

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV
Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke
Ludwig-Maximilians-Universität München
Sektion für Rheumatologie und Klinische Immunologie
Leiter: Prof. Dr. med. Hendrik Schulze-Koops

Histonmodifikationen in den Genloki RORC und IL17 bei Patienten mit rheumatoider Arthritis

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der
Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Simon Herrmann
aus
Karlsruhe
2017

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. H. Schulze-Koops

Mitberichterstatter: PD Matthias Grünke
PD Matthias Witt

Mitbetreuung durch die
promovierte Mitarbeiterin: PD Dr. Alla Skapenko

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 23.11.2017

1. Inhaltsverzeichnis

1. Inhaltsverzeichnis	3
2. Einleitung.....	5
2.1. T-Helferzellen – Schlüsselfunktion im adaptiven Immunsystem.....	5
2.2. Das Th1/Th2-Schema	6
2.3. Th17-Zellen	8
2.4. Th9-Zellen	10
2.5. Th22-Zellen und regulatorische T-Zellen.....	12
2.6. Plastizität der T-Helferzellen.....	13
2.7. Epigenetische Modifikationen.....	14
2.7.1. Die Rolle der Epigenetik in der Entwicklung der T-Zellen	14
2.7.2. Epigenetische Veränderungen in der rheumatoiden Arthritis	16
2.8. CNS-Regionen.....	18
2.9. Die rheumatoide Arthritis.....	19
2.9.1. Epidemiologie	19
2.9.2. Klinische Manifestation und Diagnostik.....	19
2.9.3. Pathogenese.....	21
2.9.4. Therapie.....	23
3. Zielsetzung der Dissertation.....	26
4. Materialien.....	27
4.1. Verwendete Geräte	27
4.2. Verbrauchsmaterialien.....	27
4.3. Chemikalien und Reagenzien	28
4.4. Kit-Systeme	29
4.5. Puffer	29
4.5.1. Verwendete Puffer und Lösungen:.....	29
4.5.2. Puffer und Lösungen für den ChIP-Assay	30
4.6. Antikörper und Zytokine	31
4.6.1. Antikörper für Oberflächenfärbungen.....	31
4.6.2. Antikörper für intrazelluläre Färbungen	32
4.6.3. Antikörper für Zellkulturen	32
4.6.4. Zytokine für Zellkultur	32
4.6.5. Antikörper für den ChIP-Assay.....	33
4.7. Primer für Real-Time PCR Analysen.....	33
4.8. Humane Zellen	33
4.9. Software.....	34
5. Methoden	35
5.1. Studienpopulation.....	35
5.2. Isolierung CD4 positiver T Zellen.....	35
5.3. Extrazelluläre Färbung mittels Durchflusszytometrie.....	37
5.4. Generierung von Th0-, Th1-, Th2-, Th9- und Th17-Zellen	38
5.5. Intrazelluläre Färbung.....	39
5.5.1. Resting.....	39
5.5.2. Restimulierung:	39
5.5.3. Fixierung	39
5.5.4. Bestimmung der Zytokinproduktion	40
5.6. ChIP-Assay.....	40
5.7. Gelelektrophorese.....	43

5.7.1.	Gelherstellung	43
5.7.2.	Gelelektrophorese.....	43
5.8.	Real-time PCR.....	43
5.9.	Statistische Auswertung	44
6.	Ergebnisse.....	45
6.1.	Klinische Daten der Patienten sowie der gesunden Vergleichsgruppe	45
6.2.	Isolierung naiver CD45RA und CD4-positiver T-Helferzellen sowie CD45RO- und CD4-positiver T-Helfer-Gedächtniszellen	46
6.3.	Bestimmung der Zytokinproduktion durch intrazellulärer Färbung.....	47
6.4.	Die CNS-Regionen am IL17- und RORC-Lokus.....	48
6.5.	Die Kontrollgene CD4 und MYOD1 – Beispiele für eine permissive und repressive Chromatinstruktur.....	50
6.6.	Ergebnisse der gesunden Kontrollgruppe bezüglich Histonmodifikationen am IL17- sowie RORC-Lokus.....	51
6.6.1.	Ergebnisse der naiven Th-Zellen:	52
6.6.1.1.	IL17-Lokus	52
6.6.1.2.	RORC-Lokus	55
6.6.1.3.	Zusammenfassung.....	58
6.6.2.	Histonmodifikation der Gedächtnis-Th-Zellen	58
6.6.2.1.	IL17-Lokus	58
6.6.2.2.	RORC-Lokus	61
6.6.2.3.	Zusammenfassung.....	64
6.7.	Ergebnisse der Patienten.....	66
6.7.1.	Histonmodifikation der naiven Th-Zellen.....	66
6.7.1.1.	IL17-Lokus	66
6.7.1.2.	RORC-Lokus	70
6.7.1.3.	Zusammenfassung.....	74
6.7.2.	Histonmodifikation der Gedächtnis-Th-Zellen	75
6.7.2.1.	IL17- und RORC-Lokus	75
7.	Diskussion.....	83
7.1.	Naive-T-Zellen bei gesunden Spendern	83
7.2.	Mögliche Rolle der CNS Regionen IL17 CNS1 und RORC CNS3 für die T-Zelldifferenzierung	85
7.3.	Gedächtnis-T-Zellen bei gesunden Spendern.....	88
7.4.	Verminderte H3K27-Trimethylierung bei naiven T-Zellen als möglicher Grund eines verstärkten Th17-Phänotyps bei RA-Patienten	88
7.5.	Gedächtnis-Th-Zellen bei RA-Patienten	90
7.6.	Kritische Beurteilung des Versuchsaufbaus sowie mögliche Folgeversuche	91
8.	Zusammenfassung.....	93
9.	Abkürzungsverzeichnis	95
10.	Literaturverzeichnis	98
11.	Danksagung	Fehler! Textmarke nicht definiert.
12.	Eidesstattliche Versicherung.....	112

2. Einleitung

2.1. T-Helferzellen – Schlüsselfunktion im adaptiven Immunsystem

Das menschliche Immunsystem ist ein hochkomplexes Abwehrsystem zum Schutze des Organismus vor extrakorporalen Krankheitserregern einerseits aber auch vor entarteten körpereigenen Zellen andererseits. Das Immunsystem kann in das angeborene sowie in das adaptive Immunsystem eingeteilt werden. Das angeborene Immunsystem ist unspezifischer und evolutionsgeschichtlich betrachtend älter als das adaptive Immunsystem, welches durch Anpassungsprozesse effektiver gegen Krankheitserreger reagieren kann. Eine Schlüsselrolle im adaptiven Immunsystem spielen sogenannte T-Helfer- (Th-) Zellen, eine Subpopulation der T-Lymphozyten oder kurz T-Zellen, die aufgrund ihres CD (cluster of differentiation) 4-Oberflächenrezeptors ebenso als CD4-positive T-Zellen bezeichnet werden können. Der Ausdruck T-Helfer-Zellen hat seinen Ursprung aus den ersten Beobachtungen, dass diese Zellen eine entscheidende Rolle für die Antikörperproduktion der B-Zellen übernehmen. CD4⁺-T-Zellen, die bisher mit keinem Antigen in Kontakt getreten sind, werden als naive Zellen bezeichnet. Die Aktivierung einer naiven Th-Zelle zu einer sogenannten Effektor-Zelle benötigt neben dem T-Zell-Rezeptor (TZR)-vermittelten Antigenkontakt noch zusätzlich ein Ko-stimulierendes Signal (Schwartz, 1990, 1992). T-Zellen können jedoch über ihre T-Zell-Rezeptoren (TZR) nur Antigene erkennen, wenn diese von antigenpräsentierenden (APC = antigen presenting cells) Zellen zuvor internalisiert, in kleine Peptidfragmente zerkleinert und als Bestandteil des Haupthistokompatibilitätskomplexes (engl. MHC = Major Histocompatibility Complex) auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Zu den antigenpräsentierenden Zellen gehören vor allem B-Zellen, dendritische Zellen und Makrophagen bzw. ihre zelluläre Vorstufe Monozyten. Es gibt zwei unterschiedliche Klassen an MHC-Komplexen: Der MHC-Klasse-I-Komplex präsentiert zellintern-synthetisierte Proteine, wird auf nahezu allen Körperzellen exprimiert und wird von T-Zellen mit dem Ko-Rezeptor CD8 gebunden, welche sich zu zytotoxischen CD8⁺-T-Zellen weiterdifferenzieren. T-Zellen mit dem Ko-Rezeptor CD4 binden antigenpräsentierende Zellen mit dem MHC-Klasse-II-Komplex, der extrazelluläre Proteine darbietet, und differenzieren sich zu T-Helferzellen. T-Helferzellen sind eine heterogene Gruppe aus mehreren Subpopulationen. Abhängig vom Antigen, von der Intensität der MHC-TZR-Interaktion, von den kostimulierenden Rezeptoren auf der antigenpräsentierenden Zelle und vom vorherrschendem

Zytokinmilieu kommt es zur Bildung linienspezifischer Transkriptionsfaktoren (TF) und zur Synthese Th-Untergruppen definierender Zytokine (Annunziato and Romagnani, 2009).

Für die Zellisolation wichtig ist die Unterscheidung zwischen naiven T-Zellen und Effektorzellen. Dies ist durch das Oberflächenprotein CD45 möglich. CD45 ist ein Oberflächenprotein, das vor allem auf Leukozyten exprimiert wird und zur Familie der Protein-Tyrosin-Phosphatase (PTP) gehört. Es bestehen 8 Isoformen, von denen zwei als Unterscheidungsmerkmal dienlich sind. CD45RA ist auf naiven Th-Zellen zu finden, wohingegen nach Antigenkontakt CD45RO exprimiert wird (Clement et al., 1988; Korn et al., 2009)

2.2. Das Th1/Th2-Schema

Schon vor über 20 Jahren wurden die Th-Zellen gemäß ihrer spezifischen Zytokinsekretion, den Transkriptionsfaktoren und ihrer Funktion in die bis dahin bekannten beiden Subpopulationen Th1 und Th2 unterteilt (Mosmann et al., 1986). Später bestätigte sich diese Entdeckung ebenso bei Menschen (Del Prete et al., 1991; Parronchi et al., 1991). Th1-Zellen produzieren das Signalzytokin Interferon (IFN)- γ und werden durch das Interleukin (IL)-12 induziert (Hsieh et al., 1993; Seder et al., 1993). IL-12 aktiviert den Transkriptionsfaktor *signal transducer and activator of transcription* (STAT)-1 in den naiven CD4⁺-T-Zellen. Dies führt zu einer Hochregulierung der Transkriptionsfaktoren *T-box expressed transcription factor* (T-bet) und STAT-4, die wiederum die Produktion von IFN γ und IL-12R β 2, einer Untereinheit des IL-12-Rezeptors, stimulieren (Szabo et al., 1997). T-bet seinerseits hat durch Blockierung der IL-4 und GATA-3 Sekretion einen hemmenden Einfluss auf den Th2-Phänotyp. Th1-Zellen spielen eine bedeutende Rolle in der Bekämpfung intrazellulärer Viren und Erreger (Annunziato and Romagnani, 2009; Del Prete et al., 1991; Romagnani, 1995). Dies liegt einerseits daran, dass Th1-Zellen phagozytierende Zellen aktivieren und andererseits zu einer Hochregulierung der Antikörper IgM, IgG und IgA führen (Annunziato and Romagnani, 2009). Diese These konnte in einem Mausmodell bestätigt werden, indem mit *Leishmania major* erkrankte Mäuse, die vorwiegend mit einer Th1-Zell-Antwort reagierten, von dieser kuriert wurden, wohingegen Mäuse mit dominanter Th2-Zell-Antwort dazu nicht imstande waren (Heinzel et al., 1989).

Zellen mit einem Th2-Phänotyp sezernieren die Zytokine IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 und werden ihrerseits durch IL-4 über die Transkriptionsfaktoren STAT-6 und GATA binding protein 3 (GATA-3) induziert (Kaplan et al., 1996; Mosmann et al., 1986; Zheng and Flavell, 1997; Zhu et al., 2004). GATA-3 hemmt bei Th1-Zellen den STAT-4 Signalweg sowie die IFN γ -Expression, reduziert die Produktion der β_2 -Kette des IL-12-Rezeptors und steigert die IL-4 und IL-5 Expression. IL-4 und IL-13 sind die Hauptmediatoren des IgE-Klassenwechsels bei B-Zellen (Kopf et al., 1993). Die Bindung von IgE an Rezeptoren von Mastzellen und basophilen Granulozyten führt unter anderem zur Sekretion von Histamin, Serotonin und weiteren Zytokinen wie IL-4, IL-13 und TNF α . IL-5 bewirkt die Proliferation und Aktivierung eosinophiler Granulozyten (Coffman et al., 1989). In Zusammenschau all jener Folgereaktionen spielen Th2-Zellen einerseits für die Abwehr gegen extrazellulären Erreger wie Würmer und Bakterien eine entscheidende Rolle (Romagnani, 1995), andererseits sind sie ein entscheidender Baustein in der Pathogenese von Allergien (Abbas et al., 1996; Coffman et al., 1989; Faulkner et al., 1998; Kopf et al., 1993; Romagnani, 2000).

Lange Zeit wurde angenommen, dass eine überschießende Th1-Zell-Reaktion für eine Reihe von Autoimmunerkrankungen wie Multipler Sklerose (MS), Diabetes mellitus Typ I, entzündlichen Darmerkrankungen und der rheumatoiden Arthritis (RA) verantwortlich sei, wohingegen Th2-Zellen eher eine protektive Wirkung zugeschrieben wurde. Dies wurde mit den Funktionen der einzelnen Zytokinen einerseits und mit der Beobachtung in Tiermodellen, dass eine IL-12-Neutralisierung oder IL-12-Defizienz die Krankheitsentstehung der oben genannten Autoimmunerkrankungen abschwächt, andererseits begründet (Leonard et al., 1995; McIntyre et al., 1996; Neurath et al., 1995; Rothe et al., 1997). Zusätzlich wurde diese These speziell bei der rheumatoiden Arthritis damit begründet, dass im Blut und in Gelenkflüssigkeiten von RA-Patienten ein im Vergleich zu Th2-Zellen verstärkte Th1-Präsenz vorherrscht (Yamada et al., 2011). Bei der *Experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis* (EAE), ein Mausmodell für die menschliche Multiple Sklerose (MS), zeigte sich jedoch bei Th1-defizienten Mäusen mit IFN γ ^{-/-}, IFN γ -Rezeptor^{-/-}, IL-12 β R^{-/-} eine verstärkte Krankheitsintensität und -progression (Becher et al., 2002; Chu et al., 2000; Ferber et al., 1996; Gran et al., 2002; Willenborg et al., 1996; Zhang et al., 2003) wohingegen ein intakter Th1-Phänotyp zu einer Linderung der Beschwerden führte. In Arthritis-Studien kam es paradoxerweise nach Neutralisierung von IFN γ oder bei genetischer Defizienz für IFN γ zu einer erhöhten Krankheitsaktivität mit Exazerbation der Arthritis (Lubberts, 2008).

Diese zunächst paradoxen Ergebnisse zeigten eindrucksvoll, dass das Th1/Th2-Schema die Entstehung von Autoimmunerkrankungen nicht vollends erklären kann. Daraus ergab sich die Notwendigkeit, nach neuen, bis dato unbekanntem Zellen zu suchen.

2.3. Th17-Zellen

Das Th1/Th2-Paradigma wurde endgültig verlassen, als die neue CD4⁺-T-Zellgruppe Th17 mit seiner proinflammatorischen Wirkung entdeckt wurde. Th17-Zellen produzieren IL-17A, jedoch kein IL-4 oder IFN γ (Harrington et al., 2005; Park et al., 2005). Die Th17-Differenzierung ist durch den linienspezifischen Transkriptionsfaktor RAR (retinoic acid receptor) related orphan receptor (RORC bei Menschen und ROR γ t bei Mäusen genannt) getriggert (Annunziato et al., 2008; Ivanov et al., 2006; Manel et al., 2008). Weiterhin produzieren Th17-Zellen eine Vielzahl an weiteren Zytokinen, unter anderem IL-17F, IL-21, IL-22, IL-26 sowie den *Chemokin (C-C motif) Ligand 20 (CCL20)* (Acosta-Rodriguez et al., 2007; Annunziato et al., 2007; Chen et al., 2007; Wilson et al., 2007) und exprimieren neben den charakteristischen *Chemokin (C-C motif) Rezeptoren (CCR)4 und 6* noch den Oberflächenmarker CD161. CCL20 spielt eine bedeutende Rolle in der Th17-Zellmigration in entzündliche Gewebeschichten, da dieser der spezifische Ligand für CCR6 ist und in Entzündungsgebieten stark hochreguliert ist. Th17-Zellen lassen sich aus einer Gruppe CD4⁺-T-Zellen mit dem exprimierten Marker CD161 unter Einwirkung der Zytokine IL-1 β und IL-23 differenzieren (Cosmi et al., 2008).

Th17-Zellen haben sowohl eine Bedeutung bei der Abwehr gewisser Bakterien- und Pilzinfektionen sowie bei der Induktion autoimmuner Erkrankungen.

Eine Vielzahl an Mechanismen spielen bei der Abwehr von Bakterien- und Pilzinfektionen durch Th17-Zellen eine bedeutende Rolle: IL-17A fördert die Reifung neutrophiler Granulozyten durch Hochregulierung des *granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF)* und wirkt chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten durch verstärkte Produktion von *chemokine (C-X-C motif) ligand (CXCL) 1, 2 und 5*. Außerdem bewirkt es eine verstärkte Expression von Proteinen der β -Defensin-Familie vor allem in neutrophilen Granulozyten, die zur direkten Zerstörung der Keime beitragen. (Onishi and Gaffen, 2010). Vor allem gegen extrazelluläre Pathogene spielt IL-17A eine bedeutende Rolle (Onishi and Gaffen, 2010). Diese These konnte im Mausmodell bei Mäusen mit ineffizienter IL-17A und IL-17F

Produktion bestätigt werden, die eine verstärkte Anfälligkeit gegenüber *Staphylococcus aureus* aufwies (Ishigame et al., 2009). Wie bedeutend Th17-Zellen für die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten sind, sieht man bei Mäusen mit ineffizienter IL-17-Rezeptor (IL-17R) Expressierung. Hierbei kommt es bei Infizierung der Mäuse mit *Klebsiella pneumoniae* aufgrund mangelnder Anzahl aktiver neutrophiler Granulozyten zu einer Todesrate von 100% (Ye et al., 2001). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen weitere Versuche mit den Erregern *Mycoplasma pneumoniae*, *Bordetella pertussis*, *Candida albicans*, *Pneumocystis carinii* und *Francisella tularensis* (Conti et al., 2009; Higgins et al., 2006; Huang et al., 2004; Puel et al., 2011; Rudner et al., 2007; Wu et al., 2007).

Th17-Zellen besitzen neben der physiologischen Funktion, der Bekämpfung von Bakterien- und Pilzinfektionen, eine proinflammatorische Wirkung bei mehreren Autoimmunerkrankungen wie rheumatoider Arthritis (RA), systemischer Lupus erythematoses (Alunno et al., 2012; Nalbandian et al., 2009; Ohl and Tenbrock, 2011), multipler Sklerose bzw. EAE oder chronisch entzündlicher Darmerkrankungen (CED). So gibt es Hinweise für eine Beteiligung von Th17-Zellen in der Pathogenese der multiplen Sklerose sowie von entzündlichen Darmerkrankungen. So konnte eine erhöhte Frequenz an Th17-Zellen in Darmresektaten von Morbus Crohn Patienten (Annunziato et al., 2007) sowie in Hirnproben von MS-Patienten, vorwiegend in aktiven Läsionen (Tzartos et al., 2008), gefunden werden.

Seine gelenkdestruktive Wirkung, relevant für die entzündlichen Arthritiden, besitzt IL-17A vor allem durch die verstärkte Freisetzung von Matrix-Metalloproteinasen (MMP) durch Fibroblasten und Chondroblasten (Cai et al., 2001; Chabaud et al., 2001). Ebenso verursacht es Knochenerosionen aufgrund gesteigerter Osteoklastendifferenzierung durch verstärkte Expression von *receptor activator of NfκB ligand* (RANKL) von Osteoblasten und von *receptor activator of NfκB* (RANK) auf Osteoklastenvorläuferzellen. (Adamopoulos et al., 2010; Sato et al., 2006). RANKL bindet an den entsprechenden Rezeptor RANK auf den Osteoklastenvorläuferzellen, die sich zu den Osteoklasten weiterdifferenzieren. IL-17A verstärkt die Gelenksentzündung durch Induzierung der Makrophagen zur IL-1 und TNF Produktion (Jovanovic et al., 1998), durch Stimulierung der synovialen Fibroblasten (SF) zur IL-6 und IL-8 Sekretion (Fossiez et al., 1996) und durch Chemotaxis der Th17-Zellen sowie dendritische Zellen (DZ) durch CCL20. Diese Befunde ließen sich auch im Mausmodell für die RA, der *Kollagen-induzierten Arthritis* (engl. CIA), bestätigen. Eine IL-17A Überexpression führte zu Gelenksentzündungen, Gelenkdestruktionen und Knochenerosionen (Lubberts et al., 2001) wohingegen bei IL-17-Knock-out-Mäusen die Gelenksentzündung

deutlich reduziert werden konnte (Nakae et al., 2003). Durch Blockierung von IL-6, einem essentiellen Interleukin zur Th17-Induktion bei Mäusen, konnte gar die Krankheitsentstehung in diesem Mausmodell verhindert werden (Fujimoto et al., 2008). Leipe et al. konnte die bedeutende Rolle der Th17-Zellen in der humanen rheumatoiden Arthritis bekräftigen. So wurde aus dem peripheren Blut Therapie-naiver RA-Patienten ein erhöhter prozentualer Anteil von Th17-Zellen an CD4⁺-T-Zellen gemessen. Ein erhöhter Anteil an Th17-Zellen korrelierte gar hochsignifikant mit der Krankheitsaktivität und mit den serologischen Entzündungsparametern. Ebenso wurde nach Stimulation von naiven Th-Zellen eine vermehrte Differenzierung zu Th17-Zellen und eine verstärkte IL-17 Produktion im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe beobachtet. Genauso zeigten sich Th17-Zellen verstärkt immun gegen anti-Th17-Differenzierungsbedingungen. So war unter Einfluss von IL-4 der Rückgang an Th17-Zellen bei RA-Patienten signifikant geringer als bei der gesunden Population. Mögliche Erklärung für diesen verstärkten Th17-Phänotyp ist die beobachtete verstärkte Expression von RORC bei RA-Patienten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe (Leipe et al., 2010).

2.4. Th9-Zellen

Eine weitere CD4⁺ T-Zelllinie mit der Fähigkeit zur IL-9 Sekretion wurde vor kurzem beschrieben (Dardalhon et al., 2008; Veldhoen et al., 2008). IL-9 ist kein Zytokin, das spezifisch von Th9-Zellen gebildet wird, sondern wird auch von Th2- und Th17-Zellen produziert. IL-9 galt lange Zeit als typisches Zytokin der Th2-Zellen und eine eigene Th9-Zelllinie wurde deshalb angezweifelt. Für die Behauptung einer eigenständigen Th9-Subpopulation sprechen jedoch mehrere Beobachtungen: Unter dem Einfluss von IL-4 und *transforming growth factor* (TGF)- β konnten naive Th-Zellen in CD4⁺ T-Zellen mit vorwiegender IL-9 Produktion initiiert werden, die keine oder im Vergleich geringere Mengen an Schlüsselzytokinen und Transkriptionsfaktoren der anderen Th-Subpopulationen wie T-bet (Th1), GATA-3 (Th2) oder RORC (Th17) exprimierten. Vielmehr exprimierten diese Zellen unter den Th9-Differenzierungsbedingungen die Transkriptionsfaktoren PU.1 und *interferon-regulatory factor 4* (IRF4), die die entscheidenden Transkriptionsfaktoren zur Generierung von Th9-Zellen sind, wohingegen IFN- γ einen hemmende Einfluss auf die IL-9 Expression besitzt (Chang et al., 2010; Schmitt et al., 1994; Staudt et al., 2010) Die Th9-Differenzierung kann durch Zugabe von IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, IL-21, IFN α und IFN β

verstärkt werden (Houssiau et al., 1995; Putheti et al., 2010; Wong et al., 2010). Ebenso konnte kürzlich demonstriert werden, dass IL-9 und IL-4 nur in seltenen Fällen durch dieselbe Zelle gebildet wird (Veldhoen et al., 2008) was die These einer selbstständigen Th9-Linie unterstreicht.

Mehrere Studien brachten in den letzten Jahren einen Einblick in die Funktion und den Effekt der Th9-Zellen. So nehmen die Th9-Zellen Einfluss auf eine Vielzahl von Zielzellen. Th9-Zellen mit seinem Zytokin IL-9 steigern die Proliferationsrate und das Überleben in vitro kultivierter T-Zellen (Dardalhon et al., 2008; Schmitt et al., 1989; Van Snick et al., 1989; Veldhoen et al., 2008). Ebenso hebt IL-9 die Proliferationsrate und die Zytokinproduktion der Mastzellen an (Wiener et al., 2004), und bewirkt zusammen mit dem *stem cell factor* (SCF) eine verstärkte Protease-Expression (Eklund et al., 1993). B-Zellen reagieren auf IL-9 mit einer gesteigerten IgE und IgG-Produktion (Dugas et al., 1993; Petit-Frere et al., 1993), und Epithelzellen der Lunge werden zur verstärkten Chemokin- und Schleimproduktion angeregt. Zusammenfassend erklärt dies die Beobachtungen, dass Th9-Zellen durch IL-9 allergische Reaktionen in der Lunge sowie im Gastrointestinaltrakt begünstigen. Die intratracheale Gabe von IL-9 führte bei Mäusen zu Asthma-ähnlichen Reaktionen mit verstärkter Eosinophilie, erhöhten IgE-Serumwerten sowie Zeichen der bronchialen Hyperreagibilität (Levitt et al., 1999; Reader et al., 2003). Gleichzeitig konnte im Mausmodell durch IL-9-Blockierung mittels Antikörper die Eosinophilie, das Serum-IgE und die bronchiale Hyperreagibilität vermindert werden (Cheng et al., 2002; Kung et al., 2001). Bronchiale Biopsate von Asthma-Patienten zeigten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe eine verstärkte IL-9- und IL-9-Rezeptor-Expression (Erpenbeck et al., 2003; Shimbara et al., 2000; Toda et al., 2002; Ying et al., 2002). Im Kontrast dazu zeigten IL-9 defiziente Mäuse, dass das Fehlen von IL-9 keinen positiven Einfluss auf die Entwicklung von allergen-induzierten Entzündungsreaktion der Lunge sowie der bronchialen Hyperreagibilität besitzt (McMillan et al., 2002). Ebenso führten monoklonale Antikörper gegen IL-9 bei Asthmapatienten in den ersten klinischen Studien zu keiner Verbesserung der klinischen Beschwerden oder des FEV1-Wertes, noch zu einer verminderten Rate an Exazerbationen (Oh et al., 2013).

In mehreren Mausmodellen besitzt IL-9 eine protektive Rolle gegenüber parasitären Darminfektionen: es führte zur verstärkten Parasiten-spezifischen IgG1-Produktion, intestinalen Mastozytose und induziert die Darmperistaltik; dies führte zur Austreibung der Parasiten, wohingegen eine Neutralisierung von IL-9 eine Ausheilung der Parasiteninfektion verhinderte (Faulkner et al., 1998; Khan et al., 2003; Leech and Grecis, 2006; Richard et al., 2000).

Es wird vermutet, dass Th9-Zellen ebenfalls eine Bedeutung für Autoimmunerkrankungen haben. So führte die IL-9-Neutralisierung und die IL-9-Rezeptor-Defizienz zu einer Abschwächung der EAE. (Nowak et al., 2009). Dieser Effekt wurde vermutlich über Th17-Zellen sowie Mastzellen vermittelt, denn die verringerte Krankheitsprogression ging mit einer verminderten Anzahl an Th17-Zellen sowie IL-6-produzierender Mastzellen einher. Für die rheumatoide Arthritis gibt es bisher nicht viele Daten. Einzig eine Assoziation zwischen IL-9-Serumwerten und der Positivität für den *IgM-Rheumafaktor* (RF) und den Autoantikörper gegen citrullinierte Peptide/Proteine (*anti-cyclic citrullinated protein antibodies*, anti-CCP-AK) bei Verwandten 1.Grades von RA-Patienten (Hughes-Austin et al., 2013) sowie erhöhten IL-9-Serumwerten bei RA-Patienten (Khan et al., 2009) konnten eruiert werden.

Somit zeigen diese Studien, dass Th9-Zellen mit seinem Zytokin IL-9 eine Rolle in der Abwehr parasitärer Darminfekte spielen, aber auch mitverantwortlich für Überreaktionen des Immunsystems zu sein scheinen.

2.5. Th22-Zellen und regulatorische T-Zellen

Der Vollständigkeit halber möchte ich noch kurz auf die Th22 und die regulatorischen T-Zellen (Treg) eingehen.

IL-22 wird vor allem von aktivierten T-Zellen, unter anderem von Th17-Zellen, aber auch von nicht-T-Zellen (Takatori et al., 2009), gebildet. 2009 wurden $CD4^+$ -T-Zellen entdeckt, die IL-22, aber kein IL-4, $IFN\gamma$ oder IL-17 produzieren, weshalb diese Zellen, als eine mögliche neue Th-Zelllinie, Th22-Zellen, genannt wurden (Duhon et al., 2009). Erhöhte IL-22 Werte lassen sich in Hautproben von Patienten mit atopischer Dermatitis finden (Nogales et al., 2009) und korrelieren bei Asthmapatienten mit einem erhöhten Schweregrad (Zhao et al., 2010). Ebenso zeigte sich eine bedeutende Rolle des IL-22 für die rheumatoide Arthritis, so konnten erhöhte Mengen an IL-22 im Serum von Patienten mit sehr früher RA und in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit etablierter RA gemessen werden. Ebenso korrelieren erhöhte Serum-Mengen an IL-22 zu Beginn der rheumatoiden Arthritis mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für die Entwicklung von Knochenerosionen (Cascao et al., 2010; Leipe et al., 2011).

Regulatorische T-Zellen (Treg), $CD4^+ CD25^+$ T-Zellen mit dem charakteristischen Transkriptionsfaktor *forkhead box P3* (FOXP3), sind wichtige Regulatoren der immunologischen Toleranz (Sakaguchi et al., 2008) und können die Entstehung von

Autoimmunerkrankungen durch Unterdrückung der T-Zell-vermittelten Immunantwort verhindern.

2.6. Plastizität der T-Helferzellen

Es wurde längere Zeit angenommen, dass die T-Helferzellen, deren Einteilung durch die jeweiligen Schlüsselzytokine und Transkriptionsfaktoren vorgenommen wurde, stabile T-Zelllinien darstellen. Es zeigte sich jedoch früh, dass es gewisse Überschneidungen der Zytokinproduktion und auch der Transkriptionsfaktoren zwischen den verschiedenen Th-Zellen gibt. So scheint IRF4, der Transkriptionsfaktor der Th9-Zellen, auch eine Rolle für die Th17-Differenzierung zu spielen (Huber et al., 2008). Neuere Studien zeigen gar, dass naive Th-Zellen keinesfalls irreversibel eine Th-Differenzierung einschlagen, sondern durch entsprechende Stimuli die Fähigkeit zur Produktion der Schlüsselzytokine oder Transkriptionsfaktoren anderer Th-Subgruppen erlangen und dadurch ihren Th-Phänotyp verändern können. So können Th2-Zellen zu sogenannten "Th2+1"-Zellen verändert werden, die neben IL-4 und GATA3 noch zusätzlich IFN γ und T-bet entsprechend dem Th1-Phänotyp produzieren (Hegazy et al., 2010).

Ebenso können Th17-Zellen zur IL-9-Produktion induziert werden (Beriou et al., 2010; Elyaman et al., 2009) oder die Th17-Zellen können zu Th1-Zellen umprogrammiert werden (Hirota et al., 2011). Auch Treg scheinen eine Umprogrammierung vornehmen zu können. So wurden Ko-Expressionen von FOXP3 mit T-bet bzw. mit GATA3 belegt, wodurch Einfluss auf die Treg-Funktion genommen werden kann (Koch et al., 2012; Koch et al., 2009; Wang et al., 2011; Wohlfert et al., 2011).

Die Plastizität der T-Helferzellen ermöglicht vermutlich dem Immunsystem flexibel auf Veränderungen der Umwelt und der Pathogene reagieren zu können. Jedoch gibt es auch Hinweise darauf, dass eine veränderte Plastizität der T-Zellen eine Rolle in der Pathogenese der Autoimmunerkrankungen spielen. Wie oben im Kapitel "Th17-Zellen" bereits erwähnt wurde, deuten neuere Ergebnisse darauf hin, dass die rheumatoide Arthritis eine veränderte Plastizität mit pathologischer Präferenz für die Th17-Subpopulation aufweist. (Leipe et al., 2010).

Um den vermutlichen Zusammenhang zwischen veränderter Plastizität und Autoimmunerkrankung besser verstehen zu können, wurden in den letzten Jahren mögliche Faktoren, die das Verhältnis von Plastizität zu Stabilität der T-Helferzellen regulieren,

genauer untersucht. Die Induktion zu einer Th-Subpopulation wird durch Zytokine und Transkriptionsfaktoren beeinflusst, die zur Expressierung einer Reihe an bestimmten Genen führen, die am Ende den Th-Phänotyp und die Funktion der Zelle bestimmen. Jedoch konnte gezeigt werden, dass auch verschiedene epigenetische Modifikationen Einfluss auf die Expression linienspezifischer Gene haben und dadurch die Entwicklung zu einer Th-Subgruppe mitbestimmen (Hirahara et al., 2011; Kanno et al., 2012).

2.7. Epigenetische Modifikationen

2.7.1. Die Rolle der Epigenetik in der Entwicklung der T-Zellen

Epigenetik befasst sich mit vererbbaaren Veränderungen der Genexpression, die nicht durch die DNA-Sequenz bedingt sind (Egger et al., 2004). Die drei Hauptmechanismen sind DNA-Methylierung, post-translatorische Modifikation der Histone sowie non-coding RNA (ncRNA) (Auyeung et al., 2013; Barski et al., 2009; Mendenhall et al., 2013; Ziller et al., 2013).

Die DNA-Methylierung, genauer gesagt die Methylierung des Cytosins an der Position 5 innerhalb eines Cytosin-Phosphat-Guanin Dinukleotids (CpG), wird durch die DNA-Methyltransferase (DNMT) reguliert. Eine Anhäufung an CpGs wird CpG-Island genannt und befinden sich zumeist in Promotor-Regionen. Die DNA-Methylierung erschwert die Bindung von TF an relevante DNA-Abschnitte und führt dadurch zu einer herabgesetzten Gen-Transkriptionsrate (Jones, 2012). Die DNA-Methylierung spielt bei mehreren physiologischen Prozessen, wie z.B. bei Frauen die Inaktivierung eines der beiden X-Chromosomen oder beim genomischen Imprinting, eine bedeutende Rolle. Ebenso scheinen DNA-Methylierungen die Th-Differenzierung mitzubestimmen: So ist für die FOXP3-Expression in Tregs die DNA-Demethylierungen in regulatorischen Elementen des FOXP3-Lokus notwendig (Floess et al., 2007; Janson et al., 2008; Zheng et al., 2010). Isolierte Th17-Zellen ($CD4^+ IL17^+$) zeigten in der IL17A-Promotorregion eine Methylierungsrate von 34%, wohingegen nicht-IL-17A produzierende $CD4^+$ -T-Zellen eine Methylierung von 82% aufwiesen. Ein Zusammenhang zwischen Methylierungsrate und IL-17A-Produktion konnte nach Gabe von 5-Aza (5-Aza-2-deoxycytidin), eine demethylierende Substanz, bekräftigt werden, das zu einer Steigerung der IL-17A-Produktion um 40% führte (Janson et al., 2011). Mehrere Studien konnten ebenfalls aufzeigen, dass Umwelteinflüsse und Lebensgewohnheiten ebenfalls das Epigenom verändern können. So konnte z.B. gezeigt werden, dass der Zigarettenkonsum sowie regelmäßig

sportliche Aktivität einen Einfluss auf die DNA-Methylierung haben (Nakajima et al., 2010; Wu et al., 2008).

Non-coding RNA werden je nach Größe in long ncRNA (lncRNA; mehr als 200 Nukleotide) oder small ncRNA (weniger als 200 Nukleotide) eingeteilt. MicroRNA (miRNA), zu den small ncRNA gehörend, bindet an die sogenannten 3' *untranslated regions* der mRNA und bewirkt dadurch den Abbau dieser mRNA oder verhindert die Translation wodurch es zu einer verminderten Synthese des Gen-Produktes kommt (Bartel, 2004). Mehrere miRNA konnten bereits gefunden werden, die Einfluss auf die Th-Zelldifferenzierung haben. So kontrolliert miRNA-155 die Treg- und Th17-Entwicklung (Hu et al., 2013), die miRNAs miRNA-21, miRNA301a und miRNA-146b regulieren die Th17-Differenzierung (Liu et al., 2013; Mycko et al., 2012).

Posttranslatorische Modifikation der Histone führt zur Veränderung der Chromatinstruktur. Acht Histone, aus je zwei der Histone H2A, H2B, H3 und H4 bilden zusammen mit der um diesen Histonoktamer gewickelten DNA (146 bp) ein Nukleosom. Die einzelnen Nukleosomen werden durch das Histone H1 miteinander verknüpft. Die Histone besitzen viele basische und damit positiv geladene Aminosäuren, wodurch eine starke elektromagnetische Anziehung auf die negativ geladene DNA ausgeübt wird. Dadurch kommt es zu der typischen verdichteten Chromatinstruktur. Von einem repressiven Modifikationsmuster wird gesprochen, wenn die Packungsdichte des Chromatins im Zellkern zunimmt und dadurch die Gen-Expression inaktiv ist (Heterochromatin). Euchromatin hingegen stellt ein durch permissive Histonmodifikationsmuster aufgelockertes Chromatin dar, deren Gene offen zugänglich und transkriptionell aktiv sind. Posttranslationale Histon-Modifikationen können im Gegensatz zur DNA-Methylierung und zur ncRNA je nach Art und Lokalisation der Modifikation entweder eine permissive oder eine repressive Wirkung haben. Dadurch ergeben sich neben einer aktiven und inaktiven Chromatin-Struktur auch ein Zwischenstadium mit sowohl repressiven als auch permissiven Histonmodifikationen, das auch als bivalentes Chromatinstatus genannt werden kann. Neben den bisher am besten untersuchten Modifikationen Methylierung und Acetylierung gibt es noch die Phosphorylierung, die Ubiquitinierung sowie die Sumoylierung (Rando, 2012). In dieser Dissertation wurde der Fokus auf folgende Modifikationen gelegt: Die Acetylierung des Histone 3 (H3ac) geht mit einer aktiven Genexpression einher und wird durch die Enzyme Histon-Acetyltransferase (HAT) und Histon-Deacetylase (HDAC) reguliert. Die Trimethylierung des Lysins 4 am Histone 3 (H3K4me3) führt zu einer verstärkt permissiven Gen-Expression, wohingegen die Trimethylierung des Lysin 27 am Histone 3 (H3K27me3) durch die *enhancer of zeste*

homologue 2 (EZH2)- Histon-Methyltransferase zu einer verstärkt repressiven Gen-Expression führt (Margueron and Reinberg, 2011). Die Abkürzung für Lysin ist Lys oder K, wodurch das Kurzwort H3K4me3 bzw. H3K27me3 verwendet wird. Die Acetylierung gilt als schnell modifizierbar, wohingegen die Methylierung größere Stabilität aufweist.

Mehrere Studien haben gezeigt, dass linienspezifische Gene je nach Th-Differenzierung unterschiedliche Histon-Modifikationsmuster aufweisen. So wurde beobachtet, dass die Intensität der H3K27me3-Modifikation im Promotorbereich des Gens von PU.1 im Laufe der Zellentwicklung von der neonatalen naiven über die adulte naive bis hin zur Gedächtnis Th-Zelle abnimmt. Durch die verstärkte Repressivität in den neonatalen naiven Th-Zellen wurde im Vergleich zu den Gedächtnis Th-Zellen eine stärkere Stimulation benötigt um eine vergleichbare IL-9 Produktion zu erreichen. Eine ähnliche Beobachtung konnte unter Th9-induzierenden Differenzierungsbedingungen gemacht werden. Darin zeigte sich eine Veränderung der Histonmodifikation am PU.1 Promotor hin zu einem verstärkt permissiven Muster (Ramming et al., 2012). Eine andere Studie zeigte bei Mäusen in der Nähe der TSS (transcription start site) der Gene IL17A und IFN γ ein linientypisches Histonmodifikationsmuster: So konnte in Th1-Zellen im Vergleich zu Th17-Zellen vermehrt die permissive Modifikation H3K4me3 und in geringerem Maße die repressive Modifikation H3K27me3 am IFN γ -Promotor beobachtet werden. Am IL17A-Promotor wurde die gegenteilige Beobachtung gemacht: So konnte bei Th17-Zellen im Vergleich zu den Th1-Zellen eine verstärkt permissive H3K4me3-Modifikation und in geringerer Ausprägung die repressive H3K27-Trimethylierung gemessen werden (Mukasa et al., 2010).

Zusammenfassend sind im Unterschied zur genomischen DNA (Genom) die epigenetischen Strukturen, das Epigenom, sehr dynamisch, verändern sich unter dem Einfluss endogener Faktoren sowie Umwelteinflüsse, beeinflussen die Proteinproduktion und somit den Phänotyp einer Zelle und zeigen ein Zell-spezifisches Muster. Somit kann eine pathologisch veränderte Präferenz zu einer Th-Subpopulation, wie es bei der rheumatoiden Arthritis zu vermuten ist, eventuell durch veränderte epigenetische Modifikationen bedingt sein.

