

Aus der Klinik für Anaesthesiologie  
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. Berhard Zwißler

und

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV  
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke



microRNA-Expression in regulatorischen T-Zellen  
und im Serum  
bei chronischer Inflammation  
am Beispiel der Rheumatoiden Arthritis

Dissertation

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

vorgelegt von

Johannes Thomas Kreuzer

aus Regensburg

2019

---

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München**

Berichterstatter: PD Dr. med. Patrick Möhnle

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Michael Vogeser

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. med. Hendrik Schulze-Koops

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

Tag der mündlichen Prüfung: 16.05.2019

meiner Familie gewidmet

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Spezifisches und unspezifisches Immunsystem .....	1
1.1.1	T-Zellen .....	2
1.1.2	Regulatorische T-Zellen .....	2
1.2	Posttranskriptionelle Modifikation der Proteinexpression durch microRNAs auf Tregs .....	4
1.2.1	microRNAs .....	4
1.2.2	GARP .....	5
1.3	Die Rheumatoide Arthritis.....	6
1.3.1	Epidemiologie .....	7
1.3.2	Klinik, Diagnostik und Klassifikation .....	7
1.3.3	Prognose.....	10
1.4	Fragestellung .....	11
1.4.1	Fragestellung und Zielsetzung.....	11
1.4.2	Versuchsaufbau .....	12
2	Material und Methoden .....	13
2.1	Reagenzien .....	13
2.2	KITs .....	13
2.3	Medien und Pufferlösungen.....	14
2.4	Antikörper .....	15
2.5	Geräte.....	15
2.6	Einschluss der Versuchspersonen .....	16
2.7	Zellisolation .....	17
2.7.1	PBMC-Isolation .....	17
2.7.2	Rosettierung .....	17
2.7.3	MACS-Negativselektion der CD4 <sup>+</sup> -Zellen.....	18
2.7.4	MACS-Negativselektion der CD4 <sup>+</sup> - und CD25 <sup>-</sup> CD4 <sup>+</sup> -Zellen .....	18
2.7.5	MACS-Positivselektion der CD25 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> -Zellen.....	19
2.8	Zellkultur.....	20
2.9	RNA-Untersuchungen.....	21
2.9.1	RNA-Isolation aus Zellen.....	21
2.9.2	RNA-Isolation aus Serum .....	21
2.9.3	TaqMan-MicroRNA-Assay .....	22
2.9.4	Messung der Serum-miRNA-Expression.....	22
2.9.5	Messung der GARP-mRNA-Expression .....	23

2.9.5.1	Reverse Transkription.....	23
2.9.5.2	Kontrolle der Reversen Transkription .....	23
2.9.5.2.1	Polymerase Kettenreaktion (PCR) .....	23
2.9.5.2.2	Gelelektrophorese.....	23
2.9.5.3	GARP TaqMan gene expression assay .....	24
2.10	FACS-Durchflusszytometrie.....	25
2.10.1	Reinheitskontrolle der Zellisolation .....	26
2.10.2	GARP-Staining.....	26
2.11	Datenauswertung und Verarbeitung.....	27
3	Ergebnisse.....	28
3.1	Klinische und demographische Daten der Studiengruppen.....	28
3.2	miR-Expression .....	29
3.2.1	miR-146a-Expression .....	29
3.2.1.1	miR-146a-Expression der CD25 <sup>-</sup> CD4 <sup>+</sup> -Zellpopulation.....	29
3.2.1.2	miR-146a-Expression der CD25 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> -Zellpopulation .....	30
3.2.2	miR-155-Expression.....	31
3.2.2.1	miR-155-Expression der CD25 <sup>-</sup> CD4 <sup>+</sup> -Zellpopulation.....	31
3.2.2.2	miR-155-Expression der CD25 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> -Zellpopulation .....	32
3.2.3	miR-223-Expression.....	33
3.2.3.1	miR-223-Expression der CD25 <sup>-</sup> CD4 <sup>+</sup> -Zellpopulation.....	33
3.2.3.2	miR-223-Expression der CD25 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> -Zellpopulation .....	34
3.2.4	miR-142-3p-Expression .....	35
3.2.4.1	miR-142-3p-Expression der CD25 <sup>-</sup> CD4 <sup>+</sup> -Zellpopulation.....	35
3.2.4.2	miR-142-3p-Expression der CD25 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> -Zellpopulation .....	36
3.3	Serum-miR-Expression .....	37
3.3.1	Serum-miR-146a-Expression .....	37
3.3.2	Serum-miR-155-Expression .....	38
3.3.3	Serum-miR-223-Expression .....	38
3.3.4	Serum-miR-142-3p-Expression.....	39
3.3.5	Zusammenfassung der Ergebnisse der Serum-miR-Expression .....	39
3.4	GARP-mRNA-Expression.....	40
3.4.1	GARP-mRNA-Expression der CD25 <sup>-</sup> CD4 <sup>+</sup> -Zellpopulation.....	40
3.4.2	GARP-mRNA-Expression der CD25 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> -Zellpopulation .....	41
3.4.3	Zusammenfassung der Ergebnisse zur GARP-mRNA-Expression .....	41
3.5	Durchflusszytometrie (GARP-Oberflächenexpression) .....	42
3.5.1	Anteil GARP <sup>+</sup> -Zellen .....	43

3.5.1.1	Anteil der GARP <sup>+</sup> -Zellen in der CD4 <sup>+</sup> -Zellpopulation .....	43
3.5.1.2	Anteil der GARP <sup>+</sup> -Zellen in der CD25 <sup>-</sup> CD4 <sup>+</sup> -Zellpopulation .....	44
3.5.1.3	Anteil der GARP <sup>+</sup> -Zellen in der CD25 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> -Zellpopulation .....	44
3.5.2	GARP-MFI .....	45
3.5.2.1	GARP-MFI der CD4 <sup>+</sup> -Zellpopulation.....	45
3.5.2.2	GARP-MFI der 25 <sup>-</sup> CD4 <sup>+</sup> -Zellpopulation .....	46
3.5.2.3	GARP-MFI der 25 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> -Zellpopulation.....	46
3.5.3	GARP-MFI der GARP <sup>+</sup> -Zellen.....	47
3.5.3.1	GARP-MFI der GARP <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> -Zellpopulation.....	47
3.5.3.2	GARP-MFI der GARP <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> -Zellpopulation.....	48
3.5.4	Zusammenfassung der Ergebnisse zur GARP-Oberflächenexpression.....	48
4	Diskussion.....	49
4.1	Zusammenfassung der Hauptergebnisse .....	49
4.2	Diskussion der Methoden .....	50
4.2.1	Einschluss der Versuchspersonen .....	50
4.2.2	Zellisolation .....	50
4.2.3	RNA-Untersuchungen.....	51
4.2.4	FACS-Durchflusszytometrie.....	52
4.2.5	Datenauswertung.....	52
4.3	Diskussion der Ergebnisse .....	53
4.3.1	RNA-Untersuchungen.....	53
4.3.1.1	miR-Expression .....	53
4.3.1.1.1	miR-146a und miR-155.....	53
4.3.1.1.2	miR-223 .....	56
4.3.1.1.3	miR-142-3p.....	57
4.3.1.2	Serum-miR-Expression .....	59
4.3.1.3	GARP-mRNA-Expression.....	61
4.3.2	GARP-Oberflächenexpression .....	63
5	Zusammenfassung.....	66
6	Anhang.....	67
6.1	Literatur- und Quellenverzeichnis.....	67
6.2	Abkürzungsverzeichnis .....	76
6.3	Eidesstattliche Versicherung .....	78
6.4	Publikation.....	79
6.5	Danksagung .....	80

# 1 Einleitung

## 1.1 Spezifisches und unspezifisches Immunsystem

Das menschliche Immunsystem ist permanent gefordert, um einerseits eine wirksame Immunabwehr zu ermöglichen, gleichzeitig aber auch die Selbsttoleranz aufrecht zu erhalten. Sobald das Immunsystem diese Balance zwischen Selbsttoleranz und Fremdadwehr nicht mehr korrekt justiert, resultieren verschiedenste Krankheitsbilder. Ist im Rahmen einer solchen Fehlregulation die Selbsttoleranz der Immunabwehr gestört, so entstehen Autoimmunität und chronische Inflammation, was sich klinisch in verschiedenen Krankheitsbildern äußern kann.

Die Rheumatoide Arthritis (synonym RA, chronische Polyarthrit), die für diese Dissertation als Modellerkrankung für chronische Entzündungsvorgänge herangezogen wurde, ist eine dieser Autoimmunerkrankungen. Im folgenden Abschnitt werden daher die grundlegenden physiologischen Mechanismen der humanen Immunabwehr, die für das Verständnis der Pathogenese der RA notwendig sind, kurz zusammengefasst.

Als Immunsystem bezeichnet man die Gesamtheit aller Abwehrmechanismen eines Lebewesens gegen eingedrungene Mikroorganismen wie Bakterien, Viren, Parasiten, Fremdstoffen oder entartete körpereigene Zellen. Im menschlichen Körper findet sich für diesen Zweck ein hochkomplexes Netzwerk, dem verschiedene Organe, Zellen und Moleküle zugerechnet werden. Man unterscheidet diese Bestandteile des Immunsystems in die sogenannte unspezifische oder angeborene (z.B. Makrophagen, die bereits ab Geburt eingedrungene Mikroorganismen phagozytieren), sowie die sogenannte erworbene oder spezifische Immunantwort (z.B. B-Zellen, die erst nach Kontakt mit dem entsprechenden Antigen die Antikörperproduktion initiieren und daher einem „Lernprozess“ unterliegen). [1, 2]

Die unspezifische Immunabwehr zielt generell auf eine Verhinderung oder frühe Eindämmung einer möglichen Infektion ab. Hierfür stehen beispielsweise Epithelien und Schleimhäute zur Verfügung, die ein Eindringen von Keimen in den häufigsten Fällen wirkungsvoll verhindern können, indem sie sowohl physikalisch dichte Oberflächenbarrieren bilden als auch chemische Abwehrmechanismen (z.B. durch antiinfektive Stoffe wie Lysozym oder saure pH-Werte) nutzen. Werden diese Barrieren jedoch überwunden, so wird der Infektion auf zwei unterschiedlichen Wegen entgegengewirkt: Einerseits dämmen Zellen, hauptsächlich Granulozyten (durch Exozytose von Granula mit antiinfektivem Inhalt wie TNF, Interleukinen sowie Komplementaktivatoren) und Makrophagen (durch Phagozytose) die Infektion ein, andererseits werden die Keime durch humorale Faktoren wie das Komplementsystem lysiert. Hierbei wird eine Proteinkaskade aktiviert, die sowohl zur Bildung eines Membranangriffskomplexes als auch zur Opsonierung für phagozytierende Zellen führt. Die Effekte der unspezifischen Immunabwehr garantieren somit eine sehr schnelle, dafür jedoch stereotyp festgelegte Reaktion auf Zellen oder Organismen, die vom Körper als „fremd“ erkannt werden. [1, 3, 4]

Das spezifische Immunsystem, über das Wirbeltiere zusätzlich zu ihrem angeborenen Immunsystem verfügen, kann als Verstärkung oder Ergänzung zu den Reaktionen des unspezifischen Immunsystems gesehen werden: Es kompensiert die mangelnde Selektivität der unspezifischen Immunantwort. Diese Selektivität wird im spezifischen Immunsystem hauptsächlich zellulär entwickelt: Antigenpräsentierende Zellen, T-Lymphozyten und B-Zellen interagieren eng und führen dazu, dass die spezifische Immunantwort im Wesentlichen auf zwei Wegen zum Tragen kommt. Einerseits auf humoralem Wege, durch von B-Zellen produzierte, hochspezifische Antikörper, andererseits durch direkte Interaktion der T-Zellen. Durch die Entwicklung von sogenannten Gedächtniszellen ist das

Immunsystem weiterhin in der Lage, bei erneuter Konfrontation mit einem Pathogen deutlich schneller die spezifische Immunantwort zu initiieren. [1, 5, 6]

Durch die Interaktion von unspezifischem und spezifischem Immunsystem ist der menschliche Körper in der Lage, eine große Bandbreite an immunologischen Bedrohungen erfolgreich zu eliminieren. Das Zusammenspiel der einzelnen Zellen, Gewebe und Moleküle ist hochkomplex und bedarf einer ebenso komplexen Regulation, um stets die enge Balance zwischen Immuntoleranz und Autoimmunität zu wahren. [1, 5-7]

### 1.1.1 T-Zellen

T-Zellen spielen in der Immunabwehr sowie in der Pathogenese von chronischer Inflammation eine zentrale Rolle und stellen daher auch einen wichtigen therapeutischen Ansatzpunkt in der Behandlung von Autoimmunerkrankungen wie der RA dar. [8-10]

Als zentrale Toleranz bezeichnet man die Selektion der T-Zellen, die als unreife Vorstufen einer Reifung in Knochenmark und Thymus (daher auch die Bezeichnung als T-Zellen) unterliegen, wo ein Großteil der autoreaktiven T-Zellen erfolgreich eliminiert werden kann (Negativselektion).

Erst im Anschluss werden die Zellen ins periphere Blut ausgeschwemmt, wo sie hauptsächlich in der Blutbahn und dem Lymphsystem zirkulieren.

Während CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, sogenannte T-Killerzellen, Antigene, die an MHC I gekoppelt sind, erkennen und anschließend direkt zytotoxisch wirken, sind für die Pathogenese der RA vor allem die CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen entscheidend, deren Wirkung zytokinvermittelt abläuft.

Für die Aktivierung einer T-Helferzelle sind in der sogenannten Immunologischen Synapse generell zwei getrennte molekulare Signale notwendig: Die MHC II-gekoppelte Präsentation von Antigenen an den T-Zell-Rezeptor löst erst in Kombination mit einem zweiten Signal durch die Stimulation des CD28-Oberflächenmoleküls durch CD80/86 auf antigenpräsentierenden Zellen eine Aktivierung der T-Zellen aus. [11] Die Intensität der jeweiligen Molekülinteraktionen sowie die Stimulation durch Zytokine führen zur Differenzierung und klonalen Expansion der aktivierten, naiven T-Zelle in eine spezifische Effektor-T-Zell-Linie, die sich anhand des differenzierten Zytokinproduktionspatterns unterscheiden lassen. [12-15]

### 1.1.2 Regulatorische T-Zellen

Bereits in den 1970er Jahren wurde die These entwickelt, wonach neben den bekannten T-Effektorzellen auch bestimmte Zellreihen existieren sollten, die Immunreaktionen verhindern oder abmildern [16]. Diese wurden entsprechend ihrer vermuteten Funktion als T-Suppressorzellen bezeichnet [17]. Es wurden vielfältige Versuche unternommen, diese T-Suppressorzellen näher zu charakterisieren, allerdings gelang die klare, phänotypische oder genetische Beschreibung einer konkreten Zelllinie lange Zeit nicht, da v. a. keine Oberflächenantigene identifiziert werden konnten, die eine Abgrenzung dieser Suppressorzellen zuverlässig ermöglicht hätte.

Shimon Sakaguchi ist als wichtige Schlüsselfigur in der Erforschung der regulatorischen T-Zellen anzusehen [18]. Unter seiner Leitung konnte im Maus- und Rattenmodell gezeigt werden, dass eine subtotale Depletion der T-Zellen nicht – wie zunächst vermutet – der Entwicklung von



Autoimmunerkrankungen entgegenwirkt, sondern diese teilweise erst generiert [16, 19]. Daraus wurde die Folgerung abgeleitet, dass neben autoreaktiven T-Zellen auch die bereits zuvor vermuteten T-Zellen existieren mussten, die das autoreaktive Potential der restlichen T-Zellen begrenzen [20]. Da diese Zellen ihre Funktion durch diverse Mechanismen [21, 22] realisieren, beispielsweise über Zytokine wie TGF- $\beta$  oder IL-10 [23-25], direkte interzelluläre Interaktionen wie Fas/FasL-Signale [26], Verhinderung klonaler Expansion beziehungsweise Schaffung von anergen Zellen [27, 28], wurde die Nomenklatur als T-Suppressorzellen verlassen. Stattdessen etablierte sich der Begriff der regulatorischen T-Zellen (Tregs), der die modulierende Funktion der Zellen besser charakterisiert. Regulatorische T-Zellen unterdrücken nicht lediglich stereotyp Immunreaktionen, sondern steuern durch verschiedenste Interaktionen die Immunantwort vielmehr sehr präzise und unterliegen selbst diversen hochkomplexen Regulationsmechanismen [29, 30].

Elementar für die Erforschung der Tregs war es, die zu untersuchende Zellpopulation morphologisch von anderen T-Zellen zu isolieren und abgrenzen zu können. Dies gelang schließlich erstmals suffizient durch die Identifikation von CD25 (synonym IL2R $\alpha$  aufgrund der Bindung von IL2), einem GEF (Guanine nucleotide exchange Factor) als Oberflächenmarker [31]. Bei Transfer von CD25-depletierten T-Zellen in athymische Mäuse entwickelten diese serologisch wie klinisch diverse Autoimmunerkrankheiten, beispielsweise Thyreoiditis, Gastritis oder Arthritis. Durch Transfer der CD25<sup>+</sup>-Zellen konnte die Selbsttoleranz wiederhergestellt werden, was die zentrale Rolle der CD25<sup>+</sup>-Zellen für die Hemmung der T-Zell-Aktivierung im Sinne peripherer Immuntoleranz verdeutlicht. [19, 32]

Das CD25-Molekül allein erlaubt jedoch für sich genommen noch keine definitive Zuordnung der untersuchten Zellen zur Treg-Population, da eine Hochregulierung des CD25-Markers auch auf aktivierten T-Zellen gezeigt wurde, ebenso wie auch nicht alle Zellen mit regulatorischer Funktion CD25 exprimieren [33-36]. Dies machte die Identifikation eines weiteren, spezifischen Markers notwendig, der eine eindeutige Zuordnung der untersuchten Zellen als Treg leisten konnte. Als solcher wurde der Transkriptionsfaktor Forkhead-Box-Protein P3 (Foxp3, synonym Scurfin) identifiziert, der die Entwicklung der Treg-Zellen zentral reguliert, indem er die Expression von Proteinen ermöglicht, die zur Differenzierung zu Tregs nötig sind. In der Folge konnte auch gezeigt werden, dass genetische Polymorphismen von Foxp3 häufig mit autoimmunen Krankheiten vergesellschaftet sind. [37-47] Aufgrund der methodisch anspruchsvolleren Bestimmung des intrazellulären Foxp3 wird jedoch nach wie vor häufig experimentell der einfacher bestimmbare CD25-Oberflächenmarker herangezogen.

Verglichen mit gesunden Probanden zeigen Patienten mit Autoimmunerkrankungen für Tregs sowohl vergleichbare Absolutzahlen als auch im prozentualen Verhältnis zu anderen Zellpopulationen vergleichbare Häufigkeiten im peripheren Blut [48-50]. Dem entgegen steht jedoch die Beobachtung, dass Tregs in entzündeten Geweben sogar in höherer Anzahl anzutreffen sind [51], was als Indiz für eine ausreichende Anzahl, jedoch reduzierte Funktion der regulatorischen Zellen gedeutet wird. Die Tatsache, dass in RA eine solche eingeschränkte Funktion der Tregs nachgewiesen wurde, die durch TNF- $\alpha$ -Antagonisten wiederhergestellt werden konnte, zeigt außerdem sowohl die generelle Relevanz der Tregs in der Pathogenese der RA, andererseits aber darüber hinaus auch das therapeutische Potential in deren Erforschung. [50, 52, 53]

## 1.2 Posttranskriptionelle Modifikation der Proteinexpression durch microRNAs auf Tregs

### 1.2.1 microRNAs

MicroRNAs (synonym miRNA sowie miR) sind kurze, nichtcodierende RNAs mit einer Länge von durchschnittlich 22 Nucleotiden, die sowohl in Pflanzen als auch unterschiedlichsten Tierarten und dem Menschen evolutionär stark konserviert anzutreffen sind. Seit ihrer späten Entdeckung in den 1990er Jahren stehen sie zunehmend im Fokus aktueller Forschung, da sie an komplexen Steuerungsvorgängen in Differenzierung und Regulation verschiedenster Zellen und Gewebe beteiligt sind, indem sie spezifisch die Translation von mRNAs hemmen oder zu deren Spaltung führen und so eine entscheidende Rolle in der Feinregulation zellulärer Vorgänge spielen. [54, 55] Die Tatsache, dass Mäuse, bei denen das Dicer-Gen unterbrochen wurde, nicht lebensfähig sind, zeigt die Bedeutung der RNA-Regulation deutlich [56]. Es verwundert daher auch nicht, dass miRs bereits mehrfach als wichtige Modulatoren von Immunzellen und Tregs identifiziert werden konnten [57-59]. Die Tatsache, dass die Ablation von nur einem der beiden Enzyme Dicer oder Drosha, die an der miR-Prozessierung beteiligt sind, zu schwerer Autoimmunität führt, zeigt weiterhin, dass miRs für die Immuntoleranz von entscheidender Bedeutung sind [60]. Auch die Beeinflussung der Treg-Funktion durch RNA-Oligonukleotide ist bekannt [61]. Es konnte darüber hinaus auch nachgewiesen werden, dass miRs am Pathomechanismus von Autoimmunerkrankungen, auch der RA, beteiligt sind. [62-64]

Die Biogenese von miRs erfolgt durch Synthetisierung eines primären Transkripts, der polyadenylierten und gecappten pri-miR durch die RNA-Polymerasen II (und III). Die pri-miR wird durch anschließende Spaltung von der Endonuklease Drosha III zur pre-miR prozessiert und dann durch Ran-GTP und Export-Receptor Exportin-5 aus dem Nucleus transportiert. Die charakteristische Spaltung der pre-miR durch Drosha führt zur folgenden Weiterprozessierung durch die Endonuklease Dicer. Der bis hier doppelsträngige RNA-Strang wird nun von einer Helicase in die reife miR sowie die komplementäre miR\* aufgetrennt. Während die miR\* schnell abgebaut wird, gelangt die miR zum RNA-induced silencing complex (RISC), einem Ribonukleoproteinkomplex mit Argonautenprotein (Ago), durch den die miR biologisch aktiv wird. Durch den RISC erfolgt die Bindung der miRNA an 3'UTR (untranslated region) der komplementären mRNA, was zu deren Spaltung durch Endonukleasen oder alternativ zur translationalen Repression führt. [65]

Über diese biologischen Funktionen hinaus werden weitere regulatorische Aufgaben der miR, etwa auf DNA-Ebene, diskutiert. [65-68]

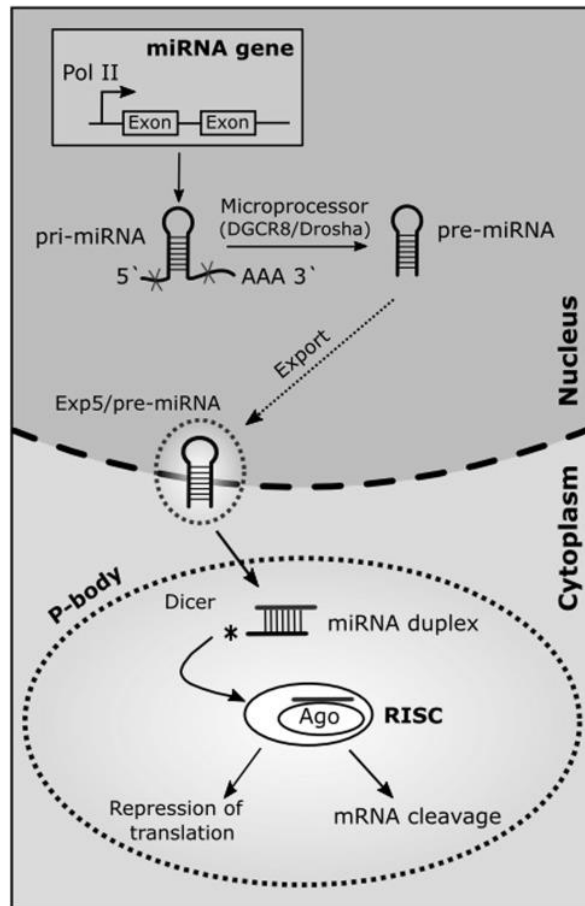


Abbildung 1: Biogenese von microRNAs [69]

### 1.2.2 GARP

Für einzelne miRs konnten spezifische immunmodulatorische Effekte nachgewiesen werden, beispielsweise wurde für die miR-142-3p gezeigt, dass sie die Expression von GARP über posttranskriptionelle Regulation verändern kann [55, 70].

Das GARP (Glycoprotein A repetitions predominant, LRR32, leucine-rich repeat-containing Protein 32) ist ein transmembranöses Glycoprotein, welches auf aktivierten regulatorischen T-Zellen, nicht jedoch auf den übrigen T-Zellen, exprimiert wird [71].

Da es darüber hinaus über Foxp3 zentral mit dem Aktivierungsgrad und der spezifischen Funktion der Tregs korreliert [72, 73], wird es als Oberflächen- und Aktivierungsmarker für regulatorische T-Zellen herangezogen [71, 74, 75]. Die biologische Funktion von GARP ist noch nicht gänzlich verstanden und daher Gegenstand derzeitiger Forschung. Bekannt ist jedoch, dass GARP an der Treg-Aktivierung beteiligt ist. Weiterhin spielt GARP bekanntermaßen eine wichtige Rolle für die immunsuppressive Funktion der Tregs [76]: Es ist nachweislich in der Lage, latentes TGF- $\beta$ 1 auf der Zelloberfläche zu binden, ist an der Freisetzung von TGF- $\beta$  beteiligt und interagiert mit Foxp3 im Sinne eines negativen Feedbackloops [70, 72-75, 77-83].

### 1.3 Die Rheumatoide Arthritis

„Was man nicht erklären kann, sieht man gern als Rheuma an“ [84], so wurde in der Vergangenheit häufig spöttisch über die Pathogenese von Krankheiten des rheumatischen Formenkreises berichtet. Die klinische Präsentation der Rheumatoiden Arthritis in ihrer heutigen Form existierte höchstwahrscheinlich bereits über die griechische Antike hinaus, wie historische Skelettfunde sowie Schriftquellen, u.a. aus der Schule von Sokrates, bestätigen [85-88]. Das oben genannte Zitat konnte dennoch erst durch die intensive Forschung der vergangenen Jahrzehnte und den damit einhergehenden Erkenntnisgewinn im Bereich der Biochemie und molekularen Medizin in weiten Teilen revidiert werden.



*Abbildung 2: Die Rheumatoide Arthritis fand, mutmaßlich aufgrund der hohen Prävalenz und charakteristischen klinischen Präsentation, auch Einzug in die Kunst. In Peter Paul Rubens "Die drei Grazien" (entstanden 1630-1635) sind Krankheitscharakteristika abgebildet, die bis heute als pathognomonisch für die Rheumatoide Arthritis gelten (Hand der Grazie links im Bild): Die Ulnardeviation des Handgelenks, Schwellungen in Form von „Rheumaknoten“ an MCP- und PIP-Gelenken und die sog. „Knopflochdeformität“. [89]*

Viele Grundlagen rheumatischer Erkrankungen gelten mittlerweile als bekannt und sind detailliert erforscht worden. Etliche Fragestellungen lassen sich jedoch auch mit dem derzeitigen Kenntnisstand nach wie vor nicht zufriedenstellend beantworten. Um chronische Inflammation und Autoimmunologie daher weiter zu erforschen, wurde für diese Dissertation exemplarisch die RA als häufige, prominente und prototypische Vertreterin der Krankheiten des rheumatischen Formenkreises ausgewählt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Fragestellung einer möglicherweise veränderten Expression von microRNAs (miR) und GARP-Protein auf regulatorischen T-Zellen (Tregs) in chronischer Inflammation am Beispiel der Rheumatoiden Arthritis zu erforschen. Außerdem wurde die miR im Serum der Patienten untersucht, um auch im Serum eine möglicherweise veränderte Expression nachzuweisen.

### 1.3.1 Epidemiologie

Die RA stellt mit einer weltweit vergleichbaren Prävalenz zwischen 0,5 % und 2 % der Bevölkerung eine häufige Erkrankung des rheumatischen Formenkreises dar, wobei Frauen etwa doppelt so häufig betroffen sind wie Männer. Es existiert darüber hinaus ein schwaches Nord-Süd-Gefälle in der Erkrankungshäufigkeit. [69, 90-93]

Durch moderne Behandlungsoptionen konnte in den letzten Jahren die Invalidität und die resultierende Anzahl der Frühberentungen gesenkt werden, jedoch ergeben sich gerade auch durch neue Therapien durchschnittliche jährliche Behandlungskosten von mehreren Tausend Euro pro Patient, was bei der gegebenen Prävalenz in der Bevölkerung die sozioökonomische Bedeutung der Erkrankung veranschaulicht [94]. Während die Gesamtkosten für RA in den zwei vergangenen Jahrzehnten auf vergleichbarem Niveau stagnierten, war eine deutliche Verschiebung der Kostenschwerpunkte zu beobachten: Insbesondere aufgrund der Nutzung von Biologicals (z.B. anti-TNF- $\alpha$ -Antikörpertherapie) in Kombination mit DMARD (disease-modifying antirheumatic drugs, v.a. Methotrexat) kam es zu einem Rückgang der Kosten von Arbeitsausfall, Invalidität und Hospitalisation, wogegen die Kosten der medikamentösen Therapie nun einen größeren Anteil an den Gesamtkosten einnehmen [95].

Eine familiäre Häufung der Erkrankungen konnte bereits früh empirisch nachgewiesen werden, allerdings ließen sich die zugrundeliegenden genetischen oder molekularen Mechanismen bis dato nicht abschließend aufklären. Obwohl der pathophysiologische Zusammenhang bisher noch nicht hergestellt werden konnte, gibt es Hinweise, dass genetische Faktoren im Bereich der Major Histocompatibility Complex II/ Human Leukozyte Antigen (MHC II/HLA) Antigene (insbesondere HLA-DRB1 und DR4) [96] Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit, an Rheumatoider Arthritis zu erkranken, nehmen [97, 98]. Darüber hinaus wurde bereits eine Korrelation zwischen RA-spezifischen Biomarkern und Polymorphismen in Genen für bestimmte immunmodulatorische Moleküle nachgewiesen [99].

### 1.3.2 Klinik, Diagnostik und Klassifikation

Die RA ist eine chronisch-entzündliche Systemerkrankung [100]. Obwohl einige, sehr charakteristische, klinische Manifestationen, wie die schmerzhafteste Schwellung der Metacarpophalangeal- (MCP) und Proximalen Interphalangealgelenke (PIP) allgemein bekannt sind und als pathognomonisch für das Vollbild der RA gelten, gestaltet sich die Diagnose, insbesondere zu Beginn der Erkrankung, teils schwierig und ermöglicht nicht immer schon bei der ersten ärztlichen Konsultation der Patienten bereits die eindeutige Diagnose. Nichtsdestotrotz müssen Anamnese und eine gründliche körperliche Untersuchung immer die Basis der Diagnosefindung bilden. [101]



*Abbildung 3: Klinische Präsentation der Hand einer 70-jährigen RA-Patientin. Bereits bei der Inspektion imponiert eine milde Ulnardeviation des Handgelenks, sowie „Rheumaknoten“. Dominierend ist der Befall der PIP- und MCP-Gelenke. Das Befallsmuster ist pathognomonisch, nachdem die DIP-Gelenke nicht affiziert sind [102].*

Da gerade eine frühzeitige korrekte Diagnose und Therapie für die Patienten prognosebestimmend sind, liegt ein immer stärkeres Augenmerk auf der Frühdiagnostik der RA. Die 1987 beschriebenen Diagnosekriterien der American Rheumatism Association (ARA)/American College of Rheumatology (ACR) [103] wurden daher 2010 von den neuen Klassifikationskriterien der Kooperationsinitiative von ACR und EULAR [104, 105] (European League Against Rheumatism) abgelöst. Diese neuen Kriterien wurden in einem dreistufigen Konzept erarbeitet: Ausgehend von Patientenkohorten wurde zunächst versucht, Kriterien abzuleiten, aufgrund derer erfahrene Kliniker die Diagnose einer RA stellen konnten, um daraufhin eine Methotrexat-Behandlung einzuleiten [106]. Anschließend wurde nach Konsensfindung die Entwicklung eines Scoring-Systems vorangetrieben, um Patienten, die für die Entwicklung schwerer und insbesondere erosiver Verläufe prädisponiert sind, frühzeitig zu identifizieren [104].

