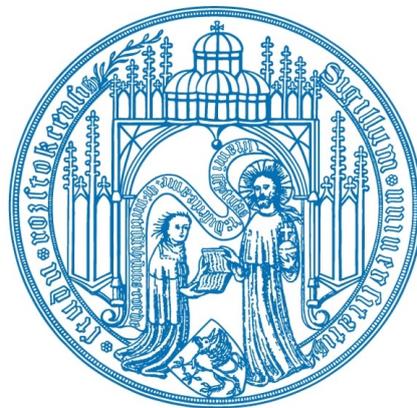


Aus dem Institut der Immunologie der Universität Rostock
Direktor: Prof. Dr. med. Hans-Jürgen Thiessen

Die Bedeutung des Thymus bei der Citruillinierung von Autoantigenen



Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von
Andra Biemelt,
geb. am 02.07.1987 in Guben

Rostock, 2014

Dekan: Prof. Dr. med. Emil Christian Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Brigitte Müller-Hilke

Institut für Immunologie, Universitätsmedizin Rostock

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Christian Kneitz

Chefarzt der Klinik für Innere Medizin II, Klinikum Südstadt Rostock

3. Gutachter: PD Dr. Eva Tolosa

Institut für Immunologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Datum der Einreichung: 23.05.2014

Datum der Verteidigung: 29.04.2015

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VI
Zusammenfassung	VII
1. Einleitung	1
1.1. Autoimmunität und Toleranzinduktion	1
1.1.1. Die zentrale Toleranz	1
1.1.2. Die periphere Toleranz	5
1.2. Rheumatoide Arthritis	7
1.2.1. Krankheitsbild	7
1.2.2. Antikörper gegen citrullinierte Peptidantigene	9
1.2.3. Risikofaktoren der RA	9
1.2.4. Peptidylarginindeiminase	10
1.3. Die Kollagen-induzierte Arthritis als Mausmodell der RA	12
1.4. Zielstellung	13
2. Material und Methoden	14
2.1. Geräte	14
2.2. Mäuse	15
2.3. Isolation der TECs	15
2.3.1. Enzymverdau der Zellsuspension	18
2.3.2. Auftrennung durch den Percoll-Dichtegradienten	19
2.3.3. Zelldepletion mittels autoMACS	20
2.3.4. Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung	21
2.4. Expressionsanalyse	23
2.4.1. Isolation der RNA	24
2.4.2. Konzentrationsbestimmung und Qualitätskontrolle der RNA	24
2.4.3. Reverse Transkription	25
2.4.4. TaqMan [®] Real-Time Polymerase-Kettenreaktion	26
2.5. Proteinanalyse	28
2.5.1. Lysierung der Zellen	30
2.5.2. Bestimmung der Proteinkonzentration	31
2.5.3. Dialyse der Proben	31
2.5.4. Bestimmung der Proteinkonzentration vor und nach Beschichtung	32

2.5.5. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	32
2.6. Statistische Auswertung	35
3. Ergebnisse	36
3.1. Charakterisierung der Zellfraktionen	36
3.1.1. Steigerung der Zellausbeute durch Optimierung der Thymusaufreinigung	36
3.1.2. Die Anzahl der T-Zellen ist in den drei Mausstämmen vergleichbar	37
3.1.3. Reife und unreife mTECs konnten mit hoher Reinheit isoliert werden	39
3.1.4. Reanalyse bestätigte hohe Reinheit der sortierten mTECs	41
3.1.5. DBA/1 weisen signifikant geringere mTEC-Zahlen auf	42
3.2. Nachweis der PAD-Expression in den mTECs	44
3.2.1. RNA wurde in guter Qualität aus mTECs isoliert	44
3.2.2. Reife mTECs verzeichneten höhere PAD-Expression	45
3.2.3. Die Expression von Aire korreliert mit der PAD-Expression	47
3.2.4. DBA-Mäuse zeigten signifikant höhere PAD-Expression	48
3.3. PAD-Nachweis auf Proteinebene	51
3.3.1. Korrelation von Zellzahl und Proteinkonzentration	51
3.3.2. Proteinnachweis mittels ELISA	52
4. Diskussion	55
4.1. Die Versuche beschränkten sich auf ein Geschlecht	55
4.2. Gleiches Alter ist essentiell für die Zellzahlen	56
4.3. TEC-Zellzahlen sind wichtig für die Selektionsprozesse	56
4.4. mTEC-Zahlen könnten Rolle bei der Entwicklung von Autoimmunität spielen	57
4.5. PADs werden als mögliche TRAs in den mTECs exprimiert	58
4.6. PAD-Expression könnte Aire-abhängig reguliert sein	59
4.7. Erhöhte PAD-Expression in dem CIA-anfälligen Stamm	61
4.8. Nachweis auf Proteinebene mit zu geringer Sensitivität	62
4.9. Weitere Mechanismen verhindern die Entwicklung von Autoimmunität	62
4.10. Übertragbarkeit auf humane Situation	63
5. Ausblick	65
6. Literaturverzeichnis	66
Danksagung	83

Abkürzungsverzeichnis

ACPA	Antikörper gegen citrullinierte Peptidantigene
ACR	American College of Rheumatology
Aire	Autoimmun-Regulator
al.	alii
anti-CCP2	Antikörper gegen cyclische citrullinierte Peptide
APECED	Autoimmunen-Polyendokrinopathie-Kandidiasis-Ektodermales-Dystrophie-Syndrom
APZ	antigenpräsentierende Zelle
BSA	bovines Serumalbumin
CD	Cluster of Differentiation
CIA	Kollagen-induzierte Arthritis
Ct	cycle threshold = Schwellenwert - Zyklus
cTEC	kortikale Thymus-Epithelzelle
CTLA-4	cytotoxic lymphocyte antigen 4
DC	dendritische Zellen
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DLL	Delta-like Liganden
DN	doppelt negativ
DP	doppelt positiv
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EULAR	European League Against Rheumatism
FACS	fluorescence activated cell sorting = Durchflusszytometrie
FCS	fetal calf serum
FSC	Forward Scatter
g	Kraft pro Masse
GAPDH	Glycerolaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
GITR	Glucocorticoid Induced Tumor Necrosis Factor Receptor
HLA	humanes Leukozytenantigen
HRP	Meerrettichperoxidase

IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
MACS	Magnetic Cell Separation
MHC	Major Histokompatibility Complex
MNS	Mausnormalserum
mTEC	medulläre Thymus-Epithelzelle
OD	optische Dichte
PAD	Peptidylarginindeiminase
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pGE	promiske Genexpression
RA	Rheumatoide Arthritis
RANK	Receptor Activator of NF- κ B
RF	Rheumafaktor
RIN	RNA-Integrity Number
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Rooswell Park Memorial Institut
RT	Reverse Transkription
SE	shared epitope
SP	einfach positiv
SSC	Sidewards Scatter
TEC	Thymus-Epithelzelle
TGF	transforming growth factor
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TRA	tissue restricted antigen
Treg	regulatorische T-Zelle
TZR	T-Zell-Rezeptor
U / min	Umdrehungen pro Minute

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht zur T-Zellentwicklung im Thymus.....	3
Abbildung 2: Übersicht zum Ablauf der Experimente	14
Abbildung 3: Schichtung der Zellfraktionen nach der Percoll- Dichtezentrifugation	20
Abbildung 4: Vergleichbare Zellzahlen der T-Zellen sprechen für ähnliche Größe der Thymi.....	38
Abbildung 5: Gesetzte Regionen bei der Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung für die Isolierung der reifen und unreifen mTECs.....	40
Abbildung 6: Die reifen und unreifen mTECs konnten mit hoher Reinheit isoliert werden.....	41
Abbildung 7: Der DBA/1 Mausstamm zeigt eine signifikant geringere Anzahl an mTECs.	43
Abbildung 8: Die RNA konnte in guter Qualität aus mTEC-Proben isoliert werden.	44
Abbildung 9: Die PAD-Gene sind in den reifen mTECs höher exprimiert als in den unreifen mTECs.	46
Abbildung 10: Die Expression von Aire korreliert mit der PAD-Expression.	47
Abbildung 11: Die Genexpression der meisten PADs ist bei den DBA/1 Mäusen am höchsten.....	50
Abbildung 12: Proteinbestimmung wurde mittels Nano Orange durchgeführt.....	51
Abbildung 13: Die Zellzahl korreliert mit der Proteinmenge.....	52
Abbildung 14: Beispiel einer Standardkurve für das PAD3-Protein.....	54

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: ACR/EULAR Kriterien zur Klassifikation der RA 2010	8
Tabelle 2: verwendete Geräte	14
Tabelle 3: verwendete Lösungen und Materialien	16
Tabelle 4: Antikörper für die Zellsortierung und autoMACS	18
Tabelle 5: Ansatz der Percoll-Lösungen	19
Tabelle 6: Parameter für die Sortierung	22
Tabelle 7: verwendete Materialien	23
Tabelle 8: TaqMan® Gene Expression Assays	24
Tabelle 9: Zusammensetzung einer RT-Reaktion	25
Tabelle 10: PCR-Reaktionsgemisch	27
Tabelle 11: PCR-Reaktionsgemisch für GAPDH	27
Tabelle 12: verwendete Lösungen und Materialien	29
Tabelle 13: Antikörper für ELISA	30
Tabelle 14: Eine höhere Ausbeute wurde durch die Erhöhung von Enzymkonzentration und Zeit erreicht.	37

Zusammenfassung

Ein funktionierendes Immunsystem sollte in der Lage sein, Pathogene effizient zu bekämpfen und körpereigene Strukturen zu erkennen. Richtet sich das Immunsystem gegen sich Selbst, kann es zur Ausbildung von Autoimmunerkrankungen kommen, wie z.B. der rheumatoiden Arthritis. Dabei entkommen autoreaktive T-Zellen den Toleranzmechanismen des Immunsystems und führen durch Aktivierung von B-Zellen zur Produktion von Autoantikörpern. Bei der rheumatoiden Arthritis treten spezifische Autoantikörper auf, die citrullinierte Proteine erkennen. Die Citrullinierung als posttranslationale Proteinmodifikation wird von Peptidylarginindeiminasen (PADs) katalysiert.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Frage untersucht werden, ob gegen posttranslationale Modifikationen, wie der Citrullinierung, eine zentrale Toleranz auf T-Zell-Ebene induziert werden kann.

Dazu wurden medulläre thymische Epithelzellen (mTECs) aus den Thymi von drei Mausstämmen (NMRI, BL6 und DBA/1 mit unterschiedlicher Prädisposition für die Entwicklung einer Arthritis) durchflusszytometrisch analysiert und sortiert. Diese Zellen sind massgeblich an der zentralen Toleranzinduktion beteiligt. Anschließend wurde die RNA aus diesen Zellen isoliert und mit Hilfe der quantitativen PCR stammspezifisch die PAD-Expression untersucht.

Es stellte sich heraus, dass PAD-Gene in den mTECs auf RNA-Ebene exprimiert werden. Interessanterweise wurde eine verminderte Zahl an mTECs für den DBA/1-Mausstamm im Vergleich zu den anderen beiden Stämmen festgestellt. Dieser Mausstamm ist besonders anfällig für das Auslösen einer experimentellen Arthritis. Allerdings wurde diese verminderte mTEC-Zahl von der erhöhten PAD-Expression begleitet, worin sich ein kompensatorischer Mechanismus vermuten lässt. Desweiteren wurde eine Korrelation zwischen der Expression von Aire und den PAD-Genen nachgewiesen. Hier wäre zu vermuten, dass PADs Aire-abhängig exprimiert werden.

Das Vorhandensein von PADs und die Existenz der Citrullinierung wären Grundvoraussetzungen für die Negativselektion im Thymus. Daher sollte in weiteren Studien der Nachweis der PAD-Proteine und der Citrullinierung erfolgen.

1. Einleitung

1.1. Autoimmunität und Toleranzinduktion

Unter Autoimmunität versteht man eine Fehlfunktion des Immunsystems, bei der körpereigene Strukturen als fremd erkannt werden. Dadurch kommt es zur Abwehr gegen die körpereigenen Gewebe mit Bildung von Autoantikörpern, zellulären und humoralen Abwehrreaktionen. Diese Mechanismen tragen zu einer Entzündungsreaktion mit einer charakteristischen Gewebeerstörung bei. Um der Entstehung von Autoimmunität vorzubeugen, hat das Immunsystem Mechanismen zur Selbsttoleranz entwickelt: die zentrale und die periphere Toleranz.

1.1.1. Die zentrale Toleranz

Die zentrale Toleranz beinhaltet die Entwicklung der Lymphozyten in den primären lymphatischen Organen (Knochenmark und Thymus). In den nachfolgenden Ausführungen soll genauer auf die T-Lymphozyten im Thymus eingegangen werden, bei denen die positive und negative Selektion eine wichtige Rolle spielen.

1.1.1.1. Der Thymus: Aufbau und Ontogenese

Der Thymus liegt im oberen vorderen Mediastinum und wird von einer Bindegewebskapsel umgeben. Er besteht aus der Rinde (= Kortex) und dem Mark (= Medulla). Es finden sich verschiedene Zelltypen im Thymus, wie Lymphozyten, Erythrozyten und ein Netz aus thymischen Epithelzellen (TEC) [Anderson and Jenkinson, 2001]. Seine immunologische Aufgabe besteht darin, aus hämatopoetischen Vorläuferzellen reife T-Lymphozyten zu entwickeln und diese auf Immunkompetenz und Selbsttoleranz zu selektieren. In der Literatur wird von einer direkten Kopplung der TECs mit der T-Zell-Entwicklung durch Zell-Zell-Kontakte und löslichen Wechselwirkungen gesprochen [Boyd et al., 1993; Ritter and Palmer, 1999]. Hierbei sind die Interaktionen und Signale der TECs von großer Bedeutung, wie z.B. Peptide / MHC Liganden für die Selektion, lösliche Faktoren für Überleben und Ausdehnung sowie Notch Liganden für Bindung und Differenzierung [Shakib et al., 2009].

Die TECs werden in medulläre (mTECs) und kortikale Epithelzellen (cTECs) unterschieden, welche einen gemeinsamen Ursprung in bipotenten Vorläufern

haben [Rossi et al., 2006]. Sie bilden mit anderen Stroma-Zellen (DC, Makrophagen, Fibroblasten) ein dreidimensionales Netzwerk [Boyd et al., 1993]. Hierbei sind die cTECs für die positive Selektion verantwortlich, bei der die doppelt positiven (DP) Thymozyten körpereigene Peptid-MHC-Komplexe erkennen sollen. Die mTECs spielen bei der negativen Selektion eine Rolle, indem sie autoreaktive Thymozyten der Apoptose zuführen. Diese Mechanismen werden als zentrale Toleranz zusammengefasst.

Es wurden verschiedene Rezeptoren entdeckt, die eine wichtige Rolle in der normalen Entwicklung des medullären Thymus spielen, wie RANK, Osteoprotegerin, CD40 und Lymphotoxin beta [Anderson and Takahama, 2012]. Die genauen Wirkmechanismen und eine eventuelle klinische Nutzung müssen aber noch geklärt werden.

Die reifen mTECs stellen eine postmitotische, terminal differenzierte Population dar [Gray et al., 2007]. Diese bilden schließlich zwiebelschalenartige epitheliale Strukturen, die auch als Hassall-Körperchen bezeichnet werden [Hale and Markert, 2004; Patel et al., 1995].

Der Thymus bildet sich im Laufe des Lebens zurück [Ortman et al., 2002; Sempowski et al., 2002; Li et al., 2003]. Bei diesem Prozess spricht man von der Involution des Thymus. Dies führt zu einer Produktionsabnahme von naiven T-Zellen [Douek et al., 1998; Hale et al., 2006].

1.1.1.2. T- Zellentwicklung und positive Selektion

Die lymphoiden Vorläuferzellen gelangen über die Blutbahn in die äußere Region des Kortex, wo sie durch Interleukin 7 (IL-7) und Delta-like Liganden (DLL) der cTECs stimuliert werden [Rothenberg et al., 2008]. Dadurch durchlaufen sie vier CD4/CD8 doppelt-negative (DN) Stadien mit unterschiedlicher Expression von CD25 und CD44 [Gossens et al., 2010]. In einem nächsten Schritt erfolgt die Bildung der TZR β -Kette durch V-D-J-Genrekombination, wodurch sowohl die Expression der Korezeptoren CD4/CD8 stimuliert als auch das Genrearrangement der TZR α -Kette veranlasst wird [Anderson and Takahama, 2012]. Daraus resultieren CD4/CD8 doppelt-positive (DP) Lymphozyten mit einer Lebensdauer von 3 – 4 Tagen im Kortex [Kyewski and Klein, 2006].

Die DP Thymozyten werden in ihren Interaktionen mit Peptid / MHC-Komplexen der cTECs getestet, wobei Zellen ohne Reaktion durch Vernachlässigung sterben [Kyewski and Klein, 2006]. Während eine geringe Affinität zu positiver Selektion und Überleben führt, endet eine zu hohe Interaktionsaffinität in Apoptose in Folge der negativen Selektion [Anderson et al., 1998]. Nur etwa 1 – 5% der T-Zellen überleben diesen Prozess und reifen zu einfach positiven (SP) CD4+CD8- bzw. CD4-CD8+ Stadien heran [Anderson and Takahama, 2012].

Damit die cTECs die spezifischen MHC-assoziierten Peptide präsentieren können, exprimieren sie einzigartige intrazelluläre proteolytische Enzyme. Zum einen ist das Thymoproteasom, welches die cTEC spezifische katalytische Untereinheit beta5t (Psmb11) enthält, verantwortlich für die Produktion von Selbstpeptiden für die MHC Klasse I und damit für die CD4-CD8+ T-Zellen. Zum anderen sind die lysosomalen Proteasen Prss16 und Cathepsin L essentiell für die MHC Klasse II abhängigen CD4+CD8- T-Zellen [Anderson and Takahama, 2012].

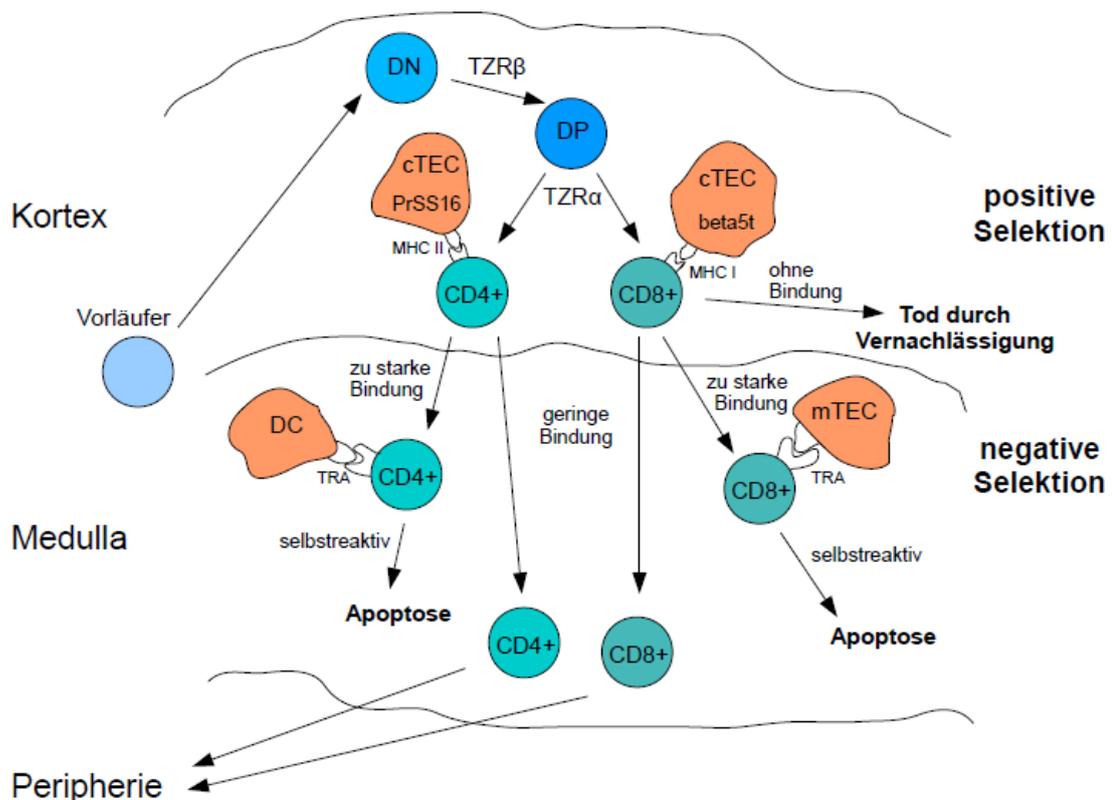


Abbildung 1: Übersicht zur T-Zellentwicklung im Thymus. Erläuterungen siehe Text.

1.1.1.3. Negative Selektion

Die positiv selektierten Thymozyten wandern in das Mark und verbringen dort 4 – 5 Tage, bevor sie in die Zirkulation entlassen werden [McCaughy et al., 2007]. Während dieser Zeit erfolgt die negative Selektion, bei der dendritische Zellen (DC) und mTECs gemeinsam Selbst-Antigene präsentieren und zur Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz beitragen, indem sie selbstreaktive T-Zellen in Apoptose schicken oder regulatorische T-Zellen (CD4+CD25+) produzieren [Klein and Jovanovic, 2011]. MTECs können nur direkt die Negativelektion von CD8+, nicht aber von CD4+ SP Thymozyten vermitteln [Gallegos and Bevan, 2004]. Hubert et al. interpretierten ihre Untersuchungen dahingehend, dass hier ein Antigentransfer von den mTECs auf die DC stattfindet, um auch die Deletion der CD4+ SP T-Zellen zu gewährleisten [Hubert et al., 2011].

Die mTECs sind in der Lage, eine Vielzahl von Selbst-Antigenen von extrathymischen Geweben zu präsentieren, welche auch als TRAs (tissue-restricted self-antigens) bezeichnet werden [Derbinski et al., 2001]. Diese unterschiedlichen Gengruppen in den mTECs werden nur gewebsspezifisch exprimiert und definieren sich als promiske Genexpression (pGE) [Kyewski and Klein, 2006]. Der gesamte Pool der pGE umfasst mehr als 1000 TRAs und jedes Selbst-Antigen wird nur durch 1 – 3 % der mTECs exprimiert [Cloosen et al., 2007; Derbinski et al., 2008]. Es konnten schon eine Vielzahl an TRAs speziell in mTECs nachgewiesen werden, wie z.B. Albumin, Haptoglobin, Tyrosinase und Insulin [Derbinski et al., 2001].

Die TRAs werden direkt durch mTECs und indirekt durch benachbarte DC den T-Zellen präsentiert [Hubert et al., 2011]. In den reifen mTECs, welche MHC II und CD80 hoch exprimieren, wurde der Transkriptionsfaktor Aire (Autoimmun-Regulator) gefunden [Hamazaki et al., 2007, Rossi et al., 2007, Gäbler et al., 2007]. Anderson et al. deuteten an, dass Aire die Expression der TRAs in den mTECs reguliert [Anderson et al., 2002]. Dies wurde in Versuchen mit Aire-defizienten Mäusen nachgewiesen, bei denen ein Ausbleiben der Eliminierung von selbstreaktiven T-Zellen im Thymus beobachtet wurde [Liston et al., 2003]. Beim Menschen äußert sich ein Gendefekt von Aire in dem seltenen Krankheitsbild des Autoimmunen-Polyendokrinopathie-Kandidiasis-

Ektodermales-Dystrophie-Syndrom (APECED) [Nagamine et al., 1997; Aaltonen et al., 1997]. Bei dieser Erkrankung richten sich gewebsspezifische Autoantikörper gegen periphere Zielorgane, vor allem gegen endokrine Drüsen [Betterle et al., 2002]. Außerdem gibt es Hinweise, dass diese Krankheit mit einem HLA-Genotyp assoziiert ist [Halonen et al., 2002].

Die Vielfalt der TRAs in den mTECs ist groß, jedoch wurde ein Beweis für die Expression citrullinierter Peptide noch nicht gefunden. Hierbei könnten Neoepitope eine Rolle spielen, die CD4+ T-Zellen aktivieren und Hilfe bei der Erzeugung von Autoantikörperantworten leisten [Gaubas et al., 2011].

1.1.2. Die periphere Toleranz

Es gibt verschiedene Mechanismen der peripheren Toleranz. Die wichtigsten sind die Apoptose, die Anergie und die Immunsuppression durch regulatorische T-Zellen (Tregs).

Die **Apoptose** gehört zum programmierten Zelltod und dient zur Eliminierung von potentiell schädlichen Zellen. Hier geht es vor allem um aktivierte B- und T-Zellen, die durch eine Mutation eine höhere Affinität zu Selbst-Antigenen entwickeln können. Autoreaktive T-Zellen werden durch die negative Selektion in die Apoptose überführt. Findet bei den B-Zellen eine Vernetzung der Rezeptoren durch ein Selbst-Antigen statt, senden sie ein Signal ins Innere der Zelle, welches die Apoptose induziert [Rink et al., 2012].

Die **Anergie** bezieht sich auf die fehlende T-Zellaktivierung, da T-Lymphozyten zur Aktivierung zwei Signale brauchen: bei dem ersten erkennt der TZR die Antigenpeptide von APZ unter Berücksichtigung der HLA-Komplexe (Klasse I für CD8+ und Klasse II für CD4+ T-Zellen). Das 2. Signal besteht in der Kostimulation durch die Interaktion des CD28-Rezeptors auf den T-Zellen mit den CD80 / CD86-Liganden auf den APZ [Riley and June, 2005].

Erkennt die T-Zelle das Antigen, aber fehlt das Kostimulationssignal, führt das zu einer antigenspezifischen „Nichtreaktivität“ (Anergie). Ist die Kostimulation vorhanden, aber der TZR erkennt kein relevantes Antigen, erfolgt auch keine T-Zellaktivierung (Ignoranz). Es kommt nur zur antigenspezifischen T-Zellaktivierung, wenn beide Signale vorhanden sind [Kabelitz und Schreiber, 2009].

Bei der Kostimulation spielen sowohl positive als auch negative Regulationsmechanismen eine Rolle. Der CD28-Rezeptor hat eine aktivierende Funktion auf die T-Zellen. Dagegen folgt dem CTLA-4 (cytotoxic lymphocyte antigen 4) – Rezeptor eine negative Regulierung. Entscheidend für die Kontrolle der T-Zellaktivierung ist das Gleichgewicht zwischen positiver und negativer Kostimulation [Scalpino and Daikh, 2008].

Die **Tregs** sind der wichtigste Mediator der peripheren Toleranz und spielen eine Schlüsselrolle in der Verhinderung von Autoimmunkrankheiten und in der Limitierung von chronisch-entzündlichen Erkrankungen [Vignali et al., 2008]. Ihre Entwicklung wird zum Teil von den mTECs und den DCs im Thymus induziert, um die Wirkung von autoreaktiven T-Zellen zu unterdrücken, die der zentralen Toleranz entkommen sind [Aschenbrenner et al., 2007; Román et al., 2010; Chinen et al., 2010].

Sakaguchi und Kollegen beschrieben, dass die CD4⁺ Tregs eine starke CD25-Expression aufweisen [Sakaguchi et al., 1995]. Zusätzlich exprimieren sie den Transkriptionsfaktor Forkhead box P3 (FoxP3)⁺ [Zheng and Rudensky, 2007], der für die Entwicklung, Erhaltung und Funktion der Tregs notwendig ist [Hori et al., 2003; Fontenot et al., 2003]. Es gibt weitere Zelloberflächenmarker, die unterschiedlich exprimiert sind und Untergruppen von Tregs charakterisieren können, z.B. CTLA-4, GITR, HLA-DR und CD127 [Costantino et al., 2008; Yi et al., 2006].