2.7.2. Epigenetische Veränderungen in der rheumatoiden Arthritis

Genetische Analysen von monozygotischen Zwillingen zeigten eine Konkordanzrate für die rheumatoide Arthritis von gerade einmal 15% (Silman et al., 1993). Dies suggeriert, dass andere Mechanismen in der Pathogenese der RA mitverantwortlich sein müssen, wie z.B. die Epigenetik.

In den letzten Jahren bekräftigten mehrere Studien diese These. So wurden niedrigere globale DNA-Methylierungsraten in T-Zellen (Richardson et al., 1990) und Leukozyten (Liu et al., 2011) von RA-Patienten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe beobachtet. Diese Hypomethylierung konnte bereits auch für einzelne Schlüsselgene der RA, relevant für Zellmigration, -adhäsion und extrazellulärer Matrixinteraktionen in synovialen Fibroblasten bestätigt werden (Nakano et al., 2013). Ebenso waren in sog. *peripheral blood mononuclear cells* (PBMCs) von RA-Patienten einzelne CpG-Regionen der Promotoren von IL-6 (Ishida et al., 2012; Nile et al., 2008) und IL-10 (Fu et al., 2011) signifikant geringer methyliert, was mit einer erhöhten Zytokinproduktion korrelierte. Bei RA-Patienten zeigen jedoch auch gewisse DNA-Abschnitte Hypermethylierungen, wie z.B. die Promotorregion des *death receptor 3* (DR3)-Gens in Synovialzellen von RA-Patienten, ein Apoptose-induzierendes Protein der Fas-Familie (Takami et al., 2006). Dies führt vermutlich zu einer geringeren Apoptoserate der proinflammatorischen Synovialzellen und damit zu einer Aufrechterhaltung der Entzündung.

Eine Verbindung zwischen miRNAs und RA konnte in mehreren Studien ebenfalls gezogen werden. So wurde miRNA-155, bekannt für seine onkogene (Costinean et al., 2006) und autoimmunitätsregulierende (O'Connell et al., 2010) Wirkung, in PBMC von RA-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe überexprimiert (Pauley et al., 2008). Dies korrelierte mit der Krankheitsaktivität der Patienten. RA-Patienten zeigen im Synovium ebenfalls erhöhte Werte für miRNA-155, was mit einer erhöhten Rate an IL-17-produzierenden T-Zellen assoziiert war (Niimoto et al., 2010). Ein Beispiel für das Zusammenspiel verschiedener epigenetischer Modifikationen ist miRNA-203, dessen Überexpression in Synovialzellen von RA-Patienten durch DNA-Demethylierung mittels 5-Aza-2'deoxyctidin weiter gesteigert werden kann und zu einer verstärkten Expression der Matrix-Metalloprotease 1 und von IL-6 führte (Stanczyk et al., 2011).

Bei den Histonmodifikationen beschränken sich die bisherigen Daten von RA-Patienten vor allem auf die Histonacetylierung sowie die Untersuchung der entsprechenden Enzyme HAT und HDAC. Jedoch wurden die Daten meist von Synovialzellen bzw. vom Synovialgewebe erhoben. Daten zu T-Zellen sind bisher kaum zu finden.

Werte zur Gesamt-HDCA-Aktivität im synovialen Gewebe von RA-Patienten sind im Vergleich zu Osteoarthritis-Patienten kontrovers und zeigen eine geringere (Huber et al., 2007) oder verstärkte (Kawabata et al., 2010) Aktivität. Dies könnte möglicherweise damit zusammenhängen, dass die Enzymaktivität variabel ist und stark von dem lokalen Entzündungsstatus abhängt (Grabiec and Reedquist, 2010). Durch HDAC-Inhibitoren

(HDACi) konnte in mehreren Studien eine mögliche bedeutende Rolle des Acetylierungsstatus bekräftigt werden. So konnte durch FK228, ein Hemmer der HDAC-Klassen I, in einem Arthritis-Mausmodell die Gelenkschwellung, die synoviale Entzündung und die Knorpeldestruktion reduziert werden (Nishida et al., 2004).

Für die Histonmethylierung konnte bei RA-Patienten bisher lediglich eine Überexpression von EZH2 in Synovialzellen von RA-Patienten (RASf) im Vergleich zu Osteoarthritispatienten (OA) nachgewiesen werden (Trenkmann et al., 2011). Jedoch korrelierte die EZH2-Expression nicht mit Veränderungen der globalen H3K27me3 in RASf. Da bisher über die Histonmodifikationen in den Schlüsselgenen IL17A und RORC, die wie zuvor erwähnt bei RA-Patienten eine erhöhte Expression aufweisen und mit einem verstärkten Th17-Phänotyp assoziiert sind, in T-Zellen von RA-Patienten noch keine vergleichende Daten zu einer gesunden Kontrollgruppe erhoben wurden, ist in diesem Bereich ein deutlicher Nachholbedarf anzusehen. Diese Dissertation nahm genau dies zum Ziel.

2.8. CNS-Regionen

Die verstärkte Transkription eines Gens kann wie am Beispiel PU.1 zuvor beschrieben durch epigenetische Modifikationen an der Promotorregion erfolgen, wodurch die Bindung entsprechender Transkriptionsfaktoren erleichtert oder erschwert wird. Jedoch gibt es neben dem Promotor noch weitere Kontrollsequenzen, sog. *Enhancer* und *Silencer*. Häufig handelt es sich bei den regulatorischen Sequenzen um *conserved non-coding sequences* (CNS). Solche Regionen erfuhren während der Evolution wenig Veränderungen, weswegen zwischen den einzelnen Säugetierarten hohe Übereinstimmung in der Sequenz zu finden sind. Dies suggeriert, dass CNS-Regionen für den Organismus eine wichtige Bedeutung und deshalb während der Evolution kaum Veränderung erfuhren haben. Aus diesem Grund wurde in dieser Dissertation die Histonmodifikationen sowohl am Promotor als auch an CNS-Regionen untersucht.

2.9. Die rheumatoide Arthritis

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist eine systemische, chronisch-inflammatorische Autoimmunerkrankung, die unbehandelt zu destruierenden Gelenkveränderungen, chronischen Schmerzen, eingeschränkter Lebensqualität und verkürzten Lebenserwartungen (Meune et al., 2010; Radovits et al., 2010) führt.

2.9.1. Epidemiologie

Mit einer Prävalenz von 0,5-1% ist die RA die häufigste entzündliche Gelenkerkrankung, wobei Frauen circa doppelt so häufig betroffen sind wie Männer. Der Erkrankungsgipfel liegt bei Frauen zwischen 55-64 Jahren, bei Männern zwischen 65-75 Jahren (Symmons, 2002), jedoch kann es auch in jedem anderen Lebensalter zu einer Manifestation kommen. Die Inzidenzrate wird mit etwa 21 bis 45 pro 100 000 Personenjahren beziffert (Pedersen et al., 2007).

2.9.2. Klinische Manifestation und Diagnostik

In der Frühphase kommt es meist zum polyartikulären symmetrischen Arthritisbefall mit Prädilektion der kleinen Gelenke wie Hand-, Fingergrund- (MCP), Fingermittel- (PIP), Zehengrundgelenken (MTP) sowie Großzehnmittelgelenke (IP). Dabei sind Schwellung als Zeichen der Synovitis, Druckschmerzhaftigkeit und Morgensteifigkeit von über 60 Minuten Dauer typische Symptome, die zu Beginn oft von Allgemeinsymptomen wie Abgeschlagenheit, Schwitzen und subfebrilen Temperaturen begleitet werden können. Bei unzureichender Therapie kann es langfristig zur Gelenkdestruktion mit Gelenkdeviation und Funktionsverlust kommen. Bei circa 50% der Patienten kommt es zusätzlich zu extraartikulären Manifestationen wie z.B. Rheumaknoten, AA-Amyloidose, rheumatoider Vaskulitis oder sehr selten Glomerulonephritis. Insgesamt haben RA-Patienten ein erhöhtes Risiko kardiovaskulär (Chung et al., 2014; Fischer et al., 2004; Nicola et al., 2005) oder pulmonal (Cortet et al., 1997) zu erkranken.

Um in einem möglichst frühen Stadium die RA diagnostizieren zu können, wurden in Kooperation zwischen der *American College of Rheumatology* (ACR) und der *European League Against Rheumatism* (EULAR) die ACR/EULAR Klassifikationskriterien für die rheumatoide Arthritis von 2010 erstellt. Die Kriterien sollen helfen, eine frühe Arthritis als rheumatoide Arthritis klassifizieren zu können, denn ein frühzeitiger Therapiebeginn ist

entscheidend für die weitere Prognose (Emery, 1995; Machold et al., 1998). Es werden max. zehn Punkte vergeben, ab einem Wert von 6 Punkten kann die Erkrankung als RA klassifiziert werden. Für folgende Kategorien werden Punkte vergeben: Anzahl der betroffenen Gelenke (max. 5 Punkte), serologische Marker (max. 3 Punkte), akute Phase Parameter (max. 1 Punkt) und Symptombdauer (max. 1 Punkt). Ein betroffenes Gelenk wird gemäß den Klassifikationskriterien definiert als ein geschwollenes oder druckschmerzhaftes Gelenk. Ausgeschlossen von dieser Bewertung sind das Daumensattelgelenk, das Großzehengrundgelenk sowie die Finger- und Zehenendgelenke, da diese bevorzugt bei Arthrose oder anderen entzündlichen Gelenkserkrankungen befallen sind. In der Serologie werden die *IgM- Rheumafaktoren* (RF) und die Autoantikörper gegen citrullinierte Peptide/Proteine (*anti-cyclic citrullinated protein antibodies*, anti-CCP-AK) untersucht. Als akute Phase Parameter eignen sich das C-reaktive Protein (CRP) und die Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG). Die Symptombdauer bezieht sich auf das Gelenk, das zum Zeitpunkt der Untersuchung am längsten betroffen ist. Ab einer Mindestdauer von 6 Wochen wird ein Punkt vergeben. Anwendbar sind die Kriterien jedoch nur, wenn eine sichere Synovitis mit Gelenkschwellung in mindestens einem Prädilektions-Gelenk (s.o.) vorliegt und andere Ursachen ausgeschlossen werden können, wie z.B. degenerative Gelenksveränderungen, Trauma oder andere entzündliche Erkrankungen. Die primäre Diagnostik, die sich v.a. auf Anamnese und klinische Untersuchung fokussieren sollte, kann durch weitere Laboruntersuchungen und Bildgebungen gesichert werden. So kann die Sonographie Gelenkergüsse und vermehrte Vaskularisierung in der proliferierten Gelenkschleimhaut als frühestes Zeichen noch reversibler struktureller Veränderungen der rheumatoiden Arthritis nachweisen (Joshua et al., 2006; Strunk et al., 2010). Vorteil ist unbestritten die einfache und kostengünstige Verfügbarkeit, jedoch steht dem eine sehr untersucherabhängige Evaluation gegenüber. Die röntgenologische Untersuchung dient vor allem der Erkennung von erosiven Gelenkveränderungen, als Ausgangsbefund für die Verlaufsbeurteilung sowie zum Ausschluss von Frakturen oder anderen Knochenprozessen. Jedoch ist es nicht als diagnostisches Mittel für eine frühe RA geeignet, denn selbst eine aggressive Form der RA benötigt zur Ausbildung von Erosionen mindestens 6-24 Monate (Machold et al., 2002).

Zur Beurteilung der Krankheitsaktivität wurde von der EULAR der DAS28-Score (*Disease Activity Score 28*) entwickelt. Diese quantitative Beurteilung des Krankheitszustandes ermöglicht einerseits verschiedenen Untersuchern den Krankheitsverlauf abzuschätzen. Andererseits ist es ein zusätzliches Mittel medikamentöse Therapieerfolge zu erfassen, was

z.B. auch bei klinischen Studien verwendet wird. Der DAS28-Score berechnet sich aus folgenden vier Parametern: Die Anzahl der geschwollenen oder schmerzhaften Gelenke, die Blutsenkungsgeschwindigkeit und die subjektive Einschätzung des Krankheitszustandes durch den Patienten selbst, angegeben durch die visuelle Analogskala von 0-100 mm mit 100 mm als schlechtmöglichste Bewertung der Symptome. Mit einer vorgegebenen Formel lässt sich durch diese 4 Parameter der Punktwert bestimmen (Prevoo et al., 1995). Ein DAS28 > 5,1 spricht für eine hohe Aktivität, ein Wert zwischen 3,2 – 5,1 deutet auf eine mittlere Krankheitsaktivität hin und ein Wert < 3,2 bedeutet fehlende bis geringe Krankheitsaktivität. Ein Wert unter 2,6 wird als Remission gewertet (Anderson et al., 2012). Liegen keine BSG-Werte vor, so kann auch das CRP verwendet werden. Der daraus ermittelte DAS28-CRP reagiert schneller auf kurzfristige Veränderungen der Krankheitsaktivität (van Leeuwen et al., 1993) und fällt im Vergleich zum DAS28-BSG meist geringer aus (Matsui et al., 2007).

2.9.3. Pathogenese

Die rheumatoide Arthritis, eine Autoimmunerkrankung durch Verlust der Selbsttoleranz, ist in seiner Ausprägung, Erscheinung und therapeutischem Ansprechen von Patient zu Patient sehr unterschiedlich. Diese Problematik verdeutlicht eindrucksvoll, dass die Pathogenese komplex und heterogen ist und es vermutlich nicht "die eine Ursache" gibt. So wurden in den letzten Jahren viele Faktoren entdeckt, die Einfluss auf die Krankheit haben. Welche Faktoren jedoch gemäß dem Prinzip "Henne und Ei" zuerst da waren, bzw. welchen Faktoren eine Kausalität zugesprochen werden kann, und welche Veränderungen eher als Folge der Erkrankung angesehen werden können, ist im Moment noch schwer zu bestimmen. Neben genetischen und epigenetischen Faktoren spielen auch Umweltfaktoren, Infektionen, die Dysfunktion von T-Zellen bzw. des angeborenen Immunsystems sowie lokale Veränderungen im Gelenk selber eine Rolle.

Durch quantitative genetische Analysen wird geschätzt, dass 60% der RA-Fälle genetisch bedingt sind. Eine Metaanalyse über sogenannte genome-wide association studies (GWASs), die annähernd Daten von 30.000 RA-Patienten und über 70.000 gesunden Kontrollspendern eingeschlossen haben, konnte 101 Gen-Loci identifizieren, die mit einem erhöhten RA-Risiko behaftet waren (Okada et al., 2014). Das *human leukocyte antigen* (HLA) – Gen zeigte dabei die größte Assoziation mit der RA (Deighton et al., 1989). Gewisse HLA-DRB1 Allele, die in einem Abschnitt der hypervariablen Antigen-Bindungsstelle eine spezifische Aminosäureabfolge von fünf Aminosäuren kodieren, das auch als *shared-epitope* (SE)

bezeichnet wird, zeigen eine starke Disposition zur RA (Gregersen et al., 1987). Ebenso konnte ein Zusammenhang zwischen SE-Allelen, die eine bedeutende Rolle für die T-Zell-Rezeptor-Bindung spielen, und das Auftreten von anti-CCP-Antikörpern ermittelt werden (Auger et al., 2005; Bas et al., 2000; Shimane et al., 2013; van Gaalen et al., 2004). Zwillingsstudien mit monozygoten Zwillingen zeigten jedoch gerade einmal eine Konkordanz von 15,4 % (Silman et al., 1993). Dies lässt vermuten, dass genetische Faktoren nicht alleine ursächlich für die RA sein können, sondern z.B. auch epigenetische Veränderungen, wie im entsprechenden Kapitel bereits erwähnt, dazu beitragen. Ebenso von Bedeutung scheinen auf APC exprimierte *Toll-like-Rezeptoren* (TLR) zu sein, denn sie erkennen nicht nur pathogene Moleküle, sondern können auch durch endogene Antigene, sog. *danger-associated molecular patterns* (DAMPs), aktiviert werden. Dies führt zur Aktivierung der APC und über Präsentation an MHCII-Molekülen zur Stimulierung der CD4⁺-T-Zellen. V.a. Th1- und Th17-Zellen sezernieren daraufhin u.a. IFN γ , TNF, IL-6, IL-17 und IL-22, und führen zum Erhalt der chronischen Inflammation einerseits durch Aktivierung und Chemotaxis von Monozyten, Makrophagen, neutrophile Granulozyten und synoviale Fibroblasten (Crowston et al., 1997; Isler et al., 1993; McInnes et al., 1997; Stout, 1993) und andererseits durch die direkte pro-inflammatorische Wirkung der Zytokine (Eastgate et al., 1988; Okamoto et al., 1997; Saxne et al., 1988; Smolen and Steiner, 2003). Neben den bereits genannten pro-inflammatorischen Wirkungen (siehe Kapitel Th17-Zellen) bewirkt IL-17 einerseits durch seine antiapoptische Wirkung eine synoviale Hyperplasie und andererseits stimuliert es über RASF die Angiogenese im synovialen Gewebe (Pickens et al., 2010). Die im Verlauf auftretende Knorpeldestruktion wird über IL-17A durch Induktion der SF zur Sekretion von Matrixmetalloproteasen und Kollagenasen verursacht (Smolen et al., 2007). IL-6 rekrutiert neutrophile Granulozyten (Lally et al., 2005), die durch Sauerstoffradikale und proteolytische Enzyme weiter zur Gelenkdestruktion beitragen. Zur Knochenerosion kommt es durch verstärkte Osteoklastogenese über das RANK/RANKL-System, deren Expression durch IL-17, IL-6 und TNF reguliert wird (Schett, 2007). Die über Tregs vermittelte Regulationsmechanismen des adaptiven Immunsystems scheint bei RA-Patienten ebenfalls gestört zu sein. So scheinen Tregs bei einer aktiven RA die verstärkte Zytokinsekretion durch T-Zellen und Monozyten nicht kontrollieren zu können (Ehrenstein et al., 2004). Auch die synovialen Fibroblasten scheinen bei RA-Patienten veränderte Eigenschaften zu besitzen. So gehen sie seltener Apoptose ein und bewirken durch Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen einerseits eine lokal-destruktive Wirkung (Ehrenstein et al., 2004) und tragen andererseits zur Erhaltung der Entzündungsreaktion bei. Durch die Gewebeschädigung an

sich kommt es zur vermehrten Freisetzung von DAMPs, die wiederum zur Aktivierung von antigen-präsentierenden Zellen führen. Dies endet in einem Teufelskreis, denn es entsteht dadurch eine sich selbst aufrechterhaltende Entzündungsreaktion (Takagi, 2011). Weitere Risikofaktoren sind Rauchen, das bei gleichzeitigem Vorhandensein von SE zu einer erhöhten Citrullierungsrate der Proteine führt und somit vermutlich zur Entwicklung von anti-CCP-AK beiträgt (Klareskog et al., 2006; van der Helm-van Mil et al., 2007). Ebenso scheint neben Übergewicht (de Hair et al., 2013; Karlson et al., 1999; Stolt et al., 2003) sowohl Stress (Cutolo and Straub, 2006) als auch erhöhte Werte an Östrogenen (Cutolo, 2000) das Risiko zur Entwicklung der rheumatoiden Arthritis zu erhöhen.

2.9.4. Therapie

Bei der richtigen Therapie der RA spielt vor allem der frühzeitige Beginn eine entscheidende Rolle, denn eine Verzögerung ist mit einem schlechteren Verlauf assoziiert (Lard et al., 2001; Nell et al., 2004; van der Linden et al., 2010). Das Ziel der Behandlung soll die schnellstmögliche Remission sein, denn die Wahrscheinlichkeit auf eine erfolgreiche Remission korreliert mit einer kürzeren Symptombdauer und der Zeit bis zum Ansprechen der Medikation. Gemäß Definition ist eine Remission bei einem DAS28 < 2,6 erreicht. Bei langjähriger Krankheitsgeschichte kann eine Remission unrealistisch sein. Hierbei soll eine möglichst geringe Krankheitsaktivität angestrebt werden.

Die folgenden Handlungsempfehlungen sind aus den S1-Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie zur sequenziellen medikamentösen Therapie der rheumatoiden Arthritis 2012 entnommen. Wurde die Diagnose einer RA gestellt, so sollte die Therapie mit *disease-modifying antirheumatic drugs* (DMARDs) begonnen werden. Hierfür ist Methotrexat (MTX) das Mittel der ersten Wahl, denn kein anderes DMARD oder Biologikum konnte bisher die klinische Wirksamkeit von MTX übertreffen (Gaujoux-Viala et al., 2010; Nam et al., 2010). Empfohlen wird eine Initialdosis von 15 mg/Woche sowie eine wöchentliche Folsäuresubstitution von 5-10 mg. Bei etwaigen Unverträglichkeiten oder Kontraindikationen gegen MTX wird die Gabe von Leflunomid oder Sulfasalazin empfohlen. Parallel zur MTX-Substitution ist eine Glukokortikoidgabe in niedriger (< 10 mg Prednisolon) oder mittlerer (initial 10-20 mg/d Prednisolon) Dosis durchzuführen. Prednisolon funktioniert einerseits bis zum Beginn der MTX-Wirkung als Überbrückungstherapie und kann andererseits aufgrund seiner antiinflammatorischen und krankheitsmodifizierenden Wirkung eine erhöhte Remissionsrate erreichen (Hafstrom et al.,

2009). Aufgrund des bekannten breiten Nebenwirkungsprofils sollte die Prednisolondosis nach 6-12 Wochen auf unter 7,5 mg pro Tag reduziert werden. Nach Beginn der Therapie sollten häufige klinische Verlaufskontrollen erfolgen, je nach Krankheitsintensität zu Beginn alle 1-3 Monate. Es konnte sogar gezeigt werden, dass eine engmaschige Verlaufskontrolle die Remissionsraten verbessern (Klarenbeek et al., 2011; Mease, 2010). Zur Verlaufsbeurteilung eignet sich DAS28, aber auch radiologische Kontrollen sollten spätestens 12 Monate nach Therapiebeginn sowie darauffolgend in einem jährlichen oder zweijährigen Rhythmus erfolgen, denn auch bei geringer oder subklinischer Krankheitsaktivität kann es zu strukturellen Schäden kommen (Rezaei et al., 2012). Sechs Wochen nach Beginn der medikamentösen Behandlung sollte der Therapieerfolg reevaluiert werden. Bei unzureichender Reduzierung der Krankheitsaktivität kann entweder die MTX-Dosis auf 20-25 mg/Woche optimiert oder die Prednisolongabe gesteigert werden. Wurden nach insgesamt 12 Wochen keine zufriedenstellenden Ergebnisse erreicht, kann entweder auf eine DMARD Zweierkombinationstherapie aus MTX und Leflunomid oder auf eine Dreifachkombinationstherapie aus MTX, Sulfasalazin und Hydroxychloroquin umgestellt werden.

Liegen mehrere ungünstige Prognosefaktoren, wie z.B. frühes Auftreten von Erosionen, Positivität für RF und anti-CCP oder eine ausgeprägte Entzündungsaktivität vor, so kann anstatt einer DMARD-Kombinationstherapie direkt auf eine Biologikatherapie in Kombination mit MTX umgestiegen werden. Ansonsten wird erst nach Ausschöpfung einer 3-monatigen DMARD-Kombinationstherapie die Biologikagabe in Kombination mit MTX empfohlen. Als Biologika eignen sich die TNF- α -Inhibitoren Adalimumab, Certolizumab, Etanercept, Golimumab und Infliximab oder aber Abatacept (Fusionsprotein aus Fc-Teil von humanem IgG1 und extrazellulärer Domäne von CTLA-4 gegen CD80 und CD86) und Tocilizumab (humanisierter anti-IL-6-Rezeptor-AK). Die Biologikatherapie sollte stets in Kombination mit MTX erfolgen. Ausnahme davon ist Tocilizumab, das sowohl in Kombination als auch als Monotherapie gleichwertige Effektivität zeigt und bei Unverträglichkeit oder Kontraindikationen von MTX gegeben werden kann. Bei Kontraindikationen für MTX kann auch auf die Kombination von Leflunomid und Rituximab gewechselt werden, deren Wirksamkeit bereits in Studien belegt wurde (Chatzidionysiou et al., 2012). Ein Biologika-Wechsel bei nicht ausreichendem Ansprechen ist nach 3-6 Monaten indiziert. Hierfür eignen sich v.a. Golimumab, Abatacept, Rituximab (anti-CD20-AK), Tocilizumab, sowie Adalimumab, Etanercept und Infliximab. Wurde selbst nach Ausschöpfung all jener Therapien keine ausreichende Besserung der Krankheitsaktivität

erreicht, so ist der Wechsel zu Medikamenten mit unterschiedlichem Wirkprinzip empfohlen. Anakinra (humaner Interleukin-1-Rezeptor-AK), Cyclophosphamid (Alkylanz) oder andere klassische DMARDs können hierbei als Ausweichpräparat verwendet werden.

3. Zielsetzung der Dissertation

Zwei wichtige Erkenntnisse der letzten Jahre waren Grundlage dieser Dissertation. Zum einen konnte bis dato gezeigt werden, dass Th-Zellen von Mäusen linienspezifische Veränderungen epigenetischer Histonmodifikationen im Bereich der Schlüsselgenen RORC und IL17 aufwiesen.

Zum anderen konnte beobachtet werden, dass Patienten mit rheumatoider Arthritis einen verstärkten Th17-Phänotyp zeigten, dessen Ausprägung mit der Krankheitsaktivität korrelierte. Dies führte zur Hypothese, dass bei RA-Patienten eine verstärkt permissive Histonmodifikation in den Th17-Schlüsselgenen zur erhöhten Th17-Frequenz beiträgt.

In der vorliegenden Dissertation sollen Veränderungen epigenetischer Histonmodifikation zwischen den verschiedenen Th-Subpopulationen einerseits und bei Patienten mit rheumatoider Arthritis andererseits genauer untersucht werden. Daraus ergaben sich folgende spezifische Fragestellungen:

1. Werden die Gene IL17A und RORC an ihren Promotoren und ausgesuchten CNS-Regionen je nach Th-Differenzierungsbedingung durch ein unterschiedliches Histonmodifikationsmuster charakterisiert?
2. Ist nach Antigenkontakt eine Veränderung der Histonmodifikation zu erkennen?
3. Zeigen Patienten mit rheumatoider Arthritis eine verstärkt permissive Histonmodifikation in den oben genannten Genen?

4. Materialien

4.1. Verwendete Geräte

Bezeichnung	Modell	Hersteller
Biological Safety Cabinets	NU-437 Class II, Type A2	Nuaire
Brutschrank	HERAcell 240 CO ₂ -Inkubator	Thermo Scientific
Durchflusszytometer	Cytomics FC 500	Beckman Coulter
Elektrophorese Horizontal-Kammer	BlueMarine TM 100	Serva Electrophoresis
Elektrophorese Spannungsquelle	Consort E834 Microcomputer	Consort
MACS® Separators	Mini-/Midi-/Octo-/Quadro-MACS TM Separation Unit	Miltenyibiotec
Magnetrührer	MR 3001	Heidolph Elektro
Orbital Platform Shaker	Unimax 1010	Heidolph
pH-Meter	In Lab Routine Pro	Mettler-Toledo
Real-Time PCR-Maschine	7500 Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems
Schüttelwasserbad	GFL 1083	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH
Sonicator	UCD300 - Bioruptor Next Generation System	Diagenode
Taumelrollenmischer	RM 5-V	CAT Ingenieurbüro M.Zepperer GmbH
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf
Temperierbare	Duomax 1030	Heidolph
Transilluminator mit Monochromaler/Farb-Kamera	E.A.S.Y® Doc plus system mit E.A.S.Y® B-1448-F	Herolab
Vortexgerät	Reax 2000	Heidolph
Zellzähler	Z1 Z2	Beckman Coulter
Zentrifugen	Centrifuge 5417R, 5415D, 5415R, 5430	Eppendorf

4.2. Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Modell	Hersteller
Serologische Pipetten	5ml, 10ml, 25ml	Greiner Bio-One, Sarstedt
Kulturplatte	Costar® 24 Well	Corning Incorporated

Real-time PCR Reaktionsplatte	Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode (0,1ml)	Applied Biosystems
Adhäsionsfilm für Reaktionsplatte	MicroAmp® Optical Adhesive Film	Applied Biosystems
Platten für ChIP	Nunc-Immuno Module, MaxiSorp	Thermo Scientific
Abdeckfolie	Sterile Folie für 96-well plates	Thermo Scientific
MACS® Cell Separation Columns	MS und LS Säulen	Miltenyibiotec
Eppendorfgefäß	0,5 ml und 1,5 ml	Eppendorf

4.3. Chemikalien und Reagenzien

Name	Hersteller
6-fach DNA loading Dye	Thermo Scientific
Agarose	Merck
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Merck
Bovines Serum Albumin (BSA)	Merck
Chlorwasserstoff 37% (HCl)	Merck
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
Dulbecco's Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (DPBS)	Invitrogen
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck
Essigsäure (CH ₃ COOH)	Merck
Ethanol	Merck
Fetales Kälberserum (FCS)	Invitrogen
Ficoll (Lymphoflot)	Bio-Rad Medical Diagnostics
Formaldehyd 37% (CH ₂ O)	Merck
GeneRuler DNA ladder 1000 Basenpaare (bp)	Fermentas
GeneRuler DNA ladder 100 bp	Fermentas
Glycin (C ₂ H ₅ NO ₂)	Merck
Henksche Lösung mit Phenolrot	Apotheke Klinikum der Universität München
Heparin-Natrium-Salz	Braun
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (Hepes)	Merck
Ionomycin, Kalzium-Salz	Merck
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃)	Merck
L-Glutaminsäure (C ₅ H ₉ NO ₄)	Gibco
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck
Monensin, Natrium-Salz	Sigma
Natriumazid (NaN ₃)	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Merck

Natriumdeoxycholat (C ₂₄ H ₃₉ NaO ₄)	Merck
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck
Normales humanes Serum (NHS)	Forschungslabor Rheumaeinheit München
Natriumlaurylsulfat = Sodium dodecylsulphate (SDS)	Merck
NP-40	Calbiochem (EMD Millipore)
Paraformaldehyd	Sigma
Penicillin G/Streptomycin	Gibco
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) (C ₇ H ₇ O ₂ SF)	Roche
Phorbol 12-myristat 13-azetat (PMA)	Sigma
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline, PBS)	Apotheke Klinikum der Universität München
Power SYBR® Green PCR Master Mix	Applied Biosystem
Protease Inhibitor Cocktail Tablets (complete, EDTA-free)	Roche
Proteinase K	Invitrogen
RPMI 1640 (RPMI)	Invitrogen
Saponin	Sigma
Schafserythrozyten = Sheep Red Blood Cells (SRBC)	Fiebig-Nährstofftechnik
SYBR Safe DNA Gel Stain	Invitrogen
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	Merck
Triton® X-100	Sigma

4.4. Kit-Systeme

Name	Hersteller
GenElute PCR Clean-Up Kit	Sigma Aldrich
CD4+ T Cell Isolation Kit II human	Miltenyi Biotec
Memory CD4+ T Cell Isolation Kit II human	Miltenyi Biotec
Naive CD4+ T Cell Isolation Kit II human	Miltenyi Biotec

4.5. Puffer

4.5.1. Verwendete Puffer und Lösungen:

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
4 M NaOH	

0,1 M NaOH	
1 M TrisHCL, pH 9,5	
1 M TrisHCL, pH 8,0	
0,5 M EDTA, pH 8,0	
10 % NaN ₃	
10-fach NH ₄ Cl	1,5 M NH ₄ Cl, 100 mM KHCO ₃ , 1,0 mM EDTA
1-fach NH ₄ Cl	0,15 M NH ₄ Cl, 10 mM KHCO ₃ , 0,1 mM EDTA
FACS Puffer (FACS-PBS)	PBS supplementiert mit: <ul style="list-style-type: none"> • 2 % FCS • 0,01 % NaN₃
5 % Saponin	5 % Saponin in PBS
FACS-Saponin	2 % Saponinlösung in FACS-PBS
MACS Puffer	<ul style="list-style-type: none"> • 0,5 % BSA • 2 mM EDTA in PBS lösen und steril filtrieren
RPMI / P S / L-Glu	RPMI 1640 supplementiert mit: <ul style="list-style-type: none"> • 2 mM L-Glutaminsäure • 50 U/ml Penicillin G • 50 µg/ml Streptomycin
Zellkulturmedium	10 % NHS in RPMI / P S / L-Glu
50-fach TRIS-Acetat-EDTA(TAE)-Puffer	2 M TRIS, 1 M Essigsäure, 0,05 M EDTA
1-fach TAE-Puffer	40 mM TRIS, 20 mM Essigsäure, 1mM EDTA
1 % Agarose	1 % Agarose in 1-fachem TAE-Puffer
4 % Paraformaldehyd	4 % Paraformaldehyd in PBS, pH 7,4

4.5.2. Puffer und Lösungen für den ChIP-Assay

Puffer	Zusammensetzung
1,25 M Glycin	
Coating Buffer (CB)	Pro Well 100µl vom Antikörper-Mastermix:
	100µl CB + 1,0µl Rb-IgG
	5µl anti-H3K4me3
	4µl anti-H3ac
	2µl anti-H3K27me3
ELISA Wash Buffer Powder (eBioscience)	In 1l MilliQ Wasser lösen
Re-Crosslinking Puffer	<ul style="list-style-type: none"> • 7,5 mM TrisHCl (pH 8,0) • 0,75 mM EDTA (pH 8,0) • 0,5 % SDS

	<ul style="list-style-type: none"> • 0,5 mg/ml Proteinase K
Sonication Puffer	<ul style="list-style-type: none"> • 50 mM Hepes (pH 7,9) • 140 mM NaCl • 1 mM EDTA • 1 % Triton X-100 • 0,1 % Na-Deoxycholat • 0,1 % SDS • 0,5 mM PMSF <p>In MilliQ Wasser verdünnen und zu 50ml eine Tablette des Protease Inhibitor Cocktail hinzugeben.</p>
Swelling Puffer	<ul style="list-style-type: none"> • 25 mM Hepes (pH 7,8) • 1,5 mM MgCl₂ • 10 mM Kcl • 0,1 % NP-40 • 1 mM DTT • 0,5 mM PMSF <p>In MilliQ Wasser verdünnen und zu 50ml eine Tablette des Protease-Inhibitor Cocktails hinzugeben.</p>
TE Puffer	<ul style="list-style-type: none"> • 10 mM TrisHCl (pH 8,0) • 1 mM EDTA (pH 8,0) <p>In MilliQ Wasser lösen.</p>
Wasch Puffer A	<ul style="list-style-type: none"> • 50 mM Hepes (pH 7,9) • 500 mM NaCl • 1 mM EDTA • 1 % Triton X-100 • 0,1 % Na-Deoxycholat • 0,1 % SDS • 0,5 mM PMSF <p>In MilliQ Wasser verdünnen und zu 50ml eine Tablette des Protease Inhibitor Cocktails hinzugeben</p>

4.6. Antikörper und Zytokine

4.6.1. Antikörper für Oberflächenfärbungen

Antikörper	Markierung	Klon	Isotyp	Hersteller
anti-CD3/CD4	FITC und PE	SK7 und SK3	Maus IgG ₁	BD Pharmingen
anti-human CD45RO	PE	UCHL1	Maus IgG _{2a}	BD Pharmingen
anti-human CD45RA	FITC	HI100	Maus IgG _{2b}	BD Pharmingen

anti-human CD27	PE	M-T271	Maus IgG ₁	BD Pharmingen
anti-human CD27	FITC	M-T271	Maus IgG ₁	BD Pharmingen

4.6.2. Antikörper für intrazelluläre Färbungen

Antikörper	Markierung	Klon	Isotyp	Hersteller
anti-human-IL-4	APC	MP4-25D2	Ratte IgG ₁	BioLegend
anti-human-IL-9	PE	MH9A4	Maus IgG _{2b}	BioLegend
anti-human-IL-17	PE/Cy7	BL168	Maus IgG ₁	BioLegend
anti-human-Interferon γ (anti-IFN- γ)	FITC	4S.B3	Maus IgG ₁	BD Pharmingen

4.6.3. Antikörper für Zellkulturen

Antikörper	Endkonzentration in d. Zellkultur	Klon	Isotyp	Hersteller
anti-CD3	1 μ g/ml	OKT3	Maus IgG	American Type Culture Collection
anti-CD28	1 μ g/ml	CD28.2	Maus IgG ₁	BD Pharmingen
anti-IL-4	10 μ g/ml	25D2	Ratte IgG ₁	Thermo Scientific
anti-IFN γ	10 μ g/ml	polyklonal	Kaninchen	Thermo Scientific

4.6.4. Zytokine für Zellkultur

Antikörper/Zytokin	Endkonzentration in der Zellkultur	Hersteller
Rekombinantes humanes IL-1 β /IL-1F2	10 η g/ml	R&D Systems
Rekombinantes humanes IL-2	10 U/ml	Endogen
Rekombinantes humanes IL-4	31,25 η g/ml	Endogen
Rekombinantes humanes IL-12	40 η g/ml	R&D Systems
Rekombinantes humanes IL-21	100 η g/ml	Invitrogen
Rekombinantes humanes IL-23	20 η g/ml	R&D Systems
Rekombinantes humanes TGF β -1	5 η g/ml	R&D Systems

4.6.5. Antikörper für den ChIP-Assay

Antikörper	Klon	Isotyp	Host Species	Hersteller
Rabbit IgG-Reagent Grade	polyklonal	IgG	Kaninchen	Sigma
Anti-acetyl Histone H3	polyklonal	k.A.	Kaninchen	Millipore
Anti-trimethyl-Histone H3(Lys4)	polyklonal	k.A.	Kaninchen	Millipore
Anti-trimethyl-Histone H3(Lys27)	polyklonal	IgG	Kaninchen	Millipore

4.7. Primer für Real-Time PCR Analysen

Gen-Loci	„Forward Primer“	„Reverse Primer“
IL17A Promotor	5'-GTG ACC ACA GAA GGA GAA AAG CC-3'	5'-ATC AGC AAG AGC ATC GCA CG-3'
IL17 CNS1	5'-CCC TAC TT TCA GTG ACA TCC GTT C-3'	5'-TGG TGG ACT TCC CTT TGG TAA TG-3'
IL17 CNS5	5'-GGT TGA GAA GCC CAG GAA TGT G-3'	5'-AAG TGC GAC TGT CCC CCT TGT AAG-3'
RORC Promotor	5'-TCT CCC CTA TGC CTG TCA CCT G-3'	5'-TGA TTT TGC CCA AGG ACT CAC AC-3'
RORC CNS3	5'-CTC TGG AAA GGA GGA TGT CTT GG-3'	5'-CTC TTA CCA TTG CTG CTG TCA GG-3'
RORC CNS5	5'-ACG AGA CGG CAG AAG AGG GAA G-3'	5'-AAA CAG CAG AGC AGG AGT CAG C-3'
CD4 Promotor	5'-TAG GGT GTG GAG GAG CCT TG-3'	5'-GCG TAT CTG TGT GAG GAC TTG G-3'
MYOD1 Promotor	5'- TTG CCA CAA CGG ACG ACT TC-3'	5'-GTG CTC TTC GGG TTT CAG GAG-3'

4.8. Humane Zellen

Humane Blutzellen wurden durch die Abnahme von heparinisiertem venösem Blut aus der Vena cubitalis gewonnen. Den Patienten wurde hierfür 80-120ml, den gesunden Spendern aus der Kontrollgruppe 300ml venöses Blut entnommen. Alle Blutspender gaben hierfür eine

schriftliche Einverständniserklärung ab. Die ethische Zustimmung wurde durch das Ethische Komitee des Klinikums der Ludwig-Maximilians-Universität München erteilt.

4.9. Software

Programm	Entwickler	Verwendete Funktionen
Vista Genome Browser	Genomics Division of Lawrence Berkeley National Laboratory	Lokalisierung der CNS-Regionen
ECR Browser	Genome Biology Division and Energy, Environment, Biology and Institutional Computing, Lawrence Livermore. National Laboratory, Livermore Department of Genome Sciences, Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley	Lokalisierung der CNS-Regionen
MacVector, Version 12.0.3	MacVector	Primer-Konzipierung für real-time PCR
Corel Draw, Version 11.633	Corel Corporation	Erstellung von Graphen
GraphPad Prism, Version 5.0a	GraphPad Software	Erstellung von Graphen, Signifikanzberechnung
Microsoft Excel, Version 11.4.1	Microsoft Corporation	Erstellung von Graphen; Signifikanzberechnung

5. Methoden

5.1. Studienpopulation

Da aus verschiedenen Veröffentlichungen der Einfluss von bestimmten Medikamenten auf epigenetische Modifikationen bekannt ist (Chan et al., 2005; Krukowski et al., 2011), wurden nur sogenannte therapienaive Patienten in die Studie aufgenommen, die bisher keine Glukokortikoide oder DMARDs erhalten hatten. Um den möglichen Einfluss von Störgrößen wie Alter und Geschlechterverteilung auf die Ergebnisse so gering wie möglich zu halten, wurde bei der Zusammenstellung der Kohorte darauf geachtet, dass jene Störvariablen zwischen den Gruppen vergleichbar sind.

Folgende Laborparameter sowie klinische Angaben wurden erhoben: Alter, Geschlecht, Krankheitsdauer, etwaige Einnahme von nichtsteroidalen Antiphlogistika (NSAID = non-steroidal anti-inflammatory drugs), Anzahl der schmerzhaften Gelenke (TJC = Tender Joint Count), Anzahl der geschwollen Gelenke (SJC = Swollen Joint Count), Erosionen im initialen Röntgen sowie CRP, Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG), Rheumafaktor und anti-CCP. Desweiteren wurde zur quantitativen Beurteilung des Krankheitszustandes der DAS28 (Disease Activity Score 28) –Score sowie der Punktwert der ACR-Kriterien 2010 berechnet.

