

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei zentrale Zielsetzungen verfolgt: Zunächst wurde der Frage nachgegangen, ob $\text{IFN}\gamma$ -Sekretion, welches eine fundamentale Effektorfunktion von Th Zellen bei der Abwehr von intrazellulären Pathogenen darstellt, nicht nur nach spezifischer Erkennung über den TCR, sondern auch allein durch lösliche, proinflammatorische Faktoren induziert werden kann. Die Voraussetzungen dafür wurden hier erstmals für das humane System detailliert beschrieben und unterscheiden sich von bisherigen Befunden in murinen Modellen. Sie leisten einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Regulation von Entzündung.

$\text{IFN}\gamma$ -Sekretion durch proinflammatorische Th1-Zellen ist jedoch auch ein Charakteristikum von Autoimmunreaktionen. Daher wurden die *in vitro* gewonnenen Kenntnisse über den Phänotyp von Zytokin-induzierten, $\text{IFN}\gamma$ -sezernierenden Th Zellen auf die *in vivo* - Situation bei der Rheumatoiden Arthritis - einer Th1-assoziierten Autoimmunerkrankung im Menschen - angewandt. Hier wurde überprüft, ob erstmals direkt *ex vivo* vom Ort der Entzündung isolierte, spontan $\text{IFN}\gamma$ -sezernierende Th-Zellen allein durch proinflammatorische Zytokine im Gelenk zur Produktion des Th1-Zytokins instruiert wurden und so möglicherweise antigen-unabhängig als Mediator innerhalb eines Zytokin-Netzwerkes an den destruktiven Prozessen bei der RA beteiligt sind.

4.1 Spontane $\text{IFN}\gamma$ -Sekretion durch Th-Zellen in den entzündeten Gelenken von RA-Patienten

4.1.1 Die Verschiebung der Th-Zell Balance bei der RA in Th1-Richtung

Die Verschiebung des Th-Zell-Gleichgewichtes in Richtung einer dominanten Th1-Antwort wurde als eine mögliche treibende Kraft in der Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis postuliert (Canete et al., 2000; Dolhain et al., 1996; Isomaki et al., 1999; Miossec and van den Berg, 1997; Simon et al., 1994; Yin et al., 1999). So fanden zahlreiche Studien nach polyklonaler *in vitro*-Restimulation von isolierten Th Zellen vom Ort der Entzündung eine erhöhte Anzahl von $\text{IFN}\gamma$ - gegenüber IL-4-

produzierenden Zellen (Dolhain et al., 1996; Isomaki et al., 1999; Simon et al., 1994). Diese Ergebnisse reflektieren jedoch nicht die *in vivo*-Aktivierung der Th Zellen, sondern lediglich das maximale zelluläre Potenzial zur Effektorzytokin-Produktion nach *in vitro*-Stimulation. In einer Reihe von Publikationen wurde die für IFN γ -kodierende mRNA in Synovialgewebe quantifiziert, wodurch jedoch keine Aussagen über die zelluläre Herkunft möglich waren. Lediglich in wenigen Studien wie der von Yin et al. (Yin et al., 1999) konnten in fixierten Gewebeschnitten der entzündeten Synovialmembran von RA-Patienten mittels immunhistochemischer Methoden IFN γ - und CD3-koexprimierende Zellen lokalisiert werden, was auf eine *in vivo*-Sekretion des Th1-Zytokins am Ort und zum Zeitpunkt der Entzündung hindeutet; hierbei kämen jedoch mangels weiterer Subtypisierung neben CD4- auch CD8-Zellen als Zytokinproduzenten in Frage. In einer späteren Veröffentlichung mit dem bezeichnenden Titel „Immunohistochemical detection of IFN γ – fake or fact?“ wurden diese und ähnliche Befunde jedoch deutlich relativiert: van den Loos et al. führten systematische Untersuchungen zur Anfärbung von IFN γ in Gewebeschnitten durch und konstatierten, dass selbst nach Testung eines umfangreichen Panels von verfügbaren IFN γ -Antikörpern keine konsistente immunhistochemische Anfärbung - im Gegensatz zu FACS-Kontrollfärbungen - möglich sei; dies war sowohl auf falsch-positive, als auch auf falsch-negative Signale zurückzuführen (van der Loos et al., 2001).

Es existierten folglich bisher keine direkten Untersuchungen im humanen System, die auf die Existenz von Th1-Zellen, charakterisiert durch IFN γ -Sekretion am Ort und zum Zeitpunkt der Entzündung bei der RA, schließen lassen.

4.1.2 Die *ex vivo* Detektion von IFN γ ⁺ Th-Zellen bei der RA

Die hier angewandte Technologie der zellulären Affinitätsmatrix (Zytokin-Sekretionsassay, Manz et al., 1995) stellt eine sensitive und robuste Methode zur Quantifizierung und Anreicherung lebender IFN γ -Produzenten auf Einzelzellebene dar. Damit gelang hier erstmals die durchflußzytometrische Detektion von unmanipulierten, *ex vivo* IFN γ -sezernierenden Th Zellen aus Synovialflüssigkeit, welche innerhalb von Minuten bis wenigen Stunden nach Entnahme der Proben

erfolgte. Es konnten in allen Patienten IFN γ -produzierende Zellen innerhalb der synovialen Th-Population detektiert werden (s. 3.1); die Spezifität der Methode konnte durch Kontrollen sichergestellt werden. Wenngleich die systemisch nachweisbare Menge an IFN γ im entzündeten Gelenk gering sein mag (Firestein and Zvaifler, 1987; Smeets et al., 1998), konnten auf Einzelzellebene *ex vivo* durchschnittlich 3.93% IFN γ -Produzenten nachgewiesen werden. Diese Größenordnung überrascht aus zwei Gründen: erstens liegen die Frequenzen IFN γ -sezernierender Th-Zellen, die bisher nach *in vitro* Restimulation mit putativen Autoantigenen wie z.B. Aggrecan quantifiziert wurden, um viele Größenordnungen niedriger (bis zu 0.28% innerhalb der Th Population, (Zou et al., 2003) als die der hier *ex vivo* detektierten IFN γ -Produzenten; auch im Vergleich mit Frequenzen Antigen-spezifischer CD4⁺ IFN γ -Produzenten, die sich z.B. bei akuter CMV-Infektion (bis zu 0,5%; (Gamadia et al., 2003) oder Tetanus-Revakzinierung (<1%; (Di Genova et al., 2006) im peripheren Blut nachweisen lassen, sind die Frequenzen von IFN γ -sezernierenden Th-Zellen vergleichsweise hoch. Es erscheint daher unwahrscheinlich, dass diese Zellen spezifisch für ein lokal exprimiertes (Auto-) Antigen sind.

Zweitens überraschen die hohen Frequenzen synovialer IFN γ -Produzenten vor dem Hintergrund der anzunehmenden Heterogenität der Patientengruppe (außer dem Alter sowie der Diagnose ließen sich nachträglich keine weiteren krankheitsrelevanten Daten für dieses Kollektiv ermitteln) in Bezug auf das Krankheitsstadium sowie die jeweilige Medikation; es muss jedoch betont werden, dass das entscheidende Charakteristikum aller Patienten die Präsenz einer starken lokalen Entzündung zum Zeitpunkt der Gelenkpunktion war.

4.2 IFN γ - Induktion durch Zytokine in humanen Th-Zellen

4.2.1 Zytokin-induzierte IFN γ -Sekretion in humanen Th-Zellen - eine TCR-unabhängige Effektorfunktion

Die Detektion von IFN γ ⁺ Th-Zellen in der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten provozierte die Frage, ob dieses Effektorzytokin auch ohne Aktivierung des TCR durch (Auto-)Antigene induziert werden kann.

Im humanen System existieren bislang nur wenige Studien, die die Auslösung von Effektorfunktionen in Th-Zellen durch lösliche Faktoren ohne Beteiligung einer TCR-Stimulation durch Antigene oder Mitogene belegen; die biologische Restriktion eines solchen Mechanismus erscheint sinnvoll, da Th Zellen als Effektoren des adaptiven Arms der Immunantwort nach Aktivierung über Ihren klonalen TCR-Rezeptor eine auf individuelle Pathogene abgestimmte Immunantwort ausführen sollen.

In der Arbeit von Unutmaz et al. konnte jedoch gezeigt werden, dass durch Stimulation mit IL-2, IL-6 und $\text{TNF}\alpha$ neben Proliferation auch die Fähigkeit zur B-Zell-Hilfe in humanen, ruhenden Gedächtnis-Th Zellen induziert werden kann, welche so zur Immunglobulin-Produktion *in vitro* beitragen (Unutmaz et al., 1994).

Im Kontext mit Zytokin-vermittelten Effektorfunktionen zitieren viele Autoren IL-12 und IL-18 allein oder in Kombination mit anderen Faktoren als Induktoren der Synthese des Th1-Effektorzytokins $\text{IFN}\gamma$ und postulieren dies als einen möglichen Schlüsselmechanismus zur Aufrechterhaltung chronischer Entzündung (Yang et al., 2001; Yu et al., 2003).

