5; G+P, n=4; P+T, n=4; G, n=4. Experiment CIA2 konnte wegen mangelnder Arthritis-Inzidenz nicht ausgewertet werden.

3.4 Wirkung des ACGT auf die Gelenkdestruktion auf histologischer Ebene

Im Verlauf der RA kommt es im Gewebe der betroffenen Gelenke zu Veränderungen, die nach und nach zu einer Zerstörung der Gelenkstruktur führen. Diese Langzeitschäden zu verhindern, ist ein wesentliches Ziel der RA-Therapie. Um die Wirkung des ACGT auf die Gelenkzerstörung zu beurteilen, wurden histologische Präparate der entzündeten Gelenke untersucht. Erst bei Experiment CIA4 wurde mit Unterstützung durch das Institut für Pathologie der Universität Gießen bei den Paraffinschnitten eine hinreichende Qualität erreicht, die diese Auswertung ermöglichte. Daher standen ausschließlich die Daten der Experimente CIA4, CIA5 und CIA6 für die histologische Auswertung zur Verfügung (Abb. 3.8).

In der Auswertung zeigte sich, dass die mit Zweifach-Kombinationstherapien behandelten Tiere tendenziell weniger Gelenkschäden aufwiesen. Die Kombination aus Galectin-1 und IL-12p40, welche in der Bewertung des klinischen Schweregrads der Arthritis die besten Ergebnisse erzielte, bewirkte auch eine geringere Schädigung auf histologischer Ebene, insbesondere hinsichtlich der knöchernen Erosion. Besonders deutlich wurde dies in Experiment CIA5. Hier fand sich eine um ca. die Hälfte geringe Proliferation des aktivierten Synoviums ($p = 0,01666$), eine um ca. die Hälfte geringere Erosionsfläche ($p = 0,025$) sowie eine um ca. 30% geringe Fläche degradierten Knorpels (keine Signifikanz). In den Experimenten CIA4 und CIA6 waren die Ergebnisse weniger deutlich ausgeprägt, wiesen aber ebenfalls auf eine positive Wirkung der Therapie hin. Bei den beiden anderen Zweifach-Kombinationstherapien fand sich eine ähnliche, weniger ausgeprägte Tendenz. So bewirkte die Kombination aus IL-12p40 und anti-TNF scFv im Experiment CIA4 eine signifikant geringere Knorpeldegradation im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p = 0,0346$).

Wie bei der Analyse der klinischen Wirkung zeigte sich auch hier die Dreifachkombination den Zweifachkombinationen nicht überlegen. Die einzige für die Analyse zur Verfügung stehende Monotherapie mit Galectin-1 zeigte in Experiment CIA6 eine etwas verstärkte Knochenerosion, ansonsten jedoch keinen Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe.

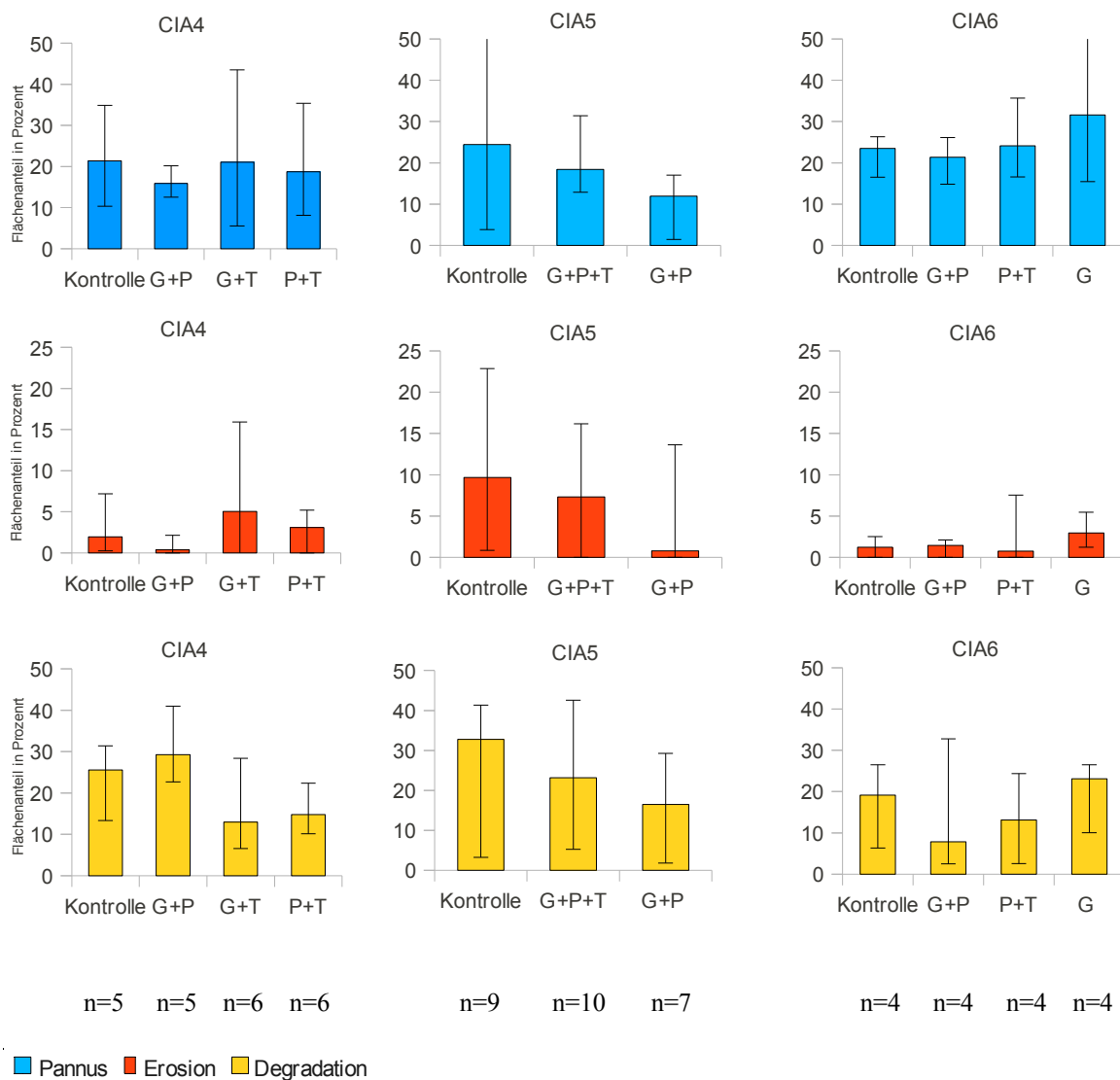


Abbildung 3.7: Auswertung der Flächenverhältnisse nach Experiment und Behandlungsgruppen (Median $\pm$ Spannweite). Pannus: Flächenanteil des aktivierten Synoviums an der Gesamtfläche des Gelenks, Erosion: Anteil der Bereiche zerstörten Knochens an der Gesamtfläche des Gelenks, Degradation: Flächenanteil des degradierten Knorpels an der Gesamtfläche des Knorpels des Gelenks. T: anti-TNF scFv Monotherapie, G: Galectin-1 Monotherapie, G+P: Galectin-1/IL-12p40 Kombinationstherapie, G+T: Galectin-1/anti-TNF scFv Kombinationstherapie, P+T; IL-12p40/anti-TNF scFv Kombinationstherapie.

Beim Vergleich der Ergebnisse auf klinischer und histologischer Ebene zeigt sich, dass die antidestruktive Wirkung der Kombinationstherapie Galectin-1/IL-12p40 deutlicher ausfällt als die klinische Wirkung. Es stellte sich daher die Frage, wie sehr die Schädigung des Gelenks im Modell der CIA mit der klinischen Ausprägung der Gelenkentzündung korreliert. Entsprechend wurde an den

histologischen Daten der Tiere aus den Kontrollgruppen untersucht, ob der beobachtete klinische Schweregrad der CIA eine Vorhersage des histologischen Schweregrads des Gelenks ermöglicht. Da diese Tiere keine Therapie erhielten, sollte die sichtbare Entzündung des Gelenks mit dem histologischen Schaden korrelieren, falls ein direkter Zusammenhang besteht. Zu diesem Zweck wurden die histologischen Ergebnisse aller Tiere aus den Kontrollgruppen nach dem klinischen Schweregrad der Gelenkentzündung zum Zeitpunkt der Organentnahme gruppiert. Der überwiegende Teil der Versuchstiere wies dabei einen hohen klinischen Schweregrad auf (Grad 3 oder 4), so dass keine vergleichbaren Gruppenstärken zwischen Tieren mit hohen und niedrigen Schweregraden zustande kamen. Abbildung 3.9 zeigt dennoch, dass kein offensichtlicher Zusammenhang zwischen klinischem Schweregrad und dem histologischen Ausmaß der Gelenkzerstörung besteht, da auch im Falle des klinischen Schweregrads 0 deutliche Synovialproliferation, Knorpeldegradation und knöcherne Erosionen nachweisbar waren.

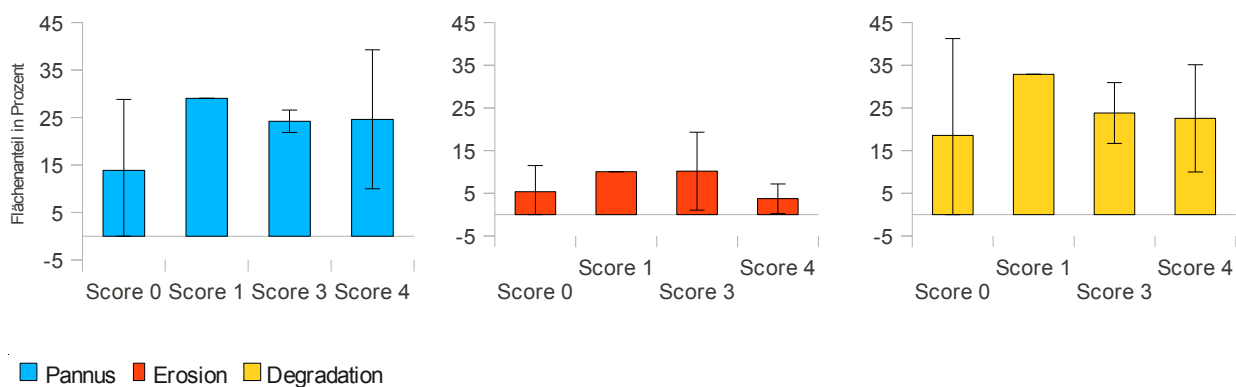


Abbildung 3.8: Verhältnis von klinischem und histologischem Schweregrad der Arthritis. Angegeben sind die Mediane und Spannweite der Synovialproliferation (Pannus), knöchernen Erosion und Knorpeldegradation für die Tiere der Kontrollgruppen (zusammengefaßte Daten aus allen Experimenten). Anzahl Pfoten mit Score 0: n=2; mit Score 1: n=1; mit Score 3: n=6; mit Score 4: n=10.

3.5 Wirkung des ACGT auf Aktivitätsmarker der Arthritis im Blutserum

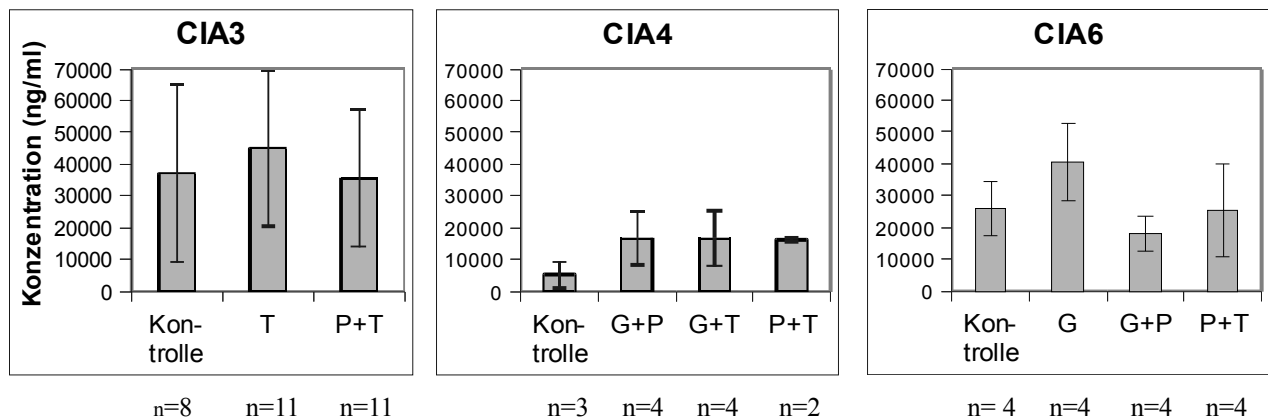
Nach Ablauf des Beobachtungszeitraums wurde den Versuchstieren Blut entnommen, um die Serumkonzentration von Antikörpern gegen Kollagen Typ II (anti-CII Ak) und von IL-12 mittels ELISA zu bestimmen. Für die Untersuchungen konnte nur in den Experimenten CIA3, CIA4 und CIA6 von den einzelnen Tieren eine hinreichende Menge an Serum gewonnen werden.

Anti-CII Ak sind ein wesentlicher pathogenetischer Faktor der CIA. Adoptiver Transfer von anti-CII Ak von erkrankten Tieren kann bei nicht erkrankten Tieren Arthritis induzieren (Stuart und Dixon, 1983). Ihre Konzentration im Blutserum kann daher als Surrogatmarker für die Krankheitsaktivität herangezogen werden. IL-12 ist ein wichtiges Zytokin in der Th1-vermittelten Immunant-

wort, dessen Konzentration im Blutkreislauf Rückschlüsse auf den Grad der systemischen Entzündung erlaubt. Da eine Blockade der Funktion von IL-12 Teil der eingesetzten Therapie ist, sind eventuelle Unterschiede zwischen mit IL-12p40 produzierenden Zellen behandelten Tieren gegenüber anderen Therapiegruppen von besonderem Interesse.

Die Analysen beider Parameter erbrachten kein einheitliches Bild. Wie in Abb. 3.7 dargestellt, konnten für die verschiedenen Behandlungsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe teils erhöhte, teils erniedrigte Serumspiegel von anti-CII Ak und IL-12 gemessen werden. Im Experiment CIA4 wurden zudem bei der Kontrollgruppe im Vergleich zu den anderen Experimenten auffallend niedrige Werte insbesondere für IL12 gemessen. Dementsprechend scheinen diese Parameter hohen individuellen Schwankungen unterworfen zu sein, so dass eine klare Beurteilung nicht möglich ist.

A



B

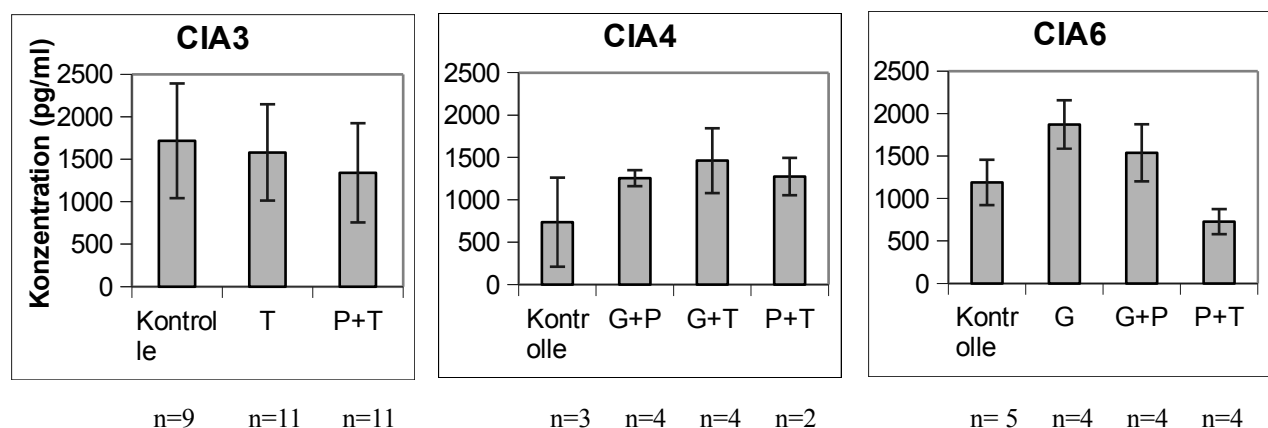


Abbildung 3.9: Konzentration (Median $\pm$ Spannweite) von IL-12 (**A**) und anti-Kollagen Typ II Antikörpern (**B**) im Serum ACGT-behandelter Versuchstiere. Kontrolle: physiologische Kochsalzlösung; T: anti-TNF scFv Monotherapie; G: Galectin-1 Monotherapie; G+P: Galectin-1/IL-12p40 Kombinationstherapie; G+T: Galectin-1/anti-TNF scFv Kombinationstherapie; P+T: IL-12p40/anti-TNF scFv Kombinationstherapie.