5.2. Isolierung CD4 positiver T Zellen

Die Abnahme venösen Blutes erfolgte jeweils durch 20 ml große mit 1 ml Heparin gefüllte Spritzen. Das Blut wurde mit demselben Volumen an PBS auf ein Gesamtvolumen von 40 ml verdünnt, mit 11 ml Ficoll unterschichtet und für 20 min mit 400 x g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach der Zentrifugation lagerten sich die mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (= Peripheral Mononuclear Blood Cell = PBMC) direkt über der Ficollschicht an. Die PBMC wurden vorsichtig geerntet und mit PBS einmal gewaschen. Der Waschvorgang wurde wie folgt durchgeführt: PBMC wurden mit PBS auf 50 ml Gesamtvolumen verdünnt und für 5 min mit 723 x g bei 15°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet mit 10 ml PBS resuspendiert und wieder auf ein Gesamtvolumen von 50 ml mit PBS verdünnt. Nach der Zellkonzentrationsmessung wurden circa 200.000 Zellen für die extrazelluläre FACS-Messung entnommen.

Im nächsten Isolationschritt erfolgte wie beschrieben (Rosenberg and Lipsky, 1979) das sogenannte „Rosetting“. Dabei wurden die zentrifugierten PBMC auf eine Konzentration von 1 Millionen Zellen/ml mit Zellkulturmedium RPMI verdünnt und diese Zellsuspension zu je 5 ml Einheiten auf mehrere Falcons verteilt. Die 1×10^6 PBMC/ml RPMI wurden mit demselben Volumen einer Mixtur aus 50% Schaferythrozyten (SRBC, annähernd 2×10^6 Zellen/ml) und 50% fetales Kälberserum (FCS) für 10 min bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert. SRBC besitzen das Oberflächenprotein CD58, das eine Bindung mit CD2 eingehen kann, welches nur auf den T-Lymphozyten und Natürlichen Killerzellen exprimiert wird. Andere Zellen der PBMC wie z.B. Monozyten oder B-Lymphozyten besitzen nicht das Oberflächenprotein CD2 und werden somit nicht durch die Schaferythrozyten gebunden. Nach 10-minütiger Inkubation im Wasserbad, das die Bildung der Bindungen beschleunigt, wurde die Zellsuspension bei $255 \times g$ für 10 min bei 15°C zentrifugiert und anschließend für weitere 45 min bei 4°C inkubiert. Durch die niedrige Temperatur werden die Bindungen verstärkt um sie für nachfolgende Schritte robuster zu machen. Nach vorsichtigem resuspendieren wurden 11 ml Ficoll unterschichtet und für 20 min bei $400 \times g$ zentrifugiert. Durch die Bindung mit SRBC erhöht sich die Dichte der T-Lymphozyten und Natürliche Killerzellen, die dadurch während der Zentrifugation durch die Ficoll-Schicht hindurch diffundieren und als „Rosette-positive Zellen“ sedimentieren, wohingegen die restlichen PBMC (Rosette-negative Zellen, Monozyten und B-Zellen) über der Ficoll-Ebene bleiben. Der Überstand wurde abgesaugt und jedes Pellet mit 10ml 155 mM NH_4Cl kräftig resuspendiert. Das Ammoniumchlorid lysiert die Schaferythrozyten aufgrund der Hypoosmolarität. Dies macht sich durch Aufhellung der Suspension bemerkbar. Nach Neutralisierung mit PBS und einem Waschschrift blieb nach erfolgreicher Lyse ein gelbes Pellet übrig, das mit PBS erneut resuspendiert wird. Es erfolgte eine Zellkonzentrationsmessung und die Abnahme von 200.000 Zellen für die extrazelluläre FACS-Messung.

Die Rosette-positiven Zellen wurden im nächsten Schritt weiter entweder zu naiven CD4 positiven T-Zellen oder zu Gedächtnis-CD4 positiven T-Zellen selektiert. Durchgeführt wurde dies durch negative Selektion mittels magnetischer Zelltrennung gemäß dem Protokoll des Herstellers (Memory bzw. Naive CD4+ T Cell Isolation Kit II von Miltenyi Biotec). Dabei wurden 10×10^6 Rosette positive Zellen mit 40µl MACS Puffer resuspendiert und mit 10µl des Cocktails aus Biotin markierten Antikörpern gegen CD8, CD14, CD15, CD16, CD19, CD25, CD34, CD36, CD56, CD123, TCRg/d, HLA-DR, Glycophorin A und CD45RO

(zur Isolation von naiven CD4⁺ T-Zellen, "Naive CD4⁺ T Cell Biotin-Antibody Cocktail II") oder CD45RA (zur Isolation von Gedächtnis-CD4⁺ T Zellen, " Memory CD4⁺ T Cell Biotin-Antibody Cocktail") für 10 min bei 4°C inkubiert. Für die Selektion der Gedächtniszellen wurden im nächsten Schritt weitere 30 µl MACS Puffer sowie 20 µl Micro-Beads (magnetisch konjugierte Anti-Biotin Antikörper) für je 10 Millionen Zellen dazugegeben. Für die Isolation naiver CD4⁺ T-Zellen erfolgte nach der 10 min Inkubation bei 4°C zuerst ein Waschschrift und daraufhin die Inkubation mit 80 µl MACS Puffer und 20 µl Micro-Beads pro 1×10^6 Zellen. Sowohl bei der Isolation naiver als auch Gedächtnis-T-Zellen erfolgte die Inkubation mit Anti-Biotin Antikörper für 15 min bei 4°C. Anschließend wurden bis zu 1×10^8 magnetisch konjugierte Zellen beziehungsweise bis einer Gesamtzellanzahl von 2×10^9 Zellen nach einem Waschschrift mit PBS mit 1 ml MACS Puffer resuspendiert und auf zuvor mit 3 ml MACS Puffer gespülten LS-Säulen (large separation) pipettiert. Die LS-Säulen sind in einem magnetischen Feld angebracht, wodurch die mit Micro-Beads markierten Zellen in der Säule hängen bleiben und die gewünschten Zellen durch 3 Waschschriffe zu je 3 ml MACS Puffer ungehindert durch die Säule wandern können. Danach erfolgte erneut eine Zellkonzentrationsmessung und die Abnahme von 200.000 Zellen für die extrazelluläre FACS-Messung.

Drei Millionen der frisch isolierten CD4 positiven T-Zellen wurden als sogenannte Prä-Bedingung direkt nach Zellisolation mit Formaldehyd fixiert (siehe 5.6), wohingegen die anderen Zellen für 5 Tagen unter verschiedenen Bedingungen weiter stimuliert wurden (siehe 5.4).

5.3. Extrazelluläre Färbung mittels Durchflusszytometrie

Die Reinheit der isolierten Zellen wurde mittels Messung spezifischer Oberflächenmoleküle durch FACS (= fluorescence activated cell sorting) kontrolliert. Verwendet wurde dabei der Durchflusszytometer Cytomics FC 500 von Beckman Coulter.

Zu jeder Probe (2×10^5 Zellen) wurde 900 µl FACS-Puffer hinzugegeben, diese bei $3800 \times g$ für 2 min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Jede Probe wurde dann mit den entsprechenden fluoreszenzmarkierten Antikörper für 15 min bei 4°C inkubiert. CD4-positive naive T-Zellen wurden mit Antikörpern gegen CD3, CD4, CD27 und CD45RA, CD4-positive Gedächtnis-T-Zellen mit Antikörpern gegen CD3, CD4, CD27 und CD45RO inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 1 ml FACS-PBS gewaschen, mit 300µl FACS-PBS

resuspendiert und analysiert. CD3 ist ein Transmembranprotein, das zusammen mit dem T-Zell-Rezeptor zur Aktivierung von T-Lymphozyten dient und somit als Oberflächenmarker in der Zellisolation verwendet werden kann.

5.4. Generierung von Th0-, Th1-, Th2-, Th9- und Th17-Zellen

Die frisch isolierten CD4 positiven T-Zellen wurden für 5 Tage unter verschiedenen Differenzierungsbedingungen auf einer Costar® 24 Well-Platte bei 37°C und einer CO₂ Sättigung von 5% im Brutschrank weiter stimuliert. Die Platte wurde zuvor mit anti-CD3 (OKT3, 1µg / 1ml 50mM TrisHCl pH 9,5) über Nacht bei 4°C beschichtet und vor der Zellkultivierung zwei Mal mit Henkscher Lösung gewaschen. Das für die Zellkultur verwendete Zellmedium bestand aus RPMI 1640 einschließlich Streptomycin (50 µg/ml), Penicillin G (50 U/ml), L-Glutaminsäure und 10% NHS.

Zur Generierung aktivierter CD4 positiver T-Zellen wurden die frisch isolierten Zellen mit einer Konzentration von $0,63 \times 10^6$ Zellen/ml mit anti-CD28 (1 µg/ml) und IL-2 (1 µg/ml) im Zellmedium in ein Loch mit einem Gesamtvolumen von 1,2ml ausplattiert. Wurden keine weiteren neutralisierende Antikörper oder Zytokine hinzugefügt, wurde diese Stimulationsbedingung als Th0 bezeichnet. Die Th1-Differenzierungsbedingung wurde durch zusätzliche Gabe von rekombinantem humanem IL-12 (40 ηg/ml) und neutralisierendem anti-IL-4 (10 µg/ml) erreicht. Anti-IL-4 blockiert den IL-4R Signalweg und somit die Generierung von Eigenschaften eines Th2 Phänotyps. Die Th2- Differenzierungsbedingung wurde durch das Hinzufügen von anti-IFNγ (10 µg/ml) und IL-4 (31,25 ηg/ml) ermöglicht, wohingegen das Beifügen von TGFβ (5 ηg/ml) und IL-4 (31,25 ηg/ml) die Th9-Differenzierungsbedingung bildeten. Die Differenzierung zu Th17 Zellen wurde wie von Leipe et al. durchgeführt. Zusätzlich zu dem an der Platte gebundenen anti-CD3 wurde in das Kulturmedium neben anti-CD28 und IL-2 die neutralisierenden Antikörper anti-IFNγ (10 µg/ml), anti-IL-4 (10 µg/ml), sowie die Zytokine IL-1β (10 ηg/ml), IL-21 (100 ηg/ml) und IL-23 (20 ηg/ml) gegeben (Leipe et al., 2010).

Die Fähigkeit bestimmte Zytokine zu produzieren charakterisiert den T-Zell Phänotyp. Die Erfolgskontrolle der 5 Tage Differenzierung wurde zu Beginn der Versuchsreihe durch intrazelluläre FACS-Messung durchgeführt.

5.5. Intrazelluläre Färbung

5.5.1. Resting

Nach 5 Tagen Differenzierung wurden die Zellen geerntet, das heißt die Zellsuspension aus je einem Loch der Lochplatte wurde in je ein Proberöhrchen übertragen. Darauffolgend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, in Zellkulturmedium mit Il-2 (10 U/ml) resuspendiert und auf eine Zielkonzentration von einer Millionen Zellen pro ml verdünnt. Diese Zellsuspension wurde in Probenröhrchen mit Zwei-Positionen-Verschluss für 2 Tage im Brutschrank bei 37 Grad Celsius und 5% CO₂ in der Raumluft gelagert.

5.5.2. Restimulierung:

Die Restimulation am 7. Tag dient der Steigerung der Proteinproduktion der Zellen durch PMA und Ionomycin einerseits sowie der Sekretionshemmung jener Proteine mittels Monensin andererseits.

Zuerst wurde am 7. Tag die Zellsuspension mit PBS gewaschen und mittels Zellkulturmedium zu einer Konzentration von 2 Millionen Zellen/ml resuspendiert. Je 1 ml dieser Suspension wurde in ein Loch einer 24- Lochplatte pipettiert. Um den oben genannten Effekt zu bewirken, wurde anschließend 2 µl PMA (20 ηg/ml), 2 µl Ionomycin (0,75 ηg/ml) sowie 0,2 µl Monensin (1,39 ηg/ml) in je ein Loch der Lochplatte dazugegeben und diese für exakt 5 h im Brutschrank aufbewahrt.

5.5.3. Fixierung

Nach der 5-stündigen Inkubation wurden die Zellen in 1,4 ml große FACS-Tubes (1,4 ml große Proberöhrchen, die für die Durchflusszytometrie verwendet werden) übertragen, bei 3341 x g für 2 min zentrifugiert, Überstand abgesaugt und mit 1 ml PBS resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation und Entfernung des Überstandes wurde das Zellpellet mit 50 µl PBS resuspendiert und zur Fixierung der Zellen 150 µl 4% Paraformaldehydlösung in die Zellsuspension pipettiert. Nach gründlichem Vortexen wird die Lösung für 10 min in den Brutschrank gelegt. Nach erneutem Waschschrift konnten die Zellen in 200 µl PBS bei 4 Grad Celsius im Kühlschrank aufbewahrt werden.

5.5.4. Bestimmung der Zytokinproduktion

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Bestimmung der Zytokinproduktion der T Helferzellen

Hierfür wurde die Zellsuspension zuerst zweimal mit jeweils 1 ml FACS-Saponin gewaschen. Dies führt zu einer verstärkten Durchgängigkeit der Zellmembranen für Proteine, die wir zur Detektion der intrazellulären Zytokine benötigen. Um mögliche unspezifische Bindungen zu blockieren wurde das Zellpellet mit 100 µl eines Mastermix bestehend aus 92 µl FACS-Saponin, 4 µl Maus- und 4 µl Rattenserum resuspendiert und für 10 min bei 4 Grad Celsius im Kühlschrank inkubiert. Nach Inkubation erfolgte ein erneuter Waschschrift mit 1ml FACS-Saponin. Um ideale Bedingungen für die intrazelluläre Färbung zu schaffen wurden die 2 Millionen Zellen pro Kulturbedingung in 2 gleich große Volumina aufgeteilt und der Überstand nach Zentrifugation bis auf ein Volumen von 50 µl entfernt, sodass eine Endkonzentration von 1 Millionen Zellen pro 50 µl FACS-Saponin entsteht. Danach wurde 10 µl eines Antikörpercocktails bestehend aus FACS-Saponin, anti-IFN γ -FITC (0,1 µg), anti-IL-4-APC (0,1 µg), anti-IL-9-PE (0,1 µg) und anti-IL-17-PeCy7 (0,03 µg) hinzugegeben. Nach 30-minütiger Inkubation bei 4 Grad Celsius wird die Suspension zweimal mit 1 ml FACS-Saponin gewaschen, der Überstand entfernt und das Zellpellet mit 200 µl FACS-PBS resuspendiert. Schließlich konnte die intrazelluläre Zytokinproduktion mit der Durchflusszytometrie analysiert werden.

5.6. ChIP-Assay

Die unter Th0-, Th1-, Th2-, Th9- und Th17-Bedingungen differenzierten Zellen wurden nach fünf Tagen Differenzierung geerntet und mit PBS gewaschen. Je 3×10^6 Zellen der jeweiligen Differenzierungsbedingung wurden, wie die frisch isolierten CD4 positiven T-Zellen (Prä-Bedingung), durch 10 ml 1% Formaldehyd fixiert.

Für die Fixation wurde 37% Formaldehyd mit ca. 4°C gekühltem RPMI auf 1% verdünnt. Die Zellen wurden zuerst mit 1 ml 1% Formaldehyd resuspendiert und dann wurde das Gesamtvolumen auf 10ml erhöht. Die Inkubation mit Formaldehyd wurde nach 1 min auf dem Taumelrollenmischer durch 1 ml 1,25 M Glycin beendet.

Nach erneutem Waschschrift erfolgte die Zelllyse. Das Zellpellet wurde mit dem "Swelling Buffer" resuspendiert und bei Raumtemperatur für 10 min inkubiert. Der Swelling Buffer bestand aus 25 mM Hepes (pH 7,8), 1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0,1 % NP-40, 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF und 1 Tablette des Protease Inhibitor Cocktails gelöst in 50 ml MilliQ Wasser. Nach mehrmaligem Vortexen innerhalb der 10 minütigen Inkubation wurde die Zellsuspension bei 3824 x g für 5 min zentrifugiert, der Überhang abgesaugt und das Zellsediment mit dem "Sonication Buffer" resuspendiert. Der Sonication Buffer beinhaltete 50 mM Hepes (pH 7,9), 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % Triton X-100, 0,1 % Na-Deoxycholat, 0,1 % SDS, 0,5 mM PMSF und in 50 ml MilliQ Wasser gelöster Protease Inhibitor Cocktail. Daraufhin wurde in 20 Zyklen à 1 min bei 5°C mittels Ultraschall (Sonicator von Diagenode) die DNA der lysierten Zellen in 200-1000 bp lange DNA-Stücke zerkleinert und danach für 10 min bei 16.000 x g zentrifugiert. Der Überstand, in dem sich die DNA-Stücke nun befinden, wurde in ein neues 1,5 ml großes Eppendorfgefäß überführt. Das Sediment, das aus Zellresten besteht, wurde verworfen. Zur Kontrolle der DNA-Länge wurde für die Gelelektrophorese 10 µl entnommen. Das restliche Volumen wird mit Sonication Buffer auf ein Gesamtvolumen von 420 µl erhöht und von jeder Differenzierungsbedingung inklusive Prä-Wert 5 µl für den "Input" entnommen und in ein 0,5 ml kleines Eppendorfgefäß pipettiert. Der Input wurde später zur Normalisierung der Messwerte verwendet. Die restlichen 415 µl einer jeder Differenzierungsbedingung wurden auf vier Wells einer ChIP-Platte (Nunc-Immuno Module, MaxiSorp) zu je 100 µl aufgeteilt. Jeder Well wurde zuvor mit einem der Antikörper gegen die Histonmodifikationen H3ac (40 µg/ml), H3K4me3 (5-25 µg/ml; Konzentration wird vom Hersteller nicht bestimmt), H3K27me3 (20 µg/ml) oder mit dem Antikörper Rabbit IgG (5 µg/ml) beladen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Vor Übertragung der Proben auf die Platte wurde diese drei Mal mit dem eBioscience Wash Buffer gewaschen.

Nach Abdeckung der ChIP-Platte mit einer Folie erfolgte die Inkubation bei Raumtemperatur für 90 min auf einem Orbital Platform Shaker. Die Ziel-DNA mit den Histonmodifikationen H3ac, H3K4me3 und H3K27me3 ist nun durch die jeweiligen Antikörper an der Platte gebunden.

Nach der 90 minütigen Inkubation wurde die Platte 6 mal mit Wasch Puffer A und 2 mal mit TE Puffer (10 mM TrisHCl pH 8,0 und 1 mM EDTA pH 8,0) gewaschen, um die Menge an unspezifischer Bindungen zu verringern. Wasch Puffer A setzte sich zusammen aus 50 mM Hepes (pH 7,9), 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0,1 % Na-Deoxycholat, 0,1 % SDS, 0,5 mM PMSF und 1 Tablette des Protease Inhibitor Cocktails gelöst in 50 ml MilliQ

Wasser. Nach dem letzten Waschschrift wurde in jedes Well und in die zuvor entnommenen Proben für den Input der "Re-Crosslinking Buffer" pipettiert. Der Puffer bestand aus 7,5 mM TrisHCl (pH 8,0), 0,75 mM EDTA (pH 8,0), 0,5% SDS und 0,5 mg/ml Proteinase K und löste durch die Proteinase K einerseits die Antikörper von der Platte und andererseits die Histonmodifikationen von den Antikörpern bzw. von der DNA. Die ChIP-Platte wurde, bedeckt durch eine Folie, für 120 min bei 65°C in den Thermomixer gestellt und die 0,5 ml kleinen Eppendorfgefäße für den Input ihrerseits für 120 min in das 65°C warme Wasserbad. Nach der 2 stündigen Inkubation wurde gemäß der Anleitung des GenElute PCR Clean-Up Kit (Sigma Aldrich) die DNA Isolation durchgeführt. Zu den Proben wurde das 5-fache Volumen an Binding Solution gegeben, damit das optimale Verhältnis DNA-Suspension zu Binding Solution von 1 zu 5 erreicht wurde. Mitgelieferte GenElute Miniprep Binding Columns wurden in ebenfalls mitgelieferte kleine Sammelbehältnisse gesteckt. In die Miniprep Binding Columns wurde 0,5 ml der Column Preparation Solution pipettiert und bei 12.000 x g für 30 Sekunden zentrifugiert. Die Column Preparation Solution maximierte dabei die mögliche Anzahl an DNA, die an die GenElute Miniprep Binding Columns bindete. In die vorbereiteten Säulen wurde nun die DNA-Suspension transferiert und bei 16.000 x g für 1 min zentrifugiert. Die eluierte, in dem Sammelbehältnis aufgefangene Flüssigkeit wurde entsorgt. Im nächsten Schritt wurde 0,5 ml Wash Solution in die Säulen pipettiert und bei 16.000 x g zentrifugiert. Die mitgelieferten 12 ml Wash Solution wurde zuvor mit 48 ml des 100% Ethanol verdünnt. Die eluierte Flüssigkeit wurde wieder entsorgt und die Säulen wurden noch einmal bei 16.000 x g für 2 min trocken zentrifugiert, um das restliche Ethanol zu entfernen. Danach wurden die GenElute Miniprep Binding Columns in neue 1,5 ml große Eppendorfgefäße transferiert und in jeder Säule 30 µl Elution Solution pipettiert. Dabei musste beachtet werden, dass die DNA-Bindungsstellen in der Mitte der Säule komplett mit der Elution Solution bedeckt ist. Nach einer 1-minütigen Inkubation wurden die Säulen bei 16.000 x g erneut für 1 min zentrifugiert. Dabei wurde die DNA aus der Säule eluiert und befand sich nun in dem 1,5 ml großem Eppendorfgefäß. Die DNA wurde nach diesem Schritt entweder direkt für die real-time PCR weiter verwendet oder bei -20°C gelagert.

5.7. Gelelektrophorese

Zur Längenkontrolle der DNA-Stücke wurde wie oben beschrieben bei jedem Versuch 10 µl der Proben direkt nach der Ultraschall-Behandlung entnommen.

5.7.1. Gelherstellung

Zur Herstellung 1 % Agarosegels wurde zu 1 g Agarose 2 ml des 50-fach TAE-Puffers pipettiert und mit MilliQ Wasser auf ein Gesamtvolumen von 100 ml verdünnt. Nach einmaligem Erhitzen in der Mikrowelle und 10 minütigem Abkühlen bei Raumtemperatur wurde zur Lösung 10 µl des SYBR Safe DNA gel stain dazugegeben und gut vermischt. Daraufhin wurde die Mischung in Gelplatten gegossen, die entstandenen Luftblasen verstrichen und unter Luftabzug bei Raumtemperatur für 30 Minuten erhärtet.

5.7.2. Gelelektrophorese

Jeder Probe (10 µl) wurde mit 2 µl des 6-fach DNA loading Dye gut vermischt und in die entsprechenden Geltaschen pipettiert. Als Referenzmaßstab wurden die beiden GeneRule DNA ladder mit 100 bp und 1 kb Länge verwendet. Die Elektrophorese lief in einer Horizontalkammer für 30 min bei 100V und einer Stromstärke von 60 A.

Nach Ablauf der Zeit wurde das Gel im Transilluminator (Herolab) analysiert.

5.8. Real-time PCR

Die real-time PCR, basierend auf dem Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR), ermöglicht die Vervielfältigung gewünschter DNA-Abschnitte. Im Unterschied zur herkömmlichen PCR, bei der die DNA am Ende der Reaktion detektiert wird, wird bei der real-time PCR die DNA-Vervielfältigung in "real-time", also während des Reaktionsverlaufes gemessen.

Nach dem ChIP-Assay liegen DNA-Stücke mit der jeweiligen gewünschten Histonmodifikation vor. Zur Amplifikation der gewünschten Gen-Loci auf diesen DNA-Stücken wurde der Power SYBR Green PCR Master Mix sowie Sequenz-spezifische Primer für die IL17A- und RORC-Promotoren und der jeweiligen CNS-Regionen verwendet. Der PCR Master Mix besteht unter anderem aus SYBR Green I Dye, ein Fluoreszenzfarbstoff, der bevorzugt Doppelstrang-DNA bindet, sowie Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTPs), die

durch die ebenfalls enthaltene AmpliTaq Gold DNA Polymerase in die neuen DNA-Stränge eingebaut werden.

Für jede zu untersuchende Probe wurden Duplikate angelegt, das heißt jeweils zwei Löcher der Lochplatte, in die zuerst 1 µl der DNA-Suspension und darauffolgend 19 µl einer Mixtur bestehend aus 10 µl des Power SYBR Green PCR Master Mix, 0,4 µl 200 nM vorwärts und rückwärts gerichteter Primer sowie 8,6 µl Wasser pipettiert wurde. Als Negativkontrolle fungierte bei jeder Messung eine Wasserprobe um unspezifische Reaktionsprodukte wie z.B. Primerdimer auszuschließen. Die real-time PCR-Analyse wurde mit dem 7500 Fast Real-Time PCR System in 40 Zyklen durchgeführt. Dabei bestand ein Zyklus aus einer Denaturierungsphase (95 Grad Celsius) für 15 Sekunden zur Auftrennung der DNA-Doppelstränge sowie einer Primerhybridisierungs- und Elongationsphase bei 60 Grad Celsius von 1 Minute Dauer, in der die DNA-Polymerase in 3' → 5'-Richtung die freien dNTPs in den fehlenden DNA-Strang einbaut. Den 40 Zyklen vorgeschaltet war eine DNA-Denaturierungsphase bei 95 Grad Celsius von 10 min Dauer. An die entstandene Doppelstrang-DNA bindet SYBR-Green I. Der daraus resultierende DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplex emittiert grünes Licht bei $\lambda_{\text{max}} = 521 \text{ nm}$, wobei die Menge an synthetisierter DNA mit der Fluoreszenzintensität korreliert. Nach jeder Messung wurde ein für jede Probe gleich geltender Schwellenwert für das Fluoreszenzsignal festgelegt. Je mehr DNA am Anfang der real-time PCR zur Verfügung stand, desto kleiner die benötigte Zyklusanzahl C_t um den Schwellenwert zu erreichen.

5.9. Statistische Auswertung

Ergebnisse wurden mittels Student's t-test (Vergleich zweier unterschiedlicher Gruppen) analysiert. Alle Berechnungen wurden unter Zuhilfenahme von Prism sowie Microsoft Excel durchgeführt. P-Werte kleiner 0,05 wurden als statistisch signifikant bewertet und wie folgt graphisch dargestellt: *- $p < 0,05$, **- $p < 0,01$, ***- $p < 0,001$ und ns – nicht signifikant.

6. Ergebnisse

6.1. Klinische Daten der Patienten sowie der gesunden Vergleichsgruppe

Für die Studie wurden Daten von 17 gesunden Spendern und 17 Patienten mit rheumatoider Arthritis erhoben. Folgende klinische Daten wurden eruiert:

	HC (n = 17)	RA (n = 17)
Alter, Jahre	56 ± 6	61 ± 16
Weiblich/männlich	16/1	13/4
Krankheitsdauer, Monate	NA	4 ± 3
NSAID-Gebrauch, %	NB	77
DMARDs, %	NA	0
DAS28	NA	4,5 ± 1,1
TJC, no.	NA	7 ± 4
SJC, no.	NA	4 ± 3
CRP, mg/dl	NB	2,9 ± 2,7
BSG, mm/h	NB	22 ± 21
Anti-CCP positiv, %	NB	47
RF positiv, %	NB	71
Erosionen im initialen Röntgen, %	NA	29
Punktezahl ACR-Kriterien 2010	NA	7 ± 1

Tabelle 1: Klinische Charakteristika der Studienpopulation

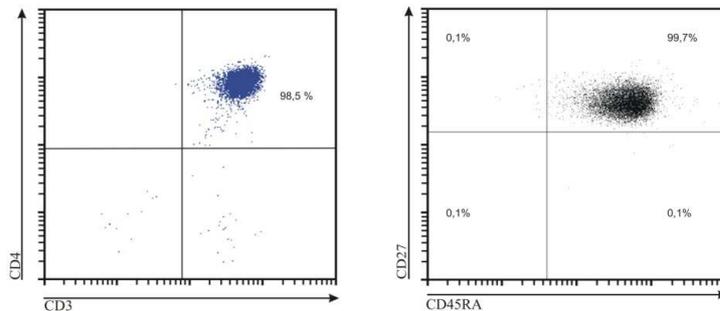
Der Altersdurchschnitt lag in beiden Gruppen zwischen 56 und 61 Jahren. Die Krankheitssymptome bestanden bei den Patienten im Schnitt seit 4 Monaten. Dies kann als frühe Arthritisform angesehen werden. In diesem Zeitraum gaben 77 % der RA-Patienten die Einnahme von NSAIDs an. Die Verwendung von DMARDs wurde von allen in die Studie aufgenommenen Spendern verneint. Der durchschnittliche DAS28 betrug 4,5. Dies entspricht einer mittleren Krankheitsaktivität. Im Schnitt gaben die RA-Patienten 7 schmerzhafte sowie 4 geschwollene Gelenke an. Die Laborwerte zeigten sich wie folgt: Bei RA-Patienten waren

die Mittelwerte der Entzündungsparameter CRP 2,9 mg/dl sowie BSG 22 mm/h. Pathologisch erhöhte Werte für die Autoantikörper anti-CCP und RF zeigten 47 % bzw. 71 % der RA-Patienten. Bei circa einem Drittel (29 %) der RA-Patienten wurden bei Aufnahme bereits radiologisch erkennbare Erosionen von Füßen oder Händen nachgewiesen. Die Patienten kamen bei Aufnahme gemäß den ACR-Kriterien von 2010 auf eine mittlere Punktzahl von 7 und konnten somit eindeutig als Patienten mit rheumatoider Arthritis klassifiziert werden.

6.2. Isolierung naiver CD45RA und CD4-positiver T-Helferzellen sowie CD45RO- und CD4-positiver T-Helfer-Gedächtniszellen

Nach jeder Isolation naiver- oder Gedächtnis-Th-Zellen wurde durchflusszytometrisch die Reinheit der Zellsuspension bestimmt. Als repräsentatives Beispiel ist in Abbildung 2 die Ergebnisse für die Isolierung naiver T-Zellen (A) sowie für die T-Gedächtniszellen (B) dargestellt. Bei dieser wissenschaftlichen Arbeit erreichten die Proben eine Reinheit um die 95% für CD4-positiv naive oder Gedächtnis-T-Zellen.

A. Isolierung von naiven T-Zellen:



B. Isolierung von T-Gedächtniszellen:

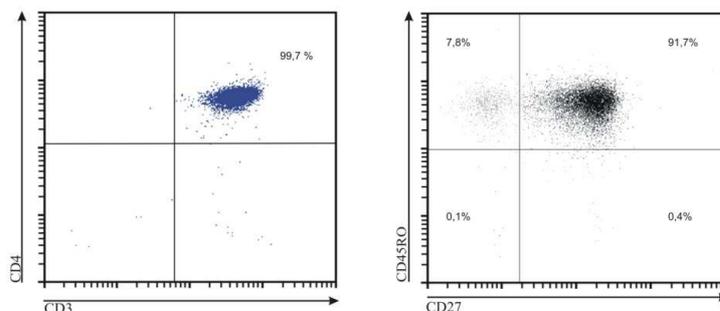
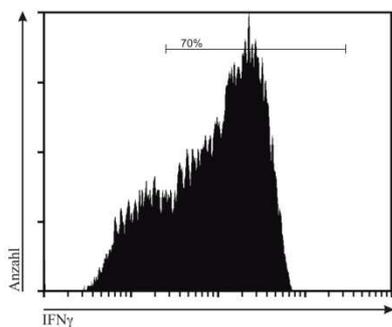


Abbildung 1: Repräsentative Darstellung der durchflusszytometrisch bestimmten Oberflächenmarker CD3/CD4 sowie CD27/CD45RA für naive T-Zellen (A) und CD45RO/CD27 für Gedächtnis-T-Zellen (B).

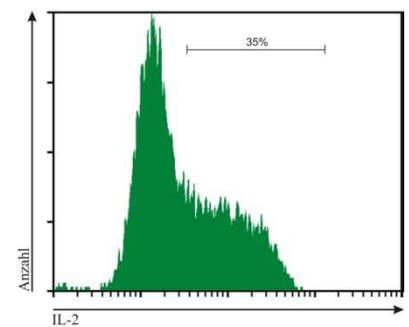
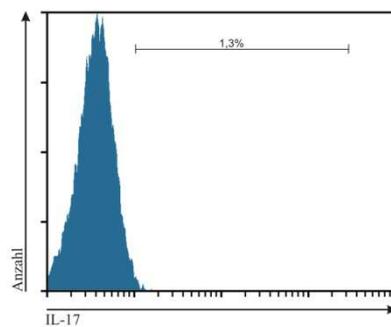
6.3. Bestimmung der Zytokinproduktion durch intrazellulärer Färbung

Als Erfolgskontrolle der verschiedenen Differenzierungsbedingungen wurde zu Beginn der Forschungsarbeit die für die jeweiligen Th-Subtypen spezifische Zytokine IFN γ , IL-4, IL-9 und IL-17 gemessen. Die Abbildung 2 zeigte repräsentative Ergebnisse für die gemessene Zytokinproduktion und somit den Differenzierungserfolg bei Gedächtnis-Th-Zellen unter Th1-, Th2- und Th17-Kulturbedingung.

A. Th1-Differenzierungsbedingung



B. Th2-Differenzierungsbedingung



C. Th17-Differenzierungsbedingung

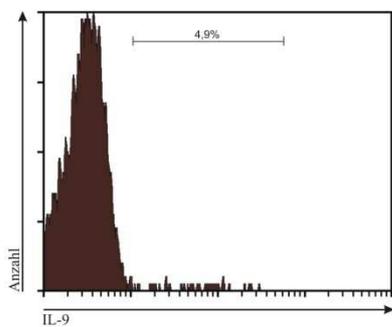
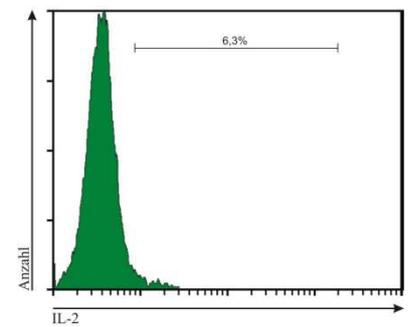
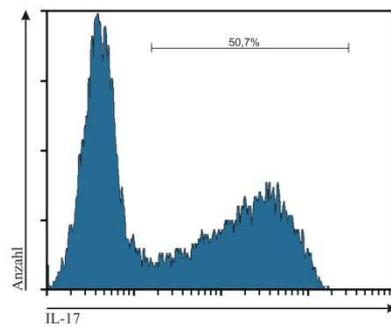
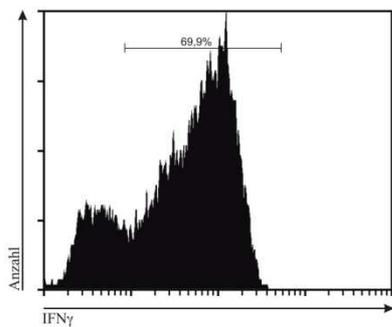


Abbildung 2: Repräsentative Darstellung in Prozent der durchflusszytometrisch bestimmten Zytokinproduktion unter Th1- (A), Th2- (B) und Th17-Differenzierungsbedingungen.

Unter Th1-Differenzierungsbedingungen kam es zu einem maximalen prozentualen Anteil von 70% an IFN γ -produzierenden Th-Zellen, unter Th2-Bedingungen wurden max. 30-35% IL-4-produzierende Zellen gemessen. Unter den Th17-Differenzierungsbedingungen wurde im Gegensatz zu den anderen Zellkulturbedingungen ein max. Anteil von 50% IL-17-produzierender Zellen erreicht, jedoch wurde ebenfalls ein hoher Anteil von bis zu 60-70% IFN γ -produzierender Zellen gemessen. Bei genauerer Betrachtung produzierten die IFN γ -produzierenden Zellen unter Th1-Differenzierungsbedingungen neben IFN γ zum Großteil keine weiteren Zytokine, wohingegen unter Th17-Differenzierungsbedingungen die IFN γ -positiven Zellen zur Hälfte IFN γ /IL-17-Doppel-Produzenten waren (Abbildung 3). Nicht dargestellt sind die Th9-Differenzierungsbedingungen, die im Mittel 15% IL-9-positive Zellen vorzuweisen hatten.

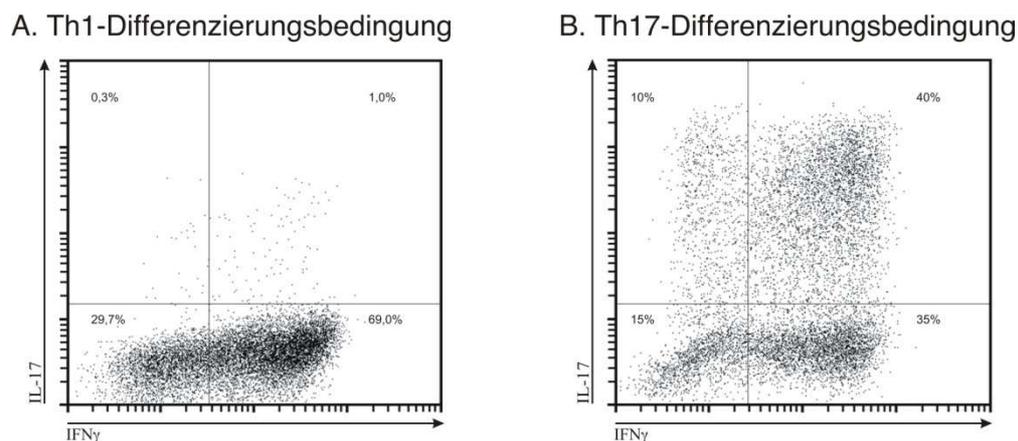


Abbildung 3: Repräsentative Darstellung in Prozent der durchflusszytometrisch bestimmten IL-17 und IFN γ Produktion unter Th1- (A) und Th17- (B) Differenzierungsbedingungen.

6.4. Die CNS-Regionen am IL17- und RORC-Lokus

Da, wie in der Einleitung beschrieben, nicht nur Promotoren regulatorische Einheiten der Gentranskription darstellen, sondern auch CNS-Regionen eine Rolle spielen, wurde in dieser Dissertation ebenso Histonmodifikationen an diesen evolutionsgeschichtlich konservierten Abschnitten der DNA untersucht.

Zu Beginn dieser experimentellen Arbeit stand zunächst die Suche nach geeigneten CNS-Regionen im Fokus. Die Auswahl der zu untersuchenden CNS-Regionen wurde einerseits durch die Ausprägung der Konservierung im Vergleich zum Maus-Genom einerseits sowie

aufgrund Literaturrecherche über etwaige bestehenden Daten aus Mausmodellen über diese Sequenzen andererseits getroffen. Wegweisende Daten mit Humanzellen waren zu Beginn der Arbeit nicht vorzufinden. Den Vergleich zum Maus-Genom wurde mit Hilfe der beiden Softwares *Vista Genome Browser* sowie *ERC Browser* gestellt. Für die Experimente wurden je zwei CNS Regionen am IL17 sowie RORC Lokus untersucht, die in Abbildung 4 dargestellt sind. Dabei zeigen die rot hinterlegten Zacken eine Übereinstimmung zwischen Mensch und Maus von mindestens 80 % im IL17-Lokus auf Chromosom 6 sowie von mindestens 90 % im RORC-Lokus auf Chromosom 1.

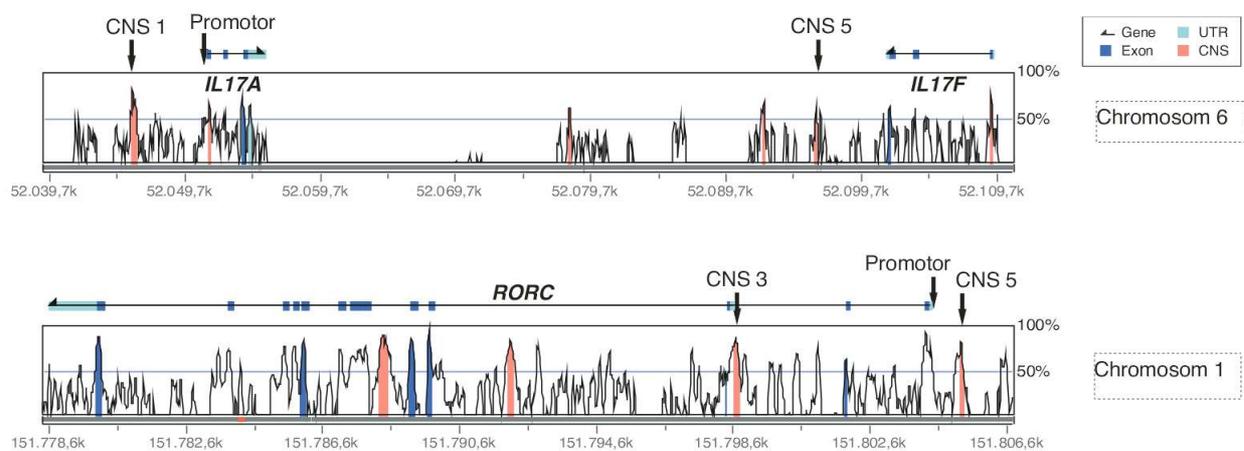


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Promotorregion und conserved non-coding sequences im IL17- und RORC-Lokus

Mukasa et al zeigte im Mausmodell, dass Th17 Zellen in den beiden CNS-Regionen CNS1 und CNS5 im IL17-Lokus eine im Vergleich zu naiven T-Zellen verstärkte H3K4me3 Modifikation, Th1 Zellen hingegen eine deutlich repressive Methylierung mit verstärkter H3K27me3 Modifikation aufwiesen, was mit der unterschiedlichen Expressionsmenge von IL-17 assoziiert war. RORC CNS3 zeigte bei Th17-Zellen eine verstärkt permissive Histonmethylierung (H3K4me), wohingegen die Zugabe von IL-12 einen deutlichen Anstieg der repressiven Methylierung H3K27me3 bewirkte, der bei STAT4 $-/-$ und T-bet $-/-$ Mäusen ausblieb. Somit scheint die CNS-Region 3 im RORC-Lokus für die repressive Modifizierung unter Th1-Bedingungen eine Rolle zu spielen (Mukasa et al., 2010). Akimzhanov et al konnte eine verstärkte Acetylierung am Histon 3 (H3ac) an den beiden CNS-Regionen 1 und 5 am IL17 Lokus unter Th17-Differenzierungsbedingungen im Vergleich zu naiven T-Zellen und T-Zellen unter Th1 und Th2-Differenzierungsbedingungen feststellen. Daraus ergibt sich

seine These, dass die CNS-Regionen eine regulatorische Funktion in der T-Zelldifferenzierung einnehmen (Akimzhanov et al., 2007)

6.5. Die Kontrollgene CD4 und MYOD1 – Beispiele für eine permissive und repressive Chromatinstruktur

Die isolierten Zellen in dieser Dissertation sind nahezu vollständig CD4⁺-T-Zellen, die dementsprechend eine hohe Genexpression des Gens CD4 aufweisen. Eine hohe Genexpression erfordert eine offene Chromatinstruktur, weshalb sich das Gen CD4 als vergleichendes Maß für eine ausgeprägt permissive Histonmodifikation eignet. MYOD1 kodiert das Protein Myogener Faktor 3, das als Transkriptionsfaktor für die Differenzierung von Fibroblasten zu Myoblasten fungiert und somit am Aufbau der Skelettmuskulatur beiträgt. Da MYOD1 keinerlei Funktion in T-Zellen aufweist, eignet es sich gut als Vergleich für eine repressive Histonmodifikation.