Die neuen Diagnosekriterien der RA finden Anwendung auf Patienten, die sich mit neu aufgetretener Synovitis, also der schmerzhaften Schwellung mindestens eines Gelenks, vorstellen und dabei keine wahrscheinlichere Erklärung für die Symptomatik bieten. Es wird so der oben bereits erwähnte Score berechnet, der sich aus den Einzelpunktwerten aus vier Kategorien zusammensetzt: Der Anzahl betroffener Gelenke, serologischer Marker, der Akute-Phase-Reaktion sowie der Symptombdauer des Patienten. Wird ein Gesamtscore von 6 oder mehr der maximal 10 Punkte erreicht, so kann die Diagnose der RA-Arthritis gestellt werden [105]. Tabelle 1 zeigt die Klassifikationskriterien aus den Jahren 1987 und 2010 im direkten Vergleich:

<b>ARA/ACR 1987 [103]</b>	
1. Morgensteifigkeit:	
- mindestens eine Stunde	
- länger als sechs Wochen bestehend	
2. Arthritis in drei oder mehr Gelenkregionen:	
- MCP, PIP, MTP, Hand-, Ellbogen-, Knie-, Sprunggelenk	
- länger als sechs Wochen bestehend	
3. Arthritis an Hand- oder Fingergelenken	
- Befall mindestens eines Handgelenks, MCP oder PIP	
- länger als sechs Wochen bestehend	
4. Symmetrische Arthritis	
- gleichzeitig bestehend, beidseitig gleiche Gelenkregion	
- länger als sechs Wochen bestehend	
5. Rheumaknoten (subkutane Knoten über Knochenvorsprüngen/ gelenknahen Streckseiten)	
6. Rheumafaktornachweis (Methode mit < 5 % positivem Nachweis in gesunder Kontrollgruppe)	
7. Radiologische Veränderungen (gelenknahe Osteopenie/Erosionen)	
<b>Mindestens 4 von 7 Kriterien</b>	

<b>ACR/EULAR 2010 [105]</b>	
A. Gelenkbeteiligung	
- 1 großes Gelenk	0
- 2-10 große Gelenke	1
- 1-3 kleine Gelenke (unabhängig von großen Gelenken)	2
- 4-10 kleine Gelenke (unabhängig von großen Gelenken)	3
- > 10 Gelenke mit mindestens einem kleinen Gelenk	5
B. Serologie	
- Negativer RF UND negative ACPA	0
- Niedrig positiver RF oder niedrig positive ACPA	2
- Hoch positiver RF oder hoch positive ACPA	3
C. Akute-Phase-Reaktion	
- Normales CRP UND normale ESR	0
- Abnormales CRP oder abnormale ESR	1
D. Dauer der Symptome	
- < 6 Wochen	0
- ≥ 6 Wochen	1
<b>mindestens 6/10 Punkten</b>	
<b>keine wahrscheinlichere Erklärung für Synovitis (Ausschlussdiagnose)</b>	
<b>mindestens ein Gelenk weist klinisch Synovitis auf</b>	

Tabelle 1: Vergleich der ARA/ACR Klassifikationskriterien aus dem Jahr 1987 und den aktuell gültigen Klassifikationskriterien der ACR/EULAR Kooperation 2010

Bereits aus den Diagnosekriterien wird daher klar, dass die RA nicht als reine Gelenkerkrankung verstanden werden darf, sondern immer als generalisierte chronisch-entzündliche Krankheit betrachtet werden muss. Diese entfaltet ihre Hauptmanifestation in der Synovia, was im Krankheitsverlauf zu einer progressiven, zellgetragenen Gelenkzerstörung führt. Dieses Krankheitsverständnis bildet die Grundlage der heutigen Diagnostik sowie die Grundvoraussetzung der vorliegenden Arbeit, da alle Experimente an Blutproben durchgeführt wurden anstatt an Synovialgewebe mit der damit verbundenen erheblich invasiveren Probengewinnung. [100]

### 1.3.3 Prognose

Die Prognose der RA allgemein zu umreißen ist kaum möglich. Sowohl das Patientengut als auch die Schwere der Erkrankung bei Diagnosestellung weisen deutliche interindividuelle Unterschiede auf. Gemeinsam ist allen Erkrankten jedoch, dass die Patienten unbehandelt aufgrund der chronischen Synovitis im Krankheitsverlauf schwere Gelenksdeformitäten entwickeln, die bis zum kompletten Funktionsverlust der Gelenke und damit einhergehender Invalidität führen. [107]

Entscheidend für das Verständnis der RA ist jedoch, die RA als systemisch-inflammatorische Erkrankung anzusehen und nicht als lokale Gelenkerkrankung zu begreifen, was anhand einiger Komorbiditäten deutlich wird: Im Vergleich zur Normalbevölkerung haben Patienten mit RA eine um mindestens 50 % höhere Mortalität [108-110]. Man führt dies auf vermehrte kardiovaskuläre Ereignisse [110], insbesondere Herzinfarkte oder Schlaganfälle, aber auch Herzklappenveränderungen oder Rhythmusstörungen, zurück. Der Grund hierfür wird in der Summation allgemeiner sowie RA-spezifischer kardiovaskulärer Risikofaktoren gesehen, deren Zusammenwirken vielfältig sein dürfte und noch nicht gänzlich geklärt ist. Neben verminderter endothelialer Regeneration wird beispielsweise auch eine Redoximbalance im Zuge der generalisierten Inflammation für die relative Risikosteigerung verantwortlich gemacht. [108, 109, 111] Verantwortlich könnten hier im systemischen Kontext ähnliche Mechanismen sein, die lokal auch zur Synovitis und Gelenkdestruktion führen: Aus einer Mischung aus Prädisposition, genetischen Faktoren, Umwelteinflüssen und noch unbekanntem Einflüssen entsteht ein inflammatorisches Milieu aus Enzymen, Chemokinen und Zytokinen, die schließlich über die Ausschüttung von TNF- $\alpha$  und Interleukinen die Aktivierung von T-Zellen, sowie in geringerem Umfang auch von B-Zellen, initiieren und so eine systemische Inflammation generieren.

Sowohl für die Morbidität als auch die Mortalität der Patienten gilt heute jedoch, dass sich ein früher Therapiebeginn mit DMARD oder TNF- $\alpha$ -Antagonisten prognoseverbessernd auf den Verlauf der Erkrankung auswirkt [112, 113].

Doch nicht nur kardiovaskuläre Komorbiditäten werden bei RA beobachtet, die Patienten leiden beispielsweise unter anderem auch in bis zu 42 % der Fälle an einer Depression [114]. Neben RA-unabhängigen Faktoren wie dem Geschlecht oder sozioökonomischem Status der Patienten konnten auch krankheitsspezifische Charakteristika wie Schmerzintensität, der funktionelle Status oder Remission mit dem Auftreten und Schweregrad der Depressionen korreliert werden [114]. Auch die Tatsache, dass es sich bei RA zum aktuellen Zeitpunkt zwar um eine effektiv behandelbare, jedoch faktisch nicht heilbare Erkrankung handelt, trägt zur psychischen Belastung der Patienten bei.

Ob die Entstehung psychischer Komorbiditäten ebenfalls kausal auf die generalisierte Inflammationsreaktion der RA zurückzuführen ist, ist bisher noch nicht geklärt. Der hohe Leidensdruck der Patienten zeigt jedoch umso mehr die Notwendigkeit einer möglichst frühen Diagnose und adäquaten Therapie, um Morbidität, Mortalität und Komorbiditäten der RA effektiv zu senken.



## 1.4 Fragestellung

### 1.4.1 Fragestellung und Zielsetzung

Die Pathogenese von chronischer Inflammation und Autoimmunerkrankungen wie der RA ist komplex und noch nicht in allen Details zufriedenstellend geklärt. Ziel dieser Dissertation war es daher, bezüglich dreier Fragestellungen einen Beitrag zum besseren Verständnis von Inflammation am Beispiel der Krankheit RA zu leisten sowie potenzielle diagnostische oder therapeutische Targets zu identifizieren.

#### **Hypothese 1: Patienten mit RA zeigen im Vergleich zur gesunden Bevölkerung eine veränderte Expression von miRs in T-Zellen.**

Die Beteiligung von miRs als Modulatoren der Feinregulierung von Immunzellen, insbesondere auch in Tregs, konnte bereits mehrfach nachgewiesen werden [55, 57, 60]. In diesem Zusammenhang wurden bei Patienten mit chronischer Inflammation durch Autoimmunerkrankungen mehrere miRs in T-Zellen beschrieben, die im Vergleich zu gesunden Populationen aberrante Expression aufweisen [69, 115-121]. MiRs können die Expression von Proteinen, z.B. GARP, posttranskriptionell beeinflussen [70]. Immunzellen sind auf eine balancierte Expression von Transkriptionsfaktoren und miRs angewiesen, um ihre Reifung durchlaufen zu können und dadurch normale Funktion zu erlangen [122]. Ein plausibler Erklärungsansatz für die Fehlregulation von Immunzellen im Rahmen autoimmuner Erkrankungen ist daher, dass wichtige Oberflächen- und Signalproteine sowie Rezeptoren aufgrund eines krankheitsbedingt fehlregulierten miR-Expressionsmusters in der Folge ebenfalls fehlreguliert werden. MiRs dürften so eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Erkrankungen spielen. In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Expression der miR-142-3p, miR-146a, miR-155 und miR-223 in CD25<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup> und CD25<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>-T-Zellen untersucht, nachdem diese miRs in der wissenschaftlichen Literatur bereits mehrfach, insbesondere in T-Zellen, im Zusammenhang mit chronischer Inflammation und autoimmunen Erkrankungen beschrieben wurden [70, 117, 123-136]. In dieser Arbeit wurde die Expression von miRs bei RA-Patienten mit einer gesunden Kontrollgruppe verglichen.

#### **Hypothese 2: Patienten mit RA zeigen im Vergleich zur gesunden Bevölkerung eine veränderte Expression von Serum-miRs (miRs im Serum).**

Wie bereits unter Hypothese 1 angeführt, sind miRs wichtige Modulatoren in der Immunregulation. Die intrazelluläre Bestimmung von miRs ist jedoch technisch aufwändig und daher kostenintensiv. Auch extrazellulär sind miRs in Serum und Plasma nachweisbar [137]. Im Falle eines veränderten Expressionsmusters von miRs im Serum von RA-Patienten wäre daher aufgrund der einfachen Probengewinnung gegebenenfalls die diagnostische Anwendung der Serum-miR-Bestimmung denkbar. In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Expression der miR-142-3p, miR-146a, miR-155 sowie miR-223 im Serum von RA-Patienten und gesunden Kontrollen untersucht.

#### **Hypothese 3: Patienten mit RA zeigen im Vergleich zur gesunden Bevölkerung eine veränderte Expression von GARP als Aktivitätsmarker auf Tregs.**

Es ist bekannt, dass das GARP einen Aktivierungsmarker auf Tregs darstellt [71, 74, 75]. Dass Tregs trotz der chronischen Immunaktivierung bei RA-Patienten in normaler Frequenz und normalen Absolutzahlen nachgewiesen werden konnten [48-50], spricht für eine funktionelle Insuffizienz der Tregs. Um diesen Zusammenhang zu untersuchen, wurde die Expression von GARP als Aktivierungsmarker der Tregs auf CD25<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup> und CD25<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>-T-Zellen gemessen. Hierbei wurden Zellen von RA-Patienten und einer gesunden Vergleichspopulation verglichen.

1.4.2 Versuchsaufbau

Um die drei beschriebenen Hypothesen zur Expression der untersuchten miRs in den Zellen, im Serum sowie der GARP-Expression auf den Zellen zu testen, wurde an Versuchstag 0 (d0) sowohl gesunden Probanden (HC) als auch Patienten mit neu diagnostizierter und unbehandelter RA Vollblut sowie Serum entnommen.

Aus der Serumprobe wurden miRs direkt isoliert und quantifiziert.

Aus dem Vollblutmaterial wurden durch Zellisolation CD4<sup>+</sup>-, CD25<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>- sowie CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellen extrahiert. Diese Zellpopulationen wurden im Anschluss über insgesamt 48 h in Zellkultur stimuliert, um ein inflammatorisches Milieu zu simulieren und damit Aussagen zum funktionellen Verhalten der Zellen treffen zu können.

Bei Versuchsbeginn (d0), nach 24 h (d1) sowie nach 48 h (d2) Stimulation wurden Zellproben asserviert. Diese Proben wurden jeweils auf die Expression von GARP mit Hilfe einer FACS-Untersuchung analysiert. Darüber hinaus wurde aus CD25<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>- und CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellen jeweils miR isoliert und quantifiziert.

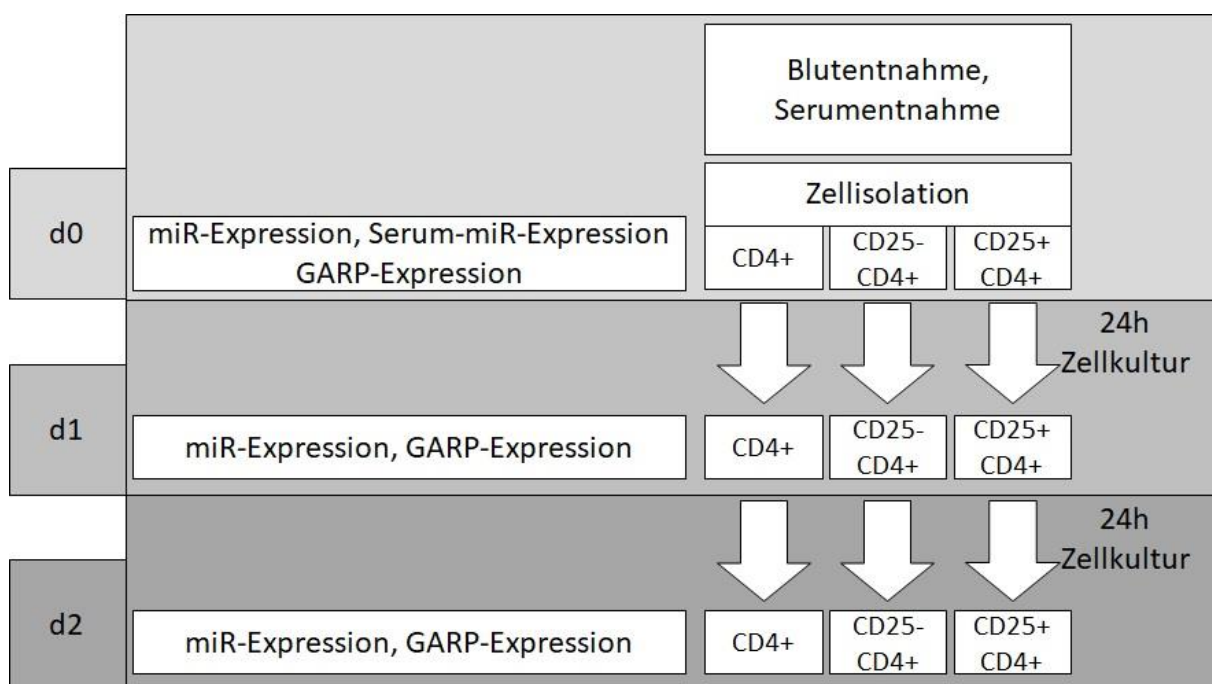


Abbildung 4: Versuchsaufbau

Abbildung 4 gibt den Versuchsaufbau grafisch wieder, Details zu den verwendeten Methoden sind dem nachfolgenden Material- und Methodenteil zu entnehmen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Reagenzien

1 kbp GeneRuler DNA ladder	Fermentas/ThermoFisher, USA
100 bp GeneRuler DNA ladder	Fermentas/ThermoFisher, USA
Agarose	Merck, Deutschland
AMV Reverse Transkriptase	Promega, USA
Ampicillin	Life Technologies, USA
BSA	Merck, Deutschland
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, USA
Chloroform	Merck, Deutschland
CD4, Human-T Zell Isolationskit II	Miltenyi Biotech, Deutschland
CD25, Human, MicroBeads II	Miltenyi Biotech, Deutschland
dNTP 100 mM	Life Technologies, USA
dNTP Mix 10 mM	Life Technologies, USA
EDTA	Sigma-Aldrich, USA
Essigsäure	Merck, Deutschland
Ethanol	Merck, Deutschland
FCS	Life Technologies, USA
Ficoll	Biotest, Deutschland
HCl (37 %)	Merck, Deutschland
Heparin-Na	Ratiopharm, Deutschland
human T-activator CD3/CD28 Dynabeads	Life Technologies, USA
IL-2 (rekombinant)	Chiron, USA
Isopropanol	Merck, Deutschland
L-Glutamine	Life Technologies, USA
Methanol	Sigma-Aldrich, USA
NH <sub>4</sub> Cl	Sigma-Aldrich, USA
NHS	Rheumaforschungslabor KUM, Deutschland
Oligo-dT <sub>12-18</sub>	GE Healthcare, England
PBS-Puffer	Life Technologies, USA
Penicillin G/Streptomycin	Life Technologies, USA
RPMI 1640	Life Technologies, USA
SDS	Merck, Deutschland
SRBC	Fiebig-Nährstofftechnik, Deutschland
SYBR safe DNA gel stain (10000x)	Life Technologies, USA
TaqMan universal PCR master mix 2x	Life Technologies, USA
TRIS	Merck, Deutschland
Oligo dT <sub>12-18</sub>	GE Healthcare, England

### 2.2 KITS

miRNeasy Serum/Plasma Kit	Qiagen, Deutschland
AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit	Agilent Technologies, USA
TaqMan Gene Expression Assay	Life Technologies, USA
TaqMan MicoRNA Assay	Life Technologies, USA

### 2.3 Medien und Pufferlösungen

0,5 M EDTA	46,52 g EDTA + Titration auf pH = 8 mit NaOH In 250 ml dest. H <sub>2</sub> O (Lagerung: Raumtemperatur)
1x NH <sub>4</sub> Cl	Verdünnung 1 : 10 der Stammlösung (10x NH <sub>4</sub> Cl) (Lagerung: 4 °C)
10x NH <sub>4</sub> Cl	41,45 g NH <sub>4</sub> Cl + 5 g KHCO <sub>3</sub> + 1 ml 0,5 M EDTA Lsg. In 500 ml dest. H <sub>2</sub> O (Lagerung: 4 °C)
10 % NaN <sub>3</sub>	5 g NaN <sub>3</sub> In 50 ml dest. H <sub>2</sub> O (Lagerung: 4 °C)
50x TAE (TRIS-Acetat-EDTA-Puffer)	50 ml 0,5 M EDTA + 28,6 ml Essigsäure + 121 g TRIS-Base In 500 ml dest. H <sub>2</sub> O
FACS-Puffer	490 ml PBS + 10 ml FCS + 0,5 ml 10 % NaN <sub>3</sub> (Lagerung: 4 °C)
MACS-Puffer	500 ml PBS + 2,5 g BSA + 2 ml 0,5M EDTA (Lagerung: 4 °C)
RPMI-P/S-L-Gln	RPMI 1640 + 10 Vol % FCS + Penicillin G (50 U/ml) + Streptomycin (50 µg/ml) + L-Glutamin (2 mmol/l) (Lagerung: 4 °C)

## 2.4 Antikörper

Sofern nicht gesondert angegeben, wurden monoklonale Antikörper verwendet.

anti-CD3-FITC/CD4-PE DUAL TAG	UCHT-1/Q4120	Sigma-Aldrich, USA
anti-CD4-FITC	UCHT-1	Sigma-Aldrich, USA
anti-CD25-FITC	MEM-181	Sigma-Aldrich, USA
anti-CD25-PE	M-A251	PD Pharmingen, USA
anti-human GARP	7H2	Helmholtz Zentrum München, Deutschland
Ratten-IgG	polyklonal	Sigma-Aldrich, USA
Ziege-anti-Ratten-IgG(H+L)-PE	polyklonal	Dianova, Deutschland

## 2.5 Geräte

Durchflusszytometer	Cytomics FC500	Beckmann Coulter, USA
Thermocycler	9800 Fast Thermal Cycler	Life Technologies, USA
Photometer	Eppendorf BioPhotometer	Eppendorf, Deutschland
Real-Time PCR	7500 Fast Real-Time PCR	Life Technologies, USA
UV-Kamera	UVT-28MP transilluminator	Herolab, Deutschland
Zentrifuge	ROTIXA 50 RS	Hettich, Deutschland

### 2.6 Einschluss der Versuchspersonen

Sowohl Patienten (RA) als auch gesunde Probanden (HC) wurden ausführlich über Inhalt, Ziel und Durchführung der Studie unterrichtet und willigten schriftlich in Blutabnahme sowie die Teilnahme an der Studie ein. Sie wurden auch über die Möglichkeit zum nachträglichen Ausscheiden aus der Studie unterrichtet. Für die Studie bestand ein positives Votum (Projekt Nr. 303-06) der Ethikkommission des KUM (Universitätsklinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München), das vor Beginn der experimentellen Versuchsphase eingeholt worden war.

Der gesamte experimentelle Teil des Promotionsprojektes (inclusive Patientenakquise, aller Laborversuche und Analysen) erfolgte im Zeitraum von Februar 2012 bis Juli 2013 im Rheumaforschungslabor der Rheumaeinheit des KUM unter Aufsicht von Prof. Dr. med. Schulze-Koops und PD Dr. rer. nat. Dr. habil. med. Alla Skapenko.

Alle Proben sowie die erhobenen Daten wurden pseudonymisiert verarbeitet und ausgewertet.

Es wurden ausschließlich Patienten der Rheumaeinheit des KUM in die Studie aufgenommen, bei denen eine RA neu diagnostiziert wurde (n = 18).

Einschlusskriterium für die Studie waren die aktuellen ACR/EULAR-Kriterien zur Klassifikation der RA aus dem Jahr 2010 [105], wobei Patienten mit einem Punktescore von 6 oder höher in die Studie aufgenommen wurden. Darüber hinaus wurden auch Patienten eingeschlossen, bei denen trotz niedrigerem Score von erfahrenen klinischen Rheumatologen die Diagnose einer RA gestellt und eine Therapie mit Methotrexat initiiert wurde.

Bereits primär ausgeschlossen wurden Patienten aus der Studie, die zum Zeitpunkt der Diagnosestellung schon medikamentöse Dauertherapie erhalten hatten (z.B. hausärztliche Dauermedikation mit NSAR, Glucocorticoiden, rheumatologischen Basistherapeutika oder sonstige Dauermedikation aufgrund nicht-rheumatischer Indikation). Nicht-regelmäßige Selbstmedikation (z.B. mit niedrig dosierten NSAR) wurde toleriert, ebenso Patientinnen mit hormoneller Kontrazeption als einziger Dauermedikation.

Am Ende der Datenerhebung wurden die Patientenakten erneut geprüft und dabei nachträglich sämtliche Patienten aus der Studie ausgeschlossen, bei deren Einschluss die ACR/EULAR-Kriterien ursprünglich erfüllt gewesen waren, im klinischen Follow-up jedoch eine wahrscheinlichere Differentialdiagnose für die Symptome gefunden wurde (n = 7, z.B. bis dahin unentdeckte maligne Grunderkrankung). Ebenso wurden hier alle Patienten ausgeschlossen, bei denen sich nachträglich zeigte, dass die Einschlusskriterien bei Probenentnahme primär nicht erfüllt worden waren (n = 2, z.B. bei Rekrutierung verschwiegene Dauermedikation).

Außerdem wurden bei der Kontrolle der Patientenakten neben epidemiologischen Parametern auch klinische Parameter wie Entzündungsparameter, Erkrankungsdauer oder VAS (visuelle Analogskala zur Schmerzbeurteilung) erfasst. Anhand der erhobenen Daten wurde auch der DAS28-Score zur Einschätzung der Krankheitsaktivität mit Hilfe eines Onlinetools berechnet [138]. Wurden Laborwerte oder Scores mehrfach bestimmt (z.B. Doppelbestimmung des DAS28 mit ESR- und mit CRP-Wert), so wurde stets der höhere Punktwert angegeben [139].

Adaptiert an das Patientenkollektiv (RA) wurde versucht, eine Kontrollgruppe aus gesunden Erwachsenen (HC) zu bilden, die anhand der demographischen Parameter Alter und Geschlecht möglichst exakt mit dem Patientenkollektiv gematched wurde (n = 27).

## 2.7 Zellisolation

Die Zellisolation von CD4<sup>+</sup>-, CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>- und CD25<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellen wurde in vier Teilschritten realisiert: Der Isolation von PMBCs (peripheral blood mononuclear cells), der Rosettierung der T-Lymphozyten, anschließender Negativselektion von CD4<sup>+</sup>- und CD25<sup>-</sup> sowie Positivselektion der CD25<sup>+</sup>-Zellen.

### 2.7.1 PBMC-Isolation

Den RA-Patienten sowie HC-Spendern wurde Vollblut entnommen, das durch Heparinzusatz antikoaguliert wurde. Je 20 ml heparinisiertes Vollblut wurden mit 20 ml PBS-Lösung gemischt, anschließend vorsichtig 10 ml Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer als Separationsmedium (Ficoll-Lösung) unter die Zelllösung geschichtet. Es schloss sich eine Zentrifugation (1300 rpm, 20 min mit freiem Auslaufen der Zentrifuge, Raumtemperatur = RT) an, um die natürliche Dichtegraduierung der Blutbestandteile zu beschleunigen. Aufgrund der spezifischen Dichte und der hydrophilen Eigenschaften des verwendeten Separationsmediums kommt dieses nach der Zentrifugation zwischen den Erythrozyten und der PBMC-Fraktion zu liegen und verbessert so die Trennschärfe zwischen den Blutbestandteilen. Die PBMC-Fraktion konnte so als dünne Zellschicht über der Ficoll-Lösung im Blutplasma isoliert werden. Dieser dünne Leukozytenring wurde möglichst vollständig und vorsichtig abpipettiert und auf neue Probenröhrchen übertragen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (1750 rpm, 5 min, RT), Absaugen des Überstandes und Resuspension in 50 ml PBS-Lösung gewaschen. Anschließend erfolgte zur späteren Reinheits- und Qualitätskontrolle die Entnahme von  $0,2 \times 10^6$  Zellen.

### 2.7.2 Rosettierung

Die so gewonnenen Zellen wurden im Anschluss in RPMI-P/S-L-Gln-Medium auf eine Konzentration von  $10 \times 10^6$  Zellen/ml resuspendiert. Zu je 8 ml der so gewonnenen Lösung wurden jeweils 4 ml SRBC-Präparat sowie FCS-Lösung zugegeben und die Mischung anschließend im Wasserbad bei 37 °C über 10 min unter leichtem Schwenken inkubiert. Nach Zentrifugation (1040 rpm, 10 min, RT) wurden die Proben für 30 min bei 4 °C gelagert. Es folgte die Resuspension der zentrifugierten Zellen sowie eine erneute Dichteseperation der Zellen. Hierfür wurde wie oben bereits beschrieben erneut 10 ml Ficoll-Lösung vorsichtig in die Probe einpipettiert und im Anschluss (1300 rpm, 20 min mit freiem Auslauf der Zentrifuge, RT) zentrifugiert.

Die Ficollschicht wurde vorsichtig abgenommen, nachdem zuvor die Rosetting-negativen Zellen, die sich oberhalb dieser Schicht gesammelt hatten, entnommen worden waren. Übrig blieben so ausschließlich die Aggregate von Rosetting-positiven Zellen und Schafserythrozyten. Aus diesen wurden die Schafserythrozyten durch Lyse mittels hypertoner 1x NH<sub>4</sub>Cl-Lösung extrahiert. Daraufhin wurden die nun aufkonzentrierten, osmotisch resistenteren T-Lymphozyten gewaschen (Vorgehen zum Waschen der Zellen, s. o.). Sofern das verbliebene Zellpellet nach der Zentrifugation noch rötlich gefärbt war, wurde die hypertone Lyse wiederholt. [140]

### 2.7.3 MACS-Negativselektion der CD4<sup>+</sup>-Zellen

Für die Selektion der CD4<sup>+</sup>-Zellen wurde das MACS-Verfahren gemäß Herstellerangaben (Milteniy Biotech) angewendet. Hierbei setzt man magnetische Beads ein, die an zellgebundene Antikörper binden, so indirekt Aggregate mit den entsprechenden Zellen bilden und diese magnetisch markieren. Beim Durchlauf durch spezielle MACS-Separationsröhren in einer starken Magnetleiste werden die an Magnetbeads gebundenen Zellen zurückgehalten und so von den restlichen Zellen getrennt.

Hierfür wurden die Zellen in MACS-Pufferlösung auf eine Konzentration von  $0,25 \times 10^6$  Zellen/ $\mu$ l verdünnt und mit 1  $\mu$ l/Mio Zellen biotinmarkierten Antikörper-Cocktails inkubiert, welcher während 10-minütiger Inkubation bei 4 °C an Oberflächenantigene von Nicht-CD4-Zellen bindet. Die Ankopplung an die Magnet-Beads geschah durch erneute, 15-minütige Inkubation bei 4 °C, wobei die antikörpergekoppelten, biotinmarkierten Zellen an die oberflächenständigen anti-Biotin-Antikörper der Magnetbeads binden. Alle für die Magnetseparation verwendeten MACS-Säulen wurden vor Benutzung mit MACS-Pufferlösung angefeuchtet. Die Aggregate aus Beads und Zellen wurden erneut gewaschen und zentrifugiert (1750 rpm, 5 min, RT), im Anschluss in MACS-Puffer aufgeschwemmt und auf die LS-MACS-Säulen verteilt (max.  $10^8$  Zellen pro Säule). Jede Säule wurde nach Durchlauf der Zellsuspension dreifach mit MACS-Puffer nachgespült, um eine möglichst hohe Zellausbeute bei ausreichend hoher Reinheit zu erreichen, welche direkt durch Zellzählung sowie Entnahme von  $0,2 \times 10^6$  Zellen zur Qualitätskontrolle überprüft wurden, hierbei zeigten sich üblicherweise mehr als 90% der Zellen CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>. Es wurden darüber hinaus  $1,2 \times 10^6$  CD4<sup>+</sup>-Zellen für die spätere Zellkultur entnommen.

### 2.7.4 MACS-Negativselektion der CD4<sup>+</sup>- und CD25<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellen

Die Isolierung von CD25<sup>-</sup>-Zellen erfolgte analog zur CD4<sup>+</sup>-Isolierung anhand des MACS-Verfahrens. Die gewaschenen und zentrifugierten (1750 rpm, 5 min, RT) Zellen wurden erneut wie im vorherigen Schritt in MACS-Puffer gelöst ( $90 \mu$ l/ $10 \times 10^6$  Zellen), jedoch nun nicht durch einen biotinvermittelten Zwischenschritt, sondern direkt durch oberflächenständige anti-CD25-Antikörper auf den Microbeads ( $10 \mu$ l/ $10 \times 10^6$  Zellen) gebunden. Die Inkubation erfolgte über 15 min bei 4 °C. Im Anschluss wurden die Zellen, wie bereits oben beschrieben, gewaschen und zentrifugiert (1750 rpm, 5 min, RT). Nun erfolgte auch hier die Auftrennung der Zellen im Magnetfeld, jedoch wurden im Gegensatz zur CD4<sup>+</sup>-Isolation MS-Separationssäulen verwendet. Der gesammelte Durchfluss der Zellsuspension und Spülung wurde, um auch letzte CD25<sup>-</sup>-Zellen sicher abzuscheiden, erneut über einer LS-MACS-Säule im Magnetfeld filtriert, wodurch eine stark aufgereinigte CD25<sup>-</sup>-Zellsuspension erreicht werden konnte. Die Reinheit der gewonnenen Zellen wurde durch FACS kontrolliert, üblicherweise waren  $\geq 95$  % der gewonnenen Zellen CD25<sup>-</sup>.



### 2.7.5 MACS-Positivselektion der CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellen

Durch Positivselektion blieben die CD25<sup>+</sup>-Zellen, an welche die Microbeads gebunden hatten, im magnetischen Feld in den MACS-Separationsröhren zurück. Nach mindestens dreifacher Spülung der Säulen mit je 500 µl MACS-Puffer wurden die Säulen aus dem Magnetfeld entfernt und die positiv selektierten Zellen aus der Säule extrahiert, indem 1 ml MACS-Puffer mit Hilfe eines speziellen Stempels durch die Säulen gepresst wurde. So konnten die konzentrierten CD25<sup>+</sup>-Zellen aus der Säule gelöst und in Lösung gebracht werden. Ebenso wie bei den CD25<sup>-</sup>-Zellen wurden auch hier Proben für die spätere Reinheitskontrolle mit Hilfe von Durchflusszytometrie gewonnen, welche einen Anteil von mehr als 85 % CD25<sup>+</sup>-Zellen zeigte.

## 2.8 Zellkultur

Als Medium für die Zellkultur wurde RPM-P/S-L-Gln-Lösung unter Zugabe von 10-Vol. % NHS (gepooltes, humanes Normalserum) verwendet.

Um ausreichend Material für die späteren Untersuchungen auf DNA- und RNA-Ebene zu erhalten, wurden die Zellen im Verhältnis 4 : 2 : 1 für die Versuchstage 0, 1 und 2 aufgeteilt. Die Zellen für Versuchstag 0 wurden nach Zentrifugation und Absaugen des Überstands bei -80 °C gelagert, um relevante enzymatische Abbauvorgänge zu minimieren.

