

### 3 Ergebnisse

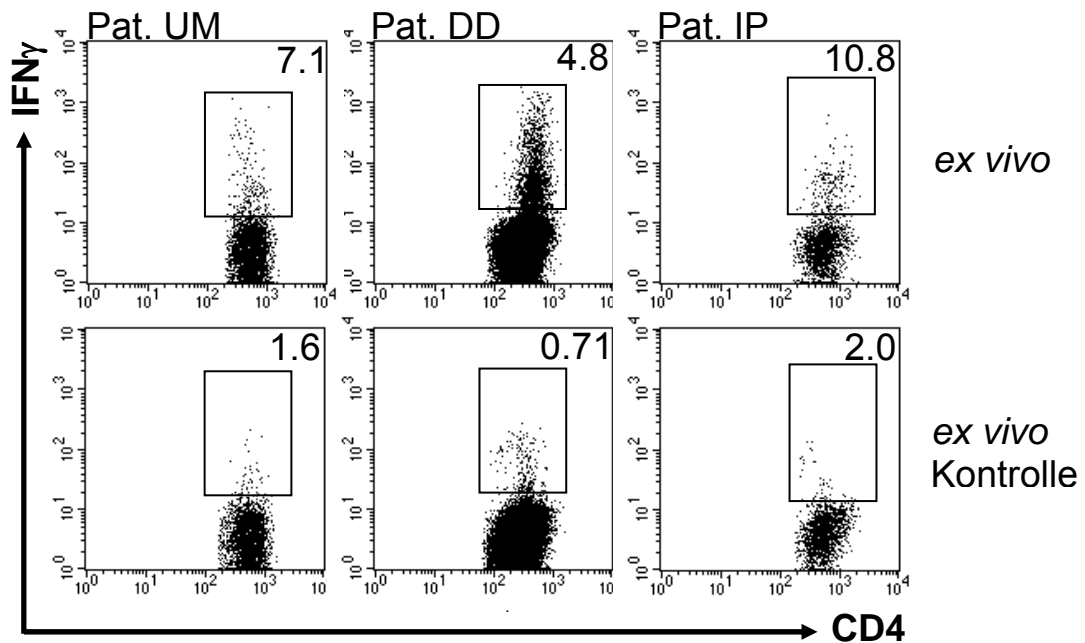
#### **3.1 Ex vivo Detektion von spontan $IFN\gamma$ sezernierenden Th Zellen in Synovialflüssigkeit von RA-Patienten**

Die RA wird vielfach als Th1-dominierte Erkrankung beschrieben (s. 1.3.4); dennoch existieren keine Studien, die die Sekretion des prototypischen Th1 Zytokins  $IFN\gamma$  durch lebende Th Zellen am Ort der Entzündung auf Einzelzellebene belegen.

Die Existenz kürzlich aktivierter,  $IFN\gamma$  produzierender Th1-Zellen wurde *ex vivo* mit der Technologie der zellulären Affinitätsmatrix (Zytokin-Sekretionsassay, vgl. 2.6.1.4, (Manz et al., 1995) untersucht, welche eine weitgehend unmanipulierte Detektion von lebenden Zytokin-Produzenten auf Einzelzellebene ermöglicht.

Mononukleäre Zellen aus Synovialflüssigkeit (SF-MNCs) von Patienten mit gesicherter RA-Diagnose wurden im Krankheitsschub untersucht. Nach Anfärbung von sezerniertem  $IFN\gamma$  sowie Markierung der Th Zellen mit CD4-Antikörpern wurde die Frequenz der  $IFN\gamma^+$  Zellen innerhalb der Th-Population durchflußzytometrisch bestimmt. Abb. 3.1 zeigt exemplarisch die Messungen von drei Patienten, in Tabelle 3.1 sind die Werte für alle Patienten zusammengefasst. Trotz starker Heterogenität der Patientengruppe (Medikation, Erkrankungsdauer, zelluläre Zusammensetzung des Punktats, Daten nicht gezeigt) ließen sich in allen Synovialpunktaten *ex vivo* proinflammatorisch aktive  $IFN\gamma^+$  Th Zellen nachweisen. Die Frequenzen bewegten sich nach Abzug der „*ex vivo*-Kontrollen“ zwischen 0.26-8.8% (Mittelwert: 3.93%, n=10).

Bei den „*ex vivo*“-Kontrollfärbungen wurde auf das  $IFN\gamma$ -catch-Reagenz verzichtet, um eine unspezifische  $IFN\gamma$ -Bindung bzw. spezifisch an die Zellmembran gebundenes, jedoch nicht sezerniertes Oberflächen- $IFN\gamma$  (Scheffold et al., 2000) auszuschließen.



**Abb. 3.1: Ex vivo Detektion von IFN $\gamma$  sezernierenden Th Zellen in Synovialpunktaten von RA Patienten.** Frisch entnommene Synovialpunktate wurden gewaschen, mittels Zytokin-Sekretionsassay sezerniertes IFN $\gamma$  angefärbt, CD4 markiert und im FACSCalibur analysiert. In Kontrollfärbungen wurde auf das catch-Reagenz verzichtet. Die Analyse im FACS erfolgte nach Anlegen zweier kombinierter Analysefenster auf Lymphozyten anhand der FSC/SSC-Eigenschaften sowie auf lebende (PJ<sup>-</sup>) CD4<sup>+</sup> Zellen. Drei exemplarische Experimente von insg. 10 (s.Tab. 3.1).

**Tab. 3.1: Frequenzen IFN $\gamma$ -sezernierender Zellen innerhalb der CD4<sup>+</sup> Th Population von RA-Patienten** (nach Abzug der jew. Frequenzen in den Kontrollfärbungen ohne catch-Reagenz).

Patienten-ID	Alter	Geschlecht	% IFN $\gamma$ <sup>+</sup> Th-Zellen
IP	62	w	8.8
AS	24	w	0.26
DD	22	m	4.1
UM	35	m	5.5
SS	47	w	1.5
ES	68	w	2.2
ID	48	w	5.0
FB	45	m	7.1
MS	47	m	1.2
UM2	33	w	3.6

$$\bar{x} = 3.93$$

## 3.2 Induktion von $IFN\gamma$ -Sekretion durch Zytokine in Th Zellen gesunder Spender

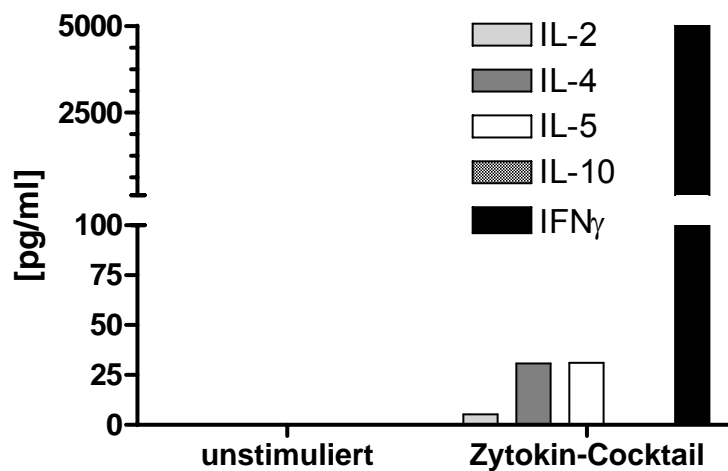
### 3.2.1 Ruhende $CD4^+$ Th Zellen sezernieren $IFN\gamma$ nach *in vitro* Stimulation mit einem inflammatorischen Zytokin-Cocktail

Der Nachweis proinflammatorischer Th Zellen bei der RA am Ort der Entzündung warf die Frage nach dem verantwortlichen Stimulus zur Induktion dieses Th1 Zytokins *in vivo* auf. Vor dem Hintergrund der aktuellen Diskussion um Th1 Zellen als Mediatoren innerhalb eines Zytokinnetzwerkes wurde die Hypothese verfolgt, ob  $IFN\gamma$  allein durch lösliche Faktoren, wie sie im entzündeten Gelenk vorliegen, induzierbar ist. In Tab. 3.2 sind die wichtigsten RA-assoziierten, in Synovialmembran und/oder -flüssigkeit nachgewiesenen Zytokine und Chemokine aufgelistet.

**Tabelle 3.2: Im entzündeten Gelenk bei der RA detektierbare Zytokine und Chemokine.**

Faktor	publiziert in:
IL-1 $\beta$	Übersicht: (Feldmann et al., 2001)
IL-6	Übersicht: (Scheller et al., 2006)
IL-7	(Harada et al., 1999; van Roon et al., 2003)
IL-8	(Rodenburg et al., 1999; Yokota et al., 2006)
IL-12	(Kim et al., 2000; Petrovic-Rackov and Pejnovic, 2006)
IL-15	Übersicht: (Baslund et al., 2005; Liew and McInnes, 2002)
IL-17	Übersicht: (Lubberts et al., 2005; Stamp et al., 2004)
IL-18	Übersicht: (Dayer, 1999; Liew and McInnes, 2002)
MIP1 $\alpha$	(Hanyuda et al., 2003; Min et al., 2004; Robinson et al., 1995)
TNF $\alpha$	Übersicht: (Feldmann et al., 2001)

In einem ersten Experiment wurden zunächst  $CD4^+$  Th Zellen aus Blut von gesunden Spendern isoliert und mit einer Zytokin-Mischung, die alle in Tabelle 3.2 gelisteten Faktoren enthielt und im Folgenden nur noch als „**Zytokin-Cocktail**“ bezeichnet wird, für 72h stimuliert. Mit Hilfe der CBA-Technologie wurden darauf folgend die Zellkultur-Überstände auf sezerniertes IL-2, IL-4, IL-5, IL-10 und  $IFN\gamma$  analysiert. Abb. 3.2 zeigt repräsentativ für 3 Spender, dass die Konzentration von IL-2, IL-4 und IL-5 nur geringfügig über der Detektionegrenze des CBA-Systems (>10pg/ml, Herstellerangaben) lag; hingegen induzierte die Stimulation von Th Zellen mit dem inflammatorischen Zytokin-Cocktail große Mengen von  $IFN\gamma$ , die mit mehr als 5000pg/ml oberhalb des Messbereichs lagen.



**Abb. 3.2: Induktion von IFN $\gamma$ -Sekretion durch Zytokine in Th Zellen gesunder Spender.**  $10^6$  MACS-sortierte CD4<sup>+</sup> Th Zellen gesunder Probanden wurden für 72h mit einem Cocktail inflammatorischer, am Ort der Entzündung bei der RA detektierbarer Zytokine (s. Tabelle in 3.2.1) stimuliert. Die Konzentrationen von sezerniertem IL-2,-4,-5,-10 und IFN $\gamma$  wurden mittels CBA-ELISA quantifiziert. Repräsentativ für 3 unabhängige Experimente.

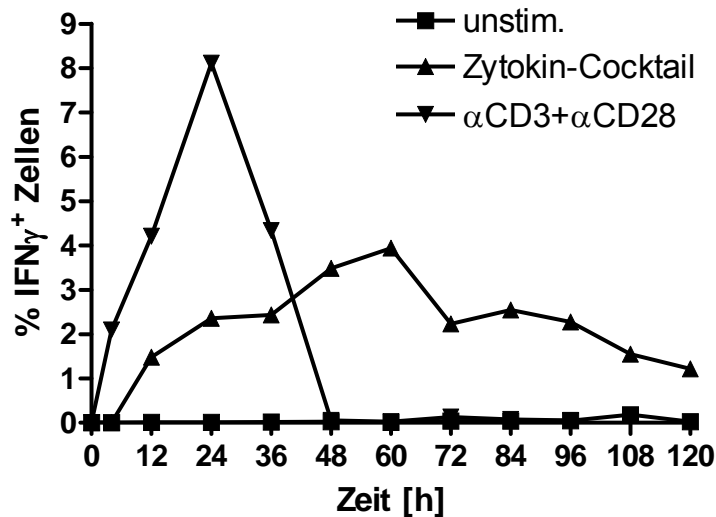
### 3.2.2 IFN $\gamma$ -Expressionskinetik in Zytokin- gegenüber TCR- stimulierten Th Zellen auf Einzelzellebene

Die Analyse der Zellkulturüberstände auf sezerniertes IFN $\gamma$  ließ keinen Aufschluss über die Frequenz der IFN $\gamma$  Produzenten sowie die Expressionskinetik zu; daher erfolgte nun die Untersuchung auf Einzelzellbasis im Vergleich zu Zellen, die über den TCR stimuliert wurden. Hierzu wurden isolierte CD4<sup>+</sup> Th Zellen mit dem Zytokin-Cocktail oder mittels  $\alpha$ CD3/28 als Imitation einer Aktivierung durch Antigen stimuliert; für die letzten 2-6h der Kultur wurde der Sekretionsinhibitor BrefeldinA hinzugefügt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die Zellen fixiert und gegen CD4 sowie intrazellulär gegen IFN $\gamma$  gefärbt.

Abb. 3.3 zeigt repräsentativ für 5 Spender, dass nach Zytokin-Stimulation eine kleine Population von maximal 4% (2.6-4%, n=5) aller Th Zellen die Fähigkeit zur IFN $\gamma$ -Sekretion ausprägte. Die Sekretion begann nach etwa 12h und erreichte ein Donor-abhängiges Maximum zwischen 36h und 72h. Am Ende des Beobachtungszeitraums (120h) waren noch bis zu 1% (0.4-1%, n=5) IFN $\gamma$ -Produzenten innerhalb der Th Population nachweisbar.

Im Gegensatz dazu verlief die Expression von IFN $\gamma$  in  $\alpha$ CD3/CD28-stimulierten Th Zellen deutlich schneller; das Zytokin ließ sich bereits nach etwa 4 Stunden

intrazellulär nachweisen, ein Maximum war nach etwa 24h messbar, nach 48h war keine  $\text{IFN}\gamma$ -Expression mehr im Durchflußzytometer detektierbar.