Wie aus Abbildung 5 zu entnehmen ist, zeigten naive CD4⁺-T-Zellen nach 5 Tagen Stimulierung unter Th17-induzierenden Differenzierungsbedingungen im entsprechenden Gen für den CD4-Rezeptor eine eindeutig permissive Modifikation mit sehr ausgeprägter H3K4-Trimethylierung und marginaler H3K27-Trimethylierung. Im Gegensatz dazu zeigte MYOD1 im Vergleich zum CD4-Promotor eine stark repressive H3K27me3 Modifikation und nur ein Siebtel des Wertes für H3K4me3 und ein Drittel für H3ac. Damit konnte gezeigt werden, dass die Histone an den Promotoren der Gene CD4 und IL17A entsprechend der bekannten Genexpressionsrate modifiziert sind, was ebenso die Validität des Versuchsaufbaus unterstreicht.

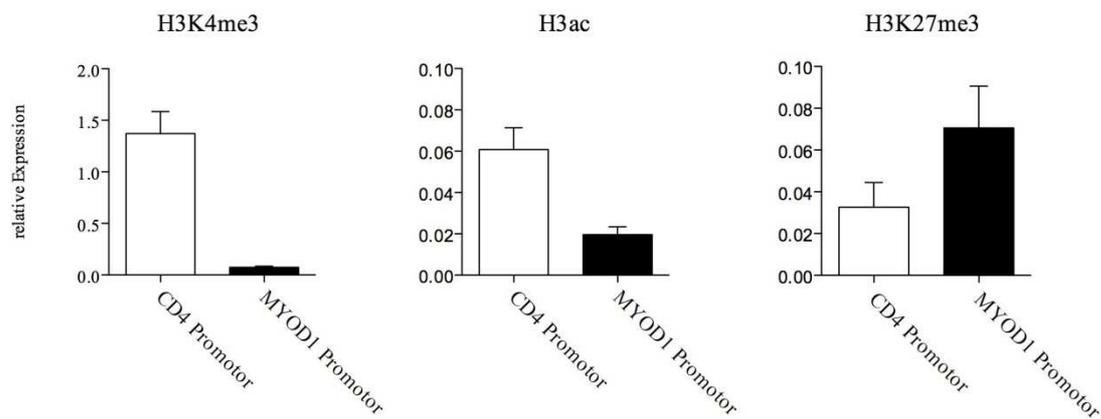


Abbildung 5: CD4⁺-T-Zellen zeigten am CD4- Promotor im Vergleich zum MYOD1-Gen eine verstärkt permissive Histonmodifikation. Naive humane CD4⁺-T-Zellen wurden isoliert und unter Th17-induzierenden Bedingungen (IL1 β , IL21, IL23, anti-IL4, anti-IFN γ) für fünf Tage differenziert. Chromatin-Immünpräzipitation (ChIP) wurde mit Antikörpern spezifisch für H3K4me3, H3ac und H3K27me3 durchgeführt und die relative Expression dieser Chromatinmodifikationen mittels real time PCR für die Promotorregionen von CD4 und MYOD1 analysiert. Dargestellte Daten von mindestens zwei unabhängigen Versuchen wurden auf die Input DNA normalisiert (Mittelwert \pm SEM)

6.6. Ergebnisse der gesunden Kontrollgruppe bezüglich Histonmodifikationen am IL17- sowie RORC-Lokus

Zunächst wurde untersucht, ob CD4⁺-T-Zellen von gesunden Spendern nach Differenzierung unter Th0-, Th1-, Th2-, Th9- und Th17-induzierenden Bedingungen linsenspezifische Veränderungen der Histonmodifikationen in den Th17-typischen Loci IL17 und RORC aufweisen. Die Ergebnisse werden in einem regelmäßigen Wechsel wie folgt dargestellt: In einer ersten Abbildung wird zunächst das Verhältnis von permissiver (H3K4me3 und H3ac) zur repressiven H3K27me3 Histonmodifikation dargestellt, um einen ersten Überblick auf die Zugänglichkeit der entsprechenden Gensequenz zu erhalten. Ein Wert über Null bedeutet ein Überhang der gemessenen permissiven Histonmodifikation gegenüber der H3K27me3-Modifikation. In der darauffolgenden Abbildung werden die Ergebnisse der einzelnen Histonmodifikation dargestellt.

6.6.1. Ergebnisse der naiven Th-Zellen:

6.6.1.1. IL17-Lokus

Am IL17-Lokus zeigte sich unter Th17-induzierenden Differenzierungsbedingungen im Vergleich zum Prä-Wert oder zu den nicht-Th17-Differenzierungsbedingungen eine signifikant verstärkt permissive Chromatinstruktur (Abbildung 6).

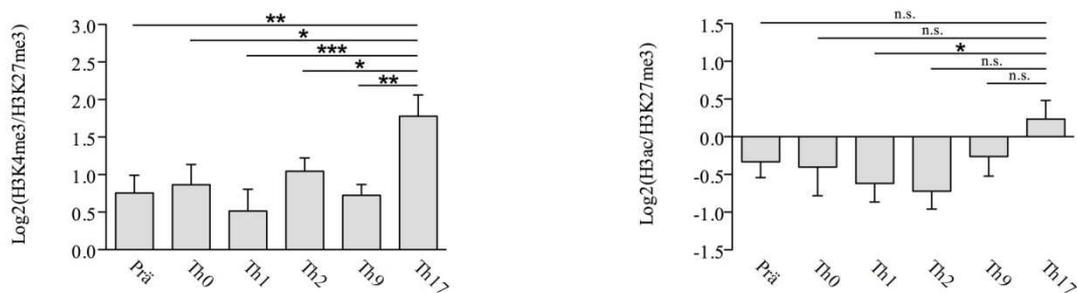
Am IL17A-Promotor verschiebte sich im Vergleich zum Präwert nur nach Th17-Differenzierung signifikant das Verhältnis der H3K4- zur H3K27-Trimethylierung zugunsten der permissiven Methylierung. Unter nicht Th17-Differenzierungsbedingungen kam es im Vergleich zum Präwert zu keinen signifikanten Veränderungen, tendenziell zeigte die Th1-Stimulierung eine verstärkt repressive Modifikation, weshalb die größten Unterschiede zwischen Th17- und Th1-Differenzierungsbedingungen zu sehen waren. Ähnliches Bild zeigte sich bei den beiden CNS-Regionen am IL17A-Gen.

Frisch isolierte Zellen (Präwert) zeigten in allen drei Gensequenzen einen negativen Quotienten aus H3ac und H3K27me3, das ein Übergewicht an der repressiven Trimethylierung H3K27 im Vergleich zur permissiven Acetylierung am Histon H3 darstellt. Nach fünf Tagen Differenzierung kam es nur unter Th17-Bedingungen zu einem Überhang an permissiver Acetylierung und somit zu einem positiven Quotienten, wohingegen die Th-Zellen unter nicht-Th17-Bedingungen eine gleichbleibende oder gar eine verstärkt repressive Modifikation aufwiesen. Die verstärkt repressive Histonstruktur im Vergleich zum Präwert zeigte sich vor allem an der CNS-Region IL17 CNS5 unter Th0- Th1- und Th2-Differenzierungsbedingungen.

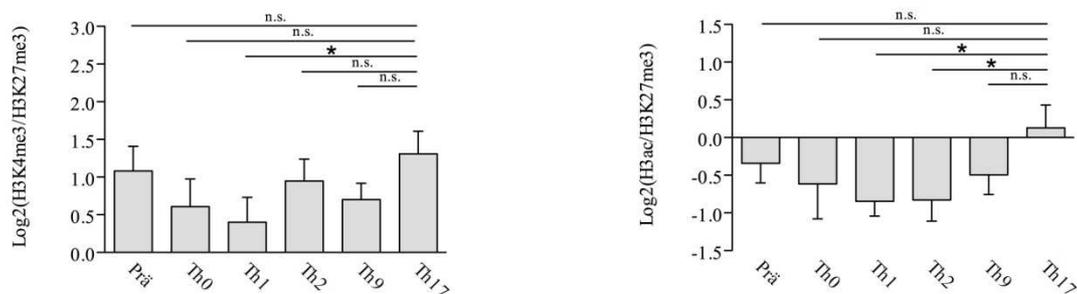
Die beobachtete Umgestaltung der Histone wird vor allem durch Veränderung der H3K27me3 Modifikation bewirkt (Abbildung 7). Am IL17A-Promotor sowie an der IL17 CNS5 Region kam es nur unter Th17-Bedingungen zu einer Reduktion der repressiven H3K27-Trimethylierung, wohingegen unter Th1-, Th2- und Th9-Bedingungen die repressive Modifikation tendenziell zunahm. Daraus ergibt sich für die Th17-Differenzierungsbedingung eine signifikant geringere H3K27-Trimethylierung im Vergleich zur Th1-Differenzierungsbedingung. Eine Veränderung der H3K4me3 Modifikation zeigte sich vor allem am IL17A Promotor. Unabhängig von der Art der Differenzierung nahm die permissive Trimethylierung am Histon 3 zu, signifikant unter Th2- und Th17-Differenzierungsbedingungen. Die Acetylierung am Histon 3 zeigte weder am Promotor noch an den beiden CNS-Regionen eine eindeutige Veränderung.

Zusammenfassend zeigten Th-Zellen unter Th17-Differenzierungsbedingungen am IL17-Lokus, am ausgeprägtesten am IL17A-Promotor, im Vergleich zum Prä-Wert und den Nicht-Th17-Differenzierungsbedingungen eine signifikant verstärkte Histon-Permissivität, bedingt durch eine verminderte repressive H3K27me3- und durch eine verstärkte permissive H3K4me3-Modifikation.

A IL17A Promotor



B IL17 CNS1



C IL17 CNS5

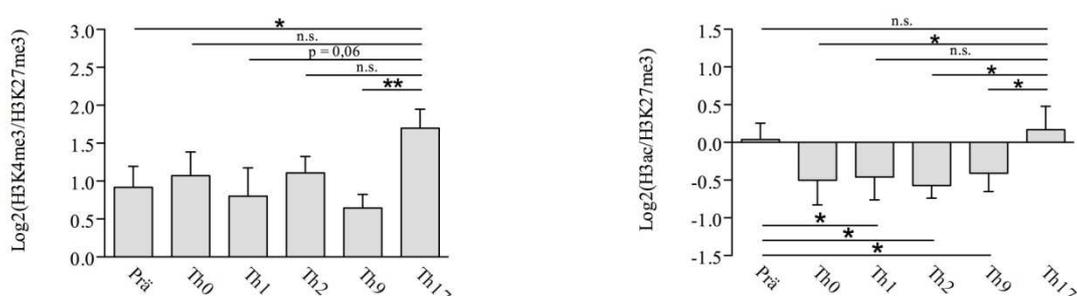


Abbildung 6: Th17 Zell-Differenzierung führte zu einer verstärkt permissiven Histonmodifikation im IL17-Lokus. Naive humane CD4⁺-T-Zellen wurden isoliert und entweder als Prä-Wert konserviert oder für 5

Tage mit anti-CD28 und anti-CD3 unter Th0-, Th1- (IL12, anti-IL4), Th2- (IL4, anti-IFN γ), Th9- (TGF β , IL4) und Th17- (IL1 β , IL21, IL23, anti-IL4, anti-IFN γ) induzierenden Bedingungen differenziert. Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) wurde mit Antikörpern spezifisch für H3K4me3, H3ac und H3K27me3 durchgeführt und die relative Expression dieser Chromatinmodifikationen mittels real time PCR für die Promotorregionen von IL17A (A) sowie zwei CNS-Regionen (B-C) analysiert. Dargestellt ist der Log2 des Quotienten aus der relativen DNA-Menge präzipitiert mit anti-H3K4me3 zu anti-H3K27me3 (linke Spalte) bzw. anti-H3ac zu H3K27me3 (rechte Spalte). Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert und SEM von mindestens 12 unabhängigen Experimenten. Statistische Analyse mit Student's t-Test zeigte signifikante Unterschiede zwischen Th17- und nicht-Th17-Differenzierungsbedingungen. * = $p < 0,05$. ** = $p < 0,01$. *** = $p < 0,001$.

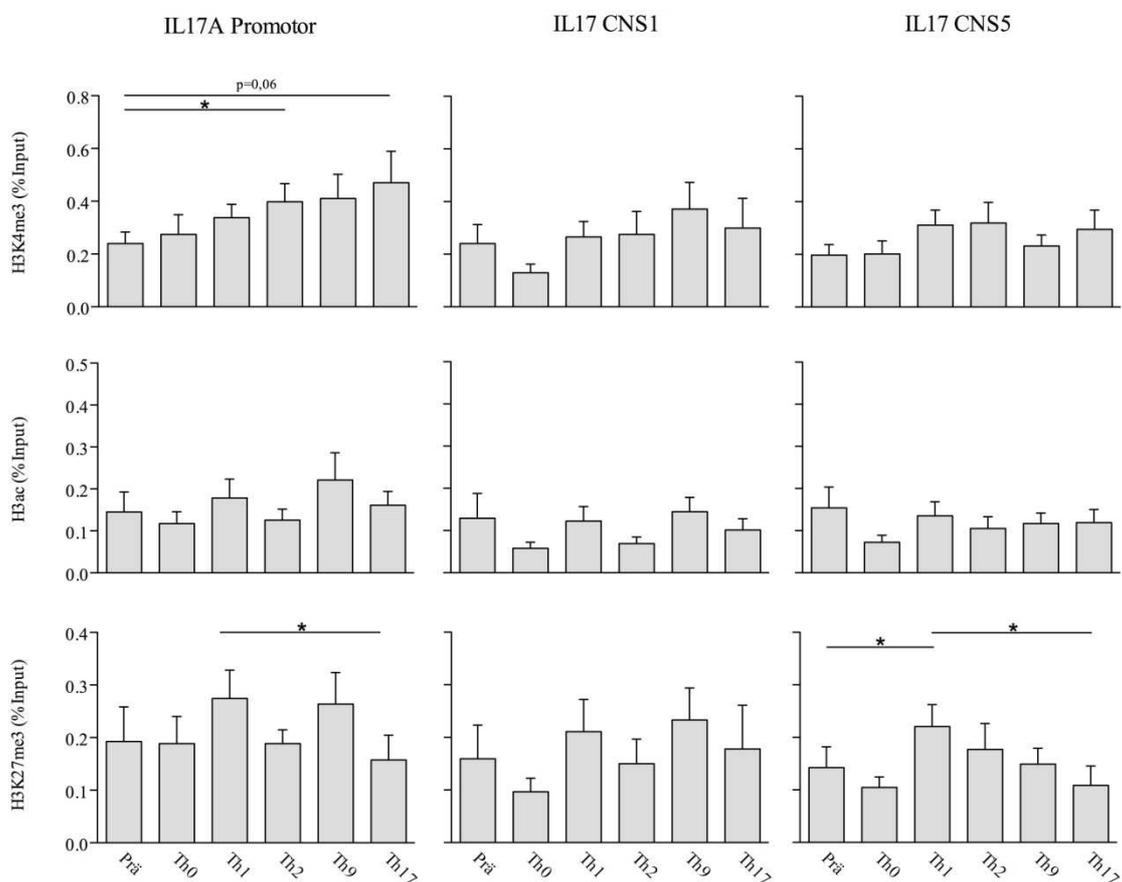


Abbildung 7: Am IL17A-Promotor zeigten Th-Zellen unter Th17-Differenzierungsbedingungen im Vergleich zum Präwert sowie zu den nicht-Th17-Bedingungen eine verstärkte permissive H3K4- und eine verminderte repressive H3K27-Trimethylierung. Dies führt wie in Figur 6 gezeigt zum Überhang der permissiven zur repressiven Histonmodifikation. Naive humane CD4⁺-T-Zellen wurden isoliert und entweder als Prä-Wert konserviert oder für 5 Tage mit anti-CD28 und anti-CD3 unter Th0-, Th1- (IL12, anti-IL4), Th2- (IL4, anti-IFN γ), Th9- (TGF β , IL4) und Th17- (IL1 β , IL21, IL23, anti-IL4, anti-IFN γ) induzierenden Bedingungen differenziert und für ChIP-Analysen weiterverarbeitet. Dargestellt ist die DNA-Menge präzipitiert

mit Antikörpern gegen H3K4me3, H3ac und H3K27me3 an den IL17A-Promotor, IL17 CNS1 und IL17 CNS5 Regionen in Relation zur Input-DNA. Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert und SEM von mindestens 12 unabhängigen Experimenten. Statistische Analyse mit Student's t-Test zeigte signifikante Unterschiede. * = $p < 0,05$.

6.6.1.2. RORC-Lokus

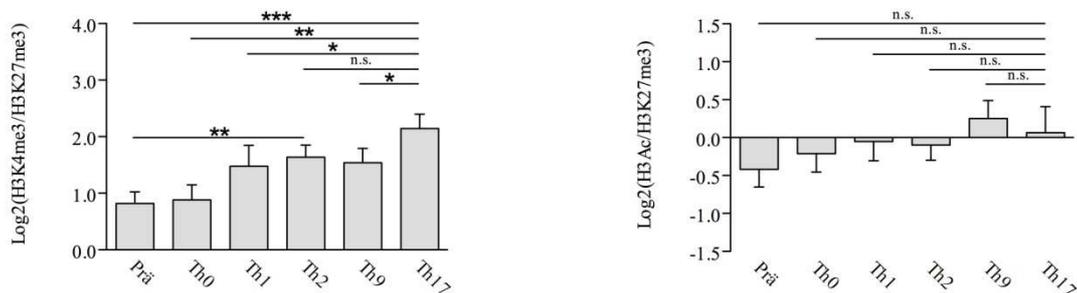
Am Promotor des Transkriptionsfaktors RORC wurden Unterschiede zwischen den verschiedenen Kulturbedingungen vor allem am H3K4me3/H3K27me3-Quotienten gesehen (siehe Abbildung 8). Die neutrale Stimulierung bewirkte keine Veränderung der Histonmodifikationen im Vergleich zum Präwert, wohingegen es bei den spezifischen Kulturbedingungen für Th1, Th2, Th9 und am ausgeprägtesten für Th17-Zellen zu einer Verschiebung zugunsten der permissiven Methylierung kam. Dies erklärt sich durch die verstärkte H3K4-Trimethylierung in diesen Differenzierungsbedingungen. Als Alleinstellungsmerkmal kam es zusätzlich unter Th17-Kulturbedingungen zur Reduktion der repressiven H3K27-Trimethylierung, wohingegen dazu die Th1-, Th2- und Th9-Differenzierungsbedingungen eine im Vergleich zu Th17-Zellen signifikant vermehrte H3K27-Modifikation zeigten (s. Abbildung 9). Keine signifikanten Unterschiede am Promotor waren am Verhältnis H3ac zu H3K27me3 zu sehen.

An der CNS-Region RORC CNS3 wurden am H3K4me3/H3K27me3-Quotienten unter Th2- und Th17-Bedingungen keine großen Veränderungen im Vergleich zum Präwert beobachtet, jedoch veränderte sich der Quotient unter den Th0-, Th1- und Th9-Kulturbedingungen im Vergleich zur Th17-Differenzierungsbedingung signifikant zugunsten einer gesteigerten repressiven H3K27-Trimethylierung. Am stärksten war die repressive Modifikation in den Th1-Kulturbedingungen beobachtet worden. Signifikante Unterschiede der H3-Azetylierung konnten nicht gefunden werden.

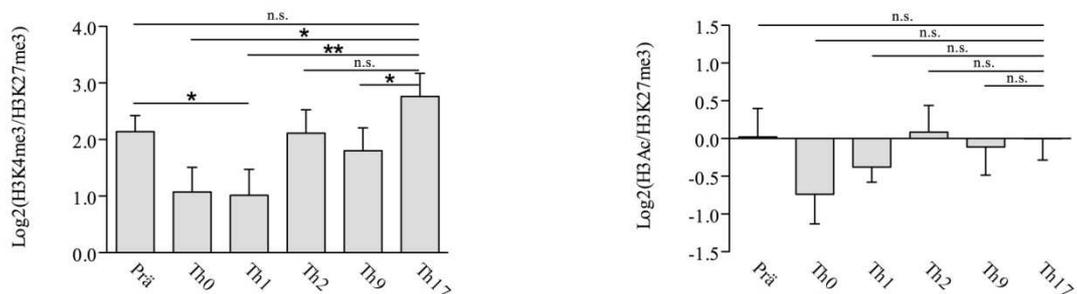
Einen signifikanten Anstieg der permissiven Histonmodifikation wurde an der RORC CNS5 Region unter Th2 und Th17-Bedingungen gemessen, wohingegen erneut in der Th1-Kultur im Vergleich zu Th17 signifikant verstärkt DNA mit der repressiven H3K27-Trimethylierung präzipitiert wurde. Frisch isolierte naive Th-Zellen zeigten einen Überhang an H3K27me3 im Vergleich zu H3ac. Dieses Verhältnis verschiebt sich signifikant nach Stimulierung zugunsten der permissiven Histonacetylierung vor allem in der Th2- und Th17-Kultur.

Zusammenfassend konnte ähnlich wie am IL17-Lokus ein Anstieg der permissiven mit gleichzeitig signifikanter Minimierung der repressiven Histonmethylierung unter Th17-Differenzierungsbedingung beobachtet werden. Die nicht-Th17-Kulturbedingungen zeichneten sich im Vergleich zu Th17 durch eine verstärkt repressive Histonmodalität aus, am ausgeprägtesten wurde dies unter den Th1-Bedingungen beobachtet.

A RORC Promotor



B RORC CNS3



C RORC CNS5

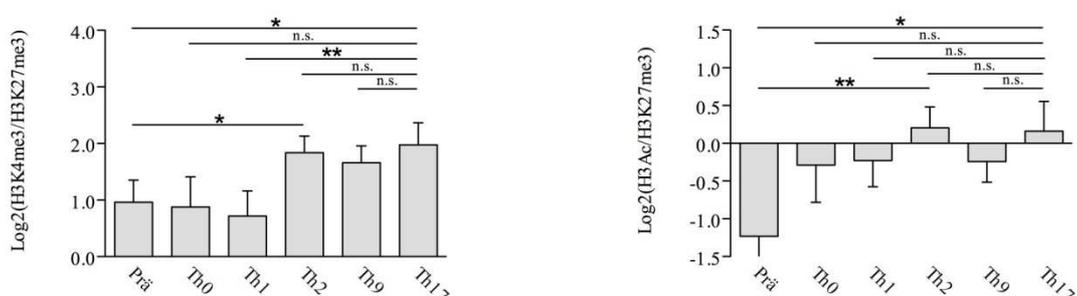


Abbildung 8: Th17 Zell-Differenzierung führte zu einer verstärkt permissiven Histonmodifikation im RORC-Lokus. Naive humane CD4⁺-T-Zellen wurden isoliert und entweder als Prä-Wert konserviert oder für 5 Tage mit anti-CD28 und anti-CD3 unter Th0-, Th1- (IL12, anti-IL4), Th2- (IL4, anti-IFN γ), Th9- (TGF β , IL4) und Th17- (IL1 β , IL21, IL23, anti-IL4, anti-IFN γ) induzierenden Bedingungen differenziert. Chromatin-

Immunpräzipitation (ChIP) wurde mit Antikörpern spezifisch für H3K4me3, H3ac und H3K27me3 durchgeführt und die relative Expression dieser Chromatinmodifikationen mittels real time PCR für die Promotorregionen von RORC (A) sowie zwei CNS-Regionen (B-C) analysiert. Dargestellt ist der Log2 des Quotienten aus der relativen DNA-Menge präzipitiert mit anti-H3K4me3 zu anti-H3K27me3 (linke Spalte) bzw. anti-H3ac zu H3K27me3 (rechte Spalte). Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert und SEM von mindestens 10 unabhängigen Experimenten. Statistische Analyse mit Student's t-Test zeigte signifikante Unterschiede zwischen Th17- und nicht-Th17-Differenzierungsbedingungen. * = $p < 0,05$. ** = $p < 0,01$. *** = $p < 0,001$.

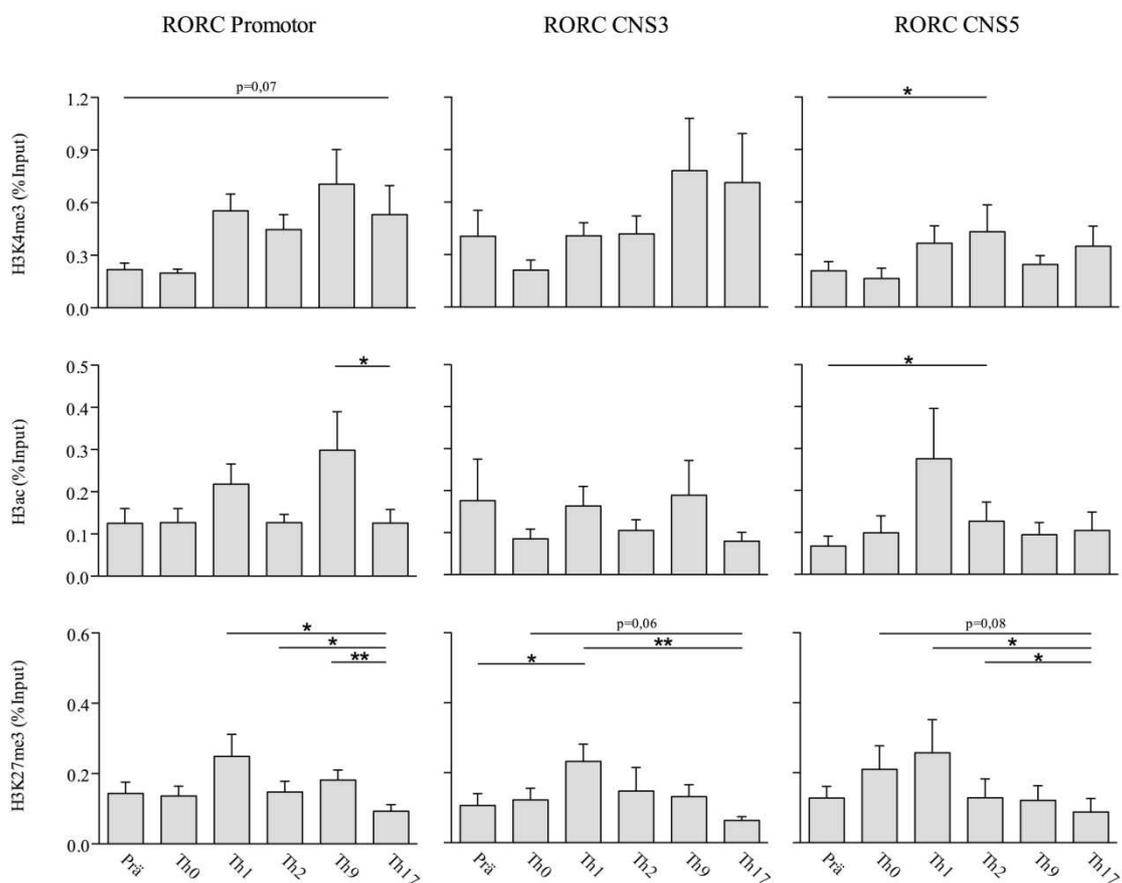


Abbildung 9: Signifikant geringere H3K27me3 Histonmodifikation nach Differenzierung unter Th17-Differenzierungsbedingungen. Naive humane CD4⁺-T-Zellen wurden isoliert und entweder als Prä-Wert konserviert oder für 5 Tage mit anti-CD28 und anti-CD3 unter Th0-, Th1- (IL12, anti-IL4), Th2- (IL4, anti-IFN γ), Th9- (TGF β , IL4) und Th17- (IL1 β , IL21, IL23, anti-IL4, anti-IFN γ) induzierenden Bedingungen differenziert und für ChIP-Analysen weiterverarbeitet. Dargestellt ist die DNA-Menge präzipitiert mit Antikörpern gegen H3K4me3, H3ac und H3K27me3 an den RORC-Promotor, RORC CNS3 und RORC CNS5 Regionen in Relation zur Input-DNA. Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert und SEM von mindestens 10 unabhängigen Experimenten. Statistische Analyse mit Student's t-Test zeigte signifikante Unterschiede. * = $p < 0,05$. ** = $p < 0,01$.

6.6.1.3. Zusammenfassung

Diese Versuche zeigten somit, dass die Histonmodifikationen in den Genloki IL17 und RORC je nach Differenzierungsbedingung unterschiedliche Veränderungen aufwiesen und dass unter Th17 Bedingungen, konkordant mit dem Th17-Phänotyp, die permissive Chromatinstruktur signifikant am stärksten ausgeprägt war, wohingegen unter Th1-Differenzierungsbedingungen das am stärksten repressive Modifikationsmuster gemessen wurde.

6.6.2. Histonmodifikation der Gedächtnis-Th-Zellen

Gedächtnis-Th-Zellen hatten bereits Kontakt mit einem Antigen und wurden dahingehend schon einer Stimulierung ausgesetzt. Dies führte zur Annahme, dass diese Zellen im Vergleich zu den naiven Th-Zellen eine besser zugängliche Chromatinstruktur aufweisen. Um dies festzustellen, wurden die Ergebnisse der naiven Th-Zellen mit denen der Gedächtnis-Th-Zellen verglichen (Abbildungen 10-13).

6.6.2.1. IL17-Lokus

Am Promotor des IL17-Lokus zeigte sich bei Gedächtnis-Th-Zellen eine deutlich verstärkt permissive Histonmodifikation im Vergleich zu naiven Th-Zellen (Abbildung 10). Dies ließ sich nicht nur unter Th17-Bedingungen erkennen, sondern vor allem auch bei den nicht-Th17-Bedingungen. Der größte Unterschied zeigte sich unter Th1-Differenzierung. Ähnliche Tendenz, jedoch in geringerem Maße, wurde auch bei den beiden CNS Regionen IL17 CNS1 und IL17 CNS5 beobachtet. Am IL17A Promotor sind, im Gegensatz zu den naiven Zellen, zwischen den einzelnen Differenzierungsbedingungen keine signifikanten Unterschiede beim Verhältnis von H3K4- zu H3K27-Trimethylierung zu erkennen, lediglich zwischen der Th17-Differenzierungsbedingung und dem Präwert ist ein signifikanter Unterschied zu sehen.

Anders als bei den naiven Th-Zellen konnte bei den Gedächtnis-Th-Zellen bereits bei den nicht-stimulierten Zellen des Präwertes ein Überhang an permissiver H3ac gegenüber der H3K27me3-Histonmodifikation am IL17A-Promotor beobachtet werden.

Betrachtet man die einzelnen Histonmodifikationen, so fällt bei Gedächtnis-T-Zellen im Vergleich zu naiven T-Zellen ein signifikant geringerer Anteil an H3K27me3-Modifikation

vor allem am IL17A Promotor, aber auch im geringeren Maße in den beiden CNS-Regionen, auf (Abbildung 11). Ebenso zeigten Gedächtnis-Th-Zellen am IL17A-Promotor eine geringere Acetylierung des Histon 3. Somit scheint es bei der Wandlung einer naiven Th-Zelle zu einer Gedächtnis-Th-Zelle nicht nur zu einer Reduzierung der repressiven H3K27-Trimethylierung zu kommen, sondern auch zu einer Reduzierung der permissiven H3-Azetylierung. Keine signifikanten Unterschiede zeigten sich in der H3K4-Trimethylierung. Somit war die Dominanz der permissiven H3K4me3 Histonmodifikation am IL17-Lokus, hier vor allem am Promotor des IL17A-Gens, gegenüber der repressiven H3K27-Trimethylierung bei Gedächtnis-Th-Zellen noch stärker ausgeprägt als bei naiven Th-Zellen.

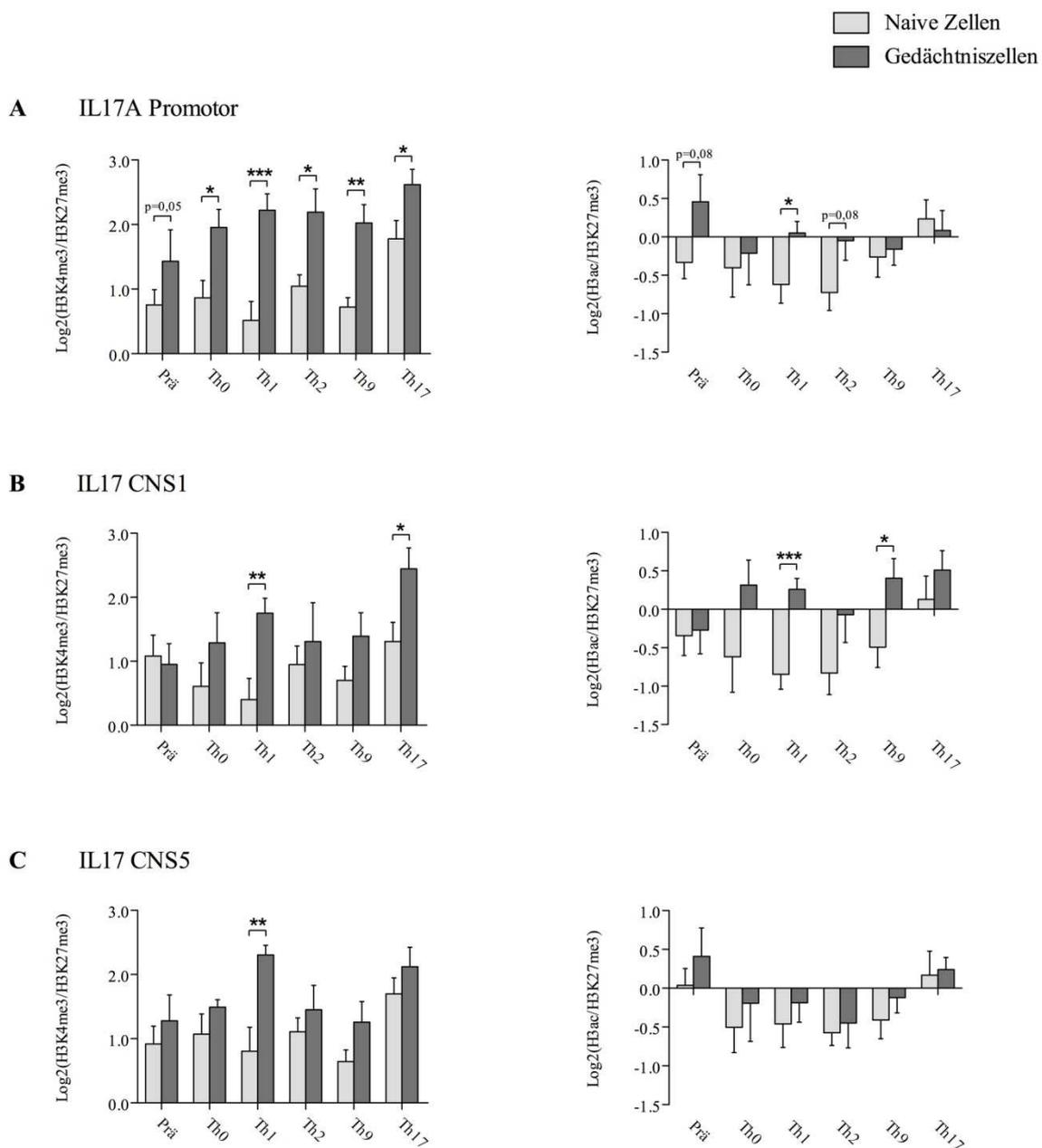


Abbildung 10: Verstärkt permissive Histonmodifikation in Gedächtnis-Th-Zellen im Vergleich zu naiven Th-Zellen. Naive und Gedächtnis-T-Zellen wurden isoliert und entweder als Prä-Wert konserviert oder für 5 Tage mit anti-CD28 und anti-CD3 unter Th0-, Th1-, Th2-, Th9- und Th17-induzierenden Bedingungen differenziert. Chromatin-Immünpräzipitation (ChIP) wurde mit Antikörpern spezifisch für H3K4me3, H3ac und H3K27me3 durchgeführt und die relative Expression dieser Chromatinmodifikationen mittels real time PCR für die Promotorregionen von IL17A (A) sowie zwei CNS-Regionen (B-C) analysiert. Dargestellt ist der Log2 des Quotienten aus der relativen DNA-Menge präzipitiert mit anti-H3K4me3 zu anti-H3K27me3 (linke Spalte) bzw. anti-H3ac zu H3K27me3 (rechte Spalte). Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert und SEM von mindestens 10 unabhängigen Experimenten. Statistische Analyse mit Student's t-Test zeigte signifikante Unterschiede zwischen naiven T-Zellen und Gedächtnis-T-Zellen. * = $p < 0,05$. ** = $p < 0,01$. *** = $p < 0,001$.

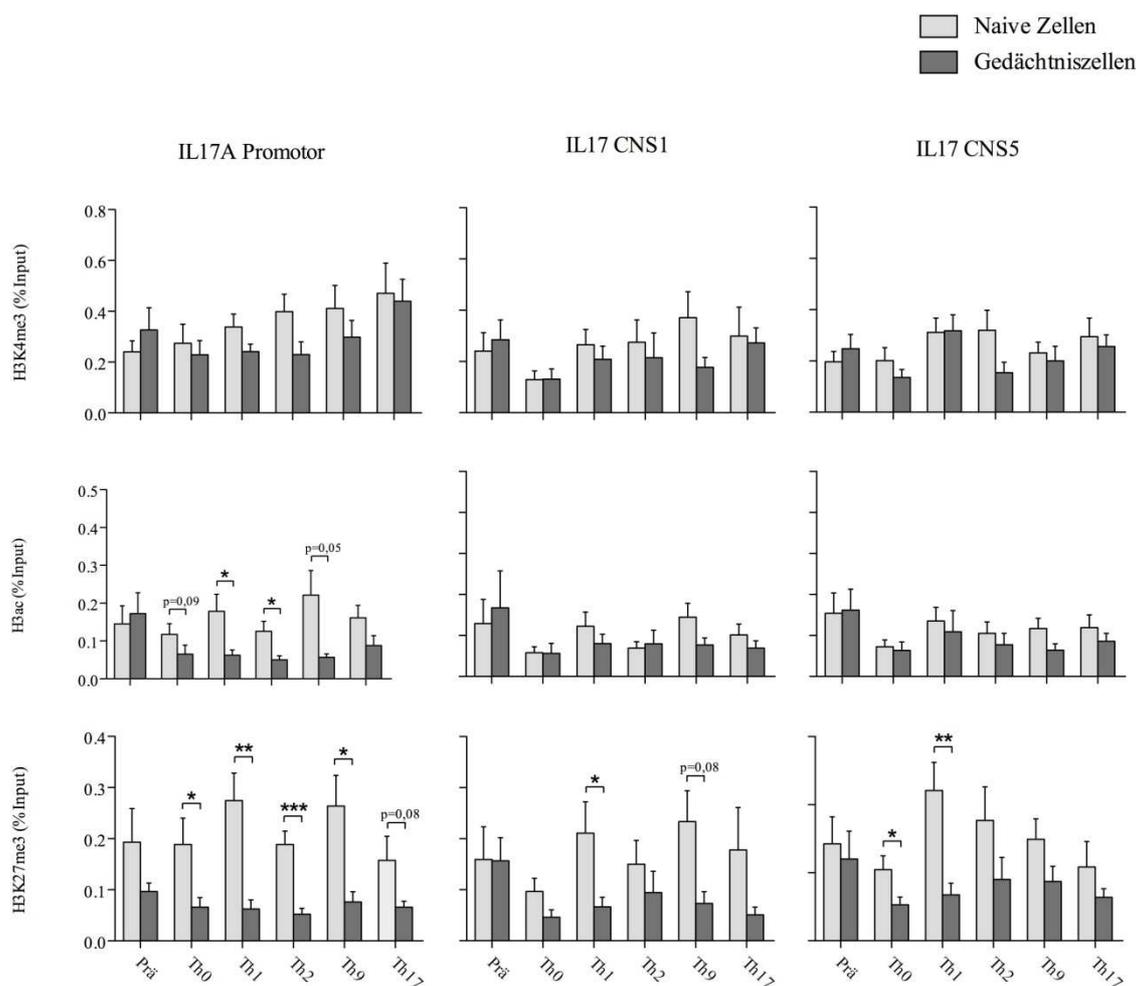


Abbildung 11: Signifikant geringere H3K27me3 Histonmodifikation vor allem am IL17A-Promotor bei Gedächtnis-Th-Zellen im Vergleich zu naiven Th-Zellen. Naive T-Zellen und Gedächtnis-T-Zellen wurden isoliert und entweder als Prä-Wert konserviert oder für 5 Tage mit anti-CD28 und anti-CD3 unter Th0-, Th1-, Th2-, Th9- und Th17-induzierenden Bedingungen differenziert und für ChIP-Analysen weiterverarbeitet. Dargestellt ist die DNA-Menge präzipitiert mit Antikörpern gegen H3K4me3, H3ac und H3K27me3 an den IL17A-Promotor, IL17 CNS1 und IL17 CNS5 Regionen in Relation zur Input-DNA. Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert und SEM von mindestens 10 unabhängigen Experimenten. Statistische Analyse mit Student's t-Test zeigte signifikante Unterschiede. * = $p < 0,05$. ** = $p < 0,01$.