Die CD4<sup>+</sup>-, CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>- sowie die CD25<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellen, die für die Zellkultur an d1 und d2 vorgesehen waren, wurden nun zentrifugiert und die Überstände verworfen. Im Anschluss wurden die Zellen im oben genannten Medium auf eine Konzentration von  $0,5 \times 10^6$  Zellen/ml resuspendiert.

Zur Stimulation der T-Zellen wurde ein Mastermix verwendet, in dem magnetische Beads mit oberflächenständigen anti-CD3/CD28 sowie IL-2 im Zellkulturmedium gelöst wurden. Die Lochplatten für die Zellkultur wurden bestückt, indem zuerst der Mastermix auf alle Wells verteilt wurde und anschließend im Volumenverhältnis 1 : 1 die Zelllösung zugegeben wurde.

Die Zellen wurden auf eine Gesamtkonzentration von  $0,5 \times 10^6$  Zellen/ml in Anwesenheit der anti-CD3/CD28-Magnetbeads (im Verhältnis Zellen: Beads = 1 : 1) sowie 100 U/ml rekombinantes IL-2 kultiviert. Die Zellkultur wurde über 48 Stunden im Inkubator in einer CO<sub>2</sub>-haltigen (5 Vol. % CO<sub>2</sub>) Atmosphäre bei 37 °C und hoher Luftfeuchtigkeit realisiert.

Nach 24 und 48 Stunden erfolgte die Probenentnahme für d1 und d2 in gleicher Weise. Dafür wurden jeweils die Proben durch kräftiges Auf- und Abpipettieren aufgeschwemmt, um die Bindung der Zellen an die Magnetbeads zu lösen und die Lösung anschließend in neue Reaktionstubes überführt. Um den Zellverlust zu minimieren, wurden die Lochplatten mit PBS nachgespült und die Spüllösung ebenfalls in die Tubes übertragen. Diese wurden nun einem starken Magnetfeld ausgesetzt, um die Beads am Magneten zu konzentrieren und die Zellen vorsichtig in neue Tubes überführen und mit PBS waschen zu können. Nach der Zentrifugation wurde das Zellpellet in 1ml PBS gelöst, um anschließend analog der Probenentnahme an Versuchstag 0 vorgehen zu können.

Es wurden  $0,15 \times 10^6$  Zellen je Zellreihe für die Durchflusszytometrie entnommen, die restliche Zelllösung daraufhin erneut zentrifugiert und nach Absaugen des Überstandes das Zellpellet bei -80 °C für die spätere Analytik konserviert.

### 2.9 RNA-Untersuchungen

#### 2.9.1 RNA-Isolation aus Zellen

Zur Isolation von RNA aus den isolierten und kultivierten Zellen wurde das RNeasy Plus Mini Kit der Firma Qiagen gemäß Herstellerangaben verwendet, alle Zentrifugationsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt:

Die Zellen wurden mit Hilfe einer Mischung aus RLT Plus-Puffer und 1 Vol.-%  $\beta$ -Mercaptoethanol lysiert und homogenisiert (Probe < 5 x 10<sup>6</sup> Zellen: 350  $\mu$ l, Probe > 5x10<sup>6</sup> Zellen: 600  $\mu$ l). Die Lösung wurde anschließend in die QIAshredder column übertragen und damit zentrifugiert (13000 rpm, 2 min, 4 °C), um Zelltrümmer aus der Lösung zu entfernen. Die genomische DNA wurde nach dem gleichen Verfahren in der anschließenden Zentrifugation in der gDNA Eliminator spin column (10000 rpm, 30 s, 4 °C) abgetrennt. Zum Durchfluss wurde, um die hydrophile RNA in Lösung zu bringen, das identische Volumen an Ethanol (70 %) pipettiert, das zuvor an RLT Plus-Puffer eingesetzt worden war, und die Mischung nun in die RNeasy spin column übertragen und zentrifugiert (10000 rpm, 30 s, 4 °C). Damit wurde die enthaltene RNA an die in der Säule verarbeitete Membran gebunden. Der Durchfluss wurde ebenso verworfen wie bei den folgenden Schritten, bei denen die Säule zuerst mit 700  $\mu$ l RW1-Puffer und nach Zentrifugation (10000 rpm, 30 s, 4 °C) mit 500  $\mu$ l RPE-Puffer und erneuter Zentrifugation (10000 rpm, 30 s, 4 °C) gespült wurde. Die Säule wurde durch erneute Zentrifugation (13000 rpm, 2 min, 4 °C) von Pufferrückständen befreit. Im Anschluss wurden mit 33  $\mu$ l RNase-freiem Wasser die Membran befeuchtet und die RNA erneut in Lösung gebracht sowie durch Zentrifugation (13000 rpm, 1 min, 4 °C) in Eppendorfgefäße überführt. Bevor die Proben bei -80 °C gelagert wurden, wurde die enthaltene RNA-Konzentration mit Hilfe eines Photometers anhand ihrer optischen Absorption bestimmt.

#### 2.9.2 RNA-Isolation aus Serum

Zur Isolation von miRNA aus Serum wurde das miRNeasy Serum/Plasma Kit der Firma Qiagen gemäß Herstellerangaben verwendet, alle Zentrifugationsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt:

Um Zellteile und Proteine aus der Probe zu entfernen, wurden zu je 200  $\mu$ l zentrifugierten Humanserums 1 ml QIAzol Lysis Reagent gegeben, die Mischung kräftig im Vortexgerät gemischt und anschließend 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurden 5  $\mu$ l Spike-In Control als interne Qualitätskontrolle zugegeben (nicht-humane miR-39 aus *C. elegans*) und gemischt. Im Anschluss wurden 200  $\mu$ l Chloroform zugegeben und die Reagenzien mit Hilfe des Vortex sehr kräftig vermischt, die folgende Zentrifugation (13000 rpm, 15 min, 4 °C) diente der Dichtegraduierung. Anhand dieser Dichteseperation konnten in der nun entstandenen – lipophilen – Phase Zelltrümmer, Proteine und DNA konzentriert werden, wogegen die hydrophilen RNAs sich in der wässrigen Phase anreicherten. Aus der wässrigen Phase wurden daher 600  $\mu$ l entnommen und mit 900  $\mu$ l Ethanol (100 %) vermischt. Nach dem Mischen der Reagenzien wurde die Lösung auf die RNeasy MinElute spin column übertragen, zentrifugiert (10000 rpm, 30 s, 4 °C), um die RNA auf die in der Säule enthaltene Membran zu übertragen und der Durchfluss verworfen. Die Säule wurde nun zuerst mit 700  $\mu$ l RWT-Puffer, anschließend mit 500  $\mu$ l RPE-Puffer gespült und jeweils zentrifugiert (10000 rpm, 30 s, 4 °C), zuletzt wurden 500  $\mu$ l Ethanol (80 %) zugegeben und erneut zentrifugiert (10000 rpm, 2 min, 4 °C), wobei der Durchfluss stets verworfen wurde. Die Membran wurde nun durch Zentrifugation (13200 rpm, 5 min, 4 °C) von Lösungsmittelresten befreit, anschließend wurde 33  $\mu$ l RNase-freies Wasser direkt auf die Membran gegeben, um die anhaftende RNA in Lösung zu bringen und im Anschluss durch erneutes

Zentrifugieren (13200 rpm, 1 min, 4 °C) in Eppendorf-Gefäße übertragen. Bis zur weiteren Verarbeitung der Proben wurde das Material bei -80 °C gelagert.

### 2.9.3 TaqMan-MicroRNA-Assay

Die reverse Transkription und Messung der miR-Expression wurde mit Hilfe eines TaqMan-miRNA-Assay gemäß Herstellerangaben realisiert. Dieser beinhaltet bereits den für die Analyse notwendigen Schritt der Transkription von miR zur cDNA.

Das Messprinzip des TaqMan Assay besteht in der Verwendung spezieller TaqMan- (Hydrolyse-) Sonden. Diese Sonden binden an die einsträngige DNA und enthalten an einem Ende einen Fluoreszenzfarbstoff sowie am anderen Ende einen Quencher, der diese Fluoreszenz unterdrückt. Wird die zu untersuchende cDNA mithilfe der Taq-Polymerase vermehrt, kommt deren 5'-3'-Exonuklease-Aktivität zum Tragen, durch die der Quencher von der fluoreszenzmarkierten Sonde entfernt wird. Dadurch wird die Fluoreszenz nicht mehr unterdrückt und die optisch erfasste Zunahme der Fluoreszenz im Laufe der Reaktionszyklen lässt Rückschlüsse auf die ursprünglich enthaltene Anzahl der Ziel-cDNA-Kopien zu.

In einem Gesamtreaktionsvolumen von 15 µl wurden zu 3 µl spezifischer Reverse-Transkriptions-Primer (für RNU6b, RNU48, miR-142-3p, miR-146a, miR-155 und miR-223) 50 ng RNA in 9,16 µl H<sub>2</sub>O, 0,19 µl RNase-Inhibitor, 1,5 µl 10x RT-Puffer, 0,15 µl 100 mM dNTP sowie 1 µl Reverse Transkriptase pipettiert. Die 96-Loch-PCR-Reaktionsplatte wurde anschließend zentrifugiert und die Reverse Transkription anschließend im Thermocycler realisiert. Dafür wurde die Probe über 30 min bei 16 °C gehalten, anschließend bei 42 °C über 30 min sowie für 5 min auf 85 °C erhitzt, bevor das Gerät die Proben auf 4 °C kühlte, bis sie bei -20 °C zur weiteren Verwendung gelagert wurden.

Das Reaktionsprodukt der Reversen Transkription wurde auf den Faktor 1 : 3,75 verdünnt. Die folgende Real-Time-PCR wurde in Duplikaten realisiert, wobei jeweils 5 µl des verdünnten Reaktionsprodukts mit 10 µl 2x Mastermix und 1 µl Primer in 20 µl Gesamtvolumen verwendet wurden, sodass sich, verglichen mit der eingesetzten cDNA, eine Verdünnung von 1 : 15 ergab. Die PCR wurde im Real-Time-PCR-Thermocycler realisiert und anhand der eingesetzten MGB TaqMan-Sonden erfasst (95 °C über 10 min, anschließend 40 Zyklen aus 95 °C über 15 s sowie 60 °C über 1 min).

Die Berechnung der relativen Expression erfolgte nach folgender Formel:

$$c(\text{miR})_{\text{normalisiert}} = 2^{(\text{Ct}(\text{miR}) - \text{Ct}(\text{RNU6b/RNU48}))}$$

### 2.9.4 Messung der Serum-miRNA-Expression

Die Messung der miRNA-Expression im Serum erfolgte analog zu 2.9.3. Es wurde lediglich statt der oben verwendeten 50 ng jeweils 6 µl der aus dem Serum isolierten RNA-Lösung als Basis für die Reaktion eingesetzt.

### 2.9.5 Messung der GARP-mRNA-Expression

#### 2.9.5.1 Reverse Transkription

Für die Untersuchung der GARP-mRNA wurde die gesamte aus den Zellen isolierte RNA zuerst in cDNA revers transkribiert, um die weiteren Experimente auf DNA-Ebene durchführen zu können. Dazu wurde das QPCR cDNA Synthesis Kit gemäß Herstellerangaben verwendet.

Je 500 ng RNA wurden in 12,7 µl Wasser gelöst und mit 7,3 µl eines Mastermix vermischt, welcher pro Probe 4,0 µl 5x AMV RT-Puffer, 2,0 µl 10 mM dNTP, 0,8 µl 0,5 µM/ml Oligo dT sowie 0,5 µl 10 U/µl AMV-Reverse Transkriptase enthielt. Die Mischung wurde für eine Stunde bei 42 °C im Thermomixer inkubiert. Bis zur Weiterverwendung wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

#### 2.9.5.2 Kontrolle der Reversen Transkription

##### 2.9.5.2.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Um eine Erfolgskontrolle der Reversen Transkription durchzuführen, wurde mit Hilfe einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) die cDNA des konstitutiv exprimierten Cyclophilin vervielfacht, um sie in einer anschließenden Gelelektrophorese nachweisen zu können.

Hierfür wurde 1 µl der cDNA-Lösung mit 24 µl eines Mastermix versetzt (2,5 µl 10 x PCR-Puffer, 0,5 µl 10 mM dNTP, 1,0 µl 10 µM Cyclophilin-Primer, 19,0 µl Wasser sowie 1 µl 0,5 U/µl Taq-Polymerase). Nach Zentrifugation der Proben wurden die Proben in den Thermocycler gegeben, wo die Kettenreaktion gemäß folgendem Protokoll realisiert wurde: 95 °C über 5 min, anschließend 25 Zyklen zu jeweils 95 °C über 30 s zur DNA-Denaturierung, 60 °C zum Annealing der Primer sowie 72 °C zur DNA-Polymerisation. Der Cycler behielt im Anschluss die Temperatur für weitere 7 min bei, bevor die Proben auf 4 °C gekühlt wurden.

##### 2.9.5.2.2 Gelelektrophorese

Um das Ergebnis der Reaktion visuell kontrollieren zu können, wurde die gewonnene DNA gelelektrophoretisch in 1 % Agarose-Gel aufgetrennt. Dafür wurden jeweils 5 µl der entsprechenden Probe mit 1 µl 6x loading Dye vermischt und anschließend, ebenso wie je 2 µl einer 100 bp- sowie 1 kbp-Vergleichsleiter, in je eine Geltasche geladen. 30 Minuten lang wurden 100 V Spannung bei einer Stromstärke von 200 mA über das Gel angelegt, um die DNA entsprechend ihrer Ladung (und damit ihrer Größe) aufzutrennen.

Sichtbar gemacht wurde die elektrophoretische Auftrennung unter einer UV-Kamera.

### 2.9.5.3 GARP TaqMan gene expression assay

Um die Expression der GARP-mRNA quantifizieren zu können, wurde mit der zuvor revers transkribierten (siehe Punkt 2.9.5.1) cDNA eine Real-Time-PCR durchgeführt. Hierfür wurde der TaqMan Gene Expression Assay gemäß Herstellerangaben verwendet. Die Ct-Werte für GARP wurden auf diejenigen des konstitutiv exprimierten Cyclophilin als Kontrolle normalisiert, um die relative Expression zu ermitteln. Um eine größere Verlässlichkeit der Daten zu erreichen, wurden alle Reaktionsansätze in Duplikaten durchgeführt.

Die relative Expression wurde mit folgender Formel berechnet:

$$c(\text{GARP mRNA})_{\text{normalisiert}} = 2^{(\text{Ct}(\text{GARP}) - \text{Ct}(\text{Cyclophilin}))}$$

Für die Messung der Cyclophilin-Expression wurde 1,5 µl cDNA zu einem Reaktionsansatz aus 10 µl 2x Mastermix, 0,5 µl 40x Primer sowie 8,0 µl Wasser pipettiert. Für die GARP-Expressionsmessung wurden 5 µl cDNA eingesetzt, außerdem ebenfalls 10 µl 2x Mastermix, 1,0 µl 20x Primer und 4,0 µl Wasser. Die 96-Lochplatte wurde anschließend mit einer optischen Folie verschlossen, die die Erfassung der Reaktion nicht beeinträchtigt, und zentrifugiert. Im Anschluss wurde die Reaktion (95 °C über 10 min, anschließend 40 Zyklen aus 95 °C über 15 s sowie 60 °C über 1 min) mit Hilfe eines Real-Time-PCR-Geräts realisiert und erfasst. Als TaqMan-Sonden wurden FAM für die GARP-mRNA sowie VIC für die Cyclophilin-mRNA verwendet.

## 2.10 FACS-Durchflusszytometrie

Die extrazelluläre FACS-Durchflusszytometrie (fluorescence-activated cell scanning) ermöglicht die Visualisierung von Oberflächenproteinen auf Zellen.

Hierzu wird in einem ersten Schritt ein Überschuss an fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen die zu bestimmenden Antigene zu den Zellen gegeben, um eine 1 : 1- Bindung der Antikörper an die Antigene zu erreichen. Ein anschließender Schritt, bei dem die Zellen gewaschen werden, entfernt die überschüssigen, ungebundenen Antikörper, sodass die Menge in der Probe vorhandener, gebundener Antikörper nun direkt mit der ursprünglichen Menge des zu untersuchenden Proteins korreliert. Diese Menge gebundener Antikörper lässt sich technisch visualisieren, indem an die Antikörper konjugierte Moleküle durch Laserlicht verschiedener Frequenzen spezifisch zur Fluoreszenz angeregt werden und die Messung der Fluoreszenz so Rückschlüsse auf das zu untersuchende Protein zulassen. [141]

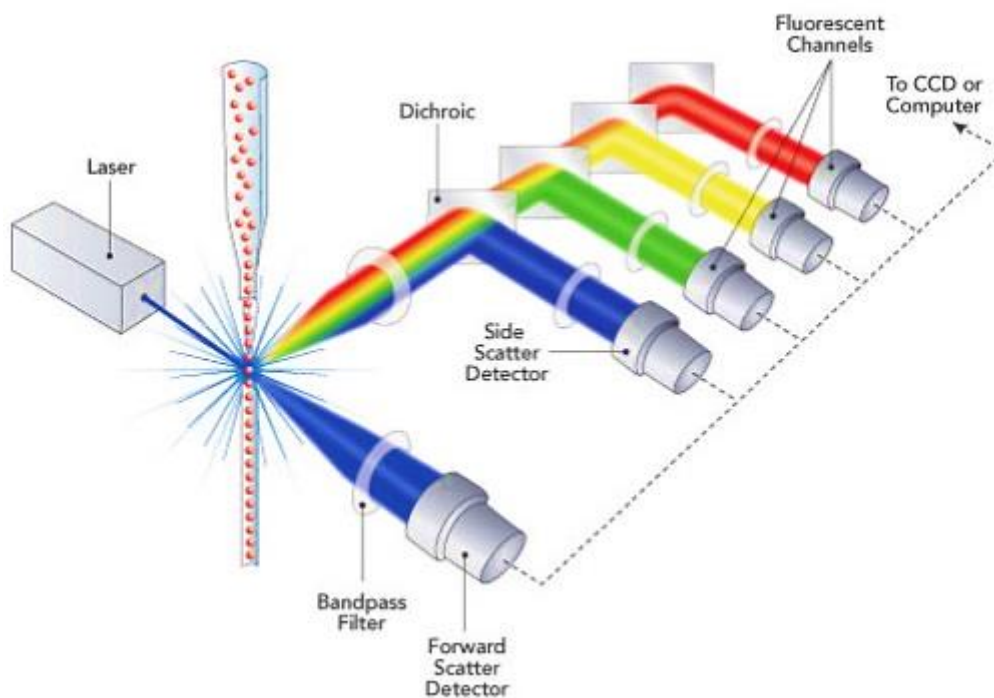


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Funktionsweise eines FACS Analysators [141]

Obwohl allgemein mit FoxP3 ein intrazellulärer Transkriptionsfaktor als aussagekräftigster Marker zur Identifikation von regulatorischen T-Zellen gilt, wurde, wie bereits in 1.1.2 erläutert, in der vorliegenden Arbeit der leichter durchführbaren CD25-Oberflächenmarkierung der Vorzug gegeben. Auf diese Weise konnten alle durchflusszytometrischen Untersuchungen durch extrazelluläre Stainings realisiert werden.

### 2.10.1 Reinheitskontrolle der Zellisolation

Um eine konstant hohe Qualität bei der Isolation der unterschiedlichen Zellreihen garantieren zu können, wurden an Versuchstag 0 nach jedem entscheidenden Zellselektionsschritt Proben entnommen, die noch am gleichen Tag durch Färbung der Oberflächenantigene CD3, CD4 sowie CD25 auf ihre Reinheit getestet wurden.

Pro Zellpopulation (PBMC-Fraktion, CD4<sup>+</sup>-Zellen, CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>- und CD25<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellen) wurden jeweils zwei Probenröhrchen mit jeweils  $0,1 \times 10^6$  Zellen bestückt und diese nach Zugabe von je 1 ml FACS-PBS einer Zentrifugation (6000 rpm, 2 min, RT) unterzogen. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt. Zur ersten der beiden Proben wurde nun 2 µl der anti-CD3-FITC/CD4-PE DUAL TAG-Lösung, zur zweiten Probe jeweils 2 µl anti-CD4-FITC sowie anti-CD25-PE-Antikörper gegeben. Im Vortexmischer wurden die Probenröhrchen kräftig geschüttelt, um die Proben für die anschließende Antikörperinkubation (5 min, RT) zu durchmischen. Durch erneute Zugabe von je 1 ml FACS-PBS, Zentrifugation (6000 rpm, 2 min, RT) und Absaugen des Überstands wurden überschüssige Antikörper entfernt. Die Proben wurden nach Zugabe von 200 µl FACS-PBS und erneutem Schütteln im Vortexmischer im Analysator ausgewertet.

### 2.10.2 GARP-Staining

An d0, d1 und d2 wurden die verschiedenen Zellfraktionen auf die Expression des GARP getestet. Hierfür wurden analog zu den Qualitätskontrollen je  $0,1 \times 10^6$  Zellen in ein Röhrchen gegeben. Die Zellen wurden durch Zugabe von 1 ml FACS-PBS, Zentrifugation (6000 rpm, 2 min, RT) und Absaugen des Überstands gewaschen. Zu den Proben, die auf GARP-Expression untersucht werden sollten, wurden nun 25 µl anti-human-GARP-Antikörper pipettiert. Um zu vermeiden, dass unspezifische Antikörper-Antigen-Reaktionen das Messergebnis verfälschen, wurde in das zweite Röhrchen jeder Zellpopulation eine 1 : 25 Verdünnung der Ratten-IgG-Lösung als Isotypenkontrolle gegeben. Beide Reaktionsansätze wurden gleichermaßen im Vortexgerät gemischt und anschließend für 15 min bei 4 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen durch Zugabe von 1 ml FACS-PBS gewaschen, zentrifugiert (6000 rpm, 2 min, RT) und der Überstand inklusive der überschüssigen Antikörper vorsichtig abgesaugt. Zu jeder der Proben wurde nun ein eisgekühlter Mastermix gegeben, der als aktive Bestandteile 2 µl anti-CD25-FITC-Antikörper und 0,25 µl Ziege-anti-Ratten-IgG(H+L)- PE enthielt, und nach erneutem Mischen am Vortexmischer für 15 min bei 4 °C inkubiert. Der PE-gekoppelte Antikörper fungierte hierbei als Sekundärantikörper, der an die primär verwendeten Antikörper (Ratten-anti-GARP-Antikörper und Isotypenkontrolle) band. Gleichzeitig konnte im selben Schritt eine CD25-Markierung realisiert werden. Nach der Inkubation wurden die Zellen erneut gewaschen (Zugabe von 1 ml FACS-PBS, Zentrifugation mit 6000 rpm, 2 min, RT, anschließend Absaugen des Überstandes), 200µl FACS-PBS zugegeben und nach kräftigem Mischen im Vortexgerät im Analysator ausgewertet.



## 2.11 Datenauswertung und Verarbeitung

Die Erfassung und statistische Auswertung aller Daten sowie Erstellung der Graphen für die vorliegende Arbeit erfolgte mithilfe von Microsoft® Excel (Versionen 2003-2016). P-Werte wurden mithilfe des Student's-t-Tests berechnet (p-Werte nicht für multiples Testen korrigiert). In allen Grafiken sind die arithmetischen Mittelwerte sowie die Standardabweichung in Form der Fehlerindikatoren dargestellt.

Die im Text angegebenen p-Werte wurden jeweils auf zwei geltende Ziffern gerundet. Angegeben wurden einheitlich alle p-Werte, die das gewählte Signifikanzniveau von 5 % erreichten.

Für die Darstellung der p-Werte in Grafiken wurde einheitlich folgende Kennzeichnung verwendet:

- \*  $0,01 < p \leq 0,05$
- \*\*  $0,001 < p \leq 0,01$
- \*\*\*  $p \leq 0,001$

Die Arbeit wurde mithilfe von Microsoft® Word (Versionen 2003-2016) erstellt.

Zur Erfassung der zitierten Quellen wurde EndNote Clarivate Analytics (Version X7.8, lizenziert für LMU München) verwendet.

Quellen, die vor der Interpunktion am Satzende eingefügt wurden, beziehen sich dabei jeweils auf den betreffenden Einzelsatz. Quellen, die nach dem Punkt eingefügt wurden, beziehen sich jeweils auf den vorstehenden Absatz.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Klinische und demographische Daten der Studiengruppen

Initial wurden 18 Patienten in die Studie rekrutiert. Am Ende der experimentellen Versuchsphase erfolgte eine erneute Evaluation der Einschlusskriterien durch Auswertung der Patientenakten, wobei 9 Patienten nachträglich aus der Analyse ausgeschlossen werden mussten (z.B. aufgrund einer im Verlauf festgestellten malignen Grunderkrankung als wahrscheinlichere Erklärung für die klinische Präsentation, Details siehe 2.6). Es wurde durch gezielten Einschluss von geeigneten Kontrollpersonen versucht, ein Matching der HC-Kontrollgruppe bezüglich Alter und Geschlecht zur RA-Patientenkohorte zu erreichen. In die HC-Gruppe konnten auf diese Weise insgesamt 27 gesunde Kontrollen rekrutiert werden.

Die Alters- und Geschlechterverteilung von RA- und HC-Gruppe unterschied sich nicht signifikant (Altersverteilung  $p = 0,29$ , Geschlechterverteilung  $p = 0,59$ ).

Die rekrutierten Patienten zeigten anhand des DAS28 eine mittlere bis hohe Krankheitsaktivität, die sich auch an der auffällig hohen Schmerzbelastung der Patienten (erhoben durch Visuelle Analogskala, VAS) zeigte.

	HC (n = 27)	RA (n = 9)
<b>Alter (in Jahren)</b>	51,5 ± 7,5	55,4 ± 9,7
<b>Geschlechterverteilung (m/w)</b>	5/22	1/8
<b>ACR/EULAR 2010 Score</b>	7,2 ± 1,7	-
<b>Erkrankungsdauer (Monate)</b>	10,0 ± 12,0	-
<b>DAS28</b>	4,8 ± 1,6	-
<b>VAS</b>	69,3 ± 17,9	-

*Tabelle 2: Epidemiologische Parameter der untersuchten Populationen, Daten jeweils angegeben als arithmetischer Mittelwert ± Standardabweichung*

## 3.2 miR-Expression

Um die Expression der untersuchten miRs (miR146a, miR-155, miR-223 und miR-142-3p) zu quantifizieren, wurde die miR nach Isolation aus den asservierten Zellen jeweils mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen miR-TaqMan Assays in einem ersten Schritt revers transkribiert und im Anschluss durch TaqMan Real-Time-PCR quantifiziert. Gemessen wurde jeweils die relative Expression der untersuchten miRs zu RNU6b und RNU48, die als sogenannte housekeeping-RNUs konstitutiv exprimiert werden.

### 3.2.1 miR-146a-Expression

#### 3.2.1.1 miR-146a-Expression der CD25<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation

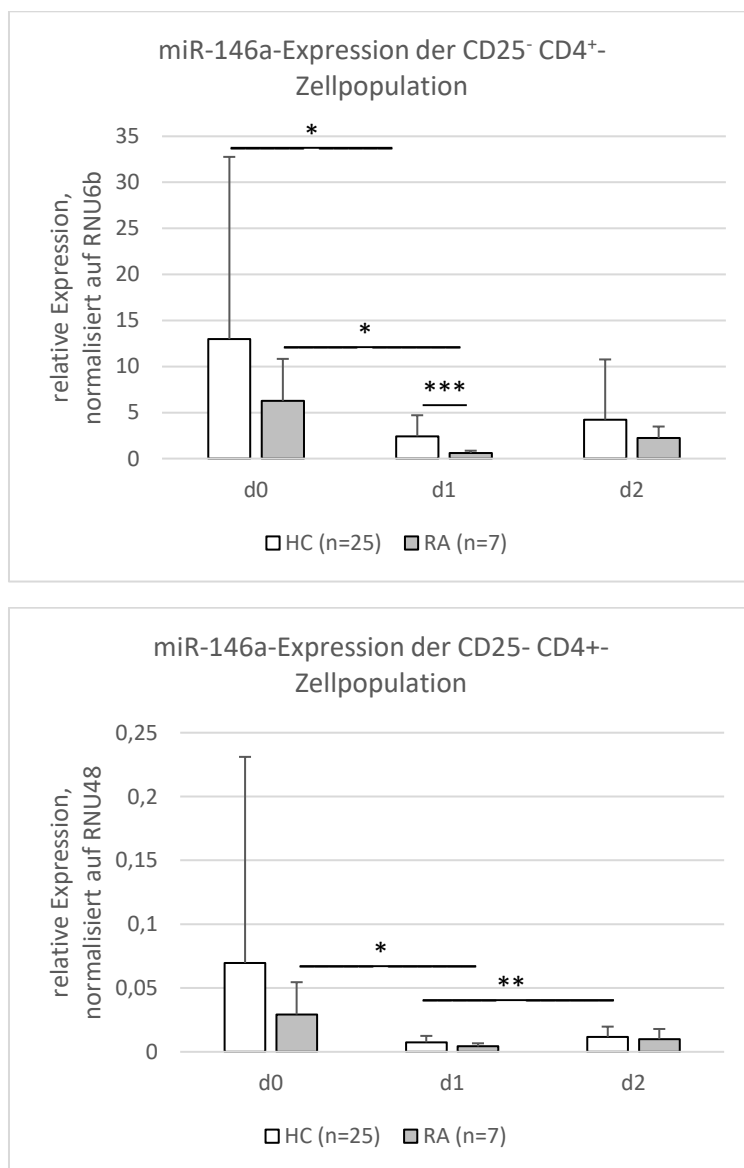


Abbildung 6: miR-146a-Expression der CD25<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation

Abbildung 6 zeigt, dass die miR-146a an d0 am stärksten exprimiert wurde. Die Expression an d1 war sowohl in der HC- als auch der RA-Gruppe an d1 signifikant niedriger (jeweils  $p < 0,05$  normalisiert auf

RNU6b, ebenso  $p < 0,05$  normalisiert auf RNU48 in der RA-Gruppe). Von d1 zu d2 stieg die miR-146a-Expression wieder signifikant an ( $p < 0,01$  normalisiert auf RNU48).

Während sich das Expressionsniveau zwischen HC- und RA-Versuchsgruppe an d0 noch nicht signifikant unterschied, zeigte sich in der Normalisierung auf RNU6b an d1 ein hochsignifikanter Unterschied zwischen der HC- und der RA-Gruppe ( $p < 0,001$ ), wobei die HC-Zellen deutlich mehr miR-146a exprimierten. Auch an den anderen Versuchstagen und bei Normalisierung auf RNU48 war die miR-146a-Expression in der HC-Gruppe höher als in der RA-Gruppe, allerdings waren hier die Unterschiede nicht statistisch signifikant.

### 3.2.1.2 miR-146a-Expression der CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation

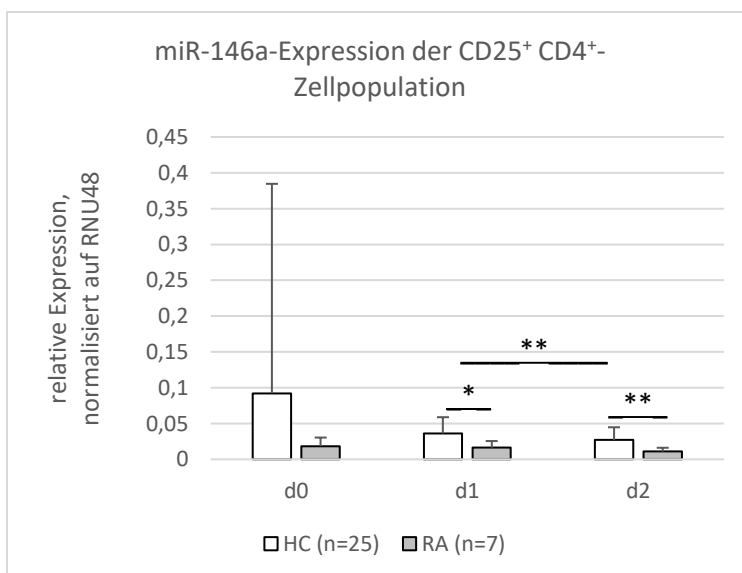
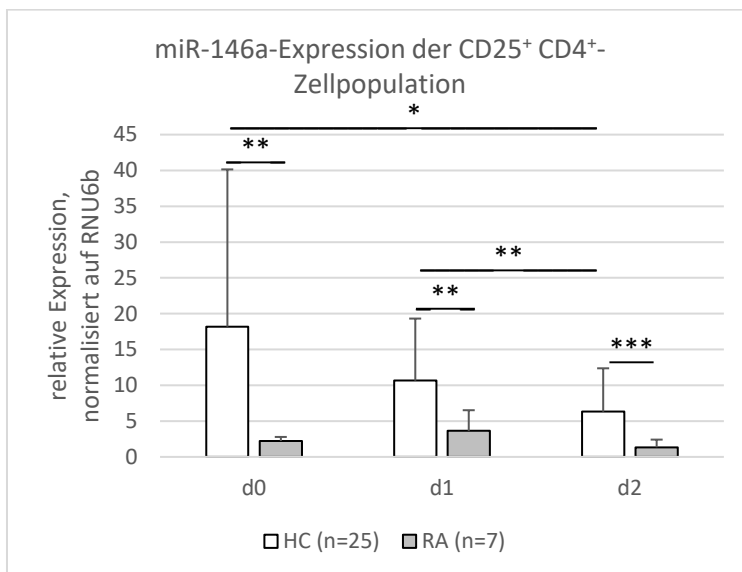


Abbildung 7: miR-146a-Expression der CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation

Wie bereits in der Population der CD25<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellen zeigt sich auch in der Population der CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellen eine stärkere Expression von miR-146a in der HC-Gruppe im Vergleich zur RA-Gruppe. Anders als bei den CD25<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellen waren die Unterschiede bei den CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellen jeweils

hochsignifikant (normalisiert auf RNU6b d0:  $p < 0,01$ ; d1:  $p < 0,01$ ; d2:  $p < 0,001$ , normalisiert auf RNU48 d1:  $p < 0,05$ ; d2:  $p < 0,01$ ) nachweisbar.