Es werden verschiedene Strategien diskutiert, wie Tregs die Immuntoleranz durchsetzen. Beispielsweise können antigenpräsentierende Zellen, insbesondere DCs, supprimierend wirken [Vignali et al., 2008]. Weitere Suppressionsmechanismen können durch inhibitorische Zytokine (z.B. IL-10, und TGF β), durch die Granzym-abhängige Zytolyse oder durch eine metabolische Störung in der Zielzelle umgesetzt werden [Vignali et al., 2008].

Eine Hauptursache von autoimmunen und entzündlichen Erkrankungen ist eine Störung in der Entwicklung oder der Funktion von Tregs [Sakaguchi et al., 2008]. Dieses Wissen bietet Ansätze zur Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten.

Die zentrale Toleranzinduktion soll am Beispiel eines Autoantigens der rheumatoiden Arthritis untersucht werden.

1.2. Rheumatoide Arthritis

1.2.1. Krankheitsbild

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist eine entzündliche Systemerkrankung mit chronisch-rezidivierender Polyarthrit. Sie weist ein symmetrisch-peripheres Befallsmuster auf. Betroffen sind vor allem die proximalen interphalangealen und metakarpophalangealen Finger- und Zehengelenke, in denen es zur Synovitis und Pannusbildung (destruktives synoviales Proliferationsgewebe) kommt [Michels und Schneider, 2010].

Epidemiologisch betrachtet, wird die RA mit einer weltweiten Prävalenz von etwa 0,5 - 1% angegeben [Gabriel et al., 2001; Silman et al., 2002]. Das Hauptmanifestationsalter liegt zwischen 30 und 50 Jahren, wobei Frauen 3-mal häufiger betroffen sind [Michels und Schneider, 2010].

Die Diagnose der RA wurde bis vor einiger Zeit anhand der Kriterien des American College of Rheumatology (ACR) von 1987 gestellt. Diese waren zwar nützlich zur Unterscheidung einer bestehenden RA von anderen entzündlichen Arthritiden, bewährten sich aber nicht bei der Früherkennung der Erkrankung [Banal et al., 2009]. Hierzu wurden 2010 neue Klassifikationskriterien der ACR und der EULAR (European League Against Rheumatism) veröffentlicht [Aletaha et al., 2010] (siehe Tabelle 1). Ein Wert von 6 Punkten oder mehr klassifiziert eine definitive RA.

Tabelle 1: ACR/EULAR Kriterien zur Klassifikation der RA 2010

Gelenke	Punkte
1 großes Gelenk	0
2 – 10 große Gelenke	1
1 – 3 kleine Gelenke (ohne große Gelenke)	2
4 – 10 kleine Gelenke (ohne große Gelenke)	3
> 10 Gelenke (mindestens 1 kleines Gelenk)	5
Serologie	
Negativer RF und negative ACPA	0
Niedrig positiver RF oder niedrig positive ACPA	2
Hoch positiver RF oder hoch positiver ACPA	3
Symptombdauer	
< 6 Wochen	0
≥ 6 Wochen	1
Akute Phase Reaktion	
CRP und BSG normal	0
CRP oder BSG gestört	1

Patienten sollten mindestens ein Gelenk mit klinischer Synovitis haben ohne eine besser erklärende Erkrankung. RF = Rheumafaktor; ACPA = Antikörper gegen citrullinierte Peptidantigene; CRP = C-reaktives Protein; BSG = Blutsenkungsgeschwindigkeit [Mjaavatten und Bykerk, 2013]

Im Krankheitsverlauf kommt es durch die chronische Entzündung der Gelenke und der Knochenerosion zur fortschreitenden Gelenkzerstörung, Schmerzen, Bewegungseinschränkung bis hin zur Invalidität [Wegner et al., 2010]. Auf Grund von zahlreichen extraartikulären Manifestationen (z.B. Pleuritis, Perikarditis, Episkleritis, Vaskulitiden, Amyloidose) und Komorbiditäten (z.B. Koronare Herzerkrankung, Bronchialkarzinom, Depressionen, Lymphome, Osteoporose) hat die RA eine reduzierte Lebenserwartung zur Folge [Prete et al., 2011].

1.2.2. Antikörper gegen citrullinierte Peptidantigene

Zur Diagnostik der RA wurden bislang viele Autoantikörper entdeckt, die gegen die verschiedensten Autoantigene reagieren. Die meisten sind jedoch nicht spezifisch für die RA, wie z.B. der Rheumafaktor (RF). Dieser ist bei zirka 75% der RA-Patienten nachweisbar und tritt sowohl bei anderen Autoimmun- und Infektionserkrankungen als auch in der gesunden Population (3 - 5%) auf [van Boekel et al., 2002]. Somit erreicht er nur eine mittlere Spezifität von 81% [Renaudineau et al., 2005]. Dagegen ist das Auftreten der Antikörper gegen citrullinierte Peptidantigene (ACPA) sehr spezifisch für die RA [Zendman et al., 2004]. Sie werden bei etwa 2/3 aller RA-Patienten und selten (<2%) bei gesunden Menschen gefunden [Klareskog et al., 2006]. Als Nachweis dient z.B. der Assay gegen Anti-CCP2-Antikörper mit einer Spezifität von 92 - 99% und einer Sensitivität von 55 – 72% [Engelmann und Müller-Hilke, 2009]. Das Auftreten der ACPA lässt sich schon einige Jahre vor dem Ausbruch der Erkrankung beobachten [Nielen et al., 2004]. ACPA-positive Patienten haben unabhängig von der Behandlung einen deutlich schwereren Krankheitsverlauf als ACPA-negative Patienten [Rönnelid et al., 2005; Kroot et al., 2000]. Die ACPA-Titer bleiben auch nach einer Therapie relativ konstant [Rönnelid et al., 2005; De Rycke et al., 2005b].

Die Studien zum Krankheitsverlauf und zur Genkopplung deuten auf eine Unterteilung der RA in zwei große und klinisch relevante Untergruppen hin: die ACPA-positive und ACPA-negative RA [Klareskog et al., 2008].

1.2.3. Risikofaktoren der RA

Ätiologisch gesehen ist die Ursache der RA noch weitgehend unbekannt, wobei verschiedene Risikofaktoren identifiziert wurden. Den genetischen Hauptrisikofaktor stellen die shared epitope (SE) tragende Allele des HLA-DR Gens dar [Gregersen et al., 1987; Jawaheer et al., 2002], wobei hier die Formen von HLA-DRB1 eine Rolle spielen [Ding et al., 2009; Lee et al., 2008]. Diese prädisponierenden SE sind auch mit dem Auftreten der ACPA verbunden [Klareskog et al., 2006; van der Helm-van Mil et al., 2007].

Neben der genetischen Disposition spielen auch Umweltfaktoren eine Rolle, wie z.B. Infektionen (Parodontitis), Einnahme von oralen Kontrazeptiva und

Rauchen [van Boekel et al., 2002]. Rauchen gilt als einer der wichtigsten Umweltfaktoren für die RA [Stolt et al., 2003; Uhlig et al., 1999]. In einer Zwillingsstudie mit 13 Paaren wurde belegt, dass in 12 Fällen Raucher von der Erkrankung betroffen waren [Silman et al., 1996]. Rauchen ist nur ein Risikofaktor für die ACPA-positive RA, jedoch nicht für die ACPA-negative [Klareskog et al., 2006; Pedersen et al., 2007]. Klareskog et al. fanden eine wichtige Interaktion von Gen und Umwelt heraus: Raucher haben mit 2 Kopien des Risikogens ein 21fach erhöhtes Risiko, verglichen mit Nichtrauchern ohne Risikogen [Klareskog et al., 2006].

Diese und noch weitere Risikofaktoren können zum Auftreten einer RA führen. Doch wie genau die Entstehung der Erkrankung abläuft, kann nur vermutet werden und ist Bestandteil weiterer Studien. Hierzu beschrieben Klareskog et al. ein 3-Phasen Modell zur Entwicklung einer ACPA-positiven RA, in dem genetische, immunologische und Umweltfaktoren berücksichtigt werden:

1. die Immunantwort (Risikofaktoren führen zur Bildung von ACPA),
2. die pathologische Entzündungsreaktion (unspezifische Arthritis und Citrullinierung von Proteinen im Gelenk) und
3. die chronische RA (Immunkomplexe erhalten die Gelenkentzündung aufrecht) [Klareskog et al., 2008].

1.2.4. Peptidylarginindeiminase

Die ACPA können nur gebildet werden, wenn vorher eine posttranslationale Modifikation der Peptidantigene stattfindet. Diese enzymatische Reaktion der Citrullinierung wird durch die Peptidylarginindeiminasen (PADs) katalysiert [György et al., 2006]. Hierbei wird die Aminosäure Arginin in Citrullin umgewandelt, bei der die Nettoladung des Proteins reduziert wird. Die PADs reagieren Kalzium-abhängig. Jedoch benötigen sie eine höhere Kalzium-Konzentration als in intakten Zellen vorhanden ist. Somit ist Kalzium ein wichtiger Regulator der aktiven PAD-Enzyme [Liu et al., 2013]. Bisher wurden 5 Mitglieder der PAD-Familie (PAD1, PAD2, PAD3, PAD4 und PAD6) mit unterschiedlicher Gewebsverteilung, subzellulärer Lokalisation und Substraten gefunden [Vossenaar et al., 2003b].

Allen PADs gemeinsam ist ihre mRNA Expression im Thymus [Vossenaar et al., 2003b]. Es kann davon ausgegangen werden, dass diese auf die pGE in den reifen mTECs zurückzuführen ist. Dagegen werden die einzelnen Proteine nur in bestimmten Geweben exprimiert.

PAD1 wurde hauptsächlich in der Epidermis und im Uterus nachgewiesen [Rus'đ et al., 1999; Guerrin et al., 2003] und ist an der Verhornung von epidermalem Gewebe beteiligt [Ishida-Yamamoto et al., 2002].

PAD2 ist das in den meisten Geweben exprimierte Enzym, am häufigsten im Skelettmuskel, Gehirn, Milz und in sekretorischen Drüsen [Watanabe et al., 1988; Watanabe and Senshu, 1989; Urano et al., 1990; Vossenaar et al., 2003b].

PAD3 findet man sowohl in der Haut als auch in den Haarfollikeln [Kanno et al., 2000; Nachat et al., 2005].

PAD4 tritt überwiegend in den Leukozyten auf [Vossenaar et al., 2004b; Asaga et al., 2001; Nakashima et al., 2002].

PAD6 wurde im Ovar und Hoden nachgewiesen [Chavanas et al., 2004].

Die physiologische Funktion der PADs ist von großer Bedeutung, jedoch sind die PADs und ihre citrullinierten Produkte mit vielen Erkrankungen des Menschen assoziiert, wie z.B. der RA. Hier geht die pathologische Citrullinierung von Proteinen mit dem Entzündungsprozess einher. Eine besondere Relevanz für die RA spielen PAD2 und PAD4, da ihre Expression in der rheumatoiden Synovialmembran [Nakayama-Hamada et al., 2005; De Rycke et al., 2005a; Foulquier et al., 2007], in Synovialflüssigkeitszellen [Vossenaar et al., 2004c] und extrazellär in der Synovialflüssigkeit nachgewiesen wurde [Kinloch et al., 2008].

Doch es ist nicht das Vorhandensein von citrullinierten Proteinen allgemein, sondern die Antikörper-Antwort, welche die RA charakterisiert [Wegner et al., 2010]. Als mögliche Antigene sind vier citrullinierte Proteine, die im Gelenk vorkommen, fest etabliert: citrulliniertes Fibrinogen/Fibrin [Masson-Bessière et al., 2001], Vimentin [Vossenaar et al., 2004a], Kollagen Typ II [Burkhardt et al., 2005] und α -Enolase [Kinloch et al., 2005]. Unklar bleibt, welches Antigen die entscheidende Rolle in der Pathogenese der RA spielt. In einem Versuch von Wegner et al. wurde die Reaktionsfähigkeit von Autoantikörpern gegen

verschiedene Antigene verglichen. Die Mehrheit der Serumproben von RA-Patienten reagierte mit mehr als einem Antigen. Jedes Serum hatte sein eigenes Reaktionsmuster und die meisten Proben konnten der Anti-CCP2-positiven Population zugeordnet werden [Wegner et al., 2010].

Neben der RA wurden die PADs auch bei anderen Formen von entzündlichen Arthritiden [Vossenaar et al., 2004c; Chapuy-Regaud et al., 2005] und nichtverwandten entzündlichen Erkrankungen nachgewiesen, wie z.B. Multiple Sklerose [Moscarello et al., 1994], Glaukom [Bhattacharya et al., 2006], Myositis [Makrygiannakis et al., 2006] und der Alzheimer Erkrankung [Ishigami et al., 2005].

1.3. Die Kollagen-induzierte Arthritis als Mausmodell der RA

Es wurden verschiedene experimentelle Mausmodelle entwickelt, um die Pathogenese der RA besser zu verstehen. Eine von diesen etablierten Modellerkrankungen kann bei Mäusen durch die Immunisierung mit Kollagen II induziert werden und wird deshalb als Kollagen-induzierte Arthritis (CIA) bezeichnet [Wooley et al., 1981]. Nach einem verzögerten Ausbruch entwickelt sich die Arthritis zu einem chronischen Stadium mit Knorpel- und Knochenerosionen [Vossenaar et al., 2003a]

Die Mausstämme unterscheiden sich hinsichtlich ihrer genetischen Prädisposition für die Entwicklung einer CIA. Diese ist mit der RA vergleichbar, da die Empfindlichkeit mit bestimmten Polymorphismen der MHC-Moleküle assoziiert ist. Hierbei handelt es sich um die MHC Haplotypen H2-q oder H2-r. Die Mäuse von dem Stamm der DBA/1 sind besonders empfänglich für das Auslösen einer CIA, da sie den MHC Haplotyp H2-q tragen [Wooley et al., 1981] und daher das MHC-II-Molekül I-A^q exprimieren. Aber auch HLA-DR1- und DR4-transgene Mäuse sind suszeptibel für eine CIA [Rosloniec et al., 1997; Rosloniec et al., 1998]. Es wurde eine strukturelle Ähnlichkeit des I-A^q Moleküls mit den DR4- und DR1-Moleküle nachgewiesen [Fugger et al., 1996]. Außerdem bindet das I-A^q Molekül an die gleiche immunodominante Peptidregion des Kollagen II wie das HLA-DR4 beim Menschen [Rosloniec et al., 1996; Kjellén et al., 1998].

Die NMRI-Mäuse besitzen auch den MHC H2-q Haplotypen, sind aber unempfindlich für das Auslösen einer CIA. Dies verdeutlicht, dass nicht nur genetische Faktoren eine Rolle bei der Entwicklung einer CIA spielen. Die C57BL/6 Mäuse tragen den Haplotypen MHC H2-b, entwickeln keine Arthritis und dienen vor allem als Referenzstamm [Holmdahl et al., 1988; Seki et al., 1992].

1.4. Zielstellung

Das Ziel dieser Arbeit beinhaltet den Nachweis der PAD-Expression im Thymus. Dies stellt die Grundvoraussetzung für die Citrullinierung dar, welche bei der RA von Bedeutung ist. Zusätzlich könnte sie einen möglichen Einfluss auf die zentrale Toleranz im Rahmen der Negativselektion haben.

Dazu wurden die drei verschiedenen Mausstämme NMRI, C57BL/6 und DBA/1 hinsichtlich ihrer PAD-Expression in den mTECs untersucht.

2. Material und Methoden

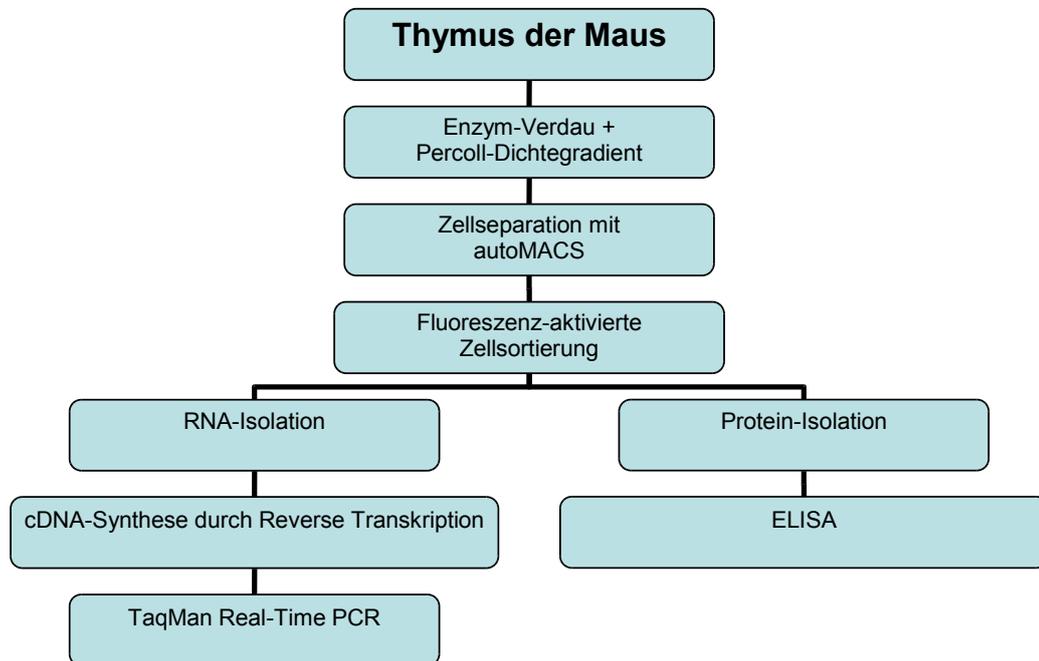


Abbildung 2: Übersicht zum Ablauf der Experimente

2.1. Geräte

Tabelle 2: verwendete Geräte

Gerät	Typ; Hersteller
Bioanalyzer	2100 Bioanalyzer; Agilent Technologies
ELISA-Plattenleser	Milenia Kinetic Analyzer; Diagnostic Products Corporation
Inkubationsschrank	Modell 3548 SN; Forma Scientific
Lichtmikroskop	CKX 41; Olympus
Spektrometer	Infinite 200 – Reader; Tecan
Spektrophotometer	NanoDrop-1000; Thermo Scientific
TaqMan	7900HT Fast Real Time PCR System; Applied Biosystems
Thermo-Cycler	GeneAmp PCR System 9700; Applied Biosystems

Zentrifugen	Biofuge fresco; Heraeus Mikro 22R; Hettich Megafuge 1.0R; Heraeus
Zell-Separator	autoMACS Separator; Miltenyi Biotec GmbH
Zell-Sortierer	FACS Aria™ II Flow Cytometer; BD Biosciences

2.2. Mäuse

Für die Entnahme der Thymi wurden Mäuse der Stämme NMRI, C57BL/6J (BL6) aus der eigenen Zucht und DBA/1 Ola Hsd (Harlan Winkelmann) verwendet. Das optimale Alter der Mäuse für die TEC Präparation wurde mit 4 – 5 Wochen beschrieben [Gray et al., 2006]. Wir verwendeten daher Mäuse in diesem Alter.

Die Zucht und Haltung der Tiere wurde von dem Tierpflegepersonal des hiesigen Tierhauses übernommen.

2.3. Isolation der TECs

Nach der Thymuspräparation erfolgten der Enzymverdau zur Herstellung der Einzelzellsuspension und die Dichtegradientenzentrifugation mit Percoll zur ersten Anreicherung der TECs. Jedoch war der prozentuale Anteil der TECs auch danach sehr gering. Den weitaus größeren Anteil stellten die CD45-positiven Lymphozyten dar, die daraufhin depletiert wurden. Die CD45-negativen TECs wurden mit Hilfe der Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung (FACS) in reife ($CD80^{\text{hoch}}$) und unreife ($CD80^{\text{niedrig}}$) mTECs aufgetrennt.

In Tabelle 3 werden die für die genannten Experimente benötigten Materialien und Lösungen aufgelistet.

Tabelle 3: verwendete Lösungen und Materialien

Name	Firma	Anmerkungen
A) Gekaufte Lösungen		
Accudrop Fluorescent Beads	BD Biosciences	
autoMACS Running Buffer (M-RB)	Miltenyi Biotec GmbH	pH 7,2
autoMACS Rinsing Solution (M-RS)	Miltenyi Biotec GmbH	pH 7,2
Collagenase B, from Clostridium histolyticum	Roche Applied Science	0,1 mg / ml
Cytometer Setup & Tracking Beads Kit	BD Biosciences	
Dispase, from Bacillus polymyxa	BD Biosciences	50 U / ml
DNase I grade II, from bovine pancreas	Roche Applied Science	20 kU / ml
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (1x PBS), liquid	Invitrogen Gibco®	ohne Calcium und Magnesium kein Phenolrot
Ethanol	Zentralapotheke Rostock	
Fetales Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories	½ h bei 56°C inaktiviert
Penicillin / Streptomycin	Invitrogen Gibco®	
Percoll	Sigma-Aldrich	1,13 g / ml
RPMI 1640 Medium (1X), liquid	Invitrogen Gibco®	mit GlutaMAX und Phenolrot

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Name	Firma	Anmerkungen
B) Selbst hergestellte Lösungen		
EDTA 0,5 M	MERCK	pH 8,0
Enzymgemisch pro Thymus		Collagenase B (2,65 µl / 500 µl) + Dispase (160 µl / 500 µl) + DNase I (6,64 µl / 500µl)
FACS-Puffer (PBS pH 7,4; 0,5% BSA; 0,1% NaN ₃)		500 ml PBS pH 7,4 + 2,5 g BSA + 0,5 g NaN ₃ steril filtrieren mit Filtereinheit (Nylonmembran, 0,2 µm Porengröße; NALGENE)
Mausnormalserum (MNS)		Gemisch aus verschiedenen Mausseren
2% FKS / PBS		100% FKS + 1x PBS (1:50)
Trypanblau	Chemapol	0,1% in 1x PBS
Zellkulturmedium		RPMI + 10% FKS + 1% Penicillin / Streptomycin
20x PBS		1000 ml dH ₂ O + 20 g NaCl (2.8M) + 4 g KCl (0.06M) + 28.8 g Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O (0.16M) + 4.8 g KH ₂ PO ₄ (0.04M)

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Name	Firma	Anmerkungen
C) Materialien		
FACS-Röhrchen	BD Biosciences	5 ml
Falcon™ Zellsieb	BD Biosciences	40 µm Nylon
Pasteurpipetten	Carl Roth GmbH	
Polypropylen Röhrchen	Greiner Bio-One GmbH	15 ml; 50 ml
Safe-Lock Reaktionsgefäße	Eppendorf AG	1,5 ml
Zellkultur Multiwellplatte	Greiner Bio-One GmbH	12 Well

Antikörper:

Tabelle 4: Antikörper für die Zellsortierung und autoMACS

Reaktivität	Klon	Markierung	Bezugsquelle	Bestell-Nr.
Mouse Ly-51	6C3	FITC	BD Biosciences	553160
Mouse CD80	16-10A1	PE	BD Biosciences	553769
Mouse CD45	30-F11	PerCP	BD Biosciences	557235
Mouse Ep-CAM	G8.8	Alexa Fluor® 647	BioLegend	118212
Mouse Ly-5	30F11.1	CD45	Miltenyi Biotec	130-052- 301

2.3.1. Enzymverdau der Zellsuspension

Die Thymi wurden von Bindegewebe und Blutgefäßen frei präpariert und anschließend in eine 12-well Platte in je 0,5 ml Zellkulturmedium (RPMI) pro Thymus überführt. Zu den zerkleinerten Thymi wurde das Enzymgemisch aus Collagenase B, Dispase und DNase (Ansatz siehe Tabelle 3B) gegeben und bei 37°C für 2 h inkubiert. Es wurden Pasteurpipetten mit einem Glasschneider gekürzt, so dass unterschiedlich große Öffnungen entstanden. Über der Brennerflamme wurden die Spitzen erhitzt, um die Kanten zu entschärfen. Während der Inkubationszeit wurde die Zellsuspension alle 10 min mit den

Pasteurpipetten in absteigender Größe auf- und abpipettiert, um das Gewebe zu zerkleinern. Eine Blasenbildung sollte möglichst vermieden werden. Nach der abgelaufenen Inkubationszeit wurde 10 µl EDTA pro 0,5 ml Medium zugegeben, um die Zellrosetten aufzubrechen, und bei maximal 37°C für 5 min inkubiert. Danach wurde die Zellsuspension durch ein Zellsieb mit Poren von 40 µm in ein 50 ml Reaktionsgefäß gegeben und anschließend mit 10 ml PBS / 2% FKS gewaschen.

2.3.2. Auftrennung durch den Percoll-Dichtegradienten

Tabelle 5: Ansatz der Percoll-Lösungen

Name	Zusammensetzung
Percoll A (1,124 g/ml) für 20 ml	18 ml Percoll (1,13 g/ml) + 1 ml 20x PBS + 1 ml H ₂ O
Percoll B (1,115 g/ml) für 10 ml	9,274 ml Percoll A + 0,726 ml 1x PBS
Percoll C (1,065 g/ml) für 10 ml	5,24 ml Percoll A + 4,76 ml 1x PBS

Zuerst wurden die notwendigen Percoll-Lösungen (siehe Tabelle 5) vorbereitet. Nach einer Zentrifugation bei 300*g für 10 Minuten wurden die Zellen in 4 ml Percoll B resuspendiert. In ein 15 ml Röhrchen wurden 2 ml PBS / 2% FKS pipettiert und dieses anschließend gerollt um die Innenflächen komplett zu benetzen. Durch Dekantieren des Gefäßes wurde die Flüssigkeit entfernt. Danach wurde die Percoll-Zellsuspension in das FKS-benetzte Röhrchen überführt. Das Röhrchen wurde im 45° Winkel gehalten und nacheinander mit 2 ml Percoll C und 2 ml 1x PBS langsam überschichtet. Es folgte die 30 minütige Dichtegradienten-Zentrifugation bei 1450*g mit ausgeschalteter Bremse bei einer Temperatur von 4°C. Hierbei wurden die Zellen anhand ihrer unterschiedlichen Dichte aufgetrennt.

Danach waren zwei Schichten zu erkennen (siehe Abbildung 3). In der oberen Schicht wurden die angereicherte TEC-Fraktion mit vielen T-Zellen und anderen

Stromazellen, wie DCs, Makrophagen, Fibroblasten oder Endothelzellen, erwartet. In der unteren Schicht befanden sich hauptsächlich Lymphozyten und Erythrozyten. Die jeweilige Zellschicht wurde mit einer Pipette abgenommen und in ein 15 ml Röhrchen überführt.

Die Zellen wurden mit MACS-Running Buffer gewaschen. Um die Zellzahl zu bestimmen wurden 10 μl der Zellsuspension mit 10 μl Trypanblau in ein Reaktionsgefäß pipettiert und gut gemischt. Davon wurden 10 μl in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und die Zellzahlen unter dem Lichtmikroskop bestimmt. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 500*g für 10 min zentrifugiert. Es folgte die Zellseparation mittels autoMACS.