3.6 Wirkung des ACGT auf die lokale und systemische Expression pro- und antientzündlicher Zytokine

Ein wesentliches Ziel der Behandlungsstrategie der ACGT besteht in einer Modulation der lokalen Entzündungsmechanismen in den arthritischen Gelenken, die durch eine gezielte Migration der gentechnisch veränderten Vehikelzellen in die entzündeten Gelenke erreicht werden soll. Insbesondere soll durch die lokale Produktion der therapeutischen Genprodukte das lokale Zytokinmilieu beeinflusst und eine systemische Immunsuppression weitgehend vermieden werden.

Dementsprechend erfolgte nach Ablauf des Beobachtungszeitraums die Entnahme der Immunorgane Milz und Lymphknoten sowie der Pfoten mit anschließender RNA-Isolation. Die Expression der bei der RA proentzündlich wirksamen, Th1-typischen Zytokine Interferon γ (INF γ) und TNF α sowie der antientzündlich wirksamen, Th2-typischen Zytokine IL-4 und IL-10 wurde mittels qRT-PCR untersucht.

In allen durchgeführten Experimenten verblieben die ermittelten Werte für IL-4 zu niedrig für eine reproduzierbare Durchführung der qRT-PCR, so dass eine Beurteilung dieses Parameters nicht möglich war. Desweiteren ergab die von den Versuchstieren des Experiments CIA1 isolierte RNA für die untersuchten Zytokine Werte außerhalb oder an der Grenze des reproduzierbaren Bereiches der qRT-PCR. Im Unterschied dazu ergab sich in den folgenden Experimenten CIA3 - CIA6 ein weitaus höherer *template*-Anteil der untersuchten Zytokine an der Gesamt-RNA, die beim Einsatz üblicher Mengen RNA für die reverse Transkription reproduzierbare Ergebnisse in der qRT-PCR lieferten. Eine Analyse der RNA-Konzentration und der Qualität der RNA in einem denaturierenden Gel zeigten keine relevanten Unterschiede zwischen CIA1 und den Folgeexperimenten. Allerdings gab es, wie in Abschnitt 2.2.4.1 dargestellt, methodologische Unterschiede bei der Isolierung der RNA zwischen Experiment CIA1 und den folgenden Experimenten. Demzufolge wurde das Experiment CIA1 von der weiteren Auswertung ausgeschlossen.

Bei den übrigen Experimenten erwies sich die Isolation der Gesamt-RNA aus den Pfoten durch den hohen Knochenanteil als schwierig, was bei einigen Proben zu verminderter Qualität der gewonnenen RNA führte. Entsprechend wurden auch diese Proben nicht für die Auswertung herangezogen, sondern ausschließlich Proben von Versuchstieren, bei denen eine Gewinnung von RNA aus Pfoten, Milz und Lymphknoten in ausreichender Menge und Qualität gelang.

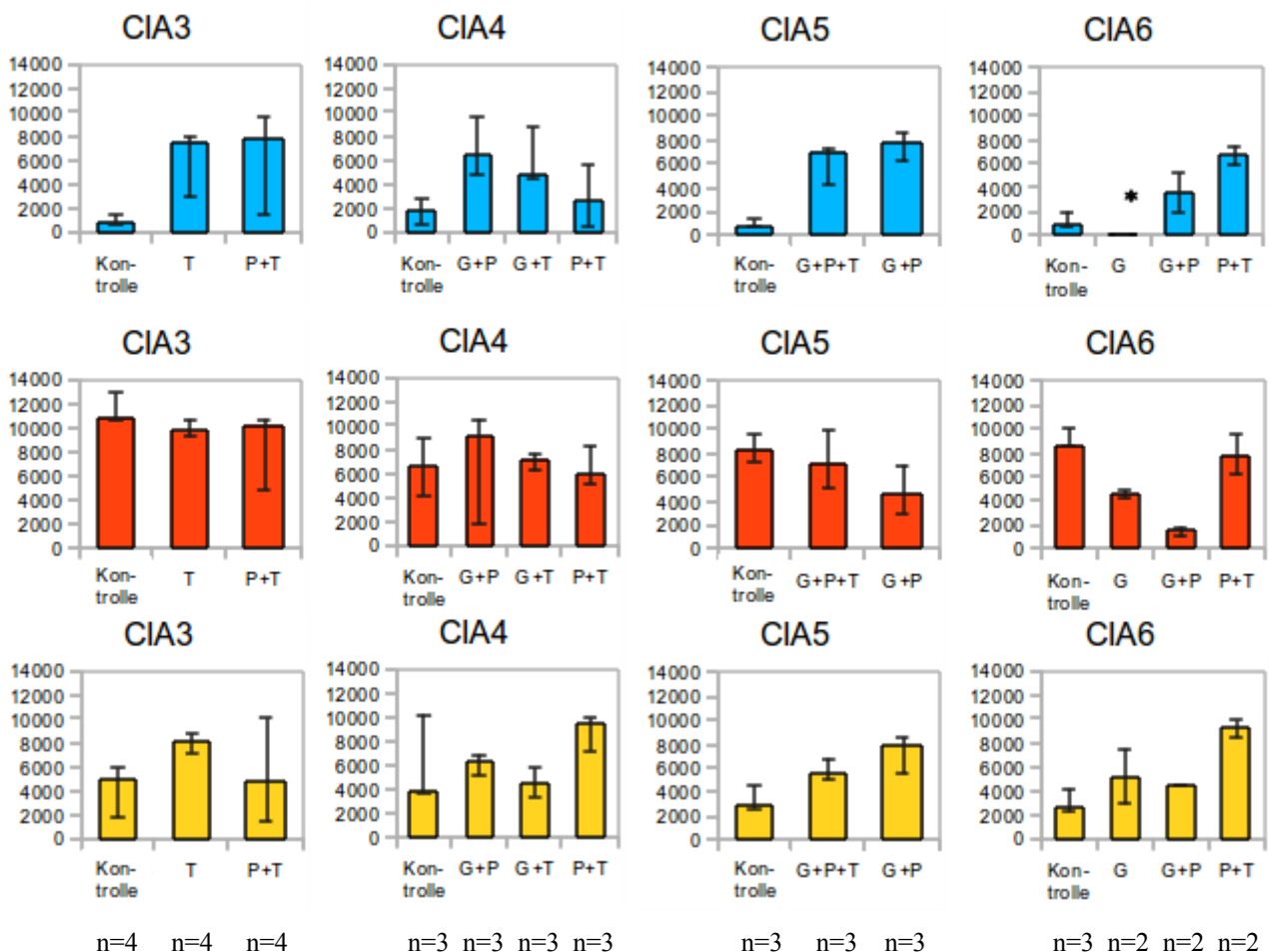
Für das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 fand sich in fast allen Behandlungsgruppen in den Pfoten eine deutlich höhere Expression als in den Kontrollgruppen (zwei- bis siebenfach, Abb. 3.10

A). In den Lymphknoten war dagegen ein weniger stark ausgeprägter Anstieg (eineinhalb- bis zweifach) der Expression von IL-10 zu beobachten, während sich für die Expression in der Milz kein einheitliches Bild ergab. Allein die Monotherapie mit Galectin-1 in Experiment CIA6 führte nur zu einer verminderten Expression von IL-10 in den Pfoten.

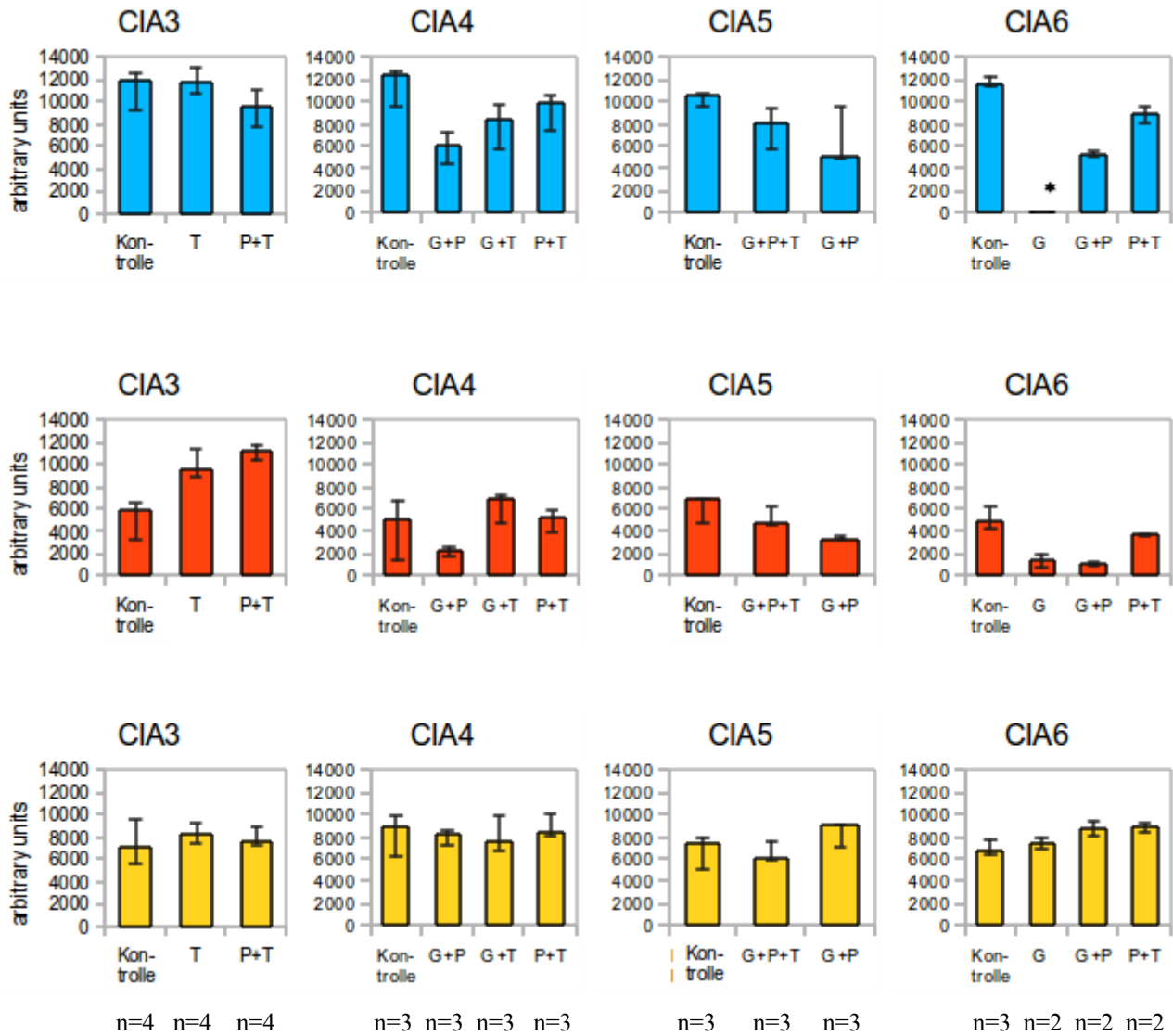
Die Expression des proentzündlichen Zytokins IFN γ war im Gegensatz zum IL-10 in der Behandlungsgruppe Galectin-1/IL-12p40 in den Pfoten (ca. 50% der Expression der Kontrollgruppe) und in der Milz (ca. 75% - 50% der Expression der Kontrollgruppe) deutlich vermindert (Abb. 3.10 B). Die Expression in den Lymphknoten unterschied sich dagegen nicht von der Kontrollgruppe. Die anderen Kombinationstherapien zeigten eine Tendenz zu verminderter Expression von IFN γ in den Pfoten im Vergleich zu den Kontrollen.

Die Expression des proentzündlichen Zytokins TNF α variierte stark zwischen den einzelnen Experimenten. Reproduzierbar zeigt sich jedoch in der Galectin-1/IL-12p40 Behandlungsgruppe eine um ca. 50% geringere Expression in der Milz, während sich für die übrigen Behandlungsgruppen kein einheitliches Bild ergab (Abb. 3.10 C).

A IL-10



B IFN γ



C TNF α

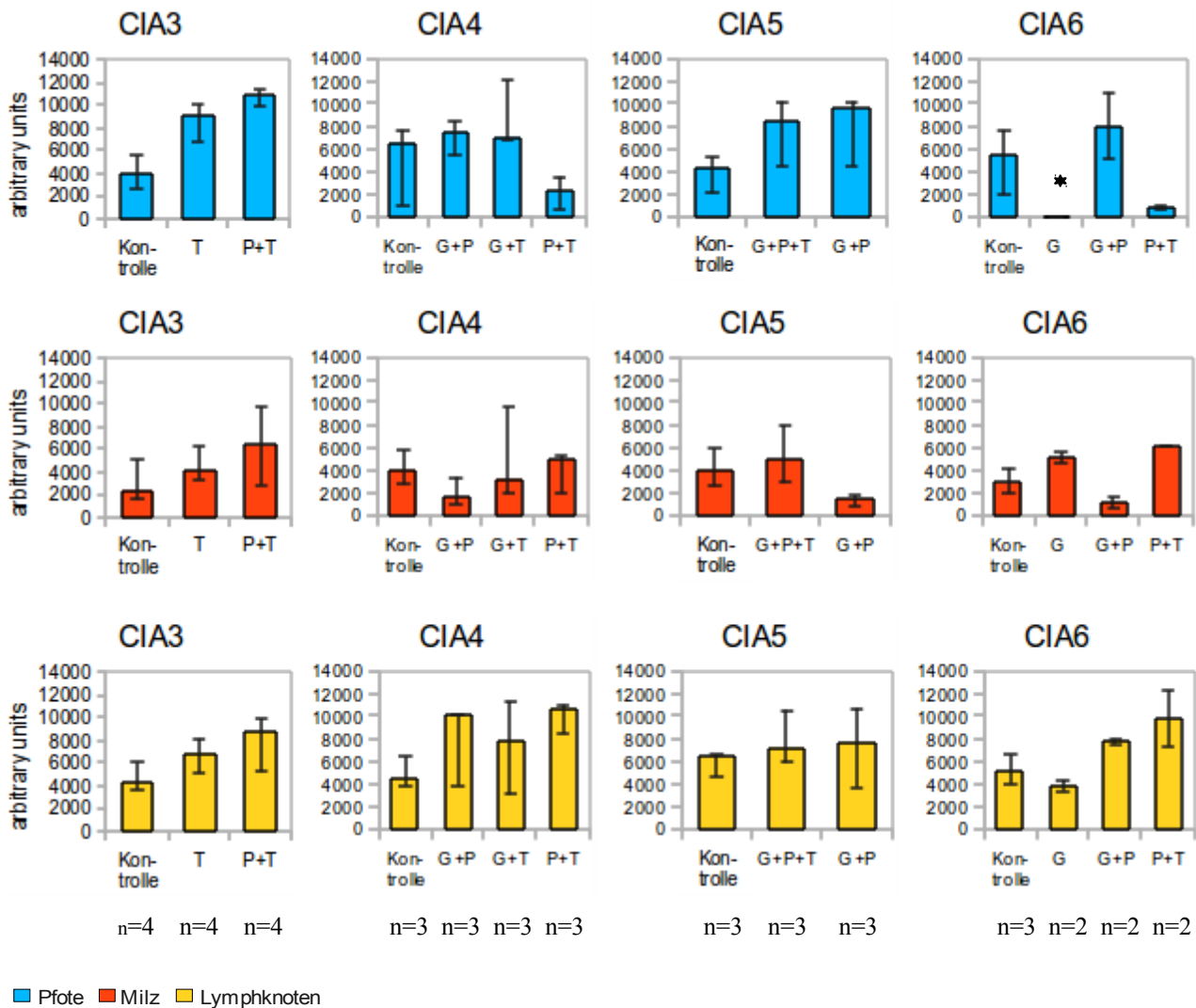


Abbildung 3.10: Lokale Expression pro- und antientzündlicher Zytokine (Median $\pm$ Spannweite) auf RNA-Ebene in den Pfoten, der Milz und den Lymphknoten: (A) IL-10; (B) INF γ ; (C) TNF α . Behandlungsgruppen: Behandlung mit physiologischer Kochsalzlösung; T: anti-TNF scFv Monotherapie; G: Galectin-1 Monotherapie; G+P: Galectin-1/IL-12p40 Kombinationstherapie; G+T: Galectin-1/anti-TNF scFv Kombinationstherapie; P+T: IL-12p40/anti-TNF scFv Kombinationstherapie; G+P+T: Dreifachkombination aus Galectin-1, IL-12p40 und anti-TNF scFv. Die für die Expression von Galectin-1 in den Pfoten ermittelten Werte waren fehlerhaft und für die Auswertung unbrauchbar (*).