Die Herabregulation der miR-146a war in der HC-Gruppe, bezogen auf RNU6b von d0 zu d2 ( $p < 0,05$ ), sowie von d1 zu d2 statistisch signifikant ( $p < 0,01$ ), ebenso bezogen auf RNU48 von d1 zu d2 ( $p < 0,01$ ).

### 3.2.2 miR-155-Expression

#### 3.2.2.1 miR-155-Expression der CD25<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation

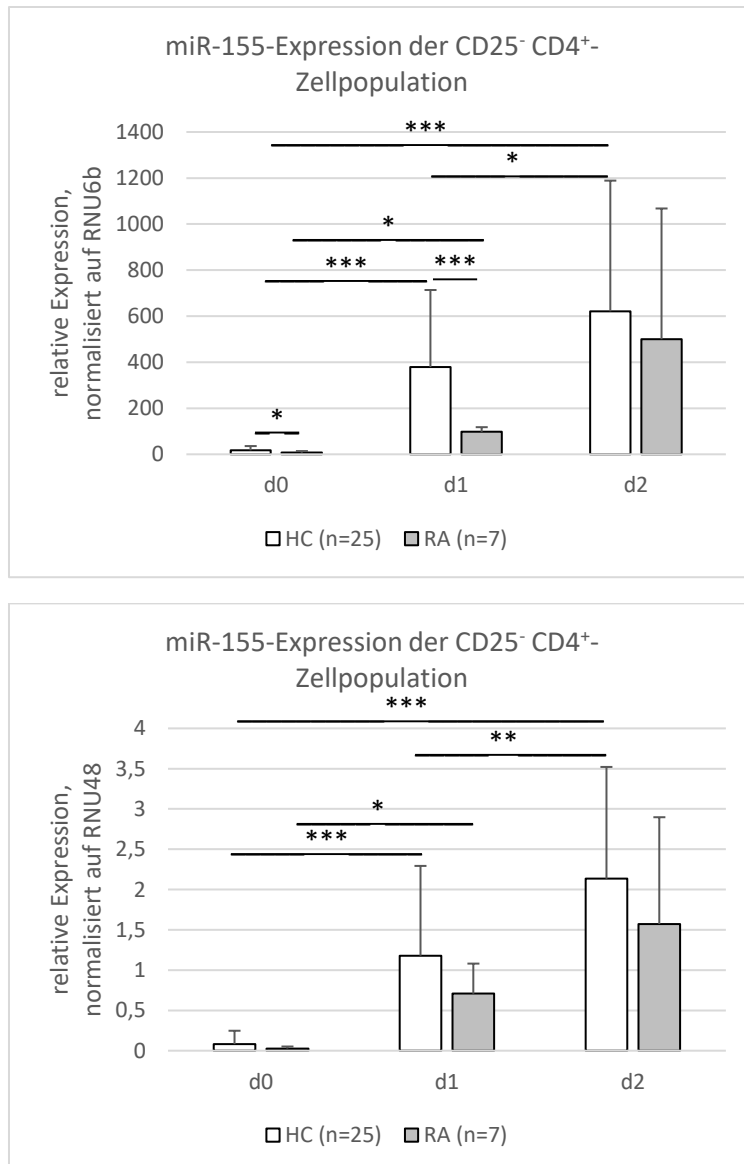


Abbildung 8: miR-155-Expression in der CD25<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation

Die Kinetik der miR-155 zeigte unter Stimulation einen deutlichen Anstieg an d1 und d2. Dieser Anstieg war, bezogen auf RNU6b, in der HC-Gruppe sowohl zwischen d0 und d1 ( $p < 0,001$ ), d1 und d2 ( $p < 0,05$ ) sowie zwischen d0 und 2 höchstsignifikant ( $p < 0,001$ ). Ein ähnliches Bild lieferte der Bezug zur RNU48, hier war der Anstieg von d0 zu d1 ( $p < 0,001$ ) sowie von d1 zu d2 ( $p < 0,01$ ) ebenso hochsignifikant nachweisbar wie zwischen d0 und d2 ( $p < 0,001$ ).

In der RA-Gruppe war in beiden Analysen von d0 zu d1 ein signifikanter Anstieg der miR-155-Expression nachweisbar (normalisiert auf RNU6b:  $p < 0,05$ ; normalisiert auf RNU48:  $p < 0,05$ ).

Der Vergleich der Versuchsgruppen zeigte in der Normalisierung auf RNU6b an d0 ( $p < 0,05$ ) und d1 ( $p < 0,001$ ) signifikante Unterschiede zwischen HC- und RA-Gruppe, diese konnten jedoch bei Normalisierung auf RNU48 nicht gefunden werden.

### 3.2.2.2 miR-155-Expression der CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation

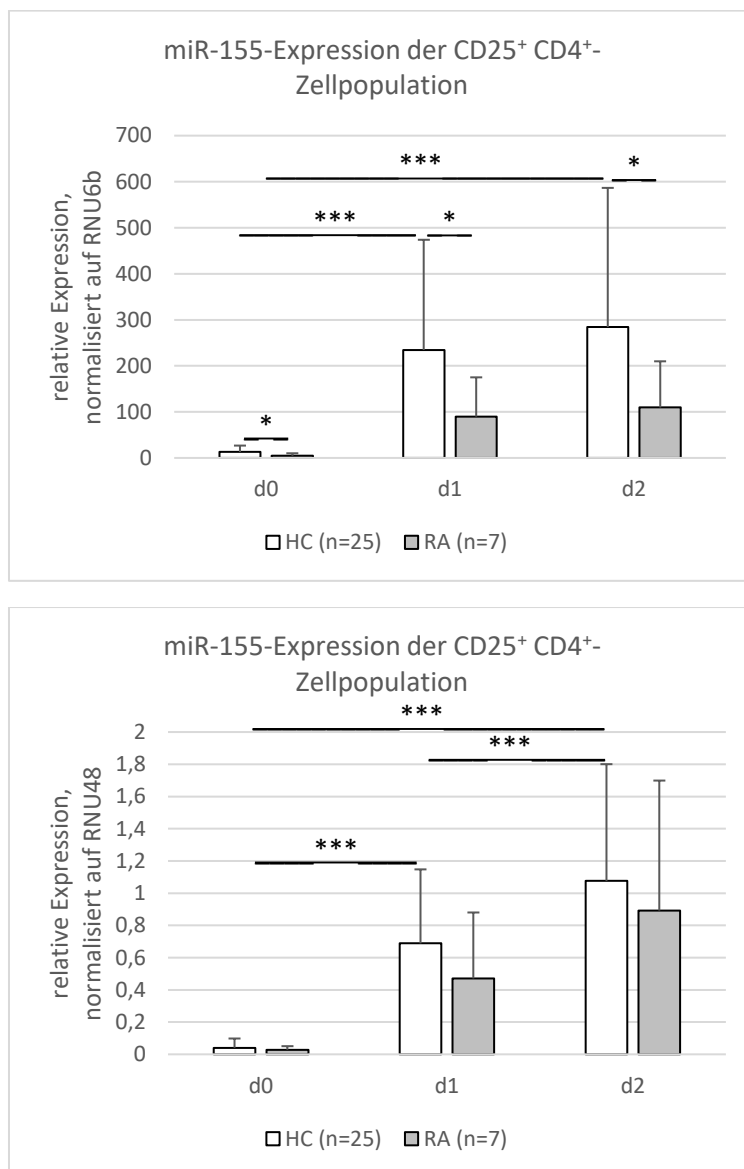


Abbildung 9: miR-155-Expression der CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation

Die Betrachtung der miR-155-Expression der CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellpopulationen in Abbildung 9 liefert ein ähnliches Bild wie in der CD25<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation in Abbildung 8.

Sowohl HC- als auch RA-Zellen exprimieren nach Stimulation vermehrt miR-155.

Die Hochregulation ist in der HC-Gruppe von d0 zu d1 ( $p < 0,001$ ) sowie von d0 zu d2 ( $p < 0,001$ ) hochsignifikant, bezogen auf RNU6b. Bezogen auf RNU48 zeigte sich zur Hochregulation zwischen d0 und d1 sowie d0 und d2 (jeweils  $p < 0,001$ ) darüber hinaus ein höchstsignifikanter Anstieg zwischen d1

und d2 (ebenfalls  $p < 0,001$ ). In der RA-Population kann bei Betrachtung der Daten ebenso eine Hochregulation angenommen werden, die Unterschiede sind hier jedoch nicht statistisch signifikant.

Der Vergleich der HC- und RA-Versuchsgruppe zeigt, bezogen auf RNU6b, für alle drei Versuchstage eine signifikant höhere miR-155-Expression in der HC-Gruppe (jeweils  $p < 0,05$ ), dieser Unterschied war bei Normierung auf RNU48 jedoch nicht statistisch signifikant nachweisbar.

### 3.2.3 miR-223-Expression

#### 3.2.3.1 miR-223-Expression der CD25<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation

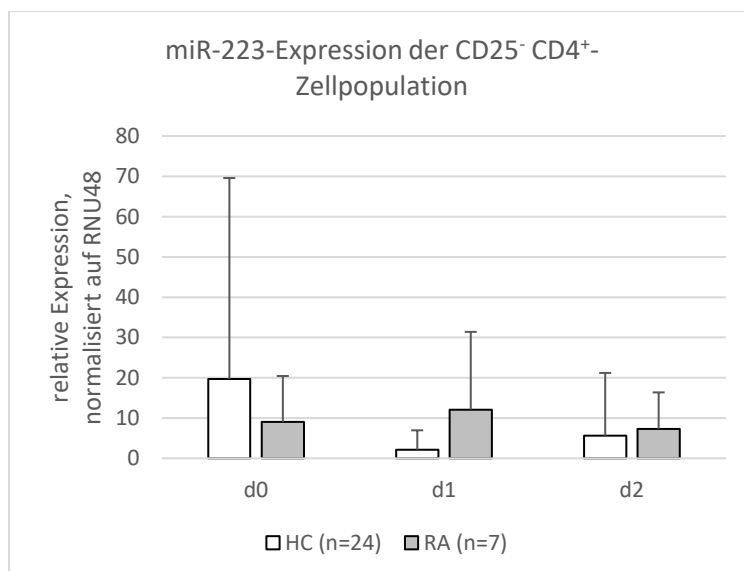
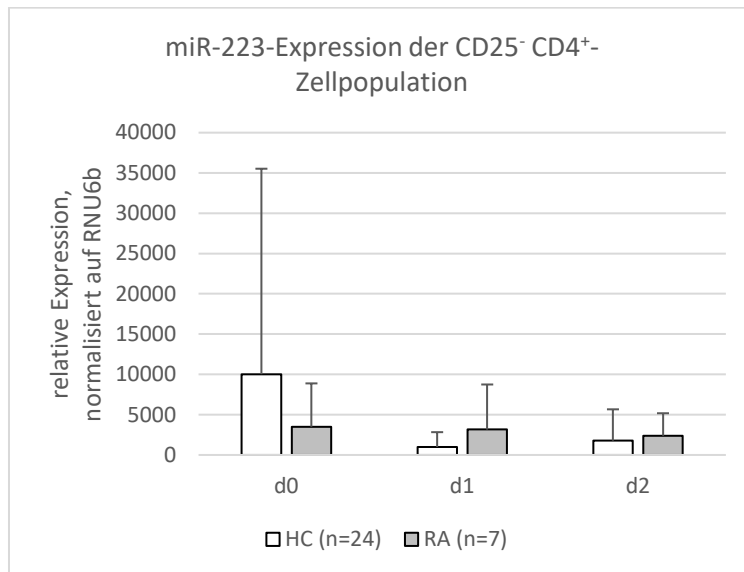


Abbildung 10: miR-223-Expression der CD25<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation

Die CD25<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellpopulationen von HC- und RA-Gruppe zeigten bezüglich der miR-223 ein heterogenes Expressionsmuster. Während in der HC-Gruppe die Expression von d0 zu d1 sank und zu d2 anschließend wieder etwas anstieg, stagnierte die Expression in der RA-Gruppe über alle drei Versuchstage auf vergleichbarem Niveau. Statistisch signifikante Unterschiede ließen sich weder in der Kinetik innerhalb der Versuchsgruppen noch zwischen den Versuchsgruppen an den jeweiligen Messpunkten nachweisen.

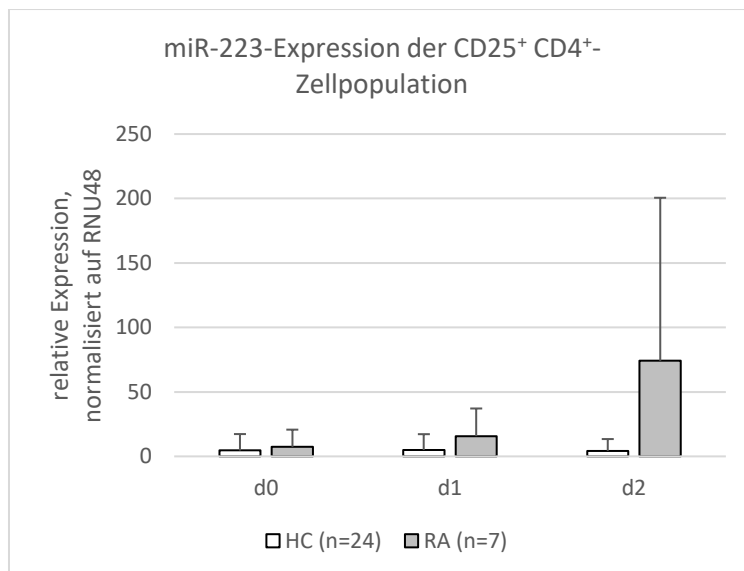
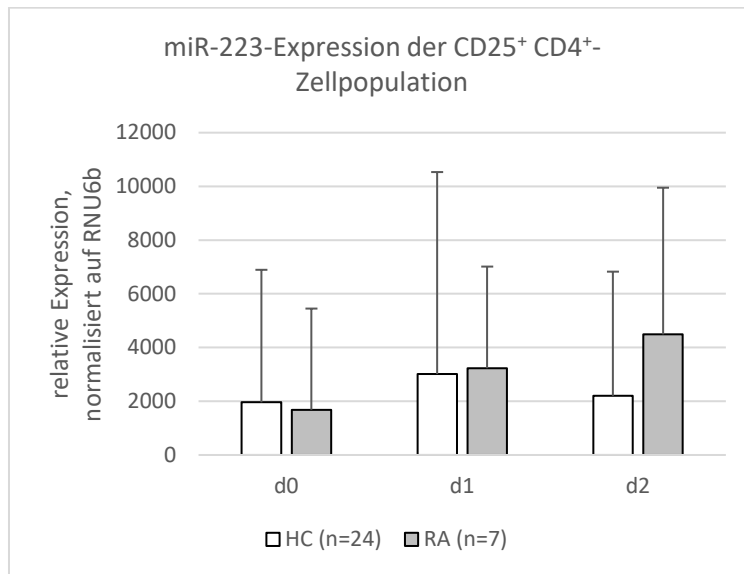
3.2.3.2 miR-223-Expression der CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation

Abbildung 11: miR-223-Expression der CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation

Die Zellen der CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation zeigten in der HC-Gruppe eine leichte Hochregulation an d1 mit anschließendem Abfall an d2, die RA-Versuchsgruppe zeigte einen konstanten Anstieg der miR-223-Expression über den gesamten Versuchszeitraum.

Auch hier waren jedoch der Vergleich der Kinetik sowie der Vergleich der beiden Versuchsgruppen an den jeweiligen Versuchstagen nicht statistisch signifikant.



## 3.2.4 miR-142-3p-Expression

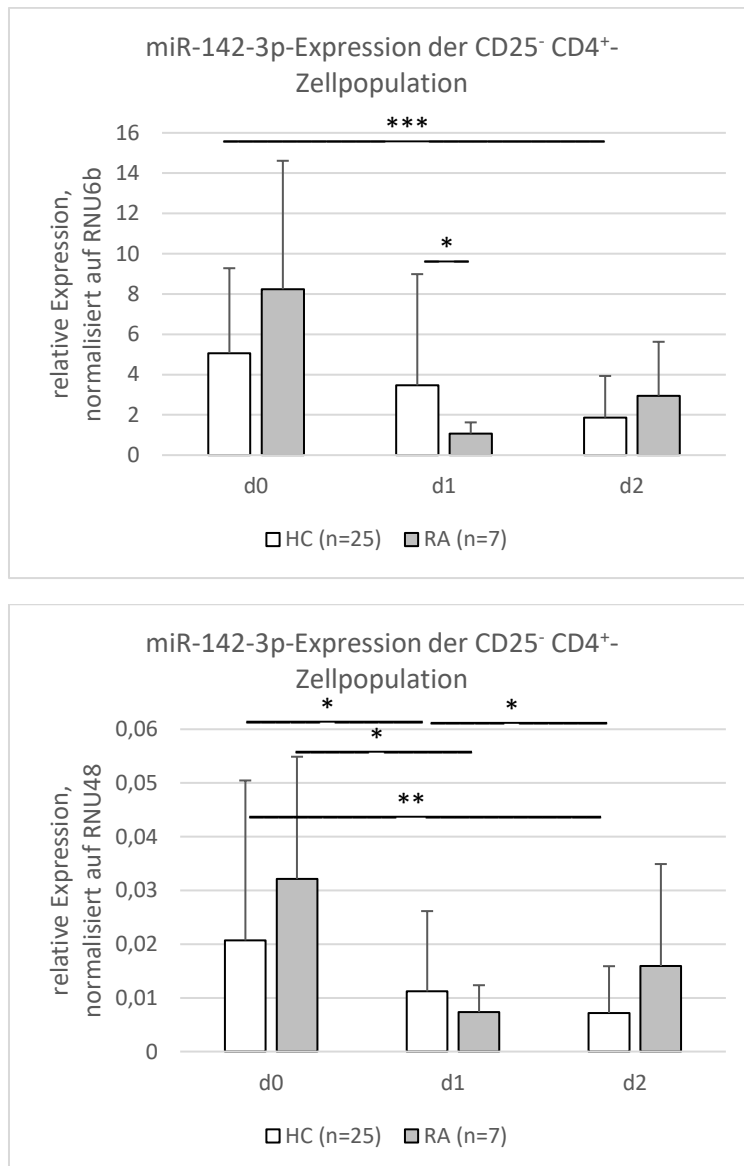
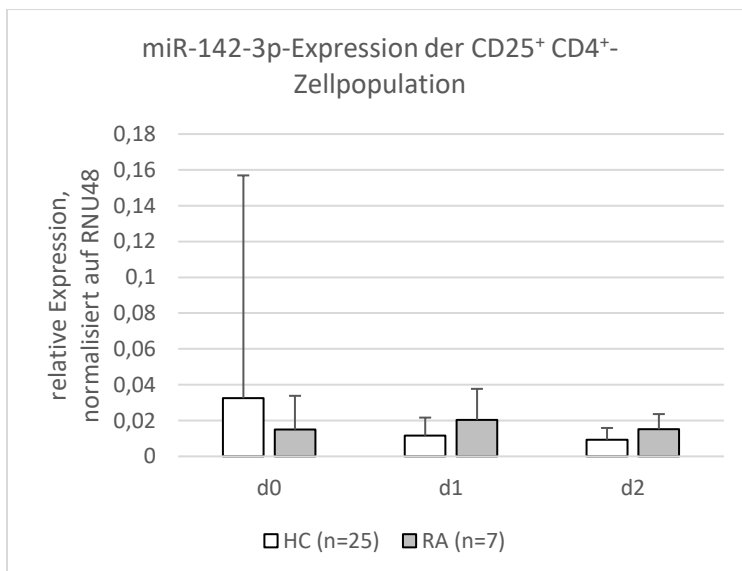
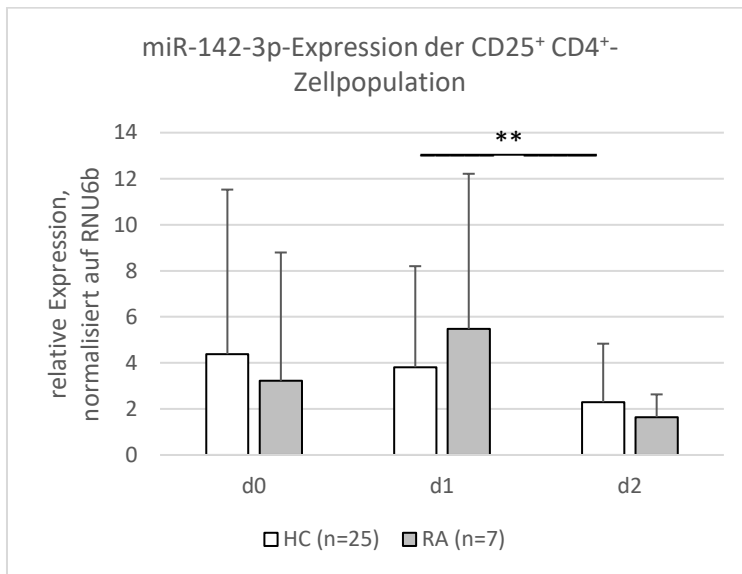
3.2.4.1 miR-142-3p-Expression der CD25<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>-ZellpopulationAbbildung 12: miR-142-3p-Expression in der CD25<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation

Abbildung 12 zeigt, dass sich die Kinetik der miR-142-3p-Expression in der HC- und der RA-Gruppe (unabhängig von der gewählten Normalisierung) unterschieden. Während die HC-Gruppe ab d0 eine leicht abnehmende Expression zeigt, ist in der RA-Gruppe von d0 zu d1 ebenfalls eine Verminderung der miR-142-3p-Expression zu sehen, diese steigt jedoch an d2 wieder etwas an. Die Herabregulation der miR-142-3p in der HC-Gruppe war von d0 zu d2 in beiden Normalisierungen ( $p < 0,001$ ;  $p < 0,01$ ), von d0 zu d1 sowie von d1 zu d2 nur in der Normalisierung auf RNU48 statistisch signifikant (jeweils  $p < 0,05$ ) nachweisbar. In der RA-Gruppe war ein Abfall der miR-Expression von d0 zu d1 nur normalisiert auf die RNU48 signifikant nachweisbar ( $p < 0,05$ ).

Obwohl in beiden Analysen die RA-Gruppe an d0 und d2 höhere sowie an d1 niedrigere miR-142-3p-Mengen exprimierte als die HC-Gruppe, war dieser Unterschied nur in der Normalisation auf die RNU6b-Expression statistisch signifikant ( $p = 0,05$ ).

3.2.4.2 miR-142-3p-Expression der CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>-ZellpopulationAbbildung 13: miR-142-3p-Expression der CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation

Die Expression der miR-142-3p zeigte keine eindeutige Kinetik in der RA- und HC-Versuchsgruppe. Lediglich ein Abfall der miR-142-3p-Expression von d1 zu d2 war in der HC-Gruppe statistisch signifikant nachweisbar ( $p < 0,01$ ).

Der Vergleich zwischen den Versuchsgruppen lieferte keine statistisch signifikanten Resultate.

### 3.3 Serum-miR-Expression

Um die miR-Expression im Serum zu untersuchen, wurde den Teilnehmern an Tag 0 Serum entnommen. Nach Isolation der miR aus dem Serum mit Hilfe eines kommerziell verfügbaren miRNeasy-KIT wurde die Serum-miR analog zur intrazellulären miR revers transkribiert und anschließend durch TaqMan Real-Time-PCR quantitativ analysiert. Die Expression wurde hierbei normalisiert auf die nicht-humane miR-39 aus *C. elegans*, die den Seren als spike-in-control zu Beginn der Serum-miR-Isolation zugegeben wurde.

#### 3.3.1 Serum-miR-146a-Expression

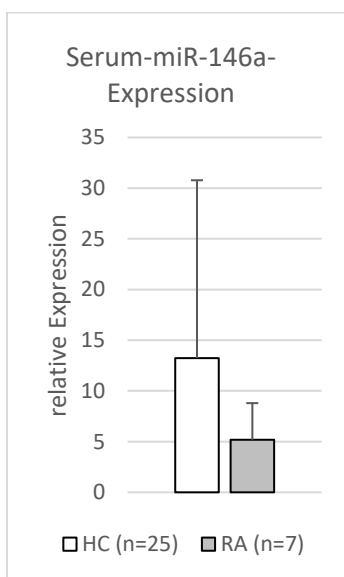


Abbildung 14: Serum-miR-146a

Auch die Untersuchung der miR-146a im Serum zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen HC- und RA-Gruppe.

### 3.3.2 Serum-miR-155-Expression

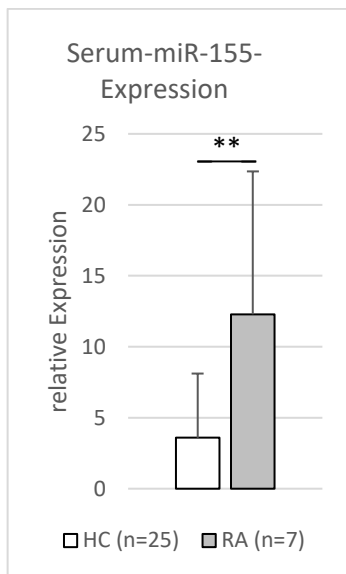


Abbildung 15: Serum-miR-155

In den Seren der RA-Versuchsgruppe fanden sich signifikant höhere ( $p < 0,01$ ) Konzentrationen miR-155 als in der HC-Gruppe.

### 3.3.3 Serum-miR-223-Expression

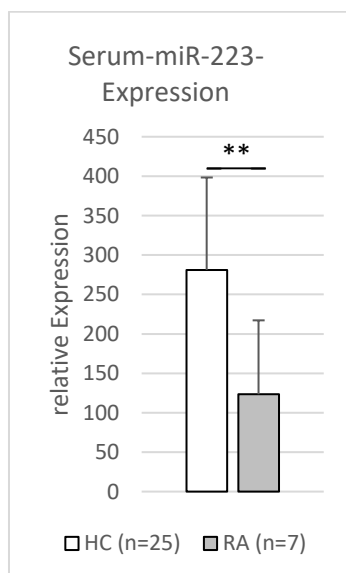


Abbildung 16: Serum-miR-223

Im Serum der HC-Versuchsgruppe war die miR-223 in signifikant höherer ( $p < 0,01$ ) Konzentration nachweisbar als in der RA-Gruppe.

### 3.3.4 Serum-miR-142-3p-Expression

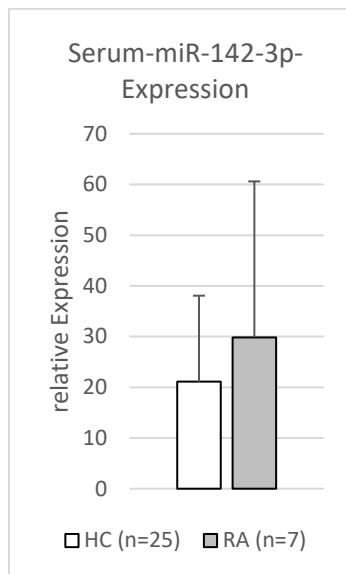


Abbildung 17: Serum-miR-142-3p

Die Untersuchung der miR-142-3p-Expression an d0 zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der HC- und der RA-Versuchsgruppe.

### 3.3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse der Serum-miR-Expression

Die Serum-miR-142-3p und Serum-miR-155 waren im Serum der HC- und RA-Gruppe vergleichbar nachweisbar. Die Expression von Serum-miR-155 und Serum-miR-223 unterschied sich dagegen statistisch signifikant zwischen den Versuchsgruppen.

### 3.4 GARP-mRNA-Expression

Um die GARP-mRNA-Expression zu messen, wurden an den Versuchstagen d0, d1 sowie d2 Zellen aus der CD25<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>- und CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation asserviert. Nach Isolation der RNA wurde diese in cDNA revers transkribiert. Als Qualitätssicherung wurde zur Kontrolle der reversen Transkription eine Gelelektrophorese durchgeführt. Im Anschluss wurde mit der cDNA ein TaqMan gene expression assay durchgeführt, um die Menge an cDNA (und damit die ursprüngliche Menge an GARP-mRNA) zu quantifizieren. Die Werte der erfassten GARP-cDNA wurden auf die Werte des konstitutiv exprimierten Cyclophilin normalisiert, um den (durch die T-Zell-Stimulation bedingt) erhöhten RNA-Grundumsatz aus der Analyse zu eliminieren.

#### 3.4.1 GARP-mRNA-Expression der CD25<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation

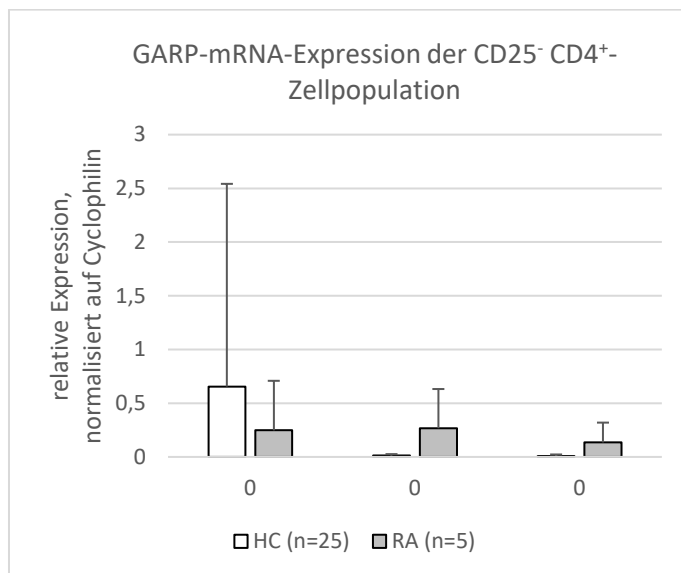


Abbildung 18: GARP-mRNA-Expression der CD25<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation

Die Zellen der CD25<sup>-</sup>-Zellpopulation zeigten an Tag 1 und 2 jeweils eine verminderte GARP-mRNA-Expression. Sowohl in der Kinetik als auch beim Vergleich von RA- und HC-Gruppe zeigten sich jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede.

### 3.4.2 GARP-mRNA-Expression der CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation

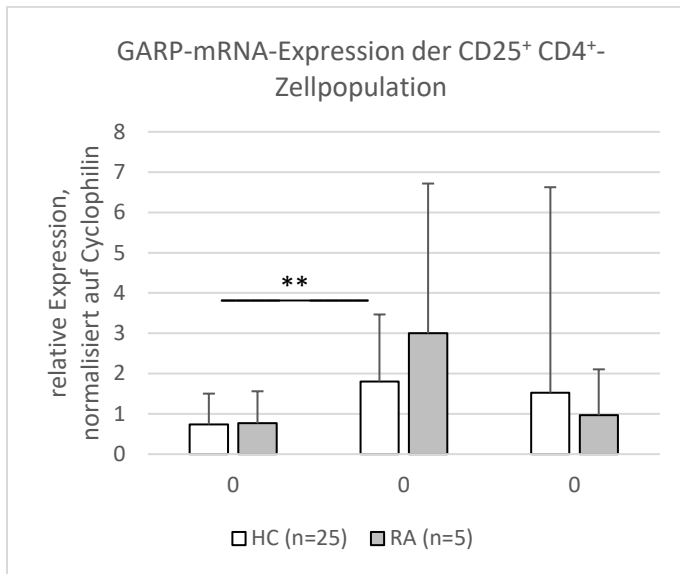


Abbildung 19: GARP-mRNA-Expression in der CD25<sup>+</sup> Zellpopulation

Die Zellen der CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation zeigten eine verstärkte Expression von GARP-mRNA an d1 und d2 im Vergleich zum Basiswert an d0. Der Anstieg der GARP-mRNA war jedoch nur von d0 zu d1 in der HC-Gruppe statistisch signifikant ( $p < 0,01$ ).