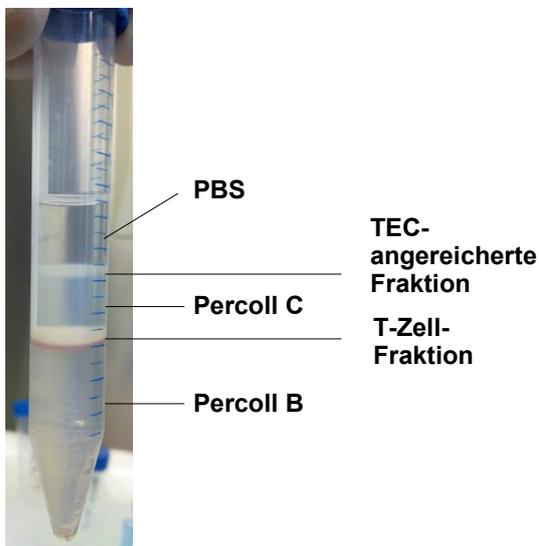


Abbildung 3: Schichtung der Zellfraktionen nach der Percoll-Dichtezentrifugation

2.3.3. Zelldepletion mittels autoMACS

Bei der autoMACS-Zellseparation wurde das Zellgemisch mit Antikörpern gegen Oberflächenstrukturen inkubiert und anschließend durch ein Magnetfeld sortiert. In den Versuchen galten die unmarkierten Zellen als die Zielzellen (Depletion der CD45-positiven T-Zellen in der TEC-Fraktion), welche für die weitere Sortierung verwendet wurden.

Die sedimentierten Zellen der TEC-Fraktion wurden in 95 μl M-RB pro $1 \cdot 10^7$ Zellen resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit 5 μl MNS pro $1 \cdot 10^7$ Zellen vermischt und für 5 min auf Eis inkubiert. Dann wurden 10 μl CD45-MicroBeads

(siehe Tabelle 4) pro $1 \cdot 10^7$ Zellen zugegeben, gut gemischt und 15 min im Kühlschrank inkubiert. Die Zellen wurden mit M-RB gewaschen, 8 min bei $300 \cdot g$ zentrifugiert und in $500 \mu\text{l}$ M-RB pro $1 \cdot 10^8$ Zellen resuspendiert. Am autoMACS-Gerät wurden die Zellen mit dem Programm „deletes“ aufgetrennt. Anschließend erfolgte die Zählung der Zellen unter dem Lichtmikroskop.

2.3.4. Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung

Durch das FACSAria™ II war eine Sortierung der Zellen auf Grund der Fluoreszenz-Markierung von Oberflächenmolekülen mit Hilfe von Antikörpern möglich.

In den Experimenten wurden die in Tabelle 4 genannten Antikörper verwendet. Als Proben für die FACS-Färbung wurden die ungefärbten Zellen, die Vierfach-Färbungen der TEC und der T-Zellen nach der Percoll-Dichte-Zentrifugation sowie die Vierfach-Färbungen von den CD45-positiven und CD45-negativen Zellen (TEC-Fraktion) nach der autoMACS-Depletion genutzt. Die Einfach-Färbungen der jeweiligen Antikörper waren zur Einstellung der Kompensation nötig.

Die Zellen wurden bei $300 \cdot g$ für 7 min zentrifugiert und in $90 \mu\text{l}$ FACS-Puffer pro $1 \cdot 10^6$ Zellen resuspendiert. Nach Zugabe von je $5 \mu\text{l}$ MNS wurde die Zellsuspension für 5 min auf Eis inkubiert. Dann wurden je $3 \mu\text{l}$ des jeweiligen Antikörpers hinzugefügt und weitere 15 min auf Eis inkubiert. Zum Waschen der Zellsuspension wurden $500 \mu\text{l}$ FACS-Puffer zugegeben und bei $3000 \text{ U} / \text{min}$ bei 4°C für 7 min zentrifugiert. Die Zellen wurden in $500 \mu\text{l}$ FACS-Puffer resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt.

Am FACSAria™ II wurden vor jeder Messung die Konfiguration und dynamische Zuordnung des Durchflusszytometers (Cytometer Setup & Tracking) und die Einstellung des Tropfenabrisses (Drop-Delay) vorgenommen. Die weiteren Parameter für die Zellsortierung sind der Tabelle 6 zu entnehmen.

Tabelle 6: Parameter für die Sortierung

Parameter	Einstellung
Device	2 Tube
Sort Setup	100 micron
Phase	0
Attenuation	Off
Precision	Purity
Yield Mask	32
Purity Mask	32
Phase Mask	0
Single Cell	Off
Sheath Pressure	20 Psi

Als Erstes wurden die ungefärbte Probe und die Einfach-Färbungen der Antikörper gemessen. Die FACSDiva™ Software 6.1.2 (BD Biosciences) berechnete daraus die Kompensation. Anschließend wurden die Vierfach-Färbungen aufgenommen und die gewünschten Zellpopulationen markiert. Das Festlegen der Regionen für die Zellen erfolgte in folgenden Schritten: Zunächst wurde in einem „Dot-Plot“ (Zwei-Parameter-Darstellung) Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht gegenübergestellt und die gewünschte Zellpopulation ausgewählt. In einem weiteren XY-Diagramm erfolgte die Darstellung der Fluoreszenzen für Ep-CAM und CD45. Es wurde eine Region um die Ep-CAM-positiven und CD45-negativen Zellen gelegt. In einem letzten „Dot-Plot“ wurde die Fluoreszenz für CD80 dem Vorwärtsstreulicht gegenübergestellt und es wurde die CD80-starkpositive (reife mTECs) und die CD80-niedrigpositive Zellfraktion (unreife mTECs) mit jeweils einer Region markiert. Die gemessene Anzahl und die Prozente der Ereignisse in den genannten Regionen wurden notiert.

Das FACS Aria™ II hat die Zellen aufgenommen und die CD45 negativen TECs in die dafür vorgesehenen Röhren in CD80 hochpositive mTECs und in CD80 niedrigpositive mTECs sortiert. Die Flussgeschwindigkeit und damit die Anzahl der Ereignisse pro Sekunde wurden so gewählt, dass eine Effizienz von etwa 90% erreicht wurde. Danach erfolgte die Reanalyse der sortierten Proben um

die tatsächlichen Reinheiten zu bestimmen. Die Zellen wurden anschließend bei 4°C mit 3000 U / min für 7 min zentrifugiert.

Aus den sortierten reifen und unreifen mTECs wurde entweder die RNA oder Gesamtprotein isoliert.

2.4. Expressionsanalyse

Zunächst wurde die RNA aus den zwei Typen der mTECs isoliert, die jeweiligen Konzentrationen bestimmt und eine Qualitätskontrolle durchgeführt. Danach wurde die gewonnene RNA durch die Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Zum Abschluss erfolgte die Analyse der Genexpression mit der TaqMan[®] Real-Time Polymerasen Kettenreaktion.

Tabelle 7: verwendete Materialien

Name	Firma
Ambion DEPC-Treated Water	Applied Biosystems
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor	Applied Biosystems
MicroAmp Fast 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems
MicroAmp Optical Adhesive Film	Applied Biosystems
RNA 6000 Pico Assays	Agilent Technologies
RNeasy Plus Kit	Qiagen, Hilden
TaqMan [®] Gene Expression Assays	Applied Biosystems
TaqMan [®] Rodent GAPDH Control Reagents	Applied Biosystems
2x TaqMan [®] Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems
20x TaqMan [®] Gene Expression Assays	Applied Biosystems siehe Tabelle 8

Tabelle 8: TaqMan® Gene Expression Assays

Gene Symbol	Assay ID
Aire	Mm00477461_m1
Psmb11 (beta5t)	Mm00613641_s1
Ins1	Mm01950294_s1
Ins2	Mm00731595_gH
Padi1	Mm00478062_m1
Padi2	Mm00447020_m1
Padi3	Mm00478075_m1
Padi4	Mm01341658_m1
Padi6	Mm00462201_m1

2.4.1. Isolation der RNA

Die Isolation der Gesamt-RNA erfolgte mit dem RNeasy Plus Kit aus den sortierten reifen und unreifen mTECs. Die verwendeten Puffer waren in dem Kit enthalten. Es wurde die Zentrifuge Mikro22R verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Zunächst wurde aus den lysierten Zellen die DNA über eine Säule entfernt. Mit Hilfe einer zweiten Säule wurde die RNA gereinigt. Abweichend vom Herstellerprotokoll wurde für die Elution der RNA zwei Mal mit je 60 µl RNase-freien Wasser für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der angegebenen Zentrifugation sollte die RNA gelöst sein und stand für die Konzentrationsbestimmung zur Verfügung.

2.4.2. Konzentrationsbestimmung und Qualitätskontrolle der RNA

Die Konzentration der gewonnenen RNA wurde mit Hilfe des Spektrophotometers NanoDrop-1000 gemessen. Die Qualitätskontrolle erfolgte mit dem 2100 Bioanalyzer.

Nachdem am NanoDrop die Parameter Nukleinsäure, RNA mit einer Wellenlänge von 260 und 280 nm und der Extinktionskoeffizient 40 ng-cm/µl eingestellt wurden, erfolgte die Eichung des Gerätes mit Hilfe von RNase-freiem Wasser. Dann wurden die Proben in je 1 µl gemessen.

Auf Grund der geringen RNA-Mengen wurde das Ergebnis vom NanoDrop mit Hilfe des RNA 6000 Pico Assays überprüft. Die Durchführung der Versuche erfolgte anhand des mitgelieferten Protokolls und den dazugehörigen Reagenzien. Mit der 2100 Expert Software (Version B.02.05.SI360) konnte anhand der RNA Integrity Number (RIN) und den RNA-Peaks der 18S und 28S Ribosomen kontrolliert werden, ob DNA enthalten oder ein Abbau der mRNA erfolgt war.

2.4.3. Reverse Transkription

Mit Hilfe einer Reversen Transkriptase wurde aus der RNA die komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert, welche für die anschließende PCR als Vorlage verwendet wurde.

Die Reverse Transkription (RT) wurde mit dem High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor entsprechend dem dazugehörigen Protokoll durchgeführt. Die aufgeführten Puffer und Primer waren in dem Kit enthalten.

Tabelle 9: Zusammensetzung einer RT-Reaktion

Komponenten	Volumen / Reaktion (µl)
RNase-freies Wasser	3,2
10x RT Buffer	2
10x RT Random Primers	2
25x dNTP Mix (100 mM)	0,8
RNase Inhibitor (20 U/µl)	1
MultiScribe™ Reverse Transkriptase (50 U/µl)	1
Probe	10
Gesamtmenge	20

Der Ansatz wurde anhand Tabelle 9 pipettiert. Für die RT wurde im Thermo-Cycler folgendes Programm eingestellt: im ersten Schritt 10 min bei 25°C, danach 120 min bei 37°C und am Ende 5 min bei 85°C. Die Proben wurden bei 4°C bis zur weiteren Verwendung im Thermo-Cycler gekühlt.

2.4.4. TaqMan[®] Real-Time Polymerase-Kettenreaktion

2.4.4.1. Prinzip

Die Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (Real-Time-PCR) erlaubt die indirekte Bestimmung der Expression eines Templates (cDNA). In unserem Fall verwendeten wir die TaqMan[®]-Chemie. Dabei wird eine Oligonukleotid-Sonde genutzt, die zwischen dem Forward und Reverse Primer an das Ziel-Template hybridisiert. Die Sonde ist am 5'-Ende mit einem Reporter (Fluoreszein-Derivat) markiert und trägt am 3'-Ende einen Quencher (Rhodamin-Derivat). Der Quencher unterdrückt das Aussenden des spezifischen Fluoreszenzsignals des Reporter-Farbstoffes durch deren räumliche Nähe. Durch die Exonukleaseaktivität der verwendeten Taq DNA Polymerase wird die Sonde während der Synthese des 2. Stranges geschnitten, so dass Quencher und Fluoreszenzfarbstoff räumlich getrennt werden. Erst dann wird ein Fluoreszenzsignal emittiert, das direkt mit der Menge neu synthetisierter DNA korreliert.

Für die relative Quantifizierung erfolgt eine Normierung durch die Amplifikation eines Referenzgens, für das in den folgenden Versuchen das GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase) verwendet wurde. Dies gilt unter der Annahme, dass die PCR für GAPDH und der zu messenden Gene mit gleicher Effizienz abläuft. Weiterhin wird die gleiche Expression von GAPDH in den zu vergleichenden Gruppen vorausgesetzt.

Die Messung des Schwellenwert-Zyklus (engl. Cycle Treshold = Ct-Wert) zur Quantifizierung erfolgt immer am Anfang der exponentiellen Phase, wenn das Reportersignal die Hintergrundfluoreszenz übersteigt. [Schild, Vers. 2.1]

2.4.4.2. Praktische Durchführung

Die TaqMan[®] Real-Time PCR wurde entsprechend dem Protokoll der TaqMan[®] Gene Expression Assays durchgeführt.

Als Proben diente die synthetisierte cDNA aus den zwei Typen der mTECs. Zum Ausschluss von Verunreinigungen durch genomische DNA wurde jedes Mal die dazugehörige Probe ohne die Reverse Transkription (no template control) als Negativkontrolle gemessen. Die genomische DNA würde ein falsch-

positives Signal liefern, falls die spezifischen Primer nicht über den Exongrenzen liegen, was hier für die Gene beta5t und Insulin 1 der Fall wäre. Die synthetisierte cDNA und die dazugehörige Negativkontrolle wurden für die weitere Verwendung jeweils 1:4 verdünnt.

Jede Probe wurde in Triplikaten gemessen. Ein Ansatz bezieht sich auf eine 20 µl Reaktion. Die folgende Zusammensetzung gilt für die Assays von Aire, beta5t, Insulin 1, Insulin 2, PAD1, PAD2, PAD3, PAD4 und PAD6.

Tabelle 10: PCR-Reaktionsgemisch

Komponenten	Reaktion für 20 µl
20x TaqMan® Gene Expression Assays	1 µl
2x TaqMan® Gene Expression Master Mix	10 µl
RNase-free water	5 µl
cDNA (1 bis 100 ng)	4 µl

Für den Maus-GAPDH Assay wurde für eine 20 µl Reaktion die folgende Zusammensetzung verwendet:

Tabelle 11: PCR-Reaktionsgemisch für GAPDH

Komponenten	Reaktion für 20 µl
GAPDH-VIC-TAMRA (20µM Sonde)	0,2
Rodent GAPDH Forward Primer (10 µM)	0,2
Rodent GAPDH Reverse Primer (10 µM)	0,2
2x TaqMan® Gene Expression Master Mix	10
RNase-free water	5,4
cDNA (1 bis 100 ng)	4

Für jeden Assay wurden 3 x 20 µl je Probe in eine 96 well-TaqMan Fast Platte pipettiert und anschließend mit Optical Adhesive Film verschlossen.

Am 7900HT Fast Real Time PCR-Gerät wurde mit Hilfe der Software SDS 2.3 (Applied Biosystems) die $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode ausgewählt. Es wurden 20 µl Probenvolumen und Standard als Ramp Rate eingestellt. Die 45 Zyklen liefen

mit folgendem Temperaturprogramm ab: 2 min bei 50°C, 10 min und 15 s bei 95 °C und 1 min bei 60°C.

Nach Abschluss der Real-Time-PCR wurden die Daten als SDS-Dokumente gespeichert.

2.4.4.3. Auswertung

Die Auswertung der SDS-Dateien erfolgte mit dem RQ-Manager 1.2 (Applied Biosystems). Das Programm legte die Grenzwerte automatisch fest und berechnete anschließend die Ct-Werte. Zur weiteren Auswertung mit Excel wurden die Proben auf die Ct-Werte von GAPDH (Δ Ct) normiert. Anschließend wurden die Mittelwerte der technischen Triplikate gebildet und die jeweiligen GAPDH-Werte subtrahiert. Im Falle einer Wiederholung von Probenanalysen wurden die Mittelwerte aus beiden Läufen gebildet. Bei wenigen Proben konnte kein Ct-Wert (außerhalb des gemessenen Bereichs) bestimmt werden. Wenn dies nur bei einem von drei Werten auftrat, dann wurde aus den gemessenen Duplikaten der Mittelwert gebildet. War es bei zwei bzw. allen drei Werten der Fall, so wurde als Wert die höchstmögliche Zykluszahl (= 45, d.h. keine Expression) gesetzt.

2.5. Proteinanalyse

Die Analyse der Proteine begann mit dem Lysieren der Zellfraktionen. Danach wurde die erhaltene Proteinkonzentration bestimmt. Zur genaueren Bestimmung der Proteinexpression der lysierten Zellen sollten sehr sensitive Methoden angewendet werden. Hierfür sollte ein ELISA für die Proteine PAD2 und PAD3 etabliert werden.

Tabelle 12: verwendete Lösungen und Materialien

Name	Firma	Zusammensetzung
A) Lösungen		
Absättigungslösung (PBS / 2% BSA) Carbonat/Bicarbonat Puffer		2 g BSA + 100 ml PBS pH 9,6 1,59 g Na ₂ CO ₃ 2,93 g NaHCO ₃ + 1000 ml dH ₂ O
PBS		pH 7,4
Probenpuffer (PBS / 1% BSA)		1 g BSA + 100 ml PBS
Stopplösung		0,5M H ₂ SO ₄
TMB Substrate Reagent Set	BioLegend	
Waschpuffer		500 µl Tween-20 + 1000 ml PBS
B) Materialien		
GeBAflex-tube Dialyse kit Midi	Scienova GmbH	
Protease Inhibitor Cocktail Set I	Calbiochem	
Nano Orange Protein Quantitation Kit	invitrogen	
Nunc Immuno Platten – MediSorb®	Thermo Fisher Scientific	
Protein Expression Sample Preparation Kit	Applied Biosystems	
PAD2 Standardprotein	SignalChem (P312-30BG-50)	
PAD3 Standardprotein	SignalChem (P312-30CG-50)	
Pierce Amine-binding, Maleic Anhydride Activated Plates (clear, 8-well strips)	Thermo Fisher Scientific	

Tabelle 13: Antikörper für ELISA

Beschreibung	Verdünnung	Bezugsquelle	Klon	Bestell-Nr.
anti-PADI2 IgG	1:1000	abcam	Kaninchen –polyklonal	ab56075
human anti mouse PADI2	1:2000	Serotec	2121	HCA011
mouse anti histidin tag:HRP	1:2000	Serotec	AD1.1.10	MCA1396P
anti-PADI3 (Y-14) IgG	1:2000	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	Ziege – polyklonal	sc-55694
anti-PADI3 IgG	1:1000	abcam	Kaninchen –polyklonal	ab50246
anti-rabbit IgG	1:5000	Jackson ImmunoResear ch	Ziege – polyklonal	111-035- 144
anti-goat IgG:HRP	1:4000	Serotec	Affe – polyklonal	OBT1500P

2.5.1. Lysierung der Zellen

Die sortierten Zellen wurden anhand des Protokolls von TaqMan[®] Protein Assays Sample Prep (Applied Biosystems) lysiert. Dazu wurde das Protein Expression Sample Preparation Kit genutzt.

Der Ansatz für die Cell Lysis Solution mit 500 µl Cell Lysis Reagent (2x) und 5 µl Protease Inhibitor (100x) war ausreichend für 500.000 Zellen.

Zunächst wurden die Zellen bei 4000 U / min für 7 min zentrifugiert, dann mit 1x PBS gewaschen, erneut zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Pellet wurde in Cell Resuspension Buffer resuspendiert, um eine Konzentration von 1000 Zellen / µl zu erhalten. Anschließend wurde das gleiche Volumen von Cell Lysis Solution dazugegeben, um eine Konzentration von 500 Zellen / µl zu erreichen. Das Zell-Lysat wurde aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

2.5.2. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinbestimmung erfolgte mit dem Nano Orange Protein Quantitation Kit. Die verwendeten Reagenzien waren in dem Kit enthalten.

Die Arbeitslösung wurde durch eine 1:10 Verdünnung des Nano Orange protein quantitation diluent in destilliertem Wasser vorbereitet. Darin wurde das Nano Orange protein quantitation reagent 1:500 verdünnt. Die BSA-Standardkurve wurde nach dem Protokoll angelegt. Für 500 μl je Messvolumen pro Probe wurden 480 μl Arbeitslösung und 20 μl des Zell-Lysats gemischt. Das Lysat sollte nicht mehr als 4% des Gesamtvolumens entsprechen. Die Lösung wurde bei 95°C für 10 min im Thermo-Cycler erhitzt und dann bei Raumtemperatur für 20 min abgekühlt. Während der Vorbereitung und der nachfolgenden Messung wurden die Lösungen vor Licht geschützt aufbewahrt. Je 2 x 200 μl der jeweiligen Probe wurden in eine schwarze Mikrotiterplatte pureGrade™ 96-well PS von der Firma Brand pipettiert. Am Spektrometer (Tecan) erfolgte die 1. Messung und nach 3 min wurde ein 2. Mal gemessen. Das ergab insgesamt 4 technische Replikate. Mit dem Computerprogramm Excel konnte die Linearstandardkurve generiert werden. Der Nullwert wurde von allen Messwerten abgezogen und dann wurde die Proteinkonzentration mit Hilfe der Standardkurve berechnet.

2.5.3. Dialyse der Proben

Die Dialyse der Proben erfolgte mit dem GeBAflex-tube Dialyse Kit Midi. Zuerst wurde die Membran mit 500 μl dH₂O für 5 min benetzt und auf eventuelle Durchlässigkeit geprüft. Nach dem Entfernen des Wassers wurden 500 μl der jeweiligen Probe in das dafür vorgesehene Gefäß überführt. Die GeBAflex-Gefäße wurden in dem mitgelieferten schwimmenden Rack platziert und anschließend in ein Becherglas mit 400 ml Carbonat/Bicarbonatpuffer gegeben. Mit Hilfe eines Rührers wurde die Flüssigkeit bei langsamer Geschwindigkeit in Bewegung gehalten. Nach 3 h bei 4°C wurde der Puffer gewechselt und über Nacht erneut dialysiert. Danach wurden die Proben in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

2.5.4. Bestimmung der Proteinkonzentration vor und nach Beschichtung

Zuerst wurde von den dialysierten Proben mit Hilfe des Nano Orange Protein Quantitation Kit die Proteinkonzentration bestimmt (siehe 2.5.2.). Danach erfolgte die Beschichtung einer Nunc Medisorb[®] ELISA-Platte mit jeweils 50 µl der Proben in Duplikaten über Nacht bei 4°C. Danach wurde der Überstand abgenommen und wiederum die Proteinkonzentration bestimmt. Die im Überstand verbliebene Proteinmenge wurde vom zugehörigen Ausgangswert abgezogen, um die Menge an tatsächlich gebundenen Protein zu bestimmen.

2.5.5. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

2.5.5.1. Test der Antikörperreaktion mit BSA

Zunächst wurde in einem Vorversuch die Kreuzreaktion der verwendeten Antikörper gegen BSA bestimmt. Es konnte dadurch die Verdünnung mit sehr geringem Hintergrund bestimmt werden (siehe Tabelle 13).

Dazu wurde eine Nunc Medisorb[®] ELISA-Platte mit jeweils 200 µl 2% BSA in PBS für 1,5 h bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Bindungsmöglichkeiten zu blockieren. Während der Inkubationszeiten, welche bei Raumtemperatur erfolgten, wurde die Platte mit einer adhäsiven Folie verschlossen. Es folgte ein dreimaliges Waschen mit 200 µl Waschpuffer. Anschließend wurde der HRP-gekoppelte Detektionsantikörper in einer seriellen 1:2 Verdünnung mit jeweils 100 µl aufgetragen und für 1,5 h inkubiert. Danach wurden die ungebundenen Antikörper durch dreimaliges Waschen entfernt und die Farbreaktion mit 100 µl TMB durchgeführt. Nach 30 min wurde diese durch 100 µl Stopplösung beendet. Zum Abschluss wurde die optische Dichte (OD) mit dem ELISA-Plattenleser gemessen. Hierzu erfolgte eine Endpunktmessung bei der spezifischen Wellenlänge von 450 nm abzüglich der Referenzwellenlänge von 650 nm.

Im nächsten Schritt wurde der PAD-spezifische Antikörper auf seine Reaktion mit BSA getestet. Dazu wurde wie oben beschrieben verfahren. Diesmal wurde der PAD-spezifische Antikörper in einer seriellen 1:2 Verdünnungsreihe im Probenpuffer angesetzt und jeweils 100 µl für 1,5 h inkubiert. Der HRP-gekoppelte Detektionsantikörper wurde nach dreimaligem Waschen mit jeweils

100 µl und einer 1:5000 Verdünnung aufgetragen. Nach einer Inkubationszeit von 1,5 Stunden wurde erneut dreimal gewaschen. Es erfolgte die Farbreaktion mit 100 µl TMB und das Abstoppen dieser nach 30 min. Die OD wurde wie oben beschrieben gemessen.

2.5.5.2. Sandwich-ELISA

Nachdem die optimalen Verdünnungen für die Antikörper bestimmt wurden, erfolgte ihre Kombination zu einem Sandwich-ELISA.

Zunächst wurden die Antikörper human anti mouse PADI2 bzw. anti-PADI3 (Y-14) IgG mit einer Konzentration von 5 µg / ml im Carbonat / Bicarbonatpuffer verdünnt und mit jeweils 50 µl als Duplikat auf einer ELISA-Platte (Nunc Medisorb[®]) aufgetragen. Die Beschichtung erfolgte über Nacht bei 4°C. Die weiteren Inkubationen erfolgten bei Raumtemperatur bei Verschluss der Platte mit einer adhäsiven Folie. Danach wurde dreimal mit 200 µl pro Vertiefung Waschpuffer gewaschen und die Platte mit 200 µl je Kavität Absättigungslösung für 1 h inkubiert. Es erfolgte ein erneutes dreimaliges Waschen. Im weiteren Ablauf wurde das entsprechende Standardprotein PAD3 bzw. PAD2 mit Probenpuffer in Verdünnungen von 1:100 bis 1:20.000.000 als Duplikate mit jeweils 100 µl auf die Platte gegeben. Es wurden die Konzentrationsstufen von 1µg / ml, 1ng / ml bis zu 5pg / ml untersucht. Zur Negativkontrolle wurden jeweils 100 µl des Probenpuffers als Duplikat aufgetragen. Es erfolgte eine Inkubationszeit von 1,5 h mit anschließendem dreimaligem Waschen. Dann wurde der PAD-spezifische Antikörper anti-PADI2 IgG bzw. anti-PADI3 IgG in 100 µl pro Vertiefung (Verdünnung siehe Tabelle 13) für 1,5 h auf der Platte inkubiert. Nach dem dreimaligen Waschvorgang wurde mit dem HRP-gekoppelten Detektionsantikörper anti-rabbit IgG gleichermaßen verfahren. Die anschließende Farbreaktion, das Abstoppen und die OD-Messung wurden wie in 2.5.5.1. beschrieben durchgeführt.

In einem weiteren ELISA wurden die Detektionsantikörper an die Platte gebunden und mit dem entsprechenden Antikörper detektiert. Die Standardproteine und ihre Verdünnung blieben gleich. Der human anti mouse PADI2 bzw. der anti-PADI3 (Y-14) IgG dienten als PAD-spezifische Antikörper.

Als HRP-gekoppelte Detektionsantikörper wurden der mouse anti histidin tag:HRP bzw. der anti-goat IgG:HRP verwendet.

2.5.5.3. Direkter ELISA

Der direkte ELISA wurde durchgeführt, um die Reaktion der Standardproteine mit den jeweiligen Antikörpern zu testen.