6.6.2.2. RORC-Lokus

Am RORC-Lokus zeigte sich ein sehr ähnliches Bild (Abbildung 12). Das Verhältnis permissiver zu repressiver Histonmethylierung nahm zugunsten der permissiven H3K4-Trimethylierung sowohl am Promotor als auch im geringeren Maße an den beiden CNS-Regionen unabhängig von der jeweiligen Differenzierungsbedingung deutlich zu. Weiterhin

ist am RORC-Lokus unter Th17-Bedingungen die am stärksten ausgeprägte permissive Histonmodifikation zu sehen.

Am Verhältnis H3ac zu H3K27me3 konnten vor allem am Präwert starke Unterschiede gesehen werden. Bei naiven frisch isolierten Th-Zellen wurde ein Überhang an repressiver H3K27-Trimethylierung beobachtet, wohingegen bei frisch isolierten Gedächtnis-Th-Zellen eine Verschiebung hin zu einer verstärkt permissiven Histonmodifikation stattfand. Genau wie am IL17-Lokus scheint auch hier die Chromatinstruktur bereits ohne ex-vivo Stimulierung permissiver gestaltet zu sein.

Die Unterschiede ergaben sich, genauso wie am IL17-Lokus, vor allem durch eine Verminderung der repressiven H3K27me3-Modifikation. Die H3K4me3 Histonmodifikation zeigte größtenteils kaum Veränderungen zwischen naiven Th-Zellen und Gedächtnis-Th-Zellen. Somit kam es zu einer Überrepräsentation der permissiven Histonmodifikationen gegenüber der repressiven Methylierung. Im Kontrast dazu zeigten die Gedächtnis-Th-Zellen am RORC-Promotor genau wie am IL17A-Promotor unter nicht Th17-Differenzierungsbedingungen eine verminderte H3-Azetylierung.

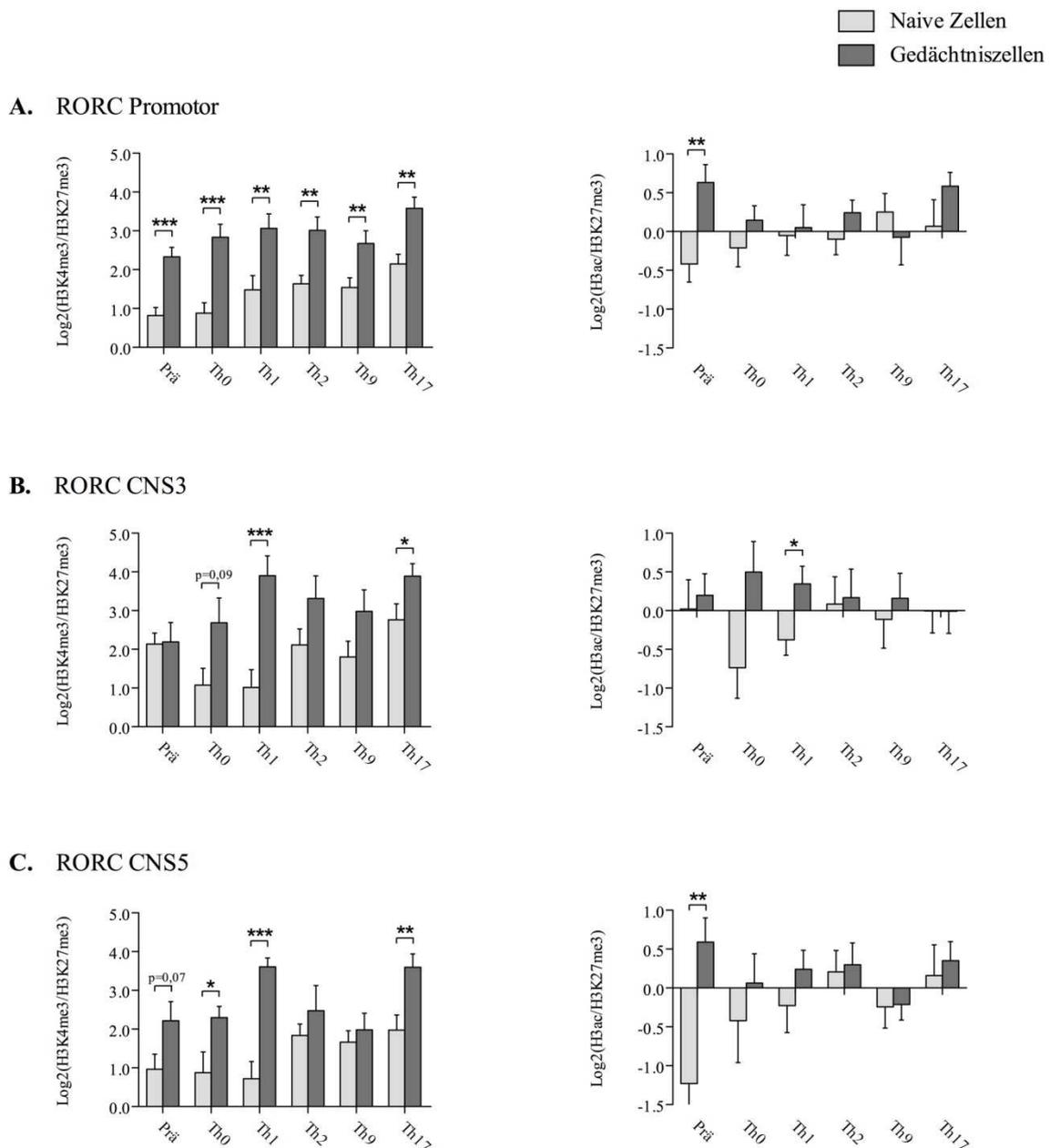


Abbildung 12: Verstärkt permissive Histonmodifikation in Gedächtnis-T-Zellen im Vergleich zu naiven T-Zellen. Naive und Gedächtnis-T-Zellen wurden isoliert und entweder als Prä-Wert konserviert oder für 5 Tage mit anti-CD28 und anti-CD3 unter Th0-, Th1-, Th2-, Th9- und Th17-induzierenden Bedingungen differenziert. Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) wurde mit Antikörpern spezifisch für H3K4me3, H3ac und H3K27me3 durchgeführt und die relative Expression dieser Chromatinmodifikationen mittels real time PCR für die Promotorregionen von RORC (A) sowie zwei CNS-Regionen (B-C) analysiert. Dargestellt ist der Log2 des Quotienten aus der relativen DNA-Menge präzipitiert mit anti-H3K4me3 zu anti-H3K27me3 (linke Spalte) bzw. anti-H3ac zu H3K27me3 (rechte Spalte). Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert und SEM von mindestens 10 unabhängigen Experimenten. Statistische Analyse mit Student's t-Test zeigte signifikante Unterschiede zwischen naiven T-Zellen und Gedächtnis-T-Zellen. * = $p < 0,05$. ** = $p < 0,01$. *** = $p < 0,001$.

werden. Insgesamt führte dies im Vergleich zu den naiven Th-Zellen zu einem Übergewicht an permissiver Histonmodifikation. Dies suggeriert, dass die Möglichkeit zur vermehrten Interleukin-17 Produktion vor allem durch Veränderung der H3K27-Trimethylierung stattfinden könnte. Genau wie bei den naiven Th-Zellen wurde auch bei den Gedächtnis-Th-Zellen das am stärksten permissive Histonmodifikationsmuster unter den Th17-Differenzierungsbedingungen beobachtet.

Besonders hervorzuheben sind die Ergebnisse der Th1-Zellen. Naive Th1-Zellen zeigten im Vergleich zu den anderen Differenzierungsbedingungen ein ausgeprägt repressives Histonmodifikationsmuster für die Th17-linienspezifischen Gene IL17A und RORC. Bei den Gedächtnis-Th-Zellen unter Th1-Differenzierungsbedingungen wurde jedoch ein, mit den anderen Differenzierungsbedingungen vergleichbares, permissives Histonmodifikationsmuster beobachtet. Dies verdeutlicht, dass Gedächtnis-Th-Zellen auch unter nicht-Th17-Bedingungen eine verstärkt permissive Histonmodifikation zeigten.

6.7. Ergebnisse der Patienten

Als nächstes wurden die Histonmodifikationen am IL17- und RORC-Lokus von Patienten mit rheumatoider Arthritis untersucht. Dahinter steckt die Hypothese, dass Patienten eine Dysregulation der Chromatinstruktur aufweisen, welche zur erhöhten Th-Plastizität sowie zum verstärkten Th17-Phänotyp beiträgt.

6.7.1. Histonmodifikation der naiven Th-Zellen

6.7.1.1. IL17-Lokus

Am IL17-Lokus (Abbildung 14-16) zeigten frisch isolierte Zellen (Prä-Wert) keinen Unterschied zwischen der RA- und HC-Gruppe, jedoch konnte nach 5 Tagen Differenzierung eine Reduktion aller drei Histonmodifikationen, H3K4me3, H3ac und H3K27me3, beobachtet werden. Dieser Rückgang wurde vor allem für die repressive Trimethylierung H3K27 sowie für die permissive Acetylierung am Histon 3 (H3ac) gemessen, weniger stark ausgeprägt jedoch zeigte sich die verminderte Immunpräzipitation für H3K4me3. Daraus resultiert ein verstärkt permissives Verhältnis von H3K4me3 zu H3K27me3 unter nicht-Th17-Differenzierungsbedingungen wohingegen unter Th17-Bedingungen keine ausgeprägten Unterschiede sowohl am Promotor als auch bei den beiden CNS-Regionen zwischen Patienten und der gesunden Kontrollgruppe gefunden werden konnte. Beim Verhältnis von H3ac zur repressiven H3K27me3 Modifikation gab es zwischen den Patienten und der gesunden Kontrollgruppe aufgrund der verminderten Immunpräzipitation beider Histonmodifikationen keine signifikanten Unterschiede.

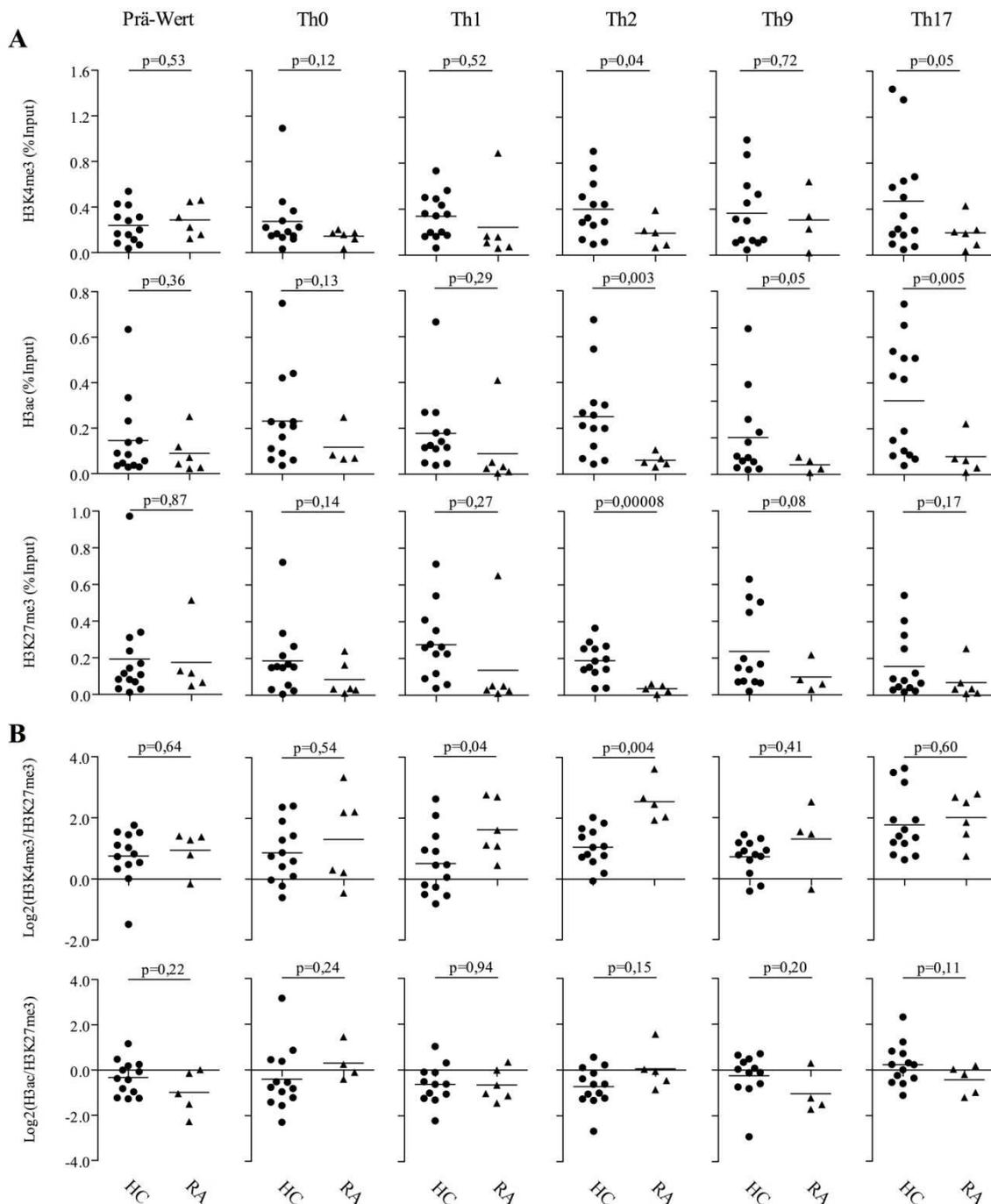


Abbildung 14: Nach 5 Tagen Differenzierung zeigten Th-Zellen von RA-Patienten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe eine verminderte Immunpräzipitation v.a. von H3K27me3 und H3ac sowie im geringeren Maße von H3K4me3 am IL17A-Promotor. Naive T-Zellen wurden isoliert und entweder als Prä-Wert konserviert oder für 5 Tage mit anti-CD28 und anti-CD3 unter Th0-, Th1-, Th2-, Th9- und Th17-induzierenden Bedingungen differenziert und für ChIP-Analysen weiterverarbeitet. Dargestellt ist am IL17A-Promotor (A) die DNA-Menge präzipitiert mit Antikörpern gegen H3K4me3, H3ac und H3K27me3 in Relation zur Input-DNA sowie (B) der Log₂ des Quotienten aus der relativen DNA-Menge präzipitiert mit anti-H3K4me3 zu anti-H3K27me3 bzw. anti-H3ac zu H3K27me3. Die Balken repräsentieren den Mittelwert der jeweiligen Probandengruppe. Statistische Analyse mit Student's t-Test durch Vergleich der Patientengruppe mit HC

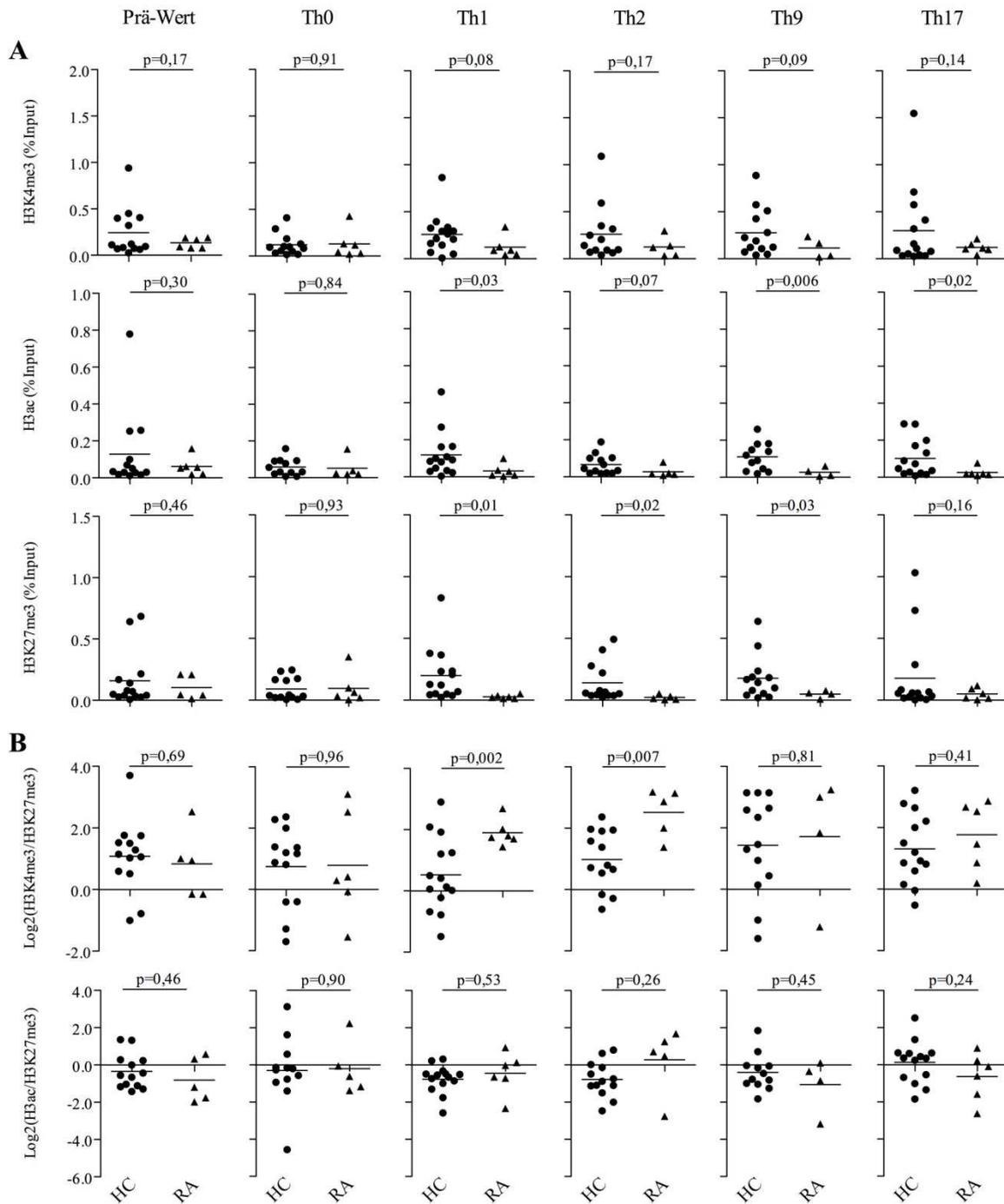


Abbildung 15: Nach 5 Tagen Differenzierung zeigten Th-Zellen von RA-Patienten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe eine verminderte Immunpräzipitation v.a. von H3K27me3 und H3ac sowie im geringeren Maße von H3K4me3 an der CNS1-Region des IL17-Lokus. Naive T-Zellen wurden isoliert und entweder als Prä-Wert konserviert oder für 5 Tage mit anti-CD28 und anti-CD3 unter Th0-, Th1-, Th2-, Th9- und Th17-induzierenden Bedingungen differenziert und für ChIP-Analysen weiterverarbeitet. Dargestellt ist an der CNS1-Region des IL17-Lokus (A) die DNA-Menge präzipitiert mit Antikörpern gegen H3K4me3, H3ac und H3K27me3 in Relation zur Input-DNA sowie (B) der Log₂ des Quotienten aus der relativen DNA-Menge präzipitiert mit anti-H3K4me3 zu anti-H3K27me3 bzw. anti-H3ac zu H3K27me3. Die Balken repräsentieren

den Mittelwert der jeweiligen Probandengruppe. Statistische Analyse mit Student's t-Test durch Vergleich der Patientengruppe mit HC

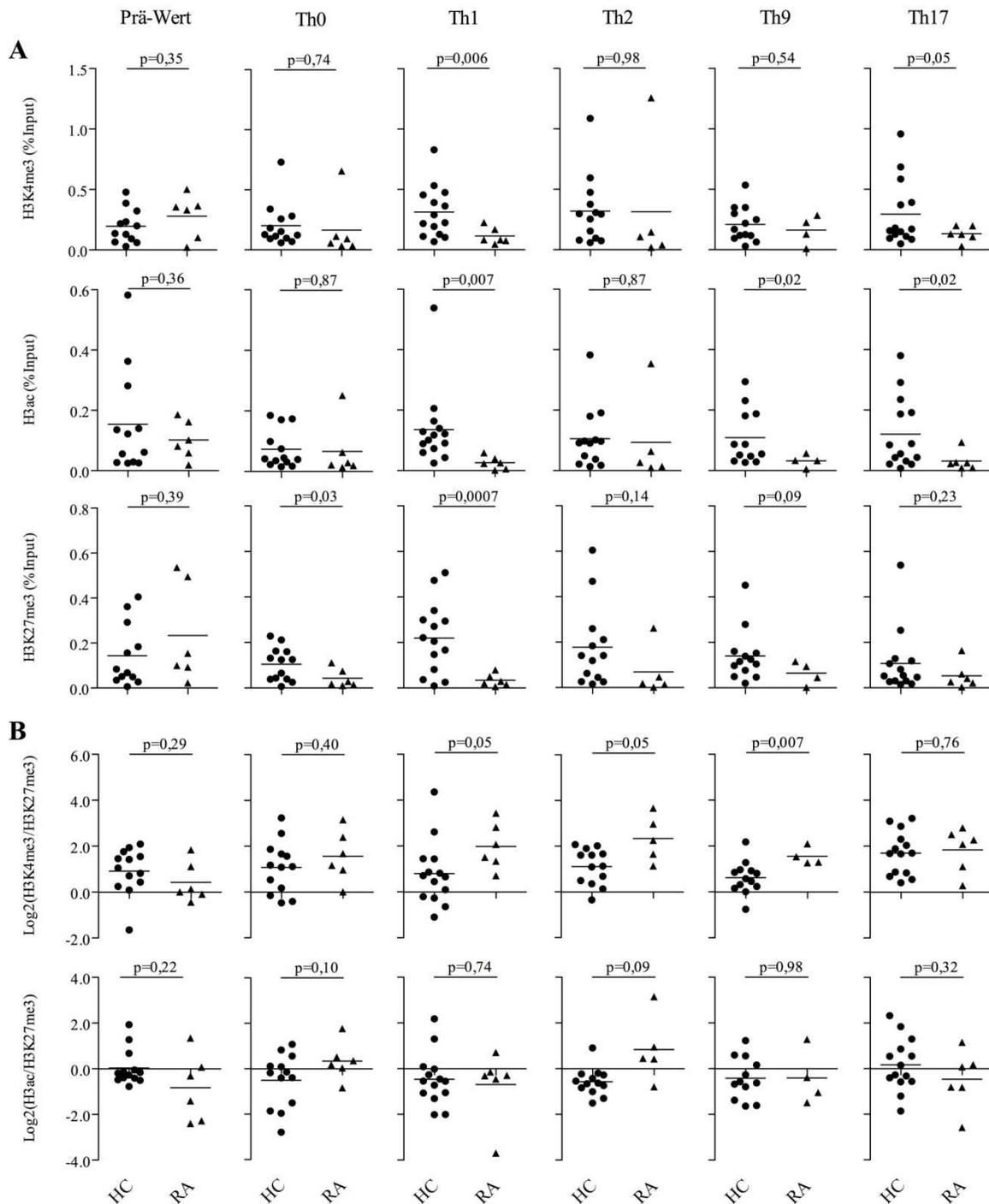


Abbildung 16: An der CNS5-Region des IL17-Lokus zeigten nach 5 Tagen Differenzierung die Th-Zellen von RA-Patienten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe eine verminderte Immunpräzipitation v.a. von H3K27me3 und H3ac sowie im geringeren Maße von H3K4me3. Naive T-Zellen wurden isoliert und

entweder als Prä-Wert konserviert oder für 5 Tage mit anti-CD28 und anti-CD3 unter Th0-, Th1-, Th2-, Th9- und Th17-induzierenden Bedingungen differenziert und für ChIP-Analysen weiterverarbeitet. Dargestellt ist an der CNS5-Region des IL17-Lokus (A) die DNA-Menge präzipitiert mit Antikörpern gegen H3K4me3, H3ac und H3K27me3 in Relation zur Input-DNA sowie (B) der Log2 des Quotienten aus der relativen DNA-Menge präzipitiert mit anti-H3K4me3 zu anti-H3K27me3 bzw. anti-H3ac zu H3K27me3. Die Balken repräsentieren den Mittelwert der jeweiligen Probandengruppe. Statistische Analyse mit Student's t-Test durch Vergleich der Patientengruppe mit HC

6.7.1.2. RORC-Lokus

Der RORC-Lokus zeigte eine ähnliche Tendenz wie der IL17-Lokus (s. Abbildung 17-19). In frisch isolierten Zellen gab es für die drei Histonmodifikationen sowie für das Verhältnis von permissiver zu repressiver Modifikation zwischen der gesunden Kontrollgruppe und den Patienten keine eindeutige Unterschiede, wohingegen nach 5 Tagen Differenzierung bei Patienten deutlich geringere Werte für alle Histonmodifikationen, v.a. für H3K27me3 und H3ac gemessen wurde. Die stärksten Unterschiede zwischen Patienten und der gesunden Kontrollgruppe zeigten sich unter den nicht-Th17-Bedingungen. Diese Beobachtung konnte vor allem am RORC-Promotor gemacht werden. Daraus resultierte tendenziell ein verstärkt permissives Verhältnis von H3K4me3 zu H3K27me3 unabhängig von der Differenzierungsbedingung sowohl am Promotor als auch bei den beiden CNS-Regionen zwischen Patienten und der gesunden Kontrollgruppe. Betrachtet man das Verhältnis von H3ac zu H3K27me3, so wurden zwischen RA-Patienten und den gesunden Kontrollspendern keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

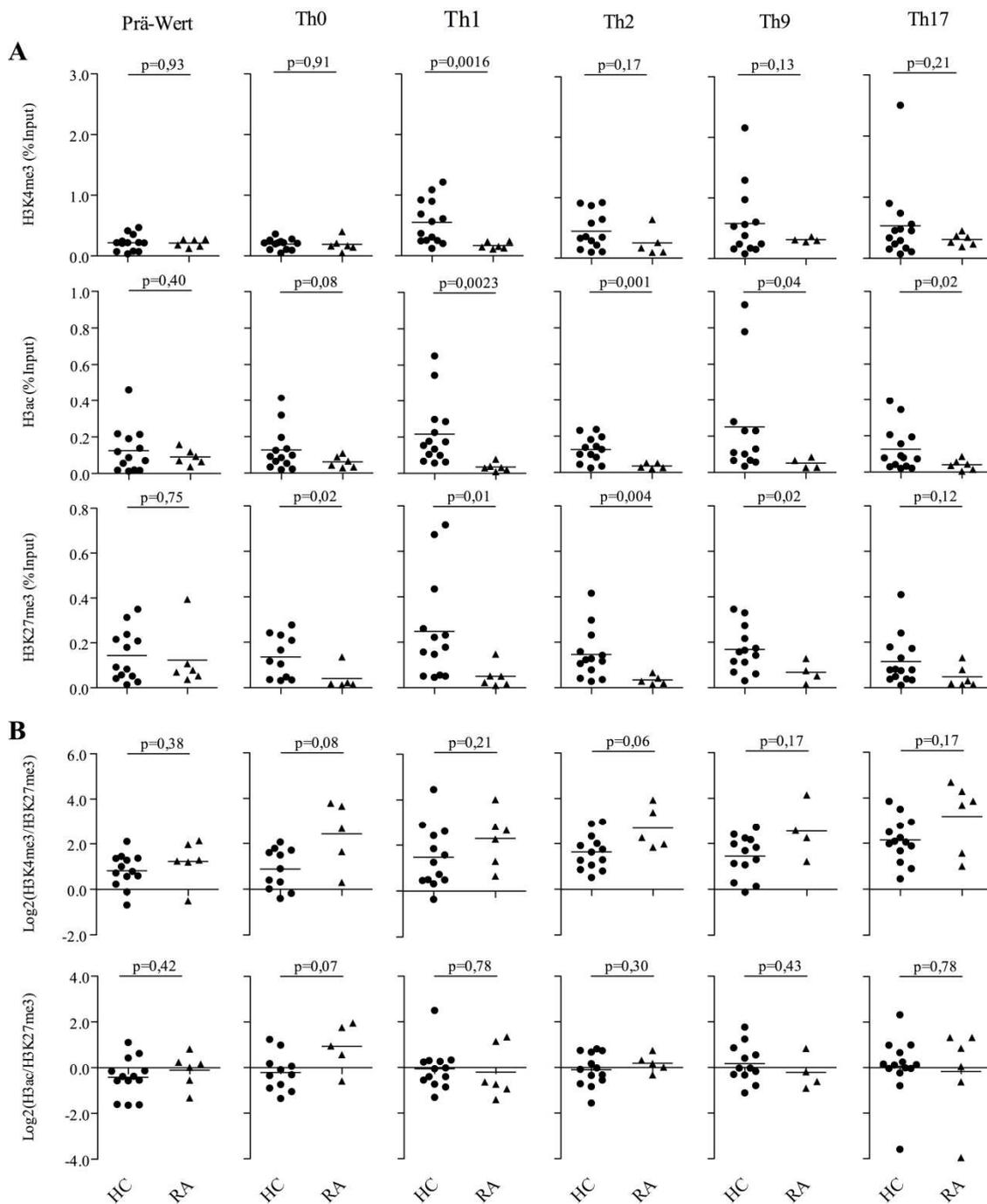


Abbildung 17: Nach 5 Tagen Differenzierung zeigten die Th-Zellen von RA-Patienten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe eine verminderte Immunpräzipitation v.a. von H3K27me3 und H3ac sowie im geringeren Maße von H3K4me3 am RORC Promotor. Naive T-Zellen wurden isoliert und entweder als Prä-Wert konserviert oder für 5 Tage mit anti-CD28 und anti-CD3 unter Th0-, Th1-, Th2-, Th9- und Th17-induzierenden Bedingungen differenziert und für ChIP-Analysen weiterverarbeitet. Dargestellt ist am RORC-Promotor (A) die DNA-Menge präzipitiert mit Antikörpern gegen H3K4me3, H3ac und H3K27me3 in Relation zur Input-DNA sowie (B) der Log₂ des Quotienten aus der relativen DNA-Menge präzipitiert mit anti-H3K4me3 zu anti-H3K27me3 bzw. anti-H3ac zu H3K27me3. Die Balken repräsentieren den Mittelwert der jeweiligen Probandengruppe. Statistische Analyse mit Student's t-Test durch Vergleich der Patientengruppe mit HC

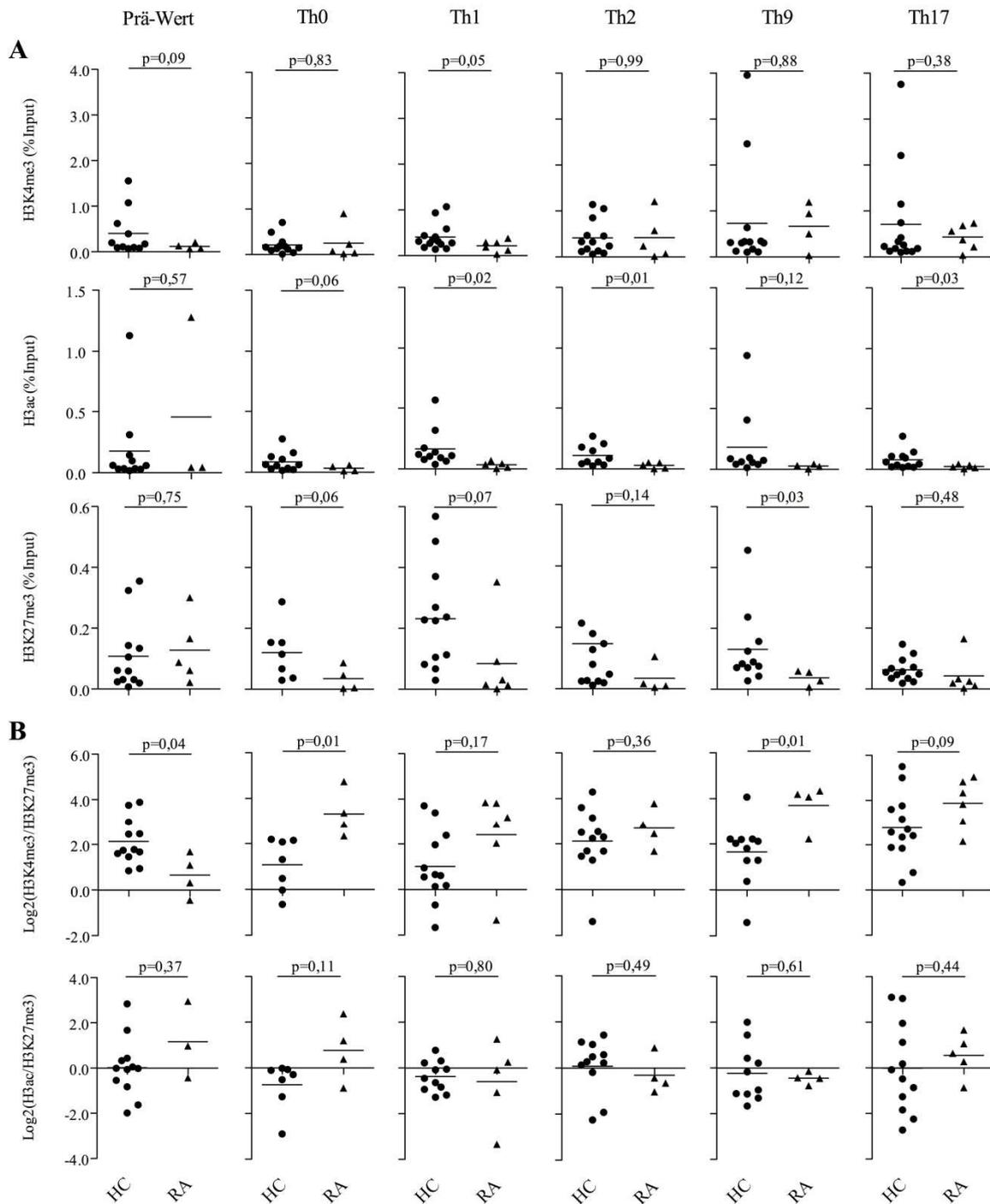


Abbildung 18: An der CNS3-Region des RORC-Lokus zeigten nach 5 Tagen Differenzierung die Th-Zellen von RA-Patienten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe eine verminderte Immunpräzipitation v.a. von H3K27me3 und H3ac sowie im geringeren Maße von H3K4me3. Naive T-Zellen wurden isoliert und entweder als Prä-Wert konserviert oder für 5 Tage mit anti-CD28 und anti-CD3 unter Th0-, Th1-, Th2-, Th9- und Th17-induzierenden Bedingungen differenziert und für ChIP-Analysen weiterverarbeitet. Dargestellt ist an der CNS3-Region des RORC-Lokus (A) die DNA-Menge präzipitiert mit Antikörpern gegen H3K4me3, H3ac und H3K27me3 in Relation zur Input-DNA sowie (B) der Log2 des Quotienten aus der relativen DNA-Menge präzipitiert mit anti-H3K4me3 zu anti-H3K27me3 bzw. anti-H3ac zu

H3K27me3. Die Balken repräsentieren den Mittelwert der jeweiligen Probandengruppe. Statistische Analyse mit Student's t-Test durch Vergleich der Patientengruppe mit HC

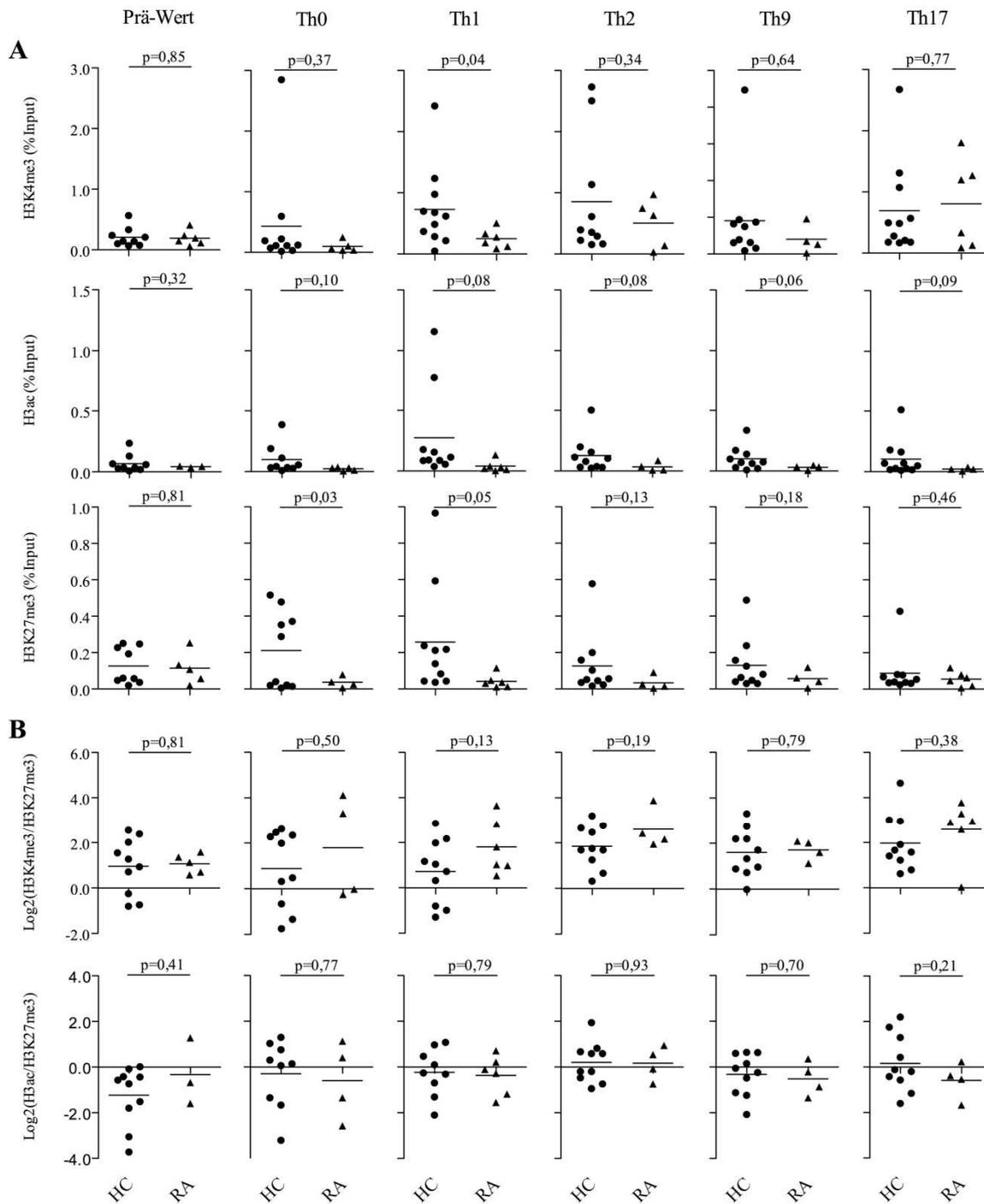


Abbildung 19: An der CNS5-Region des RORC-Lokus zeigten nach 5 Tagen Differenzierung die Th-Zellen von RA-Patienten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe tendenziell eine verminderte Immunpräzipitation v.a. von H3K27me3 und H3ac sowie im geringeren Maße von H3K4me3. Naive T-

Zellen wurden isoliert und entweder als Prä-Wert konserviert oder für 5 Tage mit anti-CD28 und anti-CD3 unter Th0-, Th1-, Th2-, Th9- und Th17-induzierenden Bedingungen differenziert und für ChIP-Analysen weiterverarbeitet. Dargestellt ist an der CNS5-Region des RORC-Lokus (**A**) die DNA-Menge präzipitiert mit Antikörpern gegen H3K4me3, H3ac und H3K27me3 in Relation zur Input-DNA sowie (**B**) der Log2 des Quotienten aus der relativen DNA-Menge präzipitiert mit anti-H3K4me3 zu anti-H3K27me3 bzw. anti-H3ac zu H3K27me3. Die Balken repräsentieren den Mittelwert der jeweiligen Probandengruppe. Statistische Analyse mit Student's t-Test durch Vergleich der Patientengruppe mit HC

6.7.1.3. Zusammenfassung

Zusammenfassend zeigten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe die Th-Zellen von RA-Patienten im IL17- und RORC-Lokus nach 5 Tagen Differenzierung, unabhängig von der jeweiligen Differenzierungsbedingung, verminderte Werte aller drei Histonmodifikationen v.a. jedoch von H3K27me3 und H3ac, wohingegen bei frisch isolierten Zellen keine Unterschiede zu sehen waren. Dies führte vor allem bei den nicht-Th17-Zellen zu einem verstärkt permissiven Verhältnisses von H3K4me3 zu H3K27me3. Das Verhältnis von H3ac zu H3K27me3 zeigte aufgrund der verminderten Immunpräzipitation beider Histonmodifikationen keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten und der gesunden Kontrollgruppe.