Der Vergleich der beiden Versuchsgruppen zum Zeitpunkt der drei Messpunkte war zu keinem Zeitpunkt statistisch signifikant.

### 3.4.3 Zusammenfassung der Ergebnisse zur GARP-mRNA-Expression

Bei Betrachtung der CD25<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation zeigt sich keine erkennbare statistisch signifikante Kinetik in der Expression, außerdem keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zwischen den Versuchsgruppen.

Die CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation exprimierte im Vergleich deutlich größere Mengen an GARP-mRNA. Es zeigte sich in beiden Versuchsgruppen eine Kinetik, die vom Basiswert an d0 einen Anstieg zu d1 und im Anschluss einen leichten Abfall der mRNA-Expression an d2 vermuten lässt. Die verstärkte Expression der GARP-mRNA ließ sich aber nur in der HC-Gruppe von d0 zu d1 mit statistischer Signifikanz nachweisen.

Alle anderen verglichenen Veränderungen innerhalb der HC- oder RA-Gruppe sowie der direkte Vergleich der Versuchsgruppen zu den Zeitpunkten d0, d1 und d2 waren jeweils nicht statistisch signifikant.

### 3.5 Durchflusszytometrie (GARP-Oberflächenexpression)

Um die Oberflächenexpression von GARP zu messen, wurde die FACS-Methode verwendet.

Hierbei wird (entweder direkt oder über einen sekundären Antikörper) zwischen dem zu untersuchenden Protein einerseits und einem Fluoreszenzfarbstoff andererseits (in der vorliegenden Arbeit FITC beziehungsweise PE) eine Antikörper-Antigen-Verbindung gebildet. Die so markierten Zellen werden mithilfe eines laminaren Flüssigkeitsstroms durch Laserstrahlen mit unterschiedlicher Wellenlänge transportiert. Da die angekoppelten Farbstoffe durch die Laserstrahlung zu einem spezifischen Fluoreszenzmuster angeregt werden, ist es hierbei auch möglich, mehrere Farbstoffe parallel einzusetzen, um gleichzeitig die Expression mehrerer verschiedener Oberflächenmoleküle zu untersuchen und anhand des erzeugten Fluoreszenzmusters Aussagen zur Oberflächenexpression des untersuchten Moleküls zu treffen.

In der vorliegenden Arbeit wurde dieses Verfahren sowohl zur Qualitätskontrolle (zur Bestätigung der Reinheit der gewonnenen Zellpopulationen) verwendet als auch bei der Untersuchung der GARP-Expression auf den Zellen.

Mit Hilfe der FACS-Analyse konnten sowohl Aussagen zum Anteil beziehungsweise der Frequenz der GARP<sup>+</sup>-Zellen innerhalb einer untersuchten Zellpopulation getroffen werden, als auch zur MFI (Mean Fluorescence Intensity), also der Menge an exprimiertem GARP auf der Zelloberfläche pro Zelle. Die MFI-Werte wurden für die Gesamtheit der Zellen einer Zellpopulation erhoben.

Darüber hinaus erfolgten Subanalysen bei den CD4<sup>+</sup>- und CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellpopulationen, in denen durch Gating der Ergebnisse nur die MFI von denjenigen Zellen erhoben wurde, die ein GARP<sup>+</sup>-Fluoreszenzmuster zeigten.



### 3.5.1 Anteil GARP<sup>+</sup>-Zellen

Innerhalb der drei kultivierten Zellpopulationen der CD4<sup>+</sup>-, CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup>- und CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>-Zellen wurde die Frequenz der GARP<sup>+</sup>-Zellen an den Versuchstagen d0 sowie d1 und d2, also nach 24-beziehungsweise 48-stündiger T-Zell-Stimulation (mit CD3/28 Beads und in Anwesenheit von IL-2) erhoben. So wurde ermittelt, in welchem Maß die Zellen der verschiedenen Zellpopulationen in einem inflammatorischen Milieu das GARP-Molekül exprimieren, um Aussagen zum funktionellen Verhalten der Zellen ableiten zu können.

#### 3.5.1.1 Anteil der GARP<sup>+</sup>-Zellen in der CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation

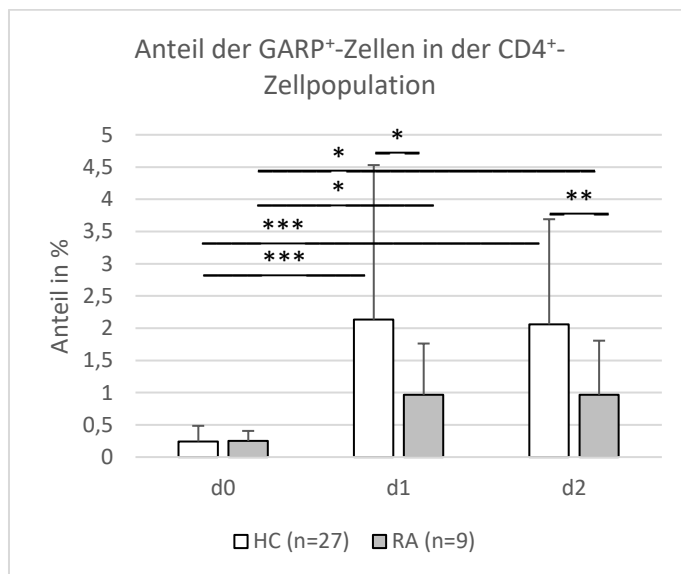
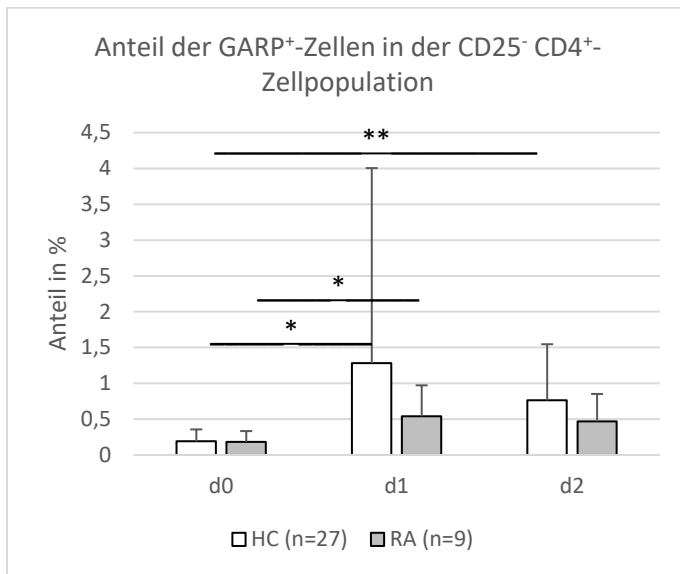


Abbildung 20: Anteil der GARP<sup>+</sup>-Zellen in der CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation

Wie aus Abbildung 20 ersichtlich, zeigten die Zellen unter T-Zell-Stimulation innerhalb der CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation in der HC- sowie der RA-Gruppe einen Anstieg der Häufigkeit an GARP<sup>+</sup>-Zellen. Der Anstieg des Anteils von GARP<sup>+</sup>-Zellen im Vergleich zwischen dem Basiswert von d0 und den Werten von d1 und d2 war jeweils hochsignifikant ( $p < 0,001$ ) in der Kontrollgruppe sowie jeweils signifikant ( $p < 0,05$ ) in der RA-Gruppe.

Während der Basiswert der beiden Gruppen sich an d0 nicht statistisch signifikant unterschied, regulierten die CD4<sup>+</sup>-Zellen der HC-Kontrollgruppe unter Stimulation die Frequenz der GARP<sup>+</sup>-Zellen an d1 und d2 (jeweils  $p < 0,05$ ) stärker hoch als die RA-Gruppe.

3.5.1.2 Anteil der GARP<sup>+</sup>-Zellen in der CD25<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>-ZellpopulationAbbildung 21: Anteil der GARP<sup>+</sup>-Zellen in der CD25<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation

In Abbildung 21 ist dargestellt, dass die Zellen der HC-Gruppe von d0 zu d1 ( $p < 0,05$ ) und d2 ( $p = 0,001$ ) jeweils einen statistisch signifikanten Anstieg des prozentualen Anteils an GARP<sup>+</sup>-Zellen zeigten. In der RA-Gruppe ließ sich ein solcher Anstieg von d0 zu d1 ebenfalls nachweisen ( $p < 0,05$ ). Im Vergleich zur CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation waren die Anstiege innerhalb der CD25<sup>-</sup>-Zellpopulation etwas geringer ausgeprägt sowie die Hochregulation zwischen der HC- und RA-Versuchsgruppe an d1 und d2 nicht signifikant verschieden.

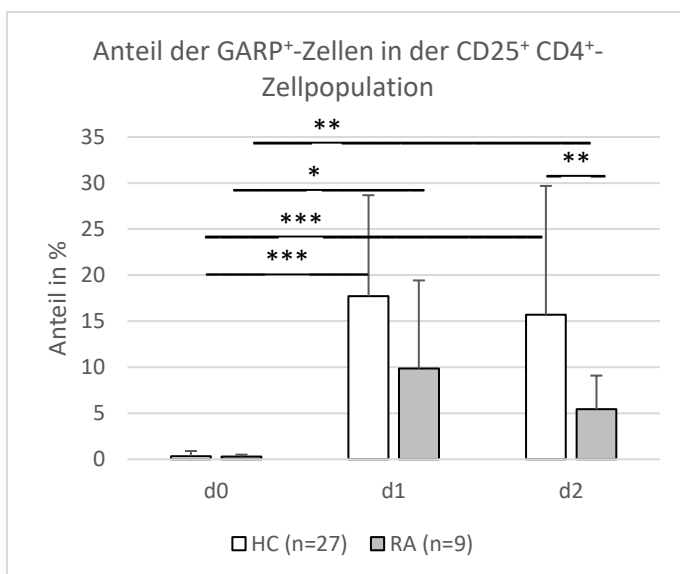
3.5.1.3 Anteil der GARP<sup>+</sup>-Zellen in der CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>-ZellpopulationAbbildung 22: Anteil der GARP<sup>+</sup>-Zellen in der CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation

Abbildung 22 sind die Anteile der GARP<sup>+</sup>-Zellen in der CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation zu entnehmen. Die HC-Gruppe zeigte vom Basiswert an d0 zu den Punkten d1 und d2 (jeweils  $p < 0,001$ ) jeweils einen

hochsignifikanten Anstieg der Frequenz der GARP<sup>+</sup>-Zellen. Ein ebenfalls signifikanter Anstieg ist hier auch für die Zellen der RA-Population nachweisbar ( $p < 0,05$  und  $p = 0,01$ ). Dennoch zeigt sich an d2, dass die Werte der HC-Gruppe signifikant ( $p < 0,01$ ) höher angestiegen waren als die der RA-Gruppe.

Insgesamt lässt sich darüber hinaus deutlich ablesen, dass sowohl der Anstieg der GARP-Expression als auch das generelle Niveau der Frequenz der GARP<sup>+</sup>-Zellen innerhalb der CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation weit höher lagen als in den CD4<sup>+</sup>- und CD25<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellpopulationen.

### 3.5.2 GARP-MFI

Nach Erhebung eines Basiswertes an d0 wurden die MFI (Mean Fluorescence Intensity, mittlere Fluoreszenzstärke) -Werte der drei kultivierten Zellpopulationen auch an d1 und d2 erhoben, um zu untersuchen, inwieweit die Zellen der jeweiligen Population im Laufe der Stimulation mehr Fluoreszenzaktivität aufweisen, was einer vermehrten Oberflächenexpression des GARP-Proteins entspricht.

#### 3.5.2.1 GARP-MFI der CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation

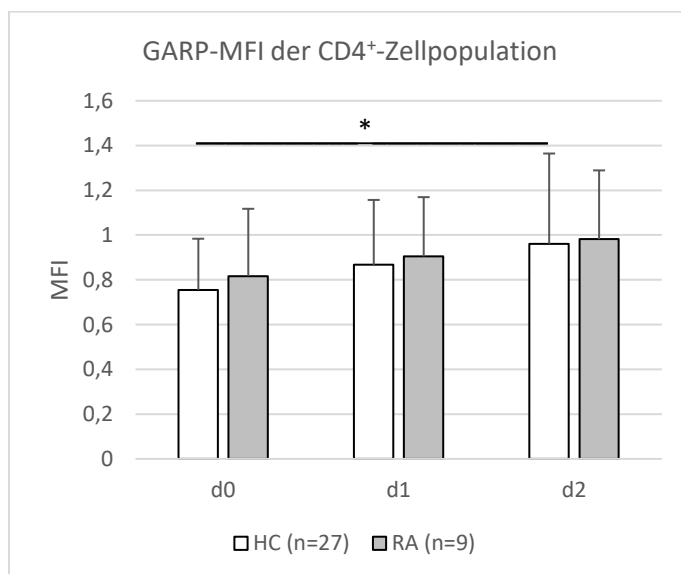


Abbildung 23: GARP-MFI der CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation

In Abbildung 23 sind die MFI-Werte von HC- und RA-Gruppe im Verlauf der 48-stündigen Stimulation dargestellt. Insgesamt zeigten die Zellen der CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation sowohl in der HC- als auch der RA-Gruppe einen Anstieg der GARP-MFI, dieser Anstieg war aber nur in der HC-Gruppe zwischen d0 und d2 signifikant ( $p < 0,05$ ) nachweisbar.

Die beiden Versuchsgruppen unterschieden sich an keinem der einzelnen Versuchstage signifikant hinsichtlich der GARP-MFI.

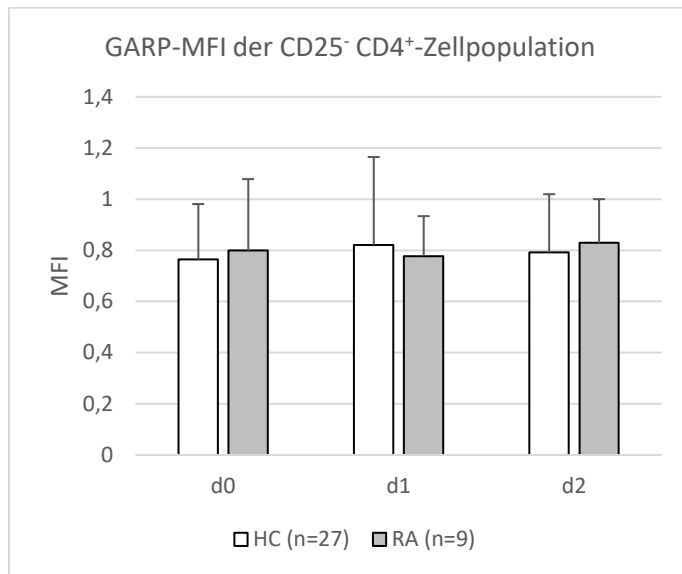
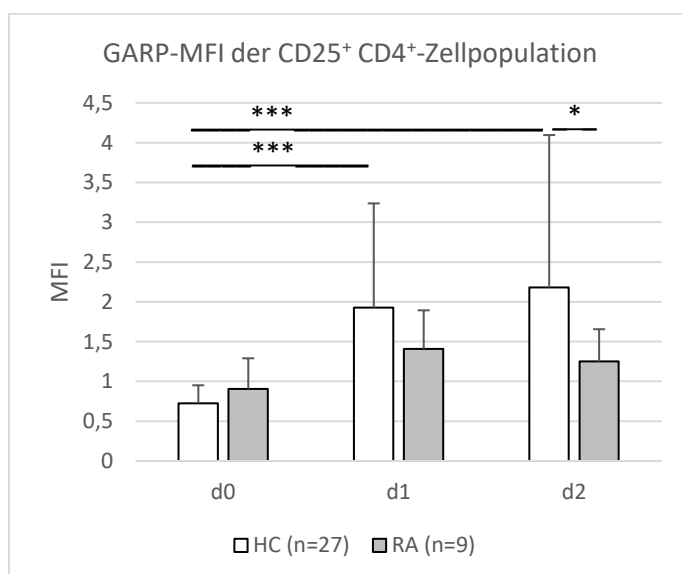
3.5.2.2 GARP-MFI der 25<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>-ZellpopulationAbbildung 24: GARP-MFI der 25<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation

Abbildung 24 zeigt die GARP-MFI der CD25<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation während der Versuchstage d0, d1 und d2. Die MFI blieb über den Versuchszeitraum konstant, es zeigte sich keine signifikante Veränderung der GARP-MFI. Ebenso zeigte sich kein Unterschied in der GARP-MFI beim Vergleich von RA- und HC-Gruppe.

3.5.2.3 GARP-MFI der 25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>-ZellpopulationAbbildung 25: GARP-MFI in der 25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation

Wie aus Abbildung 25 zu entnehmen ist, zeigten die Zellen der CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>-Population von HC- und RA-Gruppe einen Anstieg der GARP-MFI ab dem Basiswert von d0.

Während in der HC-Gruppe von d0 zu d1 sowie von d0 zu d2 (jeweils  $p < 0,001$ ) ein konstanter und hochsignifikanter Anstieg nachweisbar war, zeigte die CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>-Population der RA-Gruppe einen Anstieg der GARP-MFI von d0 zu d1, von d1 zu d2 jedoch wieder einen leichten Abfall der MFI. Weder der Anstieg von d0 zu d1 oder von d0 zu d2 noch der Abfall von d1 auf d2 waren statistisch signifikant.

An d2 unterschieden sich die GARP-MFI-Werte von HC- und GARP-Gruppe signifikant ( $p < 0,05$ ) voneinander.

### 3.5.3 GARP-MFI der GARP<sup>+</sup>-Zellen

Um die GARP-MFI der Zellen noch näher zu betrachten, erfolgte durch Gating auf die Subpopulation der GARP<sup>+</sup>-Zellen innerhalb der jeweiligen Zellpopulation eine Subanalyse, die nur die Veränderung der Stärke der GARP-Expression auf denjenigen Zellen zeigt, die GARP auch tatsächlich exprimieren. Bedingt durch dieses Gating wurde der Basiswert an d0 per Konvention als Startpunkt 0 definiert. Grund hierfür war die an d0 zu geringe Anzahl an GARP<sup>+</sup> Zellen, sodass hier kein valider Wert abgeleitet werden konnte. Aufgrund dieser Vorgehensweise erfolgte hier die statistische Testung ohne Berücksichtigung der Werte von d0.

#### 3.5.3.1 GARP-MFI der GARP<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation

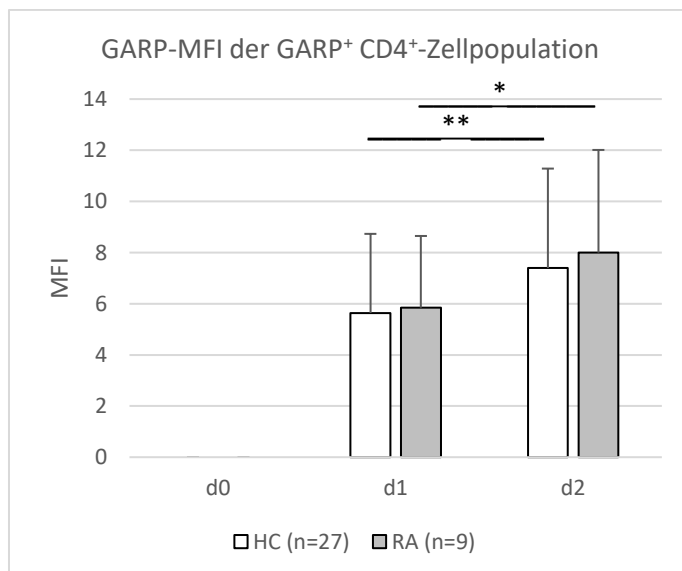


Abbildung 26: GARP-MFI der GARP<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation

Abbildung 26 zeigt, dass ausgehend vom (hier analysebedingten) Basiswert 0 an d0 die GARP<sup>+</sup>-Zellen von HC- und RA-Gruppe jeweils eine Hochregulation der GARP-MFI zu den Werten von d1 und d2 zeigten. Die Hochregulation zwischen d1 und d2 war in beiden Versuchsgruppen signifikant nachweisbar (HC:  $p < 0,01$ ; RA:  $p < 0,05$ ).

Zwischen den beiden Versuchsgruppen gab es dabei aber keine signifikanten Unterschiede in der Menge an exprimiertem GARP auf GARP<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellen.

### 3.5.3.2 GARP-MFI der GARP<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation

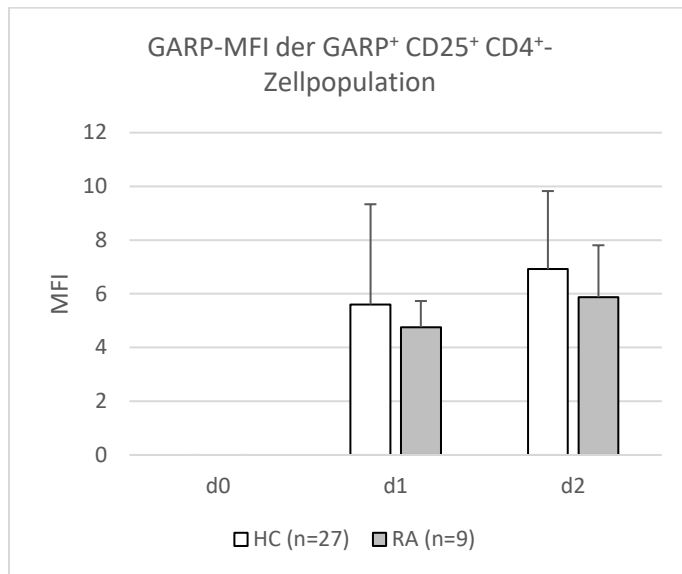


Abbildung 27: GARP-MFI der GARP<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation

Abbildung 27 zeigt verglichen mit Abbildung 26 eine identische Kinetik der Werte. Die Hochregulation der GARP-MFI von d1 zu d2 ließ sich hier allerdings nicht statistisch signifikant nachweisen.

### 3.5.4 Zusammenfassung der Ergebnisse zur GARP-Oberflächenexpression

Weder der Anteil GARP<sup>+</sup>-Zellen, noch die GARP MFI unterschied sich an d0 signifikant zwischen HC- und RA-Gruppe.

Nach Stimulation der an d0 isolierten Zellpopulationen erfolgte sowohl in der HC- als auch der RA-Versuchsgruppe eine Hochregulation von GARP. Diese Hochregulation ließ sich sowohl in Form einer Zunahme von GARP<sup>+</sup>-Zellen, insbesondere der CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation, aber auch in schwächerer Form der CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation nachweisen. Auf CD25<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellen konnte diese Entwicklung nicht mehr in ähnlichem Umfang nachgewiesen werden. Obwohl sowohl HC- als auch RA-Gruppe jeweils ähnliche Kinetik zeigten, war die Zunahme an GARP<sup>+</sup>-Zellen unter Stimulation in der HC-Gruppe stärker ausgeprägt.

Die MFI-Werte der CD4<sup>+</sup> sowie der CD25<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation wiesen im Verlauf der Zellstimulation kaum nachweisbare Veränderungen auf. Die Zellen der CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation exprimierten jedoch sowohl in der HC- als auch der RA-Gruppe im Verlauf deutlich stärker GARP auf der Zelloberfläche.

Die Zunahme der GARP-MFI ließ sich auch in einer Subanalyse der Zellpopulationen der GARP<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>- sowie GARP<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellen nachweisen.

## 4 Diskussion

### 4.1 Zusammenfassung der Hauptergebnisse

Für die vorliegende Studie wurden Serumproben, Zellproben von CD4<sup>+</sup>-, CD25<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>- sowie CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>- Zellpopulationen von insgesamt 9 RA-Patienten und 27 HC-Kontrollen isoliert. Die HC- und RA-Gruppen unterschieden sich bezüglich Alters- und Geschlechtsverteilung nicht signifikant. Die Zellpopulationen wurden über insgesamt 48 h kultiviert und stimuliert. Gemessen wurde die Serum-miR-Expression an d0 sowie die zellulär exprimierte miR-146a, miR-155, miR-223, miR-142-3p und GARP-mRNA an d0, d1 und d2 des Versuchs. Ebenso wurde an d0, d1 und d2 die Expression von GARP auf den Zellen gemessen.

Das Expressionsniveau der miR-146a in T-Zellen der RA-Patienten war, insbesondere in CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellen hochsignifikant nachweisbar, an allen drei Messzeitpunkten niedriger als bei der HC-Kontrollgruppe. Die miR-146a zeigte bei CD25<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>- und CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellen eine verminderte Expression an d1 und d2 im Vergleich zu d0.

Die Zellen der RA-Patienten zeigten eine geringere Hochregulation von miR-155 als die Zellen der HC-Kontrollgruppe. Die miR-155 zeigte bei allen untersuchten Zellpopulationen eine deutliche Zunahme, welche im zeitlichen Verlauf im Vergleich statistisch nachweisbar war.

Für die Untersuchung der miR-223 waren weder im zeitlichen Verlauf innerhalb der Versuchsgruppen noch zwischen der RA- und HC-Gruppe statistisch signifikante Unterschiede nachweisbar.

Die Expression der miR-142-3p zeigte von d0 zu d1 und d2 eine Herabregulation in allen Zellpopulationen der HC-Versuchsgruppe. Bei den RA-Patienten dagegen stieg die Expression in CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellen an d1 an, bevor sie an d2 wieder abfiel. Es zeigte sich deskriptiv eine etwas höhere Expression von miR-142-3p in der CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation der RA-Patienten als bei der HC-Kontrolle, es konnten jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden.

Die miR-146a war im Serum der RA-Patienten in geringerer Menge vorhanden als bei den HC-Kontrollen, auch hier waren die Unterschiede jedoch nicht signifikant. Anders zeigte sich die Serum-miR-155, die, im Gegensatz zu den intrazellulär gemessenen Mengen bei RA-Patienten, stärker exprimiert war. Ebenso wurde die Serum-miR-223 in der HC-Gruppe signifikant stärker exprimiert. Bei der Untersuchung der Serum-miR-142-3p zeigte die RA-Gruppe, wie bereits bei der Untersuchung der intrazellulären miR, eine leicht erhöhte miR-Expression. Auch im Serum war diese jedoch nicht signifikant nachweisbar.

Auf der Ebene der mRNA-Expression zeigten die CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellen einen deutlich stärkeren Anstieg an GARP-mRNA als die CD25<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellen. Es ließen sich im Vergleich von RA- und HC-Gruppe keine signifikanten Unterschiede finden.

Unter Stimulation kam es bei CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellen zur Hochregulation des Anteils von GARP<sup>+</sup>-Zellen sowie zu einem Anstieg der GARP-MFI. Diese Hochregulation konnte sowohl in der Gesamtzellpopulation der CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellen, als auch für die GARP<sup>+</sup>-Zellen innerhalb der Population gezeigt werden. Sie ließ sich darüber hinaus auch bei CD4<sup>+</sup>-Zellen nachweisen, bei CD25<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellen war sie hingegen nicht eindeutig nachweisbar.

Bei der Messung der GARP-Expression auf den Zellen zeigte sich an d0 kein Unterschied zwischen HC- und RA-Gruppe in der Proteinexpression. Trotz vergleichbarer Kinetik der Hochregulation von GARP in RA- und HC-Gruppe fiel die Hochregulation bei der RA-Gruppe signifikant niedriger aus als in der HC-Gruppe.

## 4.2 Diskussion der Methoden

### 4.2.1 Einschluss der Versuchspersonen

Der Einschluss von Versuchspersonen in die Studie erfolgte anhand der derzeit üblichen Standards zur frühen Klassifikation der Rheumatoiden Arthritis durch den EULAR/ACR Score aus dem Jahr 2010. Darüber hinaus wurden auch Patienten in die Studie rekrutiert, bei denen von erfahrenen klinischen Rheumatologen die Diagnose einer RA gestellt und eine Methotrexat-Therapie eingeleitet wurde.

Die mangelnde Spezifität der EULAR/ACR 2010 Klassifikationskriterien wurde durch eine zweite Analyse der Patientenakten nach Abschluss der experimentellen Versuchsphase kompensiert, in der Patienten, bei denen sich die Erstdiagnose einer RA nicht eindeutig bestätigen ließ, von der Auswertung ausgeschlossen wurden. Eine methodische Stärke der vorliegenden Arbeit ist daher die Rekrutierung eines homogenen Patientenkollektivs, bei dem sich auch im Follow-up die Diagnose einer RA bestätigen ließ.

Die Auswahl der HC-Kontrollgruppe orientierte sich an der Geschlechts- und Altersverteilung der rekrutierten RA-Patienten. Es wurde versucht, durch Matching nach Alter und Geschlecht von einer ausreichend großen Zahl gesunder Probanden (Verhältnis  $n(\text{RA}) : n(\text{HC}) = 1 : 3$ ) objektive Daten zu generieren. Auch in der RA-Testgruppe wurde initial eine höhere Fallzahl angestrebt. Nachdem aber nur Patienten mit initial sehr wahrscheinlicher RA in die Studie rekrutiert wurden und im Rahmen der bereits erwähnten, nachträglichen Evaluation des Krankheitsverlaufs ein Dropout von 50 % der initial rekrutierten Patienten zustande kam, konnten letztendlich zur Datenauswertung nur die Werte von insgesamt neun RA-Patienten herangezogen werden.

Trotz des geringen Stichprobenumfangs generierten die Experimente jedoch Daten, die teils hochsignifikante Ergebnisse lieferten und damit zur Beantwortung der im Rahmen dieser Arbeit behandelten Forschungsfragen einen wichtigen Beitrag leisteten.

In einigen Bereichen zeichneten sich anhand der erhobenen Daten bereits gewisse Trends ab, die sich möglicherweise bei zu geringer Fallzahl nicht statistisch belegen ließen. Gerade diese Daten könnten als Grundlage der Hypothesen-Generierung für weitere Forschungsvorhaben an größeren Kollektiven genutzt werden. Hier wäre beispielhaft die Untersuchung der Serum-miR-Expression zu nennen, die sich hervorragend zur Testung an großen Patientenkollektiven eignen würde, zumal vergleichsweise wenig Untersuchungsmaterial nötig ist und die Aufbereitung der Proben technisch einfach realisierbar wäre.

### 4.2.2 Zellisolation

Zur Isolation der gewünschten Zellpopulationen der  $\text{CD4}^+$ -,  $\text{CD25}^- \text{CD4}^-$  sowie  $\text{CD25}^+ \text{CD4}^-$ -Zellen war ein aufwändiges Vorgehen in vier Teilschritten notwendig: Die Isolation von PBMC-Zellen mit Hilfe der Ficoll-Dichtegraduierung, die Isolation von T-Lymphozyten durch Rosettierung mit Schafserythrozyten, erneute Dichtegraduierung und anschließende hypertone Zellyse sowie anschließend zwei MACS-Selektionen (Negativselektion von  $\text{CD4}^+$ -, Negativ/Positivselektion von  $\text{CD25}^- \text{CD4}^-$  und  $\text{CD25}^+ \text{CD4}^-$ -Zellen).

Bereits durch das aufwändige Vorgehen wird deutlich, dass versucht wurde, die untersuchten  $\text{CD25}^+ \text{CD4}^-$ -Zellen in maximaler Ausbeute und gleichzeitig größtmöglicher Reinheit zu isolieren. Insgesamt ließ sich so üblicherweise eine Reinheit von  $\geq 85\%$   $\text{CD25}^+ \text{CD4}^-$ -Zellen in der Population erreichen, was



für eine insgesamt ausreichend exakte Trennung der Zelltypen spricht. Eine weitergehende Aufreinigung der zu analysierenden Zelltypen wäre theoretisch zwar wünschenswert und technisch möglich (z.B. anhand FACS-basiertem Zellsorting), hierzu ist jedoch kritisch anzumerken, dass einerseits zwar die Reinheit der Zellen gesteigert werden könnte, gleichzeitig aber die Zellausbeute bei Weitem nicht vergleichbar mit der verwendeten MACS-Separation gewesen wäre. Gerade, da die Menge an isoliertem Zellmaterial bei einer zahlenmäßig eher kleinen T-Zellpopulation wie Tregs eine erwartbare technische Herausforderung darstellte, wurde daher die gegebene Reinheit zu Gunsten der Zellausbeute toleriert.

Trotz des beschriebenen Vorgehens waren häufig die Absolutzellzahlen ein limitierender Faktor der Analysen: Bedingt durch das begrenzte Blutprobenvolumen war es gerade bei Patienten mit geringer Leukozytenzahl nicht möglich, ausreichend Probenmaterial für alle Einzelanalysen des Versuchsaufbaus zu gewinnen. Während für das FACS-Oberflächenstaining vergleichsweise geringe Zellzahlen benötigt wurden, waren insbesondere die Analysen auf RNA-Ebene durch die isolierten Zellmengen limitiert.