Die bisher vorgeschlagenen Mechanismen der Zytokin-vermittelten $\text{IFN}\gamma$ Produktion stützen sich jedoch hauptsächlich auf Erkenntnisse, die in murinen TCR-transgenen Th1 Zellen nach kürzlicher Antigen-Stimulation (Yang et al., 2001) bzw. murinen oder humanen NK-Zellen (Bream et al., 2004) gewonnen wurden und daher wenig Aussagekraft für humane Th Zellen besitzen. Für menschliche CD4^+ Zellen liegen lediglich Studien vor, die einen verstärkenden Einfluss von Zytokinen auf Effektorfunktionen wie $\text{IFN}\gamma$ -Produktion im Kontext mit vorangegangener oder gleichzeitiger mitogener oder TCR-Stimulation quantifizieren (s. 1.2.8).

Insofern wurde die Möglichkeit einer ausschließlich Zytokin-getriebenen $\text{IFN}\gamma$ -Produktion in humanen Th Zellen bisher nicht untersucht.

In dieser Arbeit wurden zunächst diejenigen Zytokine und Chemokine zusammengestellt, welche entweder systemisch oder lokal in Synovialpunktaten oder -membranen von Patienten mit Rheumatoider Arthritis im Vergleich zu Kontrollgruppen als überexprimiert publiziert wurden und als Mediatoren in einem Zytokin-Netzwerk eine Rolle spielen könnten (s. 1.3.5). Dabei wurde absichtlich kein Fokus auf solche Faktoren gelegt, für die die Expression der korrespondierenden Rezeptoren auf Th-Zellen belegt ist oder die bereits im Kontext mit $\text{IFN}\gamma$ -Induktion untersucht wurden, um eine Einschränkung *a priori* auszuschließen. Tab. 3.2 zeigt,

dass potenzielle T-Zell-, B-Zell-, Makrophagen- und Fibroblastenprodukte im proinflammatorischen Zytokincocktail enthalten sind.

Die Kultur von hoch aufgereinigten humanen, ruhenden CD4⁺ Th Zellen von gesunden Spendern in Anwesenheit von Zytokinen, die im entzündeten Gelenk bei RA-Patienten überexprimiert sind, führte innerhalb von 72h zur Produktion großer Mengen von IFN γ ; im CBA-ELISA konnten keine weiteren wichtigen Th-Zytokine, deren Konzentration deutlich über der Nachweisgrenze lag, detektiert werden (3.2.1).

Mit diesem Ergebnis wurde erstmalig im humanen System gezeigt, dass eine Kombination von Zytokinen und Chemokinen *in vitro* die Synthese des Th1-Zytokins IFN γ ohne eine gleichzeitige Aktivierung über den TCR induzieren kann.

In den folgenden Experimenten wurden dann systematisch die Charakteristika der zur Zytokin-induzierten IFN γ -Produktion fähigen Th Zellen sowie die essentiellen Faktoren innerhalb des Zytokin-Cocktails untersucht. Die wichtigsten Eigenschaften, welche in Kap. 3.2.2 bis 3.3.4 beschrieben sind, werden im Folgenden zusammengefasst und nachfolgend diskutiert:

- Die maximale Frequenz mittels Zytokincocktail induzierbarer IFN γ ⁺ Zellen innerhalb der ruhenden Th Population ist nach 36-72h detektierbar; die Zytokin-Synthese verläuft so langsamer als bei einer Gedächtnisantwort nach TCR-Stimulation; eine Koexpression des inflammatorischen Mediators TNF α erfolgt nicht
- Die essentiellen, zur IFN γ -Produktion notwendigen Faktoren innerhalb des Stimulationscocktails sind IL-12 und IL-18 in Kombination mit einem γ c-Zytokin (IL-15>IL-2>IL-7), durch TNF α wird die Synthese verstärkt.
- Zytokin-induzierte IFN γ -Produktion ist auf Gedächtnis Th Zellen beschränkt, die die CD45RO-Isoform ausprägen
- Eine bis zu 40%ige Anreicherung von IFN γ -Produzenten findet sich in der „Effektor/Gedächtnis-Th-Fraktion“; diese Zellen sind CD4⁺CD45RO⁺CCR7⁻IL-18R α ⁺; die ex vivo IL-18R α Expression ist unbedingte Vorraussetzung für IFN γ -Produktion

- Ruhende IL-18R α ⁺ Gedächtnis-Th Zellen exprimieren im Vergleich zu IL-18R α ⁻ Th Zellen funktionale IL-12R-Komplexe; dies konnte durch Detektion von phosphoryliertem STAT4 nach Kurzzeit-Kultur in IL-12 bestätigt werden.
- CMV-spezifische Th1-Zellen zeigen nach Zytokin-Stimulation eine schnellere, uniforme IFN γ -Expression, die ebenfalls die Anwesenheit von γ_c -Zytokinen zusätzlich zu IL-12+IL-18 erfordert

Der wesentliche Unterschied der hier beschriebenen Zytokin-vermittelten Induktion von IFN γ -Sekretion in humanen Th Zellen im Vergleich zu murinen Th1 Zellen (Robinson et al., 1997; Yang et al., 2001; Yu et al., 2003) liegt in der Notwendigkeit der Anwesenheit eines γ_c -Zytokins im Stimulationscocktail (3.2.4) in Kombination mit IL-12 und IL-18.

Eine Ursache könnte darin liegen, dass die Ausbildung von funktionalen IL-12- oder IL-18-Rezeptorkomplexen erst durch γ_c -Zytokine induziert werden muss. Für den IL-12R-Komplex kann dies jedoch weitgehend ausgeschlossen werden, da in 3.3.4 die Expression des IL-12R β 1/ β 2-Heterodimers funktional durch den Nachweis von phospho-STAT4 nach IL-12-Stimulation gezeigt werden konnte. Da die Stimulationsdauer hier lediglich eine Stunde betrug und auch weiter auf 15 min. verkürzt werden konnte (nicht gezeigt), kommt eine *de novo*-Rezeptorinduktion nicht in Frage und belegt damit erstmals die funktionale *ex vivo*-IL-12R-Expression auf ruhenden IL-18R α ⁺ Th Zellen. Ein potenziell verstärkender Effekt von IL-2 als Mitglied der γ_c -Familie auf IL-12R β 2 Expression konnte nur in NK-, jedoch nicht in T-Zellen nachgewiesen werden (Wu et al., 2000) und spielt deshalb hier vermutlich keine Rolle.

Als weitere mögliche Funktion der γ_c -Zytokine bei der IFN γ -Produktion kommt die Modulation der Expression des IL-18R-Komplexes in Frage; dieser besteht aus einem α/β -Heterodimer, wobei beide Ketten zur IL-18-Bindung und -signaltransduktion erforderlich sind (Kim et al., 2001; Nakahira et al., 2001); wie in 3.3.3 dargelegt, lässt sich die α -Kette bereits *ex vivo* auf bis zu 12% der ruhenden Gedächtnis-Th-Zellen im FACS detektieren; die konstitutive Expression ist Voraussetzung für die Zytokin-vermittelte IFN γ -Produktion; lediglich die Expression der β -Kette wurde mangels verfügbarer Antikörper in dieser Arbeit nicht analysiert und könnte einer positiven Steuerung durch γ_c -Zytokine unterworfen sein.

Expressionsstudien in murinen Th Zellen und humanen NK-Zellen haben gezeigt, dass die IL-18R β -Kette primär durch IL-12-Signale und sekundär durch IFN γ reguliert wird (Kim et al., 2001; Nakahira et al., 2001); in einer Publikation von Strengell et al. findet sich jedoch auch ein Hinweis auf eine transiente Expression der β -Kette des IL-18-Rezeptors in humanen Th Zellen nach Stimulation mit IL-15 (Strengell et al., 2002).

Weiterhin wäre denkbar, dass der Einfluss der γ_c -Zytokine darin besteht, dass zur IFN γ -Sekretion erst ein Übergang der Zelle von der G₀ in die G₁/S-Phase notwendig ist. Die Korrelation von Literaturwerten für die durch IL-7 und IL-15 induzierte Proliferation ruhender Gedächtnis-Th-Zellen mit der hier gezeigten Zytokin-abhängigen IFN γ -Sekretion zeigt jedoch, dass die Zytokinsekretion der Zellteilung deutlich vorausgeht: während IFN γ -Produktion hier bereits zwischen 36-72h ein Maximum erreicht (3.2.2), konnte eine erste Zellteilung von Zytokin-stimulierten Gedächtniszellen frühestens nach 5 Tagen beobachtet werden (Geginat et al., 2001).

Zusammengefasst erscheint sowohl eine Modulation der Rezeptorexpression als auch die Induktion der Zellteilung durch γ_c -Zytokine als Voraussetzung für Zytokin-abhängige IFN γ -Induktion eher unwahrscheinlich und favorisiert alternativ eine direkte oder indirekte Einflussnahme auf den IFN γ -Promotor, was in Kapitel 4.3 diskutiert wird.