Zusammengefaßt ergab sich auch hier das Bild einer tendenziellen antientzündlichen Wirkung der Kombination aus Galectin-1 und IL-12p40, sowohl auf lokaler als auch auf systemischer Ebene. Wie bei den anderen Untersuchungsparametern wurde die statistische Auswertung dieser Ergebnisse in den einzelnen Experimenten durch die niedrigen Fallzahlen und die Streubreite der Einzeldaten beeinträchtigt. Daher wurden als Ergänzung zu den Einzelanalysen die Werte aller Experimente zusammengefaßt. Abbildung 3.11 stellt die zusammengefaßten Werte für die einzelnen Behand-

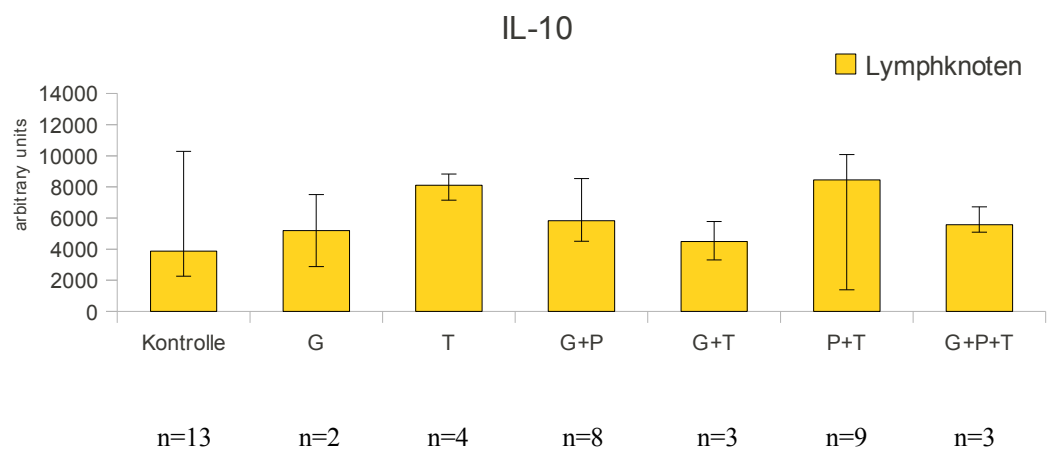
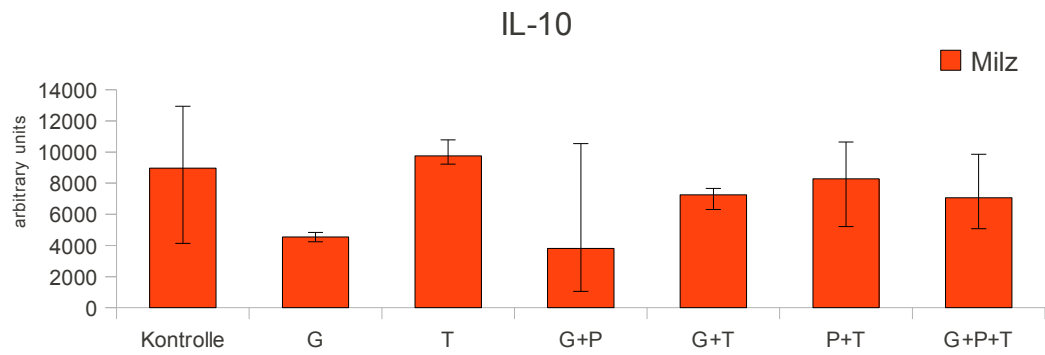
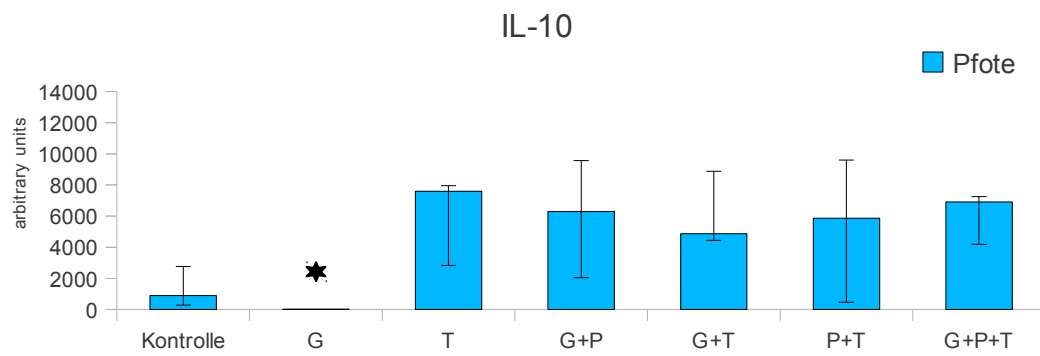
lungsgruppen dar, geordnet nach dem untersuchten Zytokin. Die Gruppen der Monotherapien Galectin-1 und anti-TNF scFv, der Kombinationstherapie mit Galectin-1 und anti-TNF-scFv sowie der Dreifach-Kombinationstherapie waren jeweils nur in einem Experiment vertreten, so dass ihre Fallzahl durch die Zusammenfassung nicht erhöht werden konnte. Infolge der unterschiedlichen Fallzahlen in den einzelnen Gruppen, der relativ niedrigen Fallzahlen insgesamt und der ungleichmäßige Verteilung der erhaltenen Werte wurde auch in dieser Auswertung der Mediantest verwendet.

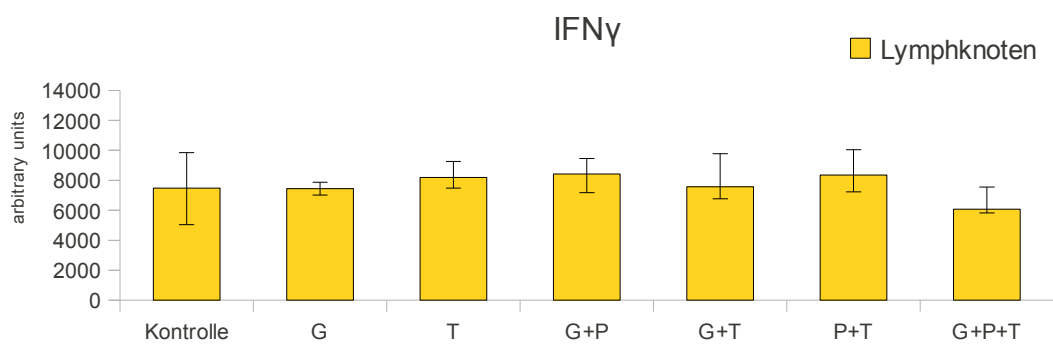
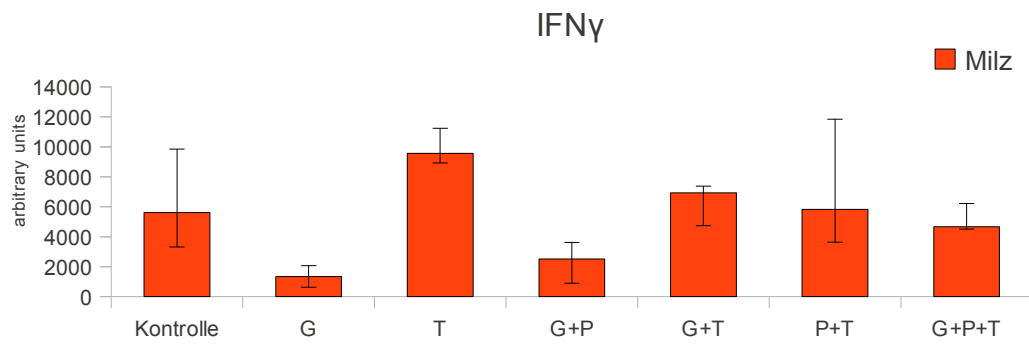
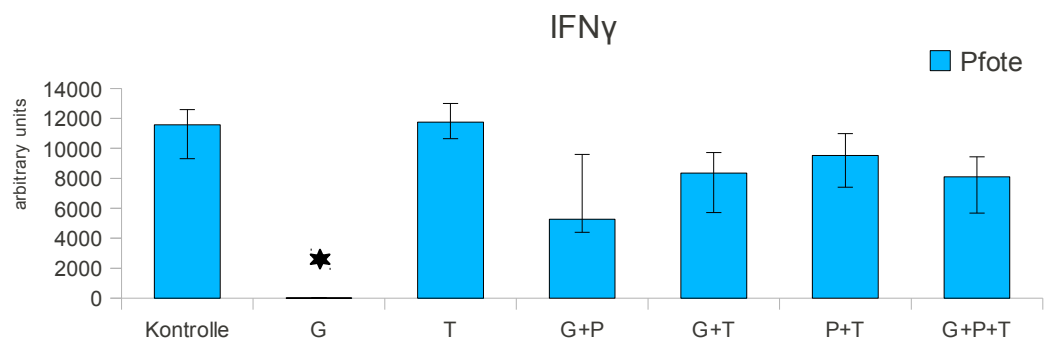
Für die Bestimmung von IL-10 ergaben sich signifikant höhere Werte der Expression in den Pfoten bei anti-TNF scFv Monotherapie ($p=0,0149$) sowie den Kombinationstherapien Galectin-1/IL-12p40 ($p=0,0002$) und IL-12p40/anti-TNF scFv ($p=0,0301$). Für die Expression in der Milz ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede für die einzelnen Behandlungsgruppen gegenüber der Kontrollgruppe. Eine erhöhte Expression in den Lymphknoten erreichte in den Gruppen anti-TNF scFv ($p=0,014$) und Galectin-1/IL-12p40 ($p=0,0476$) Signifikanz.

Bei der Untersuchung der IFN γ -Expression zeigten sich für die Kombinationstherapie Galectin-1/IL-12p40 signifikant niedrigere Werte in den Pfoten ($p=0,0006$) und in der Milz ($p=0,0006$). Die Kombinationstherapie IL-12p40/anti-TNF scFv erzielte ein verringertes Expressionsniveau für IFN γ in den Pfoten ($p=0,0301$).

Einzig die Kombinationstherapie Galectin-1/IL-12p40 erreichte eine signifikant geringere Expression von TNF α in der Milz ($p=0,0113$). Im Gegensatz dazu zeigte sich für die Monotherapie anti-TNF scFv eine erhöhte TNF α -Expression in den Pfoten ($p=0,0149$) und für die Kombinationstherapie IL-12p40/anti-TNF scFv eine erhöhte TNF α -Expression in der Milz ($p=0,0476$) und in den Lymphknoten ($p=0,004$). Diese erhöhten TNF α -Expressionsspiegel können als reaktive Überexpression als Folge der scFv-vermittelten Neutralisierung des freien TNF α gewertet werden.

Die Zusammenfassung der Daten der einzelnen Experimente bestätigt somit die in den Einzelanalysen beobachteten Tendenzen und untermauert die antientzündliche Wirkung der Kombinationstherapie Galectin-1/IL-12p40.





n=13

n=2

n=4

n=8

n=3

n=9

n=3

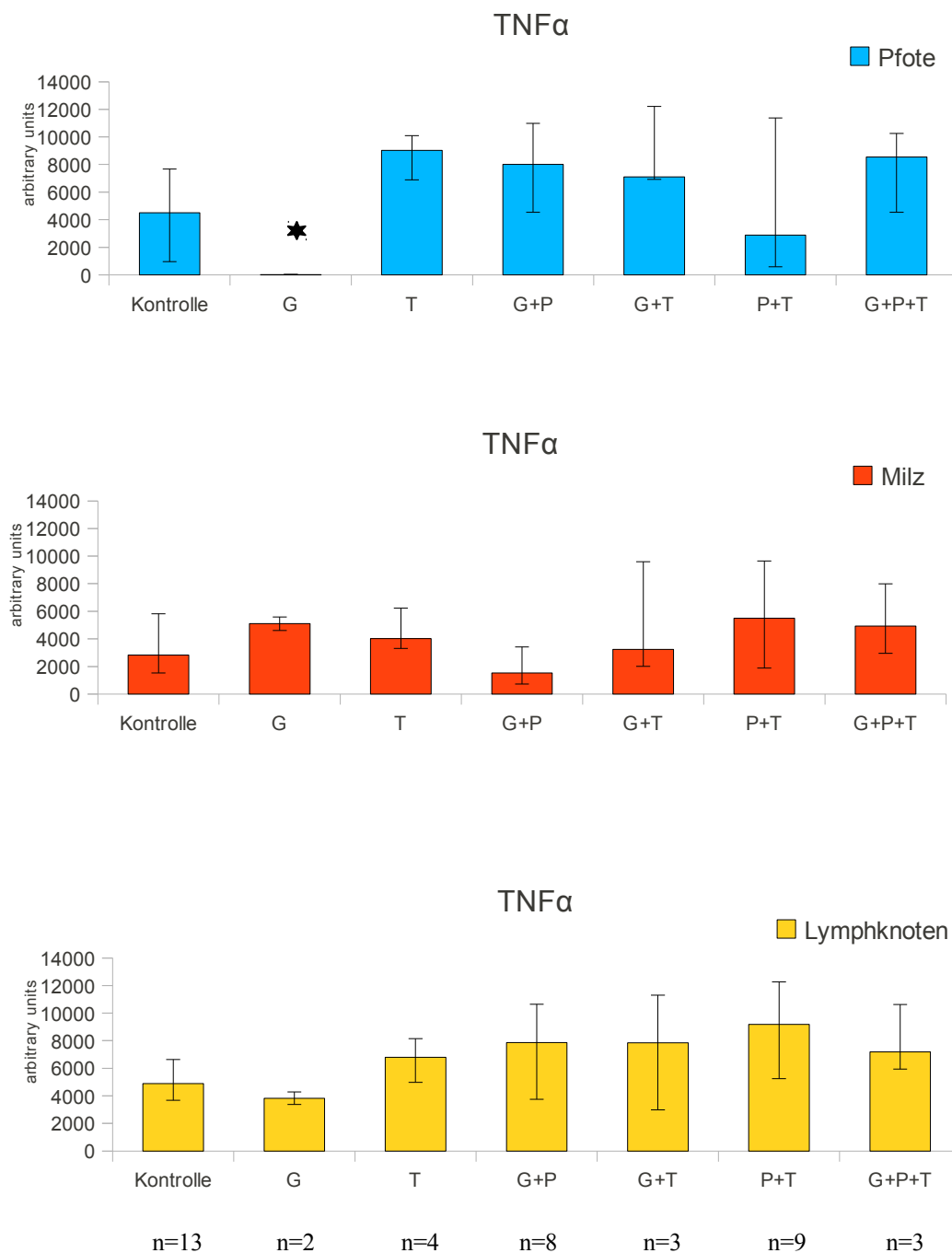


Abbildung 3.11: Aus den einzelnen Experimenten zusammengefaßte Daten der lokalen Zytokinexpression (Median $\pm$ Spannweite) auf RNA-Ebene in den Pfoten, der Milz und den Lymphknoten. Kontrolle: Behandlung mit physiologischer Kochsalzlösung; T: anti-TNF scFv Monotherapie; G: Galectin-1 Monotherapie; G+P: Galectin-1/IL-12p40 Kombinationstherapie; G+T: Galectin-1/anti-TNF scFv Kombinationstherapie; P+T: IL-12p40/anti-TNF scFv Kombinationstherapie; G+P+T: Dreifachkombination aus Galectin-1, L-12p40 und anti-TNF scFv. Die für die Expression von Galectin-1 in den Pfoten ermittelten Werte waren fehlerhaft und für die Auswertung unbrauchbar (*).