Hierbei wurde das jeweilige Standardprotein PAD2 bzw. PAD3 mit in 50 µl Carbonat / Bicarbonatpuffer in einer Verdünnungsreihe von 1:10 bis 1:2.000.000 über Nacht bei 4°C an eine ELISA-Platte von Nunc Medisorb[®] gebunden. Die folgenden Inkubationszeiten wurden bei Raumtemperatur durchgeführt und die verwendete Platte währenddessen mit einer adhäsiven Folie verschlossen. Im nächsten Schritt wurde dreimal mit 200 µl pro Kavität Waschpuffer gewaschen und die Platte mit 200 µl je Vertiefung Absättigungslösung für 1 h inkubiert. Es folgte ein erneutes dreimaliges Waschen. Dann wurde der jeweilige PAD-spezifische Antikörper anti-PADI2 IgG bzw. anti-PADI3 IgG in 100 µl pro Vertiefung (Verdünnung siehe Tabelle 13) für 1,5 h auf der Platte inkubiert. Nach dem dreimaligen Waschvorgang wurde mit dem HRP-gekoppelten Detektionsantikörper anti-rabbit IgG gleichermaßen verfahren. Die Farbreaktion erfolgte mit jeweils 100 µl TMB. Die 100 µl Stopplösung wurde bei dem PAD3 Standardprotein nach 15 min und bei dem PAD2 Standardprotein nach 30 min aufgetragen. Die OD-Messung wurde wie in 2.5.5.1 durchgeführt.

Danach wurden die Antikörper getauscht. Hierzu wurden wieder die Standardproteine PAD2 bzw. PAD3 mit dergleichen Verdünnungsreihe an die Platte gebunden. Es folgten die PAD-spezifischen Antikörper human anti mouse PADI2 bzw. anti-PADI3 (Y-14) IgG mit der 1:2000 Verdünnung. Anschließend wurde auf PAD2 der Detektionsantikörper anti histidin tag:HRP und auf PAD3 der anti-goat IgG:HRP aufgetragen.

Um die Ergebnisse weiter zu optimieren, wurde für das gleiche Protokoll eine „Pierce Amine-binding, Maleic Anhydride“ aktivierte Platte verwendet. An dieser sollte eine effizientere Proteinbindung realisiert werden.

In einem nächsten Schritt wurden die lysierten Zellproben der reifen und unreifen mTECs getestet und PAD3 als Standardprotein verwendet. Diese

wurden über Nacht bei 4°C an eine Nunc Medisorb[®]-Platte gebunden. Danach erfolgte die Erkennung mit anti-PADI3 (Y-14) IgG und die Detektion mit anti-goat IgG:HRP. An dem Ablauf des Protokolls für den direkten ELISA wurde nichts verändert.

In weiteren Versuchen wurde das Protokoll modifiziert um möglichst eine Verbesserung der Ergebnisse zu erzielen. Dazu wurde PAD3 Standardprotein in den Verdünnungsstufen 1:2000 und 1:10.000 jeweils zu ausgewählten Proben zugegeben, an die Platte gebunden und das weitere Prozedere durchgeführt.

Durch die Zugabe von PAD3-Standardprotein erhofften wir einen Anstieg der OD-Werte im Vergleich zu vorher. Danach wurde ein weiterer ELISA sowohl mit den dialysierten Proben allein, als auch mit Zugabe von PAD3 Protein durchgeführt.

Während in den zuvor beschriebenen Ansätzen die Nunc Medisorb[®]-ELISA Platte verwendet wurde, erfolgte nun ein erneuter Durchlauf mit der voraktivierten Platte. Wiederum wurden die reinen dialysierten Proben und diese mit Zugabe von PAD3 Standardprotein getestet.

2.6. Statistische Auswertung

Die Tabellen und Diagramme wurden mit Excel und GraphPad Prism 5 erstellt. Zum Vergleich der Zellzahlen wurde der Kruskal-Wallis Test und zur Bestimmung der paarweisen p-Werte der unpaarige t-Test, bei signifikanter Varianz mit Welch-Korrektur, verwendet.

Die statistischen Berechnungen für die Expressionsanalyse wurden mit der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Bei signifikanten Gruppenunterschieden wurde der Tukey's Multiple Comparison Test als Post-Test durchgeführt, um die Gruppen paarweise miteinander zu vergleichen. Zur genaueren Ermittlung des p-Wertes wurde der unpaarige t-Test, bei signifikanter Varianz mit der Welch-Korrektur, angeschlossen. Für eine Korrelationsbestimmung wurde der Spearmen-Korrelationstest verwendet.

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung der Zellfraktionen

3.1.1. Steigerung der Zellausbeute durch Optimierung der Thymusaufreinigung

Zunächst wurden der Einfluss der Enzymkonzentration und der Zeit auf die Ausbeute der vitalen TECs untersucht. Hierfür erfolgten die Präparation der Thymi und der Enzymverdau mit verschiedenen Ansätzen, indem die Konzentration der Enzyme und die Inkubationszeit variiert wurden. Danach wurde die Percoll-Dichtegradienten-Zentrifugation durchgeführt, die zur Auftrennung des Gesamthymus in T-Zellen und TEC-Fraktion diente. Anschließend erfolgten die Zählung der vitalen Zellen, deren Färbung mit den Antikörpern und die Messung der Fluoreszenzen am Durchflusszytometer. Aus den erhaltenen Prozenten ließen sich dann die absoluten Zellzahlen berechnen. Der genaue Ablauf des Experimentes ist der Tabelle 14 zu entnehmen.

Dabei konnte festgestellt werden, dass eine Verdopplung der Konzentration im Versuch 2 die absolute Zellzahl der TEC-Fraktion um 46% im Vergleich zum ersten Versuch (siehe Tabelle 14) erhöhte. Bei der Gegenüberstellung des zweiten mit dem dritten Versuch erhöhten sich die vitalen Zellen in der TEC-Fraktion um 71% und die absolute TEC-Zellzahl um etwa 5%. Verglichen mit dem dritten Versuch führte der letzte Versuch zu einer Verdopplung der vitalen Zellen in der TEC angereicherten Fraktion und zu einer Steigerung der absoluten TEC-Zellzahl um weitere 6%.

Am Ende des Experimentes konnten mit Versuch 4 die Ausbeute an vitalen Zellen in der TEC-Fraktion im Vergleich zum Ausgangsversuch um über 50% gesteigert werden. Bei den absoluten TEC-Zahlen zeigte sich eine Steigerung der Ausbeute von über 60% verglichen mit dem Ausgangswert.

Die Werte der einzelnen Versuche sind in Tabelle 14 dargestellt.

Tabelle 14: Eine höhere Ausbeute wurde durch die Erhöhung von Enzymkonzentration und Zeit erreicht.

Ver- such	Zeit	Enzym- konzen- tration	Vitale Zellen in TEC angereicherter Fraktion	% TECs in der TEC- Fraktion	TEC (absolut)
1	1 h	25%	$4,5 \cdot 10^6$	6,3	$2,8 \cdot 10^5$
2	1 h	50%	$2 \cdot 10^6$	20,5	$4,1 \cdot 10^5$
3	2 h	50%	$3,42 \cdot 10^6$	11,5	$4,3 \cdot 10^5$
4	2 h	100%	$6,9 \cdot 10^6$	7,1	$4,55 \cdot 10^5$

Die variierten Enzymkonzentrationen und Inkubationszeiten wurden den Mittelwerten der Zellzahlen nach der Percoll-Dichtegradienten-Zentrifugation gegenübergestellt. Die Werte wurden auf einen Thymus bezogen.

Auf Grund der festgestellten Steigerung der Zellausbeute im vierten Versuch entschieden wir uns für die Enzymkonzentration von 100% bei einer Inkubationszeit von 2 h für die folgenden Experimente.

3.1.2. Die Anzahl der T-Zellen ist in den drei Mausstämmen vergleichbar

Nach der Präparation und dem Enzymverdau der Thymi erfolgte die Auftrennung der gewonnenen Zellsuspension mit der Percoll-Dichtegradienten-Zentrifugation. Dadurch wurden die T-Zellen und die TEC-Fraktion in je angereicherter Form gewonnen. Anschließend konnte die jeweilige Zellzahl der drei Mausstämme NMRI, BL6 und DBA/1 unter dem Mikroskop bestimmt werden. Damit ließen sich Aussagen über die Ausbeute der zwei angereicherten Zelltypen treffen. Die einzelnen Zellzahlen wurden jeweils auf einen Thymus bezogen.

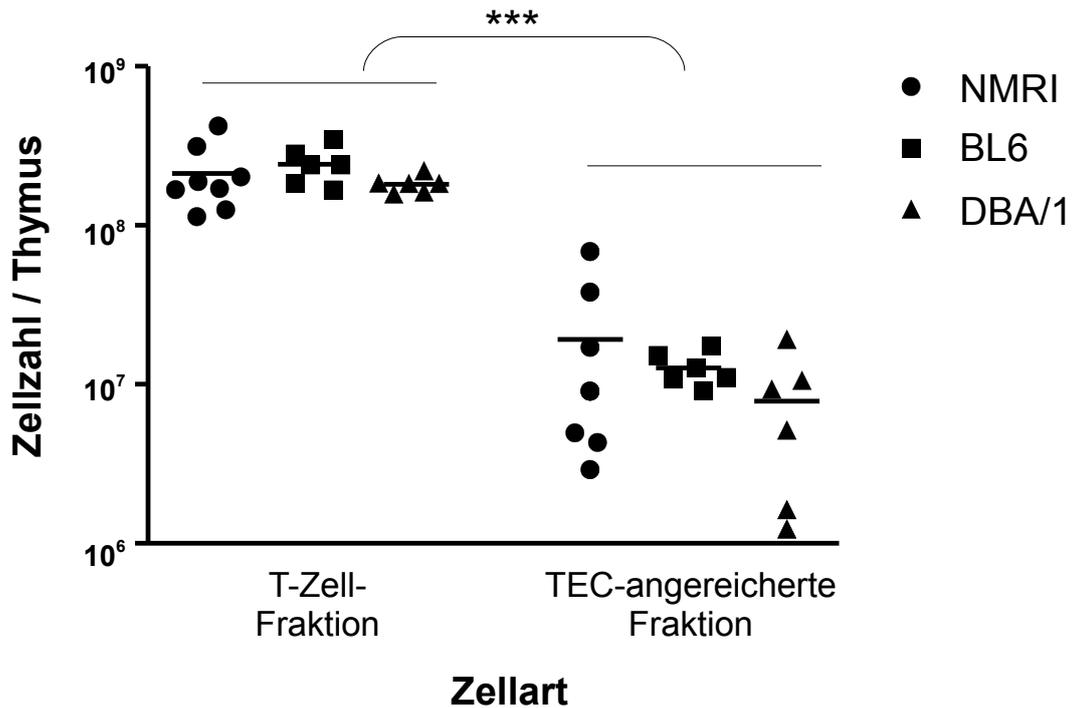


Abbildung 4: Vergleichbare Zellzahlen der T-Zellen sprechen für ähnliche Größe der Thymi. Die Zellzahlen von T-Zell- sowie TEC-Fraktion nach Percoll-Aufreinigung und der jeweilige Mittelwert sind für die Mausstämmen NMRI (n = 8), BL6 und DBA/1 (je n = 6) logarithmisch dargestellt. Die Zellzahlen wurden auf einen Thymus bezogen. *** p < 0,0001.

Bei dem Vergleich der erhaltenen Daten ist zu erkennen, dass die Zellzahlen der T-Zell-Fraktion etwa eine 10er Potenz höher liegen als die der angereicherten TEC-Fraktion mit einer Signifikanz von $p < 0,0001$. Das spiegelt sich auch in den einzelnen Mausstämmen wider: $p = 0,0013$ bei den NMRI, $p = 0,0003$ bei den BL6 und bei den DBA/1 $p < 0,0001$. Innerhalb einer Fraktion konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Mausstämmen nachgewiesen werden.

Hier ergab sich im Mittel der T-Zell-Fraktion bei den BL6 eine Zellzahl von $2,4 \cdot 10^8 \pm 6,5 \cdot 10^7$, bei den NMRI $2,1 \cdot 10^8 \pm 1 \cdot 10^8$ und bei den DBA/1 $1,8 \cdot 10^8 \pm 2,2 \cdot 10^7$. Somit liegen die Mittelwerte der T-Zellzahl bei den drei Mausstämmen dicht beieinander.

Dagegen zeigten die Mittelwerte der Zellzahl in der TEC-Fraktion eine abnehmende Tendenz von NMRI mit $1,9 \cdot 10^7 \pm 2,3 \cdot 10^7$ über BL6 mit $1,3 \cdot 10^7 \pm 3,1 \cdot 10^6$ zu DBA/1 mit $7,9 \cdot 10^6 \pm 6,8 \cdot 10^6$, wenn auch nicht signifikant. Die hier

beschriebene Abstufung der drei Mausstämmen in der angereicherten TEC-Fraktion bestätigte sich im weiteren Verlauf der Experimente.

Die gewonnenen Ergebnisse über die Vergleichbarkeit der Zellzahlen der T-Zellen zwischen den drei Mausstämmen sprechen für eine annähernd gleiche Größe der Thymi.

3.1.3. Reife und unreife mTECs konnten mit hoher Reinheit isoliert werden

Im Anschluss an die Percoll-Dichtegradienten-Zentrifugation und die magnetische Zellsortierung wurde mit Hilfe der Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung die gefärbte TEC-Fraktion anhand ihrer Oberflächenmoleküle analysiert und in reife und unreife mTECs sortiert. Nach jedem durchgeführten Experiment wurden die gewonnenen Zellfraktionen reanalysiert und auf ihre Reinheit überprüft. Abbildung 5 zeigt beispielhaft die gesetzten Regionen für die Isolierung der mTECs.

Durchflusszytometrisch zeigten die reifen mTECs folgende Kombination an Oberflächenmarkern mit CD45⁻, Ep-CAM⁺, Ly51⁻ und CD80^{high}. Die unreifen mTECs ließen sich als CD45⁻, Ep-CAM⁺, Ly51⁻ und CD80^{low} identifizieren. Außerdem konnten die cTECs mit der Markerkombination CD45⁻, Ep-CAM⁺, Ly51⁺ und CD80⁻ bestimmt werden. Sie stellten allerdings mit einem Mittelwert von 1,33% ± 0,81 % der sortierten TECs (entspricht einer Zellzahl von 2*10⁵ pro Thymus) eine so geringe Fraktion dar, dass die Sensitivität der Methoden für eine Analyse der mRNA und Proteine auf Grund des wenigen Zellmaterials nicht ausgereicht hätte.

Zusätzlich wurden zur Überprüfung des Erfolges Zwischenstufen der Anreicherungsprozedur gefärbt und gemessen: die T-Zell- und die angereicherte TEC-Fraktion nach der Percoll-Dichtegradienten-Zentrifugation sowie die CD45-negative und die CD45-positive Fraktion nach der autoMACS-Zellseparation. Diese vier Proben wurden anhand ihres TEC-Anteils verglichen, indem am Durchflusszytometer die CD45-negative und Ep-CAM-positive Zellpopulation (P2) betrachtet wurde.

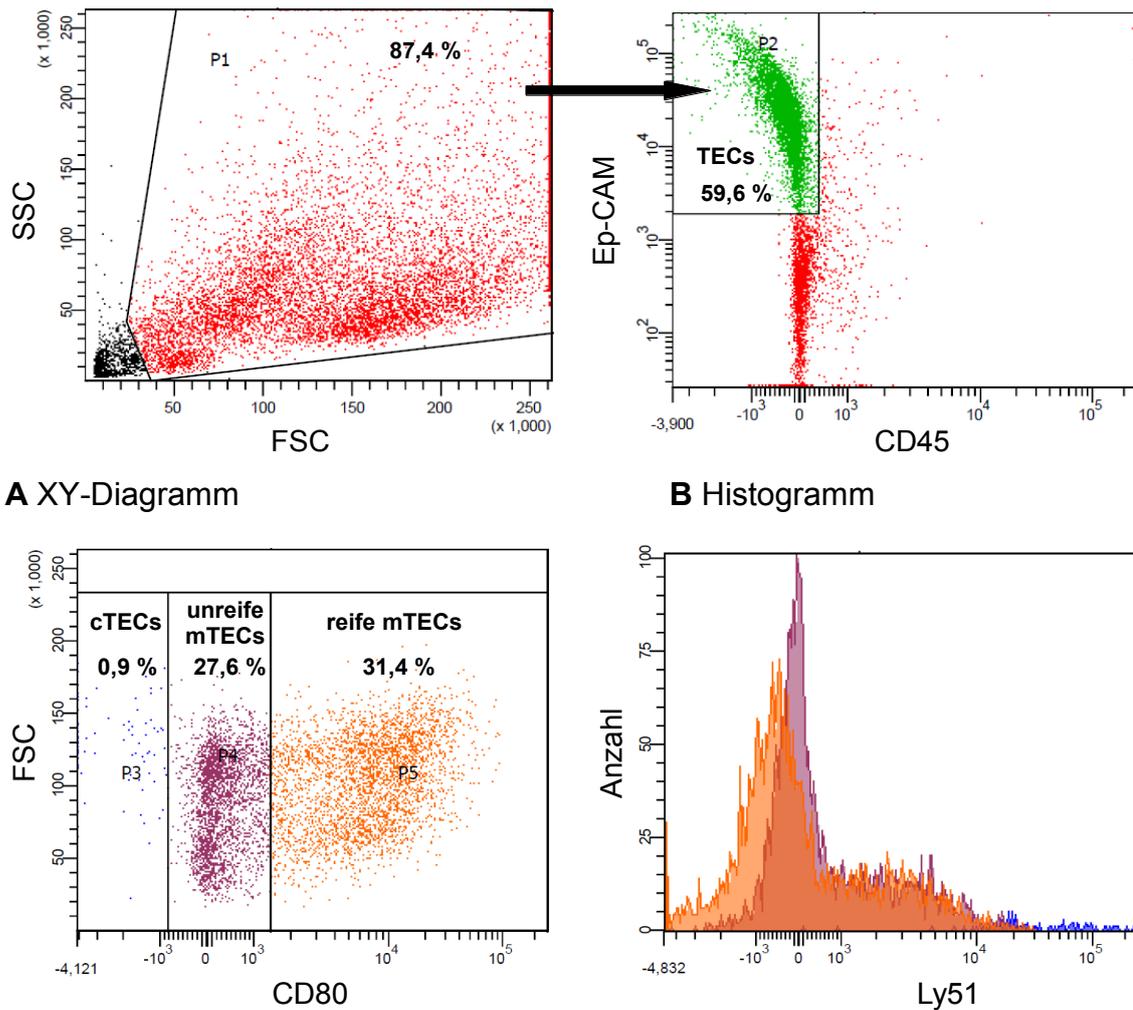


Abbildung 5: Gesetzte Regionen bei der Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung für die Isolierung der reifen und unreifen mTECs. Die Zellpopulationen sind mit ihrem jeweiligen Anteil in Prozent angegeben. (P1) Region für die lebenden Zellen und (P2) CD45- Ep-CAM+ TEC-Fraktion. **(A)** Das XY-Diagramm zeigt (P3) CD80 negative cTECs, (P4) CD80 niedrige unreife mTECs und (P5) CD80 hohe reife mTECs. **(B)** Im Histogramm sind die Populationen anhand ihrer LY51-Expression dargestellt. FSC = Vorwärtsstreulicht (forward scatter); SSC = Seitwärtsstreulicht (sideward scatter).

Die Analyse der gemessenen Werte ergab folgende prozentuale Anteile: nach der Percoll-Dichtegradienten-Zentrifugation zeigte die angereicherte TEC-Fraktion im Mittel $6,77\% \pm 3,04\%$ TECs, dies entspricht einer absoluten Zellzahl von $1,01 \cdot 10^6$ pro Thymus. Bei den T-Zellen wurde eine absolute Zellzahl von verbleibenden TECs von $6,59 \cdot 10^5$ pro Thymus berechnet ($0,3\% \pm 0,23\%$). Durch die Depletion der TEC-Fraktion von den CD45-positiven Zellen konnte der Anteil der TECs auf $56,03\% \pm 11,6\%$ gesteigert werden. Damit wurde die Wahrscheinlichkeit für Verunreinigung in den sortierten Proben verringert. Eine letzte Kontrolle bildete die CD45-positive Fraktion nach autoMACS, welche im

Mittel noch einen prozentualen TEC-Anteil von $1,47\% \pm 0,67\%$ aufwies. Auch dieser Wert stellte einen Verlust der TECs dar.

Durch die schrittweise Erhöhung des Anteils an TECs konnten die hohen Reinheiten bei der Zellaufreinigung gewährleistet werden.

3.1.4. Reanalyse bestätigte hohe Reinheit der sortierten mTECs

Nach der Zellsortierung wurden die gewonnenen Proben von reifen und unreifen mTECs erneut mit dem Durchflusszytometer gemessen, um sie auf ihre Reinheit zu überprüfen. Hierbei wurden die abgestorbenen Zellen während der Sortierung mit in FSC / SSC einbezogen. Ein Beispiel für die Reanalyse mit den gemessenen Prozenten ist in der Abbildung 6 dargestellt.

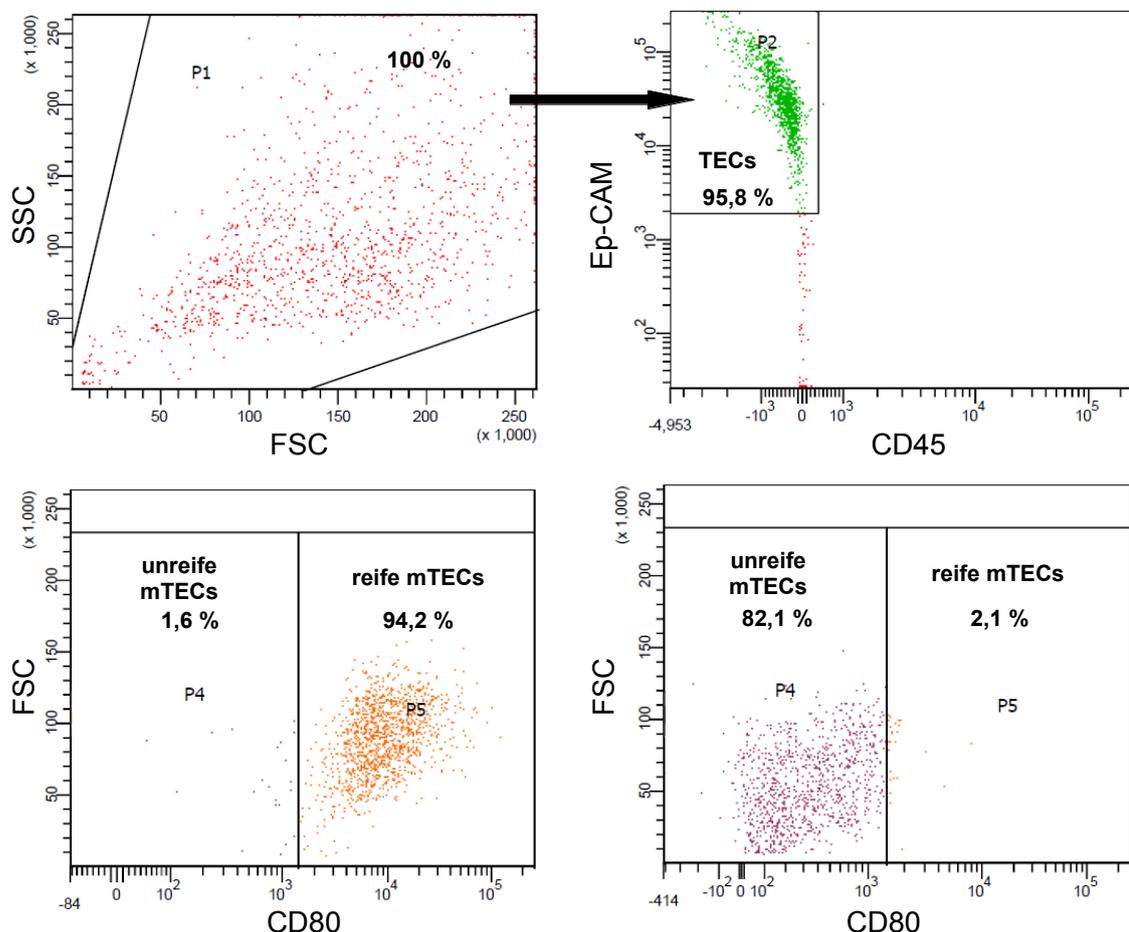


Abbildung 6: Die reifen und unreifen mTECs konnten mit hoher Reinheit isoliert werden. Dargestellt ist ein Beispiel für die Reanalyse von reifen und unreifen mTECs. (P1) alle sortierten Zellen, (P2) TECs, (P4) unreife mTECs, (P5) reife mTECs. Die Prozente beziehen sich auf alle gemessenen Ereignisse.

In der Reanalyse wurde deutlich, dass sich keine CD45+ und Ep-CAM- Zellen in den sortierten Proben befanden. Es wurde auch eine PAD-Expression in T-Zellen und anderen CD45+ Zellen (Leukozyten) beschrieben, so dass falsch positive Ergebnisse ausgeschlossen werden konnten [Chang et al., 2005; Asaga et al., 2001].

In den sortierten reifen mTEC-Proben (n = 18) wurden im Mittel $81,3\% \pm 6,55\%$ reife mTECs gemessen. Darin enthalten waren durchschnittlich $6,2\% \pm 5,28\%$ unreife mTECs. Die Probe mit den unreifen mTECs wies davon im Mittel $75,2\% \pm 6,82\%$ auf mit einem Anteil von durchschnittlich $1,1\% \pm 3,18\%$ an reifen mTECs.

Die reifen und unreifen mTECs konnten also mit hoher Reinheit isoliert werden und standen somit für die weitere Verwendung zur Verfügung.

3.1.5. DBA/1 weisen signifikant geringere mTEC-Zahlen auf

Die gewonnenen Daten der Durchflusszytometrie wurden zum Vergleich der Zellzahlen verwendet. Hierbei erfolgte eine Gegenüberstellung der Mausstämme NMRI, BL6 und DBA/1 mit den Zellzahlen der reifen und unreifen mTECs sowie der cTECs (siehe Abbildung 7). Die jeweilige TEC-Subpopulation ergab sich aus der Addition der angereicherten TEC-Fraktion mit den T-Zellen nach Percoll. Als Grundlage für die Berechnung diente die jeweils gezählte Zellzahl der beiden Proben.

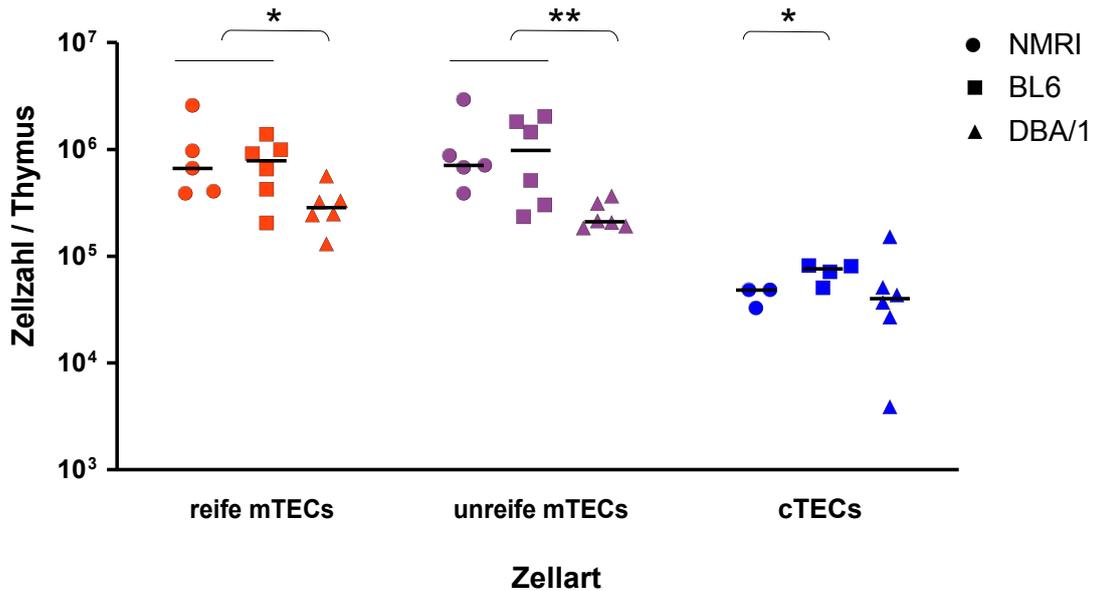


Abbildung 7: Der DBA/1 Mausstamm zeigt eine signifikant geringere Anzahl an mTECs. Nach der fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung wurden die Zellzahlen der TEC-Subpopulationen anhand der 3 Mausstämmen verglichen. Dargestellt sind die Einzelwerte mit Median aus je 6 unabhängigen Experimenten. Die Zellzahlen wurden auf einen Thymus bezogen. Zur Bestimmung des p-Wertes wurde der unpaarige t-Test mit Welch-Korrektur verwendet. * $p < 0,04$; ** $p = 0,0095$.