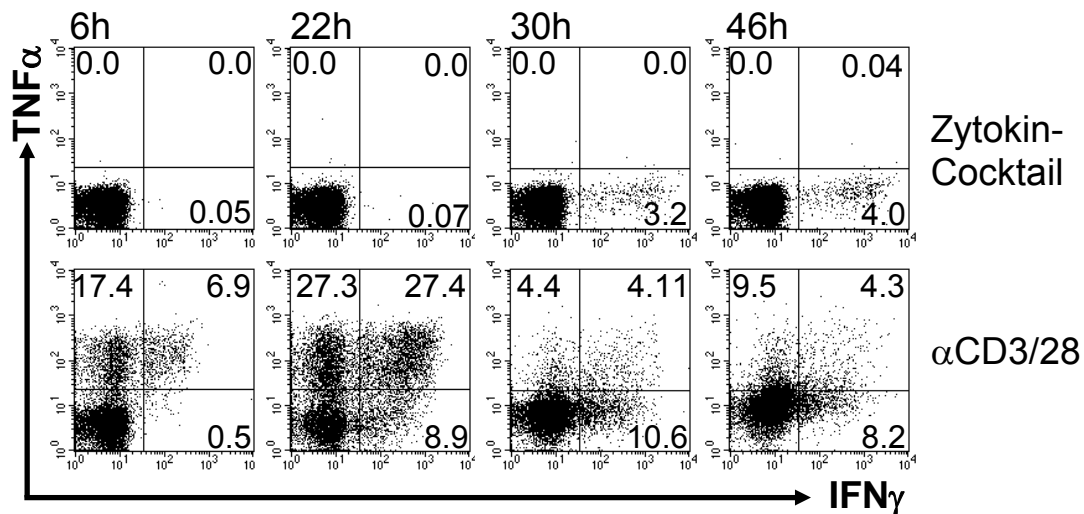
**Abb. 3.3:  $\text{IFN}\gamma$ -Expressionskinetik in TCR- bzw. Zytokin-stimulierten Th Zellen.** MACS-sortierte  $\text{CD4}^+$  Th Zellen wurden in  $\alpha\text{CD3}/28$ -beschichteten FACS-Röhrchen oder mit dem Zytokin-Cocktail stimuliert. BrefeldinA wurde für die letzten 2-6h zur Kultur hinzugefügt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen fixiert, intrazelluläres  $\text{IFN}\gamma$  angefärbt, die Zellen  $\text{CD4}$  markiert und im FACSCalibur analysiert. Die Auswertung erfolgte nach Anlegen zweier kombinierter Analysefenster auf Lymphozyten anhand der FSC/SSC-Eigenschaften sowie auf  $\text{CD4}^+$  Zellen. Repräsentativ für 5 Spender mit vergleichbaren Ergebnissen.

### 3.2.3 Zytokin-induzierte $\text{IFN}\gamma^+$ Th Zellen koexprimieren kein $\text{TNF}\alpha$

Der Entzündungsmediator  $\text{TNF}\alpha$  wird nach TCR-Stimulation von einigen Th-Zellen zusammen mit  $\text{IFN}\gamma$  koexprimiert (eigene Beobachtung). Hier wurde untersucht, ob Zytokin-stimulierte,  $\text{IFN}\gamma$ -sezernierende Th Zellen ebenfalls  $\text{TNF}\alpha$  synthetisieren. Dazu wurden wie in 3.2.2 isolierte  $\text{CD4}^+$  Th Zellen mit dem Zytokin-Cocktail oder über den TCR mittels  $\alpha\text{CD3}/28$  stimuliert; für die letzten 2-6h der Kultur wurde der Sekretionsinhibitor BrefeldinA hinzugefügt, die Zellen fixiert und  $\text{IFN}\gamma$ ,  $\text{TNF}\alpha$  sowie  $\text{CD4}$  markiert. Als Kinetik-Endpunkt wurde der in 3.2.2 identifizierte mittlere Zeitpunkt der maximalen  $\text{IFN}\gamma$ -Sekretion nach Zytokinstimulation (etwa 48h) gewählt.

Es konnte nach Stimulation mit dem Zytokincocktail zusätzlich zur  $\text{IFN}\gamma$ -Produktion keine  $\text{TNF}\alpha$ -Sekretion nachgewiesen werden (Abb.3.4). Im Gegensatz dazu koexprimierten nach  $\alpha\text{CD3}/28$ -Stimulation nach 22h bis zu 27%  $\text{IFN}\gamma$  und  $\text{TNF}\alpha$  (16-27%, n=3); bis zu 27% (18-27%, n=3) synthetisierten ausschließlich  $\text{TNF}\alpha$ .

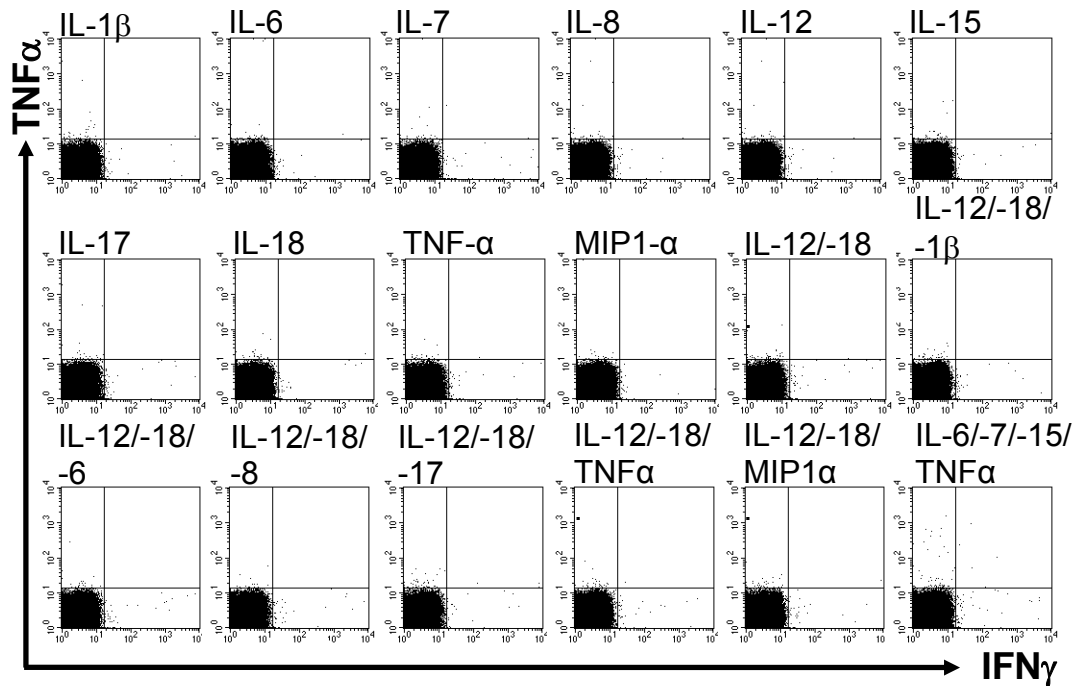
Zusammenfassend differieren Zytokin- und TCR-stimulierte Th Zellen deutlich in der Koexpression des proinflammatorischen Zytokins  $TNF\alpha$ .



**Abb. 3.4:  $IFN\gamma$ - und  $TNF\alpha$ -Expressionskinetik in TCR- bzw. Zytokin-stimulierten Th Zellen.** MACS-sortierte  $CD4^+$  Th Zellen wurden in  $\alpha CD3/28$ -beschichteten FACS-Röhrchen oder mit dem Zytokin-Cocktail stimuliert. BrefeldinA wurde für die letzten 2-6h zur Kultur hinzugefügt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen fixiert, intrazelluläres  $IFN\gamma$  und  $TNF\alpha$  angefärbt, die Zellen  $CD4$  markiert und im FACScalibur analysiert. Die Auswertung erfolgte nach Anlegen zweier kombinierter Analysefenster auf Lymphozyten anhand der FSC/SSC-Eigenschaften sowie auf  $CD4^+$  Zellen. Repräsentativ für 3 Experimente mit ähnlichen Ergebnissen.

### 3.2.4 „IL-12 + IL-18 + $\gamma_c$ - Zytokin“ ist die essentielle Kombination zur Induktion von $IFN\gamma$ -Sekretion in einer Subpopulation ruhender Th Zellen

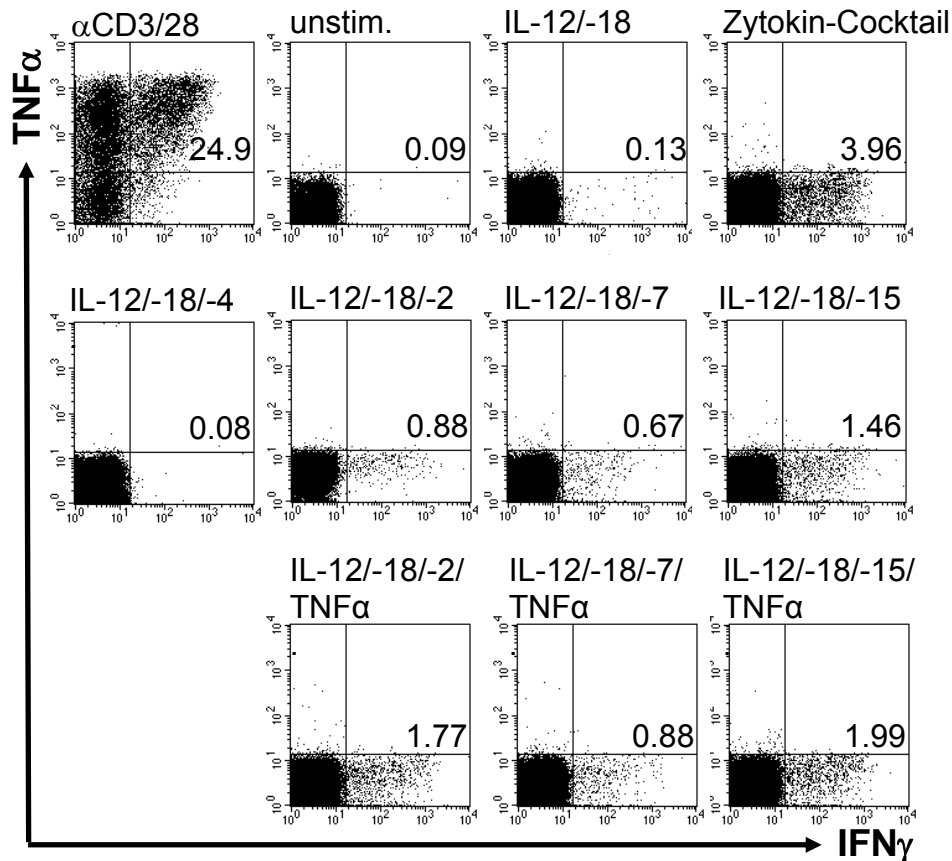
Zur Analyse der essentiellen Faktoren innerhalb des Zytokin-Cocktails wurden Th Zellen mit einer Reihe von Kombinationen der enthaltenen Faktoren stimuliert und die Frequenz der Zytokin-Produzenten auf Einzelzellebene im Durchflußzytometer analysiert. Abb. 3.4 zeigt zunächst repräsentativ für 3 Spender, dass keines der Zytokine allein in der Lage war, eine  $IFN\gamma$ -Synthese auszulösen. Weiterhin war nach Stimulation mit IL-12 und IL-18 im Gegensatz zu murinen Th1-Kulturen (Yang et al., 2001 und eigene Beobachtung) kein Anstieg der Frequenz  $IFN\gamma^+$  Th Zellen messbar; dasselbe galt für alle weiteren in 3.5 gezeigten Kombinationen. Eine  $TNF\alpha$ -Produktion war ebenfalls unter keiner dieser Stimulationsbedingungen nachweisbar.



**Abb. 3.5: Keine Induktion von  $\text{IFN}\gamma$ - oder  $\text{TNF}\alpha$ -Sekretion durch verschiedene Zytokin- und Chemokin-Kombinationen.** MACS-sortierte  $\text{CD4}^+$  Th Zellen wurden mit einzelnen Faktoren oder Kombinationen aus dem Zytokin-Cocktail für 36h stimuliert. BrefeldinA wurde für die letzten 6h zur Kultur hinzugefügt. Nach Fixierung wurde intrazelluläres  $\text{IFN}\gamma$  und  $\text{TNF}\alpha$  angefärbt, die Zellen  $\text{CD4}^+$  markiert und im FACSCalibur analysiert. Die Auswertung erfolgte nach Anlegen zweier kombinierter Analysefenster auf Lymphozyten anhand der FSC/SSC-Eigenschaften sowie auf  $\text{CD4}^+$  Zellen. Repräsentativ für 3 Experimente mit vergleichbaren Ergebnissen.

Als essentielle Faktoren zur Induktion des Th1-Zytokins  $\text{IFN}\gamma$  wurden IL-12 und IL-18 in Kombination mit einem Mitglied der drei  $\gamma_c$ -Zytokinfamilienmitglieder IL-2, IL-7 oder IL-15 identifiziert (Abb. 3.6); dabei war IL-15 am effektivsten (1.2-1.5%  $\text{IFN}\gamma$ -Produzenten, n=3) und IL-7 am wenigsten potent (0.5-0.7%  $\text{IFN}\gamma$ -Produzenten, n=3). Die Kombination IL-12+IL-18+IL-2 bewegte sich mit bis zu 0.9% (0.7-0.9%, n=3)  $\text{IFN}\gamma$ -Produzenten dazwischen, für IL-4 in Kombination mit IL-12 und IL-18 konnte keine  $\text{IFN}\gamma$ -Sekretion nachgewiesen werden. Wenn zu der minimal erforderlichen Kombination weitere proinflammatorische Zytokine wie  $\text{TNF}\alpha$  hinzugefügt wurden, konnte die Frequenz der antwortenden Zellen weiter gesteigert werden und induzierte bis zu 2% (1.4-2%, n=3)  $\text{IFN}\gamma^+$  Th Zellen bei der Kombination IL-12+IL-18+IL-15+ $\text{TNF}\alpha$ .

Eine Koproduktion von  $\text{TNF}\alpha$  war, wie bereits in 3.2.3 gezeigt, nur nach  $\alpha\text{CD3}/28$ -, nicht aber nach Zytokin-Stimulation zu beobachten.



**Abb. 3.6:** „IL-12 + IL-18 +  $\gamma_c$  - Zytokin“ ist die essentielle Kombination zur Induktion von  $IFN\gamma$  - Sekretion in einer Subpopulation ruhender Th Zellen. MACS-sortierte  $CD4^+$  Th Zellen wurden mit Kombinationen von Faktoren aus dem Zytokin-Cocktail für 36h stimuliert. Als Kontrolle wurden Zellen mit  $\alpha CD3/28$  oder nicht stimuliert. BrefeldinA wurde für die letzten 6h zur Kultur hinzugefügt. Nach Fixierung wurde intrazelluläres  $IFN\gamma$  und  $TNF\alpha$  angefärbt, die Zellen  $CD4$  markiert und im FACSCalibur analysiert. Die Auswertung erfolgte nach Anlegen zweier kombinierter Analysefenster auf Lymphozyten anhand der FSC/SSC-Eigenschaften sowie auf  $CD4^+$  Zellen. Repräsentativ für 3 Experimente mit ähnlichen Ergebnissen.