4. Diskussion

Eine Betrachtung der Effektivität der in dieser Arbeit verwendeten Therapie muss sowohl den experimentellen Charakter des ACGT als Methode als auch die Wirksamkeit der therapeutischen Moleküle selbst berücksichtigen. Es war das Ziel dieser Arbeit, folgende experimentelle Fragestellungen zu bearbeiten:

1. Ist es möglich, durch ACGT gezielt biologisch aktive Moleküle an einen gewünschten Wirkort zu verbringen und dort lokal zu exprimieren?
2. Inwieweit stützen die Ergebnisse die Hypothese, dass die verwendeten Moleküle antientzündlich wirksam sind und die experimentelle Arthritis lindern?
3. Verbessert die Kombination verschiedener Moleküle deren Wirkung?
4. Lässt sich aus den Ergebnissen eine Perspektive für eine Anwendung der ACGT beim Menschen ableiten?

Die Ergebnisse sollen im folgenden hinsichtlich dieser Fragestellungen diskutiert werden.

4.1 Lentiviral transduzierte BM-DC als Vehikelzellen für einen gezielten Gentransfer im Modell der CIA

Der in dieser Arbeit untersuchte Ansatz des ACGT verwendete lentiviral transduzierte BM-DC als Vehikelzellen für den Transport potentiell antientzündlicher Genprodukte an den Krankheitsherd. Die erfolgreiche Transduktion dieser Zellen und die Expression der rekombinanten Genprodukte *in vitro* konnten gezeigt werden (Abb. 3.1 und 3.2).

Dabei zeigten sich einige methodische Eigenheiten, die aus der Wahl der BM-DC als Vehikelzellen resultieren. Der niedrige Anteil der DC an der Gesamtheit der Blutzellen erfordert die Kultur aus Vorläuferzellen anstatt der direkten Isolation, im Fall der Tierexperimente aus dem Knochenmark, im Fall humaner Anwendung aus dem Blut. In der Kultur findet weder bei humanen noch murinen DC eine nennenswerte Proliferation statt. Die Stimulation der Proliferation durch Zusätze im Medium kann Einfluß auf den Phänotyp der DC nehmen (Gilliet *et al.*, 2002). In Verbindung mit der Notwendigkeit einer langfristig stabilen Transduktion der DC, die die Auswahl an effizienten viralen Vektoren einschränkt, ergibt sich eine Beschränkung der verfügbaren Zellzahl für die Therapie. Da DC nicht über längere Zeit in Kultur gehalten werden können, muss die Zellpräparation und -kultur für die jeweilige Anwendung zeitnah durchgeführt werden, anstatt durch Staffelung einen größeren Vorrat verwendbarer Zellen aufbauen zu können. Die Verwendung

autologer DC für die Humantherapie, die aus immunologischen Gründen vorteilhaft wäre, ist aufgrund dieser Bedingungen problematisch (Chinnasamy *et al.*, 2005; Moldenhauer *et al.*, 2003; Fiehn *et al.*, 2000).

Für die Durchführung der Tierexperimente bedeutete dies eine Begrenzung der Größe der Versuche, da 50 Prozent der verfügbaren Tiere als Spendertiere eingesetzt werden müssen. Zudem wurde die Zusammenstellung der Behandlungsgruppen durch die insertbedingt unterschiedliche Transduktionseffizienz des Vektors pHR-IG beeinflusst (Abb. 3.1).

Die Migration der BM-DC in die Gelenke und Expression der rekombinanten Genprodukte *in vivo* als weitere wesentliche Eigenschaft für Vehikelzellen konnte durch Biolumineszenzmessung und Immunhistochemie für Experiment CIA1 nachgewiesen werden (Abb. 3.4). In einem Versuchsansatz mit humanen ferromagnetisch markierten DC und humanen Gewebeimplantaten in SCID-Mäusen konnte eine Migration in rheumatoides Synovialgewebe auch für humane Zellen gezeigt werden. Die humanen DC konnten nach adoptivem Transfer in das SCID-Maus Modell der RA noch drei Wochen nach Zelltransfer im humanen RA-Gewebeimplantat sowie in Leber und Milz der Mäuse nachgewiesen werden. Allerdings besitzen die SCID-Mäuse aufgrund ihres Immundefekts im Gegensatz zu den DBA/1 Mäusen des CIA-Modells keine zelluläre Immunität, so dass sie die transferierten DC nicht abstoßen können.

Der immunohistochemische GFP-Nachweis in den DBA/1 Mäusen des Experiments CIA1 war eindeutig zellassoziiert, so dass nicht von einem Artefakt auszugehen ist. Dennoch konnte dieses Ergebnis in keinem der folgenden Experimente wiederholt werden. Der fehlende Nachweis transferierter Zellen in den Experimenten CIA3-6 weist darauf hin, dass nicht mit einer verlässlichen Expression der therapeutischen Genprodukte über einen Zeitraum von 30 Tagen gerechnet werden kann. Dies könnte auf Zelltod der transferierten DC oder Silencing des CMV-Promoters zurückzuführen sein. Der im Vektor pHR-IG verwendete CMV-Promoter ist anfällig für DNA-Methylierung, die im Laufe der Zeit zu fortschreitendem Verlust der Expression führt (Gaetano *et al.*, 2000). In einer Arbeit von Gerolami *et al.* konnte für ein CMV-reguliertes Reportergen in einer lentiviral transduzierten Hepatokarzinoma-Zelllinie ein rapide fortschreitender Signalverlust bis zum fast völligen Verschwinden innerhalb von 60 Tagen gezeigt werden (Gerolami *et al.*, 2000). Die unterschiedlichen Ergebnisse für den GFP-Nachweis in den Experimenten CIA1-6 könnten ein Ergebnis biologischer Varianz sein, indem das abweichende Ergebnis in CIA1 ein Extrem der unter diesen Versuchsbedingungen verfügbaren Zeit bis zur völligen Unterdrückung der Expression darstellt. Da auch in Material aus dem Experiment CIA1 keine Vektorsequenzen in der genomischen DNA nachgewiesen werden konnten, lies sich Silencing

des CMV-Promoters nicht von einem Verlust der transferierten BM-DC abgrenzen.

Bei einem Verlust der Zellen könnte trotz der Verwendung syngener Zellen eine immunologische Reaktion auf die transferierten DC eine Rolle spielen. Es ist auch eine Begrenzung der Lebensfähigkeit *in vivo* durch die genetische Modifikation denkbar, zumal die Untersuchung der Expression von CD80, CD86 und MHC II auf der Zelloberfläche auf eine Induktion der Zellreifung infolge der lentiviralen Transduktion hinweist (Breckpot *et al.*, 2007). Migration und anhaltende Präsenz genetisch modifizierter DC in entzündeten Gelenken wurde in den bisher publizierten Arbeiten anderer Arbeitsgruppen zur DC-basierten Gentherapie bei Arthritis nicht untersucht (Morita *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2001 und 2002). Beide Gruppen führten Migrationsversuche zur Präsenz transduzierter Zellen in den Organen des lymphatischen Systems relativ kurz nach der Injektion durch. So wiesen Morita *et al.*, 2001 über GFP-Expression transferierte Zellen in der Milz 24 h nach der Injektion nach, deren Signalstärke bereits 4 Tage nach Zelltransfer deutlich gemindert war, was auf eine kurze Lebensspanne der modifizierten DC hinweisen könnte. Kim *et al.*, 2001 konnten mit Hilfe Luciferase-exprimierender DC ebenfalls eine präferentielle Migration der transferierten Zellen in die lymphatischen Organe in den ersten 24 h nach der Injektion zeigen, verfolgten diese Fragestellung aber nicht weiter. Dagegen wurden in einer Machbarkeitsstudie zur Anwendung einer auf modifizierten DC basierenden Gentherapie mit Luciferase und GFP retroviral transduzierte DC in Mäuse nach allogenem Knochenmarktransfer injiziert. Biolumineszenzmessung und Immunofluoreszenzmikroskopie zeigten Migration der Zellen in lymphatische Organe und Präsenz der DC bis zu 100 Tage nach dem Zelltransfer in einigen Individuen (Schimmelpfennig *et al.*, 2005).

Die Literatur zeigt damit ein Bild früher Signalanreicherung in den lymphatischen Organen und eines beträchtlichen Signalverlusts transferierter Marker innerhalb weniger Tage nach dem Zelltransfer, andererseits auch Persistenz der Zellen über einen längeren Zeitraum. Die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen dagegen eine frühe Signalanreicherung in den Pfoten. In den lymphatischen Organen, für die nur Werte nach Ablauf des gesamten Beobachtungszeitraums vorliegen, war in keinem Experiment ein Signal nachweisbar. Für das Experiment CIA1 stand für diese Untersuchung der lymphatischen Organe nur die genomische DNA der Lymphknoten zur Verfügung, da die vorhandene RNA von Milzen und Lymphknoten aus diesem Experiment unbrauchbar war und nur die Pfoten für die Histologie vorbereitet worden waren. Die Bedingungen, unter denen Schimmelpfennig *et al.*, 2005 die Langzeitpräsenz der von ihnen verwendeten DC feststellten, unterscheiden sich durch den allogen Knochenmarktransfer relativ deutlich vom Kontext der mit der CIA-Therapie verbundenen Arbeiten. Da sich der in den Arbeiten von Morita und Kim beschriebene frühe Signalverlust auch in methodisch ähnlich gelagerten Versuchen, wie

dem durch Creusot *et al.*, 2008 im NOD-Modell durchgeführten ACGT, wiederfindet, trifft dieses Muster wahrscheinlich auch auf die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente zu. Damit liegt ein völliger Signalverlust adoptiv transferierter DC am Ende eines 28-30tägigen Beobachtungszeitraums im Rahmen der durch die publizierten Arbeiten vorgegebenen Erwartungen. Ein vergleichbarer früher Verlust an Expression des transferierten Materials, wie in der Literatur beschrieben, kann mit den vorhandenen Daten für diese Arbeit weder bestätigt noch verneint werden.

Da die Lebensspanne von DC zu einem gewissen Grad vom Phänotyp der Zellen und dem Milieu des Gewebes abhängig ist (Um *et al.*, 2004; Ruedl *et al.*, 2000), ist es möglich, dass trotz Beibehaltung der für die Durchführung von CIA1 verwendeten Protokolle Unterschiede in der Handhabung der Zellen, die durch den Laborwechsel und den Wechsel des durchführenden Experimentators entstanden, zu einer veränderten Lebensspanne der Zellen in den in Bad Nauheim durchgeführten Experimenten beitrugen.

Eine verkürzte Lebenszeit der DC ebenso wie ein Silencing des CMV-Promoters würden zu einem Verlust der Produktion der transferierten Genprodukte führen. In Abhängigkeit vom Zeitpunkt eines solchen Ereignisses wäre eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Auswirkung auf die therapeutische Wirksamkeit des ACGT zu erwarten. Ein früher Zeitpunkt würde eine therapeutische Wirkung weitgehend verhindern. Ein späterer Zeitpunkt würde dagegen möglicherweise zu einem Verlust einer bereits eingetretenen Wirkung führen. Keines dieser beiden Szenarien lässt sich an den erzielten Ergebnissen nachvollziehen. Zwar ist die Wirkung des ACGT begrenzt, jedoch anhand verschiedener Parameter objektivierbar, wie im folgenden näher diskutiert wird, und im Vergleich der verschiedenen Behandlungsgruppen auch unterschiedlich ausgeprägt, so dass ein frühes Ereignis (Eliminierung der DC) unwahrscheinlich erscheint. Des weiteren ist im Zeitverlauf der klinischen Schweregrade kein Verlust einer initialen Wirkung zu erkennen. Dies legt den Schluss nahe, dass der in CIA3-6 beobachtete Signalverlust in Anbetracht der verfügbaren Daten keine Auswirkung auf die Wirkung der ACGT hat.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass unter den Bedingungen des hier untersuchten spezifischen Versuchsansatzes BM-DC als Vehikelzellen grundsätzlich die erforderlichen Eigenschaften in Bezug auf Modifizierbarkeit und Migrationsverhalten aufweisen. In der Reproduzierbarkeit der Eigenschaften der modifizierten Zellen, insbesondere der Lebensdauer, und in der Verfügbarkeit großer Zellzahlen weisen die BM-DC Defizite auf. Migrationsversuche mit humanen DC im SCID-Mausmodell der RA lassen diese prinzipiell als Vehikelzellen für einen ACGT-Ansatz im Menschen geeignet erscheinen. Auch für diese stellt sich die Frage nach der Verfügbarkeit ausreichend großer

Zellzahlen, insbesondere bei Verwendung eigener Zellen des Patienten für die Therapie.

4.2 DC-basierter ACGT im CIA Modell in der Literatur

Im Unterschied zur vorgelegten Arbeit lag das Augenmerk anderer Arbeitsgruppen auf der regulierenden Wirkung modifizierter DC in den Organen des lymphatischen Systems. Durch die Transduktion mit entsprechenden Genen sollten die DC tolerogen wirken bzw. eine Modifikation der Immunreaktion von bei der entzündlichen Arthritis vorherrschenden proentzündlichem Th1- zu einem antientzündlichen Th2-Phänotyp bewirken. Damit stellten in den publizierten Arbeiten die DC selbst einen aktiven Teil der Therapie dar, und der angestrebte Zielort für ihre Wirkung waren nicht die arthritischen Gelenke, sondern die Organe des Immunsystems. Die drei relevanten Arbeiten sollen an dieser Stelle kurz vorgestellt werden, da sie auch für die weitere Diskussion von Bedeutung sind.

In der Arbeit von Morita *et al.*, 2001 wurden für die Therapie der CIA murine BM-DC retroviral transduziert, um IL-4 zu exprimieren. In Kokultur mit Splenozyten aus Kollagen Typ II-behandelten Tieren zeigten die IL-4 exprimierenden DC nach Stimulierung mit Kollagen Typ II von Hühnern die Fähigkeit, die Produktion von IFN γ und Anti-Kollagen Typ II Antikörpern vom Typ IgG2A signifikant zu unterdrücken. Scheintransduzierte DC hatten keinen vergleichbaren Effekt. Für *in vivo* Experimente wurden transduzierte BM-DC 15 Tage nach der Immunisierung der Versuchstiere mit Kollagen Typ II adoptiv transferiert. Zu diesem Zeitpunkt waren bei den Versuchstieren noch keine klinischen Symptome feststellbar. Zur Untersuchung der DC-Migration *in vivo* wurden GFP-exprimierende BM-DC injiziert, die Empfängertiere zu verschiedenen Zeitpunkten getötet, und Suspensionen von Milzzellen durchflußzytometrisch auf GFP-exprimierende Zellen untersucht. Bereits am ersten Tag nach Zelltransfer konnte ein GFP-Signal in der Milz nachgewiesen werden, welches an Tag 2 leicht und an Tag 4 deutlich nachließ. Dieser Nachweis wurde nicht über Tag 4 hinaus geführt. Ein funktioneller Test, der auf der Präsenz von mit *keyhole limpet hemocyanin* (KLH) beladenen DC beruhte, erbrachte den Nachweis des KLH-Moleküls in Milz und Lymphknoten am Tag 5 nach Injektion. Für Therapieexperimente wurden jeweils 3×10^5 IL-4-exprimierende DC *i.v.*, *i.p.* oder *s.c.* verabreicht und der Krankheitsverlauf über 35 Tage anhand von Schwellung und Beweglichkeit der Pfoten beobachtet. Im Gegensatz zu den mit scheintransduzierten oder GFP-exprimierenden DC behandelten Tieren wurden eine Verzögerung des Krankheitsbeginns und ein abgemilderter Verlauf erzielt. Bei der Verwendung IL-4 exprimender NIH 3T3-Fibroblasten oder primärer T-Zellen in äquivalenter Zellzahl wurde keine therapeutische Wirkung erreicht (Morita *et al.*, 2001).