Für weitergehende Untersuchungen der Thematik wäre daher gegebenenfalls ein modifizierter Versuchsaufbau nötig: In einem zweiarmigen Ansatz könnte jeweils die Messung der GARP-Oberflächenexpression erfolgen, die Erhebung von GARP-mRNA und der untersuchten miRs sollte getrennt durchgeführt werden, um jeweils ausreichend Probenmaterial zu generieren. Eine weitere Möglichkeit, die Ausbeute an isolierten CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>- und CD25<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellen zu steigern, wäre, auf die getrennte Kultivierung der CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation zu verzichten. Dazu ist allerdings kritisch anzumerken, dass durch ein solches Vorgehen die Ausbeute an CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>- und CD25<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellen zwar geringfügig steigerbar wäre, jedoch um den Preis des Verlusts der CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation als Vergleichspopulation im FACS-Oberflächenstaining, weshalb dieser Ansatz nicht verfolgt wurde.

#### 4.2.3 RNA-Untersuchungen

Alle RNA-Untersuchungen wurden mit Hilfe von kommerziell erhältlichen Kits realisiert. Sämtliche Messungen wurden in Form von Duplikaten realisiert. Die Normierung erfolgte jeweils auf endogen konstitutiv exprimierte „housekeeper“ von mRNA (Cyclophilin) und RNUs (RNU6b, RNU48) sowie im Falle der Serum-miR auf die zu Beginn der Serum-miR-Extraktion zugegebene miR-39, um die relative Expression der untersuchten RNAs wiederzugeben. Durch die so durchgeführte Normierung wurden die Ergebnisse unabhängig von Unterschieden in der Menge der asservierten Zellen und auch der Menge an extrahierter RNA.

Sofern die Quantifizierung der RNAs aufgrund der Notwendigkeit zusätzlicher Zwischenschritte nicht direkt erfolgen konnte, wurde die Reaktion der Zwischenschritte getrennt bestätigt: nach reverser Transkription der RNA zu cDNA erfolgte eine Gelelektrophorese des amplifizierten Cyclophilin-Gens als Qualitätskontrolle, um die Reaktion zu überprüfen. Nur wenn die Bande in der Gelelektrophorese für alle Reaktionsansätze sichtbar war, wurde das revers transkribierte Material weiterverwendet, ansonsten wurde die reverse Transkription wiederholt.

Die quantitative Real-Time-PCR stellt seit Jahren das Standardverfahren zur Messung von Nukleotid und Nukleosidsequenzen dar. Auch aufgrund der Qualitätskontrollen, die zur Validierung und Normalisierung verwendet wurden, sowie der Tatsache, dass spezifische, kommerziell erhältliche Kits zur Vorbereitung und Messung der Proben verwendet wurden, können die erhobenen RNA-Daten als ausreichend reliabel angesehen werden.

#### 4.2.4 FACS-Durchflusszytometrie

Sowohl die Reinheit der gewonnenen Zellpopulationen als auch die Oberflächenexpression des untersuchten GARP wurde mit Hilfe von FACS-Durchflusszytometrie erhoben. Zur Reinheitskontrolle wurden hier die Oberflächenantigene CD3, CD4 und CD25 bestimmt. Zellen mit CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>-Antigenexpression wurden wie in diversen anderen Publikationen [19, 28, 32, 135] auch für diese Arbeit als Tregs gewertet. Allerdings konnte, wie bereits in 1.1.2 und 2.10 ausführlich ausgeführt, nachgewiesen werden, dass Foxp3 als Transkriptionsfaktor die Treg-Population noch eindeutiger definiert als deren Oberflächenantigen-Expressionsprofil [37-40]. Zugunsten der technischen Realisierbarkeit wurde diese methodische Limitation dennoch in Kauf genommen und der Zellcharakterisierung anhand von Oberflächenproteinen der Vorzug vor einer intrazellulären Foxp3-Bestimmung gegeben. Das zusätzliche, intrazelluläre FACS-Staining hätte zu große Probenmengen erfordert, die stattdessen für die Durchführung der molekularbiologischen Untersuchungen benötigt wurden.

Auch eine Reihe weiterer Moleküle wurde in der Vergangenheit bereits zur Charakterisierung des Phänotyps von Tregs herangezogen [34]. Um die Zellpopulation bei guter experimenteller Adressierbarkeit noch enger eingrenzen zu können, wäre für weitere Forschungsvorhaben beispielsweise die zusätzliche standardmäßige Miterfassung des CD127- und/ oder CTLA-4-Moleküls geeignet. Damit könnten neben der Messung von CD3, CD4 und CD25 als Reinheitskontrolle weitere Oberflächenmoleküle erfasst werden (statt des nur aufwändig bestimmbaren intrazellulären Foxp3), von denen bereits gezeigt wurde, dass ihre Expression invers mit der intrazellulären Foxp3-Expression korreliert [74, 142, 143] beziehungsweise funktionell für die Tregs relevant ist [49, 144].

Stichprobenkontrollen der CD127-Expression zeigten jedoch ebenfalls eine ausreichende Reinheit der isolierten Zellpopulationen. Dies liegt mit großer Wahrscheinlichkeit in der verwendeten Methode zur Zellisolation begründet, da bei der MACS-Isolation der CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation bereits CD127<sup>high</sup>-Zellen durch biotinylierte Antikörper gebunden und durch die anti-Biotin-Microbeads ausselektiert werden (vgl. hierzu Herstellerangaben und Gebrauchsanweisung des „Regulatory T-cell isolation kit II, human“, Miltenyi Biotech).

#### 4.2.5 Datenauswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte anhand des Student's t-Test unter der Annahme einer Normalverteilung der Daten.

Durch Limitierung der statistischen Testung auf die Vergleichstests, die für die Beantwortung der Hypothesen relevant waren (nur die Kinetik innerhalb der jeweils untersuchten Versuchsgruppe sowie die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen zu den drei Messzeitpunkten d0, d1 und d2 wurden getestet) wurde versucht  $\alpha$ -Fehler zu minimieren, eine Korrektur des p-Wertes für multiples Testen wurde nicht durchgeführt.

### 4.3 Diskussion der Ergebnisse

#### 4.3.1 RNA-Untersuchungen

##### 4.3.1.1 miR-Expression

##### 4.3.1.1.1 miR-146a und miR-155

Die miR-146a, miR-155 und miR-223 sind bekanntermaßen an der Regulation von angeborenem und erworbenem Immunsystem beteiligt [145]. Eine veränderte Expression der miR-146a und miR-155 war im Kontext der RA bereits längere Zeit für verschiedene Zellen, beispielsweise Fibroblasten oder Synovialgewebe, bekannt [119].

Die vorliegenden Daten zur miR-Expression zeigen, dass die T-Zellen der RA-Patienten bei Probenahme weniger miR-146a und miR-155 als die HC-Vergleichskontrollen exprimierten. Dieser Unterschied war für die miR-146a in der CD25<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation, anders als in der CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation, zwar nicht statistisch signifikant, trotzdem aber angedeutet sichtbar.

Unter T-Zell-Stimulation war die verminderte miR-146a-Expression in CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellen von RA-Patienten noch deutlicher nachweisbar. Die Daten deuten darauf hin, dass insbesondere CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, möglicherweise aber auch CD25<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>-T-Zellen von RA-Patienten im aktivierten Zustand weniger miR-146a exprimieren als die Zellen gesunder Probanden.

Die miR-155 wurde in RA-Zellen (in beiden Zellpopulationen, CD25<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>- und CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellen) bereits bei Probenentnahme in signifikant niedrigerer Menge exprimiert. Wie bereits bekannt [58], regulierten sowohl die HC- als auch RA-Zellen die Expression der miR-155 hoch, dennoch blieb die in RA verminderte miR-155-Expression auch nach der 48-stündigen T-Zell-Stimulation in der Population der CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellen noch signifikant nachweisbar.

Einige andere Studien hatten, im Widerspruch zur vorliegenden Arbeit, eine Hochregulation für miR-146a und miR-155 im Kontext der RA gezeigt. In den Publikationen wird miR-146a generell als anti-, miR-155 dagegen als proinflammatorisch angesehen. [55, 129, 132, 146, 147]

Um die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit in den Kontext der vorhandenen Studien einzuordnen, werden im Folgenden einige Publikationen detailliert betrachtet:

Eine Veröffentlichung von Staczyk et al. zeigte die Hochregulation der beiden miRs (miR-146a und miR-155) bei RA-Patienten im Vergleich zu Patienten mit Arthrose (OA = Osteoarthritis, Arthrose) [119]. Die Fallzahlen dieser Arbeit waren allerdings mit maximal sieben eingeschlossenen Patienten generell geringer als im Versuchsaufbau der vorliegenden Arbeit.

Noch entscheidender ist jedoch die Tatsache, dass sich die Publikation auf die Analyse an Synovialgewebe beschränkte.

Darüber hinaus geht die Studie nicht auf die Möglichkeit ein, dass die Ergebnisse durch die Wahl von OA-Patienten als Kontrollgruppe verfälscht sein könnten: Obwohl die OA als chronisch degenerative Verschleißerkrankung zweifelsohne primär von anderer Pathogenese als die inflammatorische Genese im Setting der RA ist, kann auch bei OA das Vorhandensein einer sterilen Inflammation generell nicht ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund eignen sich Patienten mit OA auch nur begrenzt als Kontrollgruppe zur RA. Gesunde Probanden wurden nicht als Kontrollen herangezogen, mutmaßlich weil sich hier die invasive Gewinnung von Synovialgewebe ethisch nur schwer rechtfertigen ließe. [119]

Eine andere Untersuchung zur miR-155 zeigte in Atopischer Dermatitis, dass die miR in Hautgewebe, das aus Läsionen entnommen worden war, stärker exprimiert wurde als in unauffälligen Hautregionen [148]. Darüber hinaus konnten die Autoren nachweisen, dass die Hochregulation der miR-155 auf der Expression der miR in T-Zellen beruhte. Obwohl in der Arbeit auch Tregs untersucht wurden, liefert die

Publikation keine Daten zur Frage, ob die miR-155 in gleicher Weise in CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>- und CD25<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellen exprimiert wurde.

Weiterhin erfolgte in der Studie nur die Untersuchung solider Gewebe und keine Testung von Blutproben, weshalb die Daten nur schwer mit den vorliegenden Ergebnissen verglichen werden können.

Die Publikation ist dennoch auch für die chronische Inflammation im Allgemeinen sowie die RA im Speziellen beachtenswert, weil die Studie im Kontext der Atopischen Dermatitis mit der Suppression von CTLA-4 einen wichtigen Mechanismus identifizieren konnte, über den die T-Zellproliferation durch miR-155 beeinflusst wird. [148]

In einer weiteren Veröffentlichung zur miR-146a-Expression in Synovialgewebe von Nakasa et al. wurde lediglich die Expression am Tag der Gewebeentnahme erfasst, die Studie umfasst darüber hinaus nur fünf Patienten mit einer einzigen gesunden Kontrolle [118]. Diese Veröffentlichung zeigt bezüglich der miR-Expression in T-Zellen, nachgewiesen durch in-situ-Hybridisierung, dass CD3<sup>+</sup>-Zellen die miR-146a exprimieren.

Dadurch werden die vorliegenden Daten insofern bestätigt, dass auch hier eine Expression von miR-146a sowohl in CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>- als auch CD25<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellen nachgewiesen werden konnte. Eine detailliertere Subanalyse der T-Zell-Populationen erfolgte in der Arbeit von Nakasa et al. jedoch nicht, ebenso wird lediglich die in-situ-Hybridisierung und damit keine Quantifizierung der miR gezeigt. [118]

Eine Studie mit 16 eingeschlossenen RA-Patienten untersuchte die miR-Expression in PBMC-Zellen. Hierbei fanden die Autoren Pauley et al. im Vergleich zu HC, aber auch zu anderen Erkrankungsentitäten, in RA eine erhöhte miR-146a- und miR-155-Expression vor. [130]

Verglichen mit der vorliegenden Arbeit erfolgte die Auswahl der Patienten auch bei Pauley et al. zwar anhand der ACR Klassifikationskriterien für RA, allerdings wurde nicht zwischen behandelter und unbehandelter RA differenziert. Die Tatsache, dass bei Einschluss 13 der 16 Patienten bereits eine antiinflammatorische Therapie erhielten, kann daher eventuell erklären, dass ein gegensätzlicher Trend zu den Ergebnissen dieser Dissertation zu sehen war: Während im Rahmen unserer Studie lediglich Patienten mit frisch diagnostizierter, aktiver und noch nicht ärztlich behandelter RA eingeschlossen wurden, bildet die Publikation von Pauley et al. hauptsächlich ein Patientengut ab, das nicht nur mit rheumatologischen Basistherapeutika wie Methotrexat behandelt wurde, sondern häufig sogar Kombinations- oder Biological-Therapeutika erhielt. [130] Es drängt sich daher die Frage auf, ob die in der Studie nachgewiesene miR-146a-Hochregulation möglicherweise weniger den generellen RA-Pathomechanismus als vielmehr eine Wirkungsweise oder Folge der verabreichten pharmakologischen Therapie abbildet.

Abgesehen von der Auswahl des Patientenkollektivs fällt auf, dass auch diese Studie lediglich die Basis-miR-Expression bei Entnahme der Zellproben untersucht. Diese Expression entspricht dem Messpunkt d0 der vorliegenden Ergebnisse. Hierbei exprimierten die T-Zellen beider untersuchter Zellpopulationen von RA-Patienten weniger miR-155, HC- und RA-Gruppe unterschieden sich aber bezüglich der miR-146a-Expression nicht.

Um die Ergebnisse der Publikation um Pauley et al. mit den vorliegenden Ergebnissen zu vergleichen, müssen außerdem noch zwei weitere Punkte kritisch betrachtet werden:

Zum einen wurde mit PBMC-Zellen eine sehr große und relativ inhomogene Zellpopulation für die Analysen gewählt.

Auffällig ist außerdem, dass in der Publikation von Pauley et al. mehrere Proben eines einzigen Spenders verwendet wurden, was aus statistischer Sicht zumindest kritisch hinterfragt werden muss.

Eine weitere Veröffentlichung um Li et al. liefert, verglichen mit den bisher genannten Studien, präziser vergleichbare Daten für die Fragestellung zur Expression der miR-146a [128]. Es erfolgte hierbei nur ein Einschluss von Patienten mit unbehandelter RA, außerdem waren die Fallzahlen mit einem

Einschluss von 20 RA-Patienten und 12 HC-Kontrollen im Vergleich zu den bereits genannten Arbeiten erheblich größer. Die gewählten Methoden für Zellisolation und Messung der miR waren mit dem Versuchsansatz der vorliegenden Arbeit weitestgehend identisch.

Im Rahmen der Experimente zur vorliegenden Arbeit wurden die Zellen jedoch aus Vollblut statt Synovialflüssigkeit isoliert, was möglicherweise erklären kann, dass sich im Rahmen unseres Versuches direkt nach Zellisolation keine signifikanten Unterschiede in der miR-146a-Expression zwischen HC- und RA-Gruppe nachweisen ließen.

Unabhängig vom Versuchsaufbau bleibt es allerdings spekulativ, ob die vorliegenden Daten mit größerer statistischer Power ebenfalls die von Li et al. gezeigte Überexpression von miR-146a hätte zeigen können.

Bezüglich der Übertragbarkeit der Publikation auf die vorliegenden Ergebnisse muss außerdem mit einbezogen werden, dass Li et al. die miR-Expression in der Gesamtheit der CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation ermittelten, während in unserem Versuchsansatz durch die Unterteilung der CD4<sup>+</sup>-Zellen in CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>- und CD25<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellen nachgewiesen werden konnte, dass sich die Kinetik innerhalb der CD4<sup>+</sup>-Zellen inhomogen verhält. [128]

Auffällig ist, dass alle bisher genannten Studien, die an Synovialgewebe durchgeführt wurden, die relative miR-Expression mit Normalisierung zu Let-7 angeben. Eine schwankende Expression dieser internen Kontrolle ist jedoch bereits gezeigt worden [128]. Es entsteht somit eine Verzerrung der Ergebnisse durch die Nutzung des instabil exprimierten Let-7 als Kontrolle. [149]

In der vorliegenden Arbeit wurde aus diesem Grund, statt der alleinigen Normalisierung auf Let-7, jeweils eine doppelte Normalisierung auf RNU6b und RNU48 durchgeführt, um stets zwei unabhängige Kontrollen zu verwenden. Hierbei zeigten sich tatsächlich meist vergleichbare Trends, allerdings waren die Unterschiede in der Expression der jeweiligen miRs teilweise auf verschiedenen Signifikanzniveaus statistisch nachweisbar.

In allen bisher genannten Publikationen wurde auf die Ermittlung einer kompletten Verlaufskinetik der miR-Expression in nativen T-Zellen einzelner Spender unter Zellstimulation verzichtet, weshalb diesbezüglich keine Vergleichsdaten zu den vorliegenden Ergebnissen abgeleitet werden können. Gerade die funktionelle Testung des miR-Expressionsverhaltens von T-Zellen und deren Subpopulationen in einer simulierten proinflammatorischen Umgebung ist jedoch zwingend nötig, um ein grundlegendes Verständnis der pathophysiologischen Bedeutung von miRs zu erhalten. Nur durch die Erforschung der Kinetik der miR-Expression kann neben der Bedeutung der miRs für die quantitative posttranskriptionelle Regulation möglicherweise auch eine Beteiligung an der zeitlichen Feinregulation der Proteinexpression nachgewiesen werden.

Sofern in den genannten Studien eine Zellstimulation durchgeführt wurde, wurden Zelllinien oder gepoolte Zellpopulationen mehrerer Spender verwendet. Ein solcher Ansatz ist aus technisch-experimenteller Sicht durchaus sinnvoll, da die Zellkultur und Stimulation von T-Zellen aus Vollblutproben eines einzelnen Spenders aufgrund der geringen Zellzahlen und niedriger Proliferationsraten nativer T-Zellen anspruchsvoll und nicht in allen Fällen möglich sind. Gerade aufgrund der Unterschiede zwischen so generierten Daten und der tatsächlichen Expression in vivo sollten Ergebnisse, die in Zelllinien generiert wurden, allerdings nicht unkritisch auf die Verhältnisse im physiologischen oder pathophysiologischen Kontext übertragen werden.

Abschließend bleibt zusammenzufassen, dass die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit in Zusammenschau mit der bisherigen Forschungslage deutliche Hinweise darauf liefern, dass die miR-146a und miR-155 in Tregs von RA-Patienten dereguliert sind.

Dies erscheint plausibel, angesichts der für miR-146a bereits identifizierten Targets wie IRAK1, TRAF6 oder IL-1 und der damit verbundenen pleiotropen Interaktion mit dem TNF- und NF- $\kappa$ B-Signalweg [125, 150].

Außerdem konnte für miR-146a eine deutliche Überexpression in den IL-17 produzierenden Zellen gezeigt werden, die eine entscheidende Rolle im RA-Pathomechanismus einnehmen [151]. Dass sowohl die Arbeit von Pauley et al. [130] als auch Mitglieder des Rheumaforschungslabors am KUM [131] jedoch nachweisen konnten, dass TRAF6 und IRAK1 in Patienten und Kontrollen trotz unterschiedlicher miR-Expression in gleichem Maß exprimiert werden, zeigt, dass die Interaktionen der miR-146a in der Immunregulation noch umfangreicher sind als bisher angenommen.

Die miR-146a bildet daher auch für die weitere Forschung ein wichtiges Tätigkeitsfeld. Möglicherweise kann der Vergleich verschiedener inflammatorischer Entitäten dabei helfen, die komplexen Wirkmechanismen der miR-146a zu entschlüsseln und weitere, klinisch relevante, Targets zu identifizieren.

Ähnlich stellt sich die Situation im Fall der miR-155 dar, deren Involvierung in inflammatorische Vorgänge sowie die Gelenkerstörung durch Matrixmetalloproteasen bereits bekannt war [119, 134, 152-154]. Auch eine Hochregulation der miR-155 in Immunzellen durch Inflammation war bereits beschrieben worden [155], ebenso wie eine Deregulation im autoimmunen Kontext [134, 148]. Die miR-155 konnte in verschiedenen Publikationen mit wichtigen Targets, beispielsweise CTLA-4, das die Aktivität von Effektor T-Zellen herunterreguliert [148], dem TNF $\alpha$ - [156] sowie TLR/IL-1-Signalweg in Verbindung gebracht werden, den die miR im Sinne eines Negativfeedbacks herunterreguliert [157]. Nichtsdestotrotz sind auch für die miR-155 noch nicht alle biologischen Targets identifiziert und insbesondere die Relevanz der Interaktionen noch nicht geklärt. Fest steht, dass die miR-155 grundsätzlich an der Feinsteuerung und zeitlichen Koordination inflammatorischer Reaktionen beteiligt ist. [158]

Die vorliegende Arbeit weist in RA eine verminderte miR-155-Expression, insbesondere in CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellen nach. Diese Tatsache ist auch und gerade deshalb von besonderer Bedeutung, weil eine Regulation der miR-155 durch Foxp3 als zentralem Transkriptionsfaktor der Tregs nachgewiesen worden ist [122, 133]. Die vorliegenden Ergebnisse könnten daher ein Hinweis darauf sein, dass die Tregs in RA durch aberrante miR-155-Expression fehlreguliert werden und diese Fehlregulation möglicherweise in einer Veränderung des zentralen Treg-Transkriptionsfaktors Foxp3 begründet liegt. Weitere Forschung, insbesondere zur Korrelation zwischen Foxp3-Expression und miR-155-Expression im Kontext der RA, wäre daher unabdingbar, da die Foxp3-miR-155-Interaktion einen vielversprechenden Angriffspunkt für molekularbiologische Therapieoptionen darstellen könnte.

#### 4.3.1.1.2 miR-223

Für die Expression der miR-223 konnten keine Unterschiede zwischen HC- und RA-Gruppe gezeigt werden. Die vorliegenden Daten konnten somit die Hochregulation der miR, die von anderen Arbeitsgruppen im Kontext der RA gezeigt worden war, nicht bestätigen [159, 160].

Eine Publikation von Fulci et al. hatte durch Microarray-Testung die miR-223 in T-Zellen als potenziell dereguliert identifiziert und diese Vermutung anschließend durch Real-Time-PCR bestätigt [159]. Viele der eingesetzten Methoden entsprechen weitgehend dem auch für die vorliegende Studie gewählten Versuchsansatz, beispielsweise die Normalisierung der miR-Expression zur RNU6b. Auch die Gruppe um Fulci schloss Patienten unter DMARD-Therapie oder Biological-Medikation aus der Untersuchung aus, um ein homogenes Patientenkollektiv zu generieren. Im Gegensatz zu den Einschlusskriterien der vorliegenden Arbeit, die keinerlei ärztliche Vormedikation erlaubten, schloss die Arbeitsgruppe um Fulci jedoch auch Patienten mit NSAR- oder Glukokortikoid-Therapie in die Analyse mit ein.

Weiterhin unterschieden sich die untersuchten Patientenkollektive erheblich bezüglich Alter und Erkrankungsdauer.

Der relevanteste Unterschied bezüglich des Patientenguts dürfte jedoch in den angewendeten Klassifikationskriterien der RA liegen, nachdem für dieser Arbeit die aktuell gültigen ACR/EULAR 2010 Klassifikationskriterien der RA [104] zugrunde gelegt wurden, während in der von Fulci et al. veröffentlichten Studie Patienten nach den ARA/ACR-Kriterien aus dem Jahr 1987 [103] eingeschlossen wurden. [159]

Eine weitere Arbeit von Lu et al. zeigte ebenfalls eine erhöhte miR-223-Expression in humanen T-Zellen bei RA [160], wenngleich deutlich niedriger als in der zuvor genannten Arbeit [159]. Die Autoren selbst geben hierzu als mögliche Gründe für die differierenden Ergebnisse beider Studien an, dass die taiwanesischer Forschergruppe nur T-Zellen ohne Differenzierung von T-Zell-Subsets untersucht hatte und dass es sich außerdem um RA-Patienten unter Therapie handelte. Der Einschluss der Patienten war jedoch auch in dieser Arbeit anhand der RA-Klassifikationskriterien aus dem Jahr 1987 erfolgt [103].

Ob die Expression der miR-223 bei RA verändert ist, lässt sich derzeit nicht abschließend klären, nachdem unsere eigenen Ergebnisse, aber auch eine andere Publikation [161] die erhöhte miR-223-Expression nicht reproduzieren konnten. Die Publikation von Smigielska-Czepiel begründet die unterschiedliche Datenlage mit einer möglichen inter-Donor-Variabilität. Es bleibt darüber hinaus festzuhalten, dass die Patienten für die beiden erstgenannten Studien nach den veralteten Klassifikationskriterien rekrutiert wurden, die durch die Neufassung im Jahr 2010 abgelöst wurden.

Setzt man sich mit den Unterschieden zwischen den ARA/ACR-Kriterien aus dem Jahr 1987 und den aktuellen Klassifikationskriterien von ACR/EULAR aus dem Jahr 2010 auseinander (siehe hierzu Tabelle 1), so stellt man fest, dass die aktuellen Kriterien hauptsächlich auf eine frühe Erstdiagnose der RA fokussieren, um frühzeitig eine adäquate Behandlung einleiten zu können. Die ARA/ACR Kriterien sind dagegen auf die Diagnose einer manifesten RA ausgelegt.

Perspektivisch wirft der Vergleich der vorliegenden Arbeit mit den bereits erörterten Publikationen daher allerdings die Frage auf, ob die Untersuchung von miR-223 eventuell geeignet wäre, um als langfristiger Verlaufspareter für den Progress der chronischen Inflammation der RA angewendet zu werden.

Die Interaktionen der miR-223 und ihr Effekt auf die Pathogenese der RA wurden insbesondere in naiven T-Zellen zum Teil bereits erforscht, allerdings sind die Daten hierzu kontrovers [54]. Relevant ist die miR-223 insbesondere deshalb, weil ein Zusammenhang zwischen miR-223-Expression und Osteoklastenaktivierung gezeigt werden konnte [162, 163].

Ungeachtet der genannten Fragestellung einer Eignung von miR-223 als langfristiger Verlaufspareter, zeigen unsere Daten das beachtenswerte Ergebnis, dass trotz T-Zellstimulation die miR-223 im kurzfristigen Verlauf eine konstante Expression ohne relevante Kinetik aufweist, was auch in einer anderen Studie bestätigt wurde [159].

Aufgrund dieser Beobachtung wäre beispielsweise die Verwendung der miR-223 für die weitere T-Zell-Forschung als Bezugs-miR zur Normalisierung denkbar.

### 4.3.1.1.3 miR-142-3p

Für die miR-142-3p konnte zwischen HC- und RA-Gruppe kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. Die miR-142-3p wurde außerdem auch in den Zellen der CD25<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation in ähnlicher Konzentration exprimiert wie in der CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation.

Es konnten keine Publikationen gefunden werden, die im Kontext der RA durchgeführt wurden und damit einen direkten Abgleich der vorliegenden Ergebnisse ermöglicht hätten. Ein Vergleich der Ergebnisse mit Studien zur chronischen Inflammation am Beispiel von Systemischem Lupus erythematodes (SLE) bringt ebenfalls keinen zusätzlichen Erkenntnisgewinn: In einer Arbeit wurden dendritische Zellen, in einer zweiten Arbeit zwar CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, jedoch ohne Auftrennung in die Subpopulationen innerhalb dieser heterogenen Zellpopulation untersucht [117, 164].

Weiterhin liefern beide Veröffentlichungen im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit keine Aussagen zum Verhalten der miR-142-3p-Kinetik in CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>- und CD25<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellen während simulierter Inflammation und sind daher nicht direkt vergleichbar.

Die vorliegenden Daten zeigen eine verminderte Proteinexpression von GARP auf den Zellen (siehe hierzu 3.5). MiRs beeinflussen inflammatorische Prozesse. Es war bereits bekannt, dass immunologisch wichtige Proteine, beispielsweise GARP, durch die miR-142-3p posttranskriptionell reguliert werden. [70] Außerdem konnte für die miR-142-3p bereits gezeigt werden, dass sie im autoimmunen Kontext, insbesondere bei SLE, dereguliert ist [117, 164].

Die initiale Hypothese einer Überexpression von miR-142-3p, die konsekutiv zum Abbau der GARP-mRNA und damit zu geringerer GARP Expression auf den Zellen führt [70], musste jedoch verworfen werden, nachdem sich HC- und RA-Gruppe zwar in der Proteinexpression (siehe hierzu 3.5), nicht aber bezüglich der miR-142-3p-Expression oder Expression der GARP-mRNA (siehe hierzu 4.3.1.3) unterschieden.

Das miR-Expressionsniveau in CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>- und CD25<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellen war vergleichbar. Außerdem konnte unter Stimulation eine Herabregulation der miR-142-3p auch in CD25<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellen, trotz deren konstant sehr geringen GARP-Expression, gezeigt werden.

Daraus lässt sich zusammenfassend folgern, dass miR-142-3p neben der Translationshemmung/Degradation der GARP-mRNA auch in die Regulation weiterer zellulärer Vorgänge involviert zu sein scheint. Diese Folgerung wird gestützt durch die Beobachtung, dass miRs evolutionär stark konserviert erhalten sind, da komplexe pleiotrope Regulationsnetzwerke nur mit konservierten Messengern denkbar sind. [165]



#### 4.3.1.2 Serum-miR-Expression

Bei der Untersuchung der Serum-miRs konnten für Serum-miR-142-3p und Serum-miR-146a keine Unterschiede zwischen HC- und RA-Gruppe nachgewiesen werden. Die Serum-miR-155 war bei RA-Patienten erhöht, die Serum-miR-223 erniedrigt nachweisbar.

Betrachtet man im Vergleich dazu die Daten zur miR-Expression der untersuchten Zellpopulationen, so imponiert die Beobachtung, dass die Serum-miR-Daten zur miR-142-3p und miR-146a der intrazellulären Situation der CD25<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>- Zellpopulation an d0 ähnelt. In beiden Fällen zeigte sich ein vergleichbarer Trend, die Unterschiede waren jedoch auf dem gewählten Signifikanzniveau von 5 % nicht signifikant nachweisbar.

Anders verhielt sich die Situation der Serum-miR-155, die wir in RA-Patienten erhöht nachweisen konnten. Die miR-155 wurde zum Zeitpunkt der Blutentnahme in den T-Zellen der Patienten aber erniedrigt exprimiert. Auch bei Serum-miR-223, die intrazellulär stets eine vergleichbare Expression in RA- und HC-Gruppe zeigte, war die Serum-miR vermindert nachweisbar, sodass sich intrazelluläre und Serum-miR-Niveaus nicht korrelieren ließen.

Aus den Daten lässt sich ableiten, dass die Expression von Serum-miR eine eigene Entität darstellt. Sie bildet nicht zwingend die intrazelluläre miR-Expression in T-Zellen ab, obwohl T-Zellen als große, kerntragende Zellpopulation sicher einen relevanten Anteil zur Serum-miR-Expression beitragen. Weiterhin wurde bereits gezeigt, dass eine Überexpression von miR in Zellen auch zu einer Serum-miR-Überexpression führt [166].

Diese Beobachtung deckt sich mit aktueller Literatur, die die Serum-miR-Expression als unabhängig von intrazellulärer miR-Expression beschreibt [167, 168]. Dass die Serum-miR in kernhaltigen Zellen entstanden sein muss, ist aufgrund der Biosynthese von miRNAs evident. Obwohl Chen et al. insbesondere die Zellen des Blutes als Herkunft der Serum-miR benennen [137], bleibt aber auch unter Berücksichtigung der vorliegenden Ergebnisse unklar, welche eukaryontischen Zellen tatsächlich den größten Effekt auf die Serum-miR haben. Das bisherige Verständnis der Regulation von Serum-miR ist noch unzureichend und die Mechanismen der Sekretion und Endozytose noch nicht gänzlich verstanden [169]. Gerade aufgrund der potenziell therapeutischen Nutzbarkeit stellt die Serum-miR jedoch ein höchst relevantes Forschungsfeld dar.

Serum-miR sind darüber hinaus technisch erheblich leichter erfassbar als intrazellulär exprimierte miR [170], sie erweisen sich außerdem als stabil aufgrund ihres Transports in Vesikeln oder der Komplexbildung mit Argonaute-2. [169, 171, 172] Dadurch sind Serum-miRs in Proben auch trotz mehrfachen Gefrier-Tau-Zyklen noch konstant nachweisbar [173]. Die genannten Eigenschaften zeigen, dass der Erforschung von Serum-miR vermehrte Aufmerksamkeit zukommen sollte, um die Eignung in Bezug auf die potentielle Nutzbarkeit als Biomarker [137] zu klären.