4.2.2 Ruhende Th-Zellen mit einem Th1-ähnlichen Phänotyp

Wie hier gezeigt, zeichnen sich die zur IFN γ -Synthese nach Zytokin-Stimulation fähigen IL-18R α^+ Th Zellen *ex vivo* durch die Koexpression von funktionalen IL-12R β 1/ β 2-Rezeptoren aus. Da in bisherigen Publikationen eine IL-12R β 2-Expression ausschließlich auf kürzlich aktivierten Th1- und nicht auf naiven oder, wie in dieser Arbeit beschrieben, ruhenden Gedächtnis-Th-Zellen nachgewiesen (Bofill et al., 2004; Rogge et al., 1997; Rogge et al., 1999) und IL-18R-Expression ebenfalls mit Th1-Zellen assoziiert wurde (Xu et al., 1998), ist dies der erste Beleg für die Existenz einer Th-Subpopulation, die bereits *ex vivo* in Bezug auf die Rezeptorausstattung einen „ruhenden“ Th1-Phänotyp aufweist, was möglicherweise auf eine vorangegangene Reaktivierung *in vivo* zurückzuführen sein könnte. Der Befund,

dass die zytokininduzierte $\text{IFN}\gamma$ -Synthese vorrangig in CCR7^- Effektor-Gedächtniszellen detektiert werden kann (s. 3.3.2), ergänzt dieses Bild einer Th Zelle mit dem Potenzial zur Effektorzytokinproduktion sowohl nach TCR-, als auch nach Zytokinstimulation, wenngleich die Zugehörigkeit zur CCR7^- oder $\text{IL18R}\alpha^+$ -Fraktion keine unbedingte Voraussetzung für die TCR-abhängige $\text{IFN}\gamma$ -Synthese ist (3.3.2 und 3.3.3)

Die in 3.3.5 durchgeführten Experimente mit CMVpp65-spezifischen Th1-Zellen liefern weitere Belege für die präferenzielle $\text{IFN}\gamma$ -Induktion durch Zytokine in Zellen mit einer Th1-Prägung: CMV-spezifische Th-Zellen werden durch persistierende Viren vermutlich repetitiv *in vivo* restimuliert; sie weisen dadurch phänotypische Ähnlichkeiten mit synovialen Th Zellen auf, wie z.B. eine fehlende Expression von CD27 und/oder CD28, sowie eine verstärkte Expression von Th1-assoziierten Molekülen wie CCR5; dies deutet auf einen ähnlichen Differenzierungsstatus hin (Amyes et al., 2003; Fletcher et al., 2005; Gamadia et al., 2003; Zaunders et al., 2004); (Berner et al., 2000; Tak et al., 1996; Warrington et al., 2001). Für CMVpp65-spezifische Effektoren konnte hier gezeigt werden, dass zwar dieselbe minimale Zytokin-Kombination zur $\text{IFN}\gamma$ -Induktion erforderlich ist wie bei ruhenden Zellen aus peripherem Blut, die Produktion jedoch uniform in nahezu allen Zellen und mit deutlich schnellerer Kinetik, ähnlich antigen-induzierten $\text{IFN}\gamma$ -Produzenten, erfolgt. Letzteres geht vermutlich darauf zurück, dass durch die vorangegangene Antigen-spezifische Stimulation bereits eine Voraktivierung erfolgte und die Zellen so möglicherweise eine höhere Rezeptordichte aufweisen, verbunden mit einer kürzeren Latenzzeit zur Initiation der Zytokin-abhängigen $\text{IFN}\gamma$ -Transkription.

Zuletzt lässt sich der „ruhende“ Th1-Phänotyp ebenfalls gut in ein von Wu et al. aufgestelltes Konzept eingliedern (Wu et al., 2002), das in 1.2.9 ausführlicher vorgestellt wurde. Danach persistiert nach Abklingen einer Immunantwort und Untergang der terminal differenzierten Th1-Effektorzellen eine Population von langlebigen Th Gedächtniszellen, die ebenso Th1-assoziierte Moleküle wie IL-12R exprimieren, sich jedoch durch fehlende $\text{IFN}\gamma$ -Produktion nach primärer Aktivierung von den Effektoren unterscheidet und so einen Überlebensvorteil besitzt. Bei den in dieser Arbeit *ex vivo* identifizierten $\text{IL-18R}^+\text{IL-12R}^+$ Th-Zellen könnte es sich um solche bisher nur in der Maus charakterisierten Th Zellen mit Th1-assoziiertes

Rezeptorausstattung und dem Potenzial zur IFN γ -Produktion nach Sekundärkontakt mit Antigen, oder, wie hier beschrieben, mit Zytokinen, handeln.

4.2.3 Die biologische Funktion von Zytokin-induzierter IFN γ -Synthese in Th-Zellen

Der biologische Sinn einer durch Zytokine initiierten, Antigen-unabhängigen IFN γ -Sekretion durch die zur adaptiven Immunität zählenden Th Zellen erscheint zunächst zweifelhaft, da diese Eigenschaft auch die zum angeborenen Immunsystem zählenden NK-Zellen besitzen. Außerdem existieren, wie in 1.2.2 und 1.2.4 beschrieben, zahlreiche Kontrollmechanismen, die zumindest die Selektion und Aktivierung von naiven T-Zellen in engen Grenzen kontrollieren und an eine Pathogen-spezifische Aktivierung über den TCR koppeln; wenngleich Kostimulation und polarisierende Zytokine hauptsächlich im Verlauf einer Primärantwort eine Rolle spielen, verwundert es, dass zur IFN γ -Synthese durch Th1-ähnliche Gedächtniszellen Signale über den TCR nicht mehr essentiell sind, sondern vielmehr Zytokine wie IL-12, IL-18 und IL-15, die im Laufe einer Pathogenerkennung durch die angeborenen „Pattern Recognition“-Rezeptoren z.B. von Makrophagen freigesetzt werden, zur IFN γ -Induktion ausreichen.

Obwohl mehrere herausragende Publikationen (Robinson et al., 1997; Yang et al., 2001) sich mit den Mechanismen der IL-12 und IL-18-vermittelten IFN γ -Produktion in murinen TCR-transgenen Th1-Zellen beschäftigt haben, wurde bislang keine umfassende Hypothese zur biologischen Funktion im Kontext mit Infektionen formuliert, sondern eher, wie auch in der Arbeit von Yu et al., die potenziell gewebeschädigenden Eigenschaften von unkontrollierter IFN γ -Sekretion bei chronischen Entzündungen betont (Yu et al., 2003); dieser Aspekt wird in Kap. 4.7 im Zusammenhang mit der Rheumatoiden Arthritis ausführlich diskutiert.

Durch Beobachtungen in murinen Infektionsmodellen, in denen der Fokus jedoch auf CD8-Zellen gelegt wurde, konnten erste Hinweise auf eine *in vivo* Funktion gewonnen werden. Murine zytotoxische CD8-Zellen vom Effektor-/Gedächtnistyp lassen sich durch IL-12 und IL-18 zur IFN γ -Produktion stimulieren. Berg et al. (Berg et al., 2003) konnten zeigen, dass die Infektion mit *Listeria monocytogenes* und anderen Pathogenen innerhalb von Stunden zu IL-12+IL-18-vermittelter IFN γ -

Sekretion durch CD8-Zellen führt, welche die Bakterienlast bereits nach 3 Tagen effektiv kontrollieren; bis zu 50% der aus peripheren Organen isolierten CD8-Gedächtniszellen besaßen die Fähigkeit zur Sekretion des Th1-Zytokins. Die Autoren mutmaßten, dass eine effektive angeborene Immunantwort erst durch die Synergie von NK-, NK-T- und CD8-Zellen wirksam wird. Dieser Befund konnte in einem *Burkholderia pseudomallei*-Infektionsmodell bestätigt werden; IFN γ ⁺ NK-Zellen konnten hier nach 5h detektiert werden, während in CD44⁺ CD8- Gedächtniszellen IFN γ ebenfalls bereits nach 15h anfärbbar war - also lange bevor eine adaptive zytotoxische Antwort zu erwarten wäre; innerhalb der CD8-Fraktion besaßen etwa 10% die Fähigkeit zur Zytokin-Synthese nach IL-12+IL-18-Stimulation; für IL-2 konnte *in vitro* ein verstärkender Effekt auf die IFN γ -Produktion verzeichnet werden, was eine interessante Parallele zur in dieser Arbeit beschriebenen γ_c -Zytokin-Abhängigkeit der IFN γ -Produktion im humanen Th1-ähnlichen Zellen aufzeigt (Lertmemongkolchai et al., 2001).

Vor dem Hintergrund der soeben zitierten Studien sind auch durch Zytokine aktivierte, humane Th1-ähnliche Effektor/Gedächtniszellen als frühe IFN γ -Produzenten bei der Kontrolle von Infektionen vorstellbar; in der Arbeit von Lertmemongkolchai et al. fanden sich dementsprechend auch Hinweise auf eine kleine Population von IFN γ ⁺ Th Zellen innerhalb der murinen CD4-Fraktion.