In den beiden Arbeiten von Kim und Kollegen (Kim *et al.*, 2001 und 2002) wurden unreife murine DC adenoviral mit IL-4 oder Fas-Ligand (FasL) transduziert und Mäusen mit manifester CIA *i.v.* verabreicht. Die Immunisierung der Mäuse wurde analog zu dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Protokoll durchgeführt, mit einer Boosterimmunisierung an Tag 21 nach der Erstimmunisierung und einer Synchronisierung der klinischen Arthritismanifestation durch *i.p.* LPS-Gabe. Zur Bestimmung der DC-Migration *in vivo* wurden Luciferase-markierte DC injiziert und 24 Stunden nach der Injektion Organe entnommen und homogenisiert. Signifikante Biolumineszenzsignale wurden in Milz, Leber und Lymphknoten gefunden. Für die Therapie wurden 1×10^6 DC verabreicht, die mit Ad-eGFP, Ad-vIL-10 oder Ad-IL-4 bzw. Ad-FasL transduziert waren. Die klinische Krankheitsaktivität nahm bei den mit IL-4 und FasL behandelten Gruppen über den Versuchszeitraum von 28 Tagen ab, und histologische Analysen am Ende des Beobachtungszeitraumes belegten eine leichte Verminderung der Gelenkzerstörung. *In vitro* Untersuchungen an 14 Tage nach der Zellinjektion entnommenen Lymphknoten- und Milzzellen zeigten für die Behandlungsgruppen IL-4 und FasL eine deutliche Verminderung der Expression des proinflammatorischen Zytokins IFN γ nach Stimulation mit Kollagen Typ II. Eine Änderung der Expression von IL-4, FasL oder IL-10 wurde nicht festgestellt. Der Verbleib der injizierten DC nach Ablauf des Beobachtungszeitraums wurde nicht untersucht. (Kim *et al.*, 2001 und 2002).

In einem Ansatz des ACGT, der die gleichen Elemente wie die vorgelegte Arbeit einsetzt, wurden von Creusot *et al.*, 2008 mit dem Vektor pHR-IG transduzierte murine BM-DC 12 Wochen alten NOD-Mäusen *i.v.* injiziert. Die DC migrierten in die pankreatischen Inseln und akkumulierten dort. Die Untersuchung der Migration erfolgte durch Injektion transduzierter BM-DC, die ein GFP/Luciferase Fusionsgen exprimierten. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Injektion erfolgten *in vivo* Biolumineszenzmessungen, die um *in vitro* Messungen an Gewebekompositen ergänzt wurden. Dabei zeigte sich eine Konzentration des Signals auf die Milz und die pankreatischen Lymphknoten innerhalb von drei Tagen nach der Injektion. Acht Tage nach der Injektion war ein starker Abfall der Signalintensität in diesen Organen festzustellen. Der Krankheitseintritt des Diabetes wurde dennoch durch die Behandlung mit IL-4 exprimierenden BM-DC signifikant verzögert, und Microarray-Analysen belegten eine Normalisierung der krankheitsbedingt veränderten mRNA-Expressionsmuster in den pankreatischen Inseln (Creusot *et al.*, 2008).

Allen diesen Arbeiten sind die schnelle Migration in die Organe des lymphatischen Systems, der frühe Signalverlust der transferierten Reportergene, und dennoch ein Langzeiteffekt der Therapie gemeinsam. Die Anzahlen adoptiv transferierter, transduzierter Zellen pro Tier waren mit 1×10^6 (Kim *et al.*, 2001 und 2002, Creusot *et al.* 2008) und 3×10^5 (Morita *et al.*, 2001) in etwa miteinander und mit der in der vorgelegten Arbeit verwendeten Menge von 1×10^6 vergleichbar. Die Men-

gen der unter Kulturbedingungen durch die transferierten Zellen gebildeten therapeutischen Proteine lagen sowohl in der vorgelegten Arbeit als auch in den publizierten Studien im Nanogrammbereich pro Million Zellen und 24 Stunden (vgl. Abb. 3.2; Morita *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2001). Fast alle dieser Arbeiten verwendeten IL-4 als therapeutisches Molekül. Andere therapeutisch wirksame Moleküle wie IL-10 (Lechmann *et al.*, 1999; Miyata *et al.*, 2000), eingesetzt von Kim *et al.*, 2001, und FasL (Griffith *et al.*, 1996), eingesetzt von Kim *et al.*, 2002, erwiesen sich unter gleichen Versuchsbedingungen als weniger wirksam.

Die Arbeit von Morita *et al.*, 2001 unterscheidet sich von der vorliegenden Arbeit und den beiden Arbeiten von Kim *et al.* in der Immunisierungsstrategie und dem Zeitpunkt des Zelltransfers. Die Mäuse wurden nur einmal immunisiert, und die Zellen wurden vor dem Auftreten klinischer Arthritismanifestationen transferiert. Diese Methode erreichte eine Verzögerung des Eintritts von Symptomen und einen abgemilderten Verlauf der Arthritis nach Krankheitsausbruch. Damit ist diese Arbeit aufgrund des präventiven Therapieansatzes eher mit den Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe (Nakajima *et al.*, 2001; Tarner *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2003) vergleichbar, die ähnlich effektiv waren.

In den beiden Arbeiten von Kim *et al.*, 2001 und 2002 wurde eine Boosterimmunisierung 21 Tage nach der primären Immunisierung durchgeführt, gefolgt von einer LPS-Gabe an Tag 28 zur Synchronisierung des Krankheitsausbruchs. Dieses Vorgehen ist ähnlich zu dem in dieser Arbeit eingesetzten Protokoll, in dem LPS bereits am Tag 25 nach der ersten Immunisierung verabreicht wurde. Der Zelltransfer wurde von Kim *et al.* jeweils an Tag 32 nach der primären Immunisierung unmittelbar nach dem Auftreten erster klinischer Manifestationen durchgeführt. Es wurde sowohl mit IL-4 als auch mit FasL ein Rückgang der klinischen Arthritiszeichen erreicht (Kim *et al.*, 2001 und 2002).

Im Vergleich zu diesen Arbeiten zeigte sich in den Experimenten der vorgelegten Arbeit eine deutlich höhere mittlere Krankheitsaktivität in den Behandlungsgruppen zum Zeitpunkt des Zelltransfers (Abb. 4.1 B, C und D), was möglicherweise auf die frühere Stimulation mit LPS zurückzuführen ist. Zudem war in den Arbeiten von Kim *et al.* der mittlere Schweregrad der Arthritis in den Behandlungsgruppen zu Therapiebeginn niedriger als in der Kontrollgruppe. In der vorgelegten Arbeit dagegen wiesen die Behandlungsgruppen einen höheren mittleren Schweregrad auf als die Kontrollgruppe, so dass der experimentellen Therapie insgesamt eine sehr hohe Krankheitsaktivität gegenüber stand, was bei der folgenden Diskussion der Wirksamkeit berücksichtigt werden muß.

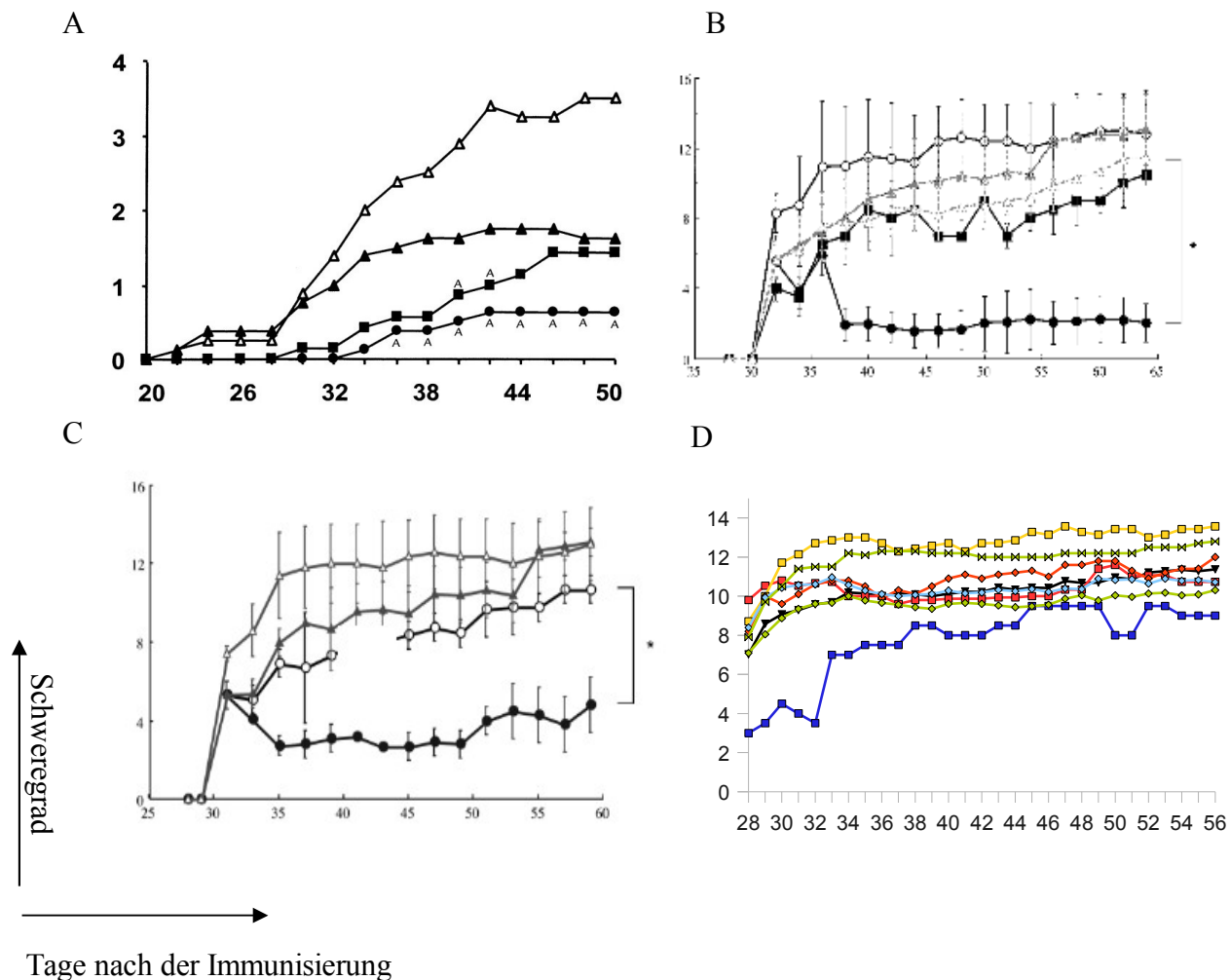


Abbildung 4.1: Verlauf des klinischen Arthritis-Schweregrads im CIA-Modell unter ACGT in publizierten Studien anderer Arbeitsgruppen und in der vorliegenden Arbeit. **(A)** Durchschnittlicher klinischer Schweregrad der Versuchstiere in der Studie von Morita *et al.*, 2001. Der Zelltransfer fand am Tag 15 nach der Immunisierung statt. Behandlungsgruppen: offene Dreiecke: Kontrollgruppe (zellfreie Kochsalzlösung); schwarze Symbole: Transfer retroviral transduzierter, IL-4 exprimierender DC *i.v.* (Quadrate), *s.c.* (Dreiecke) oder *i.p.* (Kreise). **(B)** Durchschnittlicher klinischer Schweregrad der Versuchstiere in der Studie von Kim *et al.*, 2001. Der Zelltransfer fand an Tag 32 nach der Erstimmunisierung statt. Behandlungsgruppen: offene Symbole: Kontrollgruppen mit Injektion zellfreier Kochsalzlösung (Kreise) oder untransduzierter DC; schwarze Symbole: Transfer adenoviral transduzierter DC mit Expression von IL-4 (Kreise), IL-10 (Quadrate) oder GFP (Dreiecke). **(C)** Durchschnittlicher klinischer Schweregrad der Versuchstiere in der Studie von Kim *et al.*, 2002. Der Zelltransfer fand an Tag 32 nach der Erstimmunisation statt. Behandlungsgruppen: offene Symbole: Kontrollgruppen mit Transfer untransduzierter DC (Kreise) oder adenoviral transduzierter DC mit Expression von GFP (Dreiecke); schwarze Symbole: Kontrollgruppe mit Injektion zellfreier Kochsalzlösung (Dreiecke) oder Transfer adenoviral transduzierter DC mit Expression von FasL (Kreise). **(D)** Durchschnittlicher klinischer Schweregrad der Versuchstiere aus allen Experimenten der vorliegenden Arbeit. Der Zelltransfer fand an Tag 28 nach der Erstimmunisierung statt. Behandlungsgruppen: schwarze Dreiecke: Kontrollgruppe mit Injektion zellfreier Kochsalzlösung; rote Quadrate: anti-TNF scFv Monotherapie; gelbe Quadrate: Monotherapie mit Galectin-1; blaue Quadrate: Monotherapie mit IL-12p40; orange Rauten: Zweifachkombination aus Galectin-1 und anti-TNF scFv; grüne Rauten: Zweifachkombination aus Galectin-1 und IL-12p40; hellblaue Rauten: Zweifachkombination aus anti-TNF scFv und IL-12p40; hellgrüne Doppeldreiecke: Dreifachkombination aus Galectin-1, IL-12p40 und anti-TNF scFv.

4.3 Wirksamkeit der verwendeten antientzündlichen Moleküle und Bedeutung der Kombinationstherapie

Gegen Zytokine gerichtete Therapien sind für die RA bereits klinisch etabliert. Insbesondere die anti-TNF α Biologika sind inzwischen klinischer Standard (Palladino *et al.*, 2003; Furst *et al.*, 2008; Chen *et al.* 2006), und der Anti-IL-6 Rezeptor Antikörper Tocilizumab wurde unlängst zugelassen. Gegen IL-12 gerichtete Therapien sowie die Anwendung von Galectin-1 befinden sich dagegen noch im präklinischen Stadium. Im Tiermodell der Arthritis wurde die grundsätzliche Wirksamkeit dieser Moleküle schon gezeigt (Malfait *et al.*, 1998; Nakajima *et al.*, 2001; Butler *et al.*, 1999; Rabinovich *et al.*, 1999 und 2002). Dennoch wurde in der vorgelegten Arbeit mit keiner der Monotherapien ein lindernder Einfluss auf den klinischen Krankheitsverlauf, die histologische Gelenkzerstörung oder die Expression molekularer Krankheitsmarker erzielt. Auch bei den Kombinationstherapien erbrachte nur die Kombination aus IL-12p40 und Galectin-1 eine geringe Wirkung.

Die möglichen Ursachen für den mangelnden therapeutischen Erfolg dieser prinzipiell wirksamen Moleküle in der vorgelegten Studie umfassen einen frühen Verlust der Molekülexpression durch Zellverlust oder Promoter Silencing, eine unzureichende effektive Dosis der therapeutischen Moleküle oder weniger potente molekulare Wirkmechanismen im Vergleich zu den in anderen Studien (Kim *et al.*, 2001 und 2002) erfolgreich eingesetzten Molekülen.

Wie bereits diskutiert, lässt der klinische Krankheitsverlauf für keine der Behandlungsgruppen den Verlust einer anfänglichen Wirkung erkennen. Daher wird ein eventueller Verlust der transduzierten BM-DC oder der Transgenexpression im Laufe des Experiments nicht als Ursache für die mangelnde Wirksamkeit angesehen, zumal die lokale IL-10 mRNA Expression in den Gelenken zum Versuchsende in allen Behandlungsgruppen gegenüber der Kontrollgruppe erhöht ist, so dass der ACGT nicht völlig ohne biologische Wirksamkeit geblieben ist.