Weiterhin muss in dem Zusammenhang auch der Frage nachgegangen werden, inwieweit die Serum-miR nicht nur diagnostisch und prognostisch relevant sein könnten, sondern ob sie möglicherweise auch funktionell am Pathomechanismus der RA beteiligt sind. Theoretisch denkbar wäre beispielsweise die parakrine Expression von Serum-miRs durch Zellen oder Gewebe (z.B. Fibroblasten), die in anderen Zellen (z.B. Lymphozyten) wirksam werden. [167, 174]

Die bisherige Literatur zur Serum-miR-Expression in RA zeigt inhomogene Ergebnisse.

Beim Vergleich von HC-, RA- und OA-Patienten konnten Murata et al. keine Unterschiede in der Serum-Expression der miR-146a, miR-155 und miR-223 zeigen [173]. Es gelang den Autoren allerdings, die

Anzahl schmerzender Gelenke (TJC) sowie die Krankheitsaktivität (anhand DAS28-Score) mit der Serum-miR-146a-Expression zu korrelieren.

Im Gegensatz zum Versuchsansatz der vorliegenden Arbeit mit einmaliger Serumspende erfassten Filková [136] et al. ein Follow-up der Patienten über insgesamt 12 Monate und konnten so auch Korrelationen zwischen Veränderungen von Serum-miR und klinischen Parametern der Patienten erheben. Weiterhin unterschieden die Forscher im Gegensatz zur vorliegenden Studie zwischen früher, unbehandelter RA und bestehender RA. Entgegen unseren Ergebnissen waren hierbei Unterschiede in der Serum-miR-146a-Expression zwischen früher, unbehandelter RA und HC nachweisbar, dagegen zeigten sich bei Serum-miR-155 lediglich Unterschiede zwischen früher, unbehandelter und etablierter RA, jedoch nicht zu den HC. Eine Korrelation der Serum-miR-223 mit CRP und DAS28 konnte auch in dieser Publikation gezeigt werden.

Eine weitere Publikation untersuchte neben der Serum-miR-Expression in SLE auch die Expression in RA und fand die Serum-miR-155 und Serum-miR-223 in RA dereguliert vor [175]. Entgegen den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zeigte die Gruppe jedoch auch eine veränderte Serum-miR-146a-Expression. Weiterhin waren die deregulierten Serum-miR-155 und Serum-miR-223 im Vergleich zu den vorliegenden Daten jeweils gegengerichtet verändert.

Obwohl die verwendeten Methoden (beispielsweise Serumgewinnung aus EDTA-Blut, Vortestung mittels eines gepoolten MicroArray-Tests) sich von der Vorgehensweise der vorliegenden Arbeit in einigen Punkten unterschieden, sind die Unterschiede zu unseren Daten nicht einzig durch die methodischen Unterschiede zu erklären. Denkbar ist neben einer inter-Donor-Variabilität auch, dass die Patientenkollektive sich hinsichtlich demographischer oder krankheitsspezifischer Merkmale relevant unterschieden, was anhand der gezeigten Daten nicht abschließend beurteilt werden kann.

Obwohl, oder gerade weil die vorliegenden Ergebnisse teilweise deutlich von den Daten der bereits erwähnten Publikationen abweichen, können sie zur Hypothesengenerierung für weitere Forschung genutzt werden. Insbesondere die Nutzbarkeit von miR und Serum-miR im diagnostischen Kontext stehen hierbei aktuell im Fokus.

Die in der vorliegenden Arbeit für die miR- und Serum-miR-Expression gefundenen Unterschiede zwischen HC- und RA-Versuchsgruppe könnten perspektivisch einen Beitrag zur zukünftigen Nutzung von miR und Serum-miR als Biomarker leisten. Um eine solche Anwendung zu erwägen, ist jedoch zwingend die Validierung der hier gezeigten Daten anhand großer Patientenkollektive nötig. Theoretisch wäre die Verwendung als diagnostische oder prognostische Marker jedoch durchaus denkbar.

Die Frage nach der therapeutischen Nutzbarkeit von miR und Serum-miR in dem untersuchten Kontext ist derzeit noch nicht zu beantworten. Um miRs auch therapeutisch einzusetzen, ist der Nachweis der kausalen Involvierung in die Pathogenese der RA zwingende Voraussetzung. Dieser Nachweis kann aufgrund der Methodik in dieser Arbeit nicht erbracht werden, weshalb hier weitergehende Forschung nötig sein wird.

Zudem setzt die therapeutische Nutzung von miR und Serum-miR eine zielgerichtete und zuverlässige Applikation voraus, die sowohl pharmakologisch (z.B. durch entsprechende Galenik), als auch gentechnisch (z.B. durch Viren als Vektor) Gegenstand aktueller Forschung ist.

#### 4.3.1.3 GARP-mRNA-Expression

Auf Ebene der GARP-mRNA zeigten die Zellen der CD25<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation wie erwartet eine konstant sehr niedrige GARP-mRNA-Expression sowie insgesamt deutlich weniger mRNA-Expression als die CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation. Eine Kinetik war nicht feststellbar, ebenso gab es keine relevanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen.

Anders verhielt sich die GARP-mRNA-Expression in der Zellpopulation der CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellen. Hier zeigte sich eine Hochregulation der mRNA-Expression unter der Zellstimulation in Zellkultur. Die Kinetik der Hochregulation war, verglichen mit der GARP-Oberflächenexpression (siehe hierzu 4.3.2), in ähnlichem Trend sichtbar, allerdings waren die Daten hier nicht auf vergleichbarem Niveau statistisch signifikant wie bei der Messung der Proteinexpression. Gleiches gilt für den Vergleich zwischen HC- und RA-Gruppe, der an keinem der Messzeitpunkte signifikant ausfiel.

Als Erklärung für die Diskrepanz zwischen Oberflächenexpression des Proteins und seiner zugehörigen mRNA müssen zwei Punkte berücksichtigt werden:

Zum Einen war die Datenerhebung zur mRNA erheblich aufwändiger und erforderte mehr Probenmaterial als die Messung der Oberflächenproteinexpression (siehe hierzu auch 4.2.2). Aus diesem Grund waren die Messungen zur mRNA nicht bei allen Versuchspersonen, bei denen die Proteinexpression quantifiziert werden konnte, möglich. Somit ergibt sich für die Versuche auf mRNA-Basis eine insgesamt geringere statistische Power, um tatsächliche Unterschiede in der Kinetik sowie im Vergleich zwischen den Versuchsgruppen generell nachweisen zu können. Um feine Differenzen zwischen den beiden Versuchsgruppen statistisch signifikant nachweisen zu können, wäre daher möglicherweise die Wiederholung des Experimentes ohne Messung der Oberflächen-Proteinexpression, dafür aber mit größeren Fallzahlen sinnvoll.

Als zweiter Punkt muss darüber hinaus aber auch kritisch hinterfragt werden, ob auf mRNA-Ebene tatsächlich Daten erwartbar sind, die die GARP-Oberflächenexpression identisch abbilden. Eine rein durch Veränderungen auf DNA- und RNA-Ebene bedingte GARP-Oberflächenexpression lässt sich bei kritischem Abgleich der Daten von GARP-Oberflächen-FACS-Staining und GARP-mRNA-Quantifizierung mit großer Wahrscheinlichkeit ausschließen. Vielmehr weisen die vorliegenden Daten darauf hin, dass trotz vergleichbarer GARP-mRNA-Expression die Expression von GARP auf der Zelloberfläche zwischen RA-Versuchsgruppe und HC-Kontrollgruppe signifikant unterschiedlich war.

Aus dieser Feststellung lässt sich auch für die Entität der RA eine Beteiligung der posttranslationalen Modifikation des GARP vermuten. Obwohl in der Studie keine quantitativen Daten zur GARP-mRNA-Expression gezeigt wurden, sollte hierzu die Publikation zur GARP-Expression in Atopischer Dermatitis Beachtung finden, auf die auch in 4.3.2 eingegangen wird. [176] Im direkten Vergleich zu den Daten der vorliegenden Arbeit erscheint die Veröffentlichung hoch relevant, nachdem die Autoren eine posttranslationale Veränderung des GARP-Proteins in der Patientengruppe nachweisen konnten. Die gefundene Veränderung beruhte hierbei auf einer Punktmutation und der konsekutiv veränderten Proteinfaltung. Diese veränderte Proteinstruktur führt zu einer intrazellulären Akkumulation statt zur Oberflächenpräsentation von GARP. Ein solcher Mechanismus wäre ein möglicher Erklärungsansatz, um die im Rahmen unseres Experimentes gefundene Konstellation aus signifikant differierender Oberflächenexpression des GARP trotz vergleichbarer intrazellulärer GARP-mRNA-Mengen ausreichend zu erklären.

Ebenso wären jedoch theoretisch auch andere Mechanismen, die die Oberflächenexpression eines Proteins posttranslational bedingen, vorstellbar. Denkbar wäre beispielsweise ein beschleunigter Abbau von GARP, der trotz identischer mRNA-Level und identischer Proteinproduktion letztendlich im

steady-state zu einem niedrigeren Expressionsniveau des GARP-Proteins auf T-Zellen der RA-Patienten führen würde.

Dass die verminderte GARP-Präsentation auf der Zelloberfläche einen Beitrag zur Pathogenese der RA leistet, konnten wir anhand unserer Daten zeigen (siehe hierzu 3.5). Zur Testung der geschilderten Forschungshypothesen würden allerdings umfangreiche weitere Versuche nötig sein: Für einen stringenten Nachweis der genannten Theorien müssten sowohl bei RA-Patienten als auch HC-Kontrollen jeweils die intrazelluläre Expression, die GARP-Oberflächenexpression und auch der gesamte Proteinumsatz (beispielsweise durch radioaktive Proteinmarkierung) erfasst werden. Sollte sich hier tatsächlich ein Unterschied in der Proteinverteilung oder dem Proteinumsatz nachweisen lassen, wäre es sinnvoll, die weitere Forschung sowohl auf Proteinstruktur-Ebene, als auch auf DNA-Ebene weiter zu verfolgen, um die Zusammenhänge zwischen Mutation(en), Proteinstruktur, Proteinpräsentation und -abbau kausal nachweisen zu können.

### 4.3.2 GARP-Oberflächenexpression

Im Verlauf der Zellstimulation über 48 Stunden stieg die Frequenz GARP<sup>+</sup>-Zellen statistisch signifikant an. Dieser Anstieg war in der Zellpopulation der CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellen am stärksten messbar, auch die Mischpopulation der CD4<sup>+</sup>-Zellen zeigte jedoch eine signifikante Zunahme an GARP<sup>+</sup>-Zellen. Es ließ sich auch in der CD25<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation, insbesondere in der HC-Kontrollgruppe, ein solcher Anstieg nachweisen, jedoch weitaus weniger stark als in den anderen untersuchten Populationen.

Bei Betrachtung der GARP-MFI zeigte die Population der CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellen einen deutlichen Anstieg, in der gesamten Zellpopulation wurde also insgesamt mehr GARP pro Zelle exprimiert. Hier zeigte die CD25<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation keine Veränderung und auch in der CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation blieb die GARP-MFI relativ konstant. Ein leichter Anstieg der MFI war lediglich von d0 zu d2 nachweisbar.

Es lässt sich daher folgern, dass nicht nur die Anzahl der GARP-exprimierenden Zellen im Verlauf des 48-stündigen Versuches anstieg, sondern auch die GARP-Expression der einzelnen Zellen anstieg.

Die durchgeführte Subanalyse der GARP-MFI von GARP<sup>+</sup>-Zellen muss im Kontext mit der GARP-MFI der jeweiligen Gesamtpopulationen betrachtet werden. Der auswertungsbedingte Ausgangswert an d0 ist hier zwingend in die Interpretation mit einzubeziehen. In der Folge lässt sich auch aus der MFI der GARP<sup>+</sup>-Zellen letztlich lediglich der Schluss ziehen, dass die GARP-MFI der GARP-exprimierenden Zellen in der CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation von d1 zu d2 ansteigt. Ein vergleichbarer Trend zeichnet sich auch in der CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation ab, allerdings ist der Anstieg der GARP-MFI hier bereits nicht mehr statistisch signifikant auf dem gewählten 5 %-Signifikanzniveau.

Die Expression von GARP auf aktivierten regulatorischen T-Zellen war bereits zuvor bekannt [70-72, 74, 75, 78, 79]. Eine GARP-Expression auf Zellen der CD4<sup>+</sup> und CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation war daher ein erwartbares Resultat der Zellstimulation. Dies gilt jedoch nicht für die CD25<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation, wo eine Zunahme der Frequenz von GARP<sup>+</sup>-Zellen in unserem Versuch ebenfalls nachweisbar war.

Die Zunahme der Frequenz der GARP<sup>+</sup>-Zellen in der CD25<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation stellt dennoch keinen Widerspruch zur derzeitigen Forschungslage dar. Einerseits lässt sich diese Beobachtung durch die Zellisolation erklären, bei der, bedingt durch die gewählte Methodik, keine hundertprozentige Reinheit der Zellpopulationen erreicht werden konnte (s. hierzu auch 2.7, 2.7.5 und 4.2.2), darüber hinaus kann es sich bei den Zellen der CD25<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation, die GARP produzieren, möglicherweise auch um induced Tregs (iTregs) handeln, die durch die Stimulationsbedingungen in vitro erst generiert wurden [177, 178]. Gegen diese Annahme spricht allerdings, dass Probst-Kepper et al. in einer Veröffentlichung 2009 zeigen konnten, dass TGF- $\beta$ -induzierte iTregs kein GARP exprimierten [72].

Unabhängig davon gilt es in der CD25<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation, die Relevanz der zwar nachweisbaren, jedoch im Vergleich zu den anderen Zellpopulationen nur minimalen Hochregulation der Frequenz der GARP<sup>+</sup>-Zellen zu hinterfragen.

Zur Beantwortung der Hypothese einer differierenden GARP-Expression in RA- und HC-Versuchsgruppe wurden die beiden Gruppen direkt miteinander verglichen. Hierbei zeigte sich, dass die Zellpopulationen sich an d0 nicht statistisch signifikant unterschieden. Unter Stimulation war dagegen sowohl in der CD4<sup>+</sup> als auch der CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation, nicht jedoch in der CD25<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>-Vergleichspopulation eine stärkere Zunahme der Frequenz der GARP<sup>+</sup>-Zellen in der HC-Gruppe als in der RA-Gruppe nachweisbar. Ebenso war die GARP-MFI in der der CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation der HC-Kontrollgruppe signifikant höher als in der RA-Gruppe.

Daraus lässt sich zusammenfassend ableiten, dass die GARP-Expression sich im Ruhezustand nicht zwischen RA- und HC-Gruppe unterschied. Als Folge der Zellstimulation exprimierten jedoch weniger Tregs der RA-Patienten GARP, außerdem fiel die GARP-Expression pro Zelle dabei insgesamt geringer aus als in der Vergleichsgruppe.

Die Hypothese einer veränderten GARP-Expression in Tregs von RA-Patienten ließ sich damit unter Stimulation in der simulierten Inflammationssituation insgesamt bestätigen. An d0, also dem Messpunkt, der am ehesten die Situation der Patienten in vivo abbildet, fand sich dagegen kein Unterschied.

Eine verminderte GARP-Expression war bereits zuvor im autoimmunen Kontext bei B-Zellen im Kontext von SLE [179] sowie im Zusammenhang mit T-Zellen bei Patienten mit Atopischer Dermatitis [176] nachgewiesen worden. Letztere Forschergruppe zeigte, ausgehend von Gene-Mapping, dass Patienten mit Atopischer Dermatitis Veränderungen im Sinne von Missens-Mutation im GARP-Gen aufweisen. Weiterhin konnten auch sie eine verringerte Expression von GARP auf der Zelloberfläche zeigen, während intrazellulär mehr mutiertes GARP vorhanden war. Daraus wurde gefolgert, dass die Proteinexpression generell zwar nicht gestört ist, dafür aber Veränderungen der posttranslationalen Modifikation (z.B. Faltung oder Proteinstabilisierung) aus der Mutation resultieren, die einen Transport des Proteins zur Zelloberfläche behindern. [176]

Dass die Oberflächenexpression von GARP mit der immunsuppressiven Wirkung der Tregs korreliert, war aus in vivo-Experimenten ebenfalls bereits bekannt [76].

Im Gegensatz zur bereits erwähnten Studie zur GARP-Expression auf iTregs [72] zeigten auch die Ergebnisse von Manz et al. [176], dass die iTregs der Patientenkohorte weniger GARP exprimierten als die gesunden Kontrollen. Die Datenanalyse zur Frequenz der GARP<sup>+</sup>-Zellen innerhalb der CD25<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation unseres Experimentes hatte bereits einen ähnlichen Trend, wenngleich nicht signifikant nachweisbar, angedeutet.

Die Hypothese, wonach RA-Patienten unter Stimulation eine veränderte Expression von GARP auf Tregs aufweisen, konnte damit durch die vorliegende Arbeit erstmals bewiesen werden. Es konnte insbesondere gezeigt werden, dass bei Patienten mit RA sowohl niedrigere Frequenzen der GARP<sup>+</sup>-Zellen als auch geringere GARP-MFIs exprimiert wurden.

GARP als Oberflächenprotein ist nicht nur ein spezifischer Marker auf Tregs [71], über eine Feedback-Loop ist die GARP-Expression mit der Foxp3-Expression als zentralem Regulator der Tregs eng funktionell verbunden [72, 73, 75, 180]. Eine verminderte GARP-Expression bewirkt daher auch eine verminderte regulatorische Funktion der Tregs [76].

Obwohl noch nicht alle biologischen Funktionen des GARP-Moleküls bereits ausreichend erforscht sind, weist die aktuelle Literatur darauf hin, dass die Minderung der immunsuppressiven Wirkung der Tregs über die funktionelle Störung des TGF- $\beta$ -Signalweges vermittelt wird, indem GARP die Bioverfügbarkeit von TGF- $\beta$  steuert [73, 74, 76-80, 82, 83, 181, 182]. TGF- $\beta$  ist ein Zytokin mit breitem biologischen Wirkspektrum und großer Relevanz gerade im Rahmen der RA [183]: Einerseits wurde nachgewiesen, dass TGF- $\beta$  entscheidend zur Generierung von Th17-Zellen beiträgt, die als Effektorzellen paradoxerweise mit Tregs einer gemeinsamen T-Verläufer-Zelllinie entstammen [184-186], gleichzeitig aber an der proinflammatorischen und gelenkdestruktiven Pathogenese der RA beteiligt sind [184, 187-189]. Andererseits wurde bereits früh TGF- $\beta$  aber auch als Zytokin mit einer zentralen Rolle in der Immuntoleranz identifiziert [190-192].

Trotz der proinflammatorischen Effekte von TGF- $\beta$  scheint nach aktuellem Kenntnisstand insgesamt die antiinflammatorische Wirkung des Zytokins deutlich zu überwiegen [24, 76, 80, 82, 182, 185, 186,

190, 191, 193, 194]. Eine verminderte Expression von TGF- $\beta$  stellt daher einen denkbaren Pathomechanismus für die Entstehung des insgesamt proinflammatorischen Milieus der RA dar.

Die vorliegenden Ergebnisse legen nahe, dass es sich hierbei tatsächlich, vermittelt über das Molekül GARP, um einen Mechanismus handelt, der essenziell an der Pathogenese der RA beteiligt ist und daher einen potenziellen Angriffspunkt für die Therapie der RA darstellen könnte. Die Erforschung des funktionellen Zusammenhangs von GARP und TGF- $\beta$  im Kontext der RA stellt daher ein wichtiges Feld für weitere Studien dar. Die vielschichtigen Regelkreise, in die das Zytokin TGF- $\beta$  eingreift, besser im Kontext von Autoimmunerkrankungen zu erforschen, kann so auch helfen, die physiologischen Funktionen des Zytokins selbst, aber auch seiner Rezeptoren und Bindungspartner zukünftig besser zu verstehen.

Bringt man die Ergebnisse der GARP-Expression mit den bereits diskutierten Ergebnissen zur GARP-mRNA und miR-142-3p in einen Kontext, so lässt sich zusammenfassend folgern:

Die Expression von GARP auf der Zelloberfläche ist neben der transkriptionellen Regulation, also posttranskriptionell, vermutlich von einer Vielzahl von Faktoren abhängig, und sicher nicht ausschließlich von der miR-142-3p-Expression. Dass trotz vergleichbarer GARP-mRNA-Level und nicht signifikant erhöhter miR-142-3p-Level die GARP-Oberflächenexpression vermindert ist, zeigt, dass andere posttranskriptionelle und/oder posttranslationale Mechanismen Einfluss auf die Präsentation des GARP-Moleküls auf Zellen nehmen.

Die dargestellten Ergebnisse zeigen beispielhaft auf, dass das hochkomplexe molekularbiologische und proteinbiologische Interaktom der chronischen Inflammation aufgrund der großen klinischen Relevanz auch zukünftig ein für die Medizin höchstrelevantes und vielschichtiges Forschungsfeld bleiben wird.

## 5 Zusammenfassung

Regulatorische T-Zellen sind von zentraler Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz des Immunsystems. Das Versagen dieser Selbsttoleranz führt zu chronisch-generalisierter Inflammation in Form von Autoimmunerkrankungen, zum Beispiel der Rheumatoiden Arthritis. Regulatorische T-Zellen sind im Kontext der Rheumatoiden Arthritis funktionell kompromittiert.

MicroRNAs sind nichtcodierende, einzelsträngige RNAs, die intrazellulär und im Serum nachgewiesen werden können. Sie wirken als posttranskriptionelle Negativregulatoren der Proteinexpression und haben Einfluss auf die Entwicklung und Funktion von Immunzellen. GARP ist ein Oberflächenprotein, das auf regulatorischen T-Zellen exprimiert wird und als Marker für deren zelluläre Funktionalität herangezogen werden kann.

Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob sich Patienten mit Rheumatoider Arthritis hinsichtlich der Expression von ausgewählten microRNAs (miR-146a, miR-155, miR-223 und miR-142-3p in regulatorischen T-Zellen und im Serum) sowie der GARP-Expression auf regulatorischen T-Zellen von einer gesunden Bevölkerungsstichprobe unterscheiden.

Zur Testung der beschriebenen Fragestellung wurde 9 Patienten mit neu diagnostizierter und unbehandelter Rheumatoider Arthritis und 27 gesunden Kontrollen Vollblut und Serum entnommen. Die Untersuchung der Serum-microRNA-Expression wurde mittels Real-Time-PCR realisiert. Aus den Vollblutproben wurden CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>- und CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>- Zellpopulationen isoliert, die anschließend über 48 h in Zellkultur stimuliert wurden. Direkt nach Zellisolation, nach 24-stündiger sowie 48-stündiger Zellkultur wurden Zellproben entnommen. Aus einem Teil dieser Proben wurde die GARP-Oberflächenexpression mittels FACS-Durchflusszytometrie bestimmt. Die restlichen Proben wurden verwendet, um daraus die intrazellulären microRNAs und die GARP-mRNA zu isolieren und durch Real-Time-PCR zu quantifizieren.

MiR-146a und miR-155 zeigten in den Zellen der Patienten mit Rheumatoider Arthritis eine verminderte Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe. Für die Expression der miR-223 und miR-142-3p ließ sich kein relevanter Unterschied zwischen Patienten- und Kontrollgruppe nachweisen. In den untersuchten Seren der Patienten mit Rheumatoider Arthritis war die Serum-miR-155 erhöht, Serum-miR-223 dagegen vermindert nachweisbar. GARP wurde hauptsächlich auf CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellen exprimiert. Der Anteil an GARP<sup>+</sup>-Zellen steigerte sich während Zellstimulation bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis in geringerem Umfang, als dies bei den gesunden Kontrollen der Fall war. Auch die GARP-Expression der GARP<sup>+</sup>-Zellen wurde in geringerem Umfang hochreguliert. Diese veränderte Oberflächenexpression von GARP war auf mRNA-Ebene nicht nachweisbar.

Die veränderte Expression von miR-146a und miR-155 als potente Modulatoren immunologischer Prozesse können zu einem veränderten T-Zell-Phänotyp bei Rheumatoider Arthritis beitragen. Die verminderte GARP-Expression regulatorischer T-Zellen liefert Hinweise auf deren funktionelle Insuffizienz im Kontext der Rheumatoiden Arthritis.

Die oben beschriebenen Parameter unterschieden sich zwischen Patienten- und Kontrollkollektiv signifikant. Perspektivisch könnte daher, insbesondere für microRNAs und Serum-microRNAs, diagnostisches, prognostisches und eventuell auch therapeutisches Potential abgeleitet werden. Hierfür ist jedoch die Validierung der Daten an großen Patientenkollektiven unabdingbar. Um microRNAs auch therapeutisch einsetzen zu können, wird jedoch noch weitaus umfangreichere Forschung nötig sein, um einerseits die pleiotropen microRNA-Interaktionen detailliert zu eruieren und andererseits pharmakologische oder gentechnische Möglichkeiten zu identifizieren, die eine zielgerichtete und zuverlässige Applikation der microRNAs ermöglichen.



## 6 Anhang

### 6.1 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Lüllmann-Rauch, R., *Taschenlehrbuch Histologie*. 4 ed. 2012. 694.
2. Yatim, K.M. and F.G. Lakkis, *A brief journey through the immune system*. Clin J Am Soc Nephrol, 2015. **10**(7): p. 1274-81.
3. Hato, T. and P.C. Dagher, *How the Innate Immune System Senses Trouble and Causes Trouble*. Clin J Am Soc Nephrol, 2015. **10**(8): p. 1459-69.
4. Iwasaki, A. and R. Medzhitov, *Control of adaptive immunity by the innate immune system*. Nat Immunol, 2015. **16**(4): p. 343-53.
5. Dempsey, P.W., S.A. Vaidya, and G. Cheng, *The art of war: Innate and adaptive immune responses*. Cell Mol Life Sci, 2003. **60**(12): p. 2604-21.
6. Chaplin, D.D., *1. Overview of the human immune response*. J Allergy Clin Immunol, 2006. **117**(2 Suppl Mini-Primer): p. S430-5.
7. Dunkelberger, J.R. and W.C. Song, *Complement and its role in innate and adaptive immune responses*. Cell Res, 2010. **20**(1): p. 34-50.
8. Byng-Maddick, R. and M.R. Ehrenstein, *The impact of biological therapy on regulatory T cells in rheumatoid arthritis*. Rheumatology (Oxford), 2015. **54**(5): p. 768-75.
9. Cope, A.P., H. Schulze-Koops, and M. Aringer, *The central role of T cells in rheumatoid arthritis*. Clin Exp Rheumatol, 2007. **25**(5 Suppl 46): p. S4-11.
10. Panayi, G.S., J.S. Lanchbury, and G.H. Kingsley, *The importance of the T cell in initiating and maintaining the chronic synovitis of rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 1992. **35**(7): p. 729-35.
11. Yokosuka, T. and T. Saito, *Dynamic regulation of T-cell costimulation through TCR-CD28 microclusters*. Immunol Rev, 2009. **229**(1): p. 27-40.
12. Tubo, N.J. and M.K. Jenkins, *TCR signal quantity and quality in CD4 T cell differentiation*. Trends Immunol, 2014. **35**(12): p. 591-596.
13. van Panhuys, N., *TCR Signal Strength Alters T-DC Activation and Interaction Times and Directs the Outcome of Differentiation*. Front Immunol, 2016. **7**: p. 6.
14. Skapenko, A. and H. Schulze-Koops, *Analysis of Th1/Th2 T-cell subsets*. Methods Mol Med, 2007. **136**: p. 87-96.
15. Smith, S.H., et al., *Functional subsets of human helper-inducer cells defined by a new monoclonal antibody, UCHL1*. Immunology, 1986. **58**(1): p. 63-70.
16. Sakaguchi, S., *Regulatory T cells: history and perspective*. Methods Mol Biol, 2011. **707**: p. 3-17.
17. Gershon, R.K. and K. Kondo, *Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes*. Immunology, 1970. **18**(5): p. 723-37.
18. Sakaguchi, S., K. Wing, and M. Miyara, *Regulatory T cells - a brief history and perspective*. Eur J Immunol, 2007. **37** Suppl 1: p. S116-23.
19. Sakaguchi, S., et al., *Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases*. J Immunol, 1995. **155**(3): p. 1151-64.
20. Fowell, D. and D. Mason, *Evidence that the T cell repertoire of normal rats contains cells with the potential to cause diabetes. Characterization of the CD4+ T cell subset that inhibits this autoimmune potential*. J Exp Med, 1993. **177**(3): p. 627-36.
21. Sojka, D.K., Y.H. Huang, and D.J. Fowell, *Mechanisms of regulatory T-cell suppression – a diverse arsenal for a moving target*. Immunology, 2008. **124**(1): p. 13-22.
22. Vignali, D.A.A., L.W. Collison, and C.J. Workman, *How regulatory T cells work*. Nature reviews. Immunology, 2008. **8**(7): p. 523-532.
23. Rubtsov, Y.P., et al., *Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces*. Immunity, 2008. **28**(4): p. 546-58.

24. Asseman, C., et al., *An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation*. J Exp Med, 1999. **190**(7): p. 995-1004.
25. Wan, Y.Y. and R.A. Flavell, *TGF-beta and regulatory T cell in immunity and autoimmunity*. J Clin Immunol, 2008. **28**(6): p. 647-59.
26. Liang, B., et al., *Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II*. J Immunol, 2008. **180**(9): p. 5916-26.
27. Hirai, T., et al., *Clonal Deletion Established via Invariant NKT Cell Activation and Costimulatory Blockade Requires In Vivo Expansion of Regulatory T Cells*. Am J Transplant, 2016. **16**(2): p. 426-39.
28. Takahashi, T., et al., *Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state*. Int Immunol, 1998. **10**(12): p. 1969-80.
29. Valencia, X., et al., *TNF downmodulates the function of human CD4+CD25hi T-regulatory cells*. Blood, 2006. **108**(1): p. 253-61.
30. Pasare, C. and R. Medzhitov, *Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells*. Science, 2003. **299**(5609): p. 1033-6.
31. Ng, W.F., et al., *Human CD4(+)CD25(+) cells: a naturally occurring population of regulatory T cells*. Blood, 2001. **98**(9): p. 2736-44.
32. Kuniyasu, Y., et al., *Naturally anergic and suppressive CD25(+)CD4(+) T cells as a functionally and phenotypically distinct immunoregulatory T cell subpopulation*. Int Immunol, 2000. **12**(8): p. 1145-55.
33. Caruso, A., et al., *Flow cytometric analysis of activation markers on stimulated T cells and their correlation with cell proliferation*. Cytometry, 1997. **27**(1): p. 71-6.
34. Chen, X. and J.J. Oppenheim, *Resolving the identity myth: key markers of functional CD4(+)FoxP3(+) regulatory T cells*. International immunopharmacology, 2011. **11**(10): p. 1489-1496.
35. Chen, X., et al., *Cutting edge: expression of TNFR2 defines a maximally suppressive subset of mouse CD4+CD25+FoxP3+ T regulatory cells: applicability to tumor-infiltrating T regulatory cells*. J Immunol, 2008. **180**(10): p. 6467-71.
36. Khattri, R., et al., *An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells*. Nat Immunol, 2003. **4**(4): p. 337-42.
37. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi, *Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3*. Science, 2003. **299**(5609): p. 1057-61.
38. Kim, J.M. and A. Rudensky, *The role of the transcription factor Foxp3 in the development of regulatory T cells*. Immunol Rev, 2006. **212**: p. 86-98.
39. Buckner, J.H. and S.F. Ziegler, *Functional analysis of FOXP3*. Ann N Y Acad Sci, 2008. **1143**: p. 151-69.
40. Zheng, Y. and A.Y. Rudensky, *Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage*. Nat Immunol, 2007. **8**(5): p. 457-62.
41. Lee, M.G., S.C. Bae, and Y.H. Lee, *Association between FOXP3 polymorphisms and susceptibility to autoimmune diseases: A meta-analysis*. Autoimmunity, 2015. **48**(7): p. 445-52.
42. D'Amico, F., et al., *Genetic polymorphisms of FOXP3 in Italian patients with systemic sclerosis*. Immunol Lett, 2013. **152**(2): p. 109-13.
43. Zheng, L., et al., *Foxp3 gene polymorphisms and haplotypes associate with susceptibility of Graves' disease in Chinese Han population*. Int Immunopharmacol, 2015. **25**(2): p. 425-31.
44. Gao, L., et al., *Polymorphisms in the FOXP3 gene in Han Chinese psoriasis patients*. J Dermatol Sci, 2010. **57**(1): p. 51-6.
45. Paradowska-Gorycka, A., et al., *Genetic polymorphisms of Foxp3 in patients with rheumatoid arthritis*. J Rheumatol, 2015. **42**(2): p. 170-80.
46. Park, O., et al., *Analysis of the Foxp3/scurfin gene in Crohn's disease*. Ann N Y Acad Sci, 2005. **1051**: p. 218-28.