In der Abbildung 7 ist zu erkennen, dass die Zellzahlen der mTECs in allen durchgeführten Experimenten im Mittel etwa 13fach über denen der cTECs liegen. Damit wird gezeigt, dass die mTECs eine deutlich größere Zellzahl als die cTECs aufweisen.

Weiterhin wird deutlich, dass die Zellzahl der mTECs für den Stamm NMRI im Mittel die größte Zahl der mTECs ergab. Im Vergleich dazu zeigten die Thymi der DBA/1-Mäuse eine 4fach geringere und somit auch die niedrigste Zellzahl der mTECs mit signifikanten Unterschieden zu den anderen Stämmen. Die BL6-Mäuse lagen im Durchschnitt zwischen den beiden anderen Stämmen, jedoch nur etwa 14% unter den NMRI.

Bei der statistischen Auswertung der mTEC-Zellzahlen konnte keine Signifikanz der NMRI gegenüber den BL6 nachgewiesen werden. Innerhalb der cTECs konnte ein signifikanter Unterschied von NMRI zu BL6 ($p = 0,0338$) festgestellt werden.

Bei einem Vergleich der TECs der DBA mit den anderen beiden Stämmen ergab sich eine Signifikanz mit $p = 0,0094$ (nicht gezeigt).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die beiden wenig für Autoimmunität anfälligen Mausstämme NMRI und BL6 die größeren Zellzahlen zeigten. DBA/1 als anfälliger Mausstamm wies dagegen auffallend wenige für die negative Selektion notwendige mTECs auf. Das könnte bedeuten, dass vor allem die Zellzahl der mTECs eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Autoimmunität spielt.

3.2. Nachweis der PAD-Expression in den mTECs

3.2.1. RNA wurde in guter Qualität aus mTECs isoliert

Nach der Sortierung der Zellen in reife und unreife mTECs wurde die RNA isoliert und zur Qualitätskontrolle mittels BioAnalyser gemessen.

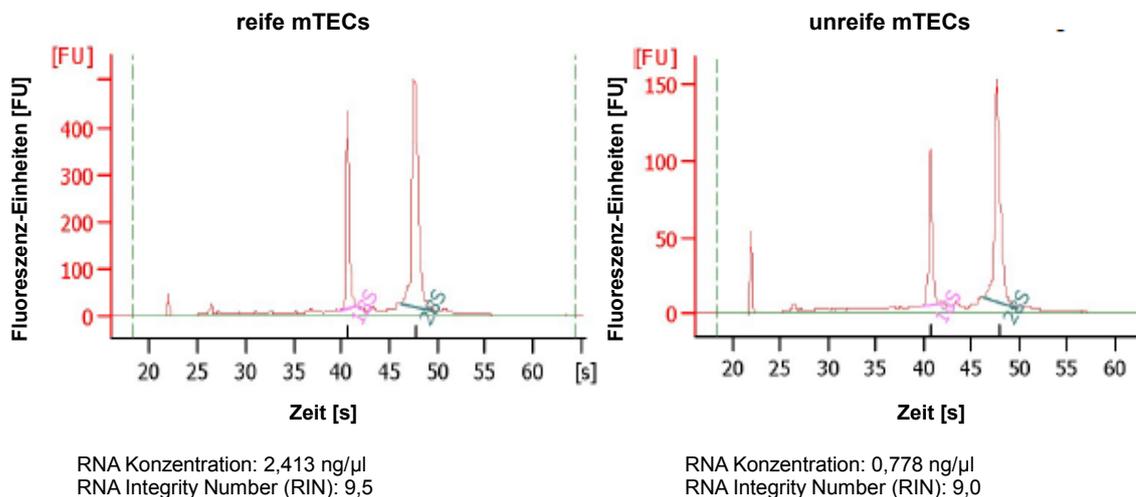


Abbildung 8: Die RNA konnte in guter Qualität aus mTEC-Proben isoliert werden. Gezeigt ist ein Beispiel zur Messung der RNA-Konzentration von reifen und unreifen mTECs. Es erfolgte die Qualitätskontrolle der RNA-Proben mit dem RNA 6000 Pico Assay.

Dabei wurde die isolierte RNA elektrophoretisch aufgetrennt, wobei die beiden Peaks für die ribosomalen Untereinheiten 18S und 28S stehen. Eventuelle Verunreinigungen und einen Abbau der mRNA ließen sich in keiner Probe feststellen, was exemplarisch in Abbildung 8 zu erkennen ist. Weiterhin wurden die RIN und die RNA-Konzentration in ng/ µl bestimmt.

Von den drei Mausstämmen betrug die RNA-Ausbeute für die reifen mTECs bei einer durchschnittlichen Zellzahl von $3,43 \cdot 10^5 \pm 2,12 \cdot 10^5$ im Mittel $133,13 \text{ ng} \pm 117,97 \text{ ng}$ bei einer RIN von $9,19 \pm 0,52$. Bei den unreifen mTECs, deren

Zellzahl durchschnittlich $2,09 \cdot 10^5 \pm 1,47 \cdot 10^5$ betrug, ergab sich eine mittlere RNA-Menge von $36,72 \text{ ng} \pm 30,97 \text{ ng}$ mit einer RIN von $8,35 \pm 1,04$.

Eine Korrelationsberechnung nach Spearman von RNA-Menge zu Zellzahl ergab einen Korrelationskoeffizienten von $r = 0,64$ und $p = 0,0044$, welches den erwarteten positiven Zusammenhang belegt.

Dieser Schritt zeigte, dass ausreichend RNA in guter Qualität für die Expressionsanalyse vorhanden war.

3.2.2. Reife mTECs verzeichneten höhere PAD-Expression

Nach der RNA-Isolation wurde diese mit Hilfe einer Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben und anschließend die Expression der untersuchten Gene mittels quantitativer PCR gemessen. Von jedem Mausstamm (NMRI, BL6 und DBA/1) wurden in 3 Durchläufen Zellen isoliert, daraus die mRNA gewonnen und in jeweils 3 technischen Replikaten die Expression mittels ΔCt -Methode bestimmt. Dazu wurde GAPDH als Referenzgen genutzt, sowie Aire und beta5t als Kontrollgene bestimmt. Aire wird in den mTECs exprimiert, in den reifen mTECs höher als in den unreifen [Derbinski et al., 2005/2008]. Beta5t dagegen befindet sich in den cTECs [Gossens et al., 2010]. Insulin 1 und 2 dienten als Kontrolle, da sie gewebspezifische Gene darstellen. Insulin wird Aire-abhängig exprimiert [Metzger and Anderson, 2011] und ist sonst lediglich im endokrinen Pankreasgewebe zu finden.

In dieser Arbeit sollte die Genexpression von PAD1, 2, 3, 4 und 6 untersucht werden. Die RNA ohne die Reverse Transkription diente als Negativkontrolle. Hier wurden keine Signale detektiert.

Die Ct-Werte der reifen und unreifen mTECs wurden jeweils auf GAPDH normiert (ΔCt) und als $2^{(-\Delta\text{Ct})}$ in der Abbildung 9 dargestellt.

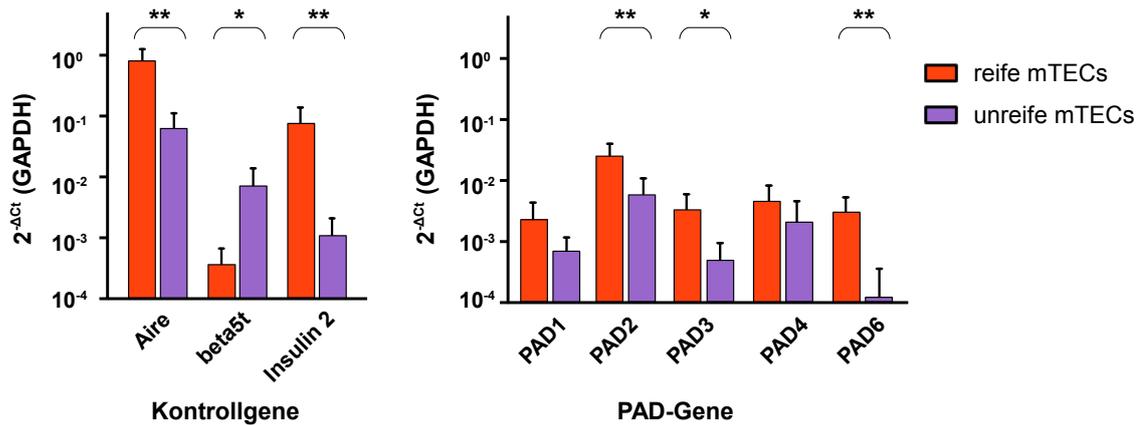


Abbildung 9: Die PAD-Gene sind in den reifen mTECs höher exprimiert als in den unreifen mTECs. Die $2^{-\Delta C_t}$ -Werte der Genexpression wurden von den 3 Mausstämmen zusammengefasst und logarithmisch dargestellt. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung von reifen und unreifen mTECs ($n = 8 - 9$). Zur Bestimmung der Signifikanz wurde der unpaariger t-Test verwendet (bei signifikanter Varianz mit Welch-Korrektur) * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Im Vergleich der Gene aller Mausstämme von reifen und unreifen mTECs zueinander hat Aire bei den reifen mTECs mit $0,8 \pm 0,45$ die höchste Expression. Zwischen reifen und unreifen mTECs ergab sich eine Signifikanz mit $p = 0,0012$. Als Kontrollgen lag beta5t signifikant 19-mal höher bei den unreifen mTECs als bei den reifen mTECs ($p = 0,0258$). Hier spielt sicherlich der Anteil an cTECs in den unreifen mTECs eine Rolle, da die Regionen bei der Zellsortierung nebeneinander liegen. Somit haben Aire und beta5t zusätzlich die Identität der sortierten Zellen bestätigt. Insulin 1 wurde in den reifen und unreifen mTECs in geringer Expression nachgewiesen (nicht gezeigt). Dagegen wies Insulin 2 eine signifikant höhere Expression in den reifen mTECs auf ($p = 0,0077$).

Die untersuchten PAD-Gene zeigten auf mRNA-Ebene eine höhere Expression in den reifen mTECs als in den unreifen mTECs mit signifikanten Unterschieden bei PAD2 mit $p = 0,0056$, PAD3 mit $p = 0,0131$ und PAD6 mit $p = 0,0051$. Zusätzlich wurde die gesamte PAD-Expression der reifen mTECs den unreifen mTECs gegenübergestellt. Hier zeigte sich eine deutliche Signifikanz ($p = 0,0015$) zugunsten der reifen mTECs.

Somit wurde bewiesen, dass die PAD-Gene in den mTECs der Maus exprimiert sind. Ihre Expression ist in den reifen mTECs signifikant höher als in den unreifen mTECs.

3.2.3. Die Expression von Aire korreliert mit der PAD-Expression

Weiterhin sollte die Frage untersucht werden, ob die Expression der PADs im Thymus von Aire abhängig ist. Dazu wurde die Expression von Aire der PAD-Expression gegenübergestellt.

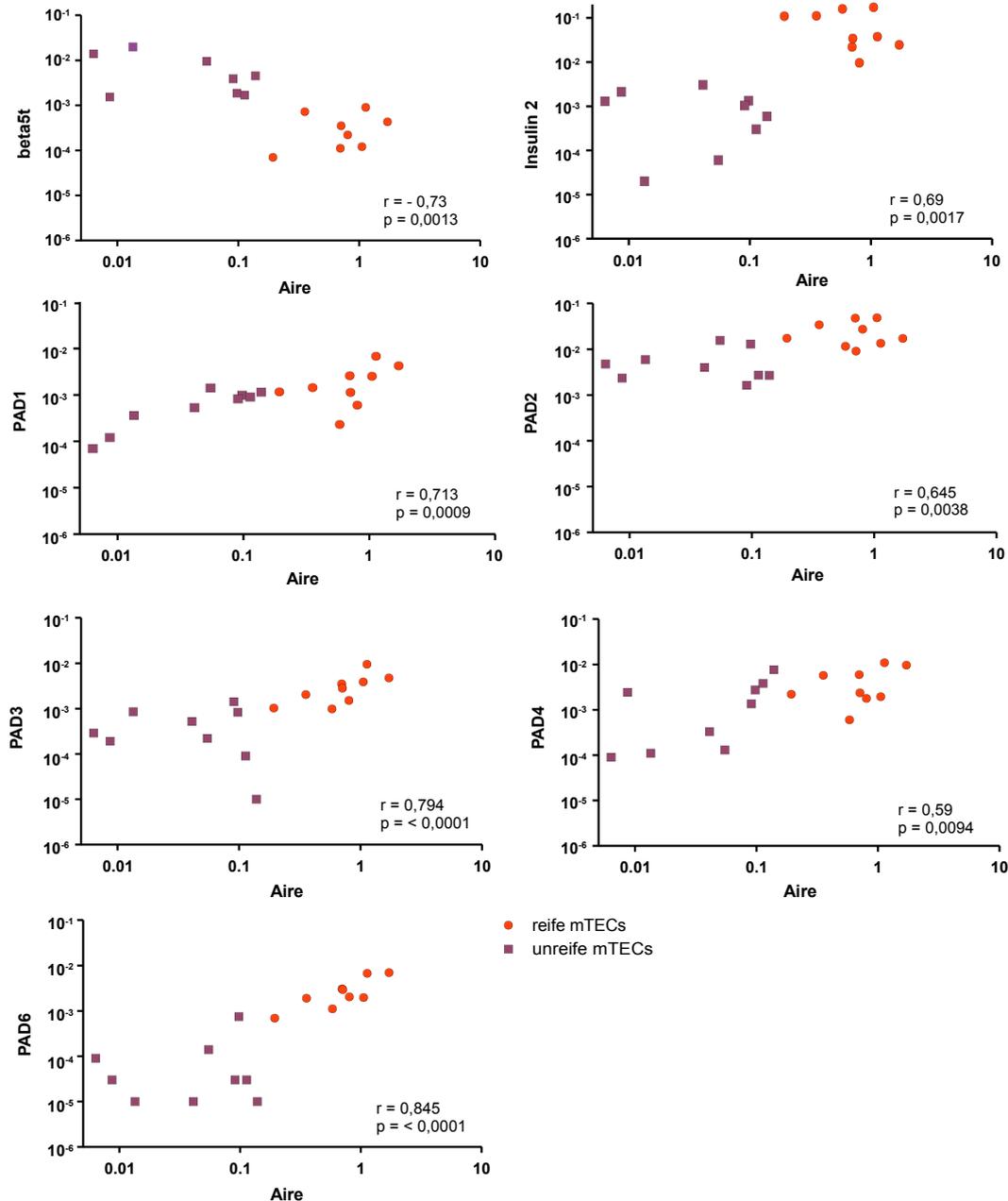


Abbildung 10: Die Expression von Aire korreliert mit der PAD-Expression. Die $2^{(-\Delta Ct)}$ - Werte von Aire sind dem jeweiligen Gen gegenübergestellt. Gezeigt sind reife und unreife mTECs mit je 9 XY-Paaren. Der Test auf Korrelation wurde nach Spearman berechnet und mit r- und p-Wert angegeben.

Bei den reifen und unreifen mTECs zusammen ergab sich für beta5t ein negativer Zusammenhang. Insulin 2 und die untersuchten PADs zeigten eine positive Korrelation mit Aire. Die genauen r- und p-Werte sind der Abbildung 10 zu entnehmen.

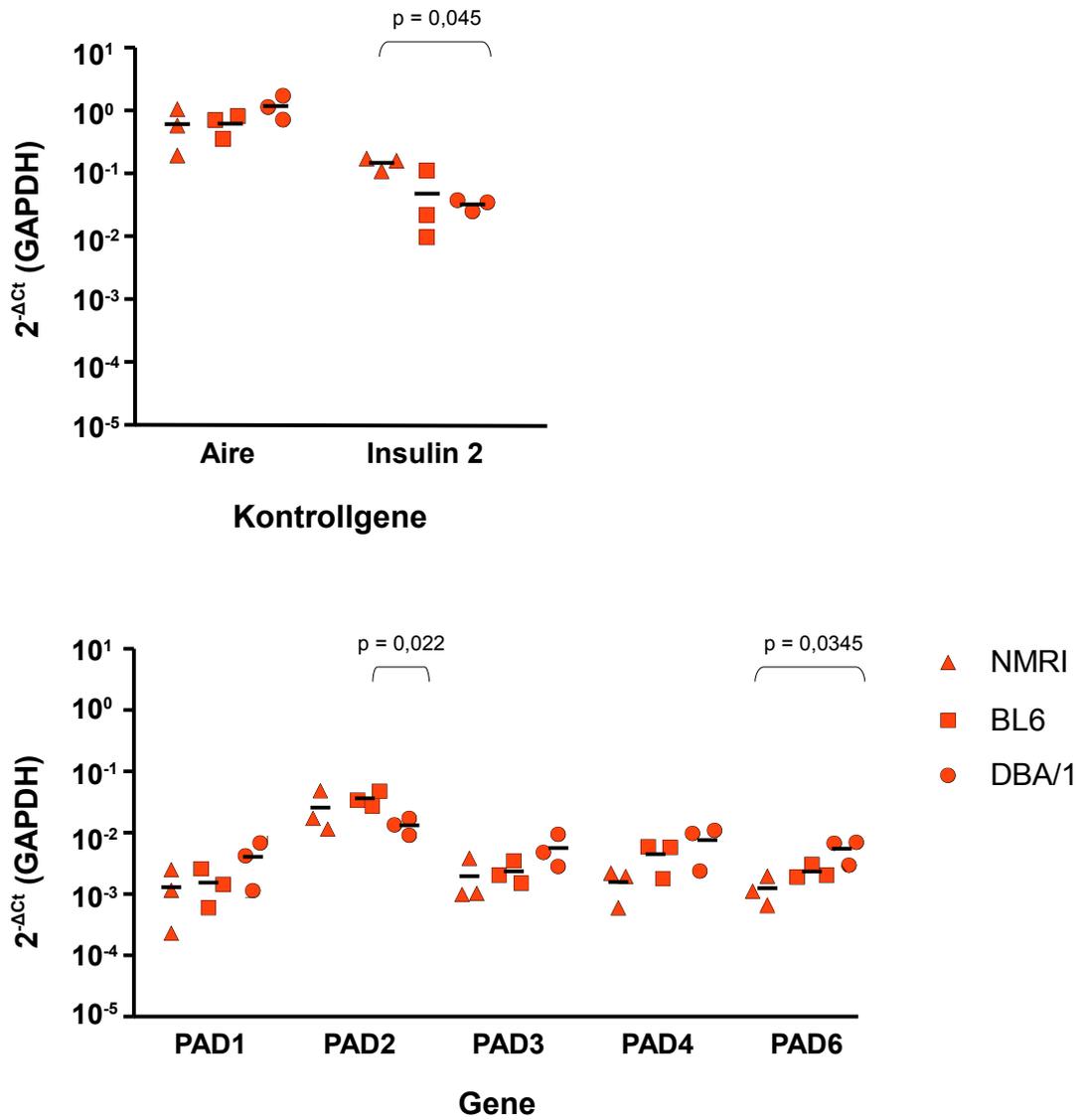
3.2.4. DBA-Mäuse zeigten signifikant höhere PAD-Expression

Als nächstes wollten wir die Mausstamm-spezifischen Unterschiede in der PAD-Expression untersuchen. Hierbei wurden die $2^{(-\Delta Ct)}$ Werte der Kontrollgene und die untersuchten Gene der einzelnen Mausstämme untereinander verglichen.

Bei den reifen mTECs zeigte sich bei einem Vergleich der Mausstämme eine höhere Expression von Aire, PAD1, 3, 4 und 6 in den DBA-Mäusen. Bei den NMRI-Mäusen lagen die Werte am niedrigsten und BL6 befand sich in der Mitte. Bei PAD4 ist ein Trend mit $p = 0,089$ zwischen NMRI und DBA/1 zu erkennen. PAD6 wies zwischen NMRI und DBA/1 eine Signifikanz ($p = 0,0345$) und zwischen BL6 und DBA/1 einen Trend ($p = 0,077$) auf. Eine umgekehrte Reihenfolge ergab sich bei dem Gen Insulin 2 mit einer Signifikanz ($p = 0,0045$) zwischen NMRI und DBA/1 und einem Trend ($p = 0,057$) zwischen NMRI und BL6. PAD2 hingegen wurde in den BL6-Mäusen am höchsten und in den DBA-Mäusen am niedrigsten exprimiert mit signifikantem Unterschied ($p = 0,022$). Im gesamten Niveau lag die PAD2-Expression signifikant über den restlichen PAD-Werten ($p = 0,0026$).

Die Auswertung der unreifen mTECs ließ kein eindeutiges Expressionsmuster erkennen, da zwischen den Genen eine größere Streuung auftrat. Es gab nur bei Aire einen signifikanten Unterschied zwischen NMRI und DBA/1 mit $p = 0,0153$, sowie einen Trend zwischen BL6 und DBA/1 ($p = 0,0817$). Die restlichen untersuchten Gene zeigten weder eine Signifikanz noch einen Trend. Bei dem PAD6-Gen war auffällig, dass bei den DBA-Mäusen in allen drei unabhängigen Experimenten kein messbares Signal detektiert werden konnte.

Insgesamt zeigte der immunanfällige Mausstamm der DBA/1 eine signifikant höhere PAD-Expression ($p = 0,0025$) im Vergleich zu NMRI und BL6, mit Ausnahme von PAD2.

A reife mTECs

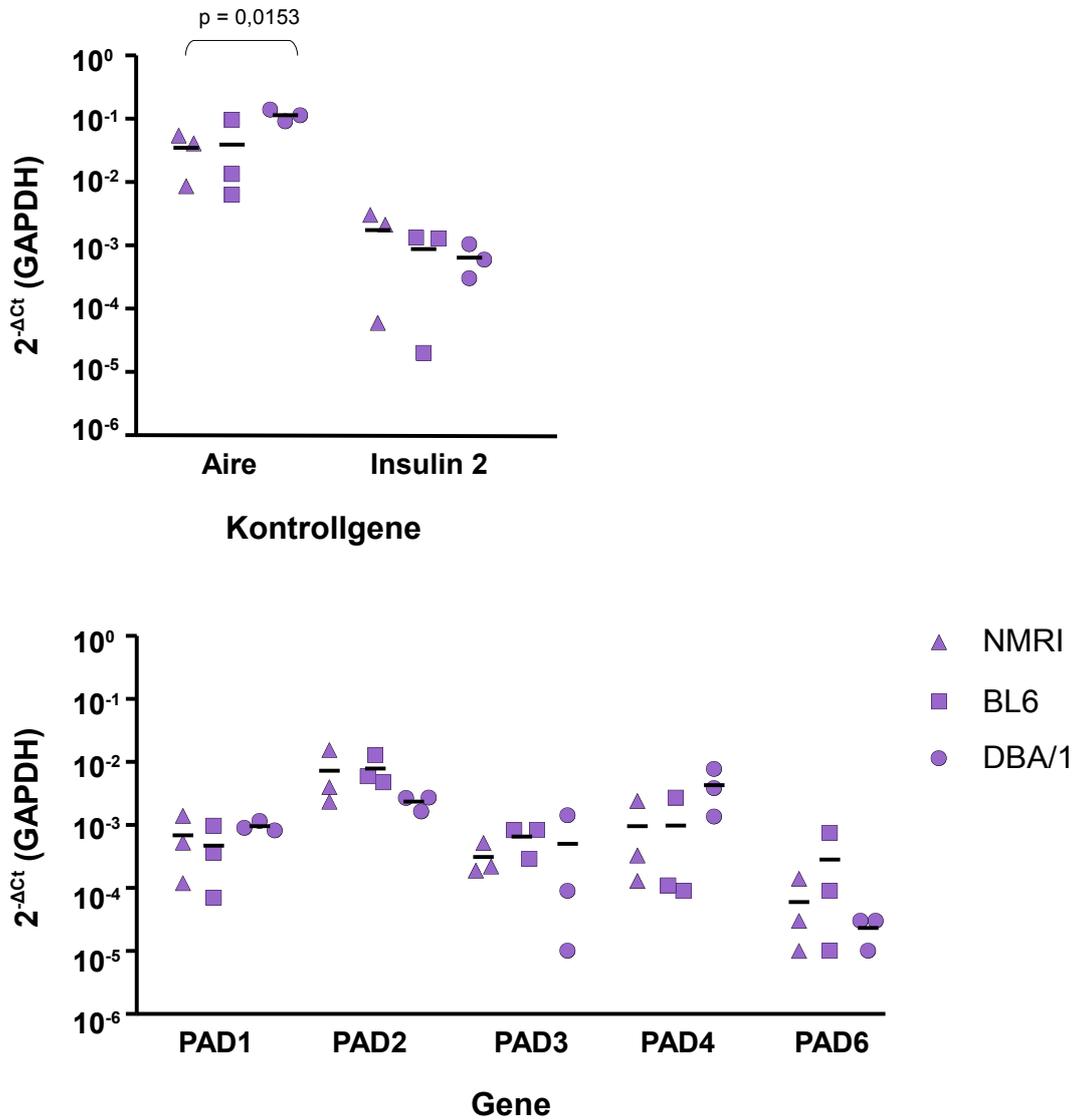
B unreife mTECs

Abbildung 11: Die Genexpression der meisten PADs ist bei den DBA/1 Mäusen am höchsten. Logarithmische Gegenüberstellung der $2^{-\Delta Ct}$ -Werte der 3 Mausstämme in jeweils 3 unabhängigen Experimenten. Die Signifikanz wurde mit der ANOVA-Varianzanalyse und dem unpaarigen t-Test berechnet. In (A) Kontrollgene und PAD-Gene für die reifen mTECs und in (B) Kontrollgene und PADs für die unreifen mTECs dargestellt.

3.3. PAD-Nachweis auf Proteinebene

3.3.1. Korrelation von Zellzahl und Proteinkonzentration

Von den sortierten und lysierten Zellen wurden die Proteinkonzentrationen mit dem Nano Orange Protein Quantitation Kit bestimmt. Anhand der gemessenen Fluoreszenzwerte und der bekannten BSA-Konzentration wurde die Konzentration der Zellproben berechnet. Diese Werte lagen oberhalb des Konzentrationsbereiches von 7,5 µg/ml BSA. In der Abbildung 12 ist ein Beispiel für die BSA-Standardkurve dargestellt.