Neben der Rolle als frühe Effektorzellen bei der Infektabwehr könnte Zytokin-induzierten IFN γ -Produzenten auch eine aktive Rolle bei der Polarisierung naiver Th Zellen in Th1-Richtung zukommen. Wie in 1.2.7 beschrieben, stellt die Bindung von IFN γ an seinen Rezeptor mit nachfolgenden Signalen über STAT1 vermutlich den initialen Schritt zur Induktion der T-bet Expression in ungeprägten, naiven Th Zellen dar. Da IFN γ in diesem Zusammenhang nur von Zellen des angeborenen Immunsystems produziert werden könnte, käme hier IFN γ ⁺ Th1-ähnlichen Gedächtniszellen, die IL-12, IL-18 und γ_c -Signale von Makrophagen oder DCs erhalten, eine Rolle bei der Th1-Polarisierung zu. Gegen diese Hypothese spricht jedoch hauptsächlich die Tatsache, dass Effektorzellen der Zugang zum Lymphknoten durch fehlende CCR7-Expression verwehrt sein sollte und eine Lokalisation dieses Phänotyps in peripheren, entzündeten Geweben wahrscheinlicher ist. Eine kürzlich erschienene Studie im murinen System zeigte

jedoch, dass CCR7⁻ NK-Zellen alternativ auch über die Expression von CXCR3 in den Lymphknoten gelangen (Martin-Fontecha et al., 2004) - ein Molekül, welches ebenfalls mit Th1-Zellen assoziiert ist.

4.3 Signaltransduktion in Zytokin-induzierten IFN γ -Produzenten

In den Kapiteln 3.4.1 bis 3.4.4 wurde überprüft, welche Signalwege in humanen Gedächtnis-Th-Zellen für die Zytokin-induzierte IFN γ -Synthese essentiell sind und welchen Einfluss die γ_c -Zytokine auf die IFN γ -Produktion ausüben.

Im murinen System sind die essentiellen Schritte, die zur IFN γ -Transkription in TCR-transgenen Th1 Zellen nach IL-12+IL-18-Stimulation führen, ansatzweise charakterisiert. Als zentrale Mediatoren wurden durch IL-12 induziertes STAT4 sowie die durch IL-18 und IL-12 über GADD45 β aktivierte p38-MAPKinase identifiziert (Yang et al., 2001). Während für STAT4 Bindungsstellen im IFN γ -Promotor bestehen (Xu et al., 1996), aktiviert IL-18 vermutlich direkt NF κ B (Sica et al., 1997) und indirekt weitere Transkriptionsfaktoren wie AP-1 über die p38 MAPK (Barbulescu et al., 1998).

4.3.1 Zytokin-induzierte IFN γ -Sekretion ist NFAT-unabhängig

Die Blockierung von Kalzineurin mittels CsA (s. 3.4.1) hatte keinen Effekt auf die Zytokin-, wohl aber auf die TCR-abhängige IFN γ -Produktion. Dies deckt sich mit den Studien, die nach Stimulation von murinen TCR-transgenen Th1-Zellen mit IL-12 und IL-18 ebenfalls keine Inhibition der IFN γ -Synthese durch CsA erzielen konnten (Klimiuk et al., 1999; Yang et al., 2001; Yu et al., 2003) und belegt auch für humane, ruhende Effektor-/Gedächtniszellen die Unabhängigkeit der Zytokin-induzierten IFN γ -Sekretion vom Kalzineurin-abhängigen Transkriptionsfaktor NFAT.

4.3.2 Inhibition der Zytokin-abhängigen IFN γ -Sekretion durch JAK3-Blockade

In Kap. 3.4.2 konnte mit der γ_c -assoziierten Janus Kinase3 (JAK3) ein essentieller Mediator der Zytokin-abhängigen IFN γ -Produktion identifiziert werden; durch die

Blockade von JAK3 mit Hilfe des spezifischen JAK3 Inhibitors I wurde die $\text{IFN}\gamma$ -Produktion konzentrationsabhängig um bis zu 100% blockiert. In anderen Arbeiten konnte auch die durch γ_c -Zytokine oder TCR-Stimuli eingeleitete Proliferation von ruhenden humanen Th Zellen durch JAK3-Blockade unterdrückt werden (Geginat et al., 2001).

Die Phosphorylierung von JAK3 spielt jedoch als ein relativ frühes Ereignis nach Bindung eines Liganden an γ_c -Zytokin-Rezeptoren in einer Reihe von weiteren Signaltransduktionswegen eine Rolle; in Abb. 4.1 sind die bekannten JAK3-abhängigen Signalwege skizziert, die potenziell an der Induktion der $\text{IFN}\gamma$ -Transkription beteiligt sein könnten.

Im Folgenden wird die Relevanz der einzelnen Mediatoren für die $\text{IFN}\gamma$ -Produktion vor dem Hintergrund der in dieser Arbeit gewonnenen Resultate diskutiert.

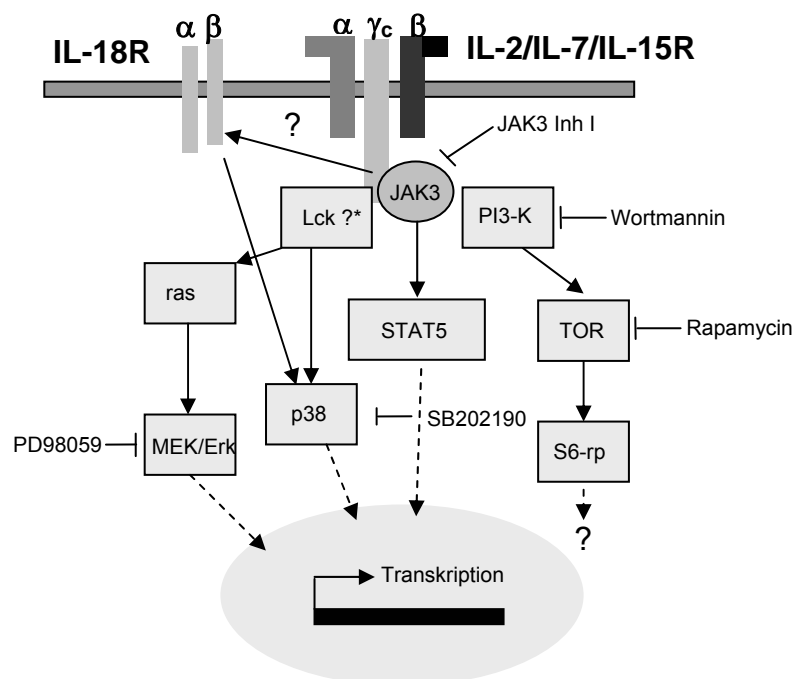


Abb. 4.1: JAK3-vermittelte Signaltransduktion und Blockade durch entsprechende Inhibitoren. Pfeile symbolisieren Aktivierung bzw. Phosphorylierung. ?* = Hypothetischer Einfluß auf Zielmoleküle. ? = Einfluß unbekannt.

4.3.2 p38 als essentieller Mediator bei der Zytokin-induzierten IFN γ -Sekretion

In 3.4.3 wurde durch die konzentrationsabhängige Suppression der Zytokin-induzierten IFN γ -Produktion durch die beiden p38-Inhibitoren SB202190 und SB203580 die essentielle Rolle der MAPKinase in humanen Th-Zellen belegt. In Gegenwart von 200nM SB202190 konnte bereits ein dramatischer Rückgang der Frequenz IFN γ^+ Th Zellen verzeichnet werden, der durch Erhöhung der InhibitorKonzentration weiter gesteigert wurde. Die verwendeten Inhibitor-Konzentrationen liegen in dem Bereich, der auch in murinen Ova-TCR-transgenen Th1-Zellen zur Blockade der IL-12+IL-18-induzierten IFN γ -Sekretion führte (Yang et al., 2001; Yu et al., 2003). Als erforderliche Konzentration für eine halbmaximale Inhibition (IC₅₀) wurde 50-100nM publiziert (Davies et al., 2000), dies liegt in derselben Größenordnung, wie in dieser Arbeit eingesetzt.

Wie in Abb. 4.1 angedeutet, kann nicht nur durch Ligation des IL-18R, sondern auch durch die Bindung von γ_c -Zytokinen an ihre jeweiligen Rezeptoren eine Phosphorylierung von p38 induziert werden: so konnte in humanen, ruhenden Th Zellen eine JAK3-abhängige Aktivierung der p38-Kinase nach Stimulation durch IL-2 (Lafont et al., 2003), IL-7 und IL-15 belegt werden (Geginat et al., 2001). In einer CD18⁺ Subpopulation innerhalb humaner CD8-Zellen wurde eine p38-Aktivierung jedoch nur nach gleichzeitiger Stimulation mit IL-2 und IL-12 beobachtet (Gollob et al., 1999). Andere Arbeiten zeigen ebenfalls, dass die Bindung desselben Zytokins an seinen Rezeptor in verschiedenen Zelltypen unterschiedliche Signale induzieren kann: so konnte nach Kultur von humanen NK-Zellen in IL-2 trotz konstitutiver Rezeptorexpression keine p38-Phosphorylierung verzeichnet werden (Lafont et al., 2003); entsprechend war die ebenfalls IL-2-abhängige IFN γ -Produktion auch nicht durch p38-Inhibitoren blockierbar (Yu et al., 2000).

Aufgrund des zuvor gesagten ist es also nicht ausgeschlossen, dass in humanen Th Zellen die gleichzeitige Stimulation von p38 durch IL-18 und γ_c -Zytokine über JAK3 erforderlich ist, um eine kritische Schwelle zur IFN γ -Transkription zu überwinden; dies würde die Notwendigkeit der Präsenz beider Faktoren erklären.