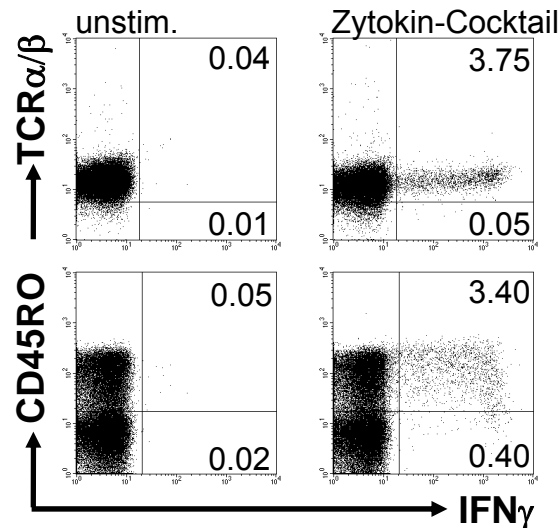
### 3.3 Charakterisierung der Zytokin-induzierten $IFN\gamma^+$ Th Zellen

#### 3.3.1. Zytokin-induzierte $IFN\gamma^+$ Th Zellen sind vom Gedächtnis-Typ und exprimieren $TCR\alpha/\beta$ - Ketten

In den folgenden Experimenten wurde die Induzierbarkeit der  $IFN\gamma$ -Expression innerhalb verschiedener Th-Zell-Subpopulationen analysiert. Th-Zellen wurden dazu für 36h mit dem Zytokin-Cocktail aktiviert und die  $IFN\gamma$ -Expression durchflußzytometrisch mit der Expression der  $TCR\alpha/\beta$ -Ketten sowie des Gedächtnis-Th-Markers  $CD45RO$  korreliert. Abb. 3.7 zeigt exemplarisch, dass der Großteil der  $CD4^+$  Zellen zur  $TCR\alpha/\beta^+$  Fraktion gehört; die  $IFN\gamma$  sezernierenden Th Zellen zeichneten sich nahezu ausnahmslos durch eine  $TCR\alpha/\beta$ -Koexpression aus. Ferner



war die  $\text{IFN}\gamma$ -Produktion auf Gedächtnis-Th Zellen beschränkt, die eine starke bis intermediäre Expression des CD45RO-Moleküls aufweisen. Es handelt sich folglich bei den Zytokin-induzierten  $\text{IFN}\gamma$ -Produzenten um konventionelle  $\text{TCR}\alpha/\beta^+$  Th-Gedächtniszellen.



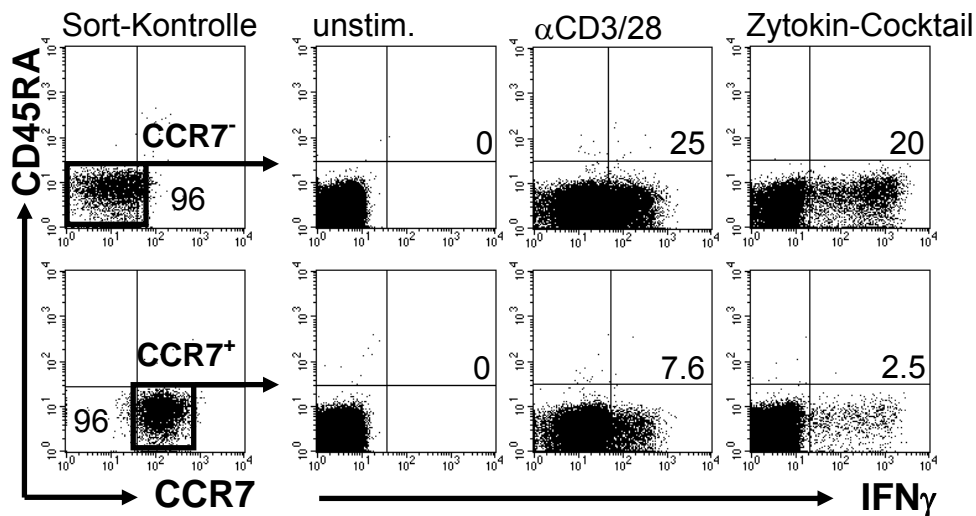
**Abb. 3.7: Zytokin-induzierte  $\text{IFN}\gamma^+$  Th Zellen sind vom Gedächtnis-Typ und exprimieren  $\text{TCR}\alpha/\beta$ -Ketten.** MACS-sortierte  $\text{CD4}^+$  Th Zellen wurden für 36h mit dem Zytokin-Cocktail stimuliert. BrefeldinA wurde für die letzten 6h zur Kultur hinzugefügt. Nach Fixierung wurde intrazelluläres  $\text{IFN}\gamma$ , sowie CD4 sowie CD45RO bzw.  $\text{TCR}\alpha/\beta$  auf der Oberfläche angefärbt und die Zellen im FACSCalibur analysiert. Die Auswertung erfolgte nach Anlegen zweier kombinierter Analysefenster auf Lymphozyten anhand der FSC/SSC-Eigenschaften sowie auf  $\text{CD4}^+$  Zellen. Repräsentativ für 3 Experimente mit ähnlichen Ergebnissen.

### 3.3.2 Zytokin-induzierte $\text{IFN}\gamma$ -produzierende Th-Zellen finden sich vermehrt in der $\text{CCR7}^-$ Effektor-Gedächtnis-Th Fraktion

Um zu überprüfen, ob Zytokin-induzierte  $\text{IFN}\gamma$ -Produzenten in der zentralen oder Effektor-Th-Gedächtnisfraktion (vgl. 1.2.10) angereichert sind, wurden Th-Zellen mittels FACS in  $\text{CCR7}^+$  (zentrale Gedächtniszellen) und  $\text{CCR7}^-$  (Effektor-Gedächtniszellen) Fraktionen sortiert und die Zytokin-induzierte  $\text{IFN}\gamma$ -Produktion nach 36h Kultur gemessen.

Abb. 3.8 zeigt repräsentativ für 3 Spender, dass  $\text{IFN}\gamma$ -Produzenten in der  $\text{CCR7}^-$  Effektor-Gedächtnisfraktion stark angereichert waren.

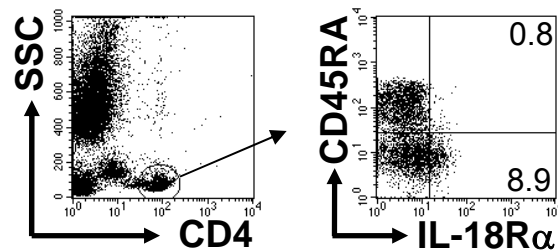
Als Kontrolle wurden Zellen mit  $\alpha\text{CD3}/28$  aktiviert; auch hier konnte eine Tendenz zu erhöhten  $\text{IFN}\gamma$ -Frequenzen in der  $\text{CCR7}^-$  Effektor-Memory-Population nachgewiesen werden, die jedoch weniger deutlich als nach Zytokin-Induktion ausgeprägt war.



**Abb. 3.8: Zytokin-induzierte IFN $\gamma$ -Produzenten finden sich vermehrt in der CCR7 Effektor-Gedächtnis-Th Fraktion.** MACS-vorangereicherte CD4<sup>+</sup> Th Zellen wurden mit Antikörpern gegen CD4, CD45RA, und CCR7 angefärbt und die CD4+CD45RA-CCR7<sup>+</sup> zentralen Gedächtnis- sowie CD4+CD45RA-CCR7<sup>-</sup> Effektor-Gedächtniszellen mittels FACSria sortiert. Dies geschah nach Anlegen von Analysefenstern auf Lymphozyten auf Grund der FSC/SSC-Eigenschaften sowie lebende (PJ) Th (CD4<sup>+</sup>) Zellen. Daraufhin wurde in einem Punktdiagramm CD45RA gegen CCR7 gegenübergestellt und die CD45RA<sup>-</sup> Gedächtnispopulationen anhand der CCR7-Expression separiert. Die so erhaltenen zentralen- und Effektor-Gedächtnispopulationen wurden für 36h mit dem Zytokin-Cocktail oder als Kontrolle für 12h in  $\alpha$ CD3/28-beschichteten FACS-Röhrchen stimuliert. BrefeldinA wurde für die letzten 6h zur Kultur hinzugefügt. Nach Fixierung wurden IFN $\gamma$  sowie CD4 angefärbt und die Zellen im FACSCalibur analysiert. Die Auswertung erfolgte nach Anlegen zweier kombinierter Analysefenster auf Lymphozyten anhand der FSC/SSC-Eigenschaften sowie auf CD4<sup>+</sup> Zellen. Repräsentativ für 3 Spender mit vergleichbaren Ergebnissen.

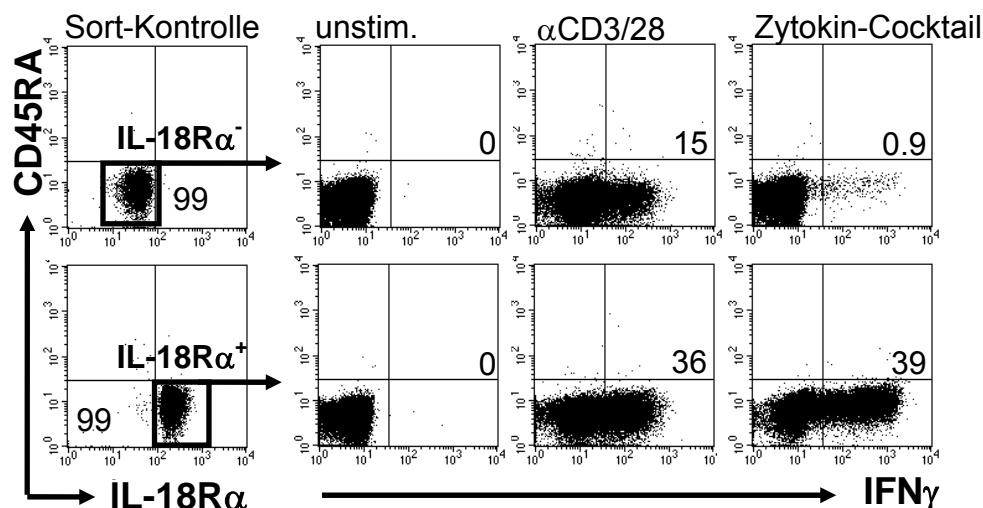
### 3.3.3 Ex vivo IL-18R $\alpha$ -Expression ist Voraussetzung für Zytokin-induzierte IFN $\gamma$ -Sekretion

Die Expression der IL-18R $\alpha$ -Untereinheit als Komponente des IL-18R-Komplexes wurde exklusiv auf Th1-, nicht aber auf Th2-polarisierten Zellen nachgewiesen (Chan et al., 2001; Xu et al., 1998). Da IL-18 für die Zytokin-abhängige IFN $\gamma$ -Induktion in Th-Zellen essentiell ist (3.2.4), wurde als nächstes überprüft, ob die  $\alpha$ -Rezeptorkette bereits *ex vivo* detektierbar ist oder ob sie im Verlauf der Kultur durch Zytokine innerhalb des Stimulations-Cocktails induziert wird. Bereits in frisch isolierten CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> Gedächtniszellen ließ sich eine IL-18R $\alpha$ <sup>+</sup> Population anfärben, deren Frequenz typischerweise zwischen 6-12% lag (n=10, Abb. 3.9).



**Abb. 3.9: Ex vivo Detektion von IL-18R $\alpha$ <sup>+</sup> Zellen innerhalb der Th Population.** PBMC wurden mit Antikörpern gegen CD4, CD45RA, und IL-18R $\alpha$  angefärbt und durchflußzytometrisch analysiert. Dies geschah nach Anlegen von Analysefenstern auf CD4<sup>+</sup> Lymphozyten auf Grund der SSC-Eigenschaften. Daraufhin wurde in einem Punktdiagramm CD45RA IL-18R $\alpha$  gegenübergestellt. Die angegebenen Frequenzen beziehen sich auf die gesamte CD4<sup>+</sup> Th Population. Repräsentativ für 10 Spender mit ähnlichen Resultaten.

Um zu untersuchen, ob die *ex vivo* IL-18R $\alpha$  Expression für die Zytokin-abhängige IFN $\gamma$  Produktion essentiell ist, wurden CD45RA<sup>-</sup>IL-18R $\alpha$ <sup>+</sup> und CD45RA<sup>-</sup>IL-18R $\alpha$ <sup>-</sup> Gedächtnis-Th Zellen mittels FACS sortiert und für 36h mit dem Zytokin-Cocktail oder  $\alpha$ CD3/28 aktiviert.



**Abb. 3.10: Ex vivo IL-18R $\alpha$ -Expression ist Voraussetzung für Zytokin-induzierte IFN $\gamma$  Sekretion.** Sortierte CD4<sup>+</sup> Th Zellen wurden mit Antikörpern gegen CD4, CD45RA, und IL-18R $\alpha$  angefärbt und die CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>IL-18R $\alpha$ <sup>+</sup> sowie CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>IL-18R $\alpha$ <sup>-</sup> Gedächtniszellen mittels FACSaria sortiert. Dies geschah nach Anlegen von Analysefenstern auf Lymphozyten auf Grund der FSC/SSC-Eigenschaften sowie lebende (PJ<sup>-</sup>) Th (CD4<sup>+</sup>) Zellen. Daraufhin wurde in einem Punktdiagramm CD45RA gegen IL-18R $\alpha$  gegenübergestellt und die CD45RA<sup>-</sup> Gedächtnispopulationen anhand der IL-18R $\alpha$ -Expression separiert. Diese Gedächtnispopulationen wurden für 36h mit dem Zytokin-Cocktail oder für 12h in  $\alpha$ CD3/28-beschichteten FACS-Röhrchen (Kontrolle) stimuliert. BrefeldinA wurde für die letzten 6h zur Kultur hinzugefügt. Nach Fixierung wurden IFN $\gamma$  sowie CD4 angefärbt und die Zellen im FACSCalibur analysiert. Die Auswertung erfolgte nach Anlegen zweier kombinierter Analysefenster auf Lymphozyten anhand der FSC/SSC-Eigenschaften sowie auf CD4<sup>+</sup> Zellen. Repräsentativ für 5 Spender mit vergleichbaren Ergebnissen.