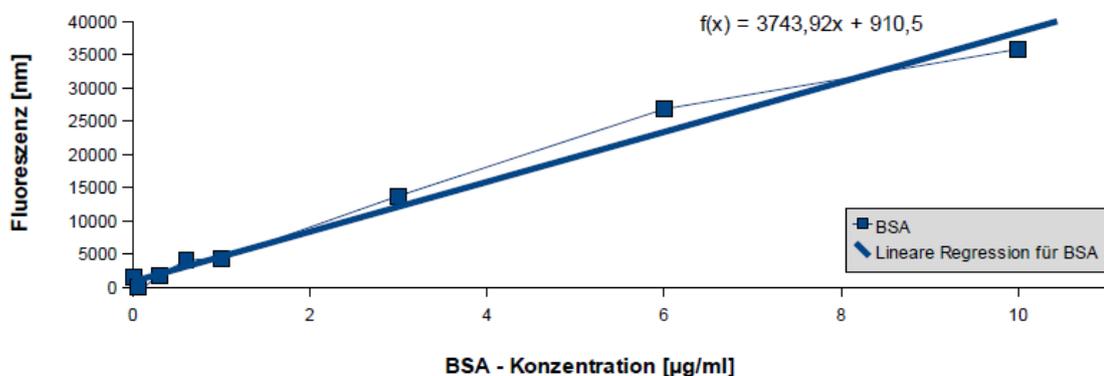


Abbildung 12: Proteinbestimmung wurde mittels Nano Orange durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte der gemessenen Fluoreszenzen der BSA-Standardreihe und die lineare Regressionsgerade. Es ist die lineare Regressionsgleichung mit angegeben

Wie zu erwarten, korrelierten die erhaltenen Zellzahlen nach der Zellsortierung mit der gemessenen Proteinmenge. Hieraus ergab sich eine positive Korrelation mit $r = 0,9194$ und $p < 0,0001$.

Analog zur mRNA-Isolation konnte aufgrund der geringeren Zellzahl der unreifen mTECs auch weniger Proteinmenge aus dieser Zellpopulation gewonnen werden.

Bei genauerer Betrachtung der einzelnen Stämme lässt sich erkennen, dass bei den DBA-Mäusen der Korrelationskoeffizient mit $r = 0,943$ signifikant mit $p = 0,0167$ am höchsten liegt. Bei den Stämmen NMRI ($r = 0,7143$) und BL6 ($r = 0,7714$) ist eine schwächere Korrelation zu erkennen. Die Daten sind in Abbildung 13 dargestellt.

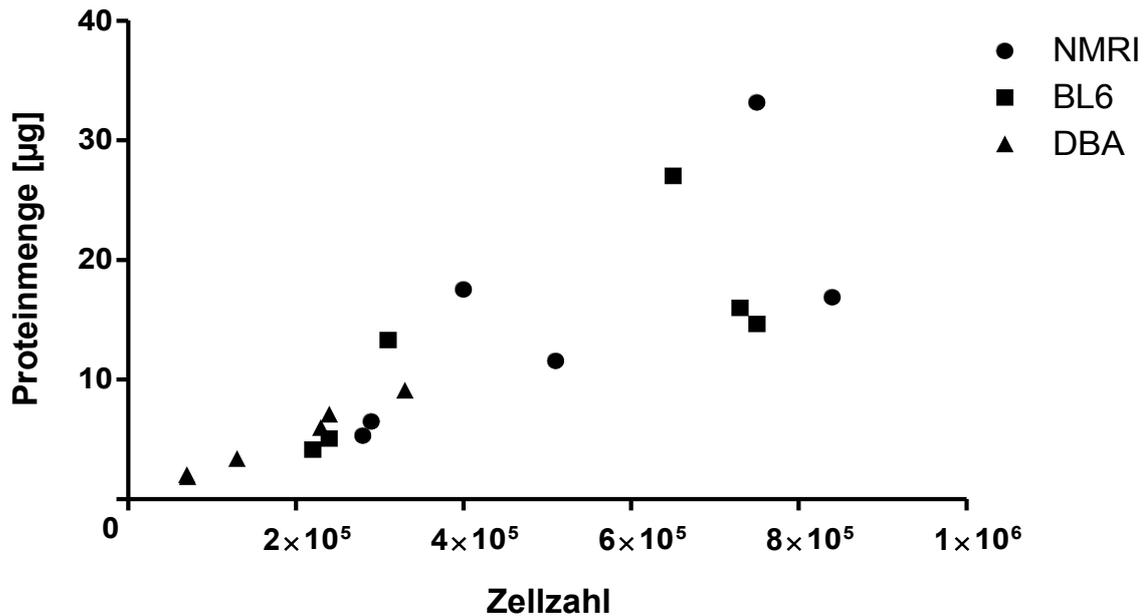


Abbildung 13: Die Zellzahl korreliert mit der Proteinmenge. Die Proteinkonzentration wurde mittels Nano Orange bestimmt und daraus die Proteinmenge berechnet. Die Zellzahl ist der Proteinmenge von den 3 Mausstämmen (n = 6) gegenübergestellt.

Generell wurde deutlich, dass sich die Zellzahlen und somit auch die gewonnene Proteinmenge bei den DBA-Mäusen im unteren Bereich der gesamten Proben befanden und relativ dicht zusammen lagen. Dagegen war bei den NMRI und den BL6 eine größere Streuung zu erkennen.

3.3.2. Proteinnachweis mittels ELISA

3.3.2.1. Kreuzreaktionen mit BSA ausgeschlossen

Für die Etablierung wurde zunächst der jeweilige Antikörper auf eine Reaktion mit BSA getestet. Die Verdünnung der Antikörper wurde so gewählt, dass bei dieser Konzentration Kreuzreaktionen mit BSA ausgeschlossen wurden. Als Beispiel lag der OD-Wert für den anti-PADI2 IgG bei der Verdünnung 1:1000 bei 0,009.

3.3.2.2. Etablierung eines Sandwich-ELISA nicht gelungen

Mit jeweils einem Antikörperpaar gegen PAD2 bzw. PAD3 sollte ein Sandwich-ELISA etabliert werden. Dabei wurde jeder Antikörper des Paares ein Mal als Fängerantikörper und ein Mal als Detektionsantikörper verwendet. Für die Standardreihe wurde entsprechend PAD2- bzw. PAD3-Protein verwendet.

In beiden Versuchsansätzen konnten keine spezifischen OD-Werte gemessen werden.

Somit war eine Etablierung eines Sandwich-ELISA nicht gelungen. Möglicherweise waren die ausgewählten Antikörper für einen Sandwich-ELISA nicht geeignet.

3.3.2.3. Direkter ELISA mit Standardproteinen etabliert

In einem weiteren Versuch sollte der Nachweis von PAD2 bzw. PAD3 per direkten ELISA durchgeführt werden. Je Protein standen zwei Antikörper zur Verfügung, die in den Versuchen passend zum Protein getauscht wurden.

Zunächst wurde getestet, welche Menge von Protein aus den Zellproben an die ELISA Platte binden kann. Dazu wurde eine Proteinbestimmung mit dem Nano Orange Protein Quantitation Kit vor und nach der Bindung an die Platte durchgeführt. Dazu dienten das PAD3 Standardprotein in 3 Verdünnungen und verschiedene dialysierte Proben, wobei jeder Mausstamm vertreten war.

Die Messungen zu PAD3 ließen nur bei der 1:100 Verdünnung eine Berechnung mit einer Differenz von 0,06 µg / ml zu. Bei den Verdünnungen von 1:2000 und 1:100.000 waren die Verdünnungsstufen zu niedrig und keine Messung mit dem Nano Orange möglich.

Die dialysierten Proben wiesen im Mittel eine Bindungskonzentration von 8,89 µg / ml auf. Dies entsprach einem prozentualen Anteil von 38% der Ausgangskonzentration. Es befanden sich noch durchschnittlich 14,56 µg / ml Protein in Lösung. Diese waren nicht an die Platte gebunden.

Somit wurde gezeigt, dass eine Proteinbindung von 38% an die ELISA-Platte erfolgte, wobei noch genügend Protein in Lösung zur Verfügung stand.

Bei dem direkten ELISA mit PAD3 ließen sich eine Farbreaktion nach TMB-Zugabe und die Abstufung der Verdünnungsreihe beobachten, was auf eine Konzentrationsabhängigkeit schließen ließ. In der Abbildung 14 ist beispielhaft eine Standardkurve für das PAD3 – Protein dargestellt. Dagegen konnte bei PAD2 keine Konzentrationsabhängigkeit gemessen werden.

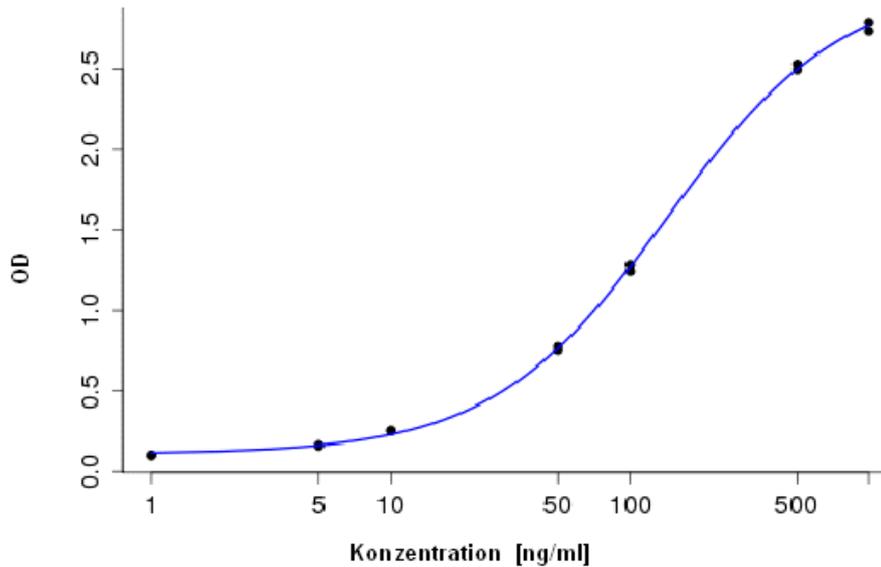


Abbildung 14: Beispiel einer Standardkurve für das PAD3-Protein. Die gemessenen OD-Werte sind der Konzentration gegenübergestellt. Der Versuch wurde als direkter ELISA mit dem PAD3-Standardprotein und den Detektionsantikörpern anti-PADI3 (Y-14) IgG und anti-goat IgG:HRP durchgeführt.

Nach dem Tausch der Antikörper ließen sich in den Versuchsansätzen mit PAD2 und PAD3 OD-Werte mit einer Konzentrationsabhängigkeit messen, die deutlich über der Negativkontrolle lagen.

Als Detektionsgrenzen ergaben sich für PAD3 50 ng / ml mit OD-Werten von 0,109 und 0,113 bei dem Detektionsantikörper anti-rabbit IgG und bei dem Antikörper anti-goat IgG:HRP 5 ng/ml mit 0,182 und 0,163. Bei PAD2 ließ sich als Detektionsgrenze 100 ng / ml mit dem Detektionsantikörper anti histidin tag:HRP nachweisen.

Zur weiteren Optimierung der Ergebnisse wurde eine voraktivierte Platte verwendet, die jedoch nicht zu einer Verbesserung beitrug.

Eine wichtige Erkenntnis dieser Versuche war, dass der direkte ELISA von PAD2 und PAD3 mit einer Standardkurve funktionierte. Die Sensitivität konnte bis zu einer Konzentration von 5 ng / ml optimiert werden, reichte jedoch nicht an die Sensitivität eines Sandwich-ELISA heran.

Bei den Versuchen mit den Protein-Proben aus den lysierten Zellen konnten zusammengefasst keine Signale gemessen werden, da ihre Konzentrationen unter der Detektionsgrenze des direkten ELISA lagen.

4. Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Frage, ob die PADs in den mTECs nachweisbar sind. In einem ersten Schritt konnte die PAD-Expression auf mRNA-Ebene belegt werden. Die Expression von PADs und die Existenz von Citrullinierungen sind als Grundvoraussetzung für die Negativselektion im Thymus anzusehen.

Hierzu wurden zunächst die Zellen aus den Mausthymi aufgereinigt und sortiert. Anschließend erfolgte eine Mausstamm-spezifische Expressions- und Proteinanalyse.

4.1. Die Versuche beschränkten sich auf ein Geschlecht

In der vorliegenden Arbeit wurde sich überwiegend auf männliche Mäuse beschränkt, um geschlechtsspezifische Unterschiede auszuschließen. In der Gegenüberstellung von TEC und T-Zellen lagen die Zellzahlen der männlichen Versuchstiere sehr dicht beieinander.

Eine Ausnahme bildete ein Versuch mit weiblichen BL6-Mäusen. Im Vergleich der Geschlechter war bei den Männchen eine 1,4fach höhere Zellzahl an TECs als bei den Weibchen zu verzeichnen. Dagegen wurde in einer neuen Studie von Dumont-Lagacé gezeigt, dass TECs in weiblichen adulten Mäusen mehr proliferieren als in männlichen. Hierzu wurden der Umsatz der Männchen und Weibchen mit Hilfe von einem grün fluoreszierenden Protein im Durchflusszytometer gemessen bis das Signal nicht mehr detektierbar war [Dumont-Lagacé et al., 2014].

Die mRNA-Analyse der Weibchen zeigte nur bei den reifen mTECs bei den Kontrollgenen Insulin 1 und 2 eine höhere Expression. Bei den PADs waren keine Unterschiede erkennbar.

Da nur ein einziger Versuch mit weiblichen Tieren durchgeführt wurde, sind keine allgemeinen Aussagen über TEC-Zahlen und PAD-Expression möglich. Deshalb sollten in weiteren Untersuchungen die Fragen sowohl nach der Reliabilität der Ergebnisse als auch nach deren Unterschied zu den Männchen geklärt werden. Doch diese Fragen waren kein Bestandteil dieser Arbeit.

In Bezug auf das Mausgeschlecht wurde beschrieben, dass männliche DBA/1 anfälliger für eine CIA sind als weibliche. Wenn allerdings eine Ovariectomie bei weiblichen Mäusen vorgenommen wurde, waren sie anfälliger für eine CIA als die Männchen. Daraus lässt sich vermuten, dass auch die weiblichen Geschlechtshormone eine Rolle für die CIA-Anfälligkeit spielen [Holmdahl et al., 1986].

Beim erwachsenen Menschen wird in Bezug auf das Geschlecht angegeben, dass mindestens 65% der Patienten mit einer Autoimmunerkrankung weiblich sind, bei der RA sogar 75% [Cooper and Stroehla, 2003].

Dies verdeutlicht die Notwendigkeit, die geschlechtsspezifischen Unterschiede in Folgestudien zu untersuchen.

4.2. Gleiches Alter ist essentiell für die Zellzahlen

In unseren Versuchen wurden die Mäusthymi im Alter von 4 - 5 Wochen präpariert, um einen konstanten Zeitpunkt in der Entwicklung der Zellen festzulegen. Dieser Zeitpunkt wurde gewählt, da sich hier die höchste Gesamtzellzahl im Thymus und die größte Expression der TEC-spezifischen Marker nachweisen ließen [Aw et al., 2008]. Danach wurde eine geringere Expression der Antikörper, z.B. von Keratin, MHC II und Ep-CAM, beobachtet und es erfolgte ein Rückgang der TEC-Zahlen, wobei es vermehrt zur Apoptose kam [Aw et al., 2008].

4.3. TEC-Zellzahlen sind wichtig für die Selektionsprozesse

Die von uns gefundene vergleichbare Zahl an T-Zellen in den Thymi der drei Mausstämme spricht für eine vergleichbare Thymusgröße. Dies ermöglicht den direkten Vergleich der Zellzahlen für die unterschiedlichen TEC-Subpopulationen.

Auffällig in den Ergebnissen war der Unterschied in der Zellzahl der mTECs und cTECs. Die mTECs lagen 13-fach über den Zellzahlen der cTECs. Dies könnte für die Bedeutung der negativen Selektion sprechen. Oder es sind so viele mTECs nötig, um diese Vielzahl an gewebsspezifischen Genen im Thymus zu exprimieren. Denn laut Literatur exprimiert jede einzelne medulläre Epithelzelle nur ein bestimmtes Repertoire an TRA-Genen [Derbinski et al., 2001].

Außerdem wurde herausgefunden, dass mTECs mehr Gene und mindestens 5-fach mehr RNA-Transkripte exprimieren als cTECs [St-Pierre et al., 2013], worin die unterschiedliche Rolle der beiden Zelltypen verdeutlicht wird.

Die cTECs dagegen wiesen in allen drei Stämmen die geringste Zellzahl auf. Genaue Zellzahlen werden in der Literatur nicht angegeben, aber es wird zumindest von einem schnelleren Zellumsatz in adulten Mäusen bei den mTECs im Vergleich zu den cTECs gesprochen [Dumont-Lagacé et al., 2014].

Ein weiterer Aspekt liegt darin, dass möglicherweise für die Positivselektion weniger cTECs notwendig sind. Laut Literatur kann ein einzelner Peptid-MHC-Komplex, der von den cTECs exprimiert wird, ein vielfältiges T-Zell-Repertoire produzieren [Ignatowicz et al., 1996; Huseby et al., 2005]. In näheren Untersuchungen wurde dabei das proteolytische Thymoproteasom gefunden, welches die cTEC-spezifische katalytische Untereinheit beta5t enthält [Ripen et al., 2011]. Die Relevanz dieser Untereinheit zeigte sich in Studien mit beta5t-defizienten Mäusen, bei denen eine deutlich verminderte Positivselektion der MHC Klasse I CD4-CD8+ T-Zellen stattfand und zusätzlich mehr immuninkompetente CD4-CD8+ T-Zellen produziert wurden [Nitta et al., 2010].

4.4. mTEC-Zahlen könnten eine Rolle bei der Entwicklung von Autoimmunität spielen

Ein Vergleich der Zellzahlen von reifen und unreifen mTECs pro Thymus zeigte bei dem CIA-anfälligen Stamm DBA/1 signifikant niedrigere Zellzahlen im Vergleich zu den weniger anfälligen Stämmen.

Wie kommt es zu den geringeren mTEC-Zahlen? Eine Erklärung wäre in einem Defekt in der Entwicklung der mTECs zu vermuten, welcher möglicherweise mit der TNF-Superfamilie der Zytokine zusammenhängt. Denn wie bereits beschrieben wurde, spielen RANK und CD40 eine wichtige Rolle bei der Entstehung des medullären Thymus und der Entwicklung der mTECs [Akiyama et al., 2008; Irla et al., 2008].

Weiterhin stellt sich die Frage, welche Auswirkungen die geringeren mTEC-Zahlen haben könnten. Es besteht die Möglichkeit, dass auf Grund der geringeren Zahl an mTECs weniger Negativselektion stattfinden kann und dadurch vermehrt TRA-reaktive T-Zellen der Negativselektion im Thymus

entkommen können. Nachgewiesen wurde das an Aire-defizienten transgenen Mäusen, die einen nahezu kompletten Ausfall in der Deletion von autoreaktiven T-Zellen im Thymus zeigten [Liston et al., 2003]. Da mTECs in Aire-defizienten Mäusen eine Verminderung in der Gentranskription von TRAs aufwiesen [Anderson et al., 2002], wurde vermutet, dass auf Grund der reduzierten Expression von TRAs im Aire-defizienten Thymus pathogene autoreaktive T-Zellen nicht effizient eliminiert werden können [Liston et al., 2003]. Daraus ergibt sich, dass Aire das Überleben von autoreaktiven T-Zellen unter Transkriptionskontrolle von TRAs im Thymus reguliert [Kuroda et al., 2005]. Somit ist zu vermuten, dass sich eine verringerte mTEC-Zahl ähnlich wie eine Aire-Defizienz auswirken könnte.

In der Literatur wird von einer Abhängigkeit der CIA-Induktion durch T-Zellen gesprochen, welches mit Hilfe von CD4-Knock-out-Mäusen nachgewiesen wurde [Tada et al., 1996]. Diese vermehrten antigen-spezifischen T-Zellen sind überwiegend an der Induktionsphase der CIA, an der Unterstützung der Aktivierung von Kollagen-spezifischen B-Zellen und Autoantikörpern beteiligt [Pöllinger, 2012]. Die Aussagen im Zusammenhang mit unseren Ergebnissen, ergibt sich für die CIA-Induktion möglicherweise auch eine Abhängigkeit von der Anzahl der mTECs.

4.5. PADs werden als mögliche TRAs in den mTECs exprimiert

Um die PADs in den mTECs nachzuweisen, wurde zunächst die mRNA aus den sortierten Zellen isoliert und dann ihre PAD-Expression überprüft. Die Expressionsanalysen zeigten im Allgemeinen das Vorhandensein der PADs in den mTECs. Die Expression der PAD-Enzyme, welche die posttranslationale Modifikation katalysieren, ist die erste Grundvoraussetzung für die Negativselektion von Citrullin-spezifischen T-Zellen.

Die mRNA-Expression aller 5 PAD-Isoformen wurde im Gesamthymus laut Vossenaar nachgewiesen [Vossenaar et al., 2003b], wobei auch andere Zellen in der Lage sind, PADs zu exprimieren, wie z.B. CD3+ T-Zellen, CD20+ B-Zellen, Neutrophile und Monozyten [Chang et al., 2005]. In unseren Versuchen konnten wir die angegebene Lokalisation im Thymus auf die mTECs

präzisieren. Es liegt die Vermutung nahe, dass auch PADs TRAs darstellen, welche im Thymus exprimiert werden.

Bei unseren Ergebnissen ist aufgefallen, dass die Expressionswerte der PADs sehr gering waren. Da die Expressionslevel von Aire und TRAs in mTECs von Person zu Person variieren können [Taubert et al., 2007] und auch in Mäusen diese Variabilität innerhalb eines Stammes und zwischen beiden Thymuslappen bestätigt wurde [Venzani et al., 2008], verwendeten wir gepoolte Mausthymi für je ein Experiment um diese interindividuellen Unterschiede auszugleichen und um auch das Repertoire der PADs abzudecken. Somit wurde nicht auf Einzelzellebene untersucht. Dies entspricht den Erwartungen, denn Gillard und Farr haben herausgefunden, dass eine medulläre Epithelzelle nur ein begrenztes Spektrum an TRAs exprimiert und dass die Häufigkeit der mTECs, welche einzelne TRAs exprimieren, ziemlich niedrig ist [Gillard and Farr, 2006].

4.6. PAD-Expression könnte Aire-abhängig reguliert sein

Da der Nachweis der PADs auf mRNA-Ebene gelungen war, erfolgte nun eine genauere Betrachtung im Zusammenhang mit Aire. Derbinski et al. haben herausgefunden, dass überwiegend reife CD80 positive mTECs für die Expression der TRAs verantwortlich sind und Aire die Induktion einer großen Anzahl an Genen bestimmt [Derbinski et al., 2005]. Somit wird Aire eher eine transkriptionsaktivierende Wirkung zugesprochen [Björnses et al., 2000; Pitkänen et al., 2000/2001/2005]. Zusätzlich ist die Aire-Expression an die Entwicklung der mTECs gekoppelt [Gillard et al., 2007]. Weiterhin wurde in anderen Studien gezeigt, dass die reifen mTECs in Aire-positiv (70%) und in Aire-negativ (30%) eingeteilt werden können [Derbinski et al., 2008; Venzani et al., 2007]. Somit stellen sie womöglich aufeinander folgende Abschnitte in der Entwicklung dar, bei denen die Aire-positiven mTECs als das reifste Stadium angesehen werden [Gäbler et al., 2007; Gray et al., 2007; Rossi et al., 2007]. In unseren Versuchen konnten wir diese Aussagen bestätigen. Es wurde in den reifen mTECs sowohl die Expression von Aire als auch das gewebsspezifische Gen Insulin 2 als Beispiel für ein TRA nachgewiesen. Beide Kontrollgene waren in den reifen mTECs signifikant höher exprimiert als in den unreifen mTECs. Diese Ergebnisse zeigten, dass sich die Aire-Expression in den mTECs erst entwickelt

und stützen das Modell der terminalen Differenzierung von Derbinski et al. [Derbinski et al., 2005]. Zusätzlich fanden sie heraus, dass die promiske Genexpression (pGE) mit der Expression von CD80 in den mTECs korreliert, was mit ihrem Reifungsgrad zusammenhängt [Derbinski et al., 2005]. Aus den unreifen mTECs (geringe Expression von CD80 und Aire) entwickeln sich die Aire-positiven und mit hoher CD80-Expression reifen mTECs [Rossi et al., 2007; Gäbler et al., 2007]. Auch in unseren Resultaten ist Aire in den reifen mTECs mit einer hohen Expression von CD80 am höchsten exprimiert. Anderson et al. haben herausgefunden, dass es in Aire-defizienten Mäusen zu einem Defekt in der mRNA Transkription von Insulin und anderen gewebespezifischen Genen kommt [Anderson et al., 2002].

Als Schlussfolgerung ergibt sich, dass das Insulingen in reifen mTECs Aire-abhängig exprimiert wird. Dies konnten wir auch in unseren Ergebnissen bestätigen. Wir konnten eine positive Korrelation von Aire zu Insulin in den mTECs nachweisen.

Zusätzlich zeigte sich in unseren Versuchen eine negative Korrelation von Aire zu beta5t in den mTECs. Dies bestätigte, dass es sich tatsächlich um mTECs handelte. Denn beta5t ist zwar spezifisch im Thymus exprimiert, aber davon 70 bis 80% in den cTECs [Takahama et al., 2008].

Bei Übertragung der gewonnenen Ergebnisse auf die untersuchten PAD-Gene sieht man, dass die gesamten PADs in den reifen mTECs signifikant höher als in den unreifen mTECs exprimiert waren. Und auch hier ließ sich für alle PAD-Isoformen eine positive Korrelation mit Aire aufzeigen, womit sich die PAD-Expression auch als Aire-abhängig darstellt. Das könnte bedeuten, dass die PADs von Aire positiv reguliert werden und somit könnte durch einen Anstieg von Aire die PAD-Expression gesteigert werden. Die gewonnenen Ergebnisse unterstützen die Vermutung, dass die PAD-Gene auch im Rahmen der pGE Aire-abhängig exprimiert werden. Der genaue Mechanismus dieser Abhängigkeit ist jedoch noch unklar.

In unseren Versuchen erfolgte keine Unterscheidung der reifen mTECs anhand Aire. Hier läge ein möglicher Ansatz für weiterführende Studien, in denen zwei Fragen zu unterscheiden sind: 1. Welche mTEC-Population exprimiert die PADs? Hier könnte die Immunhistochemie mit Antikörpern gegen PAD und Aire

Klarheit bringen. 2. Wird die PAD-Expression tatsächlich vom Transkriptionsfaktor Aire reguliert? Dazu wäre die Methode der Chromatin-Immunopräzipitation hilfreich.

Unsere Untersuchungen bestätigen die Aire-Abhängigkeit von Insulin und legen auch eine Abhängigkeit der PADs von Aire nahe.

4.7. Erhöhte PAD-Expression in dem CIA-anfälligen Stamm

Nachdem zuvor die Mausstämme zusammen betrachtet wurden, soll nun die Genexpression der drei Mausstämme individuell für jeden Stamm beurteilt werden. Donate et al. fanden heraus, dass die Expression von Aire und Gelenk-TRA-Genen im Thymusstroma bei den CIA-anfälligen DBA-1/J Mäusen im Vergleich zu weniger anfälligen Mäusen sinkt. Sie interpretierten es als Reduzierung bei der Negativselektion der jeweiligen autoreaktiven Thymozyten, welche an der darauf folgenden autoimmunen Reaktion gegen diese Antigene in der Peripherie mitwirken könnten [Donate et al., 2011]. In unseren Experimenten zeigte Aire bei den DBA/1 dagegen eine höhere Expression im Vergleich zu den CIA-resistenten Stämmen NMRI und BL6, bei den unreifen mTECs signifikant zu NMRI. Dieses Ergebnis sollte in weiteren Untersuchungen überprüft werden.