Da mit den verwendeten p38-Inhibitoren zwischen diesen beiden Möglichkeiten in funktionalen Assays nicht unterschieden werden kann, wird zur Zeit in Immunoblots

der Einfluß der γ_c -Zytokine im Vergleich mit IL-18 auf die p38-Aktivierung mittels phospho-spezifischer Antikörper analysiert.

4.3.3 Die Rolle von MEK/Erk und PI3-K bei der Zytokin-induzierten IFN γ -Synthese

Als weiterer Signaltransduktionsmechanismus ist der MAPKinaseKinase- (MEK/Erk-) Weg an den IL-2-Rezeptorkomplex via JAK3 gekoppelt. Die in 3.4.4 präsentierten vorläufigen Ergebnisse sprechen gegen eine Rolle von MEK/Erk bei der γ_c -vermittelten IFN γ -Induktion in Th Zellen.

Dies deckt sich mit einer Arbeit, in der die durch γ_c -Zytokine induzierte Proliferation in ruhenden, humanen Th Zellen ebenfalls MEK/Erk-unabhängig war (Geginat et al., 2001). Da in Untersuchungen zur Spezifität des MEK/Erk-Inhibitors PD98059 bei hohen Konzentrationen auch eine Blockierung von p38 beobachtet wurde (Davies et al., 2000), könnte darauf der in 3.4.4 gezeigte Rückgang der Zahl IFN γ^+ Th Zellen bei der höchsten verwendeten Konzentration von 25 μ M zurückzuführen sein.

Weitere vorläufige Untersuchungen ergaben, wie in 3.4.4 gezeigt, ebenfalls keinen Anhaltspunkt dafür, dass PI3-K in Zytokin-stimulierten Th Zellen JAK3-abhängig aktiviert wird und an der IFN γ -Synthese beteiligt ist; die Titration des PI3-K-Inhibitors Wortmannin über einen weiten Bereich führten zu keinem nennenswerten Rückgang der Frequenz IFN γ^+ Th Zellen; dieses Experiment wird jedoch gerade reproduziert, um eine entsprechende Aussage zu stärken.

4.3.4 JAK3 und STAT5

JAK3-Phosphorylierung kann auch die Aktivierung von STAT5a und STAT5b nach sich ziehen (eigene Beobachtung und (Wang et al., 1999); diese Transkriptionsfaktoren binden zumindest in NK Zellen an Konsensusregionen im IFN γ -Promotor (Bream et al., 2004) und schaffen so eine Verbindung zwischen γ_c -Signalen und IFN γ -Sekretion. Dieser Mechanismus wurde jedoch für Th-Zellen bisher nicht demonstriert; in Mausexperimenten konnte immerhin eine präferenzielle Aktivierung von STAT5 in Th1-, nicht jedoch in Th2-Zellen nach TCR-Stimulation quantifiziert werden (Anderson et al., 2003). Im Rahmen dieser Arbeit wurden erste Experimente

durchgeführt, um die Funktion von STAT5 bei der Zytokin-vermittelten IFN γ -Sekretion zu charakterisieren. Eine STAT5-Phosphorylierung nach Stimulation mit IL-15 konnte sowohl in IL-18R α^+ wie IL18R α^- Gedächtnis-Th-Zellen im Western-Blot detektiert werden (nicht gezeigt), was gegen eine präferentielle Aktivierung in humanen Th1-Zellen spricht. Weitere vorläufige Ergebnisse ergaben weder Hinweise auf eine nukleäre STAT5-Translokation mit Bindung im IFN γ -Promoter (Analyse mittels ChromatinImmunPräzipitations-(ChIP-) Assay, nicht gezeigt), noch konnte durch lentivirale Überexpression einer konstitutiv aktiven STAT5-Form der Effekt der γ_c -Zytokine in Hinblick auf IFN γ -Sekretion imitiert werden (nicht gezeigt). Da keine spezifischen STAT5-Inhibitoren existieren, könnten hier Experimente mit murinen Th Zellen, in denen STAT5 konditionell deletiert wurde, Aufschluss geben.

4.3.5 Verstärkung der Zytokin-abhängigen IFN γ -Produktion durch TNF α

Zusätzlich zur essentiellen Zytokin-Kombination IL-12+IL-18+IL-15 wurde in 3.2.4 der verstärkende Effekt von TNF α auf die IFN γ -Synthese beschrieben. Diese Synergie könnte dadurch erklärt werden, dass die Bindung von TNF α an seinen Rezeptor ebenfalls eine Aktivierung der p38-MAPKinase sowie NF κ B-Translokation nach sich zieht (Garfield et al., 2005, Übersicht: {Chen, 2002 #184; Raingeaud et al., 1995) und so möglicherweise IL-18- oder γ_c -Zytokin-Effekte potenziert; für murine NK- und Th1-Zellen wurde eine Rolle von proinflammatorischen Faktoren wie TNF α oder IL-1 bei der IL-12-abhängigen IFN γ -Produktion bzw. Th1-Polarisierung beschrieben (Hunter et al., 1995; Shibuya et al., 1998) und auch im humanen System wurde die durch Antigen induzierte IFN γ -Sekretion in Th Zellen nach Blockierung von TNF α in der Kultur um bis zu 36% reduziert (Netea et al., 2002).

4.4 Phänotypische Charakterisierung von Zytokin-induzierten IFN γ -Produzenten

In den Kapiteln 3.2 und 3.3 wurden die TCR-unabhängige, Zytokin-vermittelte IFN γ -Synthese in humanen Th Zellen beschrieben. Um die Relevanz dieses Effektormechanismus *in vivo* bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen wie der Rheumatoiden Arthritis zu untersuchen, wurden in Kap. 3.5 TCR- im Vergleich zu

Zytokin-induzierten $\text{IFN}\gamma^+$ Th Zellen anhand der Expression von aktivierungsinduzierten Oberflächenmarkern untersucht, mit dem Ziel, eine TCR- bzw. Zytokin-typische Signatur zu identifizieren.

Die Anforderung an einen idealen Differenzierungsmarker beinhaltet die frühe und lang anhaltende Expression unter der einen Stimulationsbedingung und die möglichst konstante Abwesenheit unter der anderen Stimulationsart. In einem ersten Screening wurde in 3.5.1 zunächst die Expression der sieben ausgewählten Moleküle nach 36h Stimulation mit $\alpha\text{CD3}/\text{CD28}$ oder dem Zytokin-Cocktail analysiert- also etwa zum frühestmöglichen Zeitpunkt der maximalen $\text{IFN}\gamma$ -Sekretion nach Zytokin-Stimulation. Während die meisten Aktivierungsmarker innerhalb der $\text{IFN}\gamma^+$ Population unter beiden Konditionen nach 36h entweder kaum oder nicht differenziell exprimiert wurden, konnte für das $\text{TNF}\alpha$ -Superfamilienmitglied 4-1BB eine Expression nur nach Aktivierung über den TCR detektiert werden, weshalb die Expressionstudien in 3.5.2 und 3.5.3 vertieft wurden. Die Stimulation von CMV-spezifischen Th-Zellen innerhalb PBMC durch Virus-Lysat wurde gewählt, um den möglicherweise unphysiologisch starken TCR-Agonisten αCD3 durch ein physiologisches Antigen zu ersetzen; auch spiegelte die Verwendung von kompletten PBMC anstelle von isolierten Th Gedächtnis-Zellen eine zelluläre Zusammensetzung, wie sie z.B. in Synovialflüssigkeit von aktiven RA-Patienten vorliegt, besser wider. Sowohl hier als auch nach Restimulation einer CMV-spezifischen Th1-Kurzzeit-Zelllinie mittels TCR-Agonisten (3.5.3) konnte eine verstärkte Expression von 4-1BB in $\text{IFN}\gamma^+$ Th-Zellen beobachtet werden. Diese setzte bereits nach etwa 8h ein, erreichte ein Maximum nach 16h und blieb bis zum Abklingen der $\text{IFN}\gamma$ -Sekretion nach ca. 48h erhalten. Im Gegensatz dazu blieb die 4-1BB-Expression in Zytokin-stimulierten $\text{IFN}\gamma$ -Produzenten auf konstant niedrigem Niveau innerhalb des gesamten Beobachtungszeitraums. In vorläufigen Affymetrix-Genchip-Analysen konnte die starke differenzielle Ausprägung von 4-1BB unter den beiden unterschiedlichen Stimulationsbedingungen auch auf mRNA-Ebene bestätigt werden; während 4-1BB-mRNA in Zytokin-stimulierten, FACS-sortierten $\text{IFN}\gamma$ -Produzenten knapp oberhalb der Detektionsgrenze lag, konnte in TCR-induzierten $\text{IFN}\gamma^+$ Th Zellen eine 62-fache Anreicherung quantifiziert werden (Daten nicht gezeigt).