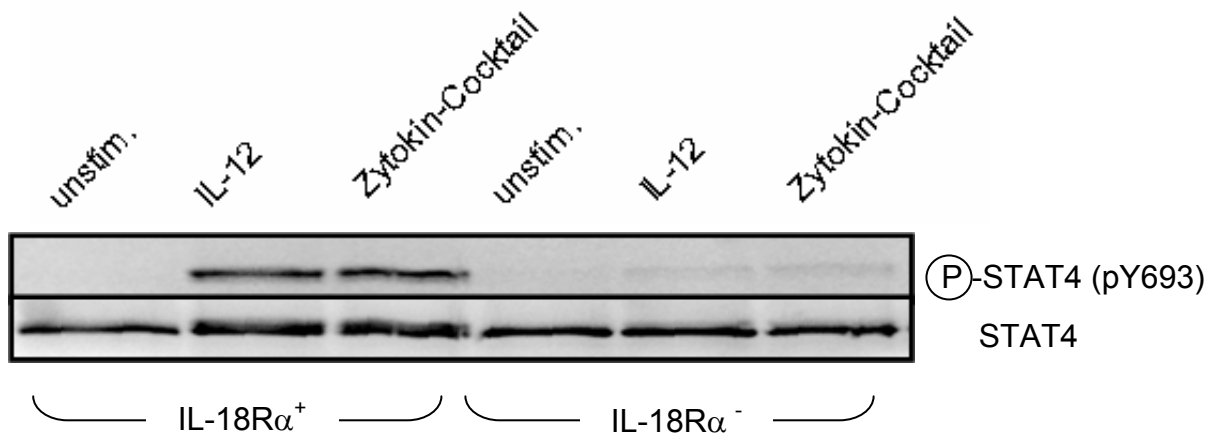
Während nach  $\alpha$ CD3/28-Stimulation sowohl IL-18R $\alpha$ <sup>+</sup> wie IL-18R $\alpha$ <sup>-</sup> Th Zellen IFN $\gamma$  sezernierten (Abb.3.10), war für die Zytokin-aktivierte IFN $\gamma$ -Sekretion eine *ex*

*vivo* IL-18R $\alpha$ -Expression essentiell: IFN $\gamma$ -Produzenten waren nach Zytokin-Stimulation in der IL-18R $\alpha^+$  Fraktion hoch angereichert (27-39%, n=5; vgl. Abb. 3.10). Lediglich ein geringer Prozentsatz von 0.1-0.9% (n=5) innerhalb der IL-18R $\alpha^-$  Population sezernierte IFN $\gamma$  nach Stimulation durch Zytokine; für diese Population kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass eine geringere Anzahl von IL-18R $\alpha$ -Molekülen exprimiert wird, die jedoch für eine Visualisierung im FACS zu gering ist.

### **3.3.4 *Ex vivo* isolierte IL-18R $\alpha^+$ Th-Zellen koexprimieren funktionale IL-12R-Komplexe**

IL-12 wurde als essentieller Faktor für die Zytokin-induzierte IFN $\gamma$ -Produktion identifiziert (3.2.4). Die für die IL-12-Bindung und -Signaltransduktion erforderliche  $\beta$ 2-Kette des IL-12R-Komplexes ist wie IL-18R $\alpha$  als Th1-spezifischer Marker beschrieben, der im Verlaufe der Th1-Differenzierung exprimiert wird und bisher auf ruhenden Th-Gedächtniszellen nicht detektiert werden konnte (Rogge et al., 1997; Rogge et al., 1999). Im Rahmen dieser Arbeit konnten auf ruhenden Th-Gedächtniszellen ebenfalls keine IL-12R $\beta$ 2-Ketten mit kommerziell erhältlichen Antikörpern im Durchflußzytometer angefärbt werden (Daten nicht gezeigt). Um analog zu 3.3.3 zu überprüfen, ob funktionale IL-12R-Komplexe erst Zytokin-abhängig im Verlauf der 36-stündigen Kultur induziert werden oder bereits *ex vivo* unterhalb der Detektionsgrenze des Durchflußzytometers vorliegen, wurde eine Western-Analyse mit IL-18R $\alpha^+$  und IL-18R $\alpha^-$  Gedächtnis-Th-Zellen durchgeführt. Darin wurde die funktionale Expression des IL-12R-Komplexes anhand der Phosphorylierung von STAT4, dem unmittelbar abwärts des Rezeptorkomplexes induzierbaren Transkriptionsfaktor, untersucht.

*Ex vivo* sortierte IL-18R $\alpha^+$  und IL-18R $\alpha^-$  Populationen wurden dazu entweder nicht, mit IL-12 oder mit dem Zytokin-Cocktail kultiviert und die Menge an phosphoryliertem STAT4 nach einer Stunde visualisiert. Die kurze Stimulationsdauer wurde gewählt, um eine aktivierungsabhängige Rezeptorinduktion auszuschließen; die weitere Verkürzung der Stimulationsdauer auf 15 min führte zu vergleichbaren Ergebnissen (nicht gezeigt).



**Abb. 3.11: Ex vivo isolierte IL-18R $\alpha$ <sup>+</sup> Th Zellen koexprimieren funktionale IL-12R-Komplexe.** MACS-vorangereicherte CD4<sup>+</sup> Th Zellen wurden mit Antikörpern gegen CD4, CD45RA, und IL-18R $\alpha$  angefärbt und die CD4+CD45RA-IL-18R $\alpha$ <sup>+</sup> sowie CD4+CD45RA-IL-18R $\alpha$ <sup>-</sup> Gedächtnispopulationen mittels FACSaria bis auf 99% angereichert. Dies geschah nach Anlegen von Analysefenstern auf Lymphozyten auf Grund der FSC/SSC-Eigenschaften sowie lebende (PJ<sup>-</sup>) Th (CD4<sup>+</sup>) Zellen. Daraufhin wurde in einem Punktdiagramm CD45RA gegen IL-18R $\alpha$  dargestellt und die CD45RA<sup>-</sup> Gedächtnispopulationen anhand der IL-18R $\alpha$ -Expression separiert. Je 1.5x10<sup>6</sup> Zellen wurden daraufhin für 1h nicht, mit IL-12 oder mit dem Zytokin-Cocktail stimuliert und lysiert. Die Proteine wurden über ein 10%iges SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western-Blot immobilisiert. Die Detektion erfolgte mit  $\alpha$ STAT4-spezifischen bzw.  $\alpha$ -phospho-STAT4-spezifischen Erstantikörpern, gefolgt von Peroxidase-gekoppelten Detektionsantikörpern; die mittels Chemolumineszenz-Reagenz erzeugten Signale wurden im Fuji LAS-3000-Scanner aufgenommen. Zur Anfärbung von STAT4 nach Markierung von Phospho-STAT4 wurde die Membran „gestrippt“. Ein repräsentatives Experiment von dreien.

Es ist zu erkennen, dass IL-18R<sup>+</sup>, nicht aber IL-18R<sup>-</sup> Th Zellen bereits funktionale IL-12R-Komplexe tragen, da in der Anwesenheit von IL-12 eine STAT4-Phosphorylierung erfolgte (Abb.3.11). Zytokin-abhängige IFN $\gamma$ -Produktion scheint folglich nur in Th Zellen, die bereits *ex vivo* eine Th1-assoziierte Rezeptorausstattung aufweisen, induzierbar zu sein.

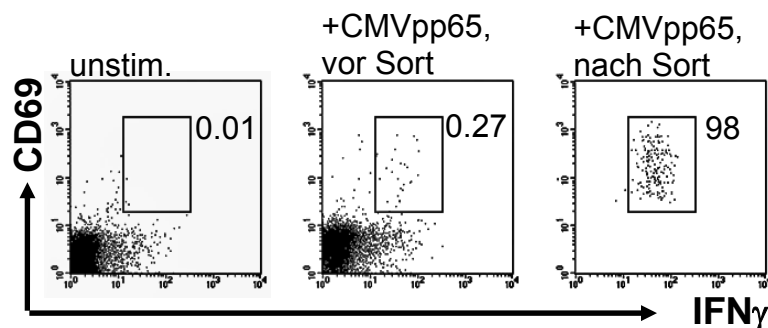
### 3.3.5 CMVpp65-spezifische Th1-Zellen synthetisieren uniform IFN $\gamma$ nach Zytokin-Stimulation

In den vorangegangenen Untersuchungen wurde die Zytokin-vermittelte IFN $\gamma$ -Induktion in ruhenden, *ex vivo* isolierten Gedächtniszellen mit einem Th1-ähnlichen Phänotyp beschrieben.

Um die Zytokin-induzierte IFN $\gamma$ -Produktion in Zellen zu untersuchen, die mit chronisch aktivierten Th1-Zellen aus entzündeten Gelenken von RA-Patienten vergleichbar sind, wurden Experimente mit CMV-spezifischen Th1-Zellen von gesunden Spendern durchgeführt; diese werden durch persistierende, vom

Immunsystem kontrollierte Viruslast vermutlich repetitiv *in vivo* restimuliert (Amyes et al., 2003; Fletcher et al., 2005; Gamadia et al., 2003). Untersuchungen zum Differenzierungsstatus von CMV-spezifischen Th1-Zellen lassen zahlreiche phänotypische und funktionale Ähnlichkeiten mit synovialen Th Zellen erkennen (Bernier et al., 2000; Tak et al., 1996; Warrington et al., 2001).

Nach Isolation CMV-spezifischer Th1-Zellen aus PBMC eines CMV<sup>+</sup> Spenders anhand von CMVpp65-induzierter IFN $\gamma$ - und CD69-Expression (Abb. 3.12; vergl. 2.7.2.1) wurden die Zellen 10 Tage *in vitro* in der Gegenwart von IL-7 und IL-15 und autologen „Feeder“-Zellen expandiert und für 5 weitere Tage ohne Zytokine kultiviert.



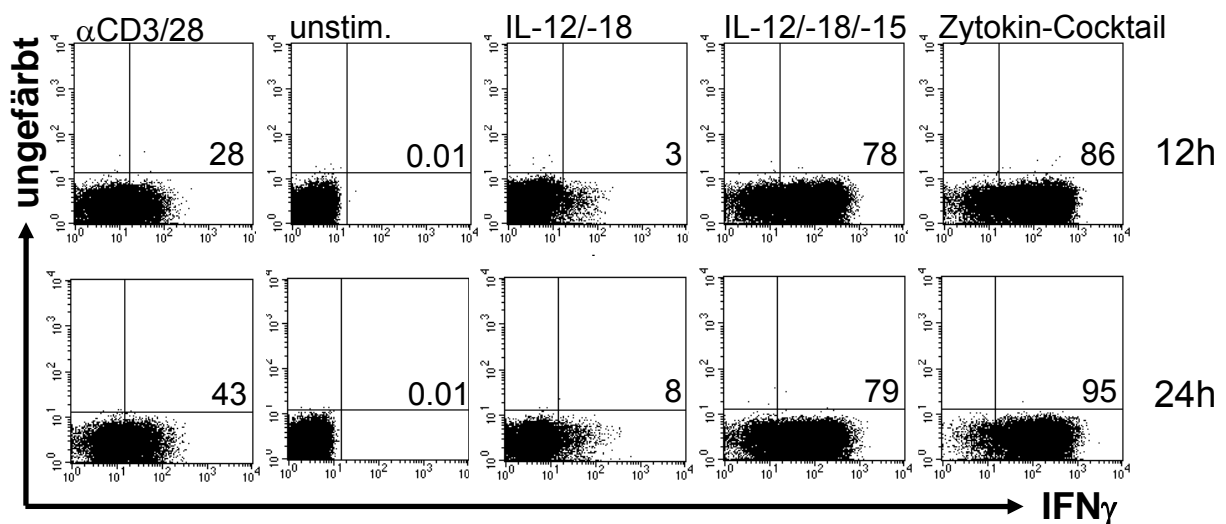
**Abb. 3.12: Isolierung von CMVpp65-spezifischen Th1 Zellen.** PBMC eines gesunden, CMV<sup>+</sup> Spenders wurden für 6h mit CMVpp65 in Gegenwart von  $\alpha$ CD28 stimuliert; die spezifisch aktivierten, IFN $\gamma$ <sup>+</sup> Th Zellen wurden mittels Zytokin-Affinitätsmatrix markiert sowie mit Fluorochromen gegen CD4 und den Aktivierungsmarker CD69 angefärbt und mittels FACS Aria angereichert. Die Reanalyse erfolgte ebenfalls am FACS Aria nach Anlegen von Analysefenstern auf CD4<sup>+</sup>, lebende (PJ) Lymphozyten. Die isolierten Zellen wurden innerhalb von 10 Tagen in der Gegenwart eines 100-fachen Überschusses von autologen, bestrahlten „Feeder“-Zellen und je 25 ng/ml IL-7 und IL-15 expandiert.

Anschließend wurden die so erhaltenen CMVpp65-spezifischen Th1-Zellen entweder mit IL-12+IL-18 oder mit der minimalen IFN $\gamma$ -induzierenden Zytokin-Kombination IL-12+IL-18+IL-15 oder mit dem Zytokin-Cocktail für 12, 24 oder 36h restimuliert.

Die Kombination von IL-12 und IL-18 mit dem  $\gamma_c$ -Zytokin IL-15 war notwendig und ausreichend, um bereits nach 12h in über 75% eine IFN $\gamma$  - Synthese zu initiieren. Die Stimulation mit dem kompletten Zytokin-Cocktail konnte diese Frequenz noch auf bis zu 85% erhöhen. Die Kombination von IL-12+IL-18 allein reichte nicht aus, um in einer Mehrheit der pp65-spezifischen Th1 Zellen IFN $\gamma$  zu induzieren (Abb. 3.13). Weiterhin ist erkennbar, dass sich nach 24h die Frequenz der IFN $\gamma$ -Produzenten durch Kultur in IL-12+IL-18+IL-15 nicht mehr veränderte, jedoch nach 24-stündiger Stimulation mit dem Zytokin-Cocktail nahezu jede (95%) CMVpp65-spezifische Th1-

Zelle die Fähigkeit zur  $\text{IFN}\gamma$ -Sekretion erworben hatte (Abb. 3.13). Nach 36h reduzierte sich die Frequenz der  $\text{IFN}\gamma$ -Produzenten bereits wieder geringfügig (Daten nicht gezeigt). Experimente mit einer CMVpp65-spezifischen Th1-Linie eines zweiten Spenders führten zu vergleichbaren Resultaten.

Kürzlich mit Antigen-restimulierte Th1-Zellen benötigen folglich dieselbe Zytokinkombination zur Induktion der  $\text{IFN}\gamma$ -Synthese wie ruhende, *ex vivo* isolierte Th1-ähnliche Zellen. Unterschiede bestehen jedoch in der schnelleren Kinetik der  $\text{IFN}\gamma$ -Synthese sowie der deutlich erhöhten Frequenz der mit  $\text{IFN}\gamma$ -Produktion antwortenden CMVpp65-spezifischen Th1 Zellen.



**Abb. 3.13: CMVpp65-spezifische Th1 Zellen synthetisieren uniform  $\text{IFN}\gamma$  nach Zytokin-Stimulation.** Nach 5-tägiger Kultur ohne Zytokine wurden CMVpp65-spezifische TH1 Zellen (s.Abb.3.11) wie oben bezeichnet für 12h oder 24h stimuliert; dabei war BrefeldinA für die letzten 6h der Kultur anwesend. Nach Fixierung und Färbung von  $\text{IFN}\gamma$  sowie CD4 erfolgte die durchflußzytometrische Analyse der  $\text{IFN}\gamma$ -Expression. Dazu wurden zuvor Analysefenster auf Lymphozyten sowie  $\text{CD4}^+$  Th Zellen gelegt. Ein repräsentatives Experiment von zweien mit CMVpp65-spezifischen Th1 Zellen unterschiedlicher Spender.