6.7.2. Histonmodifikation der Gedächtnis-Th-Zellen

6.7.2.1. IL17- und RORC-Lokus

Der Vergleich von Gedächtniszellen zwischen Patienten und der gesunden Kontrollgruppe offenbarte ein anderes Ergebnis (s. Abbildung 20-25).

Am IL17-Lokus zeigten die einzelnen Histonmodifikationen sowohl am Promotor als auch an den beiden CNS-Regionen keine signifikanten Unterschiede zwischen RA-Patienten und HC.

In der RORC CNS3 Region zeigten RA-Patienten eine signifikant erhöhte H3K4-Trimethylierung unter der neutralen Th0-Differenzierungsbedingung. Dies führte zu einem verstärkt permissivem Verhältnis von H3K4me3 zu H3K27me3 (s. Abbildung 24). Am RORC Promotor und in der RORC CNS5 Region konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen RA-Patienten und der gesunden Kontrollgruppe gesehen werden.

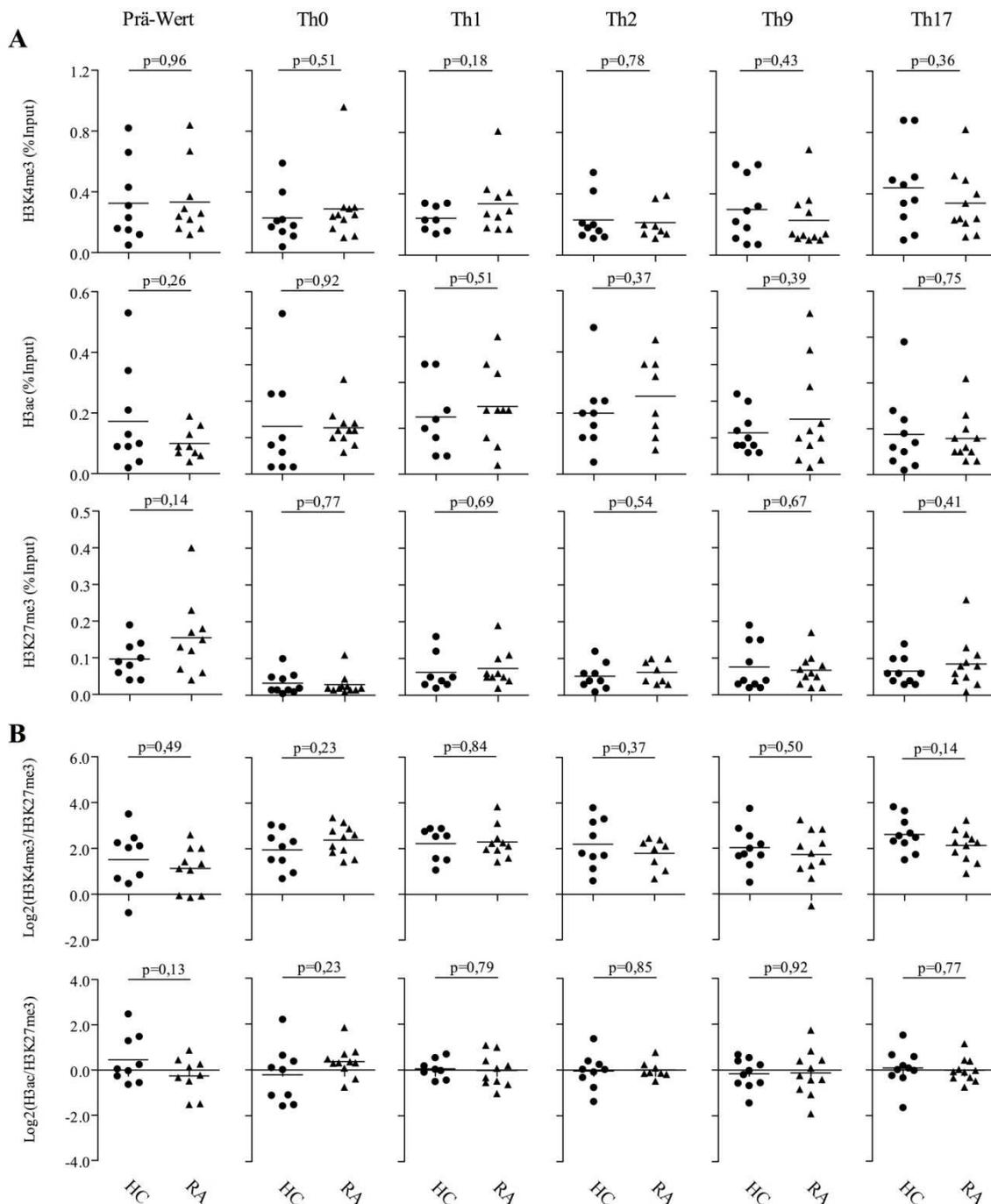


Abbildung 20: Keine signifikanten Unterschiede in den gemessenen Histonmodifikationen zwischen RA-Patienten und HC am IL17A-Promotor. Gedächtnis-T-Zellen von Patienten mit RA sowie einer gesunden Kontrollgruppe wurden isoliert und entweder als Prä-Wert konserviert oder für 5 Tage mit anti-CD28 und anti-CD3 unter Th0-, Th1-, Th2-, Th9- und Th17-induzierenden Bedingungen differenziert und für ChIP-Analysen weiterverarbeitet. Dargestellt ist am IL17A-Promotor (**A**) die DNA-Menge präzipitiert mit Antikörpern gegen H3K4me3, H3ac und H3K27me3 in Relation zur Input-DNA sowie (**B**) der Log₂ des Quotienten aus der relativen DNA-Menge präzipitiert mit anti-H3K4me3 zu anti-H3K27me3 bzw. anti-H3ac zu H3K27me3. Die Balken repräsentieren den Mittelwert der jeweiligen Probandengruppe. Statistische Analyse mit Student's t-Test durch Vergleich der Patientengruppe mit HC zeigten keine signifikanten Unterschiede.

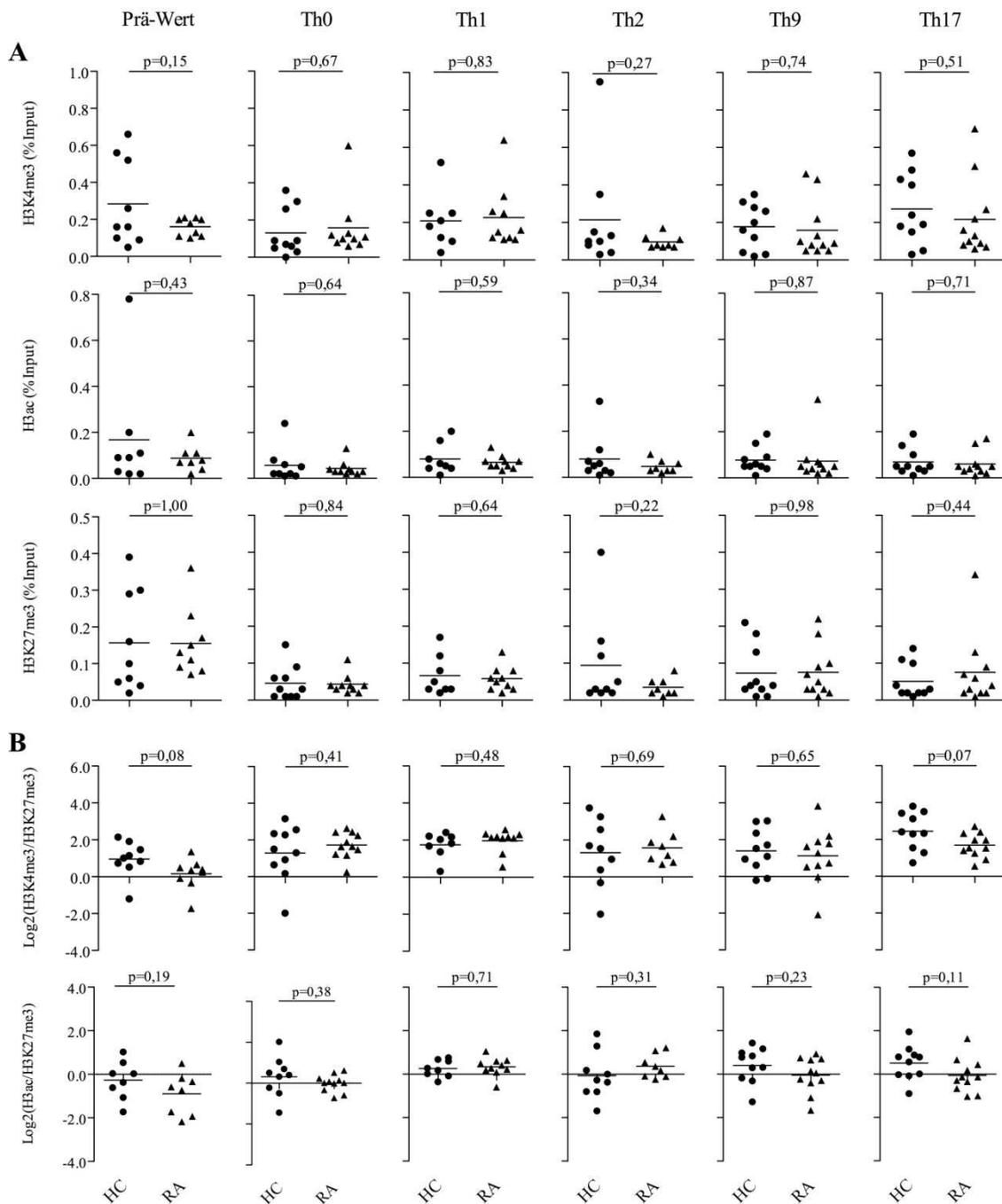


Abbildung 21: In der CNS1-Region des IL17-Lokus wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen RA-Patienten und HC gesehen. Gedächtnis-T-Zellen von Patienten mit RA sowie einer gesunden Kontrollgruppe wurden isoliert und entweder als Prä-Wert konserviert oder für 5 Tage mit anti-CD28 und anti-CD3 unter Th0-, Th1-, Th2-, Th9- und Th17-induzierenden Bedingungen differenziert und für ChIP-Analysen weiterverarbeitet. Dargestellt ist an der CNS1-Region des IL17-Lokus (A) die DNA-Menge präzipitiert mit Antikörpern gegen H3K4me3, H3ac und H3K27me3 in Relation zur Input-DNA sowie (B) der Log₂ des Quotienten aus der relativen DNA-Menge präzipitiert mit anti-H3K4me3 zu anti-H3K27me3 bzw. anti-H3ac zu H3K27me3. Die Balken repräsentieren den Mittelwert der jeweiligen Probandengruppe. Statistische Analyse mit Student's t-Test durch Vergleich der Patientengruppe mit HC zeigten keine signifikanten Unterschiede.

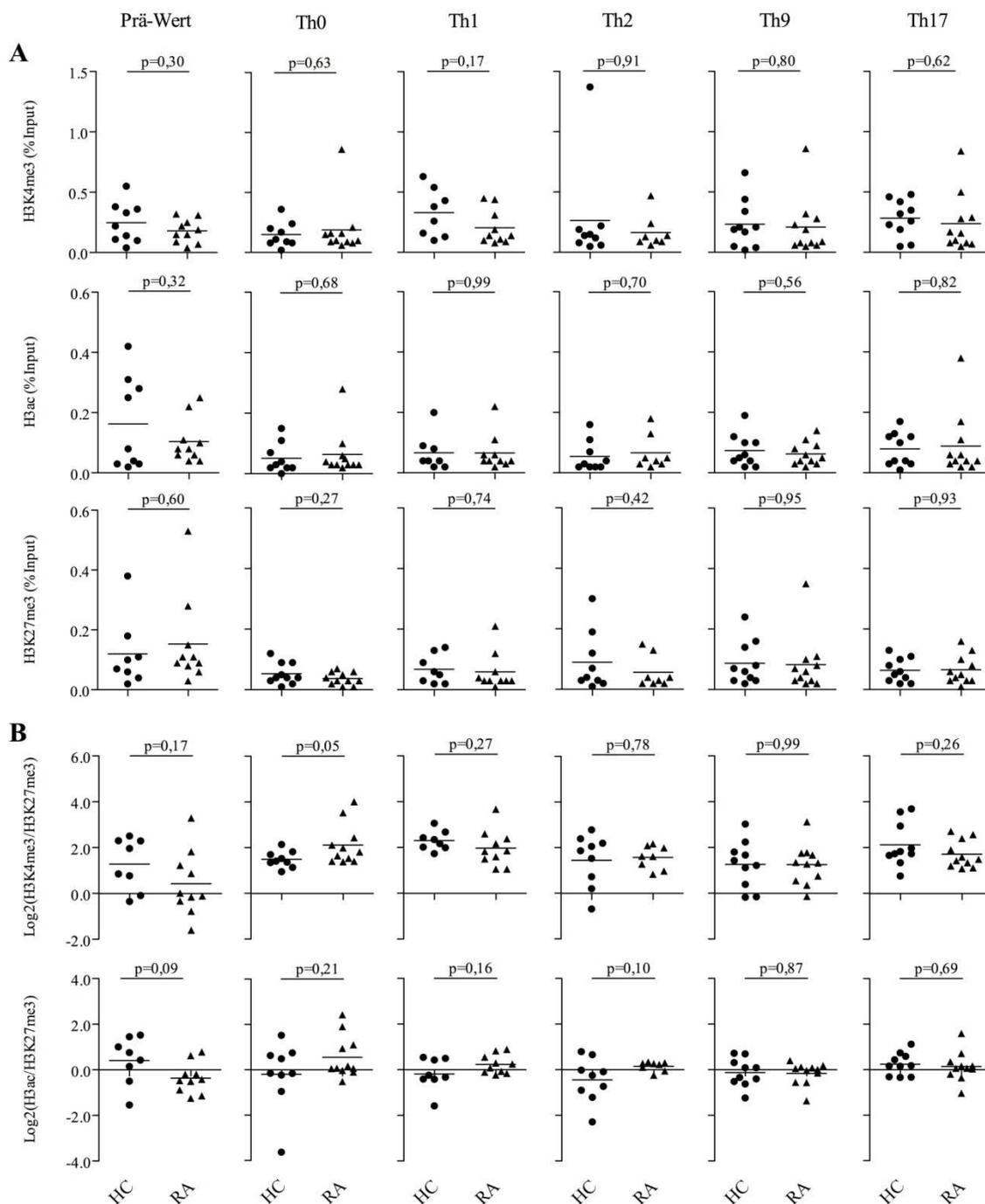


Abbildung 22: Keine signifikanten Unterschiede in der CNS5-Region des IL17-Lokus zwischen RA-Patienten und HC. Gedächtnis-T-Zellen von Patienten mit RA sowie einer gesunden Kontrollgruppe wurden isoliert und entweder als Prä-Wert konserviert oder für 5 Tage mit anti-CD28 und anti-CD3 unter Th0-, Th1-, Th2-, Th9- und Th17-induzierenden Bedingungen differenziert und für CHIP-Analysen weiterverarbeitet. Dargestellt ist an der CNS5-Region des IL17-Lokus (**A**) die DNA-Menge präzipitiert mit Antikörpern gegen H3K4me3, H3ac und H3K27me3 in Relation zur Input-DNA sowie (**B**) der Log₂ des Quotienten aus der relativen DNA-Menge präzipitiert mit anti-H3K4me3 zu anti-H3K27me3 bzw. anti-H3ac zu H3K27me3. Die Balken repräsentieren den Mittelwert der jeweiligen Probandengruppe. Statistische Analyse mit Student's t-Test durch Vergleich der Patientengruppe mit HC zeigten keine signifikanten Unterschiede.

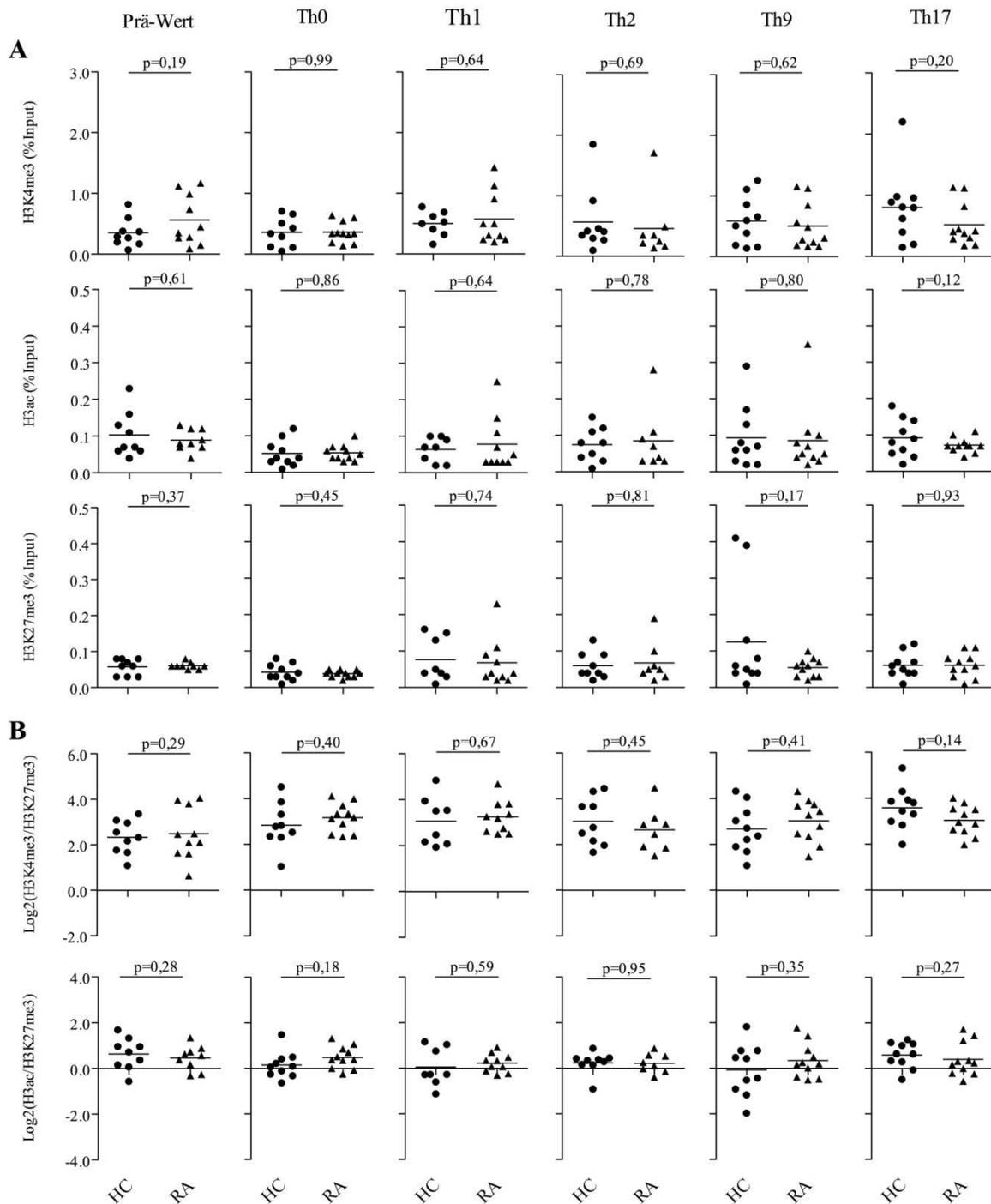


Abbildung 23: Keine signifikanten Unterschiede zwischen RA-Patienten und HC am RORC Promotor. Gedächtnis-T-Zellen von RA-Patienten sowie einer gesunden Kontrollgruppe wurden isoliert und entweder als Prä-Wert konserviert oder für 5 Tage mit anti-CD28 und anti-CD3 unter Th0-, Th1-, Th2-, Th9- und Th17-induzierenden Bedingungen differenziert und für ChIP-Analysen weiterverarbeitet. Dargestellt ist am RORC-Promotor (A) die DNA-Menge präzipitiert mit Antikörpern gegen H3K4me3, H3ac und H3K27me3 in Relation zur Input-DNA sowie (B) der Log₂ des Quotienten aus der relativen DNA-Menge präzipitiert mit anti-H3K4me3 zu anti-H3K27me3 bzw. anti-H3ac zu H3K27me3. Die Balken repräsentieren den Mittelwert der jeweiligen Probandengruppe. Statistische Analyse mit Student's t-Test durch Vergleich der Patientengruppe mit HC

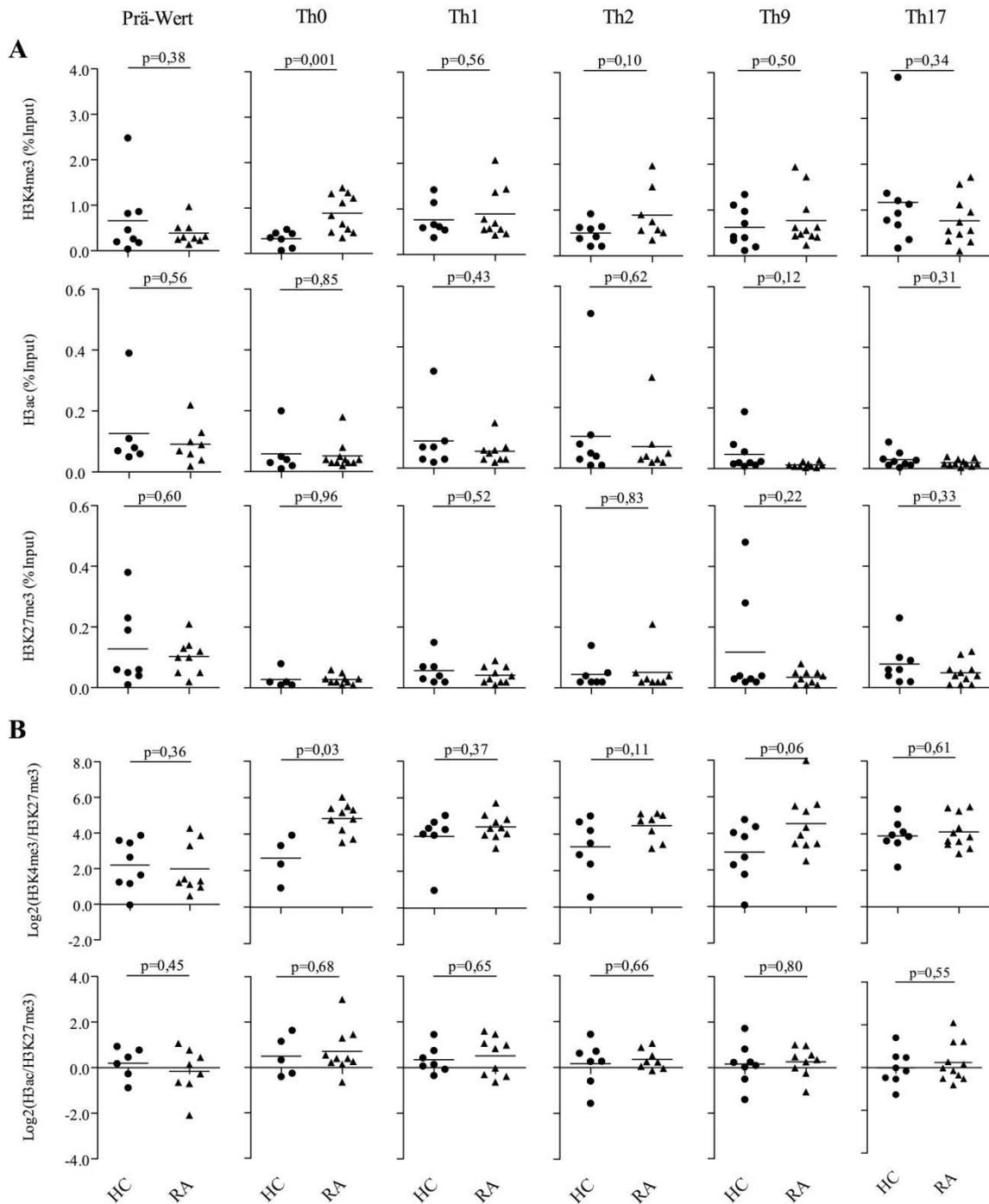


Abbildung 24: RA-Patienten zeigten erhöhte Werte für H3K4me3 unter neutralen

Differenzierungsbedingungen sowie tendenziell ein verstärktes permissives Verhältnis von H3K4- zur

H3K27-Trimethylierung unter Th9-Bedingungen am RORC CNS3. Gedächtnis-T-Zellen von Patienten mit

RA sowie einer gesunden Kontrollgruppe wurden isoliert und entweder als Prä-Wert konserviert oder für 5 Tage

mit anti-CD28 und anti-CD3 unter Th0-, Th1-, Th2-, Th9- und Th17-induzierenden Bedingungen differenziert

und für ChIP-Analysen weiterverarbeitet. Dargestellt ist an der CNS-Region 3 des RORC-Lokus (A) die DNA-

Menge präzipitiert mit Antikörpern gegen H3K4me3, H3ac und H3K27me3 in Relation zur Input-DNA sowie

(B) der Log₂ des Quotienten aus der relativen DNA-Menge präzipitiert mit anti-H3K4me3 zu anti-H3K27me3

bzw. anti-H3ac zu H3K27me3. Die Balken repräsentieren den Mittelwert der jeweiligen Probandengruppe. Statistische Analyse mit Student's t-Test durch Vergleich der Patientengruppe mit HC

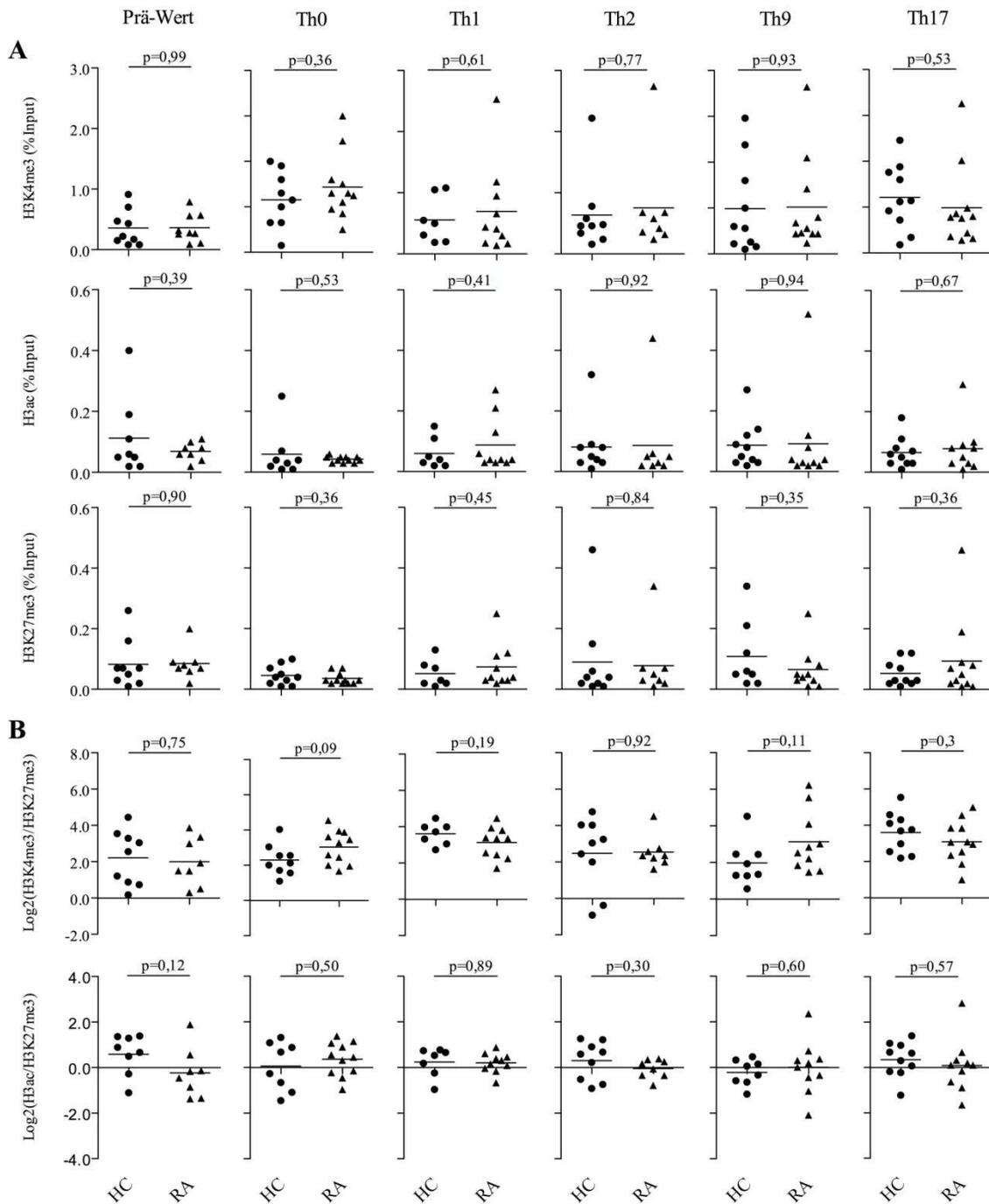


Abbildung 25: Keine signifikanten Unterschiede zwischen RA-Patienten und der gesunden

Kontrollgruppe am RORC CNS5. Gedächtnis-T-Zellen von Patienten mit RA sowie einer gesunden

Kontrollgruppe wurden isoliert und entweder als Prä-Wert konserviert oder für 5 Tage mit anti-CD28 und anti-CD3 unter Th0-, Th1-, Th2-, Th9- und Th17-induzierenden Bedingungen differenziert und für ChIP-Analysen

weiterverarbeitet. Dargestellt ist an der CNS-Region 5 des RORC-Lokus (**A**) die DNA-Menge präzipitiert mit Antikörpern gegen H3K4me3, H3ac und H3K27me3 in Relation zur Input-DNA sowie (**B**) der Log2 des Quotienten aus der relativen DNA-Menge präzipitiert mit anti-H3K4me3 zu anti-H3K27me3 bzw. anti-H3ac zu H3K27me3. Die Balken repräsentieren den Mittelwert der jeweiligen Probandengruppe. Statistische Analyse mit Student's t-Test durch Vergleich der Patientengruppe mit HC

Zusammenfassend zeigten die einzelnen Histonmodifikationen bei den Gedächtnis-Th-Zellen im Gegensatz zu den Ergebnissen der naiven Th-Zellen deutlich geringe Unterschiede zwischen Patienten und der gesunden Kontrollgruppe. Insbesondere konnte keine über alle Differenzierungsbedingungen hinweg ausgeprägte Minderung aller drei Histonmodifikationen wie bei den naiven Zellen der RA-Patienten festgestellt werden. Lediglich die Th0- als auch die Th9-Bedingung zeigten bei RORC CNS3 ein verstärkt permissives Verhältnis bei RA-Patienten, wohingegen am IL17-Lokus sowie am RORC Promotor und CNS Region 5 des RORC-Lokus keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen beobachtet werden konnten.

7. Diskussion

Th17-Zellen, eine Subpopulation der CD4-positiven T-Helferzellen, spielen mit der Sekretion des entzündungsfördernden Zytokins IL-17 eine bedeutende Rolle in der rheumatoiden Arthritis. So konnten Leipe et al neben einem erhöhten prozentualen Anteil von Th17-Zellen innerhalb der CD4⁺-T-Zellen auch eine erhöhte Menge an IL-17 im Blutserum als auch in der Gelenkflüssigkeit von RA-Patienten nachweisen. Ebenso konnte die Forschergruppe bei RA-Patienten nach Stimulation von naiven Th-Zellen eine vermehrte Differenzierung hin zu Th17-Zellen, eine verstärkte IL-17 Produktion sowie einer erhöhten Menge des Transkriptionsfaktors RORC im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe beobachten. Dies resultiert in einen mit der Krankheitsaktivität korrelierenden verstärkt ausgeprägten Th17-Phänotyp bei Patienten mit rheumatoider Arthritis, dessen Ursache bisher nicht gänzlich erklärt werden kann (Leipe et al., 2010). Eine mögliche Ursache stellen epigenetische Modifikationen dar, die Einfluss auf die Entwicklung einer T-Zelle zu einer bestimmten Th-Subgruppe haben. Um eine mögliche Dysregulation der T-Zelldifferenzierung bei RA-Patienten erklären zu können, muss zunächst zum besseren Verständnis die Regulationsmechanismen genauer untersucht werden, insbesondere im Bereich der Schlüsselgene RORC und IL17. Eine gezielte Untersuchung der Histonmodifikationen in diesen zwei Genen hat zum Zeitpunkt des Untersuchungsbeginns nur bei Mäusen stattgefunden. Aus diesem Grund wurden mit der vorliegenden Arbeit die epigenetischen Histonmodifikation an den beiden für die Th17-Zellen bekannten Schlüsselgenen RORC und IL17 in humanen CD4-positiven T-Helferzellen genauer untersucht. Hierfür wurde in dieser Forschungsarbeit der Fokus auf die zwei permissiven Histonmodifikationen H3K4me3 und H3ac sowie auf die repressive Modifikation H3K27me3 gelegt.

7.1. Naive-T-Zellen bei gesunden Spendern

Der erste Interessenschwerpunkt dieser Arbeit war einerseits herauszufinden, ob diese Histonmodifikationen je nach Differenzierungsbedingung und somit je nach Phänotyp der T-Helferzelle ein dem Interleukin-Sekretionsprofil entsprechendes Histonmodifikationsmuster aufweisen. So konnte deutlich gezeigt werden, dass CD4⁺ T-Zellen nach 5 Tagen Differenzierung unter Th17-Kulturbedingungen das am stärksten permissiv ausgeprägte Histonmodifikationsmuster, bedingt durch eine verstärkte H3K4me3- sowie verminderte

H3K27me3-Modifikation, im Bereich der Promotoren der Gene IL17 und RORC aufwies, wohingegen bei den nicht-Th17-Zellen, und hier insbesondere unter Th1-Bedingungen, ein im Vergleich verstärkt repressives Profil zu sehen war. Unter Th1-Bedingungen wurde im Vergleich zu Th17 eine gesteigerte repressive H3K27- sowie verminderte permissive H3K4-Trimethylierung beobachtet. Diese Ergebnisse bestätigen die Resultate aus mehreren Mausmodellen: Wei et al. sowie Mukasa et al. untersuchten die Ausprägung der permissiven H3K4- sowie der repressiven H3K27-Trimethylierung am RORC- und IL17-Lokus. Die Forschergruppen fanden heraus, dass T-Zellen von Mäusen, differenziert unter Th2- und v.a. unter Th1-Differenzierungsbedingungen, in den beiden Loci IL17 und RORC verstärkte Level an repressiver H3K27me3- und deutlich verringerte Werte für die permissive H3K4me3-Modifikation zeigten, wohingegen Th17-Zellen im Vergleich stark erhöhte Werte für die permissive H3K4- und eindeutig verminderte Mengen an repressiver H3K27-Trimethylierung besaßen (Mukasa et al., 2010; Wei et al., 2009). Etwas später untersuchte die Gruppe um C. Cohen die Histonmodifikationen an den beiden Promotoren in humanen CD4⁺ naiven T-Zellen sowie in isolierten Th1- und Th17-Zellen, die weitere 14 Tage unter neutralen Bedingungen kultiviert wurden. Auch hier zeigte sich bei den Th17-Zellen am IL17-Promotor im Vergleich zu den Th1-Zellen eine verminderte H3K27- und verstärkte H3K4-Trimethylierung (Cohen et al., 2011). Somit konnten die Versuche genau wie in dieser Arbeit zeigen, dass an den Promotoren der Gene IL17 und RORC je nach Differenzierungsbedingungen gemäß ihrer unterschiedlichen IL-17-Produktion ein linienspezifisches Histonmodifikationsmuster zu finden ist. Wie instabil bzw. flexibel epigenetische Modifikationen auf Zytokinmilieuveränderungen reagieren, konnte Mukasa et al. durch Zugabe von IL-12 zur Th17-Zellkultur demonstrieren. Hierbei kam es zu einer Reduktion der permissiven H3K4- sowie Erhöhung der repressiven H3K27-Trimethylierung nicht nur am Promotor sondern im gesamten Bereich des IL17-Lokus (Mukasa et al., 2010). Dass diese Veränderungen der Histonmodifikationen nicht nur ein Nebenprodukt der T-Zelldifferenzierung darstellen, sondern eine notwendige Komponente für die jeweilige T-Zelllinie, konnte Yamashita durch heterozygot-insuffiziente Mäuse für die H3K4-Methyltransferase "MLL" (MLL +/-) zeigen. Hierbei konnten die Mäuse die IL4, IL5, IL13 und Gata3-Expression in Th2-Zellen nicht aufrechterhalten, was in diesem Experiment die Bedeutung der MLL und der H3K4-Modifikation für die Erhaltung des Th2-Phänotyps sowie die Bedeutung der Histonmodifikationen im Allgemeinen für die T-Zellen demonstrierte (Yamashita et al., 2006).

7.2. Mögliche Rolle der CNS Regionen IL17 CNS1 und RORC CNS3 für die T-Zelldifferenzierung

Die CNS-Regionen 1 und 5 des IL17 Locus zeigten in dieser Arbeit ebenfalls ein je nach Differenzierungsbedingung unterschiedliches Histonmodifikationsmuster. So wurde die am stärksten permissive Histonmodifikation unter Th17-Differenzierungsbedingungen durch Reduktion von H3K27me₃ gesehen. Unter Th1-Bedingungen war das Verhältnis H3K4me₃ zu H3K27me₃ im Vergleich zu den Th17-Zellen durch einen signifikant erhöhten Wert der hemmenden H3K27-Trimethylierung signifikant repressiver gestaltet. Somit kann auch bei den beiden CNS-Regionen festgestellt werden, dass die Histonmodifikationen in diesem Bereichen linienspezifische Veränderungen unterliegen. Ebenso überzeugt von der Relevanz der CNS1-Region für die Th17-Zellentwicklung waren die beiden Arbeitsgruppen Thomas et al. und Zhang et al., die mit ihren Ergebnissen den Beweis dafür sehen, dass CNS1 ein für die IL-17-Produktion relevanter Enhancer darstellt. So konnte gezeigt werden, dass ROR γ t an die CNS1-Region bindet und hierbei die IL17-Promotoraktivität erhöht. Die Zugabe von ROR γ t ohne Beisein der CNS1-Region führte jedoch zu keinem deutlichen Anstieg der IL17-Promotoraktivität. Dies lässt die Vermutung einbringen, dass CNS1 ein notwendiger Enhancer zur Steigerung der IL-17-Produktion darstellt (Thomas et al., 2012; Yang et al., 2008; Zhang et al., 2008). Welcher genauer Mechanismus dahinter steckt und welche Bedeutung dies unter in-vivo Bedingung hat, könnte mit einem Mausmodell genauer untersucht werden. Wang et al. führte in CNS2-defizienten Mäusen ein solches in-vivo Experiment durch. CNS2 ist eine ebenfalls als Enhancer angesehene CNS-Region -2kb upstream des IL17-Promotors. Hierbei kam es im Vergleich zur Wildtyp-Maus bei gleichbleibender ROR γ t-Konzentration zu einer deutlichen Reduktion der IL-17-Produktion unter Th17-Differenzierungsbedingungen. Wang et al fand heraus, dass zwei Histon-modulierende Enzyme, p300, das die Histon-Acetyltransferase (HAT) beinhaltet, sowie JmJc domain-containing protein 3 (JMJD3), das spezifisch die H3K27-Trimethylierung entfernt (De Santa et al., 2007), an diese CNS2-Region binden. Bei ROR γ t-defizienten Mäusen kam es in dieser CNS-Region zu einem Anstieg der repressiven H3K27-Trimethylierung sowie zu einer Reduktion der H3-Azetylierung. Dies führte zur Hypothese, dass ROR γ t an CNS2 bindet, die Histon-modulierende Enzyme P300 und JMJD3 initiiert und durch ein verstärkt permissives Histonmodifikationsmuster durch Reduktion von H3K27me₃ und Erhöhung von H3ac eine bessere Zugänglichkeit der Transkriptionsfaktoren bewirkt, das im Endeffekt zu

einer IL-17-Produktionssteigerung führt (Wang et al., 2012). Da in der CNS1-Region ebenfalls unter Th17-Bedingungen ein signifikanter Rückgang der repressiven H3K27-Trimethylierung zu sehen war, könnte der durch Wang et al. beschriebene Mechanismus ebenfalls auf den Enhancer CNS1 zutreffen. Ebenso zeigten diese Versuche, dass Veränderungen im Epigenom nicht nur eine Folge einer bestimmten T-Zelldifferenzierung sind, sondern dass epigenetische Modifikationen die T-Zellentwicklung aktiv mitbestimmen. Bezüglich IL17 CNS5 gibt es bisher sehr wenige publizierte Daten. Bei Mäusen wurde genau wie bei CNS1 entsprechend dem Th17-Phänotyp unter Th17-Kulturbedingungen im Vergleich zu den anderen Differenzierungsbedingungen ein Rückgang der repressiven H3K27- sowie Verstärkung der permissiven H3K4-Trimethylierung beobachtet. Ebenso wie in der CNS1-Region wurde bei Mäusen unter Th17+IL-12 Kulturbedingungen im Vergleich zu Th17-Kulturbedingungen eine Veränderung hin zu einem verstärkt repressivem Histonmodifikationsmuster beobachtet (Mukasa et al., 2010). Im Gegensatz zu CNS1 zeigte jedoch CNS5 in einem CNS-IL17Promotor-Luciferase-Konstrukt in Beisein von ROR γ t keine erhöhte Luciferase-Aktivität. Dies verdeutlichte, dass CNS5 im Gegensatz zu CNS1 kein ROR γ t-vermittelter Enhancer der IL17-Promotoraktivität ist (Thomas et al., 2012).