Obwohl nur einige wenige Studien zur Regulation der 4-1BB-Expression auf DNA-Ebene vorliegen, erscheinen die hier gemachten Beobachtungen plausibel: In einer der ersten Beschreibungen über 4-1BB wurde die Abhängigkeit der Induktion vom zentralen Transkriptionsfaktor NFAT durch Inhibitionsexperimente mit CyclosporinA verifiziert (Kwon et al., 1989); da NFAT durch den Zytokincocktail vermutlich nicht induziert wird, wohl aber nach TCR-Aktivierung mittels α CD3/CD28 oder CMV-Antigen, ist das Ausbleiben der Induktion von 4-1BB in Zytokin-stimulierten IFN γ -Produzenten schlüssig. Obwohl nachweislich weitere Transkriptionsfaktoren an der 4-1BB-Regulation beteiligt sind (Kim et al., 2003), ist eine Induktion in humanen Th Zellen ohne NFAT-Beteiligung nach jetzigem Wissensstand ausgeschlossen und qualifiziert 4-1BB als idealen Indikator für TCR- gegenüber Zytokin-induzierte IFN γ -Produzenten.

4.5 Inhibition der Zytokin-induzierten IFN γ -Produktion durch CD25⁺ Tregs

CD25⁺ regulatorische T-Zellen sind in den Gelenken von RA-Patienten akkumuliert und machen, je nach Studie, bis zu 20% der infiltrierenden Th Zellen aus; unter Vorwegnahme der Ergebnisse in 3.7, die belegen, dass synoviale IFN γ ⁺ Th Zellen nicht durch lokal exprimierte (Auto-) Antigene, sondern durch das Zytokinmilieu im entzündeten Gelenk zur IFN γ -Produktion angeregt werden, wurde in 3.6.1 der Einfluß von CD25⁺ regulatorischen T-Zellen auf die IFN γ -Produktion in CD4⁺IL18R α ⁺ Effektor-/Gedächtniszellen nach Stimulation mit dem Zytokin-Cocktail untersucht; daraus sollte eine Aussage darüber abgeleitet werden, ob Tregs prinzipiell Zytokin-vermittelte Effektorfunktionen wie IFN γ -Synthese im entzündeten Gewebe kontrollieren können.

Die Tatsache, dass die Frequenz Zytokin-induzierter IFN γ -Produzenten nach Kocultivierung mit CD25⁺ regulatorischen T-Zellen durchschnittlich um etwa die Hälfte abnahm (3.6.1), überrascht aus mehreren Gründen. Zunächst handelt es sich hierbei um die ersten Belege dafür, dass Tregs ihr Suppressorpotenzial nicht nur im Kontext einer Aktivierung der Responderzellen über den TCR, sondern auch nach deren Stimulation durch Zytokine ausüben können; weiterhin wurden in bisherigen Publikationen zumeist naive Responderzellen in Suppressionsassays verwendet, in

denen lediglich die Zellproliferation quantifiziert wurde; die hier gezeigten Ergebnisse belegen auch eine Inhibition der Zytokin-Produktion in differenzierten Effektor/Gedächtniszellen. Schließlich wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die Reduktion der Zytokinproduktion auch in Gegenwart von IL-6 und insbesondere in Anwesenheit der γ_c -Zytokine IL-7 und IL-15 erfolgte, die in anderen Publikationen als Inhibitoren des Suppressor-Potenzials von Tregs beschrieben wurden (de la Rosa et al., 2004; Pasare and Medzhitov, 2003; Ruprecht et al., 2005).

Die hier gemachten Beobachtungen sind vor dem Hintergrund aktueller *in vitro* Modelle zur Funktion von Tregs nicht zu deuten: Studien wie die von de la Rosa et al. (de la Rosa et al., 2004) zeigten auf elegante Weise, dass nahezu alle Charakteristika der Suppression von Proliferation naiver Th Zellen mittels Tregs durch die Konkurrenz um den Wachstumsfaktor IL-2 erklärbar sind. Auch eine mögliche Inhibition der Zytokinproduktion im Rahmen einer Primärantwort durch Tregs ließe sich durch die Konkurrenz-Theorie erklären: Naive Th Zellen erhalten ohne frühe IL-2-Transkription vermutlich keine ausreichenden Aktivierungs- und Überlebenssignale (Gett et al., 2003) zur nachfolgenden Effektorzytokinproduktion.

In den in 3.6.1 gezeigten Experimenten spielt jedoch endogenes IL-2 bei der Induktion der $\text{IFN}\gamma$ -Sekretion in $\text{CD4}^+\text{IL-18R}\alpha^+$ Effektorzellen keine Rolle; es wird, wie in 3.2.1 gezeigt, von den Effektorzellen auch gar nicht produziert. Aus diesem Grund findet eine Konkurrenz um den Wachstumsfaktor IL-2, sowie eine Kompensation des IL-2-Mangels durch exogenes IL-7 oder IL-15, im hier verwendeten System nicht statt.

Es müssen folglich andere Mechanismen existieren, die die Suppression der $\text{IFN}\gamma$ -Produktion durch Tregs vermitteln. Ob dazu ein direkter Zellkontakt erforderlich ist oder ob die Inhibition der Effektorzellen möglicherweise über lösliche Mediatoren erfolgt, wird in laufenden Experimenten untersucht. Erste, vorläufige Daten lassen darauf schließen, dass die Zytokin-induzierte $\text{IFN}\gamma$ -Sekretion auch in Abwesenheit von CD14^+ akzessorischen Zellen durch Tregs inhibiert werden kann (nicht gezeigt); dies deckt sich mit Studien, die belegen, dass die Suppression von Proliferation durch Tregs *in vitro* APC-unabhängig ist (Ng et al., 2001; Piccirillo and Shevach, 2001).

Als Konsequenz für Autoimmunerkrankungen wie die RA ergibt sich aus den in 3.6.1 vorgestellten Ergebnissen, dass CD25^+ Tregs prinzipiell das Potenzial zur Kontrolle

von $\text{IFN}\gamma$ -Produktion in Effektorzellen besitzen, auch wenn diese nicht durch TCR- sondern durch Zytokin-Stimulation induziert wurde.

Weiterhin belegen die hier gezeigten Resultate, dass ein solcher Suppressormechanismus auch in Anwesenheit hoher Spiegel von IL-7- oder IL-15, wie sie im entzündeten Gelenk nachweisbar sind (Ruprecht et al., 2005), erfolgen könnte, da er unabhängig von endogenem IL-2 ist.

Es wäre so vorstellbar, dass die in den entzündeten Gelenken von RA-Patienten akkumulierten Tregs (Cao et al., 2003; Cao et al., 2004; van Amelsfort et al., 2004) aktiv an der Begrenzung der Entzündung z.B. durch Suppression der $\text{IFN}\gamma$ -Synthese in Effektor-Th-Zellen beteiligt sind. Tatsächlich finden sich in einer aktuellen Studie erste Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der Frequenz $\text{CD}25^+$ Tregs am Ort der Entzündung und der Schwere der untersuchten Juvenilen Idiopathischen Arthritis (JIA): die selbst-limitierende, remittierende Form war mit höheren Treg-Frequenzen in den Gelenken assoziiert als die „extended“ Form mit schlechterer Prognose (de Kleer et al., 2004). Wenngleich diese Arbeiten noch weit davon entfernt sind, die Rolle von Tregs bei der Kontrolle von Autoimmunerkrankungen des Menschen zu verstehen, lassen die hier präsentierten Daten eine Therapie mit *in vitro* expandierten $\text{CD}25^+$ Suppressorzellen sinnvoll erscheinen, auch wenn der Entzündungsprozess nicht durch eine Aktivierung von Effektorzellen durch (Auto-)Antigene, sondern durch Faktoren innerhalb eines Zytokin-Netzwerks aufrechterhalten wird.

4.6 Zytokin-abhängige $\text{IFN}\gamma$ -Synthese in den entzündeten Gelenken von RA-Patienten

In Kap. 3.7.1 wurde die spontane *ex vivo* Sekretion von $\text{IFN}\gamma$ durch lebende Th Zellen aus Synovialflüssigkeit von RA Patienten mit 4-1BB-Expression korreliert. Abb. 3.24 zeigt, dass sich in allen Patienten die überwiegende Mehrheit der Zytokinproduzenten durch eine fehlende 4-1BB-Koexpression auszeichnet.

Aufgrund der Expressionsanalysen von 4-1BB in 3.5 kann angenommen werden, dass diese Zellen keine kürzliche Aktivierung über den TCR erfahren haben, die zu NFAT-vermittelter 4-1BB-Ausprägung geführt hätte, sondern vermutlich durch proinflammatorische Zytokine induziert wurden. Einzig innerhalb des frühen

Zeitfensters zwischen etwa vier (erste IFN γ -Produzenten nach Antigen-Stimulation messbar) und acht Stunden (erste IFN γ /4-1BB-Koexpression nach Antigen-Stimulation nachweisbar) wären theoretisch IFN γ^+ 4-1BB $^-$ Th Zellen nach TCR-Aktivierung detektierbar; es erscheint jedoch als sehr unwahrscheinlich, dass alle IFN γ^+ Th Zellen in sämtlichen untersuchten Patienten sich genau in diesem engen Fenster nach *in vivo*-Induktion befanden.

In 3.7 konnte zudem gezeigt werden, dass kurzzeitig *in vitro* kultivierte synoviale Th-Zellen mehrheitlich die Fähigkeit zur 4-1BB-Expression nach TCR- oder Superantigen-Stimulation besitzen; durch diese Kontrollen kann ein genereller Defekt zur 4-1BB-Ausprägung ausgeschlossen werden. Um finale Sicherheit zu erlangen, dass synoviale IFN γ^+ Th Zellen 4-1BB nach antigener Stimulation nicht möglicherweise internalisieren und so eine Oberflächenfärbung verhindern, bietet sich die Quantifizierung von 4-1BB-mRNA nach *ex vivo* Isolation an; erste Proben für diese Analyse wurden bereits sortiert, eine Analyse mittels quantitativer PCR ist in Vorbereitung.