### **3.4 Signaltransduktion in Zytokin-induzierten $IFN\gamma^+$ Th-Zellen**

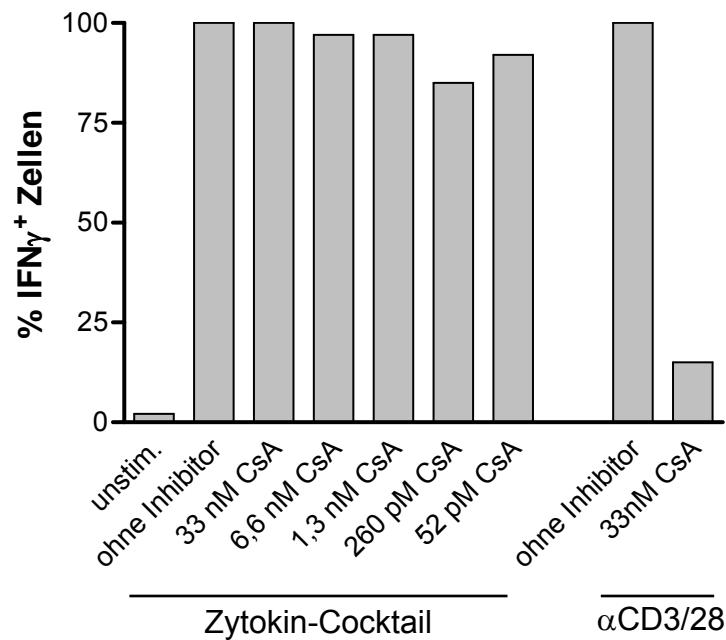
In den folgenden Experimenten wurde untersucht, welche Signaltransduktionswege für die Zytokin-induzierte  $IFN\gamma$ -Produktion in ruhenden, Th1-ähnlichen Zellen im Menschen essentiell sind. Dies geschah durch Quantifizierung der Frequenz  $IFN\gamma$ -produzierender Th Zellen in Gegenwart oder Abwesenheit von Inhibitoren gegen verschiedene Signaltransduktionsmediatoren, die direkt oder indirekt an IL-18R oder die  $\gamma$ -Kette des IL-2-Rezeptors gekoppelt sind oder die bei der TCR-vermittelten  $IFN\gamma$ -Synthese eine Rolle spielen. Bereits in 3.3.4 wurde nachgewiesen, dass die Phosphorylierung von STAT4, das an Konsensusregionen im  $IFN\gamma$ -Promotor bindet (Barbulescu et al., 1998), durch IL-12 in  $IL-18R\alpha^+$ , nicht aber in  $IL-18R\alpha^-$  Th Zellen induziert wird.

#### **3.4.1 Zytokin-induzierte $IFN\gamma$ -Produktion ist Cyclosporin-insensitiv**

Zunächst wurde untersucht, ob der Kalzineurin-Inhibitor Cyclosporin A einen Einfluß auf die Zytokin-abhängige  $IFN\gamma$ -Produktion in ruhenden Th Gedächtniszellen hat. Kalzineurin ist eine kalziumabhängige Proteinphosphatase, die die nukleäre Translokation des Transkriptionsfaktors NFAT induziert, der für die TCR-abhängige  $IFN\gamma$ -Sekretion essentiell ist (Aune and Flavell, 1997).

Es konnte kein Anhaltspunkt für eine Rolle von CaN bei der Zytokin-induzierten  $IFN\gamma$ -Synthese gefunden werden, da die Frequenz der  $IFN\gamma^+$  Th Zellen in Gegenwart steigender Konzentrationen von CsA konstant blieb (Abb. 3.14). Als Kontrolle wurden Zellen mit  $\alpha CD3/28$  in der Abwesenheit oder Gegenwart von CsA stimuliert und der Einfluß auf die  $IFN\gamma$  Synthese untersucht; die optimale CsA-Konzentration wurde zuvor in Titrationsexperimenten ermittelt (Daten nicht gezeigt). Die Bedeutung von CaN bzw. NFAT für die TCR-vermittelte  $IFN\gamma$ -Produktion zeigte sich in dem dramatischen Rückgang der Frequenz  $IFN\gamma^+$  Th Zellen in der mit CsA vorbehandelten Kultur (Abb. 3.14).



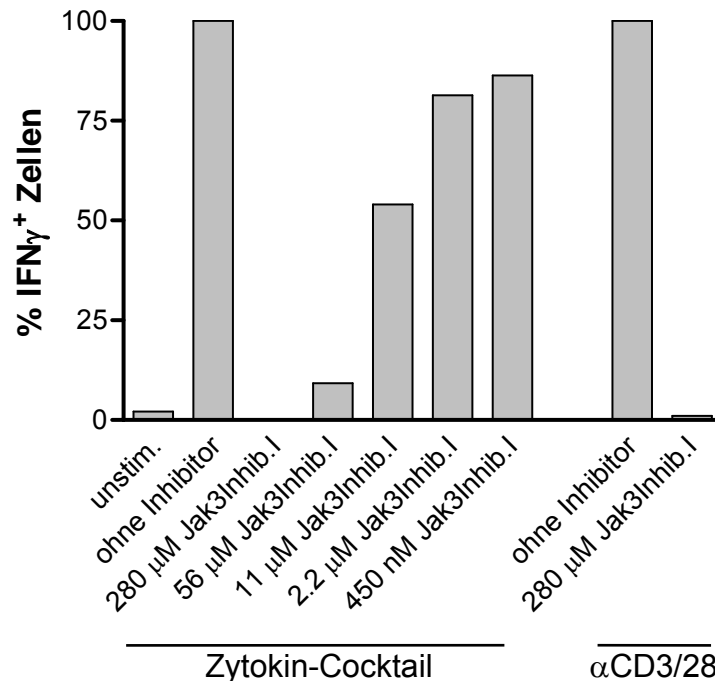


**Abb. 3.14: Zytokin-induzierte IFN $\gamma$ -Produktion ist Cyclosporin-insensitiv.** MACS-sortierte CD4<sup>+</sup>, CD45RA-depletierte Th Gedächtniszellen wurden für 45 min. in der Gegenwart oder Abwesenheit verschiedener CsA-Konzentrationen kultiviert und anschließend für 36h mit dem Zytokin-Cocktail oder für 12h in  $\alpha$ CD3/28-beschichteten FACS-Röhrchen stimuliert. BrefeldinA wurde für die letzten 6h zur Kultur hinzugefügt. Nach Fixierung und Anfärbung von IFN $\gamma$  sowie CD4 wurden die Zellen im FACSCalibur analysiert. Dies geschah nach Anlegen zweier kombinierter Analysefenster auf Lymphozyten anhand der FSC/SSC-Eigenschaften sowie auf CD4<sup>+</sup> Zellen. Die Frequenzen der IFN $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen in Abwesenheit von CsA wurden als 100% festgelegt; anhand dessen wurde die Veränderung nach Zugabe des CaN-Inhibitors in Prozent kalkuliert. Repräsentativ für 3 Experimente mit vergleichbaren Ergebnissen.

### 3.4.2 Janus Kinase3-Blockade inhibiert die Zytokin-induzierte IFN $\gamma$ -Produktion

Die Ereignisse nach Interaktion eines Liganden mit Typ-I-Zytokinrezeptoren, zu denen IL-2R, IL-7R und IL-15R zählen, sind vielfältig; sie beinhalten zunächst die Phosphorylierung von Janus-Kinasen (JAKs) mit anschließender Aktivierung von Mitogen-Aktivierten Kinasen (MAPKs), Extrazellulär-regulierten Kinasen (Erk), Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) oder STAT-Molekülen (vgl. Abb. 4.1). Es ist bekannt, dass die  $\gamma$ -Rezeptorkette mit JAK3-Molekülen assoziiert (Übersicht s. Ellery and Nicholls, 2002), die zur Familie der zytoplasmatischen Tyrosinkinase gehören. Mit Hilfe des spezifischen JAK3-Kinase Inhibitors I wurde untersucht, ob die IFN $\gamma$ -Synthese in humanen Th-Gedächtniszellen JAK3-abhängig ist. Die Titration des Inhibitors über einen großen Bereich zeigte eine konzentrationsabhängige Abnahme der Frequenz von IFN $\gamma$ -Produzenten nach Zytokin-Stimulation; ebenso wurde die in der Kontrolle durch  $\alpha$ CD3/28 hervorgerufene IFN $\gamma$ -Sekretion in Gegenwart von

JAK3 Inhibitor I nahezu vollständig unterdrückt. Diese Ergebnisse implizieren die Abhängigkeit der  $\text{IFN}\gamma$ -Sekretion von JAK3-Aktivierung sowohl nach Zytokin-, als auch nach TCR-Stimulation (Abb. 3.15).



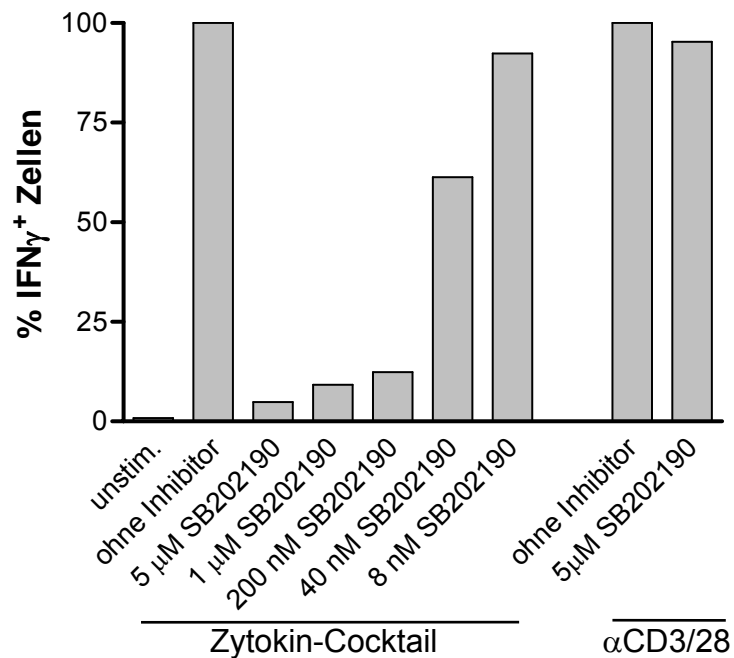
**Abb. 3.15: Janus Kinase3-Blockade inhibiert die Zytokin-induzierte  $\text{IFN}\gamma$  Produktion.** MACS-sortierte  $\text{CD4}^+$ ,  $\text{CD45RA}$ -depletierte Th Gedächtniszellen wurden für 45 min. in der Gegenwart oder Abwesenheit verschiedener Janus-Kinase3-Inhibitor I - Konzentrationen kultiviert und anschließend für 36h mit dem Zytokin-Cocktail oder für 12h in  $\alpha\text{CD3/28}$ -beschichteten FACS-Röhrchen stimuliert. BrefeldinA wurde für die letzten 6h zur Kultur hinzugefügt. Nach Fixierung und Anfärbung von  $\text{IFN}\gamma$  sowie  $\text{CD4}$  wurden die Zellen im FACSCalibur analysiert. Dies geschah nach Anlegen zweier kombinierter Analysefenster auf Lymphozyten anhand der FSC/SSC-Eigenschaften sowie auf  $\text{CD4}^+$  Zellen. Die Frequenzen der  $\text{IFN}\gamma^+$  Zellen in Abwesenheit von JAK3 Inhibitor I wurden als 100% festgelegt; anhand dessen wurde die Veränderung nach Zugabe des Inhibitors in Prozent kalkuliert. Repräsentativ für 3 Experimente mit ähnlichen Ergebnissen.

### 3.4.3 Der p38 MAPK-Signalweg ist essentiell für die Zytokin-induzierte $\text{IFN}\gamma$ -Produktion

Hier wurde der Einfluss der p38-MAPKinase auf die Zytokin-induzierte  $\text{IFN}\gamma$ -Produktion untersucht. Es existieren sowohl Hinweise darauf, dass p38 durch IL-18 (Yang et al., 2001), als auch durch  $\gamma_c$ -Zytokine wie IL-15, unter Beteiligung von JAK3, aktiviert werden kann (Geginat et al., 2001). Ferner wurde durch die Expression dominant-negativer p38-Mutanten gezeigt, dass der MAP-Kinase eine essentielle

Rolle bei der Differenzierung muriner Th Zellen in Th1-Richtung zukommt (Rincon et al., 1998).

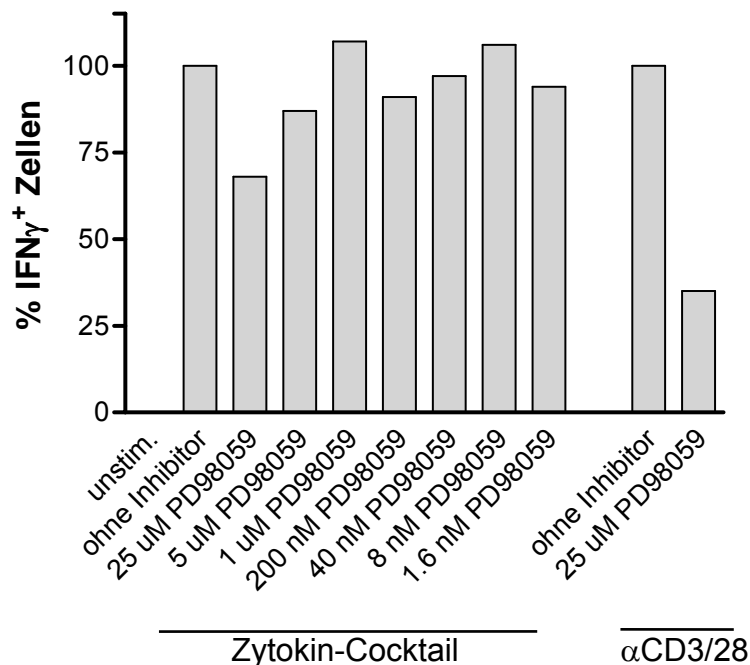
Nach Vorinkubation von ruhenden humanen Gedächtnis-Th-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen des spezifischen p38-Inhibitors SB202190 wurden diese mit dem Zytokin-Cocktail stimuliert. Es zeigte sich eine konzentrationsabhängige Reduktion der Frequenz  $\text{IFN}\gamma^+$  Th Zellen, die nicht in  $\alpha\text{CD3}/28$ -stimulierten Kontrollen zu beobachten war (Abb. 3.16). Die Substitution von SB202190 durch den ebenfalls p38-spezifischen Inhibitor SB203580 führte zu vergleichbaren Resultaten (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 3.16: Der p38 MAPK-Signalweg ist essentiell für die Zytokin-induzierte  $\text{IFN}\gamma$  Produktion.** MACS-sortierte  $\text{CD4}^+$ ,  $\text{CD45RA}$ -depletierte Th Gedächtniszellen wurden für 45 min. in der Gegenwart oder Abwesenheit verschiedener Konzentrationen des p38-Inhibitors SB202190 kultiviert und anschließend für 36h mit dem Zytokin-Cocktail oder für 12h in  $\alpha\text{CD3}/28$ -beschichteten FACS-Röhrchen stimuliert. BrefeldinA wurde für die letzten 6h zur Kultur hinzugefügt. Nach Fixierung und Anfärbung von  $\text{IFN}\gamma$  sowie  $\text{CD4}$  wurden die Zellen im FACSCalibur analysiert. Dies geschah nach Anlegen zweier kombinierter Analysefenster auf Lymphozyten anhand der FSC/SSC-Eigenschaften sowie auf  $\text{CD4}^+$  Zellen. Die Frequenzen der  $\text{IFN}\gamma^+$  Zellen in Abwesenheit von SB202190 wurden als 100% festgelegt; anhand dessen wurde die Veränderung nach Zugabe des Inhibitors in Prozent kalkuliert. Repräsentativ für 5 Experimente mit ähnlichen Ergebnissen.