Mehrere Argumente sprechen dafür, dass die mangelnde Wirksamkeit am ehesten durch eine im Verhältnis zur Aktivität der CIA unzureichende Potenz der verwendeten Therapie bedingt ist und die wahrscheinlichste Ursache dafür letztlich in einer unzureichenden Dosis besteht, zumal der Wirkmechanismus der verwendeten Moleküle auf kompetitiver Hemmung beruht.

Dies gilt in erster Linie für IL-12p40 und anti-TNF scFv. Die von den transduzierten BM-DC produzierten p40 Untereinheiten des IL-12 bilden Monomere oder Homodimere, die an den IL-12 Rezeptor binden ohne ein intrazelluläres Signal auszulösen. Therapeutisches IL-12p40 hemmt somit die Wirkung des biologisch wirksamen IL-12 p35/p40 durch kompetitive Verdrängung am Rezeptor

(Nakajima *et al.* 2001). Das anti-TNF scFv Molekül hemmt die biologische Wirksamkeit des Zielmoleküls TNF durch neutralisierende Bindung in Analogie zu den etablierten Therapeutika Infliximab und Adalimumab. Die biologische Wirksamkeit beider Moleküle setzt somit eine hinreichende molekulare Menge im Verhältnis zu ihren Zielmolekülen voraus, d.h., idealerweise einen Überschuß.

Die mangelnde Wirksamkeit der IL-12p40 bzw. anti-TNF scFv produzierenden BM-DC in der vorgelegten Arbeit im Vergleich zu dem erfolgreichen Einsatz von IL-12p40 bzw. anti-TNF scFv exprimierenden T-Zell Hybridomen durch Nakajima *et al.*, 2001 bzw. Smith *et al.*, 2003 könnte dadurch bedingt sein, dass in den Experimenten von Nakajima *et al.*, 2001 und Smith *et al.*, 2003 die Therapie jeweils vor der klinischen Manifestation der CIA begonnen wurde. Entsprechend ist davon auszugehen, dass in diesen präventiven Ansätzen eine erheblich geringere Menge an IL-12 bzw. TNF durch die therapeutischen Moleküle zu antagonisieren war als in der Situation einer hochgradig aktiven Arthritis in der vorgelegten Arbeit. Darüberhinaus besaßen die IL-12p40 bzw. anti-TNF scFv produzierenden T-Zell Hybridome als immortalisierte Zellen im Gegensatz zu den hier verwendeten BM-DC die Fähigkeit zur fortgesetzten Proliferation *in vivo*, wodurch bei gleicher Zahl adoptiv transferierter Zellen (1×10^6) und ähnlicher Produktion *in vitro* (Nanogramm pro ml pro 1×10^6 Zellen) von einer deutlich höheren effektiven Dosis des IL-12p40 bzw. anti-TNF scFv *in vivo* auszugehen ist. Desweiteren werden beim Menschen die zugelassenen TNF-Blocker in einer Dosierung verabreicht, deren Äquivalent bei Mäusen einer Expression mehrerer Mikrogramm therapeutischen Proteins entspräche, was in Anbetracht der *in vitro* Messungen wahrscheinlich nicht erreicht wird.

Galectin-1 verfügt über eigenständige regulierende Effekte (Liu, 2000). Von besonderem Interesse für diese Arbeit ist die Fähigkeit zur Auslösung von Apoptose aktivierter T-Zellen. Die *i.p.* Injektion von rekombinantem Galectin-1 oder von Galectin-1 exprimierenden syngenischen Fibroblasten beim Auftreten erster Arthritissymptome bewirkte in einer Studie von Rabinovich *et al.*, 1999 eine deutliche Milderung des klinischen Krankheitsverlaufs der CIA. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Therapie mit Galectin-1 steht damit den erfolgreichen Therapien in den Arbeiten von Kim *et al.* und Morita *et al.* konzeptionell näher als die Therapie mit IL-12 p40 und anti-TNF scFv. Die erfolgreich zum DC-basierten ACGT eingesetzten Moleküle IL-4 und FasL besitzen wichtige Funktionen im Kontext der RA (Lubberts *et al.*, 2000; Pundt *et al.*, 2009; Eguchi, 2001; Agnello *et al.*, 2003; Müller-Ladner *et al.*, 2005). Ausgeprägte *downstream*-Effekte, die aus der regulierenden Funktion resultieren, verstärken die physiologische Wirkung einer bestimmten Menge exprimierter Moleküle im Vergleich zu einer anderen, die weniger ausgeprägte *downstream*-Effekte nach sich zieht, bzw. eine höhere Konzentration zum Bewirken eines Effektes benötigt. Effektivere Regulator-

ren erzielen daher bessere Ergebnisse in der Therapie. So zeigte sich IL-4 der Therapie mit IL-10 und FasL unter sonst gleichen Bedingungen überlegen (Kim *et al.*, 2001 und 2002). Die therapeutischen Moleküle mit direkt regulierender Wirkung benötigen durch die direkte Auslösung eines Effektes eine geringere Wirkungs-dosis als die durch kompetitive Hemmung wirkenden Moleküle, da diese erst nach dem Erreichen einer im Vergleich zu ihren Zielmolekülen signifikanten Expression eine Wirkung zeigen. Dementsprechend wurde für die Galectin-1 Monotherapie in dieser Arbeit eine Überlegenheit gegenüber den anderen Monotherapien erwartet. Dies lässt sich anhand der Daten jedoch nicht bestätigen. Allerdings erfolgte in der Arbeit von Rabinovich *et al.*, 1999 die Induktion der CIA abweichend vom Standardprotokoll nur durch eine Immunisierung, ohne zusätzliche *booster* Immunisierung und auch ohne LPS-Gabe. Bei einer solchen Methodik ist entsprechend von einer weniger ausgeprägten Immunaktivierung und somit einer geringeren Intensität der Arthritis auszugehen.

Insgesamt erscheint ein DC-basierter Ansatz des ACGT, der auf kompetitiver Hemmung einzelner entzündungsfördernder Zytokine beruht, trotz der erfolgreichen Anwendung der Zytokinblockade in der Klinik nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit nicht erfolgversprechend. Als Ursache für diese Befunde kommen in erster Linie zwei Möglichkeiten in Betracht. Zum einen könnte die immunregulierende Wirksamkeit der einzelnen verwendeten Moleküle einschließlich Galectin-1 relativ geringer sein als die von IL-4 und FasL. Zum anderen könnte, wie oben dargestellt, die erzielte Wirkdosis im Verhältnis zur Aktivität der Arthritis-erkrankung zu gering gewesen sein.

Bei zu geringer Wirksamkeit der Einzelsubstanzen kann durch eine Kombination verschiedener Wirkstoffe und Wirkmechanismen grundsätzlich eine wesentliche Steigerung der Wirksamkeit erzielt werden. Auch dieses Konzept ist für die konventionellen Basistherapeutika bei der RA klinischer Standard (O'Dell, 2005). Daher wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene Kombinationen der therapeutischen Genprodukte untersucht. Entgegen der Arbeitshypothese bewirkten die untersuchten Kombinationstherapien jedoch keine klinische Remission.

Ausschließlich für die Kombination aus Galectin-1 und IL-12p40 konnte eine tendenzielle Linderung des klinischen Krankheitsverlaufs beobachtet werden, welche auch durch die Auswertung molekularer und histologischer Marker unterstützt wurde. Diese Befundkonstellation spricht dafür, dass eine Kombination aus Apoptoseinduktion bei T-Zellen durch Galectin-1 (Rabinovich *et al.* 1999) und Inhibierung der Th1-Subtypen-Differenzierung durch IL-12p40 eine zweckmäßige Therapiestrategie darstellt. Möglicherweise wäre mit dieser Strategie bei optimaler Dosierung eine signifikante Wirkung zu erzielen. Demgegenüber scheint die ergänzende Blockade von TNF α bei der Dreifachkombination keinen Zugewinn darzustellen.

Die erzielbare Dosis war in der vorliegenden Arbeit von verschiedenen Faktoren abhängig. Dazu gehören neben der oben bereits diskutierten unklaren *in vivo* Lebensdauer der DC und der Möglichkeit eines CMV-Promoter Silencing ein eventuell unzureichendes, Phänotyp-abhängiges Homing, eine für suffiziente statistische Auswertung unzureichende Größe der Behandlungsgruppen und die Zahl effizient transduzierter Zellen.

Dabei ist die Zellzahl in zweierlei Hinsicht bedeutsam. Zum einen wurde in allen Behandlungsgruppen bei adoptiven Zelltransfer die Gesamtzahl der effektiv transduzierten DC gleich gehalten. Der Grund dafür bestand sowohl in der begrenzten Verfügbarkeit transduzierter Zellen als auch in der Hypothese, dass eine wirksame Kombinationstherapie eine Dosisreduktion der Einzelsubstanzen ermöglicht. Die absolute Anzahl von DC, die ein bestimmtes therapeutisches Molekül exprimiert, war somit bei der Zweifach-Kombination geringer als bei der Monotherapie, und bei der Dreifach-Kombination entsprechend nochmals geringer. Dies wäre auch eine mögliche Erklärung für den mangelnden therapeutischen Zugewinn der Dreifach- gegenüber der Zweifach-Kombination. Die tendenzielle Wirkung der Zweifach-Kombinationen Galectin-1/IL-12p40 und auch anti-TNF α /IL-12 p40 auf die molekularen Krankheitsmarker (Serumspiegel der anti-Kollagen Typ II Antikörper, Expressionsniveau pro-entzündlicher Zytokine) deutet darauf hin, dass möglicherweise eine bessere Wirkung erzielt worden wäre, wenn die Kombinationstherapien tatsächliche Verdoppelung bzw. Verdreifachung der Monotherapien dargestellt hätten.

Der wesentliche limitierende Faktor ist dabei jedoch die verfügbare Zellzahl. Da die DC in Kultur nur in geringem Umfang proliferieren, bedeutet eine Erhöhung der Zahl adoptiv transferierter Zellen einen deutlichen Mehraufwand (Kim *et al.*, 2008; Dohnal *et al.*, 2009), vor allem eine erhebliche höhere Zahl an Spendertieren. Eine deutliche Steigerung der *in vitro* Proliferation lässt sich zwar durch Zugabe von FMS-like tyrosine kinase 3 ligand (Flt3L) erzielen, jedoch haben unpublizierte Pilotversuche des Arbeitsgruppenleiters gezeigt, dass es dadurch zu einer verstärkten Ausreifung der DC kommt. Bestandteil der Arbeitshypothese der vorliegenden Arbeit ist jedoch ein möglichst unreifer Phänotyp der DC zum Zweck eines besseren Homings in entzündete Gewebe. Zudem könnten große Mengen vielseitig regulierend wirkender Zellen wie den DC unvorhergesehene Nebenwirkungen mit sich bringen. Eine Positivselektion der erfolgreich transduzierten Zellen mittels FACS wäre dann unumgänglich, was jedoch die Verfügbarkeit eines Hochgeschwindigkeits-FACS voraussetzt. Aus den Erfahrungen der Vorversuche heraus erfordert die Größe der DC ein relativ hohes Verdünnungsvolumen der aufzutrennenden Zellsuspension, um ein Verstopfen des FACS-Geräts zu vermeiden. In Verbindung mit einer relativ geringen Transduktionseffizienz ergeben sich damit relativ lange FACS-Zeiten, was der Vitalität der DC in Verbindung mit dem aufwendigen Prozeß der Zellkultur-Ernte abträglich ist.

Die begrenzte Zahl transduzierter DC kann die erfassbare Wirksamkeit der untersuchten Therapien auch noch in einem weiteren Aspekt beeinflussen. Um mit den verfügbaren Zellen alle Therapiegruppen untersuchen zu können, waren die Versuchsgruppen relativ klein und die einzelnen Experimente in der Zusammenstellung der Behandlungsgruppen unterschiedlich. In Verbindung mit den geringen therapeutischen Effekten und der Streuung der erhaltenen Daten gestaltete sich die statistische Auswertung schwierig. Viele der erhaltenen Werte in den Einzelexperimenten erreichten keine statistische Signifikanz, obwohl bei vielen Parametern gleichartige Tendenzen beobachtet werden konnten.

Zusammenfassend stehen die erzielten Ergebnisse des hier untersuchten AGCT mit lentiviral transduzierten BM-DC als Vehikelzellen für die lokale Expression von anti-TNF α scFv, Galectin-1 und IL-12 p40 in einem ungünstigen Verhältnis zum technischen Aufwand der Methode, auch wenn die Strategie einer kombinierten lokalen Applikation geeigneter therapeutischer Moleküle grundsätzlich vielversprechend ist. Zudem hat die praktische Anwendung verschiedene technische und methodologische Schwierigkeiten aufgezeigt, die eine Übertragbarkeit der Methode für eine humane Anwendung infrage stellen.

4.4 Perspektiven für die humane Anwendung des ACGT

Obwohl die erzielten Wirkungen hinter den ursprünglichen Erwartungen zurückblieben sind, wurde für die Kombination Galectin-1/IL-12p40 mit einem einmaligen Zelltransfer eine Verringerung des Gelenkschadens und eine anhaltende Veränderung in der Expression krankheitsrelevanter Moleküle erreicht. Die Untersuchungen zum zellulären *homing* belegen zudem, dass auch humane DC die Fähigkeit besitzen in Entzündungsgebiete einzuwandern. Die diskutierten Arbeiten anderer Gruppen mit ähnlichem Ansatz erzielten ebenfalls Langzeitergebnisse mit teilweise deutlich höherer Wirksamkeit. Die Möglichkeit, bei einer chronischen Erkrankung eine langfristige Wirkung ohne wiederholte Verabreichung zu erzielen, stellt eine attraktive Eigenschaft und wesentliche Stärke des ACGT dar.

Demgegenüber konnten als kritische Parameter für einen erfolgreichen ACGT in der vorliegenden Arbeit die erforderliche Zellzahl, die Transduktions- und Expressionseigenschaften des viralen Vektors und die Wirkmodalitäten der therapeutischen Moleküle identifiziert werden. Der in dieser Arbeit untersuchte spezifische Ansatz mit DC als Vehikelzellen, dem lentiviralen Vektor pHR-IG und den eingesetzten therapeutischen Molekülen hat im Verhältnis zum notwendigen Aufwand nicht die Effektivität gezeigt, die eine weitere Verfolgung rechtfertigen würde.

Dennoch ist vorstellbar, dass ein optimiertes System mit besser geeigneten Vehikelzellen und einem verbesserten Vektorkonstrukt die Schwächen des hier ausführlich getesteten Systems ausgleichen könnte, zumal es sich um ein auf verschiedenen Ebenen adaptierbares Therapiekonzept handelt. Aufgrund seiner modularen Natur kann das Therapiesystem des ACGT an neue wissenschaftliche Erkenntnisse über die immunologischen Regulationsmechanismen der Arthritis und über molekulare Therapieziele angepasst werden. Allerdings gibt es noch viele Unsicherheiten hinsichtlich des Zellschicksals *in vivo* und der grundsätzlichen Eigenschaften möglicher Vehikelzellen in den vielfältigen lokalen Milieus des Organismus. Mit der Erweiterung des diesbezüglichen Wissensstandes steigt auch die Beherrschbarkeit dieses Therapiesystems und damit dessen Nützlichkeit.

Darüberhinaus muß jede Diskussion über die mögliche humane Anwendung einer Variante der Gentherapie die Vorbehalte der Öffentlichkeit in Betracht ziehen, die in Anbetracht aufgetretener Komplikationen nicht völlig unberechtigt sind (Somia and Verma, 2000; Kaiser, 2007; Hacein-Bey-Abina *et al.*, 2008). Die beginnende Kommerzialisierung der Gentherapie, die, nicht zuletzt wegen öffentlicher Vorbehalte in der westlichen Welt, von Asien ausgeht, bringt neue Dynamik in die Frage der klinischen Anwendung (Peng, 2005). Der ACGT und verwandte Ansätze, wie einige Varianten der DC-basierten Krebstherapie, sind infolge der nicht dauerhaften Übertragung modifizierten Materials vergleichsweise sichere Methoden mit einem wachsenden wissenschaftlichen Unterbau (Tarner *et al.* 2004, Dudley und Rosenberg, 2007). ACGT kann als transiente somatische Gentherapie begriffen werden (Slavin *et al.*, 2002; Tarner *et al.*, 2006). Der fehlende Nachweis transduzierter Zellen am Ende des Beobachtungszeitraumes in den durchgeführten Experimenten bedeutet im Umkehrschluss auch eine selbstständige Eliminierung des fremden Materials aus dem Empfängerorganismus und somit einen Sicherheitsvorteil.