Vor dem Hintergrund der in dieser Arbeit *in vitro* charakterisierten Zytokin-induzierten IFN γ -Produzenten mit einem Th1-ähnlichen Phänotyp (3.2) spricht sowohl das Zytokinmilieu im entzündeten Gelenk, als auch der Phänotyp der Th Zellen am Ort der Entzündung bei der RA für einen Antigen-unabhängigen Mechanismus zur IFN γ -Induktion: Alle zur IFN γ -Synthese essentiellen Zytokine wurden in verschiedenen Studien in Synovialpunktaten nachgewiesen (vgl. Tab. 3.2). Interessanterweise konnte in der Arbeit von Petrovic-Rackov eine Korrelation für erhöhte Spiegel von IL-12, IL-18, IL-15 und TNF α mit einer besonders hohen Krankheitsaktivität festgestellt werden (Petrovic-Rackov and Pejnovic, 2006); bei diesen vier Faktoren handelt es sich, wie in 3.2.4 gezeigt, um effektive Induktoren der IFN γ -Synthese in Th1-ähnlichen Effektor/Gedächtniszellen. Andere Studien belegen, dass mehrere löslichen Faktoren im Gelenk in Konzentrationen vorliegen, wie sie auch in dieser Arbeit in den *in vitro*-Experimenten eingesetzt wurden; so quantifizierten Raza et al. Werte von IL-12 in einzelnen Patienten im ng/ml-Bereich (Raza et al., 2005), ähnliches wurde für IL-6 und IL-8 berichtet (Canete et al., 2000; McInnes et al., 1996; Raza et al., 2005). Für IL-15 konnten sogar Konzentrationen im μ g/ml-Bereich detektiert werden (McInnes et al., 1996); dies entspricht einem Vielfachen der in dieser Arbeit zur IFN γ -Induktion benötigten Konzentration.

Patienten, die mit stark entzündungshemmenden Kortikosteroiden therapiert wurden, wiesen z.T. höhere Konzentrationen an Entzündungsmediatoren wie IL-6 oder IL-1 β im Gelenk auf als nicht behandelte oder mit nicht-steroidalen Medikamenten substituierte Patienten (Lettesjo et al., 1998); es ist also nicht zwangsläufig davon auszugehen, dass systemische Zytokinpiegel im Gelenk bei hoher Krankheitsaktivität durch anti-inflammatorische Medikation kontrolliert werden können; dies wurde auch erklären, warum trotz starker Heterogenität der hier untersuchten Patienten in Bezug auf die Medikation in nahezu allen Punktaten IFN γ -Produzenten detektierbar waren – möglicherweise waren die Zytokinpiegel im Gelenk von der Medikation unbeeinflusst. Anders verhält es sich bei der Therapie mit Biologicals wie den TNF α -Blockern: Hier konnte u.a. eine Reduktion von proinflammatorischen Mediatoren wie IL-1 β , IL-6, IL-8, GM-CSF und insbesondere IL-15 verzeichnet werden (Brennan et al., 1989; Butler et al., 1995; Haworth et al., 1991; Kageyama et al., 2006).

Als weiteres Argument für eine Zytokin-abhängige Synthese der IFN γ -Induktion in synovialen Th-Zellen von RA-Patienten ist der vorherrschende Phänotyp am Ort der Entzündung anzuführen: Viele der in Punktaten nachweisbaren Th-Zellen sind Gedächtniszellen, die den frühen Aktivierungsmarker CD69 exprimieren (Iannone et al., 1996; Mertens et al., 1994; Thomas et al., 1992) und eigene Beobachtung); im Vergleich zu peripherem Blut von Patienten und Gesunden finden sich darin erhöhte Frequenzen von Zellen mit einem typischen molekularen Th1-/Effektor-Muster: Sowohl IL-18R- und IL-12R-Komplexe werden verstärkt exprimiert (Aita et al., 2004; Kawashima and Miossec, 2003), als auch die Chemokinrezeptoren CXCR3 und CCR5; letzterer lässt sich auf bis zu 80% synovialer Th-Zellen anfärben (Anderson et al., 2003; Norii et al., 2006; Qin et al., 1998; Suzuki et al., 1999). CCR5⁺ wird von der überwiegenden Mehrheit der IL-18R α ⁺ Th-Zell-Subpopulation koexprimiert (vorläufige Daten; nicht gezeigt) und wird wie IL-18R als typischer Th1-Marker angesehen (Bonecchi et al., 1998; Loetscher et al., 1998); ferner besitzen CCR5⁺ Th-Zellen ein hohes Migrationspotential in entzündete Gewebe (Norii et al., 2006). Der Chemokinrezeptor CXCR3 wurde mit prä-Th1-Zellen assoziiert (Rivino et al., 2004). Funktionale Rezeptoren für γ_c -Zytokine lassen sich auf synovialen Th Zellen ebenso nachweisen; im Durchflußzytometer konnten Roon et al. die α -Kette des IL-7-Rezeptors uniform auf allen Th Zellen aus Gelenkpunktaten detektieren (van Roon et al., 2003); Hovdenes et al. fanden eine verstärkte Ausprägung von IL-2R-Komplexen

auf synovialen Th Zellen von RA Patienten im Gegensatz zu Gesunden (Hovdenes et al., 1989a; Hovdenes et al., 1989b; Hovdenes et al., 1989c). Die Tatsache, dass synoviale Th Zellen in Gegenwart von IL-15 proliferieren und nach IL-15-Kultur $\text{TNF}\alpha$ in Fibroblasten induzieren (McInnes et al., 1996; Miranda-Carus et al., 2004), spricht ebenfalls für eine Expression funktionaler IL-15R-Komplexe.

Zusammenfassend finden sich in den entzündeten Gelenken von RA Patienten alle löslichen Faktoren, die zur Zytokin-abhängigen $\text{IFN}\gamma$ -Synthese notwendig sind; phänotypische Analysen belegen zudem, dass synoviale Th Zellen Rezeptoren exprimieren, um sowohl in die entzündeten Gewebe einzuwandern, als auch Zytokin-abhängig $\text{IFN}\gamma$ zu synthetisieren. Zudem zeichnen sich *ex vivo* isolierte $\text{IFN}\gamma$ -Produzenten durch eine fehlende 4-1BB-Expression aus (3.7.1), was als direktes Indiz für eine $\text{IFN}\gamma$ -Induktion durch inflammatorische Mediatoren und nicht durch lokal präsentierte (Auto-)Antigene angeführt werden kann.

Das Konzept einer zytokin-induzierten, $\text{IFN}\gamma$ sezernierenden Th1-Zelle im Mittelpunkt der Entzündungsreaktion bei der RA ist in Abb. 4.2 zusammengefaßt: Danach werden CCR5^+ Th-Zellen mit einem Th1-Phänotyp durch das inflammatorische Milieu in die Gelenke rekrutiert; die dort hauptsächlich von Makrophagen und Fibroblasten freigesetzten Zytokine führen zur Aktivierung und $\text{IFN}\gamma$ -Induktion. Im Gegenzug bewirkt die lokale $\text{IFN}\gamma$ -Produktion eine Freisetzung von Sauerstoff- und Stickstoffradikalen durch Makrophagen, die u.a. zur Aktivierung von Osteoklasten führen, die am Knochenabbau beteiligt sind. Weiterhin werden indirekt durch $\text{IFN}\gamma$ Matrix-Metalloproteinasen aktiviert, die ebenfalls an der Gelenkdestruktion beteiligt sind. In 4.7 werden zudem die Konsequenzen der $\text{IFN}\gamma$ -Synthese für die Freisetzung weiterer Mediatoren innerhalb eines Zytokinnetzwerkes beschrieben.

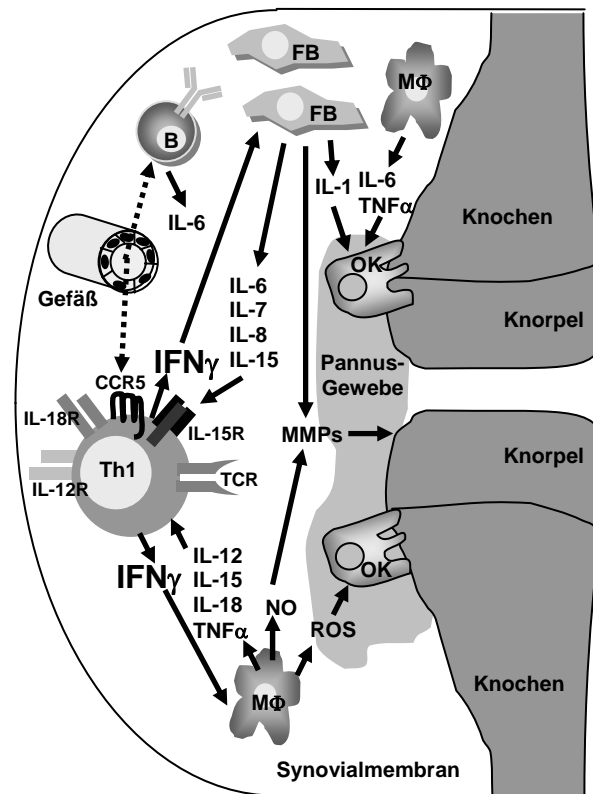


Abb. 4.2: Zytokin-induzierte, IFN γ -produzierende Th1-Zellen innerhalb eines Zytokinnetzwerks bei der RA. B=B-Zelle, FB=synovialer Fibroblast, MMP=Matrix-Metalloproteinase, M Φ = Makrophage, NO=Stickoxid, OK=Osteoklast, ROS=Reaktive Sauerstoffspezies. Durchgehende Pfeile symbolisieren die Freisetzung von Faktoren sowie die entsprechenden Ziele. Gestrichelte Pfeile symbolisieren Migration ins Gewebe.