### 3.4.4 MAPKinaseKinase und Phosphatidylinositol-3-Kinase spielen keine Rolle bei der Zytokin-induzierten IFN $\gamma$ -Produktion

In den folgenden beiden noch vorläufigen Experimenten wurde weiter untersucht, über welche Signalwege die  $\gamma_c$ -Zytokine an der Zytokin-vermittelten IFN $\gamma$ -Synthese beteiligt sind. Dazu wurde die Rolle des von MAPKinaseKinase (MEK) bzw. deren Substrat Extrazellulär-Regulierte Kinase (Erk) sowie von Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-K) durch Blockade mit entsprechenden Inhibitoren analysiert. Beide Moleküle können nach  $\gamma_c$ -Aktivierung JAK3-abhängig stimuliert werden (vgl. Abb. 4.1).

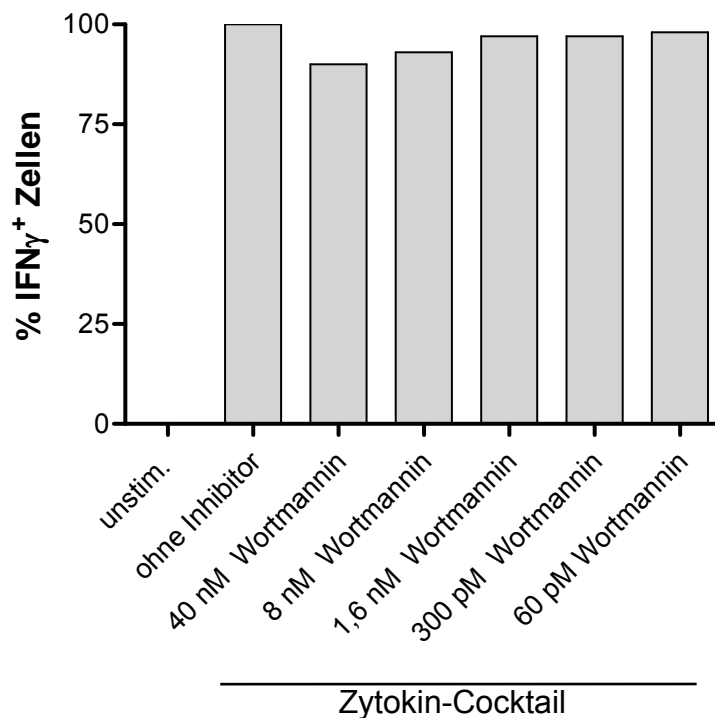


**Abb. 3.17a: Der MEK/Erk-Signalweg spielt keine Rolle bei der Zytokin-induzierten IFN $\gamma$ -Produktion.** MACS-sortierte CD4<sup>+</sup>, CD45RA-depletierte Th Gedächtniszellen wurden für 45 min. in der Gegenwart oder Abwesenheit verschiedener Konzentrationen des Erk/MEK-Inhibitors PD98059 kultiviert und anschließend für 36h mit dem Zytokin-Cocktail oder für 12h in  $\alpha$ CD3/28-beschichteten FACS-Röhrchen stimuliert. BrefeldinA wurde für die letzten 6h zur Kultur hinzugefügt. Nach Fixierung und Anfärbung von IFN $\gamma$ sowie CD4 wurden die Zellen im FACSCalibur analysiert. Dies geschah nach Anlegen zweier kombinierter Analysefenster auf Lymphozyten anhand der FSC/SSC-Eigenschaften sowie auf CD4<sup>+</sup> Zellen. Die Frequenzen der IFN $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen in Abwesenheit von PD98059 wurden als 100% festgelegt; anhand dessen wurde die Veränderung nach Zugabe des Inhibitors in Prozent kalkuliert. 2 Experimente mit ähnlichen Ergebnissen.

Durch Vorinkubation von ruhenden humanen Gedächtnis-Th-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen des MEK/Erk-Inhibitors PD98059 konnte keine vollständige Blockade der IFN $\gamma$ -Produktion erreicht werden, sondern lediglich eine maximale Reduktion um 30% (19-30%, n=2); es war dabei keine Konzentrations-

abhängigkeit zu erkennen. In den mit  $\alpha$ CD3/28-stimulierten Kontrollen konnte ein maximaler Rückgang der Frequenz  $\text{IFN}\gamma^+$  Th Zellen um 65% quantifiziert werden (58-65%, n=2, Abb. 17a).

Die Abhängigkeit der Zytokin-induzierten  $\text{IFN}\gamma$ -Produktion von PI3-K wurde durch Vorinkubation von humanen, ruhenden Gedächtnis-Th-Zellen mit dem PI3-K-spezifischen Inhibitor Wortmannin und anschließender Quantifizierung der Frequenz  $\text{IFN}\gamma^+$  Th Zellen bestimmt. Innerhalb des untersuchten Konzentrationsbereiches konnte keine Reduktion der Frequenz  $\text{IFN}\gamma^+$  Th-Zellen beobachtet werden (Abb. 3.17b).



**Abb. 3.17b: Der PI3-K-Signalweg spielt keine Rolle bei der Zytokin-induzierten  $\text{IFN}\gamma$ -Produktion.** MACS-sortierte  $\text{CD4}^+$ ,  $\text{CD45RA}$ -depletierte Th Gedächtniszellen wurden für 45 min. in der Gegenwart oder Abwesenheit verschiedener Konzentrationen des PI3-K-Inhibitors Wortmannin kultiviert und anschließend für 36h mit dem Zytokin-Cocktail stimuliert. BrefeldinA wurde für die letzten 6h zur Kultur hinzugefügt. Nach Fixierung und Anfärbung von  $\text{IFN}\gamma$  sowie  $\text{CD4}$  wurden die Zellen im FACSCalibur analysiert. Dies geschah nach Anlegen zweier kombinierter Analysefenster auf Lymphozyten anhand der FSC/SSC-Eigenschaften sowie auf  $\text{CD4}^+$  Zellen. Die Frequenzen der  $\text{IFN}\gamma^+$  Zellen in Abwesenheit von Wortmannin wurden als 100% festgelegt; anhand dessen wurde die Veränderung nach Zugabe des Inhibitors in Prozent kalkuliert. Ein vorläufiges Experiment.

### **3.5 Phänotypische Charakterisierung von TCR- gegenüber Zytokin-aktivierten $IFN\gamma^+$ Th-Zellen**

Die Zielsetzung für die folgenden Experimente bestand darin, einen spezifischen Marker auf Zytokin-induzierten  $IFN\gamma$ -Produzenten im Durchflußzytometer zu identifizieren, der diese von Antigen-induzierten  $IFN\gamma^+$  Th Zellen unterscheidbar macht. Ein solcher differenziell exprimierter Aktivierungsmarker sollte es später ermöglichen, die aus Synovialpunktaten von RA-Patienten isolierten, *ex vivo* spontan  $IFN\gamma$  produzierenden Th Zellen (s. 3.1) auf den für die  $IFN\gamma$ -Induktion ursächlichen Stimulus hin zu untersuchen.

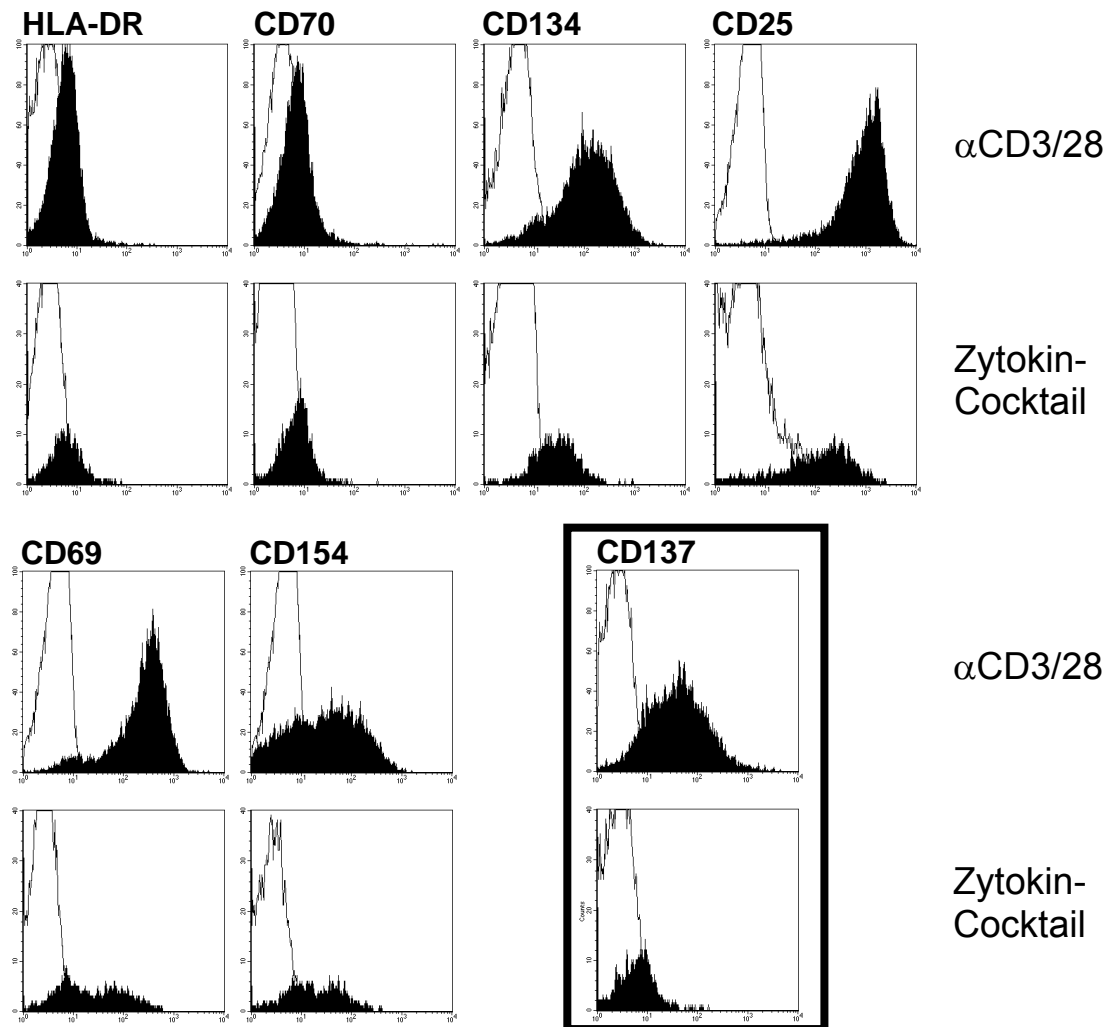
#### **3.5.1 Das $TNF\alpha$ -Rezeptor-Superfamilien-Mitglied 4-1BB ist differenziell auf TCR- gegenüber Zytokin-induzierten $IFN\gamma$ -Produzenten exprimiert**

Zur Identifizierung von auf Zytokin- und TCR-stimulierten  $IFN\gamma$ -Produzenten differenziell exprimierten Oberflächenmolekülen wurde die Ausprägung einer Reihe von klassischen Aktivierungsmarkern analysiert (Tab. 3.3).

**Tab.3.3: Analytierte Aktivierungsmarker auf  $IFN\gamma^+$  Th Zellen.**

<b>Aktivierungsmarker</b>	<b>Molekülklasse</b>
CD25	IL-2R $\alpha$ Kette, Typ I Zytokin-Rezeptor
CD40L (CD154)	TNF-Ligand-Familie, Typ-II-Transmembranprotein
CD69	sehr früher Aktivierungsmarker, C-Typ Lektin-Familie
CD70 (CD27L)	TNF-Ligand-Familie, Typ-II-Transmembranprotein
CD134 (Ox40)	TNF-Rezeptor-Familie, Typ I Oberflächenprotein
CD137 (4-1BB)	TNF-Rezeptor-Familie, Transmembran-Glycoprotein
HLA-DR	MHC Klasse II Familie, sehr später Aktivierungsmarker

Die Expressionsanalyse erfolgte nach jeweils 36-stündiger Zytokin- bzw.  $\alpha$ CD3/28-Stimulation der Gedächtnis-Th-Zellen unter Verwendung des  $IFN\gamma$ -Sekretionsassays zur Markierung der  $IFN\gamma$ -Produzenten (Abb. 3.18).



**Abb. 3.18: Das TNF $\alpha$ -Rezeptor-Superfamilien-Mitglied 4-1BB ist differenziell auf TCR- gegenüber Zytokin-induzierten IFN $\gamma$ -Produzenten exprimiert.** MACS-sortierte CD45RA-depletierte CD4<sup>+</sup> Th Gedächtniszellen wurden für 36h in  $\alpha$ CD3/28-beschichteten FACS-Röhrchen oder mit dem Zytokin-Cocktail stimuliert. Danach wurden lebende IFN $\gamma$ -Produzenten mit Hilfe der Zellulären Affinitätsmatrix-Technologie markiert; zusätzlich wurde CD4 sowie der jeweils bezeichnete Aktivierungsmarker angefärbt und die Zellen im FACSCalibur analysiert. Die Auswertung erfolgte nach Anlegen dreier kombinierter Analysefenster auf Lymphozyten anhand der FSC/SSC-Eigenschaften sowie auf lebende (PJ) CD4<sup>+</sup> Th Zellen und schließlich auf IFN $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen. Die schwarzen Flächen zeigen die Expression des jeweiligen Aktivierungsmarkers im Vergleich zur Isotypkontrolle (schwarze Linien). Repräsentativ für 3 Experimente mit vergleichbaren Ergebnissen.

Die Mehrzahl der Aktivierungsmarker wies zum untersuchten Zeitpunkt ähnliche Expressionsmuster unabhängig von der Art der Stimulation auf.