Durch die Identifikation geeigneter therapeutischer Ziele und die Entwicklung effektiver Vektoren mit guter biologischer Sicherheit kann die humane Anwendung des ACGT Wirklichkeit werden. Der Beitrag der vorliegenden Arbeit zu diesem Entwicklungsprozeß liegt vor allem in der Identifizierung kritischer methodologischer Eckpunkte, die optimiert werden müssen, um eine wirksame und sichere Gentherapie zu ermöglichen.

5. Literaturverzeichnis

Abdi K. (2002) IL-12: The role of p40 versus p75. *Scand. J. Immunol.*, 56, 1-11

Al-Allaf AW, Sanders PA, Ogston SA, Marks JS. (2001) A case-control study examining the role of physical trauma in the onset of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 40, 262-266

Al-Mughales J, Blyth TH, Hunter JA, Wilkinson PC. (1996) The chemoattractant activity of rheumatoid synovial fluid for human lymphocytes is due to multiple cytokines. *Clin. Exp. Immunol.*, 106, 230-236

Agnello D, Lankford CS, Bream J, Morinobu A, Gadina M, O'Shea JJ, Frucht DM. (2003) Cytokines and transcription factors that regulate T helper cell differentiation: New players and new insights. *J. Clin. Immunol.*, 23, 147-161

Alarcon-Segovia D, Alarcon-Riquelme ME, Cardiel MH, Caeiro F, Massardo L, Villa AR, Pons-Estel BA: Grupo Latinoamericano de Estudio del Lupus Eritematoso (GLADEL). (2005) Familial aggregation of systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, and other autoimmune diseases in 1,177 lupus patients from the Gladel cohort. *Arthritis Rheum.*, 52, 1138-1147

Albers JMC, Kuper HH, van Riel CM, Prevoo MLL, Van 't Hof MA, van Gestel AM, Severens JL. (1999) Socio-economic consequences of rheumatoid arthritis in the first years of the disease. *Rheumatology (Oxford)*, 38, 423-430

Baecklund E, Ekbom A, Sparen P, Feltelius N, Klareskog L. (1998) Disease activity and risk of lymphoma in patients with rheumatoid arthritis: Nested casecontrol study. *BMJ*, 317, 180–181

Barnetche T, Constantin A, Cantagrel A, Cambon-Thomsen A, Gourraud PA. (2008) New Classification of HLA-DRB1 alleles in rheumatoid arthritis susceptibility: A combined analysis of worldwide samples. *Arthritis Res. Ther.*, 10, R26

Barton A, Thomson W, Ke X, Eyre S, Hinks A, Bowes J, Gibbons L, Plant D, Wellcome Trust Case Consortium, Wilson AG, Marinou I, Morgan A, Emery P, Year Consortium, Steer S, Hocking L, Reid DM, Wordsworth P, Harrison P, Worthington J. (2008) Re-evaluation of putative rheumatoid arthritis susceptibility genes in the post-genome wide association study era and hypothesis of a key

pathway underlying susceptibility. *Hum. Mol. Genet.*, 17, 2274-2279

Bellamy N, Duffy D, Martin N, Mathews J. (1992) Rheumatoid arthritis in twins: A study of aetiopathology based on the Australian Twin Registry. *Ann. Rheum. Dis.*, 51, 588-593

Boissier MC, Feng XZ, Carlouz A, Roudier R, Fournier C. (1987) Experimental autoimmune arthritis in mice. I. Homologous type II collagen is responsible for self-perpetuating chronic polyarthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, 46, 691-700

Breckpot K, Emeagi P, Dullaers M, Michiels A, Heirman C, Thielemans K. (2007) Activation of immature monocyte-derived dendritic cells after transduction with high doses of lentiviral vectors. *Hum. Gene Ther.*, 18, 536-546

Brennan, FM, Mcinnes IB. (2008) Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.*, 118, 3537-3545

Buch, M., Emery, P. (2002) The aetiology and pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Hospital Pharmacist*, 9, 5-10

Butler DM, Malfait AM, Maini RN, Brennan FM, Feldmann M. (1999) Anti-IL-12 and anti-TNF antibodies synergistically suppress the progression of murine collagen-induced arthritis. *Eur. J. Immunol.*, 29, 2205-2212

Camona L, Villaverde V, Hernandez-Garcia C, Ballina J, Gabriel R, Laffon A: EPISER Study Group. (2002) The prevalence of rheumatoid arthritis in the general population of Spain. *Rheumatology (Oxford)*, 41, 88-95.

Chen Y, Jobanputra P., Barton P, Jowett S, Bryan S, Clark W, Burls A. (2006) A systematic review of the effectiveness of adalimumab, etanercept and infliximab for the treatment of rheumatoid arthritis in adults and an economic evaluation of their cost-effectiveness. *Health Technol. Assess.*, 10(42)

Chinnasamy N, Treisman JS, Oaks MK, Hanson JP, Chinnasamy D. (2005) Ex vivo generation of genetically modified dendritic cells for immunotherapy: Implications of lymphocyte contamination. *Gene Ther.*, 12, 259-271

Chorus AM, Miedema HS, Boonen A, van der Linden S. (2003) Quality of Life and work in patients with rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis of working age. *Ann. Rheum. Dis.*, 62, 1178-1184

Costa GL, Sandora MR, Nakajima A, Nguyen EV, Taylor-Edwards C, Slavin AJ, Contag CH, Fathman CG, Benson JM. (2001) Adoptive immunotherapy of experimental autoimmune encephalomyelitis via T cell delivery of the IL-12 p40 subunit. *J. Immunol.*, 167, 2379-2387

Creusot RJ, Yaghoubi SS, Kodama K, Dang DN, Dang VH, Breckpot K, Thielemann K, Gambhir SS, Fathman CG. (2008) Tissue-targeted therapy of autoimmune diabetes using dendritic cells transduced to express IL-4 in NOD mice. *Clin. Immunol.*, 127, 176-187

Curtis JR, Kramer JM, Martin C, Saag KG, Patkar N, Shatin D, Burgess M, Xie A, Braun MM. (2007) Heart failure among younger rheumatoid arthritis and Crohn's patients exposed to TNF-alpha antagonists. *Rheumatology (Oxford)*, 46, 1688-1693

Donahue KE, Gartlehner G, Jonas DE, Lux LJ, Thieda P, Jonas BL, Hansen RA, Morgan LC, Lohr KN. (2008) Systematic review: Comparative effectiveness and harms of disease-modifying medications for rheumatoid arthritis. *Ann. Intern. Med.*, 148, 124-134

Dohnal AM, Graffi S, Witt V, Eichstill C, Wagner D, Ul-Haq S, Wimmer D, Felzmann T. (2009) Comparative evaluation of techniques for the manufacturing of dendritic cell-based cancer vaccines. *J. Cell. Mol. Med.*, 13, 125-135

Dudley ME, Rosenberg SA. (2007) Adoptive Cell Transfer Therapy. *Semin. Oncol.*, 34, 524-531

Eaton WW, Byrne M, Ewald H, Mors O, Chen C, Agerbo E, Mortensen PB. (2006) Association of schizophrenia and autoimmune diseases: Linkage of Danish national registers. *Am. J. Psychiatry*, 163, 521-528

Ebringer A, Rashid T. (2006) Rheumatoid arthritis is an autoimmune disease triggered by *Proteus* urinary tract infection. *Clin. Dev. Immunol.*, 13, 41-48

Edwards JC, Cambridge G. (2006) B-cell targeting in rheumatoid arthritis and other autoimmune

diseases. *Nat. Rev. Immunol.*, 6, 394-403

Edwards CJ, Cooper C. (2006) Early environmental factors and rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Immunol.*, 143, 1-5

Eguchi K. (2001) Apoptosis in autoimmune diseases. *Internal Medicine*, 40, 275-284

Elliott MJ, Maini RN, Feldmann M, Long-Fox A, Charles P, Katsikis P, Brennan FM, Walker J, Bijl H, Ghrayeb J. (1993) Treatment of rheumatoid arthritis with chimeric monoclonal antibodies to tumor necrosis factor alpha. *Arthritis Rheum.*, 36, 1681–1690

Fiehn C, Wettschureck N, Krauthoff A, Haas R, Ho AD. (2000) Bone marrow-derived cells as carriers of recombinant immunomodulatory cytokine genes to lymphoid organs. *Canc. Gene Ther.*, 7, 1105-1112

Fleischmann RM, Tesser J, Schiff MH, Schechtman J, Burmester GR, Bennett R, Modafferi D, Zhou L, Bell D, Appleton B. (2006) Safety of extended treatment with anakinra in patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, 5, 1006-1012

Forslind K, Hafström I, Ahlmen M, Svensson B, BARFOT Study Group. (2007) Sex: A major predictor of remission in early rheumatoid arthritis? *Ann. Rheum. Dis.*, 66, 46-52

Furst DE, Keystone EC, Kirkham B, Kavanaugh A, Fleischmann R, Mease P, Breedveld FC, Kalden JR, Smolen JS, Burmester GR, Braun J, Emery P, Winthrop K, Bresnahan B, De Benedetti E, Dörner T, Gibofsky A, Schiff MH, Sieper J, Singer N, van Riel PL, Weinblatt ME, Weisman MH. (2008) Updated consensus statement on biological agents for the treatment of rheumatic diseases, *Ann. Rheum. Dis.*, 67, iii2-iii25

Gabriel SE, Crowson CS, O'Fallon WM. (1999) The epidemiology of rheumatoid arthritis in Rochester, Minnesota, 1955-85. *Arthritis Rheum.*, 42, 415-420

Gaetano C, Catalano A, Palumbo R, Illi B, Orlando G, Ventoruzzo G, Serino F, Capogrossi MC. (2000) Transcriptionally active drugs improve adenovirus vector performance in vitro and in vivo. *Gene Ther.*, 7, 1624-1630.

Gerolami R, Uch R, Jordier F, Chapel S, Bagnis C, Brechot C, Mannoni P. (2000) Gene transfer to hepatocellular carcinoma: Transduction efficacy and transgene expression kinetics by using retroviral and lentiviral vectors. *Canc. Gene Ther.*, 7, 1286-1292

Gilliet M, Boonstra A, Paturel C, Antonenko S, Xu XL, Trinchieri G, O'Garra A, Liu YJ. (2002) The development of murine plasmacytoid dendritic cell precursors is differentially regulated by FLT3-ligand and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.*, 195, 953-958

Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.*, 36, 59–74

Griffith, TS, Yu X, Herndon JM, Green DR, Ferguson TA. (1996) CD95- induced apoptosis of lymphocytes in an immune privileged site induces immunological tolerance. *Immunity*, 5, 7–16

Hacein-Bey-Abina S, Garrigue A, Wang GP, Soulier J, Lim A, Morillon E, Clappier E, Caccavelli L, Delabesse E, Beldjord K, Asnafi V, Macintyre E, Cortivo LD, Radford I, Brousse N, Moshous D, Hauer J, Borkhardt A, Belohradsky BH, Wintergerst U, Velez MC, Leiva L, Sorensen R, Wulffraat N, Bushman FD, Fischer A, Cavazzana-Calvo M. (2008) Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X. *J. Clin. Invest.*, 118, 3132-3142

Harizi H, Gualde N. (2006) Pivotal role of PGE2 and IL-10 in the cross-regulation of dendritic cell-derived inflammatory mediators. *Cell. Mol. Immunol.*, 3, 271-277

Hazes JMW. (1991) Pregnancy and its effects on the risk of developing rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, 50, 71-72

Hernandez JD, Baum LG. (2002) MINI REVIEW Ah, sweet mystery of death! Galectins and control of cell fate. *Glycobiology*, 12, 127-136

Hillier SG. (2007) Diamonds are forever: The cortisone legacy. *J. Endocrinol.*, 195, 1-6

Hirsch R, Lin JP, Scott WW Jr., Ma LD, Pillemer SR, Kastner DL, Jacobsson LT, Bloch DA, Knowler WC, Bennet PH, Bale SJ. (1998) Rheumatoid Arthritis in the Pima Indians: The

intersection of epidemiologic, demographic, and genealogic data. *Arthritis Rheum.*, 41, 1464-1469

Jones M, Symmons D, Finn J, Wolfe F. (1996) Does exposure to immunosuppressive therapy increase the 10 year malignancy and mortality risks in rheumatoid arthritis? A matched cohort study. *Br. J. Rheumatol.*, 35, 738-745

Jongbloed SL, Lebre MC, Fraser AR, Gracie JA, Sturrock RD, Tak PP, McInnes IB. (2006) Enumeration and phenotypical analysis of distinct dendritic cell subsets in psoriatic arthritis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.*, 8, R15

Kaiser J. (2007) Clinical trials. Gene transfer an unlikely contributor to patient's death. *Science*, 318, 1535

Kaplan MJ. (2006) Cardiovascular disease in rheumatoid arthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.*, 18, 289-297

Kato K, Shimoizato O, Hoshi K, Wakimoto H, Hamada H, Yagita H, Okumura K. (1996) Local production of the p40 subunit of interleukin 12 suppresses T-helper 1-mediated immune responses and prevents allogeneic myoblast rejection. *PNAS*, 93, 9085-9089

Kim S, Kim HO, Kim HJ, Lee K, Kim HS. (2008) Generation of functionally mature dendritic cells from elutriated monocytes using polyinosinic: polycytidylic acid and soluble CD40 ligand for clinical application. *Clin. Exp. Immunol.*, 154, 365-374

Kim SH, Kim S, Evans CH, Ghivizzani SC, Oligino T, Robbins PD. (2001) Effective treatment of established murine collagen-induced arthritis by systemic administration of dendritic cells genetically modified to express IL-4. *J. Immunol.*, 166, 3499-3505

Kim SH, Kim S, Oligino T, Robbins PD. (2002) Effective treatment of established mouse collagen-induced arthritis by systemic administration of dendritic cells genetically modified to express FasL. *Mol. Ther.*, 6, 584-590

Kim WU, Min SY, Cho ML, Youn J, Min JK, Lee SH, Park SH, Cho SH, Kim HY. (2000) The role of IL-12 in inflammatory activity of patients with rheumatoid arthritis (RA). *Clin. Exp. Immunol.*, 119, 175-181

Kinne RW, Stuhlmüller B, Burmester G. (2007) Cells of the synovium in rheumatoid arthritis: Macrophages. *Arthritis Res. Ther.*, 9, 224

Klareskog L, Stolt P, Lundberg K, Källberg H, Bengtsson C, Grunewald J, Rönnelid J, Harris HE, Ulfgren AK, Rantapää-Dahlqvist S, Eklund A, Padyukov L, Alfredsson L. (2006) A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: Smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. *Arthritis Rheum.*, 54, 38-41

Knedla A, Neumann E, Müller-Ladner U. (2007) Developments in the synovial biology field 2006. *Arthritis Res. Ther.*, 9, 209-217

Lajas C, Abasolo L, Bellajdel B, Hernandez-Garcia C, Carmona L, Vargas E, Lazaro P, Jover JA. (2003) Costs and predictors of costs in rheumatoid arthritis: A prevalence-based study. *Arthritis Rheum.*, 49, 64-70

Lebre MC, Tak PP. (2008) Dendritic cell subsets: Their roles in rheumatoid arthritis. *Acta Rheumatol. Port.*, 33, 35-45

Lechman ER, Jaffurs D, Ghivizzani SC, et al. (1999) Direct adenoviral gene transfer of viral IL-10 to rabbit knees with experimental arthritis ameliorates disease in both injected and contralateral control knees. *J. Immunol.*, 163, 2202-2208