DNase I hypersensitive sites Analysen können einen weiteren Hinweis darauf geben, wie relevant eine CNS-Region für die Gen-Transkription ist, denn damit kann die Zugänglichkeit durch die DNase I und somit die Chromatindensität in dem jeweiligen Bereich gemessen werden. Nach Th17-Differenzierung zeigten die meisten CNS-Regionen sowie der Promotor am IL17-Lokus entsprechend dem permissiven Histonmodifikationsmuster eine gute Zugänglichkeit für die DNase I. Die Zugabe von IL-12 bewirkte jedoch nur beim Promotor und bei CNS1 entsprechend dem Zugewinn von H3K27me₃ eine Resistenz gegenüber der DNase I. Dies gibt einen weiteren Hinweis, dass CNS1 eine größere Rolle in der IL-17-Transkriptionsregulation einnehmen könnte als CNS5 (Mukasa et al., 2010; Thomas et al., 2012).

Der durch Akimzhanov beschriebene Anstieg der H3-Azetylierung im Bereich des gesamten IL17-Lokus unter Th17-Differenzierungsbedingungen im Vergleich zum Präwert als auch im Vergleich zu den Th1- und Th2-Bedingungen konnte in der hiesigen Arbeit nicht gesehen werden (Akimzhanov et al., 2007). Es wurde zwar ein Überhang der permissiven Acetylierung gegenüber der repressiven Trimethylierung unter Th17-Kulturbedingungen beobachtet, jedoch war dessen Ursache vielmehr eine Reduktion der repressiven H3K27-Trimethylierung bei ansonsten unveränderter H3-Azetylierung. Diese Befunddiskrepanz könnte daher kommen, dass einerseits hier humane Zellen verwendet wurden, oder dass die

vom Menschen stammenden Zellen eine größere Heterogenität darstellen als die von Mäusen stammenden T-Zellen und die Sensitivität des Versuchsaufbaus nicht ausreichte, um Unterschiede zwischen den Kulturbedingungen festzustellen, da die H3-Azetylierung insgesamt in geringeren Mengen vorkommt als z.B. die H3K4-Trimethylierung.

Bei RORC CNS3 wurde in dieser Arbeit unter Th17-Kulturbedingungen wie am IL17-Lokus das am stärksten permissive Verhältnis aus H3K4me3 zu H3K27me3 gemessen. Der Unterschied zwischen dem Präwert und den Werten nach 5 Tagen Differenzierung unter Th17-Bedingungen war jedoch nicht ausgeprägt, ein geringer Rückgang von H3K27me3 war zu beobachten. Vielmehr zeigten sich Unterschiede zwischen dem Präwert und den Werten nach 5 Tagen Differenzierung unter Th1-Kulturbedingungen. Th1 Zellen zeigten einen signifikanten Anstieg von H3K27me3 im Vergleich zum Präwert als auch im Vergleich zu Th17-Zellen. Dies suggeriert, dass die Aufgabe von RORC CNS3 primär die Hemmung der RORC-Transkription unter Th1-Bedingungen ist. Diese hemmende Wirkung fällt unter Th17-Bedingungen durch eine verminderte H3K27-Trimethylierung deutlich geringer aus. Mukasa et al. zeigte bei Mäusen unter Th17+IL-12 Kulturbedingungen im Vergleich zu den Th17-Differenzierungsbedingungen einen ebenso deutlichen Anstieg der repressiven H3K27-Trimethylierung in RORC CNS3, die mit einer geringeren RORC-Expression einhergingen. Bei Knockout Mäuse für STAT4 (-/-) sowie T-bet (-/-) blieb unter Th17+IL-12 Bedingungen der Anstieg von H3K27me3 aus. Dies lässt vermuten, dass der Anstieg von H3K27me3 unter Th1-Bedingungen T-bet und STAT4-vermittelt ist. Diese Ergebnisse unterstreichen die mögliche Funktion von RORC CNS3 als unterdrückender Regulator der RORC-Transkription und somit des Th17-Phänotyps unter Th1-Differenzierungsbedingungen in Beisein von T-bet und STAT4. Über welchen Mechanismus genau T-bet und STAT4 in diese hemmende Wirkung eingreifen, muss durch weitere Analysen geklärt werden, da eine direkte Bindung dieser Transkriptionsfaktoren an RORC CNS3 nicht nachgewiesen werden konnte (Mukasa et al., 2010)

Bei RORC CNS5 wurde ebenfalls ein signifikanter Unterschied zwischen den Th1- und Th17 Zellkulturbedingungen beobachtet. Unter Th17-Bedingungen wurde ein signifikant verstärkt permissives Verhältnis von H3K4me3/H3K27me3 im Vergleich zu den Th1-Bedingungen beobachtet, der vor allem aufgrund einer verstärkten H3K27-Trimethylierung in den Th1-Zellen verursacht wurde. Vergleiche konnten in der Literatur nicht gefunden werden, da bisher keine Versuche über diese CNS-Regionen durch andere Arbeitsgruppen durchgeführt wurden. Es ist zu resümieren, dass RORC CNS5 ebenfalls einer linienspezifischen Veränderung der Histonmodifikationen, vor allem von H3K27me3 unterliegt. Versuche wie

oben beschrieben durch Mukasa et. al, Thomas et al. oder Wang et al. könnten weitere nützliche Informationen über die Bedeutung von RORC CNS5 für die RORC-Expression erbringen.

7.3. Gedächtnis-T-Zellen bei gesunden Spendern

Die zweite Fragestellung dieser wissenschaftlichen Arbeit beschäftigte sich mit der Veränderung des Histonmodifikationsmusters nach bereits stattgefundenen Antigenkontakt. Gedächtnis-T-Zellen zeigten in den beiden Gen-Loki IL17 sowie RORC, unabhängig von der jeweiligen Differenzierungsbedingung, ein im Vergleich zu den naiven Th-Zellen Übergewicht an permissiver Histonmodifikation. Dies ist durch einen deutlichen Rückgang der repressiven H3K27me3-Modifikation bei gleichzeitig unveränderter H3K4-Trimethylierung sowie gering verminderter H3-Azetylierung bedingt. Dieses Ergebnis ist konkordant zu dem bekanntermaßen erhöhten Anteil an Il-17-produzierender Zellen bei Gedächtnis-T-Zellen im Vergleich zu naiven Th-Zellen unter allen Differenzierungsbedingungen. Aus physiologischer Sicht macht diese offene Gestaltung der Gene Sinn, da durch bereits stattgefundenen Antigenkontakt eine schnelle Reaktion der Zelle durch Steigerung der Interleukinproduktion notwendig ist. Eine ähnliche Veränderung der epigenetischen Histonmodifikationen durchlaufen naive T-Zellen hin zu zytotoxische T-Zellen. Hierbei wurde ebenso ein Rückgang der repressiven H3K27-Trimethylierung bei gleichbleibender Menge an H3K4me3 beobachtet (Russ et al., 2014).

7.4. Verminderte H3K27-Trimethylierung bei naiven T-Zellen als möglicher Grund eines verstärkten Th17-Phänotyps bei RA-Patienten

Der letzte Schwerpunkt der Arbeit beschäftigte sich mit der Frage, ob Histone bei Patienten mit rheumatoider Arthritis unterschiedlich modifiziert sind und dadurch der verstärkte Th17-Phänotyp bei RA-Patienten erklärt werden könnte.

Die naiven Th-Zellen zeigten bei Patienten mit rheumatoider Arthritis im Vergleich zur gesunden Vergleichspopulation in den Gen-Loci IL17 und RORC nach 5 Tagen Differenzierung unter allen, jedoch am ausgeprägtesten unter den nicht-Th17-Bedingungen,

eine Reduktion aller drei Histonmodifikationen, am stärksten der repressiven H3K27-Trimethylierung. Keine Unterschiede wurden im sogenannten Präwert beobachtet. So könnte diese verstärkt permissive Histonmodifikation unter nicht-Th17-Kulturbedingungen das von Leipe et al. beschriebene erhöhte Potential naiver CD4-positiver T-Zellen zur Differenzierung zu IL-17-produzierender Zellen unter neutralen Stimulierungsbedingungen bei RA-Patienten erklären (Leipe et al., 2010). Dies würde die These einer gestörten Neigung der naiven T-Zellen hin zum Th17-Phänotyp unterstützen. Desweiteren wurde bei RORC CNS3 in der hiesigen Arbeit unter Th1-induzierenden Bedingungen ein deutlicher Rückgang der H3K27-Trimethylierung gesehen. Im Mausmodell der zuvor bereits erwähnten Veröffentlichung von Mukasa et al führte ein Wegfall der H3K27-Trimethylierung in RORC CNS3 bei STAT4- oder T-bet-defizienten Mäusen zu einer gesteigerten RORC-Expression unter Th17+IL-12-Kulturbedingungen. Dies wäre eine mögliche Erklärung für die Th-Zellentwicklung hin zu einem Th1/Th17-Phänotyp, der vermehrt bei Autoimmunerkrankungen nachgewiesen wurde. Ein sog. Th1/Th17-Phänotyp sind CD4- positive T-Zellen, die sowohl IL-17, IFN γ als auch die jeweiligen Transkriptionsfaktoren RORC und T-bet exprimieren. Der Th1/Th17-Phänotyp wurde beispielsweise vermehrt in Gelenken von Arthritis-Patienten oder im Darm von Morbus Crohn-Patienten gesichtet, was deren Bedeutung für Autoimmunerkrankungen unterstreicht (Annunziato et al., 2007; Nistala et al., 2010). Gegen diese Theorie spricht die erst kürzlich veröffentlichte Dissertation "Th9-Zellen bei Autoimmunerkrankungen" von Herrn Küpper, in der durch intrazelluläre Färbung die Interleukin-Produktion der naiven und Gedächtnis-Th-Zellen von RA-Patienten und einer gesunden Kontrollgruppe unter den selben Differenzierungsbedingungen wie in dieser Arbeit mit nachfolgender Stimulierung für 2 Tagen untersucht wurden. Herr Küpper fand heraus, dass es zwischen RA-Patienten und der gesunden Kontrollgruppe in den naiven T-Zellen keine Unterschiede in der Anzahl IFN γ /IL-17 Doppelproduzenten unter Th1- oder Th17-Differenzierungsbedingungen gab. Eine erhöhte IFN γ /IL-17 Ko-Expression wurde nur bei stimulierten Gedächtnis-Th-Zellen unter Th0 und Th1-Differenzierungsbedingungen gefunden. Ebenso konnte nach 5 Tagen Differenzierung naiver T-Zellen unter Th1-, Th2-, Th9- und Th17-Kulturbedingungen keine unterschiedliche Frequenz IL-17-produzierender Th-Zellen zwischen RA-Patienten und HC gesehen werden. Dies erklärt und unterstreicht einerseits den fehlenden eindeutigen Unterschied zwischen RA-Patienten und HC unter Th17-Differenzierungsbedingungen in der hiesigen Arbeit, andererseits scheint die deutlich verminderte H3K27-Trimethylierung bei RA-Patienten unter Th0-, Th1-, Th2- und Th9-

Bedingungen zu keiner verstärkten Interleukin-17-Produktion zu führen. Dies könnte einerseits daran liegen, dass neben der Reduktion der repressiven Modifikation ebenfalls eine Reduktion der permissiven Histonmethylierung und -acetylierung in dieser Arbeit beobachtet wurde. Andererseits kann bei einer durch Histonmodifikationen zugängliche Chromatinstruktur nicht automatisch von einer Steigerung der Gen-Expression ausgegangen werden, hierfür sind bekanntermaßen noch weitere Regulationsmechanismen von Bedeutung. Ebenso könnte es sein, dass nur in-vivo nach Antigenkontakt die verminderte repressive H3K27-Trimethylierung eine verstärkte IL-17-Produktion und somit einen Th17-Shift bewirkt, der nach Stimulierung unter in-vitro Bedingungen ohne Antigenkontakt nicht zu sehen ist.

Somit konnten in dieser Arbeit zwar Unterschiede durch eine verminderte Menge aller drei gemessener Histonmodifikationen bei RA-Patienten gesehen werden, diese spiegeln sich jedoch nicht in anderen Veröffentlichungen, zumindest nicht in in-vitro-Experimenten, in einer gesteigerten IL-17-Produktion oder einem verstärkten Th1/Th17-Phänotyp bei naiven T-Helferzellen wider. Ob das verminderte Vorkommen aller drei Histone zu einer veränderten Plastizität bei einem Redifferenzierungsdruck wie es z.B. in entzündeten Gelenken vorkommen kann, führt, kann aktuell nicht beurteilt werden. Es gibt bisher keine veröffentlichte Daten darüber, ob Th1-Zellen, die aus naiven Th-Zellen differenziert wurden, unter Th17-Bedingungen zu einer verstärkten Redifferenzierungsrate zu Th17-Zellen neigen. Bisherige Daten konzentrieren sich hierbei auf die Gedächtnis-T-Zellen.

7.5. Gedächtnis-Th-Zellen bei RA-Patienten

Veränderungen der Histonmodifikationen wurden zu Beginn der Arbeit vor allem bei den Gedächtnis-T-Zellen vermutet, da gerade diese wie oben bereits erwähnt bei RA-Patienten eine erhöhte Th17-Frequenz aufweisen. Ebenso zeigten bisher nicht veröffentlichte Daten aus unserer Arbeitsgruppe, dass gezielt isolierte Th1 Zellen bei RA-Patienten eine verstärkte Fähigkeit im Vergleich zu den Th1-Zellen der gesunden Kontrollgruppe besitzen, unter Th17-Differenzierungsbedingungen zu einem Th17 Phänotyp zu wechseln. Dabei werden vermehrt IL-17-produzierende und IFN γ /IL-17 Doppelproduzenten beobachtet. Andererseits zeigten gezielt isolierte Th17-Zellen von RA-Patienten eine erhöhte Resistenz gegenüber Th1-Redifferenzierungsbedingung, was zusammengenommen die verstärkte Plastizität hin zu einem dominanten Th17-Phänotyp bei RA-Patienten verdeutlicht. Überraschenderweise

bieten die in dieser Arbeit gemessenen Ergebnisse der Histonmodifikationen keine Erklärung für den verstärkten Th17-Phänotyp in den Gedächtnis-T-Zellen, denn zwischen den Patienten mit rheumatoider Arthritis und der gesunden Vergleichsgruppe konnten in den 3 Histonmodifikationen an den Promotoren sowie an den CNS-Regionen des IL17- und RORC-Promotors keine eindeutig signifikanten Ergebnisse gefunden werden. Ebenso zeigten bisher nicht veröffentlichte Daten aus unserer Arbeitsgruppe, dass die vermehrte Fähigkeit zur Redifferenzierung von mittels *Cell-Sorting* isolierten Th1-Zellen hin zu Th17-Zellen nicht mit einem verstärkt permissiven Histonmodifikationsmuster an den Promotoren der Th17-sepezifischen Genen einhergeht. Eine solche Histonstabilität nach Antigenkontakt und bereits durchgeführter T-Zelldifferenzierung zeigte ebenfalls Cohen et al. Hierbei führte die Redifferenzierung von Th17-Zellen gesunder Spender unter Th1-Kulturbedingungen zu einer gesteigerten IFN γ und T-bet-Produktion jedoch ohne signifikanten Veränderungen in der epigenetischen Signatur am IL17-Promotor zu verursachen, inklusive H3K4me3 und H3K27me3 (Cohen et al., 2011). Somit muss vermutet werden, dass die beobachteten Histonmodifikationen H3K4me3, H3ac und H3K27me3, zumindest an den Promotoren und CNS-Regionen von IL17- und RORC, nicht an dem verstärkten Th17-Phänotyp bei Gedächtnis-Th-Zellen beteiligt sind, sondern andere epigenetische Elemente hierfür verantwortlich sind.

Wie im Abschnitt 2.7.2 "Epigenetische Veränderungen in der rheumatoiden Arthritis" bereits erwähnt, gibt es eine Vielzahl von Veränderungen des Epigenoms bei RA-Patienten, die auch teils nachweislich mit der Krankheitsaktivität und Zytokinexpression korrelierten, jedoch bleibt weiterhin die ursächliche Veränderung, die zur verstärkten Tendenz der Th-Zellen hin zu einer Th17-Zelle führt, ungewiss. Auch hierbei muss vermutet werden, dass die Ursache der verstärkten Th17-Plastizität in der rheumatoiden Arthritis komplex sowie heterogen und nicht auf eine einzige Veränderung zurückzuführen ist.

7.6. Kritische Beurteilung des Versuchsaufbaus sowie mögliche Folgeversuche

Ein limitierender Faktor der Arbeit ist die Unreinheit der Th-Subpopulationen in den einzelnen Zellkulturbedingungen. Durch die oben beschriebenen Zellisolationsschritte wurde zunächst ein Zellgemisch aus CD4⁺ Th-Zellen isoliert und unter den jeweiligen Kulturbedingungen für 5 Tage kultiviert. Wie im Abschnitt Ergebnisse gezeigt, lagen jedoch

die Reinheiten der jeweiligen Th-Subpopulationen deutlich unter 100%. Dadurch wird es in den Folgeversuchen wie dem hier durchgeführten ChIP-Assay schwieriger, Unterschiede zwischen den einzelnen CD4-Subpopulationen zu erkennen oder darzustellen. Um dieses Problem zu lösen gibt es die Möglichkeit des *Cell-Sortings*, dabei werden z.B. Th17 Zellen mit dem sog. *IL-17 secretion assay* gezielt isoliert. Es werden dabei Reinheiten um die 95% erreicht. Dadurch wird es möglich, gezielt die gewünschte T-Zelllinie zu untersuchen. Limitierender oder erschwerender Faktor dieser Methode ist jedoch die geringe Zellanzahl, v.a. der kleinen Th-Subpopulationen wie Th9 oder Th17, die dadurch gewonnen werden.

Wie im obigen Diskussionsabschnitt bereits angesprochen, könnten Folgeversuche weitere Informationen zur Bedeutung von RORC CNS5 für die RORC-Expression erbringen. Eventuell würde man wie bei RORC CNS3 unter Th17+IL-12 Kulturbedingungen einen Anstieg von H3K27me3 sehen, das eine mögliche Silencer-Funktion dieser CNS-Region andeutet. Durch Luciferase-Assays und Protein-binding-Assays könnte eine mögliche Wirkung dieser CNS-Region auf die RORC-Transkriptionsaktivität sowie Transkriptionsfaktoren, die eine Bindung mit CNS3 einhergehen, untersucht werden.

Ein möglicher Folgeversuch betrifft die gesehenen Unterschiede in den naiven Th-Zellen zwischen RA-Patienten und HC. Nach fünf Tagen Differenzierung unter den jeweiligen Differenzierungsbedingungen könnte man spezifisch die einzelnen Th-Subpopulationen mittels Cell-Sorting isolieren und unter Th17-Redifferenzierungsbedingungen bzw. unter Th1-Redifferenzierungsbedingungen für Th17-Zellen aussetzen. Parallel könnten die Histonmodifikationen in den Genloki IL17, RORC sowie T-bet vor und nach Redifferenzierung gemessen werden. Hierbei kann mit größtmöglicher Zellreinheit eine mögliche verstärkte Fähigkeit zur Th17-Redifferenzierung bei RA-Patienten beobachtet werden und ein möglicher Zusammenhang mit Histonveränderungen gezogen oder ausgeschlossen werden.

8. Zusammenfassung

Einleitung: Th17-Zellen, eine proinflammatorische T-Zell-Population, spielen eine bedeutende Rolle in der rheumatoiden Arthritis. So wird bei der RA ein mit der Krankheitsaktivität korrelierender verstärkt ausgeprägter Th17-Phänotyp beobachtet, der mit einer vermehrten Produktion des Th17-linienspezifischen Transkriptionsfaktors RORC sowie Zytokins IL-17 einhergeht. Ob Histonmodifikationen eine Rolle in der Th17-Differenzierung oder gar einen Beitrag zur Entstehung des verstärkten Th17-Phänotyps leisten, wurde bisher nicht spezifisch untersucht.

Fragestellung: Zeigen die einzelnen Th-Subpopulationen ein linienspezifisches Histonmodifikationsmuster in den Genloki IL17 sowie RORC und kommt es nach Antigenkontakt zu einer weiteren Veränderung dieser Histone? Kann der verstärkte Th17-Phänotyp bei RA-Patienten mit einem pathologisch veränderten Histonmodifikationsmuster in den genannten Genen erklärt werden?

Methodik: Naive und Gedächtnis-T-Zellen von 17 Patienten mit RA sowie von 17 gesunden Spendern (HC) wurden aus dem peripheren Blut isoliert und entweder als Prä-Wert konserviert oder für 5 Tage mit anti-CD28 und anti-CD3 unter Th0-, Th1-, Th2-, Th9- und Th17-induzierenden Bedingungen differenziert. Mittels ChIP-Analysen wurden die Histonmodifikationen H3K4me3, H3ac und H3K27me3 an den Promotoren sowie an jeweils 2 CNS-Regionen der Gen-Loki RORC sowie IL17 gemessen und zwischen den einzelnen Differenzierungsbedingungen sowie zwischen den RA-Patienten und den HC verglichen.

Ergebnisse: Die einzelnen Th-Subpopulationen zeigten ein dem IL-17-Sekretionsmuster entsprechend linienspezifisches Histonmodifikationsmuster nicht nur am Promotor sondern auch an den CNS-Regionen der Genloki IL17- und RORC. Wie in früheren Publikationen zeigte auch meine Arbeit, dass speziell IL17 CNS1 und RORC CNS3 potentielle Regulatoren der T-Zelldifferenzierung sein könnten. Nach Antigenkontakt zeigten die isolierten Gedächtnis-T-Zellen ein verstärkt permissives Histonmodifikationsmuster, das konkordant mit dem bekanntermaßen erhöhten Anteil an IL-17-produzierender Zellen bei Gedächtnis-T-Zellen im Vergleich zu naiven Th-Zellen ist. Naive T-Zellen von RA-Patienten zeigten im Vergleich zu Th-Zellen gesunder Spender eine Reduktion aller drei gemessenen Histonmodifikationen, wohingegen bei Gedächtnis-Th-Zellen keine Unterschiede festgestellt werden konnten.

Schlussfolgerung: Histonmodifikationen in den Genloki IL17 und RORC sind linienspezifischen Veränderungen in der T-Zelldifferenzierung unterworfen und bestimmen den Zellphänotyp aktiv mit. Der verstärkte Th17-Phänotyp bei RA-Patienten im Vergleich zu Gesunden lässt sich aktuell nicht durch die gemessenen Histonmodifikationen erklären.

9. Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
Anti-CCP-AK	anti-cyclic citrullinated protein antibody (AK gegen zyklisch citrullinierte Peptide)
APC	antigen presenting cell (antigenpräsentierende Zelle)
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
CD	cluster of differentiation
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankung
CIA	Collagen-induced arthritis = Kollagen-induzierte Arthritis
CNS	conserved non-coding sequence
CRP	C-reaktives Protein
DAMPs	danger-associated molecular patterns
DAS28	disease activity score 28 (Krankheitsaktivitätsscore für 28 Gelenke)
DGRh	Deutsche Gesellschaft für Rheumatologie
DMARD	Disease modifying anti-rheumatic drug (krankheitsmodifizierendes antirheumatisches Medikament)
DNA	deoxyribonucleid acid (Desoxyribonukleinsäure, DNS)
DNMT	DNA-Methyltransferase
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DZ	Dendritische Zellen
EAE	Experimentelle Autoimmunenzephalitis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EULAR	European League Against Rheumatism
FACS	Fluorescence activated cell sorting (fluoreszenzaktivierte Zellsortierung)
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FOXP3	forkhead box P3
GATA-3	GATA binding protein 3
HC	Healthy control (gesunder Kontrollspender)

HLA	humane Leukozytenantigen
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IRF4	interferon regulatory factor 4
L-Glu	L-Glutaminsäure
MACS	Magnetic cell separation
MHC	major histocompatibility complex
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
mRNA	messenger RNA
miRNA	microRNA
MS	Multiple Sklerose
MTX	Methotrexat
NHS	Normales humanes Serum
NSAID	non-steroidal anti-inflammatory drug (nichtsteroidales Antiphlogistikum)
PBMC	peripheral blood mononuclear cells (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)
PBS	phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PE	Phycoerythrin
PMA	Phorbol 12-myristat 13-acetat
P S	Penicillin G und Streptomycin
RA	Rheumatoide Arthritis
RANK	Receptor Activator of NfκB
RANKL	Receptor Activator of NF-κB Ligand
RF	Rheumafaktor
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure, RNS)
RORC	retinoic acid receptor related orphan receptor C
RT	Reverse Transkriptase
SCF	stem cell factor
SE	shared-epitope
SF	Synoviale Fibroblasten
SRBC	sheep red blood cells (Schaferythrozyten)

STAT	signal transducer and activator of transcription
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
T-bet	T-box expressed in T-cells
TF	Transkriptionsfaktoren
TGF	transforming growth factor
Th-Zellen	T-Helferzellen
TLR	Toll-like-Rezeptoren
TNF	tumor necrosis factor (Tumornekrose-Faktor)
Treg-Zellen	regulatorische T-Zellen
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
TSS	transcription start site

10. Literaturverzeichnis

- Abbas, A.K., Murphy, K.M., and Sher, A. (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383, 787-793.
- Acosta-Rodriguez, E.V., Rivino, L., Geginat, J., Jarrossay, D., Gattorno, M., Lanzavecchia, A., Sallusto, F., and Napolitani, G. (2007). Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol* 8, 639-646.
- Adamopoulos, I.E., Chao, C.C., Geissler, R., Laface, D., Blumenschein, W., Iwakura, Y., McClanahan, T., and Bowman, E.P. (2010). Interleukin-17A upregulates receptor activator of NF-kappaB on osteoclast precursors. *Arthritis Res Ther* 12, R29.
- Akimzhanov, A.M., Yang, X.O., and Dong, C. (2007). Chromatin remodeling of interleukin-17 (IL-17)-IL-17F cytokine gene locus during inflammatory helper T cell differentiation. *J Biol Chem* 282, 5969-5972.
- Alunno, A., Bartoloni, E., Bistoni, O., Nocentini, G., Ronchetti, S., Caterbi, S., Valentini, V., Riccardi, C., and Gerli, R. (2012). Balance between regulatory T and Th17 cells in systemic lupus erythematosus: the old and the new. *Clin Dev Immunol* 2012, 823085.
- Anderson, J., Caplan, L., Yazdany, J., Robbins, M.L., Neogi, T., Michaud, K., Saag, K.G., O'Dell, J.R., and Kazi, S. (2012). Rheumatoid arthritis disease activity measures: American College of Rheumatology recommendations for use in clinical practice. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 64, 640-647.
- Annunziato, F., Cosmi, L., Liotta, F., Maggi, E., and Romagnani, S. (2008). The phenotype of human Th17 cells and their precursors, the cytokines that mediate their differentiation and the role of Th17 cells in inflammation. *Int Immunol* 20, 1361-1368.
- Annunziato, F., Cosmi, L., Santarlasci, V., Maggi, L., Liotta, F., Mazzinghi, B., Parente, E., Fili, L., Ferri, S., Frosali, F., *et al.* (2007). Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med* 204, 1849-1861.
- Annunziato, F., and Romagnani, S. (2009). Heterogeneity of human effector CD4+ T cells. *Arthritis Res Ther* 11, 257.
- Auger, I., Sebbag, M., Vincent, C., Balandraud, N., Guis, S., Nogueira, L., Svensson, B., Cantagrel, A., Serre, G., and Roudier, J. (2005). Influence of HLA-DR genes on the production of rheumatoid arthritis-specific autoantibodies to citrullinated fibrinogen. *Arthritis Rheum* 52, 3424-3432.
- Auyeung, V.C., Ulitsky, I., McGeary, S.E., and Bartel, D.P. (2013). Beyond secondary structure: primary-sequence determinants license pri-miRNA hairpins for processing. *Cell* 152, 844-858.
- Barski, A., Jothi, R., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.Y., Schones, D.E., and Zhao, K. (2009). Chromatin poises miRNA- and protein-coding genes for expression. *Genome Res* 19, 1742-1751.
- Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281-297.
- Bas, S., Perneger, T.V., Mikhnevitch, E., Seitz, M., Tiercy, J.M., Roux-Lombard, P., and Guerne, P.A. (2000). Association of rheumatoid factors and anti-filaggrin antibodies with severity of erosions in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 39, 1082-1088.
- Becher, B., Durell, B.G., and Noelle, R.J. (2002). Experimental autoimmune encephalitis and inflammation in the absence of interleukin-12. *J Clin Invest* 110, 493-497.
- Beriou, G., Bradshaw, E.M., Lozano, E., Costantino, C.M., Hastings, W.D., Orban, T., Elyaman, W., Khoury, S.J., Kuchroo, V.K., Baecher-Allan, C., *et al.* (2010). TGF-beta induces IL-9 production from human Th17 cells. *Journal of immunology* 185, 46-54.

- Cai, L., Yin, J.P., Starovasnik, M.A., Hogue, D.A., Hillan, K.J., Mort, J.S., and Filvaroff, E.H. (2001). Pathways by which interleukin 17 induces articular cartilage breakdown in vitro and in vivo. *Cytokine* *16*, 10-21.
- Cascao, R., Moura, R.A., Perpetuo, I., Canhao, H., Vieira-Sousa, E., Mourao, A.F., Rodrigues, A.M., Polido-Pereira, J., Queiroz, M.V., Rosario, H.S., *et al.* (2010). Identification of a cytokine network sustaining neutrophil and Th17 activation in untreated early rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* *12*, R196.
- Chabaud, M., Lubberts, E., Joosten, L., van Den Berg, W., and Miossec, P. (2001). IL-17 derived from juxta-articular bone and synovium contributes to joint degradation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* *3*, 168-177.
- Chan, H.W., Miller, J.S., Moore, M.B., and Lutz, C.T. (2005). Epigenetic control of highly homologous killer Ig-like receptor gene alleles. *Journal of immunology* *175*, 5966-5974.
- Chang, H.C., Sehra, S., Goswami, R., Yao, W., Yu, Q., Stritesky, G.L., Jabeen, R., McKinley, C., Ahyi, A.N., Han, L., *et al.* (2010). The transcription factor PU.1 is required for the development of IL-9-producing T cells and allergic inflammation. *Nat Immunol* *11*, 527-534.
- Chatzidionysiou, K., Lie, E., Nasonov, E., Lukina, G., Hetland, M.L., Tarp, U., van Riel, P.L., Nordstrom, D.C., Gomez-Reino, J., Pavelka, K., *et al.* (2012). Effectiveness of disease-modifying antirheumatic drug co-therapy with methotrexate and leflunomide in rituximab-treated rheumatoid arthritis patients: results of a 1-year follow-up study from the CERERRA collaboration. *Ann Rheum Dis* *71*, 374-377.
- Chen, Z., Tato, C.M., Muul, L., Laurence, A., and O'Shea, J.J. (2007). Distinct regulation of interleukin-17 in human T helper lymphocytes. *Arthritis Rheum* *56*, 2936-2946.
- Cheng, G., Arima, M., Honda, K., Hirata, H., Eda, F., Yoshida, N., Fukushima, F., Ishii, Y., and Fukuda, T. (2002). Anti-interleukin-9 antibody treatment inhibits airway inflammation and hyperreactivity in mouse asthma model. *Am J Respir Crit Care Med* *166*, 409-416.
- Chu, C.Q., Wittmer, S., and Dalton, D.K. (2000). Failure to suppress the expansion of the activated CD4 T cell population in interferon gamma-deficient mice leads to exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* *192*, 123-128.
- Chung, W.S., Peng, C.L., Lin, C.L., Chang, Y.J., Chen, Y.F., Chiang, J.Y., Sung, F.C., and Kao, C.H. (2014). Rheumatoid arthritis increases the risk of deep vein thrombosis and pulmonary thromboembolism: a nationwide cohort study. *Ann Rheum Dis* *73*, 1774-1780.
- Clement, L.T., Yamashita, N., and Martin, A.M. (1988). The functionally distinct subpopulations of human CD4+ helper/inducer T lymphocytes defined by anti-CD45R antibodies derive sequentially from a differentiation pathway that is regulated by activation-dependent post-thymic differentiation. *Journal of immunology* *141*, 1464-1470.
- Coffman, R.L., Seymour, B.W., Hudak, S., Jackson, J., and Rennick, D. (1989). Antibody to interleukin-5 inhibits helminth-induced eosinophilia in mice. *Science* *245*, 308-310.
- Cohen, C.J., Crome, S.Q., MacDonald, K.G., Dai, E.L., Mager, D.L., and Levings, M.K. (2011). Human Th1 and Th17 cells exhibit epigenetic stability at signature cytokine and transcription factor loci. *Journal of immunology* *187*, 5615-5626.
- Conti, H.R., Shen, F., Nayyar, N., Stocum, E., Sun, J.N., Lindemann, M.J., Ho, A.W., Hai, J.H., Yu, J.J., Jung, J.W., *et al.* (2009). Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis. *J Exp Med* *206*, 299-311.
- Cortet, B., Perez, T., Roux, N., Flipo, R.M., Duquesnoy, B., Delcambre, B., and Remy-Jardin, M. (1997). Pulmonary function tests and high resolution computed tomography of the lungs in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* *56*, 596-600.
- Cosmi, L., De Palma, R., Santarlasci, V., Maggi, L., Capone, M., Frosali, F., Rodolico, G., Querci, V., Abbate, G., Angeli, R., *et al.* (2008). Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161+CD4+ T cell precursor. *J Exp Med* *205*, 1903-1916.

- Costinean, S., Zanesi, N., Pekarsky, Y., Tili, E., Volinia, S., Heerema, N., and Croce, C.M. (2006). Pre-B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high-grade lymphoma in E(mu)-miR155 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 7024-7029.
- Crowston, J.G., Salmon, M., Khaw, P.T., and Akbar, A.N. (1997). T-lymphocyte-fibroblast interactions. *Biochem Soc Trans* *25*, 529-531.
- Cutolo, M. (2000). Sex hormone adjuvant therapy in rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* *26*, 881-895.
- Cutolo, M., and Straub, R.H. (2006). Stress as a risk factor in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Neuroimmunomodulation* *13*, 277-282.
- Dardalhon, V., Awasthi, A., Kwon, H., Galileos, G., Gao, W., Sobel, R.A., Mitsdoerffer, M., Strom, T.B., Elyaman, W., Ho, I.C., *et al.* (2008). IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells. *Nat Immunol* *9*, 1347-1355.
- de Hair, M.J., Landewe, R.B., van de Sande, M.G., van Schaardenburg, D., van Baarsen, L.G., Gerlag, D.M., and Tak, P.P. (2013). Smoking and overweight determine the likelihood of developing rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* *72*, 1654-1658.
- De Santa, F., Totaro, M.G., Prosperini, E., Notarbartolo, S., Testa, G., and Natoli, G. (2007). The histone H3 lysine-27 demethylase Jmjd3 links inflammation to inhibition of polycomb-mediated gene silencing. *Cell* *130*, 1083-1094.
- Deighton, C.M., Walker, D.J., Griffiths, I.D., and Roberts, D.F. (1989). The contribution of HLA to rheumatoid arthritis. *Clin Genet* *36*, 178-182.
- Del Prete, G.F., De Carli, M., Mastromauro, C., Biagiotti, R., Macchia, D., Falagiani, P., Ricci, M., and Romagnani, S. (1991). Purified protein derivative of *Mycobacterium tuberculosis* and excretory-secretory antigen(s) of *Toxocara canis* expand in vitro human T cells with stable and opposite (type 1 T helper or type 2 T helper) profile of cytokine production. *J Clin Invest* *88*, 346-350.
- Dugas, B., Renauld, J.C., Pene, J., Bonnefoy, J.Y., Peti-Frere, C., Braquet, P., Bousquet, J., Van Snick, J., and Mencia-Huerta, J.M. (1993). Interleukin-9 potentiates the interleukin-4-induced immunoglobulin (IgG, IgM and IgE) production by normal human B lymphocytes. *Eur J Immunol* *23*, 1687-1692.
- Duhen, T., Geiger, R., Jarrossay, D., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2009). Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat Immunol* *10*, 857-863.
- Eastgate, J.A., Symons, J.A., Wood, N.C., Grinlinton, F.M., di Giovine, F.S., and Duff, G.W. (1988). Correlation of plasma interleukin 1 levels with disease activity in rheumatoid arthritis. *Lancet* *2*, 706-709.
- Egger, G., Liang, G., Aparicio, A., and Jones, P.A. (2004). Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* *429*, 457-463.
- Ehrenstein, M.R., Evans, J.G., Singh, A., Moore, S., Warnes, G., Isenberg, D.A., and Mauri, C. (2004). Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy. *J Exp Med* *200*, 277-285.
- Eklund, K.K., Ghildyal, N., Austen, K.F., and Stevens, R.L. (1993). Induction by IL-9 and suppression by IL-3 and IL-4 of the levels of chromosome 14-derived transcripts that encode late-expressed mouse mast cell proteases. *Journal of immunology* *151*, 4266-4273.
- Elyaman, W., Bradshaw, E.M., Uyttenhove, C., Dardalhon, V., Awasthi, A., Imitola, J., Bettelli, E., Oukka, M., van Snick, J., Renauld, J.C., *et al.* (2009). IL-9 induces differentiation of TH17 cells and enhances function of FoxP3+ natural regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 12885-12890.
- Emery, P. (1995). Therapeutic approaches for early rheumatoid arthritis. How early? How aggressive? *Br J Rheumatol* *34 Suppl 2*, 87-90.

- Erpenbeck, V.J., Hohlfeld, J.M., Volkmann, B., Hagenberg, A., Geldmacher, H., Braun, A., and Krug, N. (2003). Segmental allergen challenge in patients with atopic asthma leads to increased IL-9 expression in bronchoalveolar lavage fluid lymphocytes. *J Allergy Clin Immunol* *111*, 1319-1327.
- Faulkner, H., Renauld, J.C., Van Snick, J., and Grecis, R.K. (1998). Interleukin-9 enhances resistance to the intestinal nematode *Trichuris muris*. *Infect Immun* *66*, 3832-3840.
- Ferber, I.A., Brocke, S., Taylor-Edwards, C., Ridgway, W., Dinisco, C., Steinman, L., Dalton, D., and Fathman, C.G. (1996). Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Journal of immunology* *156*, 5-7.
- Fischer, L.M., Schlienger, R.G., Matter, C., Jick, H., and Meier, C.R. (2004). Effect of rheumatoid arthritis or systemic lupus erythematosus on the risk of first-time acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* *93*, 198-200.
- Floess, S., Freyer, J., Siewert, C., Baron, U., Olek, S., Polansky, J., Schlawe, K., Chang, H.D., Bopp, T., Schmitt, E., *et al.* (2007). Epigenetic control of the *foxp3* locus in regulatory T cells. *PLoS Biol* *5*, e38.
- Fossiez, F., Djossou, O., Chomarat, P., Flores-Romo, L., Ait-Yahia, S., Maat, C., Pin, J.J., Garrone, P., Garcia, E., Saeland, S., *et al.* (1996). T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med* *183*, 2593-2603.
- Fu, L.H., Ma, C.L., Cong, B., Li, S.J., Chen, H.Y., and Zhang, J.G. (2011). Hypomethylation of proximal CpG motif of interleukin-10 promoter regulates its expression in human rheumatoid arthritis. *Acta Pharmacol Sin* *32*, 1373-1380.
- Fujimoto, M., Serada, S., Mihara, M., Uchiyama, Y., Yoshida, H., Koike, N., Ohsugi, Y., Nishikawa, T., Ripley, B., Kimura, A., *et al.* (2008). Interleukin-6 blockade suppresses autoimmune arthritis in mice by the inhibition of inflammatory Th17 responses. *Arthritis Rheum* *58*, 3710-3719.
- Gaujoux-Viala, C., Smolen, J.S., Landewe, R., Dougados, M., Kvien, T.K., Mola, E.M., Scholte-Voshaar, M., van Riel, P., and Gossec, L. (2010). Current evidence for the management of rheumatoid arthritis with synthetic disease-modifying antirheumatic drugs: a systematic literature review informing the EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* *69*, 1004-1009.
- Grabiec, A.M., and Reedquist, K.A. (2010). Histone deacetylases in RA: epigenetics and epiphenomena. *Arthritis Res Ther* *12*, 142.
- Gran, B., Zhang, G.X., Yu, S., Li, J., Chen, X.H., Ventura, E.S., Kamoun, M., and Rostami, A. (2002). IL-12p35-deficient mice are susceptible to experimental autoimmune encephalomyelitis: evidence for redundancy in the IL-12 system in the induction of central nervous system autoimmune demyelination. *Journal of immunology* *169*, 7104-7110.
- 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 Rheum* *30*, 1205-1213.
- Hafstrom, I., Albertsson, K., Boonen, A., van der Heijde, D., Landewe, R., and Svensson, B. (2009). Remission achieved after 2 years treatment with low-dose prednisolone in addition to disease-modifying anti-rheumatic drugs in early rheumatoid arthritis is associated with reduced joint destruction still present after 4 years: an open 2-year continuation study. *Ann Rheum Dis* *68*, 508-513.
- Harrington, L.E., Hatton, R.D., Mangan, P.R., Turner, H., Murphy, T.L., Murphy, K.M., and Weaver, C.T. (2005). Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* *6*, 1123-1132.
- Hegazy, A.N., Peine, M., Helmstetter, C., Panse, I., Frohlich, A., Bergthaler, A., Flatz, L., Pinschewer, D.D., Radbruch, A., and Lohning, M. (2010). Interferons direct Th2 cell

- reprogramming to generate a stable GATA-3(+)T-bet(+) cell subset with combined Th2 and Th1 cell functions. *Immunity* 32, 116-128.
- Heinzel, F.P., Sadick, M.D., Holaday, B.J., Coffman, R.L., and Locksley, R.M. (1989). Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *J Exp Med* 169, 59-72.
- Higgins, S.C., Jarnicki, A.G., Lavelle, E.C., and Mills, K.H. (2006). TLR4 mediates vaccine-induced protective cellular immunity to *Bordetella pertussis*: role of IL-17-producing T cells. *Journal of immunology* 177, 7980-7989.
- Hirahara, K., Vahedi, G., Ghoreschi, K., Yang, X.P., Nakayamada, S., Kanno, Y., O'Shea, J.J., and Laurence, A. (2011). Helper T-cell differentiation and plasticity: insights from epigenetics. *Immunology* 134, 235-245.
- Hirota, K., Duarte, J.H., Veldhoen, M., Hornsby, E., Li, Y., Cua, D.J., Ahlfors, H., Wilhelm, C., Tolaini, M., Menzel, U., *et al.* (2011). Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses. *Nat Immunol* 12, 255-263.
- Houssiau, F.A., Schandene, L., Stevens, M., Cambiaso, C., Goldman, M., van Snick, J., and Renaud, J.C. (1995). A cascade of cytokines is responsible for IL-9 expression in human T cells. Involvement of IL-2, IL-4, and IL-10. *Journal of immunology* 154, 2624-2630.
- Hsieh, C.S., Macatonia, S.E., Tripp, C.S., Wolf, S.F., O'Garra, A., and Murphy, K.M. (1993). Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by *Listeria*-induced macrophages. *Science* 260, 547-549.
- Hu, R., Huffaker, T.B., Kagele, D.A., Runtsch, M.C., Bake, E., Chaudhuri, A.A., Round, J.L., and O'Connell, R.M. (2013). MicroRNA-155 confers encephalogenic potential to Th17 cells by promoting effector gene expression. *Journal of immunology* 190, 5972-5980.
- Huang, W., Na, L., Fidel, P.L., and Schwarzenberger, P. (2004). Requirement of interleukin-17A for systemic anti-*Candida albicans* host defense in mice. *J Infect Dis* 190, 624-631.
- Huber, L.C., Brock, M., Hemmatazad, H., Giger, O.T., Moritz, F., Trenkmann, M., Distler, J.H., Gay, R.E., Kolling, C., Moch, H., *et al.* (2007). Histone deacetylase/acetylase activity in total synovial tissue derived from rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients. *Arthritis Rheum* 56, 1087-1093.
- Huber, M., Brustle, A., Reinhard, K., Guralnik, A., Walter, G., Mahiny, A., von Low, E., and Lohoff, M. (2008). IRF4 is essential for IL-21-mediated induction, amplification, and stabilization of the Th17 phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 20846-20851.
- Hughes-Austin, J.M., Deane, K.D., Derber, L.A., Kolfenbach, J.R., Zerbe, G.O., Sokolove, J., Lahey, L.J., Weisman, M.H., Buckner, J.H., Mikuls, T.R., *et al.* (2013). Multiple cytokines and chemokines are associated with rheumatoid arthritis-related autoimmunity in first-degree relatives without rheumatoid arthritis: Studies of the Aetiology of Rheumatoid Arthritis (SERA). *Ann Rheum Dis* 72, 901-907.
- Ishida, K., Kobayashi, T., Ito, S., Komatsu, Y., Yokoyama, T., Okada, M., Abe, A., Murasawa, A., and Yoshie, H. (2012). Interleukin-6 gene promoter methylation in rheumatoid arthritis and chronic periodontitis. *J Periodontol* 83, 917-925.
- Ishigame, H., Kakuta, S., Nagai, T., Kadoki, M., Nambu, A., Komiyama, Y., Fujikado, N., Tanahashi, Y., Akitsu, A., Kotaki, H., *et al.* (2009). Differential roles of interleukin-17A and -17F in host defense against mucocutaneous bacterial infection and allergic responses. *Immunity* 30, 108-119.
- Isler, P., Vey, E., Zhang, J.H., and Dayer, J.M. (1993). Cell surface glycoproteins expressed on activated human T cells induce production of interleukin-1 beta by monocytic cells: a possible role of CD69. *Eur Cytokine Netw* 4, 15-23.