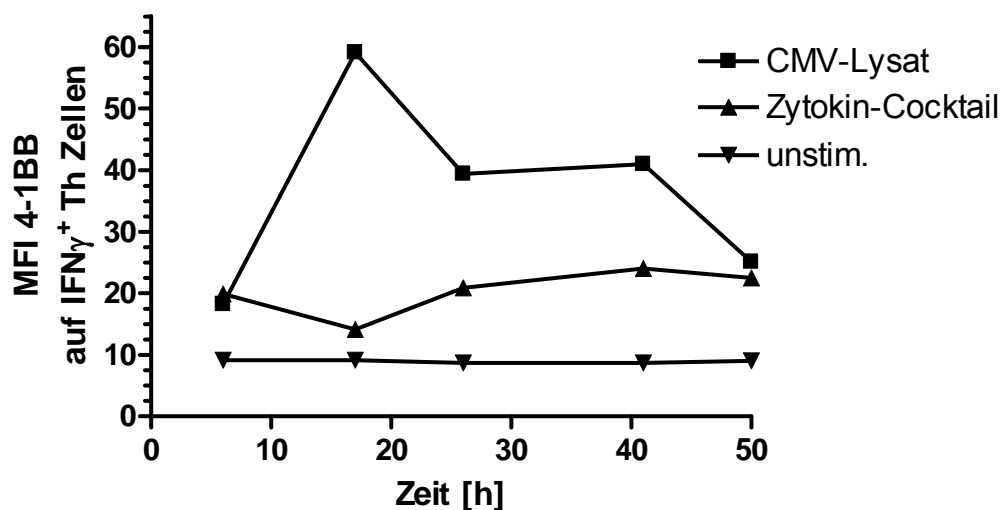
Der einzige Aktivierungsmarker, der eine deutliche differenzielle Expression zeigte, war 4-1BB (CD137): Während das TNF-R-Familienmitglied auf der großen Mehrheit der TCR-induzierten IFN $\gamma$ -Produzenten anfärbbar war, war nur ein geringer Anstieg der mittleren Fluoreszenzintensität auf Zytokin-aktivierten IFN $\gamma$ <sup>+</sup> Th Zellen im Vergleich zur Isotypkontrolle messbar.

### 3.5.2 Kinetik der 4-1BB-Expression in Antigen- gegenüber Zytokin-induzierten IFN $\gamma$ -Produzenten

Im Folgenden wurde die Expression von 4-1BB über einen größeren Zeitraum analysiert. Weiterhin wurde das experimentelle Protokoll dahingehend modifiziert, dass der TCR-Stimulus  $\alpha$ CD3/28 gegen CMV-Lysat als physiologisches Antigen ausgetauscht wurde; da für die Antigenpräsentation APCs erforderlich sind, wurden statt isolierter Th Gedächtniszellen komplette PBMC eines gesunden CMV<sup>+</sup> Spenders verwendet.

Das Maximum der IFN $\gamma$ -Sekretion lag nach CMV-Stimulation etwa zwischen 8h und 16h, nach Zytokininduktion bei ca. 36h (nicht gezeigt). Da sich nach 50h keine CMV-spezifischen IFN $\gamma$ <sup>+</sup> Th Zellen mehr anfärben ließen, wurde die Kinetik zu diesem Zeitpunkt beendet.

In Abb. 3.19 ist der Verlauf der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) von 4-1BB auf lebenden CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> Lymphozyten dargestellt.



**Abb. 3.19: Kinetik der 4-1BB-Expression in Antigen- gegenüber Zytokin-induzierten IFN $\gamma$ -Produzenten.** PBMCs eines CMV<sup>+</sup> Spenders wurden entweder mit CMV-Lysat oder mit dem Zytokin-Cocktail stimuliert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden lebende IFN $\gamma$ -Produzenten mit Hilfe der Zellulären Affinitätsmatrix-Technologie markiert; zusätzlich wurde CD4 sowie 4-1BB (CD137) angefärbt und die Zellen im FACSCalibur analysiert. Die Auswertung erfolgte nach Anlegen dreier kombinierter Analysefenster auf Lymphozyten anhand der FSC/SSC-Eigenschaften sowie auf lebende (PJ) CD4<sup>+</sup> Th Zellen und schließlich auf IFN $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen. In diesen CD4<sup>+</sup>PJ<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von 4-1BB (CD137), abzüglich der Fluoreszenz in der Isotypgefärbten Probe, quantifiziert und gegen die Zeit aufgetragen. Repräsentativ für 3 unabhängige Experimente mit vergleichbaren Ergebnissen.



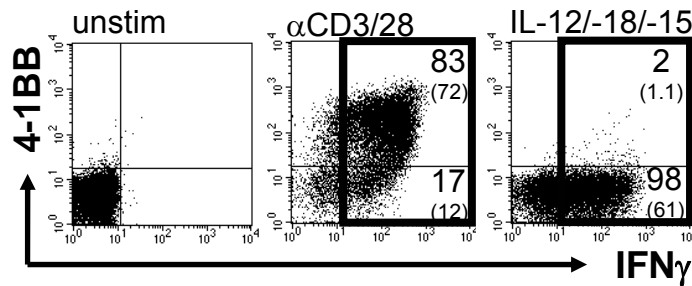
4-1BB war in CMV-spezifischen  $\text{IFN}\gamma^+$  Th Zellen in allen Spendern bereits nach ca. 8h anfärbbar, erreichte sein Expressionsmaximum nach etwa 16h und blieb über den gesamten Zeitraum der  $\text{IFN}\gamma$ -Sekretion detektierbar. Nach Zytokinstimulation hingegen war über den gesamten Zeitraum nur eine geringfügige höhere Expression von 4-1BB als in der unstimulierten Kontrolle messbar.

### **3.5.3 CMVpp65-spezifische Th1-Zellen exprimieren 4-1BB nach TCR-, nicht aber nach Zytokin-Stimulation**

Wie bereits in 3.3.5 erwähnt, weisen CMV-spezifische Th1-Zellen durch chronische Reaktivierung *in vivo* ähnliche Charakteristika auf, wie Th Zellen aus Synovialinfiltraten von RA Patienten.

Da in 3.5.2 die Zytokin-induzierten  $\text{IFN}\gamma$ -Produzenten nicht innerhalb der CMV-spezifischen Population auf 4-1BB analysiert werden konnten, sondern nur innerhalb der gesamten Th-Zell-Population, wurde diese Untersuchung noch einmal an CMVpp65-spezifischen Th1-Linien (vgl. 3.3.5) wiederholt.

Zu diesem Zweck wurden die CMVpp65-spezifischen Th1-Zellen nach Expansion und 5-tägiger Kultur ohne IL-7 und IL-15 entweder mit der essentiellen Zytokinkombination IL-12+IL-18+IL-15 oder mit  $\alpha\text{CD}3/28$  restimuliert und CD4-,  $\text{IFN}\gamma$ - sowie 4-1BB-markiert. Mit 14h Stimulationsdauer wurde ein Zeitpunkt gewählt, zu dem die durch IL-12+IL-18+IL-15 induzierte  $\text{IFN}\gamma$ -Produktion, wie in 3.3.5 gezeigt, bereits ein Maximum erreichte. Eine Restimulation mit dem spezifischen Antigen CMVpp65 statt mit  $\alpha\text{CD}3/28$  konnte mangels autologer APCs nicht durchgeführt werden. In Abb. 3.20 ist repräsentativ für drei unabhängig generierte CMVpp65-Th1-Linien zu erkennen, dass die  $\text{IFN}\gamma^+$  Th1-Zellen nach Stimulation mit IL-12+IL-18+IL-15 nahezu vollständig 4-1BB-negativ blieben. Im Gegensatz dazu hatte bereits die Mehrheit der  $\alpha\text{CD}3/28$ -induzierten  $\text{IFN}\gamma$ -Produzenten den Aktivierungsmarker nach 14h ausgebildet. Nach 24h konnte ein weiterer Anstieg der 4-1BB<sup>+</sup>-Frequenz in  $\alpha\text{CD}3/28$ -induzierten  $\text{IFN}\gamma$ -Produzenten gemessen werden, während die Zytokin-abhängig  $\text{IFN}\gamma$ -sezernierenden Th Zellen weiterhin 4-1BB-negativ blieben (nicht gezeigt).



**Abb. 3.20: CMVpp65-spezifische Th1 Zellen exprimieren 4-1BB nach Antigen-, nicht aber nach Zytokin-Stimulation.** PBMC eines gesunden, CMV<sup>+</sup> Spenders wurden für 6h mit CMVpp65 stimuliert; die spezifisch aktivierten, IFN $\gamma$ <sup>+</sup> Th Zellen wurden mittels Zytokin-Affinitätsmatrix markiert sowie mit Fluorochromen gegen CD69 und CD4 angefärbt, mittels FACSria angereichert und für 10 Tage in der Gegenwart eines 100-fachen Überschusses von autologen, bestrahlten „Feeder“-Zellen und je 25 ng/ml IL-7 und IL-15 expandiert. Nach 5-tägiger Kultur ohne Zytokine wurden die Zellen wie oben bezeichnet für 14h stimuliert; dabei war BrefeldinA für die letzten 6h der Kultur anwesend. Nach Fixierung und Anfärbung von IFN $\gamma$  sowie CD4 und 4-1BB erfolgte die durchflußzytometrische Analyse am FACS. Dazu wurden zuvor Analysefenster auf Lymphozyten sowie CD4<sup>+</sup> Th Zellen gelegt und dann IFN $\gamma$  gegen 4-1BB aufgetragen. Zahlen gegen die relativen Frequenzen innerhalb der gesamten CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> Population (=100%) an, Zahlen in Klammern die absoluten Frequenzen innerhalb der CD4<sup>+</sup> Fraktion. Repräsentativ für 3 Experimente mit vergleichbaren Resultaten.

In 3.5 konnte somit gezeigt werden, dass die IFN $\gamma$ -Synthese nach einem starken ( $\alpha$ CD3/28) oder physiologischen (CMV-Antigen) TCR-Stimulus mit 4-1BB-Koexpression einhergeht. 4-1BB wird früh exprimiert und bleibt praktisch während der gesamten IFN $\gamma$ -Sekretionszeit (bis 48h) auf der Zelloberfläche anfärbbar. Der Aktivierungsmarker lässt sich jedoch nicht auf Zytokin-induzierten IFN $\gamma$ -Produzenten detektieren.

Diese Dichotomie erfüllt die Anforderungen an einen idealen Differenzierungsmarker für Antigen- gegenüber Zytokin-aktivierten T-Zellen.

### **3.6 Der Einfluß von CD25<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen auf die Zytokin-induzierte IFN $\gamma$ -Produktion**

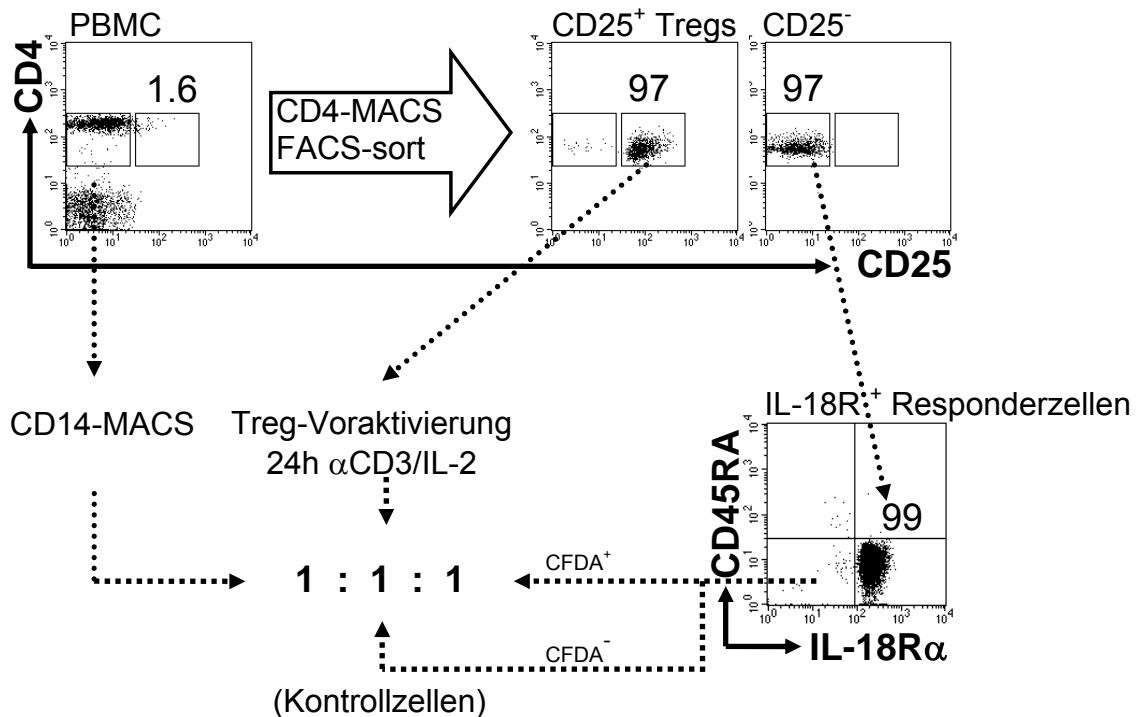
Bisher beschrieben nur einige wenige Publikationen den Einfluß von humanen CD25<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen auf Effektorfunktionen wie Zytokin-Produktion durch Responderzellen (vgl. 1.2.3).

Vor dem Hintergrund der in dieser Arbeit ausführlich charakterisierten Zytokin-induzierten IFN $\gamma$ -Synthese in Gedächtnis-Th-Zellen sollte der Frage nachgegangen werden, ob Tregs diese Effektorfunktion inhibieren können. Dies sollte wie in den vorangegangenen Experimenten auf Einzelzellebene analysiert werden.

#### **3.6.1 CD25<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen supprimieren die Zytokin-induzierte IFN $\gamma$ -Produktion**

Um die Suppression der Zytokin-induzierten IFN $\gamma$ -Produktion in Th Zellen durch Tregs zu analysieren, wurden zunächst CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorische T Zellen sowie ruhende CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup>IL-18R $\alpha$ <sup>+</sup> Effektor-/Gedächtniszellen als Responderzellen im Durchflußzytometer separiert. Zur späteren Re-Identifizierung der Zytokinproduzenten im FACS wurden die Responderzellen mit CFDA angefärbt; die regulatorischen T-Zellen wurden mittels immobilisiertem  $\alpha$ CD3 und IL-2 für 24h voraktiviert. Die Sortierstrategie samt der typischen erhaltenen Reinheiten, sowie das Verhältnis der Zellen in den einzelnen Ansätzen sind in Abb. 3.21 wiedergegeben. Zu jedem Ansatz wurden CD14<sup>+</sup> Monozyten als akzessorische Zellen hinzugefügt.