Bei der Betrachtung von Insulin 2 der DBA/1 ergab sich im Vergleich zu den anderen Stämmen eine niedrigere Expression, bei den reifen mTECs signifikant zu NMRI. Diese Herabregulation des Aire-abhängigen Insulin Autoantigens wurde auch von Donate et al. nachgewiesen und könnte darstellen, dass der allgemeine Toleranzmechanismus bei den DBA-1/J nicht korrekt funktioniert [Donate et al., 2011]. Dies steht im Kontrast zu normalen nicht-autoimmunen Mausstämmen, bei denen sich die Genexpression im Thymus mit der Zeit nicht verändert [Kyewski and Derbinski, 2004]. Das Insulin 1 scheint in den mTECs nicht exprimiert zu sein (nicht gezeigt). Auch andere Studien haben gezeigt, dass zwar Insulin 2 nicht aber Insulin 1 im Thymus exprimiert ist [Nakayama et al., 2005; Brimnes et al., 2002]. Die beiden Insulingene bilden bei Ratten und Mäusen ein Zwei-Gen-System [Soares et al., 1985; Wentworth et al., 1986]. Das Insulin 2 in diesem System ist ortholog zum Insulingen beim Menschen, was einen Bezug von der Maus zum Menschen ermöglicht.

Weiterhin konnten wir auch bei den PADs Unterschiede zwischen den Stämmen nachweisen. Insgesamt zeigten alle PADs zusammen genommen, abgesehen von PAD2, eine signifikant höhere Expression bei den DBA/1 im Vergleich zu den anderen Stämmen. Dies könnte für eine gesteigerte Bildung von PADs sprechen und somit zu einer vermehrten Citrullinierung von Peptidantigenen führen.

Weiterhin auffällig bei den Expressionsanalysen der DBA-Mäuse war das Gen PAD6, da es bei den unreifen mTECs in allen Versuchen nicht detektierbar war. Eine Erklärung hierfür könnte die spätere Expression von PAD6 in den mTECs sein, weshalb es auch erst in den reifen mTECs detektierbar war.

4.8. Nachweis auf Proteinebene mit zu geringer Sensitivität

Zwar ist es uns gelungen, den direkten ELISA für PAD2 und PAD3 zu entwickeln, doch war hier die Sensitivität nicht ausreichend um die PAD-Proteine in den mTECs nachzuweisen. Als zweite Möglichkeit wurde der TaqMan[®] Protein Assay verfolgt. Doch leider konnte dies nicht erfolgreich etabliert werden. Da nicht alle Zellen gleichermaßen PADs exprimieren, sondern einige Zellen eine höhere Expression aufweisen, wäre eine Immunhistochemie-Untersuchung eine erfolgversprechende Alternative für den Nachweis der PAD-Proteine und der Citrullinierung.

4.9. Weitere Mechanismen verhindern die Entwicklung von Autoimmunität

Auf Grund der Vielzahl an Selbstantigenen ist eine unvollständige Präsentation dieser immer möglich. Deshalb sind mTECs und DCs in der Lage, die Entwicklung von Tregs im Thymus zu induzieren, welche die autoreaktiven T-Zellen supprimieren können [Aschenbrenner et al., 2007; Roman et al., 2010]. Um dies zu gewährleisten, können Membrandomänen zwischen mTECs und DCs ausgetauscht werden [Koble and Kyewski, 2009; Millet et al., 2008].

Gardner et al. entdeckten eine neue Population außerhalb des Thymus von Aire-exprimierenden Zellen mit TRAs in den sekundären lymphatischen Organen. Sie spekulierten, dass dies ein Sicherheitsnetz sein könnte, um naive

autoreaktive T-Zellen auszusondern, die der Negativselektion im Thymus entkommen konnten [Gardner et al., 2008].

4.10. Übertragbarkeit auf humane Situation

Wir konnten nachweisen, dass die PADs in den mTECs des Mausthymus exprimiert werden. Doch kann man davon ausgehen, dass dies auch beim Menschen der Fall ist? Diese Theorie ist sehr wahrscheinlich, denn auch im menschlichen Thymus konnte Insulin mit einer umgekehrten Korrelation für die Anfälligkeit zur Entwicklung von Diabetes Typ 1 nachgewiesen werden [Vafiadis et al., 1997]. Diabetes Typ 1 wird durch eine Autoimmunantwort gegen das Antigen Insulin verursacht [Janeway et al., 2001]. Auch wurde beim Menschen Aire nachgewiesen, was bei einem Gendefekt zu dem APECED-Syndrom führt [Nagamine et al., 1997; Aaltonen et al., 1997]. Desweiteren wurde beim Menschen die Expression von PAD4 und PAD2 im Zusammenhang mit der RA nachgewiesen [Foulquier et al., 2007]. Es wird vermutet, dass beide Isotypen an der Citrullinierung von Fibrin beteiligt sind [Foulquier et al., 2007].

Doch die Citrullinierung ist kein RA-spezifischer Prozess, da sie sowohl bei der akuten als auch bei der chronischen Arthritis im Mausmodell nachgewiesen wurde [Vossenaar et al., 2003a]. Weiterhin wies Vossenaar daraufhin, dass diese Mausmodelle zwar sehr hilfreich sein können, um den Arthritisprozess zu verstehen, die RA aber nicht vollständig nachahmen können [Vossenaar et al., 2003a]. So tritt der Krankheitsbeginn der CIA innerhalb weniger Wochen auf, während die Entwicklung bei der RA viele Jahre dauert. ACPA und RF können schon Jahre vor dem Ausbruch der RA positiv werden [Nielen et al., 2004]. Auch in der Maus konnten ACPAs nachgewiesen werden, wobei diese humorale Antwort abhängig von dem Mausstamm, dem Immunogen und dem Immunisierungsprotokoll ist [Cantaert et al., 2013]. ACPAs sind beim Menschen sehr spezifisch für die RA [Zendman et al., 2004] und assoziiert mit einer fortschreitenden Progression der Gelenkzerstörung [Van Gaalen et al., 2004; Van der Helm-van Mil et al., 2005]. Bei der Maus ist das Auftreten von ACPAs nicht unbedingt pathologisch, da vorbestehende ACPAs keinen Einfluss auf den Krankheitsverlauf der Arthritis zeigten [Cantaert et al., 2013].

Weiterhin von Bedeutung für die Entwicklung einer RA ist das Geschlecht, denn etwa 75% der Patienten sind weiblich [Cooper and Stroehla, 2003]. Um diesen Geschlechtsunterschied besser zu verstehen, wurde von Taneja und Kollegen eine transgene Maus entwickelt, die MHC II auf den T-Zellen exprimiert und bei der das Weibchen eine erhöhte Anfälligkeit für Arthritis aufweist [Taneja et al., 2007].

Desweiteren spielt die genetische Komponente beim Menschen eine entscheidende Rolle bei der Induktion von Autoimmunität zu citrullinierten Proteinen: beim Menschen ist der HLA-DR4 Phenotyp in dieser Hinsicht ein besonders wichtiger Risikofaktor [Silman and Pearson, 2002]. Auch im Mausmodell sind die DBA/1 mit dem MHC II Haplotyp H-2q assoziiert und weisen eine erhöhte Anfälligkeit für die CIA auf [Wooley et al., 1981].

Zusammenfassend konnte deutlich die Übertragbarkeit des Mausmodells auf die humane Situation dargelegt werden. Eine Interpretation unserer Ergebnisse für den Menschen erscheint somit möglich. Eine Expression der PADs in den humanen mTECs ist als sehr wahrscheinlich anzunehmen, doch in weiteren Untersuchungen genauer zu klären.

5. Ausblick

In folgenden Studien sollte der Proteinnachweis der PADs etabliert werden. Hierfür stehen verschiedene Optionen zur Verfügung. Zunächst sollte ein Sandwich-ELISA mit anderen Antikörper-Paaren versucht werden, um eine möglichst hohe Sensitivität zu erreichen. Danach wäre sowohl der Proteinnachweis als auch die Citrullinierungsreaktion an sich in histologischen Schnitten des Thymus zu führen. Erst dann könnte ein Modell erarbeitet werden, bei dem die PADs in den mTECs die Negativselektion beeinflussen und an der Pathogenese der RA beteiligt sind.

Weiterhin ist der genaue Mechanismus zu untersuchen, wie die PADs von Aire reguliert werden. Ein erster Schritt wäre hier die Aire-Abhängigkeit der PAD-Expression mit der Chromatin-Immunopräzipitation nachzuweisen.

Inwieweit die Ergebnisse wirklich auf das humane System übertragbar sind, ist in zusätzlichen Studien mit Thymusgewebe von RA-Patienten zu klären.

Welche Rolle die PADs im Thymus in der Pathogenese der RA spielen, bleibt unklar. Doch es wird vermutet, dass die PADs an der Bildung von citrullinierten Epitopen beteiligt sind und die Citrullin-bezogene Epitopausbreitung in der RA infolge einer Neoantigen-Bildung als Konsequenz der entzündlichen Citrullinierung auftritt [Kidd et al., 2008]. Dies wurde in einer Studie von van Willis et al. an DBA-Mäusen, die eine CIA entwickelten, gezeigt. Es konnte mithilfe eines pan-PAD-Inhibitors die Citrullinierung in der Synovia und im Serum, die klinische Krankheitsaktivität und die Antikörperantwort reduziert werden [van Willis et al., 2011]. Sie schlussfolgerten daraus, dass PADs erforderliche Teilnehmer an dem autoimmunen und nachfolgend entzündlichen Prozess der CIA sind und dass der PAD-Inhibitor eine neue Klasse von Krankheits-modifizierenden Mitteln darstellt, welche die pathologische Citrullinierung verhindern könnte [van Willis et al., 2011]. Somit könnten PADs als Zielsubstanz für Medikamente zur Behandlung der RA dienen, welches in weiteren Studien geprüft werden sollte.

6. Literaturverzeichnis

- Aaltonen J., Björnses P., Perheentupa J., Horelli-Kuitunen N., Palotie A., Peltonen L., Su Lee Y., Francis F., Henning S., Thiel C., Leharach H. and Yaspo M.-L.** (1997): An autoimmune disease, APECED, caused by mutations in a novel gene featuring two PHD-type zinc-finger domains. *Nature Genetics*, 17(4):399–403.
- Akiyama T., Shimo Y., Yanai H., Qin J., Ohshima D., Maruyama Y., Asaumi Y., Kitazawa J., Takayanagi H., Penninger J.M., Matsumoto M., Nitta T., Takahama Y. and Inoue J.** (2008): The tumor necrosis factor family receptors RANK and CD40 cooperatively establish the thymic medullary microenvironment and self-tolerance. *Immunity*, 29(3):423–437.
- Aletaha D., Neogi T., Silman A.J., Funovits J., Felson D.T., Bingham III C.O., Birnbaum N.S., Burmester G.R., Bykerk V.P., Cohen M.D., Combe B., Costenbader K.H., Dougados M., Emery P., Ferraccioli G., Hazes J.M.W., Hobbs K., Huizinga T.W.J., Kavanaugh A., Kay J., Kvien T.K., Laing T., Mease P., Ménard H.A., Moreland L.W., Naden R.L., Pincus T., Smolen J.S., Stanislawska-Biernat E., Symmons D., Tak P.P., Upchurch K.S., Vencovský J., Wolfe F. and Hawker G.** (2010): 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 69(9):1580–8.
- Anderson G. and Jenkinson E.J.** (2001): Lymphostromal interactions in thymic development and function. *Nature Reviews Immunology*, 1(1):31–40.
- Anderson G., Partington K.M. and Jenkinson E.J.** (1998): Differential effects of peptide diversity and stromal cell type in positive and negative selection in the thymus. *The Journal of Immunology*. 161(12): 6599-6603.
- Anderson G. and Takahama Y.** (2012): Thymic epithelial cells: working class heroes for T cell development and repertoire selection. *Trends in Immunology*, 33(6):256-263.
- Anderson M.S., Venanzi E.S., Klein L., Chen Z., Berzins S.P., Turley S.J., von Boehmer H., Bronson R., Dierich A., Benoist C. and Mathis D.** (2002): Projection of an Immunological self-shadow within the thymus by the Aire protein. *Science*, 298(5597):1395-1401.
- Asaga H., Nakashima K., Senshu T., Ishigami A. and Yamada M.** (2001): Immunocytochemical localization of peptidylarginine deiminase in human eosinophils and neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology*, 70(1):46–51.
- Aschenbrenner K., D’Cruz L.M., Vollmann E.H., Hinterberger M., Emmerich J., Swee L.K., Rolink A. and Klein L.** (2007): Selection of Foxp3+

regulatory T cells specific for self antigen expressed and presented by Aire+ medullary thymic epithelial cells. *Nature Immunology*, 8(4):351-358.

Aw D., Silva A.B., Maddick M., von Zglinicki T. and Palmer D.B. (2008): Architectural changes in the thymus of aging mice. *Aging Cell*, 7(2):158-167.

Banal F., Dougados M., Combes C. and Gossec L. (2009): Sensitivity and specificity of the American College of Rheumatology 1987 criteria for the diagnosis of rheumatoid arthritis according to disease duration: a systematic literature review and metaanalysis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 68(7):1184–91.

Betterle C., Dal Pra C., Mantero F. and Zanchetta R. (2002): Autoimmune adrenal insufficiency and autoimmune polyendocrine syndromes: autoantibodies, autoantigens, and their applicability in diagnosis and disease prediction. *Endocrine Reviews*, 23(3):327-364.

Bhattacharya S.K., Crabb J.S., Bonilha V.L., Gu X., Takahara H. and Crabb J.W. (2006): Proteomics implicates peptidyl arginine deiminase 2 and optic nerve citrullination in glaucoma pathogenesis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 47(6):2508–2514.

Björnses P., Halonen M., Palvimo J.J., Kolmer M., Aaltonen J., Ellonen P., Perheentupa J., Ulmanen I. and Peltonen L. (2000): Mutations in the AIRE gene: effects on subcellular location and transactivation function of the autoimmune polyendocrinopathycandidiasis-ectodermal dystrophy protein. *The American Journal of Human Genetics*, 66(2):378-92.

Bleul C.C., Corbeaux T., Reuter A., Fisch P., Mönning J.S. and Boehm T. (2006): Formation of a functional thymus initiated by a postnatal epithelial progenitor cell. *Nature*, 441(7096):992–996.

Boyd R.L., Tucek C.L., Godfrey D.I., Izon D.J., Wilson T.J., Davidson N.J., Bean A.G., Ladyman H.M., Ritter M.A. and Hugo P. (1993): The thymic microenvironment. *Immunology Today*, 14(9): 445–459.

Brimnes M.K., Jensen T., Jørgensen T.N., Michelsen B.K., Troelsen J. and Werdelin O. (2002): Low Expression of Insulin in the Thymus of Non-obese Diabetic Mice. *Journal of Autoimmunity*, 19(4):203–213.

Burkhardt H., Sehnert B., Bockermann R., Engström A., Kalden J.R. and Holmdahl R. (2005): Humoral immune response to citrullinated collagen type II determinants in early rheumatoid arthritis. *European Journal of Immunology*, 35(5):1643–1652.

Cantaert T., Teitsma C., Tak P.P. and Baeten D. (2013): Presence and role of anti-citrullinated protein antibodies in experimental arthritis models. *Arthritis & Rheumatism*, 65(4):939–948.

- Chang X., Yamada R., Suzuki A., Sawada T., Yoshino S., Tokuhiko S. and Yamamoto K.** (2005): Localization of peptidylarginine deiminase 4 (PADI4) and citrullinated protein in synovial tissue of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford Journals)*, 44(1):40–50.
- Chapuy-Regaud S., Sebbag M., Baeten D., Clavel C., Foulquier C., De Keyser F. and Serre G.** (2005): Fibrin deimination in synovial tissue is not specific for rheumatoid arthritis but commonly occurs during synovitides. *The Journal of Immunology*, 174(8):5057–5064.
- Chavanas S., Méchin M.C., Takahara H., Kawada A., Nachat R., Serre G. and Simon M.** (2004): Comparative analysis of the mouse and human peptidylarginine deiminase gene clusters reveals highly conserved non-coding segments and a new human gene, PADI6. *Gene*, 330:19–27.
- Chinen T., Volchkov P.Y., Chervonsky A.V. and Rudensky A.Y.** (2010): A critical role for regulatory T cell-mediated control of inflammation in the absence of commensal microbiota. *The Journal of Experimental Medicine*, 207(11):2323–30.
- Cloosen S., Arnold J., Thio M., Bos G.M., Kyewski B. and Germeraad W.T.** (2007): Expression of tumor-associated differentiation antigens, MUC1 glycoforms and CEA, in human thymic epithelial cells: Implications for self-tolerance and tumor therapy. *Cancer Research*, 67(8):3919–3926.
- Costantino C.M., Baecher-Allan C.M. and Hafler D.A.** (2008): Human regulatory T cells and autoimmunity. *European Journal of Immunology*, 38(4):921–924.
- Cooper G.S. and Stroehla B.C.** (2003): The epidemiology of autoimmune diseases. *Autoimmunity Reviews*, 2(3):119–125.
- De Rycke L., Nicholas A.P., Cantaert T., Kruithof E., Echols J.D., Vandekerckhove B., Veys E.M., De Keyser F. and Baeten D.** (2005a): Synovial intracellular citrullinated proteins colocalizing with peptidyl arginine deiminase as pathophysiologically relevant antigenic determinants of rheumatoid arthritis-specific humoral autoimmunity. *Arthritis & Rheumatology*, 52(8):2323–2330.
- De Rycke L., Verhelst X., Kruithof E., Van den Bosch F., Hoffman I.E., Veys E.M. and De Keyser F.** (2005b): Rheumatoid factor, but not anti-cyclic citrullinated peptide antibodies, is modulated by infliximab treatment in rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 64(2):299–302.
- Derbinski J., Gäbler J., Brors B., Tierling S., Jonnakuty S., Hergenahn M., Peltonen L., Walter J. and Kyewski B.** (2005). Promiscuous gene expression in thymic epithelial cells is regulated at multiple levels. *The Journal of Experimental Medicine*, 202(1):33–45.

- Derbinski J., Pinto S., Rösch S., Hexel K. and Kyewski B.** (2008): Promiscuous gene expression patterns in single medullary thymic epithelial cells argue for a stochastic mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(2):657-662.
- Derbinski J., Schulte A., Kyewski B. and Klein L.** (2001): Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nature Immunology*, 2(11):1032–1039.
- Ding B., Padyukov L., Lundström E., Seielstad M., Plenge R.M., Oksenberg J.R., Gregersen P.K., Alfredsson L. and Klareskog L.** (2009): Different patterns of associations with anti-citrullinated protein antibody-positive and anti-citrullinated protein antibody-negative rheumatoid arthritis in the extended major histocompatibility complex region. *Arthritis & Rheumatism*, 60(1):30–38.
- Donate P.B., Fornari T.A., Junta C.M., Magalhães D.A., Macedo C., Cunha T.M., Nguyen C., Cunha F.Q. and Passos G.A.** (2011): Collagen induced arthritis (CIA) in mice features regulatory transcriptional network connecting major histocompatibility complex (MHC H2) with autoantigen genes in the thymus. *Immunobiology*, 216(5):591-603.
- Douek D.C., McFarland R.D., Keiser P.H., Gage E.A., Massey J.M., Haynes B.F., Polis M.A., Haase A.T., Feinberg M.B., Sullivan J.L., Jamieson B.D., Zack J.A., Picker L.J. and Koup R.A.** (1998): Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature*, 396(6712):690–695.
- Dumont-Lagacé M., Brochu S., St-Pierre C. and Perreault C.** (2014): Adult thymic epithelium contains nonsenescent label-retaining cells. *The Journal of Immunology*, 192(5):2219-26.
- Engelmann R. und Müller-Hilke B.** (2009): Antikörper gegen citrullinierte Peptide in der Klinik und in der Forschung. *Zeitschrift für Rheumatologie*, 68(6):485-490.
- Fontenot J.D., Gavin M.A. and Rudensky A.Y.** (2003): Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nature Immunology*, 4(4):330–336.
- Foulquier C., Sebbag M., Clavel C., Chapuy-Regaud S., Al Badine R., Méchin M.C., Vincent C., Nachat R., Yamada M., Takahara H., Simon M., Guerrin M. and Serre G.** (2007): Peptidyl Arginine Deiminase Type 2 (PAD-2) and PAD-4 but Not PAD-1, PAD-3, and PAD-6 Are Expressed in Rheumatoid Arthritis Synovium in Close Association With Tissue Inflammation. *Arthritis & Rheumatism*, 56(11):3541–3553.
- Fugger L., Rothbard J.B. and Sonderstrup-McDevitt G.** (1996): Specificity of an HLA-DRB1*0401- restricted T cell response to type II collagen. *European Journal of Immunology*, 26(4):928-933.

- Gäbler J., Arnold J. and Kyewski B.** (2007): Promiscuous gene expression and the developmental dynamics of medullary thymic epithelial cells. *European Journal of Immunology*, 37(12):3363-72.
- Gabriel S.E.** (2001): The epidemiology of rheumatoid arthritis. *Rheumatic Disease Clinics of North America*, 27(2):269–81.
- Gallegos A.M. and Bevan M.J.** (2004): Central tolerance to tissue-specific antigens mediated by direct and indirect antigen presentation. *The Journal of Experimental Medicine*, 200(8):1039-1049.
- Gardner J.M., DeVoss J.J., Friedman R.S., Wong D.J., Tan Y.X., Zhou X., Johannes K.P., Su M.A., Chang H.Y., Krummel M.F. and Anderson M.S.** (2008): Deletional tolerance mediated by extrathymic Aire-expressing cells. *Science*, 321(5890):843-7.
- Gaub V., Grünewald J., Gorney V., Deaton L.M., Kang M., Bursulaya B., Ou W., Lerner R.A., Schmedt C., Geierstanger B.H., Schultz P.G. and Ramirez-Montagutet T.** (2011): Loss of CD4 T-cell-dependent tolerance to proteins with modified amino acids. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 108(31):12821–12826.
- Gillard G.O., Dooley J., Erickson M., Peltonen L. and Farr A.G.** (2007): Aire-dependent alterations in medullary thymic epithelium indicate a role for Aire in thymic epithelial differentiation. *The Journal of Immunology*, 178(5):3007–3015.
- Gillard G.O. and Farr A.G.** (2006): Features of medullary thymic epithelium implicate postnatal development in maintaining epithelial heterogeneity and tissue-restricted antigen expression. *The Journal of Immunology*, 176(10):5815-5824.
- Gossens K., Naus S., Holländer G.A. and Ziltener H.J.** (2010): Deficiency of the metalloproteinase-disintegrin ADAM8 is associated with thymic hypercellularity. *PLoS One*, 5(9):e12766.
- Gray D., Abramson J., Benoist C. and Mathis D.** (2007): Proliferative arrest and rapid turnover of thymic epithelial cells expressing Aire. *The Journal of Experimental Medicine*, 204(11):2521–2528.
- Gray D.H., Seach N., Ueno T., Milton M.K., Liston A., Lew A.M., Goodnow C.C. and Boyd R.L.** (2006): Developmental kinetics, turnover, and stimulatory capacity of thymic epithelial cells. *Blood*, 108(12):3777-85.
- Gregersen P.K., Silver J. and Winchester R.J.** (1987): The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 30(11):1205–13.

- Guerrin M., Ishigami A., Méchin M.C., Nachat R., Valmary S., Sebbag M., Simon M., Senshu T. and Serre G.** (2003): cDNA cloning, gene organization and expression analysis of human peptidylarginine deiminase type I. *Biochemical Journal*, 370(Pt1):167–174.
- György B., Tóth E., Tarcsa E., Falus A., Buzás E.I.** (2006): Citrullination: a posttranslational modification in health and disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 38(10):1662-77.
- Hale J.S., Boursalian T.E., Turk G.L. and Fink P.J.** (2006): Thymic output in aged mice. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 103(22):8447–8452.
- Hale L.P. and Markert M.L.** (2004): Corticosteroids regulate epithelial cell differentiation and Hassall body formation in the human thymus. *The Journal of Immunology*, 172(1): 617–624.
- Halonen M., Eskelin P., Myhre A.G., Perheentupa J., Husebye E.S., Kämpe O., Rorsman F., Peltonen L., Ullmanen I. and Partanen J.** (2002): AIRE mutations and human leukocyte antigen genotypes as determinants of the autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy phenotype. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 87(6):2568–2574.
- Hamazaki Y., Fujita H., Kobayashi T., Choi Y., Scott H.S., Matsumoto M. and Minato N.** (2007): Medullary thymic epithelial cells expressing Aire represent a unique lineage derived from cells expressing claudin. *Nature Immunology*, 8(3):304-311.
- Holmdahl R., Jansson L. and Andersson M.** (1986): Female sex hormones suppress development of collagen-induced arthritis in mice. *Arthritis & Rheumatology*, 29(12):1501-9.
- Holmdahl R., Jansson L., Andersson M. and Larsson E.** (1988): Immunogenetics of type II collagen autoimmunity and susceptibility to collagen arthritis. *Immunology*, 65(2):305-10.
- Hori S., Nomura T. and Sakaguchi S.** (2003): Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*, 299(5609):1057-1061.
- Hubert F.X., Kinkel S.A., Davey G.M., Phipson B., Mueller S.N., Liston A., Proietto A.I., Cannon P.Z.F., Forehan S., Smyth G.K., Wu L., Goodnow C.C., Carbone F.R., Scott H.S. and Heath W.R.** (2011): Aire regulates the transfer of antigen from mTECs to dendritic cells for induction of thymic tolerance. *Blood*, 118(9):2462–2472.
- Huseby E.S., White J., Crawford F., Vass T., Becker D., Pinilla C., Marrack P. and Kappler J.W.** (2005): How the T cell repertoire becomes peptide and MHC specific. *Cell*, 122(2):247–260.