47. Fontenot, J.D., M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky, *Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells*. Nat Immunol, 2003. **4**(4): p. 330-6.
48. Lin, S.C., et al., *The quantitative analysis of peripheral blood FOXP3-expressing T cells in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis patients*. Eur J Clin Invest, 2007. **37**(12): p. 987-96.
49. Flores-Borja, F., et al., *Defects in CTLA-4 are associated with abnormal regulatory T cell function in rheumatoid arthritis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(49): p. 19396-401.
50. Boissier, M.C., et al., *Regulatory T cells (Treg) in rheumatoid arthritis*. Joint Bone Spine, 2009. **76**(1): p. 10-4.
51. Jiao, Z., et al., *Accumulation of FoxP3-expressing CD4+CD25+ T cells with distinct chemokine receptors in synovial fluid of patients with active rheumatoid arthritis*. Scand J Rheumatol, 2007. **36**(6): p. 428-33.
52. Ehrenstein, M.R., et al., *Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy*. J Exp Med, 2004. **200**(3): p. 277-85.
53. Nadkarni, S., C. Mauri, and M.R. Ehrenstein, *Anti-TNF-alpha therapy induces a distinct regulatory T cell population in patients with rheumatoid arthritis via TGF-beta*. J Exp Med, 2007. **204**(1): p. 33-9.
54. Chen, X.M., et al., *Role of Micro RNAs in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis: Novel Perspectives Based on Review of the Literature*. Medicine (Baltimore), 2015. **94**(31): p. e1326.
55. O'Connell, R.M., D.S. Rao, and D. Baltimore, *microRNA regulation of inflammatory responses*. Annu Rev Immunol, 2012. **30**: p. 295-312.
56. Bernstein, E., et al., *Dicer is essential for mouse development*. Nat Genet, 2003. **35**(3): p. 215-7.
57. Liston, A., et al., *Dicer-dependent microRNA pathway safeguards regulatory T cell function*. J Exp Med, 2008. **205**(9): p. 1993-2004.
58. Cobb, B.S., et al., *A role for Dicer in immune regulation*. J Exp Med, 2006. **203**(11): p. 2519-27.
59. Zhou, X., et al., *Selective miRNA disruption in T reg cells leads to uncontrolled autoimmunity*. J Exp Med, 2008. **205**(9): p. 1983-91.
60. Chong, M.M., et al., *The RNaseIII enzyme Drosha is critical in T cells for preventing lethal inflammatory disease*. J Exp Med, 2008. **205**(9): p. 2005-17.
61. Anz, D., et al., *Immunostimulatory RNA blocks suppression by regulatory T cells*. J Immunol, 2010. **184**(2): p. 939-46.
62. De Santis, G., et al., *Altered miRNA expression in T regulatory cells in course of multiple sclerosis*. J Neuroimmunol, 2010. **226**(1-2): p. 165-71.
63. Lashine, Y.A., et al., *Expression signature of microRNA-181-a reveals its crucial role in the pathogenesis of paediatric systemic lupus erythematosus*. Clin Exp Rheumatol, 2011. **29**(2): p. 351-7.
64. Furer, V., et al., *The role of microRNA in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases*. Clin Immunol, 2010. **136**(1): p. 1-15.
65. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. Cell, 2004. **116**(2): p. 281-97.
66. He, L. and G.J. Hannon, *MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation*. Nat Rev Genet, 2004. **5**(7): p. 522-31.
67. Chen, C.Z., et al., *MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation*. Science, 2004. **303**(5654): p. 83-6.
68. Ma, X., et al., *MicroRNAs in NF-kappaB signaling*. J Mol Cell Biol, 2011. **3**(3): p. 159-66.
69. Churov, A.V., E.K. Oleinik, and M. Knip, *MicroRNAs in rheumatoid arthritis: altered expression and diagnostic potential*. Autoimmun Rev, 2015. **14**(11): p. 1029-37.
70. Zhou, Q., et al., *miR-142-3p is involved in CD25+ CD4 T cell proliferation by targeting the expression of glycoprotein A repetitions predominant*. J Immunol, 2013. **190**(12): p. 6579-88.
71. Wang, R., et al., *Expression of GARP selectively identifies activated human FOXP3+ regulatory T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(32): p. 13439-44.

72. Probst-Kepper, M., et al., *GARP: a key receptor controlling FOXP3 in human regulatory T cells*. J Cell Mol Med, 2009. **13**(9b): p. 3343-57.
73. Hahn, S.A., et al., *Soluble GARP has potent antiinflammatory and immunomodulatory impact on human CD4(+) T cells*. Blood, 2013. **122**(7): p. 1182-91.
74. Sun, L., H. Jin, and H. Li, *GARP: a surface molecule of regulatory T cells that is involved in the regulatory function and TGF-beta releasing*. Oncotarget, 2016. **7**(27): p. 42826-42836.
75. Wang, R., et al., *Identification of a regulatory T cell specific cell surface molecule that mediates suppressive signals and induces Foxp3 expression*. PLoS One, 2008. **3**(7): p. e2705.
76. Cuende, J., et al., *Monoclonal antibodies against GARP/TGF-beta1 complexes inhibit the immunosuppressive activity of human regulatory T cells in vivo*. Sci Transl Med, 2015. **7**(284): p. 284ra56.
77. Gauthy, E., et al., *GARP is regulated by miRNAs and controls latent TGF-beta1 production by human regulatory T cells*. PLoS One, 2013. **8**(9): p. e76186.
78. Tran, D.Q., et al., *GARP (LRRC32) is essential for the surface expression of latent TGF-beta on platelets and activated FOXP3+ regulatory T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(32): p. 13445-50.
79. Stockis, J., et al., *Membrane protein GARP is a receptor for latent TGF-beta on the surface of activated human Treg*. Eur J Immunol, 2009. **39**(12): p. 3315-22.
80. Edwards, J.P., et al., *Regulation of the expression of GARP/latent-TGF-β1 complexes on mouse T cells and their role in Regulatory T Cell and Th17 differentiation()*. J Immunol, 2013. **190**(11): p. 5506-15.
81. Ruprecht, C.R., et al., *Coexpression of CD25 and CD27 identifies FoxP3+ regulatory T cells in inflamed synovia*. J Exp Med, 2005. **201**(11): p. 1793-803.
82. Metelli, A., et al., *Immunoregulatory functions and the therapeutic implications of GARP-TGF-β in inflammation and cancer*. Journal of Hematology & Oncology, 2018. **11**: p. 24.
83. Wang, R., et al., *GARP regulates the bioavailability and activation of TGFbeta*. Mol Biol Cell, 2012. **23**(6): p. 1129-39.
84. Redensart.
85. Blondiaux, J., et al., *Two Roman and Medieval Cases of Symmetrical Erosive Polyarthropathy from Normandy: Anatomico-pathological and Radiological Evidence for Rheumatoid Arthritis*. Vol. 7. 1997. 451-466.
86. Leden, I., E. Persson, and O. Persson, *Aspects of the history of rheumatoid arthritis in the light of recent osteo-archaeological finds*. Scand J Rheumatol, 1988. **17**(5): p. 341-52.
87. Rogers, J., I. Watt, and P. Dieppe, *Arthritis in Saxon and mediaeval skeletons*. Br Med J (Clin Res Ed), 1981. **283**(6307): p. 1668-70.
88. Thould, A.K. and B.T. Thould, *Arthritis in Roman Britain*. Br Med J (Clin Res Ed), 1983. **287**(6409): p. 1909-11.
89. Entezami, P., et al., *Historical Perspective on the Etiology of Rheumatoid Arthritis*. Hand clinics, 2011. **27**(1): p. 1-10.
90. Ma, V.Y., L. Chan, and K.J. Carruthers, *Incidence, prevalence, costs, and impact on disability of common conditions requiring rehabilitation in the United States: stroke, spinal cord injury, traumatic brain injury, multiple sclerosis, osteoarthritis, rheumatoid arthritis, limb loss, and back pain*. Arch Phys Med Rehabil, 2014. **95**(5): p. 986-995.e1.
91. Bernatsky, S., et al., *Rheumatoid arthritis prevalence in Quebec*. BMC Res Notes, 2014. **7**: p. 937.
92. Herold, D.m.G., *Innere Medizin*. 2011: Gerd Herold, Köln.
93. Shamim, R., M.D. Jan, and U. Zafar, *Prevalence of rheumatoid arthritis in population with arthralgia presenting to a tertiary care hospital*. J Pak Med Assoc, 2015. **65**(11): p. 1202-5.
94. Huscher, D., et al., *Evolution of cost structures in rheumatoid arthritis over the past decade*. Ann Rheum Dis, 2015. **74**(4): p. 738-45.
95. Kirchhoff, T., et al., *Cost of illness in rheumatoid arthritis in Germany in 1997-98 and 2002: cost drivers and cost savings*. Rheumatology (Oxford), 2011. **50**(4): p. 756-61.

96. Kochi, Y., A. Suzuki, and K. Yamamoto, *Genetic basis of rheumatoid arthritis: a current review*. Biochem Biophys Res Commun, 2014. **452**(2): p. 254-62.
97. van Heemst, J., et al., *HLA and rheumatoid arthritis: how do they connect?* Ann Med, 2014. **46**(5): p. 304-10.
98. de Vries, R.R., et al., *Genetics of ACPA-positive rheumatoid arthritis: the beginning of the end?* Ann Rheum Dis, 2011. **70 Suppl 1**: p. i51-4.
99. Daha, N.A., et al., *Confirmation of STAT4, IL2/IL21, and CTLA4 polymorphisms in rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 2009. **60**(5): p. 1255-60.
100. Firestein, G.S., *Evolving concepts of rheumatoid arthritis*. Nature, 2003. **423**(6937): p. 356-61.
101. Schneider M., L.M., Abholz H.-H, Blumenroth M., Flügge C., Gerken M., Jäniche H., Kunz R., Krüger K., Mau W., Specker C., Zellner M. , ed. *Interdisziplinäre Leitlinie S3, Management der frühen rheumatoiden Arthritis 2011*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York
102. J. Kreuzer, m.Z.d.P. 2018.
103. Arnett, F.C., et al., *The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 1988. **31**(3): p. 315-24.
104. Kay, J. and K.S. Upchurch, *ACR/EULAR 2010 rheumatoid arthritis classification criteria*. Rheumatology (Oxford), 2012. **51 Suppl 6**: p. vi5-9.
105. Aletaha, D., et al., *2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative*. Arthritis Rheum, 2010. **62**(9): p. 2569-81.
106. Aletaha, D., et al., *Reporting disease activity in clinical trials of patients with rheumatoid arthritis: EULAR/ACR collaborative recommendations*. Arthritis Rheum, 2008. **59**(10): p. 1371-7.
107. Birch, J.T., Jr. and S. Bhattacharya, *Emerging trends in diagnosis and treatment of rheumatoid arthritis*. Prim Care, 2010. **37**(4): p. 779-92, vii.
108. Picerno, V., et al., *One year in review: the pathogenesis of rheumatoid arthritis*. Clin Exp Rheumatol, 2015. **33**(4): p. 551-8.
109. Braun, J., et al., *Cardiovascular Comorbidity in Inflammatory Rheumatological Conditions*. Dtsch Arztebl Int, 2017. **114**(12): p. 197-203.
110. Maradit-Kremers, H., et al., *Cardiovascular death in rheumatoid arthritis: a population-based study*. Arthritis Rheum, 2005. **52**(3): p. 722-32.
111. Specker, C., *[The heart in rheumatic diseases]*. Internist (Berl), 2007. **48**(3): p. 284-9.
112. Soubrier, M., et al., *Cardiovascular risk in rheumatoid arthritis*. Joint Bone Spine, 2014. **81**(4): p. 298-302.
113. Solomon, D.H., et al., *Disease activity in rheumatoid arthritis and the risk of cardiovascular events*. Arthritis Rheumatol, 2015. **67**(6): p. 1449-55.
114. Margaretten, M., et al., *Depression in patients with rheumatoid arthritis: description, causes and mechanisms*. International journal of clinical rheumatology, 2011. **6**(6): p. 617-623.
115. Carlsen, A.L., et al., *Circulating microRNA expression profiles associated with systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 2013. **65**(5): p. 1324-34.
116. Filkova, M., et al., *MicroRNAs in rheumatoid arthritis: potential role in diagnosis and therapy*. BioDrugs, 2012. **26**(3): p. 131-41.
117. Ding, S., et al., *Decreased microRNA-142-3p/5p expression causes CD4+ T cell activation and B cell hyperstimulation in systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 2012. **64**(9): p. 2953-63.
118. Nakasa, T., et al., *Expression of microRNA-146 in rheumatoid arthritis synovial tissue*. Arthritis Rheum, 2008. **58**(5): p. 1284-92.
119. Stanczyk, J., et al., *Altered expression of MicroRNA in synovial fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 2008. **58**(4): p. 1001-9.
120. O'Connell, R.M., et al., *MicroRNA-155 promotes autoimmune inflammation by enhancing inflammatory T cell development*. Immunity, 2010. **33**(4): p. 607-19.
121. Boldin, M.P., et al., *miR-146a is a significant brake on autoimmunity, myeloproliferation, and cancer in mice*. J Exp Med, 2011. **208**(6): p. 1189-201.

122. Kohlhaas, S., et al., *Cutting edge: the Foxp3 target miR-155 contributes to the development of regulatory T cells*. J Immunol, 2009. **182**(5): p. 2578-82.
123. Salerno, F. and M.C. Wolkers, *T-cells require post-transcriptional regulation for accurate immune responses*. Biochem Soc Trans, 2015. **43**(6): p. 1201-7.
124. O'Connell, R.M., et al., *Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(2): p. 111-22.
125. Taganov, K.D., et al., *NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(33): p. 12481-6.
126. Lu, L.F., et al., *Function of miR-146a in controlling Treg cell-mediated regulation of Th1 responses*. Cell, 2010. **142**(6): p. 914-29.
127. Albrecht, K., et al., *German guidelines for the sequential medical treatment of rheumatoid arthritis with traditional and biologic disease-modifying antirheumatic drugs*. Rheumatol Int, 2014. **34**(1): p. 1-9.
128. Li, J., et al., *Altered microRNA expression profile with miR-146a upregulation in CD4+ T cells from patients with rheumatoid arthritis*. Arthritis Res Ther, 2010. **12**(3): p. R81.
129. Nakasa, T., et al., *The inhibitory effect of microRNA-146a expression on bone destruction in collagen-induced arthritis*. Arthritis Rheum, 2011. **63**(6): p. 1582-90.
130. Pauley, K.M., et al., *Upregulated miR-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients*. Arthritis Res Ther, 2008. **10**(4): p. R101.
131. Zhou, Q., et al., *Decreased expression of miR-146a and miR-155 contributes to an abnormal Treg phenotype in patients with rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis, 2015. **74**(6): p. 1265-74.
132. Kurowska-Stolarska, M., et al., *MicroRNA-155 as a proinflammatory regulator in clinical and experimental arthritis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(27): p. 11193-8.
133. Lu, L.F., et al., *Foxp3-dependent microRNA155 confers competitive fitness to regulatory T cells by targeting SOCS1 protein*. Immunity, 2009. **30**(1): p. 80-91.
134. Rodriguez, A., et al., *Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function*. Science, 2007. **316**(5824): p. 608-11.
135. Huang, B., et al., *miR-142-3p restricts cAMP production in CD4+CD25- T cells and CD4+CD25+ TREG cells by targeting AC9 mRNA*. EMBO Rep, 2009. **10**(2): p. 180-5.
136. Filkova, M., et al., *Association of circulating miR-223 and miR-16 with disease activity in patients with early rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis, 2014. **73**(10): p. 1898-904.
137. Chen, X., et al., *Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases*. Cell Res, 2008. **18**(10): p. 997-1006.
138. <http://www.4s-dawn.com/DAS28/>.
139. Wells, G., et al., *Validation of the 28-joint Disease Activity Score (DAS28) and European League Against Rheumatism response criteria based on C-reactive protein against disease progression in patients with rheumatoid arthritis, and comparison with the DAS28 based on erythrocyte sedimentation rate*. Ann Rheum Dis, 2009. **68**(6): p. 954-60.
140. Kanof, M.E., *Isolation of T cells using rosetting procedures*. Curr Protoc Immunol, 2001. **Chapter 7**: p. Unit 7.2.
141. <https://itn-snal.net/wp-content/uploads/sites/9/2014/11/FACSCalibur-Flow-cytometer1.jpg>. [cited 2018 03.09.2018]; Available from: <https://itn-snal.net/wp-content/uploads/sites/9/2014/11/FACSCalibur-Flow-cytometer1.jpg>.
142. Liu, W., et al., *CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4(+) T reg cells*. The Journal of Experimental Medicine, 2006. **203**(7): p. 1701-1711.
143. Seddiki, N., et al., *Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells*. J Exp Med, 2006. **203**(7): p. 1693-700.
144. Tai, X., et al., *Basis of CTLA-4 function in regulatory and conventional CD4(+) T cells*. Blood, 2012. **119**(22): p. 5155-63.

145. Sonkoly, E., M. Stahle, and A. Pivarcsi, *MicroRNAs and immunity: novel players in the regulation of normal immune function and inflammation*. *Semin Cancer Biol*, 2008. **18**(2): p. 131-40.
146. Tarassishin, L., et al., *Interferon regulatory factor 3 inhibits astrocyte inflammatory gene expression through suppression of the proinflammatory miR-155 and miR-155\**. *Glia*, 2011. **59**(12): p. 1911-22.
147. Bluml, S., et al., *Essential role of microRNA-155 in the pathogenesis of autoimmune arthritis in mice*. *Arthritis Rheum*, 2011. **63**(5): p. 1281-8.
148. Sonkoly, E., et al., *MiR-155 is overexpressed in patients with atopic dermatitis and modulates T-cell proliferative responses by targeting cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4*. *J Allergy Clin Immunol*, 2010. **126**(3): p. 581-9.e1-20.
149. Schwarzenbach, H., et al., *Which is the accurate data normalization strategy for microRNA quantification?* *Clinical chemistry*, 2015. **61**(11): p. 1333-1342.
150. O'Leary, N.A., et al., *Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation*. *Nucleic Acids Res*, 2016. **44**(D1): p. D733-45.
151. Niimoto, T., et al., *MicroRNA-146a expresses in interleukin-17 producing T cells in rheumatoid arthritis patients*. *BMC Musculoskelet Disord*, 2010. **11**: p. 209.
152. Faraoni, I., et al., *miR-155 gene: a typical multifunctional microRNA*. *Biochim Biophys Acta*, 2009. **1792**(6): p. 497-505.
153. Spoerl, D., et al., *The role of miR-155 in regulatory T cells and rheumatoid arthritis*. *Clin Immunol*, 2013. **148**(1): p. 56-65.
154. Li, L. and H. Li, *Role of microRNA-mediated MMP regulation in the treatment and diagnosis of malignant tumors*. *Cancer Biology & Therapy*, 2013. **14**(9): p. 796-805.
155. O'Connell, R.M., et al., *MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(5): p. 1604-9.
156. Choy, E.H. and G.S. Panayi, *Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis*. *N Engl J Med*, 2001. **344**(12): p. 907-16.
157. Ceppi, M., et al., *MicroRNA-155 modulates the interleukin-1 signaling pathway in activated human monocyte-derived dendritic cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(8): p. 2735-40.
158. Zhou, H., et al., *miR-155 and its star-form partner miR-155\* cooperatively regulate type I interferon production by human plasmacytoid dendritic cells*. *Blood*, 2010. **116**(26): p. 5885-94.
159. Fulci, V., et al., *miR-223 is overexpressed in T-lymphocytes of patients affected by rheumatoid arthritis*. *Hum Immunol*, 2010. **71**(2): p. 206-11.
160. Lu, M.C., et al., *Increased miR-223 expression in T cells from patients with rheumatoid arthritis leads to decreased insulin-like growth factor-1-mediated interleukin-10 production*. *Clinical and Experimental Immunology*, 2014. **177**(3): p. 641-651.
161. Smigielska-Czepiel, K., et al., *Comprehensive analysis of miRNA expression in T-cell subsets of rheumatoid arthritis patients reveals defined signatures of naive and memory Tregs*. *Genes and Immunity*, 2014. **15**(2): p. 115-125.
162. Shibuya, H., et al., *Overexpression of microRNA-223 in rheumatoid arthritis synovium controls osteoclast differentiation*. *Mod Rheumatol*, 2013. **23**(4): p. 674-85.
163. Li, Y.T., et al., *Brief report: amelioration of collagen-induced arthritis in mice by lentivirus-mediated silencing of microRNA-223*. *Arthritis Rheum*, 2012. **64**(10): p. 3240-5.
164. Wang, Y., et al., *Elevated expression of miR-142-3p is related to the pro-inflammatory function of monocyte-derived dendritic cells in SLE*. *Arthritis Res Ther*, 2016. **18**(1): p. 263.
165. Bartel, D.P. and C.Z. Chen, *Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs*. *Nat Rev Genet*, 2004. **5**(5): p. 396-400.
166. Kosaka, N., H. Iguchi, and T. Ochiya, *Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis*. *Cancer Sci*, 2010. **101**(10): p. 2087-92.
167. Valadi, H., et al., *Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells*. *Nat Cell Biol*, 2007. **9**(6): p. 654-9.

168. Pigati, L., et al., *Selective release of microRNA species from normal and malignant mammary epithelial cells*. PLoS One, 2010. **5**(10): p. e13515.
169. Vickers, K.C., et al., *MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins*. Nat Cell Biol, 2011. **13**(4): p. 423-33.
170. Weber, J.A., et al., *The microRNA spectrum in 12 body fluids*. Clin Chem, 2010. **56**(11): p. 1733-41.
171. Mitchell, P.S., et al., *Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(30): p. 10513-8.
172. Arroyo, J.D., et al., *Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(12): p. 5003-8.
173. Murata, K., et al., *Plasma and synovial fluid microRNAs as potential biomarkers of rheumatoid arthritis and osteoarthritis*. Arthritis Res Ther, 2010. **12**(3): p. R86.
174. Denzer, K., et al., *Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device*. J Cell Sci, 2000. **113 Pt 19**: p. 3365-74.
175. Wang, H., et al., *Circulating microRNAs as candidate biomarkers in patients with systemic lupus erythematosus*. Transl Res, 2012. **160**(3): p. 198-206.
176. Manz, J., et al., *Targeted Resequencing and Functional Testing Identifies Low-Frequency Missense Variants in the Gene Encoding GARP as Significant Contributors to Atopic Dermatitis Risk*. J Invest Dermatol, 2016. **136**(12): p. 2380-2386.
177. Kanamori, M., et al., *Induced Regulatory T Cells: Their Development, Stability, and Applications*. Trends Immunol, 2016. **37**(11): p. 803-811.
178. Shevach, E.M. and A.M. Thornton, *tTregs, pTregs, and iTregs: Similarities and Differences*. Immunological reviews, 2014. **259**(1): p. 88-102.
179. Wallace, C.H., et al., *B lymphocytes confer immune tolerance via cell surface GARP-TGF-beta complex*. JCI Insight, 2018. **3**(7).
180. Probst-Kepper, M., R. Balling, and J. Buer, *FOXP3: required but not sufficient. the role of GARP (LRRC32) as a safeguard of the regulatory phenotype*. Curr Mol Med, 2010. **10**(6): p. 533-9.
181. Thummler, K., et al., *Immune regulation by peripheral suppressor T cells induced upon homotypic T cell/T cell interactions*. J Leukoc Biol, 2010. **88**(5): p. 1041-50.
182. Zhou, A.X., et al., *GARP-TGF-beta complexes negatively regulate regulatory T cell development and maintenance of peripheral CD4+ T cells in vivo*. J Immunol, 2013. **190**(10): p. 5057-64.
183. Oh, S.A. and M.O. Li, *TGF-β: Guardian of T Cell Function*. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), 2013. **191**(8): p. 3973-3979.
184. Leipe, J., et al., *Role of Th17 cells in human autoimmune arthritis*. Arthritis Rheum, 2010. **62**(10): p. 2876-85.
185. Bettelli, E., et al., *Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells*. Nature, 2006. **441**(7090): p. 235-8.
186. Veldhoen, M., et al., *TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells*. Immunity, 2006. **24**(2): p. 179-89.
187. Cai, L., et al., *Pathways by which interleukin 17 induces articular cartilage breakdown in vitro and in vivo*. Cytokine, 2001. **16**(1): p. 10-21.
188. Kotake, S., et al., *IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis*. J Clin Invest, 1999. **103**(9): p. 1345-52.
189. Jovanovic, D.V., et al., *IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages*. J Immunol, 1998. **160**(7): p. 3513-21.
190. Kulkarni, A.B., et al., *Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(2): p. 770-4.
191. Shull, M.M., et al., *Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease*. Nature, 1992. **359**(6397): p. 693-9.



192. Marie, J.C., D. Liggitt, and A.Y. Rudensky, *Cellular mechanisms of fatal early-onset autoimmunity in mice with the T cell-specific targeting of transforming growth factor-beta receptor*. *Immunity*, 2006. **25**(3): p. 441-54.
193. Kehrl, J.H., et al., *Transforming growth factor beta is an important immunomodulatory protein for human B lymphocytes*. *J Immunol*, 1986. **137**(12): p. 3855-60.
194. Kehrl, J.H., et al., *Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth*. *J Exp Med*, 1986. **163**(5): p. 1037-50.

## 6.2 Abkürzungsverzeichnis

ACR	American College of Rheumatology
Ago	Agonautenprotein
AMV	Alfalfa mosaic Virus
ARA	American Rheumatism Association
bp	basepair, Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit, Synonym: ESR
B-Zellen	Synonym: B-Lymphozyten
CD	Cluster of differentiation
CD25 <sup>-</sup>	CD25 <sup>-</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen
CD25 <sup>+</sup>	CD25 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte associated Protein, Synonym: CD152
d0	Versuchstag 0, Tag der Blutprobenentnahme
d1	Versuchstag 1, 24h nach Blutentnahme
d2	Versuchstag 2, 48h nach Blutentnahme
dest.	Destilliert
DIP	Distales Interphalangealgelenk
DMARD	disease-modifying anti-rheumatic drug
DNA	Desoxyrionucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESR	Erythrocyte Sedimentation Rate, Synonym: BSG
EULAR	European League Against Rheumatism
Exp5	Export Receptor Exportin-5
FACS	fluorescence-activated cell scanning
FAM	Carboxyfluorescein
Fas	Synonym: CD95, APO-1
FasL	Fas Ligand
FCS	fetal calf serum, Fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
Foxp3	Forkhead-Box-Protein P3, Synonym: Scurfin
GARP	Glycoprotein A repetitions predominant, Synonym: LRRC32
GEF	Guanine nucleotide exchange Factor
HC	healthy control, Synonym: Gesunde Kontrollgruppe
HC	healthy control, Synonym: Gesunde Kontrollgruppe
HLA	Human Leukocyte Antigen
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IL2R $\alpha$	Interleukin-2 Rezeptor Alpha Kette
IRAK	Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase
kbp	kilobasepair, 1000 Basenpaare
KUM	Universitätsklinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München
LRRC32	leucine-rich repeat-containing Protein 32
MACS	Magnetic-activated cell sorting
MCP	Metacarpophalangealgelenk
MFI	Mean Fluorescence Intensity, mittlere Fluoreszenzstärke
MHC	Major Histocompatibility Complex
miR	microRNA, miRNA
mRNA	messenger RNA
MTP	Metatarsophalangealgelenk

NHS	gepooltes Normal Human Serum
NSAR	Nichtsteroidales Antirheumatikum
OA	Osteoarthritis, Synonym: Arthrose
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin
PIP	Proximales Interphalangealgelenk
pre-miR	pre-microRNA, Synonym: pre-miRNA
pri-miR	pri-microRNA, Synonym: pri-miRNA
RA	Rheumatoide Arthritis
Ran-GTP	Ras-related nuclear GTP-binding Protein
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	Ribonucleic Acid
RNA	ribonucleic acid
RNU	Nucleolar RNA
rpm	revolutions per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
Serum-miR	Serum-microRNA, Serum-miRNA
SLE	Systemischer Lupus erythematoses
SRBC	Sheep Red Blood Cells
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor beta
TLR	Toll-like Receptor
TNF	Tumornekrosefaktor
Tregs	regulatorische T-Zellen
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
T-Zellen	Synonym: T-Lymphozyten
UTR	untranslated region
VAS	Visuelle Analogskala

### 6.3 Eidesstattliche Versicherung

**Kreuzer, Johannes Thomas**

---

Name, Vornamen

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**microRNA-Expression in regulatorischen T-Zellen und im Serum bei chronischer Inflammation am Beispiel der Rheumatoiden Arthritis**

selbstständig 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, 20.05.2019*

---

Ort, Datum

*Johannes Kreuzer*

---

Unterschrift Doktorand

## 6.4 Publikation

Die Dissertation wurde im Rahmen des Promotionsstudienganges „Oligonucleotides in Cell Biology and Therapy“ des Graduiertenkolleg 1202 der DFG unterstützt.

Teile dieser Arbeit wurden in folgender Publikation veröffentlicht:

Zhou Q\*, Haupt S\*, **Kreuzer JT**, Hammitzsch A, Proft F, Neumann C, Leipe J, Witt M, Schulze-Koops H, Skapenko A, *Decreased expression of miR-146a and miR-155 contributes to an abnormal Treg phenotype in patients with rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis, 2015 Jun;74(6):1265-74 [131]

Weiterhin wurden Teile dieser Arbeit als Posterpräsentation vorgestellt:

European Congress of Immunology 2012:

**J. T. Kreuzer**, Q. Zhou, H. Schulze-Koops & A. Skapenko, *GARP and miR-142-3p expression in patients with rheumatoid arthritis*

ACR/ARHP Annual Meeting 2012:

Qihui Zhou, Sonja Haupt, **Johannes Thomas Kreuzer**, Hendrik Schulze-Koops and Alla Skapenko, *miR-142-3p interferes with T Cell Proliferation by Targeting the Expression of Garp in Patients with Rheumatoid Arthritis*

## 6.5 Danksagung

*An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit ergreifen, um allen zu danken,  
die zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben:*

An erster Stelle danke ich allen teilnehmenden Patienten und Probanden, ohne die keines der Experimente dieser Dissertation möglich gewesen wäre.

Ich danke PD Dr. Patrick Möhnle für die überaus engagierte Betreuung und die stets konstruktiven Verbesserungsvorschläge.

Mein Dank gilt der Klinik für Anaesthesiologie, insbesondere Prof. Dr. Zwißler und Dr. Frey für die Unterstützung meiner Promotion. Weiterhin danke ich meinen assistenzärztlichen Kollegen (ganz besonders Dr. Melanie Märte) für ihre stets kollegiale Hilfe!

Ich danke der Rheumaeinheit für die Möglichkeit, sämtliche Experimente in einem hervorragend ausgestatteten Forschungslabor durchführen zu können. Mein Dank gilt daher Prof. Dr. med. Schulze-Koops sowie PD Dr. rer. nat. Dr. habil. med. Skapenko für die Überlassung der Laborausstattung und Materialien. Weiterhin danke ich allen in der Rheumaambulanz tätigen Ärzten für die Rekrutierung der Patienten für die Studie, sowie meinen Laborkollegen, insbesondere meiner Supervisorin Dr. Qihui Zhou, die mich mit großem Engagement einarbeitete, betreute und mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand. Ich möchte es auch nicht versäumen, mich bei Christine Schnabel zu bedanken, die für stets gefüllte Materialschränke sorgte und bei technischen Problemen eine stets hilfsbereite Ansprechpartnerin war.

Ich danke dem Graduiertenkolleg 1202 der DFG, vertreten durch Sprecher Prof. Dr. Endres, für die finanzielle Unterstützung meines Forschungsvorhabens sowie für die Vermittlung der Methodik wissenschaftlichen Arbeitens und die Möglichkeit des Gedankenaustausches mit anderen Nachwuchsforschern.

Ich möchte ganz besonders meinen Eltern danken, die mich nicht nur in Studium und Promotion, sondern auch im Alltag stets unterstützt haben und mir so ermöglichten, meinen Beruf als Arzt zu ergreifen. Meinen Eltern Barbara und Richard, aber auch meinen Paten Anne und Reinhard, gebührt daher mein großer Dank.

Weiterhin möchte ich meinen beiden Brüdern danken. Es ist schön zu wissen, dass wir uns aufeinander verlassen können! Es gäbe ohne euch außerdem bestimmt den ein oder anderen Satz der ohne Interpunktion auskommen müsste oder einfach unvermittelt und ohne Verb.

Zu guter Letzt danke ich meiner Freundin Karo!

Um die kleinen und großen Probleme des Alltags zu meistern, braucht es jemanden an seiner Seite, auf den man zählen kann:

Jemanden, der manchmal „nur da“ ist.

Jemanden, der einem manchmal den Kopf zurechtrückt.

... und manchmal braucht es jemanden, der dafür sorgt, dass das Überleben auch in stressigen Arbeitsphasen in letzter Sekunde durch frisch gekochte Pasta gesichert wird!

Für all das, DANKE!