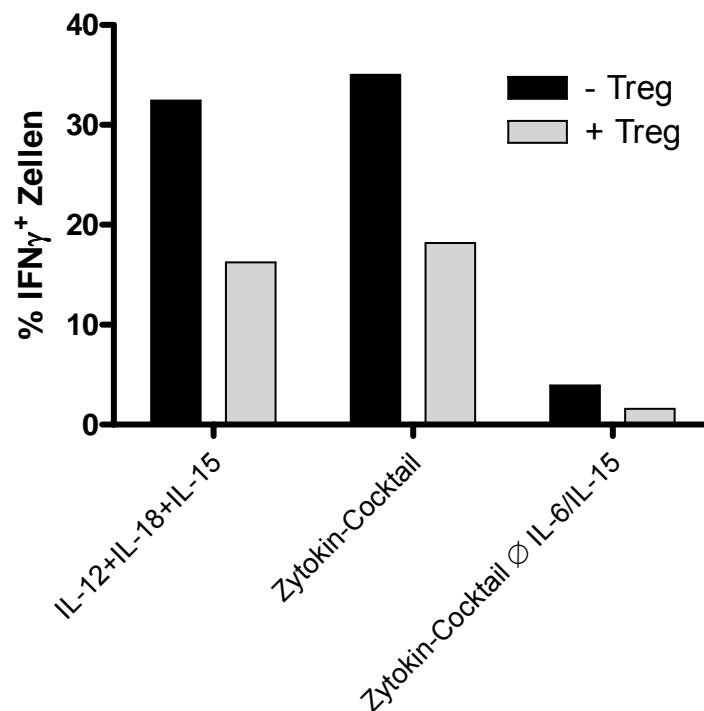
Die IFN $\gamma$ -Sekretion in CFDA<sup>+</sup> Effektorzellen nach 36h Zytokinstimulation wurde dann in Gegenwart der gleichen Anzahl CD25<sup>+</sup> Tregs oder CFDA<sup>-</sup> Effektorzellen (Kontrollzellen) in Anwesenheit akzessorischer CD14<sup>+</sup> Monozyten untersucht (Abb.3.22). Die Gesamtzellzahl pro Ansatz war folglich stets identisch.



**Abb. 3.21: Separationsstrategie zur Gewinnung CD25<sup>+</sup> regulatorischer T-Zellen, IL-18R<sup>+</sup> Effektor/Gedächtniszellen als Responderzellen sowie CD14<sup>+</sup> Monozyten als akzessorische Zellen.** MACS-vorangereicherte CD4<sup>+</sup> Th Zellen wurden mit Antikörpern gegen CD4, CD45RA, IL-18R $\alpha$  und CD25 angefärbt. CD25<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen wurden nach Anlegen von Analysefenstern auf Lymphozyten auf Grund der FSC/SSC-Eigenschaften sowie lebende (PJ-), CD25-hochexprimierende CD4<sup>+</sup> Th Zellen sortiert. Aus der CD25<sup>-</sup> Fraktion wurden IL-18R $\alpha$ <sup>+</sup> Effektor/Gedächtnis-Responderzellen nach Anlegen eines Fensters auf IL-18R $\alpha$  und CD45RA aufgereinigt und CFDA-markiert (Endkonzentration: 1nM) bzw. nicht markiert (Kontrollzellen). Typischerweise wurden Reinheiten von 97-98% erzielt. Zur Separation CD14<sup>+</sup> akzessorischer Zellen wurde nach der CD4-Voranreicherung die CD4<sup>-</sup> Fraktion mit CD14-MACS-Beads inkubiert und CD14<sup>+</sup> Monozyten mittels AutoMACS unter Verwendung des Programms Posseld2 bis auf 99% angereichert.

Die Anwesenheit von CD25<sup>+</sup> regulatorischen Zellen führte unter allen Stimulationsarten zu einem Rückgang der Frequenz IFN $\gamma$ -produzierender IL-18R $\alpha$ <sup>+</sup> Effektor/Gedächtnis Th-Zellen: Nach Stimulation mit der minimalen Kombination von IL-12+IL-18+IL-15 sank die Frequenz IFN $\gamma$ <sup>+</sup> Th Zellen um bis zu 73% (50-73%, n=3) in Gegenwart von Tregs; nach Stimulation mit dem Zytokin-Cocktail ließen sich bis zu 61% (46-61%, n=3) weniger IFN $\gamma$ -Produzenten in der Kokultur mit Tregs anfärben. Da die Zytokine IL-6 und IL-15 als Inhibitoren des Suppressor-Potenzials von Tregs diskutiert werden (de la Rosa et al., 2004; Pasare and Medzhitov, 2003; Ruprecht et al., 2005), wurden diese in einem weiteren Stimulationsansatz aus dem Zytokin-Cocktail entfernt. Die Frequenz der IFN $\gamma$ -Produzenten in den Kontrollen fiel dadurch deutlich geringer aus als nach Stimulation mit dem kompletten Zytokin-Cocktail; die Kokultur mit Tregs statt mit Kontrollzellen führte hier jedoch zu einem mit den

anderen Zytokinkombinationen vergleichbaren Rückgang (39-74%, n=3) der Frequenz IFN $\gamma$ -produzierender Effektor-Gedächtniszellen.



**Abb. 3.22: CD25<sup>+</sup> Tregs supprimieren Zytokin-induzierte IFN $\gamma$ -Produktion.**  $1 \times 10^5$  CD4<sup>+</sup>IL18R $\alpha$ <sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CFDA<sup>+</sup> Responderzellen wurden für 36h entweder mit derselben Anzahl CD4<sup>+</sup>IL18R $\alpha$ <sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CFDA<sup>-</sup> Kontrollzellen oder CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen sowie  $1 \times 10^5$  CD14<sup>+</sup> akzessorischen Zellen in der Gegenwart der bezeichneten Stimuli inkubiert. Für die letzten 6h wurde BrefA hinzugefügt. Nach Fixierung und Permeabilisierung wurden die Zellen mit Antikörpern gegen CD4 und IFN $\gamma$  angefärbt und im FACS analysiert. Nach Anlegen von Analysefenstern auf Lymphozyten anhand der FCS/SSC-Eigenschaften wurde die Frequenz der IFN $\gamma$ -positiven CD4<sup>+</sup>IL18R $\alpha$ <sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CFDA<sup>+</sup> Responderzellen analysiert. Nach 36h konnte noch keine Zellteilung verzeichnet werden; daher hatte sich die Menge an CFDA pro Zelle bis zur Fixierung nicht verringert. Ein repräsentatives Experiment von dreien.

Um den potenziellen Einfluss der akzessorischen CD14<sup>+</sup> Monozyten auf die Treg-vermittelte IFN $\gamma$ -Suppression zu untersuchen, wurden die Experimente wie zuvor beschrieben in der Gegenwart bzw. Abwesenheit von CD14<sup>+</sup> Monozyten wiederholt; unter Stimulation mit dem Zytokin-Cocktail mit oder ohne IL-6 und IL-15 konnte auch ohne Monozyten in Gegenwart von Tregs eine deutliche Suppression der IFN $\gamma$ -Produktion um etwa 50% gemessen werden. Hierbei handelt es sich jedoch nur um ein vorläufiges Ergebnis, das im Rahmen der zur Verfügung stehenden Zeit nicht reproduziert werden konnte (Daten nicht gezeigt).

### 3.7 Phänotypische Analyse von ex vivo isolierten Th-Zellen aus Synovialflüssigkeit von RA-Patienten

#### 3.7.1 Induktion der IFN $\gamma$ -Sekretion in ex vivo isolierten synovialen Th-Zellen von RA-Patienten durch proinflammatorische Zytokine

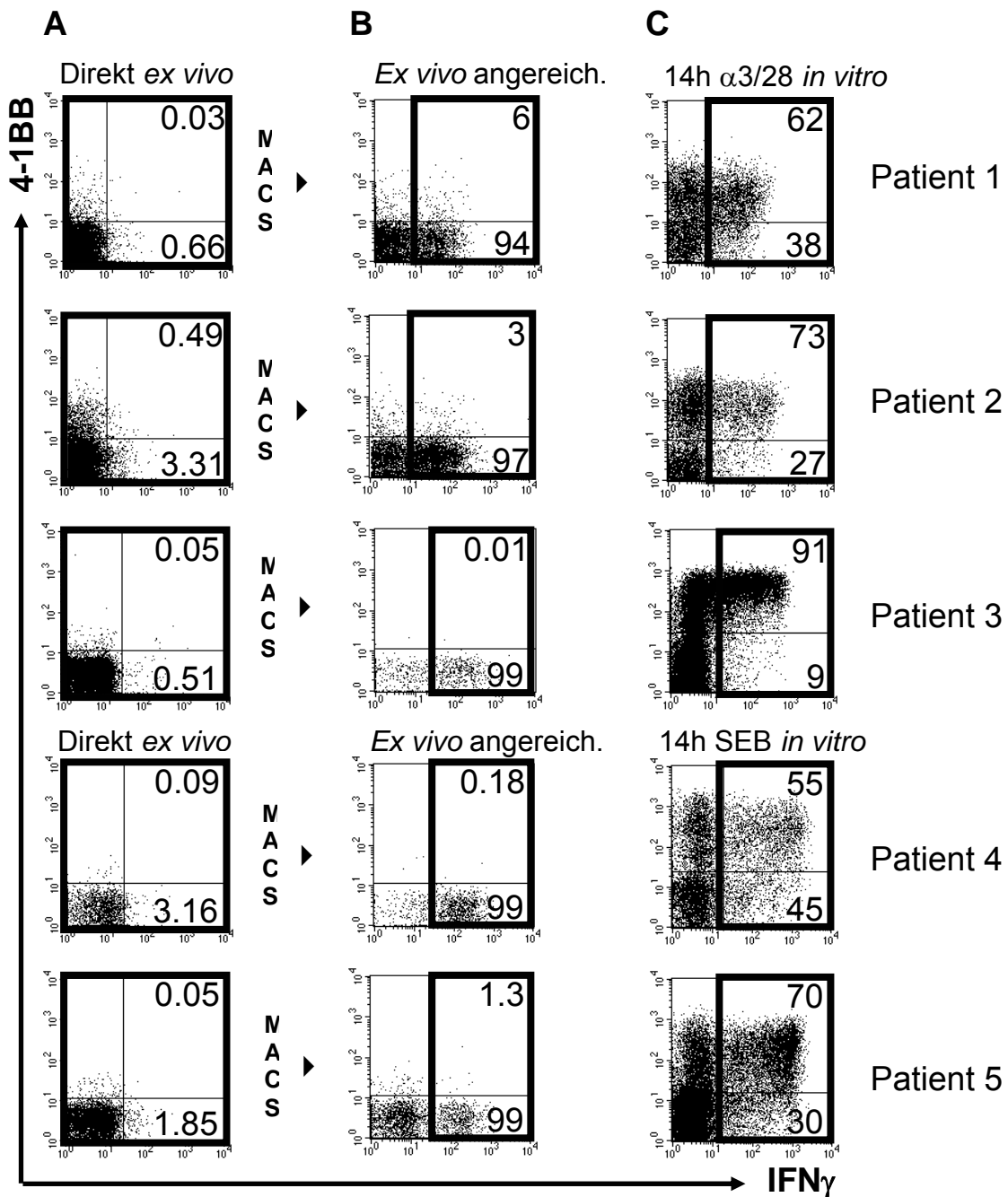
In 3.5 konnte gezeigt werden, dass anhand der 4-1BB-Koexpression TCR- von Zytokin-induzierten IFN $\gamma$ -Produzenten unterschieden werden können.

Analog zu 3.1 wurden erneut Th-Zellen aus Synovialpunktaten von RA-Patienten untersucht, um anhand der 4-1BB-Expression zu überprüfen, ob diese Zellen eher durch Antigene oder durch proinflammatorische Zytokine zur IFN $\gamma$ -Produktion stimuliert wurden. In Tabelle 3.4 sind die Charakteristika der untersuchten Patienten dargestellt.

Tab. 3.4: In die Analyse aufgenommene RA-Patienten

Patienten-ID	Alter	Geschlecht	Medikation	Erkrankungsdauer/Jahre
SH1	37	w	- (pausiert mit Enbrel)	3
CS	28	m	Cyclosporin	1
CR	63	w	Prednisolon	2
SH2	37	w	- (pausiert mit Enbrel)	3
HM	74	m	-	1
OM	69	w	MTX, Chloroquin	2
SC	48	w	Prednisolon	16
RC	21	w	Infliximab, MTX, Prednis.	7
MK	84	w	-	46

Abb. 3.24 zeigt exemplarisch für fünf Patientenproben die Korrelation der 4-1BB- und IFN $\gamma$ -Expression vor (Abb. 3.24A) und nach (Abb. 3.24B) magnetischer Anreicherung der IFN $\gamma$ -Produzenten zur Erzielung einer höheren Trennschärfe. Bereits in den unseparierten Proben ist erkennbar, dass die Mehrzahl der synovialen IFN $\gamma$ <sup>+</sup> Th Zellen 4-1BB-negativ war (Abb.3.24A). Dies wurde nach magnetischer Anreicherung der IFN $\gamma$ -Produzenten umso deutlicher: Die überwiegende Mehrheit der ex vivo isolierten, spontan IFN $\gamma$  produzierenden Th Zellen zeigte keine 4-1BB-Koexpression (Abb.3.24B und 3.25). Da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass in synovialen Th Zellen ein genereller Defekt zur Ausprägung von 4-1BB vorlag, wurde in einigen Patienten zur Kontrolle eine 14-stündige Stimulation der SF-MNCs mit  $\alpha$ CD3/28 oder dem Superantigen SEB durchgeführt, um das Potenzial zur 4-1BB-Expression nach TCR-abhängiger Stimulation zu analysieren.



**3.24 Induktion der IFN $\gamma$ -Sekretion in ex vivo isolierten synovialen Th Zellen durch proinflammatorische Zytokine.** (A) Frisch entnommene Synovialpunktate wurden gewaschen, mittels Zytokin-Sekretionsassay sezerniertes IFN $\gamma$  angefärbt, sowie CD4 und 4-1BB markiert. Danach erfolgte die direkte durchflußzytometrische Quantifizierung der IFN $\gamma$ -positiven, 4-1BB<sup>+</sup> und 4-1BB<sup>-</sup> Th Zellen nach Anlegen zweier kombinierter Analysefenster auf Lymphozyten anhand der FSC/SSC-Eigenschaften sowie auf CD4<sup>+</sup> Zellen; die gesamte CD4<sup>+</sup> Fraktion (=schwarzer Rahmen) wurde als 100% gesetzt. (B) Analyse wie in (A), jedoch nach vorangegangener magnetischer Anreicherung der IFN $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen über eine MACS-Säule. Die CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> Fraktion wurde als 100% gesetzt (=schwarzer Rahmen). (C) Ein Teil der frisch entnommenen SF-MNCs wurde nach dem Waschen in  $\alpha$ CD3/28-beschichteten FACS-Röhrchen oder nach SEB-Zugabe für 14h stimuliert; BrefeldinA war für die letzten 6h der Kultur anwesend. Nach Anfärbung von intrazellulärem IFN $\gamma$  sowie Markierung von CD4 und 4-1BB wurden die Zellen am FACS analysiert. Die Auswertung erfolgte nach Anlegen zweier kombinierter Analysefenster auf Lymphozyten anhand der FSC/SSC-Eigenschaften sowie auf CD4<sup>+</sup> Zellen. Die CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> Fraktion (=schwarzer Rahmen) wurde als 100% gesetzt.