- Ivanov, II, McKenzie, B.S., Zhou, L., Tadokoro, C.E., Lepelley, A., Lafaille, J.J., Cua, D.J., and Littman, D.R. (2006). The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17⁺ T helper cells. *Cell* 126, 1121-1133.
- Janson, P.C., Linton, L.B., Bergman, E.A., Marits, P., Eberhardson, M., Piehl, F., Malmstrom, V., and Winqvist, O. (2011). Profiling of CD4⁺ T cells with epigenetic immune lineage analysis. *Journal of immunology* 186, 92-102.
- Janson, P.C., Winerdal, M.E., Marits, P., Thorn, M., Ohlsson, R., and Winqvist, O. (2008). FOXP3 promoter demethylation reveals the committed Treg population in humans. *PLoS One* 3, e1612.
- Jones, P.A. (2012). Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet* 13, 484-492.
- Joshua, F., Edmonds, J., and Lassere, M. (2006). Power Doppler ultrasound in musculoskeletal disease: a systematic review. *Semin Arthritis Rheum* 36, 99-108.
- Jovanovic, D.V., Di Battista, J.A., Martel-Pelletier, J., Jolicoeur, F.C., He, Y., Zhang, M., Mineau, F., and Pelletier, J.P. (1998). IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages. *Journal of immunology* 160, 3513-3521.
- Kanno, Y., Vahedi, G., Hirahara, K., Singleton, K., and O'Shea, J.J. (2012). Transcriptional and epigenetic control of T helper cell specification: molecular mechanisms underlying commitment and plasticity. *Annual review of immunology* 30, 707-731.
- Kaplan, M.H., Schindler, U., Smiley, S.T., and Grusby, M.J. (1996). Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells. *Immunity* 4, 313-319.
- Karlson, E.W., Lee, I.M., Cook, N.R., Manson, J.E., Buring, J.E., and Hennekens, C.H. (1999). A retrospective cohort study of cigarette smoking and risk of rheumatoid arthritis in female health professionals. *Arthritis Rheum* 42, 910-917.
- Kawabata, T., Nishida, K., Takasugi, K., Ogawa, H., Sada, K., Kadota, Y., Inagaki, J., Hirohata, S., Ninomiya, Y., and Makino, H. (2010). Increased activity and expression of histone deacetylase 1 in relation to tumor necrosis factor-alpha in synovial tissue of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 12, R133.
- Khan, I.H., Krishnan, V.V., Ziman, M., Janatpour, K., Wun, T., Luciw, P.A., and Tuscano, J. (2009). A comparison of multiplex suspension array large-panel kits for profiling cytokines and chemokines in rheumatoid arthritis patients. *Cytometry B Clin Cytom* 76, 159-168.
- Khan, W.I., Richard, M., Akiho, H., Blennerhasset, P.A., Humphreys, N.E., Grecis, R.K., Van Snick, J., and Collins, S.M. (2003). Modulation of intestinal muscle contraction by interleukin-9 (IL-9) or IL-9 neutralization: correlation with worm expulsion in murine nematode infections. *Infect Immun* 71, 2430-2438.
- Klarenbeek, N.B., Guler-Yuksel, M., van der Kooij, S.M., Han, K.H., Roday, H.K., Kerstens, P.J., Seys, P.E., Huizinga, T.W., Dijkmans, B.A., and Allaart, C.F. (2011). The impact of four dynamic, goal-steered treatment strategies on the 5-year outcomes of rheumatoid arthritis patients in the BeSt study. *Ann Rheum Dis* 70, 1039-1046.
- Klareskog, L., Stolt, P., Lundberg, K., Kallberg, H., Bengtsson, C., Grunewald, J., Ronnelid, J., Harris, H.E., Ulfgren, A.K., Rantapaa-Dahlqvist, S., *et al.* (2006). A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. *Arthritis Rheum* 54, 38-46.
- Koch, M.A., Thomas, K.R., Perdue, N.R., Smigiel, K.S., Srivastava, S., and Campbell, D.J. (2012). T-bet(+) Treg cells undergo abortive Th1 cell differentiation due to impaired expression of IL-12 receptor beta2. *Immunity* 37, 501-510.
- Koch, M.A., Tucker-Heard, G., Perdue, N.R., Killebrew, J.R., Urdahl, K.B., and Campbell, D.J. (2009). The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. *Nat Immunol* 10, 595-602.

- Kopf, M., Le Gros, G., Bachmann, M., Lamers, M.C., Bluethmann, H., and Kohler, G. (1993). Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses. *Nature* 362, 245-248.
- Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., and Kuchroo, V.K. (2009). IL-17 and Th17 Cells. *Annual review of immunology* 27, 485-517.
- Krukowski, K., Eddy, J., Kosik, K.L., Konley, T., Janusek, L.W., and Mathews, H.L. (2011). Glucocorticoid dysregulation of natural killer cell function through epigenetic modification. *Brain Behav Immun* 25, 239-249.
- Kung, T.T., Luo, B., Crawley, Y., Garlisi, C.G., Devito, K., Minnicozzi, M., Egan, R.W., Kreutner, W., and Chapman, R.W. (2001). Effect of anti-mIL-9 antibody on the development of pulmonary inflammation and airway hyperresponsiveness in allergic mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 25, 600-605.
- Lally, F., Smith, E., Filer, A., Stone, M.A., Shaw, J.S., Nash, G.B., Buckley, C.D., and Rainger, G.E. (2005). A novel mechanism of neutrophil recruitment in a coculture model of the rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum* 52, 3460-3469.
- Lard, L.R., Visser, H., Speyer, I., vander Horst-Bruinsma, I.E., Zwinderman, A.H., Breedveld, F.C., and Hazes, J.M. (2001). Early versus delayed treatment in patients with recent-onset rheumatoid arthritis: comparison of two cohorts who received different treatment strategies. *Am J Med* 111, 446-451.
- Leech, M.D., and Grecis, R.K. (2006). Induction of enhanced immunity to intestinal nematodes using IL-9-producing dendritic cells. *Journal of immunology* 176, 2505-2511.
- Leipe, J., Grunke, M., Dechant, C., Reindl, C., Kerzendorf, U., Schulze-Koops, H., and Skapenko, A. (2010). Role of Th17 cells in human autoimmune arthritis. *Arthritis Rheum* 62, 2876-2885.
- Leipe, J., Schramm, M.A., Grunke, M., Baeuerle, M., Dechant, C., Nigg, A.P., Witt, M.N., Vielhauer, V., Reindl, C.S., Schulze-Koops, H., *et al.* (2011). Interleukin 22 serum levels are associated with radiographic progression in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 70, 1453-1457.
- Leonard, J.P., Waldburger, K.E., and Goldman, S.J. (1995). Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against interleukin 12. *J Exp Med* 181, 381-386.
- Levitt, R.C., McLane, M.P., MacDonald, D., Ferrante, V., Weiss, C., Zhou, T., Holroyd, K.J., and Nicolaides, N.C. (1999). IL-9 pathway in asthma: new therapeutic targets for allergic inflammatory disorders. *J Allergy Clin Immunol* 103, S485-491.
- Liu, C.C., Fang, T.J., Ou, T.T., Wu, C.C., Li, R.N., Lin, Y.C., Lin, C.H., Tsai, W.C., Liu, H.W., and Yen, J.H. (2011). Global DNA methylation, DNMT1, and MBD2 in patients with rheumatoid arthritis. *Immunol Lett* 135, 96-99.
- Liu, X., Nurieva, R.I., and Dong, C. (2013). Transcriptional regulation of follicular T-helper (Tfh) cells. *Immunol Rev* 252, 139-145.
- Lubberts, E. (2008). IL-17/Th17 targeting: on the road to prevent chronic destructive arthritis? *Cytokine* 41, 84-91.
- Lubberts, E., Joosten, L.A., Oppers, B., van den Bersselaar, L., Coenen-de Roo, C.J., Kolls, J.K., Schwarzenberger, P., van de Loo, F.A., and van den Berg, W.B. (2001). IL-1-independent role of IL-17 in synovial inflammation and joint destruction during collagen-induced arthritis. *Journal of immunology* 167, 1004-1013.
- Machold, K.P., Eberl, G., Leeb, B.F., Nell, V., Windisch, B., and Smolen, J.S. (1998). Early arthritis therapy: rationale and current approach. *J Rheumatol Suppl* 53, 13-19.
- Machold, K.P., Stamm, T.A., Eberl, G.J., Nell, V.K., Dunky, A., Uffmann, M., and Smolen, J.S. (2002). Very recent onset arthritis--clinical, laboratory, and radiological findings during the first year of disease. *J Rheumatol* 29, 2278-2287.

- Manel, N., Unutmaz, D., and Littman, D.R. (2008). The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgamma. *Nat Immunol* 9, 641-649.
- Margueron, R., and Reinberg, D. (2011). The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature* 469, 343-349.
- Matsui, T., Kuga, Y., Kaneko, A., Nishino, J., Eto, Y., Chiba, N., Yasuda, M., Saisho, K., Shimada, K., and Tohma, S. (2007). Disease Activity Score 28 (DAS28) using C-reactive protein underestimates disease activity and overestimates EULAR response criteria compared with DAS28 using erythrocyte sedimentation rate in a large observational cohort of rheumatoid arthritis patients in Japan. *Ann Rheum Dis* 66, 1221-1226.
- McInnes, I.B., Leung, B.P., Sturrock, R.D., Field, M., and Liew, F.Y. (1997). Interleukin-15 mediates T cell-dependent regulation of tumor necrosis factor-alpha production in rheumatoid arthritis. *Nat Med* 3, 189-195.
- McIntyre, K.W., Shuster, D.J., Gillooly, K.M., Warriar, R.R., Connaughton, S.E., Hall, L.B., Arp, L.H., Gately, M.K., and Magram, J. (1996). Reduced incidence and severity of collagen-induced arthritis in interleukin-12-deficient mice. *Eur J Immunol* 26, 2933-2938.
- McMillan, S.J., Bishop, B., Townsend, M.J., McKenzie, A.N., and Lloyd, C.M. (2002). The absence of interleukin 9 does not affect the development of allergen-induced pulmonary inflammation nor airway hyperreactivity. *J Exp Med* 195, 51-57.
- Mease, P.J. (2010). Improving the routine management of rheumatoid arthritis: the value of tight control. *J Rheumatol* 37, 1570-1578.
- Mendenhall, E.M., Williamson, K.E., Reyon, D., Zou, J.Y., Ram, O., Joung, J.K., and Bernstein, B.E. (2013). Locus-specific editing of histone modifications at endogenous enhancers. *Nat Biotechnol* 31, 1133-1136.
- Meune, C., Touze, E., Trinquart, L., and Allanore, Y. (2010). High risk of clinical cardiovascular events in rheumatoid arthritis: Levels of associations of myocardial infarction and stroke through a systematic review and meta-analysis. *Arch Cardiovasc Dis* 103, 253-261.
- Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., and Coffman, R.L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *Journal of immunology* 136, 2348-2357.
- Mukasa, R., Balasubramani, A., Lee, Y.K., Whitley, S.K., Weaver, B.T., Shibata, Y., Crawford, G.E., Hatton, R.D., and Weaver, C.T. (2010). Epigenetic instability of cytokine and transcription factor gene loci underlies plasticity of the T helper 17 cell lineage. *Immunity* 32, 616-627.
- Mycko, M.P., Cichalewska, M., Machlanska, A., Cwiklinska, H., Mariasiewicz, M., and Selmaj, K.W. (2012). MicroRNA-301a regulation of a T-helper 17 immune response controls autoimmune demyelination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, E1248-1257.
- Nakae, S., Nambu, A., Sudo, K., and Iwakura, Y. (2003). Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *Journal of immunology* 171, 6173-6177.
- Nakajima, K., Takeoka, M., Mori, M., Hashimoto, S., Sakurai, A., Nose, H., Higuchi, K., Itano, N., Shiohara, M., Oh, T., *et al.* (2010). Exercise effects on methylation of ASC gene. *Int J Sports Med* 31, 671-675.
- Nakano, K., Whitaker, J.W., Boyle, D.L., Wang, W., and Firestein, G.S. (2013). DNA methylome signature in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 72, 110-117.
- Nalbandian, A., Crispin, J.C., and Tsokos, G.C. (2009). Interleukin-17 and systemic lupus erythematosus: current concepts. *Clin Exp Immunol* 157, 209-215.
- Nam, J.L., Winthrop, K.L., van Vollenhoven, R.F., Pavelka, K., Valesini, G., Hensor, E.M., Worthy, G., Landewe, R., Smolen, J.S., Emery, P., *et al.* (2010). Current evidence for the management of rheumatoid arthritis with biological disease-modifying antirheumatic drugs: a

- systematic literature review informing the EULAR recommendations for the management of RA. *Ann Rheum Dis* 69, 976-986.
- Nell, V.P., Machold, K.P., Eberl, G., Stamm, T.A., Uffmann, M., and Smolen, J.S. (2004). Benefit of very early referral and very early therapy with disease-modifying anti-rheumatic drugs in patients with early rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 43, 906-914.
- Neurath, M.F., Fuss, I., Kelsall, B.L., Stuber, E., and Strober, W. (1995). Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. *J Exp Med* 182, 1281-1290.
- Nicola, P.J., Maradit-Kremers, H., Roger, V.L., Jacobsen, S.J., Crowson, C.S., Ballman, K.V., and Gabriel, S.E. (2005). The risk of congestive heart failure in rheumatoid arthritis: a population-based study over 46 years. *Arthritis Rheum* 52, 412-420.
- Niimoto, T., Nakasa, T., Ishikawa, M., Okuhara, A., Izumi, B., Deie, M., Suzuki, O., Adachi, N., and Ochi, M. (2010). MicroRNA-146a expresses in interleukin-17 producing T cells in rheumatoid arthritis patients. *BMC Musculoskelet Disord* 11, 209.
- Nile, C.J., Read, R.C., Akil, M., Duff, G.W., and Wilson, A.G. (2008). Methylation status of a single CpG site in the IL6 promoter is related to IL6 messenger RNA levels and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 58, 2686-2693.
- Nishida, K., Komiyama, T., Miyazawa, S., Shen, Z.N., Furumatsu, T., Doi, H., Yoshida, A., Yamana, J., Yamamura, M., Ninomiya, Y., *et al.* (2004). Histone deacetylase inhibitor suppression of autoantibody-mediated arthritis in mice via regulation of p16INK4a and p21(WAF1/Cip1) expression. *Arthritis Rheum* 50, 3365-3376.
- Nistala, K., Adams, S., Cambrook, H., Ursu, S., Olivito, B., de Jager, W., Evans, J.G., Cimaz, R., Bajaj-Elliott, M., and Wedderburn, L.R. (2010). Th17 plasticity in human autoimmune arthritis is driven by the inflammatory environment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 14751-14756.
- Nogales, K.E., Zaba, L.C., Shemer, A., Fuentes-Duculan, J., Cardinale, I., Kikuchi, T., Ramon, M., Bergman, R., Krueger, J.G., and Guttman-Yassky, E. (2009). IL-22-producing "T22" T cells account for upregulated IL-22 in atopic dermatitis despite reduced IL-17-producing TH17 T cells. *J Allergy Clin Immunol* 123, 1244-1252 e1242.
- Nowak, E.C., Weaver, C.T., Turner, H., Begum-Haque, S., Becher, B., Schreiner, B., Coyle, A.J., Kasper, L.H., and Noelle, R.J. (2009). IL-9 as a mediator of Th17-driven inflammatory disease. *J Exp Med* 206, 1653-1660.
- O'Connell, R.M., Kahn, D., Gibson, W.S., Round, J.L., Scholz, R.L., Chaudhuri, A.A., Kahn, M.E., Rao, D.S., and Baltimore, D. (2010). MicroRNA-155 promotes autoimmune inflammation by enhancing inflammatory T cell development. *Immunity* 33, 607-619.
- Oh, C.K., Leigh, R., McLaurin, K.K., Kim, K., Hultquist, M., and Molfino, N.A. (2013). A randomized, controlled trial to evaluate the effect of an anti-interleukin-9 monoclonal antibody in adults with uncontrolled asthma. *Respir Res* 14, 93.
- Ohl, K., and Tenbrock, K. (2011). Inflammatory cytokines in systemic lupus erythematosus. *J Biomed Biotechnol* 2011, 432595.
- Okada, Y., Wu, D., Trynka, G., Raj, T., Terao, C., Ikari, K., Kochi, Y., Ohmura, K., Suzuki, A., Yoshida, S., *et al.* (2014). Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. *Nature* 506, 376-381.
- Okamoto, H., Yamamura, M., Morita, Y., Harada, S., Makino, H., and Ota, Z. (1997). The synovial expression and serum levels of interleukin-6, interleukin-11, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 40, 1096-1105.
- Onishi, R.M., and Gaffen, S.L. (2010). Interleukin-17 and its target genes: mechanisms of interleukin-17 function in disease. *Immunology* 129, 311-321.
- Park, H., Li, Z., Yang, X.O., Chang, S.H., Nurieva, R., Wang, Y.H., Wang, Y., Hood, L., Zhu, Z., Tian, Q., *et al.* (2005). A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 6, 1133-1141.

- Parronchi, P., Macchia, D., Piccinni, M.P., Biswas, P., Simonelli, C., Maggi, E., Ricci, M., Ansari, A.A., and Romagnani, S. (1991). Allergen- and bacterial antigen-specific T-cell clones established from atopic donors show a different profile of cytokine production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 4538-4542.
- Pauley, K.M., Satoh, M., Chan, A.L., Bubb, M.R., Reeves, W.H., and Chan, E.K. (2008). Upregulated miR-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res Ther* 10, R101.
- Pedersen, J.K., Svendsen, A.J., and Horslev-Petersen, K. (2007). Incidence of Rheumatoid Arthritis in the Southern part of Denmark from 1995 to 2001. *Open Rheumatol J* 1, 18-23.
- Petit-Frere, C., Dugas, B., Braquet, P., and Mencia-Huerta, J.M. (1993). Interleukin-9 potentiates the interleukin-4-induced IgE and IgG1 release from murine B lymphocytes. *Immunology* 79, 146-151.
- Pickens, S.R., Volin, M.V., Mandelin, A.M., 2nd, Kolls, J.K., Pope, R.M., and Shahrara, S. (2010). IL-17 contributes to angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Journal of immunology* 184, 3233-3241.
- Prevo, M.L., van 't Hof, M.A., Kuper, H.H., van Leeuwen, M.A., van de Putte, L.B., and van Riel, P.L. (1995). Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 38, 44-48.
- Puel, A., Cypowyj, S., Bustamante, J., Wright, J.F., Liu, L., Lim, H.K., Migaud, M., Israel, L., Chrabieh, M., Audry, M., *et al.* (2011). Chronic mucocutaneous candidiasis in humans with inborn errors of interleukin-17 immunity. *Science* 332, 65-68.
- Putheti, P., Awasthi, A., Popoola, J., Gao, W., and Strom, T.B. (2010). Human CD4 memory T cells can become CD4+IL-9+ T cells. *PLoS One* 5, e8706.
- Radovits, B.J., Fransen, J., Al Shamma, S., Eijsbouts, A.M., van Riel, P.L., and Laan, R.F. (2010). Excess mortality emerges after 10 years in an inception cohort of early rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 62, 362-370.
- Ramming, A., Druzd, D., Leipe, J., Schulze-Koops, H., and Skapenko, A. (2012). Maturation-related histone modifications in the PU.1 promoter regulate Th9-cell development. *Blood* 119, 4665-4674.
- Rando, O.J. (2012). Combinatorial complexity in chromatin structure and function: revisiting the histone code. *Curr Opin Genet Dev* 22, 148-155.
- Reader, J.R., Hyde, D.M., Schelegle, E.S., Aldrich, M.C., Stoddard, A.M., McLane, M.P., Levitt, R.C., and Tepper, J.S. (2003). Interleukin-9 induces mucous cell metaplasia independent of inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 28, 664-672.
- Rezaei, H., Saevarsdottir, S., Forslind, K., Albertsson, K., Wallin, H., Bratt, J., Ernestam, S., Geborek, P., Pettersson, I.F., and van Vollenhoven, R.F. (2012). In early rheumatoid arthritis, patients with a good initial response to methotrexate have excellent 2-year clinical outcomes, but radiological progression is not fully prevented: data from the methotrexate responders population in the SWEFOT trial. *Ann Rheum Dis* 71, 186-191.
- Richard, M., Grecis, R.K., Humphreys, N.E., Renauld, J.C., and Van Snick, J. (2000). Anti-IL-9 vaccination prevents worm expulsion and blood eosinophilia in *Trichuris muris*-infected mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 767-772.
- Richardson, B., Scheinbart, L., Strahler, J., Gross, L., Hanash, S., and Johnson, M. (1990). Evidence for impaired T cell DNA methylation in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 33, 1665-1673.
- Romagnani, S. (1995). Biology of human TH1 and TH2 cells. *J Clin Immunol* 15, 121-129.
- Romagnani, S. (2000). The role of lymphocytes in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 105, 399-408.

- Rosenberg, S.A., and Lipsky, P.E. (1979). Monocyte dependence of pokeweed mitogen-induced differentiation of immunoglobulin-secreting cells from human peripheral blood mononuclear cells. *Journal of immunology* 122, 926-931.
- Rothe, H., O'Hara, R.M., Jr., Martin, S., and Kolb, H. (1997). Suppression of cyclophosphamide induced diabetes development and pancreatic Th1 reactivity in NOD mice treated with the interleukin (IL)-12 antagonist IL-12(p40)2. *Diabetologia* 40, 641-646.
- Rudner, X.L., Happel, K.I., Young, E.A., and Shellito, J.E. (2007). Interleukin-23 (IL-23)-IL-17 cytokine axis in murine *Pneumocystis carinii* infection. *Infect Immun* 75, 3055-3061.
- Russ, B.E., Olshanksy, M., Smallwood, H.S., Li, J., Denton, A.E., Prier, J.E., Stock, A.T., Croom, H.A., Cullen, J.G., Nguyen, M.L., *et al.* (2014). Distinct epigenetic signatures delineate transcriptional programs during virus-specific CD8(+) T cell differentiation. *Immunity* 41, 853-865.
- Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., and Ono, M. (2008). Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 133, 775-787.
- Sato, K., Suematsu, A., Okamoto, K., Yamaguchi, A., Morishita, Y., Kadono, Y., Tanaka, S., Kodama, T., Akira, S., Iwakura, Y., *et al.* (2006). Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J Exp Med* 203, 2673-2682.
- Saxne, T., Palladino, M.A., Jr., Heinegard, D., Talal, N., and Wollheim, F.A. (1988). Detection of tumor necrosis factor alpha but not tumor necrosis factor beta in rheumatoid arthritis synovial fluid and serum. *Arthritis Rheum* 31, 1041-1045.
- Schett, G. (2007). Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Osteoclasts. *Arthritis Res Ther* 9, 203.
- Schmitt, E., Germann, T., Goedert, S., Hoehn, P., Huels, C., Koelsch, S., Kuhn, R., Muller, W., Palm, N., and Rude, E. (1994). IL-9 production of naive CD4+ T cells depends on IL-2, is synergistically enhanced by a combination of TGF-beta and IL-4, and is inhibited by IFN-gamma. *Journal of immunology* 153, 3989-3996.
- Schmitt, E., Van Brandwijk, R., Van Snick, J., Siebold, B., and Rude, E. (1989). TCGF III/P40 is produced by naive murine CD4+ T cells but is not a general T cell growth factor. *Eur J Immunol* 19, 2167-2170.
- Schwartz, R.H. (1990). A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science* 248, 1349-1356.
- Schwartz, R.H. (1992). Costimulation of T lymphocytes: the role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy. *Cell* 71, 1065-1068.
- Seder, R.A., Gazzinelli, R., Sher, A., and Paul, W.E. (1993). Interleukin 12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for interferon gamma production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 10188-10192.
- Shimane, K., Kochi, Y., Suzuki, A., Okada, Y., Ishii, T., Horita, T., Saito, K., Okamoto, A., Nishimoto, N., Myouzen, K., *et al.* (2013). An association analysis of HLA-DRB1 with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis in a Japanese population: effects of *09:01 allele on disease phenotypes. *Rheumatology (Oxford)* 52, 1172-1182.
- Shimbara, A., Christodoulopoulos, P., Soussi-Gounni, A., Olivenstein, R., Nakamura, Y., Levitt, R.C., Nicolaidis, N.C., Holroyd, K.J., Tscicopoulos, A., Lafitte, J.J., *et al.* (2000). IL-9 and its receptor in allergic and nonallergic lung disease: increased expression in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 105, 108-115.
- Silman, A.J., MacGregor, A.J., Thomson, W., Holligan, S., Carthy, D., Farhan, A., and Ollier, W.E. (1993). Twin concordance rates for rheumatoid arthritis: results from a nationwide study. *Br J Rheumatol* 32, 903-907.
- Smolen, J.S., Aletaha, D., Koeller, M., Weisman, M.H., and Emery, P. (2007). New therapies for treatment of rheumatoid arthritis. *Lancet* 370, 1861-1874.

- Smolen, J.S., and Steiner, G. (2003). Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Drug Discov* 2, 473-488.
- Stanczyk, J., Ospelt, C., Karouzakis, E., Filer, A., Raza, K., Kolling, C., Gay, R., Buckley, C.D., Tak, P.P., Gay, S., *et al.* (2011). Altered expression of microRNA-203 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts and its role in fibroblast activation. *Arthritis Rheum* 63, 373-381.
- Staudt, V., Bothur, E., Klein, M., Lingnau, K., Reuter, S., Grebe, N., Gerlitzki, B., Hoffmann, M., Ulges, A., Taube, C., *et al.* (2010). Interferon-regulatory factor 4 is essential for the developmental program of T helper 9 cells. *Immunity* 33, 192-202.
- 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. *Ann Rheum Dis* 62, 835-841.
- Stout, R.D. (1993). Macrophage activation by T cells: cognate and non-cognate signals. *Curr Opin Immunol* 5, 398-403.
- Strunk, J., Backhaus, M., Schmidt, W., and Kellner, H. (2010). [Color Doppler sonography for investigation of peripheral joints and ligaments]. *Z Rheumatol* 69, 164-170.
- Symmons, D.P. (2002). Epidemiology of rheumatoid arthritis: determinants of onset, persistence and outcome. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 16, 707-722.
- Szabo, S.J., Dighe, A.S., Gubler, U., and Murphy, K.M. (1997). Regulation of the interleukin (IL)-12R beta 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells. *J Exp Med* 185, 817-824.
- Takagi, M. (2011). Toll-like receptor--a potent driving force behind rheumatoid arthritis. *J Clin Exp Hematop* 51, 77-92.
- Takami, N., Osawa, K., Miura, Y., Komai, K., Taniguchi, M., Shiraishi, M., Sato, K., Iguchi, T., Shiozawa, K., Hashiramoto, A., *et al.* (2006). Hypermethylated promoter region of DR3, the death receptor 3 gene, in rheumatoid arthritis synovial cells. *Arthritis Rheum* 54, 779-787.
- Takatori, H., Kanno, Y., Watford, W.T., Tato, C.M., Weiss, G., Ivanov, II, Littman, D.R., and O'Shea, J.J. (2009). Lymphoid tissue inducer-like cells are an innate source of IL-17 and IL-22. *J Exp Med* 206, 35-41.
- Thomas, R.M., Sai, H., and Wells, A.D. (2012). Conserved intergenic elements and DNA methylation cooperate to regulate transcription at the il17 locus. *J Biol Chem* 287, 25049-25059.
- Toda, M., Tulic, M.K., Levitt, R.C., and Hamid, Q. (2002). A calcium-activated chloride channel (HCLCA1) is strongly related to IL-9 expression and mucus production in bronchial epithelium of patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 109, 246-250.
- Trenkmann, M., Brock, M., Gay, R.E., Kolling, C., Speich, R., Michel, B.A., Gay, S., and Huber, L.C. (2011). Expression and function of EZH2 in synovial fibroblasts: epigenetic repression of the Wnt inhibitor SFRP1 in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 70, 1482-1488.
- Tzartos, J.S., Friese, M.A., Craner, M.J., Palace, J., Newcombe, J., Esiri, M.M., and Fugger, L. (2008). Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am J Pathol* 172, 146-155.
- 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 Rheum* 56, 425-432.
- van der Linden, M.P., le Cessie, S., Raza, K., van der Woude, D., Knevel, R., Huizinga, T.W., and van der Helm-van Mil, A.H. (2010). Long-term impact of delay in assessment of patients with early arthritis. *Arthritis Rheum* 62, 3537-3546.

- van Gaalen, F.A., van Aken, J., Huizinga, T.W., Schreuder, G.M., Breedveld, F.C., Zanelli, E., van Venrooij, W.J., Verweij, C.L., Toes, R.E., and de Vries, R.R. (2004). Association between HLA class II genes and autoantibodies to cyclic citrullinated peptides (CCPs) influences the severity of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 50, 2113-2121.
- van Leeuwen, M.A., van Rijswijk, M.H., van der Heijde, D.M., Te Meerman, G.J., van Riel, P.L., Houtman, P.M., van De Putte, L.B., and Limburg, P.C. (1993). The acute-phase response in relation to radiographic progression in early rheumatoid arthritis: a prospective study during the first three years of the disease. *Br J Rheumatol* 32 Suppl 3, 9-13.
- Van Snick, J., Goethals, A., Renaud, J.C., Van Roost, E., Uyttenhove, C., Rubira, M.R., Moritz, R.L., and Simpson, R.J. (1989). Cloning and characterization of a cDNA for a new mouse T cell growth factor (P40). *J Exp Med* 169, 363-368.
- Veldhoen, M., Uyttenhove, C., van Snick, J., Helmby, H., Westendorf, A., Buer, J., Martin, B., Wilhelm, C., and Stockinger, B. (2008). Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat Immunol* 9, 1341-1346.
- Wang, X., Zhang, Y., Yang, X.O., Nurieva, R.I., Chang, S.H., Ojeda, S.S., Kang, H.S., Schluns, K.S., Gui, J., Jetten, A.M., *et al.* (2012). Transcription of Il17 and Il17f is controlled by conserved noncoding sequence 2. *Immunity* 36, 23-31.
- Wang, Y., Su, M.A., and Wan, Y.Y. (2011). An essential role of the transcription factor GATA-3 for the function of regulatory T cells. *Immunity* 35, 337-348.
- Wei, G., Wei, L., Zhu, J., Zang, C., Hu-Li, J., Yao, Z., Cui, K., Kanno, Y., Roh, T.Y., Watford, W.T., *et al.* (2009). Global mapping of H3K4me3 and H3K27me3 reveals specificity and plasticity in lineage fate determination of differentiating CD4+ T cells. *Immunity* 30, 155-167.
- Wiener, Z., Falus, A., and Toth, S. (2004). IL-9 increases the expression of several cytokines in activated mast cells, while the IL-9-induced IL-9 production is inhibited in mast cells of histamine-free transgenic mice. *Cytokine* 26, 122-130.
- Willenborg, D.O., Fordham, S., Bernard, C.C., Cowden, W.B., and Ramshaw, I.A. (1996). IFN-gamma plays a critical down-regulatory role in the induction and effector phase of myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology* 157, 3223-3227.
- Wilson, N.J., Boniface, K., Chan, J.R., McKenzie, B.S., Blumenschein, W.M., Mattson, J.D., Basham, B., Smith, K., Chen, T., Morel, F., *et al.* (2007). Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol* 8, 950-957.
- Wohlfert, E.A., Grainger, J.R., Bouladoux, N., Konkel, J.E., Oldenhove, G., Ribeiro, C.H., Hall, J.A., Yagi, R., Naik, S., Bhairavabhotla, R., *et al.* (2011). GATA3 controls Foxp3(+) regulatory T cell fate during inflammation in mice. *J Clin Invest* 121, 4503-4515.
- Wong, M.T., Ye, J.J., Alonso, M.N., Landrigan, A., Cheung, R.K., Engleman, E., and Utz, P.J. (2010). Regulation of human Th9 differentiation by type I interferons and IL-21. *Immunol Cell Biol* 88, 624-631.
- Wu, J.Y., Wang, J., Lai, J.C., Cheng, Y.W., Yeh, K.T., Wu, T.C., Chen, C.Y., and Lee, H. (2008). Association of O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) promoter methylation with p53 mutation occurrence in non-small cell lung cancer with different histology, gender, and smoking status. *Ann Surg Oncol* 15, 3272-3277.
- Wu, Q., Martin, R.J., Rino, J.G., Breed, R., Torres, R.M., and Chu, H.W. (2007). IL-23-dependent IL-17 production is essential in neutrophil recruitment and activity in mouse lung defense against respiratory *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Microbes Infect* 9, 78-86.
- Yamada, H., Nakashima, Y., Okazaki, K., Mawatari, T., Fukushi, J., Oyamada, A., Fujimura, K., Iwamoto, Y., and Yoshikai, Y. (2011). Preferential accumulation of activated Th1 cells not only in rheumatoid arthritis but also in osteoarthritis joints. *J Rheumatol* 38, 1569-1575.

- Yamashita, M., Hirahara, K., Shinnakasu, R., Hosokawa, H., Norikane, S., Kimura, M.Y., Hasegawa, A., and Nakayama, T. (2006). Crucial role of MLL for the maintenance of memory T helper type 2 cell responses. *Immunity* 24, 611-622.
- Yang, X.O., Pappu, B.P., Nurieva, R., Akimzhanov, A., Kang, H.S., Chung, Y., Ma, L., Shah, B., Panopoulos, A.D., Schluns, K.S., *et al.* (2008). T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma. *Immunity* 28, 29-39.
- Ye, P., Rodriguez, F.H., Kanaly, S., Stocking, K.L., Schurr, J., Schwarzenberger, P., Oliver, P., Huang, W., Zhang, P., Zhang, J., *et al.* (2001). Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J Exp Med* 194, 519-527.
- Ying, S., Meng, Q., Kay, A.B., and Robinson, D.S. (2002). Elevated expression of interleukin-9 mRNA in the bronchial mucosa of atopic asthmatics and allergen-induced cutaneous late-phase reaction: relationships to eosinophils, mast cells and T lymphocytes. *Clin Exp Allergy* 32, 866-871.
- Zhang, F., Meng, G., and Strober, W. (2008). Interactions among the transcription factors Runx1, RORgammat and Foxp3 regulate the differentiation of interleukin 17-producing T cells. *Nat Immunol* 9, 1297-1306.
- Zhang, G.X., Gran, B., Yu, S., Li, J., Siglienti, I., Chen, X., Kamoun, M., and Rostami, A. (2003). Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in IL-12 receptor-beta 2-deficient mice: IL-12 responsiveness is not required in the pathogenesis of inflammatory demyelination in the central nervous system. *Journal of immunology* 170, 2153-2160.
- Zhao, Y., Yang, J., Gao, Y.D., and Guo, W. (2010). Th17 immunity in patients with allergic asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 151, 297-307.
- Zheng, W., and Flavell, R.A. (1997). The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 89, 587-596.
- Zheng, Y., Josefowicz, S., Chaudhry, A., Peng, X.P., Forbush, K., and Rudensky, A.Y. (2010). Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate. *Nature* 463, 808-812.
- Zhu, J., Min, B., Hu-Li, J., Watson, C.J., Grinberg, A., Wang, Q., Killeen, N., Urban, J.F., Jr., Guo, L., and Paul, W.E. (2004). Conditional deletion of Gata3 shows its essential function in T(H)1-T(H)2 responses. *Nat Immunol* 5, 1157-1165.
- Ziller, M.J., Gu, H., Muller, F., Donaghey, J., Tsai, L.T., Kohlbacher, O., De Jager, P.L., Rosen, E.D., Bennett, D.A., Bernstein, B.E., *et al.* (2013). Charting a dynamic DNA methylation landscape of the human genome. *Nature* 500, 477-481.

11. Danksagung

Hiermit möchte ich die Möglichkeit nutzen, mich bei den wichtigsten Personen zu bedanken, die an der Fertigstellung dieser Arbeit beteiligt waren.

Mein besonderer Dank geht an meinen Doktorvater Prof. Dr. med. Schulze-Koops, der mir erst die Arbeit auf diesem interessanten Forschungsgebiet ermöglicht hat. Herr Prof. Schulze-Koops verstand es immer sehr gut, die Brücke zwischen Forschung und klinischem Alltag zu ziehen. Insbesondere als internistisch interessierter Mediziner erwies sich dies als hilfreicher Motivationsschub.

Desweiteren möchte ich mich bei Frau PD Dr. Alla Skapenko bedanken, die als Leiterin der Forschungsabteilung, insbesondere in meinem Forschungsjahr, mir täglich mit Rat und Tat zur Verfügung stand. Sie verstand es einem Neuling in der Forschung die wichtigsten Werkzeuge zu vermitteln.

Gleichermaßen gilt mein Dank Dr. Jan Leipe und Dr. Andreas Ramming für das Einarbeiten im Labor und das Beibringen der Methoden.

Ein großes Dankeschön geht an Sonja Haupt und Fausto Pirronello, mit denen ich einige lange Arbeitstage gemeinsam im Labor verbracht habe. Sie hatten immer ein offenes Ohr und sowohl in der Arbeit als auch im privaten Leben immer einen guten Ratschlag parat. Ich freue mich über die daraus entstandene Freundschaft.

Ebenso gilt mein Dank der guten Seele des Labors, Christine Schnabel.

Den Ärzten der Rheumaeinheit danke ich für das Abnehmen der Patientenblutproben.

Zuletzt gilt mein Dank den vielen Patienten und freiwilligen Spendern, ohne deren Blutspende die Arbeit erst gar nicht möglich gewesen wäre.

Meinen Eltern gebührt Dank für ihr Vertrauen in mich.

12. Eidesstattliche Versicherung

Herrmann, Simon

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Histonmodifikationen in den Genloki RORC und IL17 bei Patienten mit rheumatoider Arthritis

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 23.11.2017