Lefèvre S, Knedla A, Tennie C, Kampmann A, Wunrau C, Dinser R, Korb A, Schnäker EM, Turner IH, Robbins PD, Evans CH, Stürz H, Steinmeyer J, Gay S, Schölmerich J, Pap T, Müller-Ladner U, Neumann E. (2009) Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints. *Nat. Med.*, 15, 1414-1420

Liu, Fo-Tung. (2000) Galectins – A new family of regulators of inflammation. *Clin. Immunol.*, 97, 79-88

Lubberts E, Joosten LA, Chabaud M, van Den Bersselaar L, Oppers B, Roo CJ, Richards CD, Miossec P, van den Berg W. (2000) IL-4 gene therapy for collagen arthritis suppresses synovial IL-17 and osteoprotegerin ligand and prevents bone erosion. *J. Clin. Invest.*, 105, 1697-1710

- Lutzky V, Hannawi S, Thomas R. (2007) Cells of the synovium in rheumatoid arthritis: Dendritic cells. *Arthr. Res. Ther.*, 9, 219
- Malfait AM, Butler DM, Presky DH, Maini RN, Brennan FM, Feldmann M. (1998) Blockade of IL-12 during the induction of collagen-induced arthritis (CIA) markedly attenuates the severity of the arthritis. *Clin. Exp. Immunol.*, 111, 377-383
- Massa M, Mazzoli F, Pignatti P, Benedetti FD, Passalia M, Viola S, Samodal R, Cava AL, Giannoni F, Ollier W, Martini A, Albani S. (2002) Proinflammatory responses to self HLA epitopes are triggered by molecular mimicry to Epstein-Barr Virus proteins in oligoarticular juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum.*, 46, 2721-2729
- Mehraein Y, Lennerz C, Ehlhardt S, Remberger K, Ojak A, Zang KD. (2004) Latent Epstein-Barr virus (EBV) infection and cytomegalovirus (CMV) infection in synovial tissue of autoimmune chronic arthritis determined by RNA- and DNA-in situ hybridization. *Mod. Pathol.*, 17, 781-789
- Miossec, P. (2008) Dynamic interactions between T cells and dendritic cells and their derived cytokines/chemokines in the rheumatoid synovium. *Arthritis Res. Ther.*, 10(Suppl 1), S2
- Miterski B, Drynda S, Böschow G, Klein W, Oppermann J, Kekow J, Epplen JT. (1994) Complex genetic predisposition in adult and juvenile rheumatoid arthritis. *BMC Genet.*, 5, 2
- Miyata M, Sasajima T, Sato H, Saito A, Saito A, Iriswa A, Sato Y, Kasukawa R. (2000) Suppression of collagen induced arthritis in mice utilizing plasmid DNA encoding interleukin 10. *J. Rheumatol.*, 27, 1601-1605
- Mohammed FF, Smookler DS, Khokha R. (2003) Metalloproteinases, inflammation, and rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, 62, 43-47
- Moldenhauer A, Nociari MM, Dias S, Lalezari P, Moore MA. (2003) Optimized culture conditions for the generation of dendritic cells from peripheral blood monocytes. *Vox Sanguinis*, 84, 228-236
- Morita Y, Yang J, Gupta R, Shimizu K, Sheldon EA, Endres J, Mule JJ, McDonagh KT, Fox DA. (2001) Dendritic cells genetically engineered to express IL-4 inhibit murine collagen-induced

arthritis. *J. Clin. Invest.*, 107, 1275-1284

Müller-Ladner U, Pap T, Gay RE, Neidhart M, Gay S. (2005) Mechanisms of Disease: The molecular and cellular basis of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.*, 1, 102-110

Murai C, Munakata Y, Takahashi Y, Ishii T, Shibata S, Muryoi T, Funato T, Nakamura M, Sugamura K, Sasaki T. (1999) Rheumatoid arthritis after human parvovirus B19 infection. *Ann. Rheum. Dis.*, 58, 130-132

Murphy CA, Langrish CL, Chen Y, Blumenschein W, McClanahan T, Kastelein RA, Sedgwick JD, Cua DJ. (2003) Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J. Exp. Med.*, 198, 1951-1957

Nakajima A, Seroogy CM, Sandora MR, Turner IH, Costa GL, Taylor-Edwards G, Bachmann MH, Contag CH, Fathman CG. (2001) Antigen-specific T cell-mediated gene therapy in collagen-induced arthritis. *J. Clin. Invest.*, 107, 1293-1301

Neidhart M, Müller-Ladner U, Frey W, Bosserhoff AK, Colombani PC, Frey-Rindova P, Hummel KM, Gay RE, Häuselmann H, Gay S. (2000) Increased serum levels of non-collagenous matrix proteins (cartilage oligomeric matrix protein and melanoma inhibitory activity) in marathon runners. *Osteoarthritis Cartilage*, 8, 222-229

Neumann E, Gay RE, Gay S, Müller-Ladner U. (2004) Functional genomics of fibroblasts. *Curr. Opin. Rheumatol.*, 16, 238-245

O'Dell J. (2005) Rheumatoid arthritis initial therapy: Unanswered questions. *J. Rheumatol. Suppl.*, 72, 14-16

Palladino MA, Bahjat FR, Theodorakis EA, Moldawer LL. (2003) Anti-TNF- α Therapies: The next generation. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2, 736-746

Pedersen M, Jacobson S, Garred P, Madsen HO, Klarlund M, Svejgaard A, Pedersen BV, Wohlfahrt J, Frisch M. (2007) Strong combined gene-environment effects in anti-cyclic citrullinated peptide-positive rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 56, 1446-1453

Peng Z. (2005) Current status of gendicine in China: Recombinant human Ad-p53 agent for treatment of cancers. Hum. Gene Ther., 16, 1016-1027

Pflugbeil S, Smolen J. (2004) Richtlinien zum Beginn und zur Fortsetzung einer TNF-Blocker-Therapie bei Patienten mit chronisch entzündlichen rheumatologischen Erkrankungen unter besonderer Berücksichtigung der österreichischen Gegebenheiten. Journal für Mineralstoffwechsel, 11, 50-53

Pundt N, Peters MA, Wunrau C, Strietholt S, Fehrmann C, Neugebauer K, Seyfert C, van Valen F, Pap T, Meinecke I. (2009) Susceptibility of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts to FasL- and TRAIL-induced apoptosis is cell cycle-dependent. Arthritis Res. Ther., 11, R16

Rabinovich G, Daly G, Dreja H, Tailor H, Riera CM, Hirabayashi J, Chernajovsky A. (1999) Recombinant galectin-1 and its genetic delivery suppress collagen-induced arthritis via T cell apoptosis. J. Exp. Med., 190, 385-397

Rabinovich GA, Ramhorst RE, Rubinstein N, Corigliano A, Daroqui M, Kier-Joffe E, Fainboim L. (2002) Induction of allogenic T-cell hyporesponsiveness by galectin-1-mediated apoptotic and non-apoptotic mechanisms. Cell Death Differ., 9, 661-670

Ramírez AS, Rosas A, Hernández-Beriain JA, Orengo, JC, Saavedra, P, de La Fe C, Fernández A, Poveda JB. (2005) Relationship between rheumatoid arthritis and *Mycoplasma pneumoniae*: A case-control study. Rheumatology (Oxford), 44, 912-914

Rao P, Knaus EE. (2008) Evolution of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): Cyclooxygenase (COX) inhibition and beyond. J. Pharm. Pharmaceut. Sci., 11, 81s-110s

Redlich K, Schett G, Steiner G, Hayer S, Wagner EF, Smolen JS. (2003) Rheumatoid arthritis therapy after tumor necrosis factor and interleukin-1 blockade. Arthritis Rheum., 48, 3308-3319

Ruedl C, Koebel P, Bachmann M, Hess M, Karjalainen K. (2000) Anatomical origin of dendritic cells determines their life span in peripheral lymph nodes. J. Immunol., 165, 4910-4916

Ruolf J, Hülsemann JL, Mittendorf T, Handelsmann S, von der Schulenburg JM, Zeidler H,

- Merkesdal S. (2003) Costs of rheumatoid arthritis in Germany: A micro-costing approach based on healthcare payer's data sources. *Ann. Rheum. Dis.*, 62, 544-550
- Saag KG, Teng GG, Patkar NM, Anuntiyo J, Finney C, Curtis JR, Paulus HE, Mudano A, Pisu M, Elkins-Melton M, Outman R, Allison JJ, Suarez Almazor M, Bridges SL Jr, Chatham WW, Hochberg M, MacLean C, Mikuls T, Moreland LW, O'Dell J, Turkiewicz AM, Furst DE; American College of Rheumatology. (2008) American College of Rheumatology 2008 recommendations for the use of nonbiologic and biologic disease-modifying antirheumatic drugs in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 59, 762-784
- Schimmelpfennig CH, Schulz S, Arber C, Baker J, Tarner IH, McBride J, Contag CH, Negrin RS. (2005) Ex vivo expanded dendritic cells home to T cell zones of lymphoid organs and survive in vivo after allogeneic bone marrow transplantation. *Am. J. Pathol.*, 167, 1321-1331
- Silman AJ, Pearson JE. (2002) Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.*, 4, 265-272
- Slavin AJ, Tarner IH, Nakajima A, Urbanek-Ruiz I, McBride J, Contag CH, Fathman CG. (2002) Adoptive cellular gene therapy of autoimmune disease. *Autoimmun. Rev.*, 1, 213-219
- Smith R, Tarner IH, Hollenhorst M, Lin C, Levicnik AU, Fathman CG, Nolan GP. (2003) Localized expression of an anti-TNF single-chain antibody prevents development of collagen-induced arthritis. *Gene Ther.*, 10, 1248-1257
- Smolen JS, Steiner G. (2003) Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2, 473-488
- Somia N, Verma IM. (2000) Gene therapy: Trials and tribulations. *Nat. Rev. Genet.*, 1, 91-99
- Symmons DP. (2005) Looking back: Rheumatoid arthritis – aetiology, occurrence and mortality. *Rheumatology (Oxford)*, 44 Suppl 4, iv14-iv17
- Symmons DP, Bankhead CR, Harrison BJ, Brennan P, Barrett EM, Scott DG, Silman AJ. (1997) Blood transfusion, smoking and obesity as risk factors for the development of rheumatoid arthritis:

- Results from a primary care-based incident case-control study in Norfolk, England. *Arthritis Rheum.*, 40, 1955-1961
- Turner IH, Müller-Ladner U, Fathman CG. (2004) Targeted gene therapy: Frontiers in the development of 'smart drugs'. *Trends biotechnol.*, 22, 304-310
- Turner IH, Nakajima A, Seroogy CM, Emann J, Levicnik A, Contag CH, Fathman CG. (2002) Retroviral gene therapy of collagen-induced arthritis by local delivery of IL-4. *Clin. Immunol.*, 105, 304-314
- Turner IH, Neumann E, Gay S, Fathman CG, Müller-Ladner U. (2006) Developing the concept of adoptive cellular gene therapy of rheumatoid arthritis. *Autoimmun. Rev.*, 5, 148-152
- Turner IH, Slavin AJ, McBride J, Levicnik A, Smith R, Nolan GP, Contag CH, Fathman CG. (2003) Treatment of autoimmune disease by adoptive cellular gene therapy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 998, 512-519
- Tengstrand B, Ahlmen M, Hafström I. (2004) The influence of sex on rheumatoid arthritis: A prospective study of onset and outcome after 2 years. *J. Rheumatol.*, 31, 214-222
- Trinchieri G, Pflanz S, Kastelein RA. (2003) The IL-12 family of heterodimeric cytokines: New players in the regulation of T cell responses. *Immunity*, 19, 641-644
- Um HD, Cho YH, Kim DK, Shin JR, Lee YJ, Choi KS, Kang JM, Lee MG. (2004) TNF- α suppresses dendritic cell death and the production of reactive oxygen intermediates induced by plasma withdrawal. *Exp. Dermatol.*, 13, 282-288
- van der Heiden IM, Wilbrink B, Tchetcherikov I, Schrijver IA, Schouls LM, Hazenberg MP, Breedveld FC, Tak PP. (2000) Presence of bacterial DNA and bacterial peptidoglycans in joints of patients with rheumatoid arthritis and other arthritides. *Arthritis Rheum.*, 43, 593-598
- van der Pouw Kraan TC, van Gaalen FA, Kasperkovitz PV, Verbeet NL, Smeets TJ, Kraan MC, Fero M, Tak PP, Huizinga TW, Pieterman E, Breedveld FC, Alizadeh AA, Verweij CL. (2003) Rheumatoid arthritis is a heterogeneous disease: Evidence for differences in the activation of the

STAT-1 pathway between rheumatoid tissues. *Arthritis Rheum.*, 48, 2132-2145

Wolfe F, Mitchell DM, Sibley JT, Fries JF, Bloch DA, Williams CA, Spitz PW, Haga M, Kleinheksel SM, Cathey MA. (1994) The mortality of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 37, 481-494

Yelin E, Murphy L, Cisternas MG, Foreman AJ, Pasta DJ, Helmick CG. (2007) Medical care expenditures and earnings losses among persons with arthritis and other rheumatic conditions in 2003, and comparisons with 1997. *Arthritis Rheum.*, 56, 1397-1407

Zakharova M, Ziegler HK. (2005) Paradoxical anti-inflammatory actions of TNF-alpha: Inhibition of IL-12 and IL-23 via TNF receptor 1 in macrophages and dendritic cells. *J. Immunol.*, 175, 5024-5033

Zeng QY, Chen R, Darmawan J, Xiao ZY, Chen SB, Wigley R, Le Chen S, Zhang NZ. (2008) Rheumatic diseases in China. *Arthritis Res. Ther.*, 10, R17

Zentilin P, Serio B, Dulbecco P, Caratto E, Iiritano E, Fasciolo D, Bilardi C, Mansi C, Testa E, Savarino V. (2002) Eradication of *Helicobacter pylori* may reduce disease severity in rheumatoid arthritis. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 16, 1291-1299

6. Abkürzungen

ACGT	adoptiver zellulärer Gentransfer
aqua dest.	Aqua destillata - destilliertes Wasser
aqua bidest.	Aqua bidestillata - zweifach destilliertes Wasser
BM-DC	<i>bone marrow derived dendritic cells</i>
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CFA	<i>complete Freund's adjuvant</i>
CIA	<i>collagen induced arthritis</i>
CMV	Cytomegalovirus
COX	Cyclooxygenase
Ct	<i>cycle threshold</i>
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DBA/1	<i>dilute, brown, non-agouti type 1</i> Mäusestamm
DC	<i>dendritic cells</i>
DMARD	<i>disease-modifying anti-rheumatic drug</i>
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
EBV	Epstein-Barr-Virus
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
ELISA	<i>enzymelinked immunosorbent assay</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FasL	Fas Ligand
GCP	<i>good clinical practice</i>
HLA	<i>human leukocyte antigene</i>
HRPO	<i>horseradish peroxidase</i>
HSP	<i>heat shock protein</i>
huDC	<i>human dendritic cells</i>
iDC	<i>immature dendritic cells</i>
IFA	<i>incomplete freund's adjuvant</i>
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IRES	<i>internal ribosomal entry site</i>
kb	Kilobasen

KLH	<i>keyhole limpet hemocyanin</i>
LPS	Lipopolysaccharid
M	Mol
MACS	<i>magnetic activated cell sorting</i>
mg	Milligramm
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
ml	Milliliter
mM	Millimol
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
µM	Mikromol
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
muDC	<i>murine dendritic cells</i>
ng	Nanogramm
nM	Nanomol
NSAID	<i>non-steroidal anti-inflammatory drugs</i>
OD	optische Dichte
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PE	Phycoerythrin
pg	Pikogramm
qRT-PCR	<i>quantitative real-time PCR</i>
RA	rheumatoide Arthritis
RANKL	<i>receptor activator of nuclear factor kappa B ligand</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RRE	<i>Rev response element</i>
RT-PCR	Reverse Transkription-PCR
scFv	<i>single-chain variable Fragment</i> eines Antikörpermoleküls
SCID	<i>severe combined immunodeficiency</i>
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TU	<i>transforming unit</i>

Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die ich wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Halle, den 01. 05. 2010