- Ignatowicz L., Kappler J. and Marrack P.** (1996): The repertoire of T cells shaped by a single MHC/peptide ligand. *Cell*, 84(4):521–529.
- Irla M., Hugues S., Gill J., Nitta T., Hikosaka Y., Williams I.R., Hubert F.X., Scott H.S., Takahama Y., Holländer G.A. and Reith W.** (2008): Autoantigen-specific interactions with CD4+ thymocytes control mature medullary thymic epithelial cell cellularity. *Immunity*, 29(3):451–463.
- Ishida-Yamamoto A., Senshu T., Eady R.A.J., Takahashi H., Shimizu H., Akiyama M. and Iizuka H.** (2002): Sequential reorganization of cornified cell keratin filaments involving filaggrin-mediated compaction and keratin 1 deimination. *Journal of Investigative Dermatology*, 118(2):282–287.
- Ishigami A., Ohsawa T., Hiratsuka M., Taguchi H., Kobayashi S., Saito Y., Murayama S., Asaga H., Toda T., Kimura N. and Maruyama N.** (2005): Abnormal accumulation of citrullinated proteins catalyzed by peptidylarginine deiminase in hippocampal extracts from patients with Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience Research*, 80(1):120–128.
- Janeway C.A., Travers P., Walport M. and Shlomchik M.J.** (2001): Immunobiology 5th edition: The Immune System in Health and Disease. *Garland Science*, New York.
- Jawaheer D. and Gregersen P.K.** (2002): Rheumatoid arthritis. The genetic components. *Rheumatic Disease Clinics of North America*, 28(1):1–15.
- Kabelitz D. und Schreiber S.** (2009): Autoimmunität. Physiologische Kontrollmechanismen und Wege zur Autoimmunerkrankung. *Der Internist*, 50(3):267–275.
- Kanno T., Kawada A., Yamanouchi J., Yosida-Noro C., Yoshiki A., Shiraiwa M., Kusakabe M., Manabe M., Tezuka T. and Takahara H.** (2000): Human peptidylarginine deiminase type III: molecular cloning and nucleotide sequence of the cDNA, properties of the recombinant enzyme, and immunohistochemical localization in human skin. *Journal of Investigative Dermatology*, 115(5):813–823.
- Kidd B.A., Ho P.P., Sharpe O., Zhao X., Tomooka B.H., Kanter J.L., Steinman L. and Robinson W.H.** (2008): Epitope spreading to citrullinated antigens in mouse models of autoimmune arthritis and demyelination. *Arthritis & Research Therapy*, 10(5):R119.
- Kinloch A., Lundberg K., Wait R., Wegner N., Lim N.H., Zendman A.J., Saxne T., Malmström V. and Venables P.J.** (2008): Synovial fluid is a site of citrullination of autoantigens in inflammatory arthritis. *Arthritis & Rheumatology*, 58(8): 2287–2295.
- Kinloch A., Tatzer V., Wait R., Peston D., Lundberg K., Donatien P., Moyes D., Taylor P.C. and Venables P.J.** (2005): Identification of citrullinated

alpha-enolase as a candidate autoantigen in rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy*, 7(6):R1421–R1429.

Kjellén P., Brunsberg U., Broddefalk J., Hansen B., Vestberg M., Ivarsson I., Engström A., Svejgaard A., Kihlberg J., Fugger L. and Holmdahl R. (1998): The structural basis of MHC control of collagen-induced arthritis; binding of the immunodominant type II collagen 256-270 glycopeptide to H-2Aq and H-2Ap molecules. *European Journal of Immunology*, 28(2): 755-767.

Klareskog L., Rönnelid J., Lundberg K., Padyukov L. and Alfredsson L. (2008): Immunity to citrullinated proteins in rheumatoid arthritis. *Annual Review of Immunology*, 26:651-675.

Klareskog L., Stolt P., Lundberg K., Källberg H., Bengtsson C., Grunewald J., Rönnelid J., Harris H.E., Ulfgren A.K., Rantapää-Dahlqvist S., Eklund A., Padyukov L. and 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 & Rheumatology*, 54(1):38–46.

Klein L. and Jovanovic K. (2011): Regulatory T cell lineage commitment in the thymus. *Seminars in Immunology*, 23(6):401–409.

Koble C. and Kyewski B. (2009): The thymic medulla: a unique microenvironment for intercellular self-antigen transfer. *The Journal of Experimental Medicine*, 206(7):1505-1513.

Kroot E.J., de Jong B.A., van Leeuwen M.A., Swinkels H., van den Hoogen F.H., van't Hof M., van de Putte L.B., van Rijswijk M.H., Venrooij W.J. and van Riel P.L. (2000): The prognostic value of anti-cyclic citrullinated peptide antibody in patients with recent-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatology*, 43(8):1831–1835.

Kuroda N., Mitani T., Takeda N., Ishimaru N., Arakaki R., Hayashi Y., Bando Y., Izumi K., Takahashi T., Nomura T., Sakaguchi S., Ueno T., Takahama Y., Uchida D., Sun S., Kajiura F., Mouri Y., Han H., Matsushima A., Yamada G. and Matsumoto M. (2005): Development of autoimmunity against transcriptionally unrepressed target antigen in the thymus of Aire-deficient mice. *The Journal of Immunology*, 174(4):1862-70.

Kyewski B. and Derbinski J. (2004): Self-representation in the thymus: an extended view. *Nature Reviews Immunology*, 4(9):688–698.

Kyewski B. and Klein L. (2006): A central role for central tolerance. *Annual Review of Immunology*, 24:571–606.

Lee H.S., Lee A.T., Criswell L.A., Seldin M.F., Amos C.I., Carulli J.P., Navarrete C., Remmers E.F., Kastner D.L., Plenge R.M., Li W. and Gregersen P.K. (2008): Several regions in the major histocompatibility

complex confer risk for anti-CCP antibody positive rheumatoid arthritis, independent of the DRB1 locus. *Molecular Medicine*, 14(5–6):293–300.

- Li L., Hsu H.C., Grizzle W.E., Stockard C.R., Ho K.J., Lott P., Yang P.A., Zhang H.G. and Mountz J.D.** (2003): Cellular mechanism of thymic involution. *Scandinavian Journal of Immunology*, 57(5):410–422.
- Liston A., Lesage S., Wilson J., Peltonen L. and Goodnow C.C.** (2003): Aire regulates negative selection of organ-specific T cells. *Nature Immunology*, 4(4):350–354.
- Liu Y.L., Tsai I.C., Chang C.W., Liao Y.F., Liu G.Y. and Hung H.C.** (2013): Functional roles of the non-catalytic calcium-binding sites in the N-terminal domain of human peptidylarginine deiminase 4. *PLoS One*, 8(1):e51660.
- Makrygiannakis D., af Klint E., Lundberg I.E., Löfberg R., Ulfgren A.K., Klareskog L. and Catrina A.I.** (2006): Citrullination is an inflammation-dependent process. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 65(9):1219–1222.
- Masson-Bessière C., Sebbag M., Girbal-Neuhauser E., Nogueira L., Vincent C., Senshu T. and Serre G.** (2001): The major synovial targets of the rheumatoid arthritis-specific antifilaggrin autoantibodies are deaminated forms of the alpha- and beta-chains of fibrin. *The Journal of Immunology*, 166(6):4177–4184.
- McCaughy T.M., Wilken M.S. and Hogquist K.A.** (2007): Thymic emigration revisited. *The Journal of Experimental Medicine*, 204(11):2513–2520.
- Metzger T.C. and Anderson M.S.** (2011): Control of central and peripheral tolerance by Aire. *Immunological Reviews*, 241(1):89–103.
- Michels G. und Schneider T.** (2010): *Klinikmanual Innere Medizin*. Springer Verlag, Berlin, 557–560.
- Millet V., Naquet P. and Guinamard R.R.** (2008): Intercellular MHC transfer between thymic epithelial and dendritic cells. *European Journal of Immunology*, 38(5):1257–1263.
- Mjaavatten M.D. and Bykerk V.P.** (2013): Early rheumatoid arthritis: the performance of the 2010 ACR/EULAR criteria for diagnosing RA. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 27(4):451–466.
- Moscarello M.A., Wood D.D., Ackerley C. and Boulias C.** (1994): Myelin in multiple sclerosis is developmentally immature. *The Journal of Clinical Investigation*, 94(1):146–154.
- Nachat R., Méchin M.C., Charveron M., Serre G., Constans J. and Simon M.** (2005): Peptidylarginine deiminase isoforms are differentially expressed in the anagen hair follicles and other human skin appendages. *Journal of Investigative Dermatology*, 125(1):34–41.

- Nagamine K., Peterson P., Scott H.S., Kudoh J., Minoshima S., Heino M., Krohn K.J., Lalioti M.D., Mullis P.E., Antonarakis S.E., Kawasaki K., Asakawa S., Ito F. and Shimizu N.** (1997): Positional cloning of the APECED gene. *Nature Genetics*, 17(4):393–398.
- Nakashima K., Hagiwara T. and Yamada M.** (2002): Nuclear localization of peptidylarginine deiminase V and histone deimination in granulocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(51):49562–49568.
- Nakayama M., Babaya N., Miao D., Sikora K., Elliott J.F. and Eisenbarth G.S.** (2005): Thymic expression of mutated B16: A preproinsulin messenger RNA does not reverse acceleration of NOD diabetes associated with insulin 2 (thymic expressed insulin) knockout. *Journal of Autoimmunity*, 25(3):193-198.
- Nakayama-Hamada M., Suzuki A., Kubota K., Takazawa T., Ohsaka M., Kawaida R., Ono M., Kasuya A., Furukawa H., Yamada R. and Yamamoto K.** (2005): Comparison of enzymatic properties between hPADI2 and hPADI4. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 327(1):192–200.
- Nielen M.M., van Schaardenburg D., Reesink H.W., van de Stadt R.J., van der Horst-Bruinsma I.E., de Koning M.H., Habibuw M.R., Vandenbroucke J.P. and Dijkmans B.A.** (2004): Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. *Arthritis & Rheumatology*, 50(2):380–86.
- Nitta T., Murata S., Sasaki K., Fujii H., Ripen A.M., Ishimaru N., Koyasu S., Tanaka K. and Takahama Y.** (2010): Thymoproteasome shapes immunocompetent repertoire of CD8+ T cells. *Immunity*, 32(1):29–40.
- Ortman C.L., Dittmar K.A., Witte P.L. and Le P.T.** (2002): Molecular characterization of the mouse involuted thymus: aberrations in expression of transcription regulators in thymocyte and epithelial compartments. *International Immunology*, 14(7):813–822.
- Patel D.D., Whichard L.P., Radcliff G., Denning S.M. and Haynes B.F.** (1995): Characterization of human thymic epithelial cell surface antigens: phenotypic similarity of thymic epithelial cells to epidermal keratinocytes. *Journal of Clinical Immunology*, 15(2):80–92.
- Pedersen M., Jacobsen S., Garred P., Madsen H.O., Klarlund M., Svejgaard A., Pedersen B.V., Wohlfahrt J. and Frisch M.** (2007): Strong combined gene-environment effects in anti-cyclic citrullinated peptidepositive rheumatoid arthritis: a nationwide case-control study in Denmark. *Arthritis & Rheumatology*, 56(5):1446–53.
- Pitkänen J., Rebane A., Rowell J., Murumägi A., Ströbel P., Möll K., Saare M., Heikkilä J., Doucas V., Marx A. and Peterson P.** (2005): Cooperative activation of transcription by autoimmune regulator AIRE and CBP. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 333(3):944-53.

- Pitkänen J., Doucas V., Sternsdorf T., Nakajima T., Aratani S., Jensen K., Will H., Vähämurto P., Ollila J., Vihinen M., Scott H.S., Antonarakis S.E., Kudoh J., Shimizu N., Krohn K. and Peterson P.** (2000): The autoimmune regulator protein has transcriptional transactivating properties and interacts with the common coactivator CREB-binding protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(22):16802-9.
- Pitkänen J., Vähämurto P., Krohn K. and Peterson P.** (2001): Subcellular localization of the autoimmune regulator protein. Characterization of nuclear targeting and transcriptional activation domain. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(22):19597-602.
- Pöllinger B.** (2012): IL-17 producing T cells in mouse models of multiple sclerosis and rheumatoid arthritis. *Journal of Molecular Medicine*, 90(6):613–624.
- Prete M., Racanelli V., Digiglio L., Vacca A., Dammacco F. and Perosa F.** (2011): Extra-articular manifestations of rheumatoid arthritis: An update. *Autoimmunity Reviews*, 11(2):123–131.
- Renaudineau Y., Jamin C., Saraux A. and Youinou P.** (2005): Rheumatoid factor on a daily basis. *Autoimmunity*, 38(1):11–16.
- Riley J.L. and June C.H.** (2005): The CD28 family: a T-cell rheostat for therapeutic control of T-cell activation. *Blood*, 105(1):13–21.
- Rink L., Kruse A. und Haase H.** (2012): Immunologie für Einsteiger. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Ripen A.M., Nitta T., Murata S., Tanaka K. and Takahama Y.** (2011): Ontogeny of thymic cortical epithelial cells expressing the thymoproteasome subunit beta5t. *European Journal of Immunology*, 41(5):1278–1287.
- Ritter M.A. and Palmer D.B.** (1999): The human thymic microenvironment: new approaches to functional analysis. *Seminars in Immunology*, 11(1):13–21.
- Román E., Shino H., Qin F.X. and Liu Y.J.** (2010): Cutting edge: hematopoietic-derived APCs select regulatory T cells in thymus. *The Journal of Immunology*, 185(7):3819-3823.
- Rönnelid J., Wick M.C., Lampa J., Lindblad S., Nordmark B., Klareskog L. and van Vollenhoven R.F.** (2005): Longitudinal analysis of anticitrullinated protein/peptide antibodies (anti-CP) during 5 year follow-up in early rheumatoid arthritis: anti-CP status is a stable phenotype that predicts worse disease activity and greater radiological progression. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 64(12):1744–1749.
- Rosloniec E.F., Brand D.D., Myers L.K., Esaki Y., Whittington K.B., Zaller D.M., Woods A., Stuart J.M. and Kang A.H.** (1998): Induction of

autoimmune arthritis in HLA-DR4 (DRB1*0401) transgenic mice by immunization with human and bovine type II collagen. *The Journal of Immunology*, 160(6):2573-2578.

Rosloniec E.F., Brand D.D., Myers L.K., Whittington K.B., Gumanovskaya M., Zaller D.M., Woods A., Altmann D.M., Stuart J.M. and Kang A.H. (1997): An HLA-DR1 transgene confers susceptibility to collagen-induced arthritis elicited with human type II collagen. *The Journal of Experimental Medicine*, 185(6):1113-1122.

Rosloniec E.F., Whittington K.B., Brand D.D., Myers L.K. and Stuart J.M. (1996): Identification of MHC class II and TCR binding residues in the type II collagen immunodominant determinant mediating collagen-induced arthritis. *Cellular Immunology*, 172(1):21-28.

Rossi S.W., Jenkinson W.E., Anderson G. and Jenkinson E.J. (2006): Clonal analysis reveals a common progenitor for thymic cortical and medullary epithelium. *Nature*, 441(7096):988–991.

Rossi S.W., Kim M.Y., Leibbrandt A., Parnell S.M., Jenkinson W.E., Glanville S.H., McConnell F.M., Scott H.S., Penninger J.M., Jenkinson E.J., Lane P.J. and Anderson G. (2007): RANK signals from CD4(+)3(-) inducer cells regulate development of Aire-expressing epithelial cells in the thymic medulla. *The Journal of Experimental Medicine*, 204(6):1267-72.

Rothenberg E.V., Moore J.E. and Yui M.A. (2008): Launching the T cell-lineage developmental programme. *Nature Reviews Immunology*, 8(1):9–21.

Rus'd A.A., Ikejiri Y., Ono H., Yonekawa T., Shiraiwa M., Kawada A. and Takahara H. (1999): Molecular cloning of cDNAs of mouse peptidylarginine deiminase type I, type III and type IV, and the expression pattern of type I in mouse. *European Journal of Biochemistry*, 259(3):660–669.

Sakaguchi S., Yamaguchi T., Nomura T. and Ono M. (2008): Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*, 133(5):775-87.

Sakaguchi S., Sakaguchi N., Asano M., Itoh M. and Toda M. (1995): Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *The Journal of Immunology*, 155(3):1151-1164.

Scalpinio K.J. and Daikh D.I. (2008): CTLA-4: a key regulatory point in the control of autoimmune disease. *Immunological Reviews*, 223(1):143–155.

Schild, T.A. (Vers. 2.1): Einführung in die Real-Time TaqMan™ PCR-Technologie. Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt.

Seki N., Sudo Y., Mizuhara H., Orito K., Imasaki A., Ono S., Hamaoka T., Senoh H. and Fujiwara H. (1992): Type II collagen-induced murine arthritis:

induction of arthritis depends on antigenpresenting cell function as well as susceptibility of host to an anticollagen immune response. *The Journal of Immunology*, 148(10):3093-9.

- Sempowski G.D., Gooding M.E., Liao H.X., Le P.T. and Haynes B.F.** (2002): T cell receptor excision circle assessment of thymopoiesis in aging mice. *Molecular Immunology*, 38(11):841–848.
- Shakib S., Desanti G.E., Jenkinsin W.E., Parnell S.M., Jenkinson E.J. and Anderson G.** (2009): Checkpoints in the development of thymic cortical epithelial cells. *The Journal of Immunology*, 182(1):130-137.
- Silman A.J., Newman J. and MacGregor A.J.** (1996): Cigarette smoking increases the risk of rheumatoid arthritis: results from a nationwide study of disease-discordant twins. *Arthritis & Rheumatology*, 39(5):732–35.
- Silman A.J. and Pearson J.E.** (2002): Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. *Arthritis Research*, 4(Suppl 3):S265–72.
- Soares M.B., Schon E., Henderson A., Karathanasis S.K., Cate R., Zeitlin S., Chirgwin J. and Efstratiadis A.** (1985): RNA-mediated gene duplication: the rat preproinsulin I gene is a functional retroposon. *Molecular and Cell Biology*, 5(8):2090–2103.
- Stolt P., Bengtsson C., Nordmark B., Lindblad S., Lundberg I., Klareskog L. and Alfredsson L.** (2003): Quantification of the influence of cigarette smoking on rheumatoid arthritis: results from a population based case-control study, using incident cases. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 62(9):835–41.
- St-Pierre C., Brochu S., Vanegas J.R., Dumont-Lagacé M., Lemieux S. and Perreault C.** (2013): Transcriptome sequencing of neonatal thymic epithelial cells. *Scientific Reports*, 3:1860.
- Tada Y., Ho A., Koh D.R. and Mak T.W.** (1996): Collagen-induced arthritis in CD4- or CD8-deficient mice: CD8+ T cells play a role in initiation and regulate recovery phase of collagen-induced arthritis. *The Journal of Immunology*, 156(11):4520-6.
- Takahama Y., Tanaka K. and Murata S.** (2008): Modest cortex and promiscuous medulla for thymic repertoire formation. *Trends in Immunology*, 29(6):251-5.
- Taneja V., Behrens M., Mangalam A., Griffiths M.M., Luthra H.S. and David C.S.** (2007): New humanized HLA-DR4-transgenic mice that mimic the sex bias of rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 56(1):69–78.
- Taubert R., Schwendemann J. and Kyewski B.** (2007): Highly variable expression of tissue-restricted self-antigens in human thymus: Implications for self-tolerance and autoimmunity. *European Journal of Immunology*, 37(3):838–848.

- Uhlig T., Hagen K.B. and Kvien T.K.** (1999): Current tobacco smoking, formal education, and the risk of rheumatoid arthritis. *The Journal of Rheumatology*, 26(1):47–54.
- Urano Y., Watanabe K., Sakaki A., Arase S., Watanabe Y., Shigemi F., Takeda K., Akiyama K. and Senshu T.** (1990): Immunohistochemical demonstration of peptidylarginine deiminase in human sweat glands. *The American Journal of Dermatopathology*, 12(3):249-55.
- Vafiadis P., Bennett S.T., Todd J.A., Nadeau J., Grabs R., Goodyer C.G., Wickramasinghe S., Colle E. and Polychronakos C.** (1997): Insulin expression in human thymus is modulated by INS VNTR alleles at the IDDM2 locus. *Nature Genetics*, 15(3):289–292.
- van Boekel M.A., Vossenar E.R., van den Hoogen F.H. and van Venrooij W.J.** (2002): Autoantibody systems in rheumatoid arthritis: specificity, sensitivity and diagnostic value. *Arthritis Research*, 4(2):87-93.
- van der Helm-van Mil A.H., Verpoort K.N., Breedveld F.C., Toes R.E. and Huizinga T.W.** (2005): Antibodies to citrullinated proteins and differences in clinical progression of rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapie*, 7(5):R949–58.
- van der Helm-van Mil A.H., Verpoort K.N., le Cessie S., Huizinga T.W., de Vries R.R. and Toes R.E.** (2007): The HLA-DRB1 shared epitope alleles differ in the interaction with smoking and predisposition to antibodies to cyclic citrullinated peptide. *Arthritis & Rheumatism*, 56(2):425–32.
- van Gaalen F.A., Linn-Rasker S.P., van Venrooij W.J., de Jong B.A., Breedveld F.C., Verweij C.L., Toes R.E. and Huizinga T.W.** (2004): Autoantibodies to cyclic citrullinated peptides predict progression to rheumatoid arthritis in patients with undifferentiated arthritis: a prospective cohort study. *Arthritis & Rheumatism*, 50(3):709–15.
- van Willis C., Gizinski A.M., Banda N.K., Causey C.P., Knuckley B., Cordova K.N., Luo Y., Levitt B., Glogowska M., Chandra P., Kulik L., Robinson W.H., Arend W.P., Thompson P.R. and Holers V.M.** (2011): N- α -benzoyl-N⁵-(2-Chloro-1-Iminoethyl)-L-ornithine amide, a protein arginine deiminase inhibitor, reduces the severity of murine collagen-induced arthritis. *The Journal of Immunology*, 186(7):4396–4404.
- Venanzi E.S., Gray D.H., Benoist C. and Mathis D.** (2007): Lymphotoxin pathway and Aire influences on thymic medullary epithelial cells are unconnected. *The Journal of Immunology*, 179(9):5693-700.
- Venanzi E.S., Melamed R., Mathis D. and Benoist C.** (2008): The variable immunological self: genetic variation and nongenetic noise in Aire-regulated transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 105(41):15860-15865.

- Vignali D.A., Collison L.W. and Workman C.J.** (2008): How regulatory T cells work. *Nature Reviews Immunology*, 8(7):523–532.
- Vossenaar E.R., Després N., Lapointe E., van der Heijden A., Lora M., Senshu T., van Venrooij W.J. and Ménard H.A.** (2004a): Rheumatoid arthritis specific anti-Sa antibodies target citrullinated vimentin. *Arthritis Research & Therapy*, 6(2):R142–R150.
- Vossenaar E.R., Nijenhuis S., Helsen M.M., van der Heijden A., Senshu T., van den Berg W.B., van Venrooij W.J. and Joosten L.A.** (2003a): Citrullination of synovial proteins in murine models of rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatology*, 48(9):2489–2500.
- Vossenaar E.R., Radstake T.R., van der Heijden A., van Mansum M.A., Dieteren C., de Rooij D.J., Barrera P., Zendman A.J. and van Venrooij W.J.** (2004b): Expression and activity of citrullinating peptidylarginine deiminase enzymes in monocytes and macrophages. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 63(4):373–381.
- Vossenaar E.R., Smeets T.J., Kraan M.C., Raats J.M., van Venrooij W.J. and Tak P.P.** (2004c): The presence of citrullinated proteins is not specific for rheumatoid synovial tissue. *Arthritis & Rheumatology*, 50(11):3485–3494.
- Vossenaar E.R., Zendman A.J., van Venrooij W.J. and Pruijn G.J.** (2003b): PAD, a growing family of citrullinating enzymes: genes, features and involvement in disease. *BioEssays*, 25(11):1106–1118.
- Watanabe K., Akiyama K., Hikichi K., Ohtsuka R., Okuyama A. and Senshu T.** (1988): Combined biochemical and immunochemical comparison of peptidylarginine deiminases present in various tissues. *Biochimica et Biophysica Acta*, 966(3):375–383.
- Watanabe K. and Senshu T.** (1989): Isolation and characterization of cDNA clones encoding rat skeletal muscle peptidylarginine deiminase. *The Journal of Biological Chemistry*, 264(26):15255–15260.
- Wegner N., Lundberg K., Kinloch A., Fisher B., Malmström V., Feldmann M. and Venables P.J.** (2010): Autoimmunity to specific citrullinated proteins gives the first clues to the etiology of rheumatoid arthritis. *Immunological Reviews*, 233(1):34–54.
- Wentworth B.M., Schaefer I.M., Villa-Komaroff L. and Chirgwin J.M.** (1986): Characterization of the two nonallelic genes encoding mouse preproinsulin. *Journal of Molecular Evolution*, 23(4):305–312.
- Wooley P.H., Luthra H.S., Stuart J.M. and David C.S.** (1981): Type II collagen-induced arthritis in mice. I. Major histocompatibility complex (I region) linkage and antibody correlates. *The Journal of Experimental Medicine*, 154(3):688–700.

- Yi H., Zhen Y., Jiang L., Zheng J. and Zhao Y.** (2006): The phenotypic characterization of naturally occurring regulatory CD4+CD25+ T cells. *Cellular & Molecular Immunology*, 3(3):189–195.
- Zendman A.J., Vossenaar E.R. and van Venrooij W.J.** (2004): Autoantibodies to citrullinated (poly)peptides: a key diagnostic and prognostic marker for rheumatoid arthritis. *Autoimmunity*, 37(4):295–9.
- Zheng Y. and Rudensky A.Y.** (2007): Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. *Nature Immunology*, 8(5):457–462.

Thesen

1. Die Ergebnisse sprechen für eine annähernd gleiche Größe der Thymi, da die T-Zellen in den untersuchten Mausstämmen eine vergleichbare Anzahl aufwiesen.
2. Die mTECs sind an der Eliminierung von autoreaktiven T-Zellen beteiligt. Im Mausstammvergleich wiesen die DBA/1 Mäuse signifikant erniedrigte mTEC-Zahlen auf. Als Auswirkung ist eine ineffiziente Negativselektion denkbar, bei der vermehrt autoreaktive T-Zellen entkommen könnten. Dies könnte zur CIA-Anfälligkeit der DBA/1 Mäuse beitragen.
3. Die Sortierung der TECs mit Hilfe der Durchflusszytometrie zeigte eine hohe CD80-Expression bei den reifen mTECs und eine niedrige CD80-Expression bei den unreifen mTECs. Die Reanalyse bestätigte eine hohe Reinheit der Proben.
4. Die PAD-Expression konnte in den mTECs nachgewiesen werden. In den reifen mTECs waren die PAD-Gene signifikant höher exprimiert als in den unreifen mTECs.
5. Im Stamm der DBA/1 wurde eine signifikant erhöhte PAD-Expression im Vergleich zu den NMRI und den BL6 nachgewiesen. Dies könnte für eine gesteigerte Bildung von PADs sprechen und zu einer vermehrten Citrullinierung von Proteinen führen.
6. Die promiske Genexpression ist eine wichtige Funktion der reifen mTECs. Als Beispiel wird oft das Insulingen genannt, welches Aire-abhängig exprimiert wird. Dies wurde in unseren Untersuchungen durch eine positive Korrelation bestätigt.
7. Auch bei den PADs konnte eine positive Korrelation zu Aire in den mTECs nachgewiesen werden. Dies legt nahe, dass die PAD-Gene wahrscheinlich auch Aire-abhängig exprimiert werden.
8. In weiteren Studien sollten der Nachweis der PADs und der Citrullinierung auf Proteinebene erfolgen. Die Expression von PADs und die Existenz der Citrullinierung wären eine Grundvoraussetzung für die Negativselektion im Thymus.

Danksagung

Ich möchte mich hiermit bei Frau Prof. Dr. med. Brigitte Müller-Hilke vom Institut für Immunologie der Universität Rostock bedanken, die mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit unter ihrer Leitung durchzuführen.

Herrn Dr. rer. nat. Robby Engelmann danke ich ganz besonders für die Themastellung, die hervorragende Betreuung und seine ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft. Auch für die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens möchte ich mich herzlich bedanken.

Einen Dank auch an die gesamte Arbeitsgruppe für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, viele wertvolle Anregungen und stete Hilfsbereitschaft, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei meinen Eltern möchte ich mich besonders herzlich für die uneingeschränkte, liebevolle und vielseitige Unterstützung während meines Studiums bedanken, ohne die diese Arbeit so nicht möglich gewesen wäre.

Ein letzter Dank geht an meinen Sohn und meinen Freund, die mir durch ihre Liebe und ihr Vertrauen viel Kraft gegeben haben.