4.7 Die Rolle von IFN γ bei der Aufrechterhaltung von chronischer Entzündung

Bei der Rheumatoiden Arthritis führt chronische Entzündung zu einer progressiven Schädigung der betroffenen Gelenke. In diesem Kapitel soll eine potenzielle Beteiligung von IFN γ -produzierenden Th Zellen bei diesem Prozess kritisch beurteilt werden; neben den inflammatorischen, gewebescheidigenden Eigenschaften des Th1-Zytokins in Autoimmunerkrankungen wurden in den letzten Jahren mehrere Arbeiten publiziert, die die regulatorische Funktion von IFN γ bei der Beendigung von Immunantworten gegen Pathogene herausgestellt haben.

So konnte gezeigt werden, dass die Kontraktion des Pools an *Listeria*-spezifischen CD8-Effektorzellen in Mäusen mit deletiertem IFN γ -Lokus verzögert ist (Badovinac et al., 2000). In der Studie von Wu et al. zur Persistenz von CD4-Effektor- bzw. Gedächtniszellen (vgl. 1.2.9) deutete sich an, dass IFN γ *in vivo* den Ausgang einer Th1-Antwort maßgeblich mitbestimmt; durch bis dato ungeklärte Mechanismen

besaßen $\text{IFN}\gamma^+$ Effektoren nur eine kurze Lebensspanne, während sich $\text{IFN}\gamma^-$ Zellen mit einer molekularen Th1-Signatur zu langlebigen Gedächtniszellen entwickelten (Wu et al., 2002).

In der Arbeit von Feuerer et al. (Feuerer et al., 2006) wurde dieses Konzept experimentell bestätigt und weiterentwickelt. Auch hier konnte eine $\text{IFN}\gamma$ -abhängige selbst-Limitierung des Umfangs der Th1-Population nach antigener Induktion verzeichnet werden; es konnte sowohl eine erhöhte Frequenz Antigen-spezifischer Th1-Zellen nach Blockade von $\text{IFN}\gamma$ in Wildtyp-Mäusen als auch nach Transfer in Tiere, die keine $\text{IFN}\gamma$ -Rezeptoren ausprägten, beobachtet werden; dies ging mit einer stärkeren lokalen Entzündung in dem verwendeten DTH-Modell (Delayed Type Hypersensitivity - Überempfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ, bei dem T-Zellen eine lokale, Antigen-spezifische Entzündungsreaktion in der Haut verursachen) einher. Die Autoren zeigten, dass die Kontrolle des Th1-Pools von der durch $\text{IFN}\gamma$ induzierten Expression des Moleküls iNOS (inducible Nitric Oxygen Synthetase – induzierbare Stickoxydsynthetase) abhängt.

In Th1-basierten Tiermodellen für Autoimmunerkrankungen führte die Deletion des $\text{IFN}\gamma$ - oder $\text{IFN}\gamma\text{R}$ -Gens zu widersprüchlichen Ergebnissen; während die experimentelle Induktion einer der Multiplen Sklerose ähnlichen Erkrankung in $\text{IFN}\gamma$ -defizienten Mäusen zu erhöhter Krankheitsaktivität gegenüber Wildtyptieren führte (Ferber et al., 1996) und Ähnliches im Kollagen-induzierten Arthritismodell beschrieben wurde (Manoury-Schwartz et al., 1997; Vermeire et al., 1997), war reziprok die Ausprägung von experimentell induzierter Myasthenia Gravis, Proteoglykan-induzierter Arthritis oder Typ-II-Diabetes stark von einer intakten $\text{IFN}\gamma$ -Antwort abhängig (Kaplan et al., 2002; Wang et al., 1997; Zhang et al., 1999). Diesen gegensätzlichen Effekten von $\text{IFN}\gamma$ liegen vermutlich einerseits Unterschiede in den experimentellen Systemen zugrunde. Andererseits spielen bei der Pathogenese einiger Erkrankungen nicht die induzierten oder transferierten Th1-Zellen selbst die Hauptrolle, sondern Th-Zell-abhängig produzierte Autoantikörper, durch die z.B. die Kollagen-induzierte Arthritis in gesunde Tiere übertragen werden kann (Stuart et al., 1982; Nandakumar et al., 2003).

So mag der Einfluss von $\text{IFN}\gamma$ auf die Ausprägung und Aufrechterhaltung der Entzündung vor dem Hintergrund der Arbeiten von Wu et al. und Feuerer et al. unterschiedlich ausfallen – je nachdem, welche Effektormechanismen zur

Pathogenese beitragen, ob die Krankheit durch Immunisierung oder Transfer *in vitro* generierter Th1-Zellen induziert wurde und in welcher Phase der Erkrankung die Entzündungsparameter erfasst wurden.

Für die in dieser Arbeit beschriebenen *ex vivo* isolierten synovialen IFN γ -Produzenten spielen die kontroversen Befunde zur Funktion des Th1-Zytokins vermutlich keine Rolle: Bei der RA ist die Steuerung der lokalen Immunantwort außer Kontrolle geraten; chronische Entzündung wird vermutlich lediglich durch ein Netzwerk von chronisch freigesetzten inflammatorischen Mediatoren in Abwesenheit relevanter Autoantigene aufrecht erhalten und unterscheidet sich dadurch grundlegend von den zitierten Tiermodellen. Auch die Tatsache, dass in zahlreichen Arbeiten eine Resistenz von synovialen Th Zellen gegenüber Apoptose beschrieben wurde (Ali et al., 2001; Schirmer et al., 1998), die auf Überlebenssignale von IL-15 im Gelenk zurückzuführen sein könnte, spricht gegen eine aktive Rolle von IFN γ bei der Begrenzung der Entzündung durch einen wie von Wu et al. und Feuerer et al. charakterisierten Mechanismus; die Präsenz einer Population von Th Zellen mit einem aktivierten Effektor-Phänotyp in den Gelenken von RA-Patienten deutet eher auf einen Defekt bei der Beseitigung solcher Zellen hin.

Zuletzt sprechen sowohl direkte wie indirekte Anhaltspunkte für eine pathogene Rolle IFN γ sezernierender Th1-Zellen bei der Erkrankung: *in vitro* - Daten belegen, dass IFN γ -Produktion eng mit der Synthese von weiteren potenziell destruktiven proinflammatorischen Mediatoren verknüpft ist; so führte die Blockade von IFN γ in synovialen Th Zellen zu verringerter Produktion von IL-6, IL-8 und IL-15 in ko-kultivierten synovialen Fibroblasten (Miranda-Carus et al., 2004); es bestehen ebenfalls Hinweise auf eine Induktion der TNF α -Synthese durch IFN γ in Monozyten (Gonzalez-Alvaro et al., 2006). Ferner ist eine Induktion von Reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffradikalen sowie Matrix-Metalloproteinasen in Makrophagen wahrscheinlich (Amin and Abramson, 1998; Hirai et al., 2001; Kim et al., 2005; Yang et al., 2002), von denen bekannt ist, dass sie zur Gelenkdestruktion beitragen (vgl. Abb. 4.2).

Nach *in vivo* - Administration von rekombinantem IFN γ zur Behandlung von chronischen Infektionen wie Hepatitis C entwickelt ein Teil der Patienten autoimmune Manifestationen, einschließlich chronischer Gelenkentzündungen (Ioannou and Isenberg, 2000).

Den wohl überzeugendsten Beleg für $\text{IFN}\gamma$ als eine treibende Kraft bei der Rheumatoiden Arthritis lieferte die Therapie mit neutralisierenden $\text{IFN}\gamma$ -Antikörpern: in einer „proof-of-concept“- , gefolgt von einer randomisierten, doppel-blind-Studie wurde eine ähnliche Reduktion der Krankheitsaktivität erzielt wie mit $\text{TNF}\alpha$ -Blockern, die Patienten in der Kontrollgruppe erhielten und derzeit die effektivste biologische Therapie darstellt; zu ähnlichen Resultaten führte die $\alpha\text{IFN}\gamma$ -Behandlung bei Patienten, die an der ebenfalls als Th1-assoziiert geltenden Autoimmunerkrankung Multiple Sklerose litten (Sigidin et al., 2001; Skurkovich and Skurkovich, 2006; Skurkovich et al., 2001).

Der in dieser Arbeit postulierte Mechanismus der Antigen-unabhängigen Induktion der $\text{IFN}\gamma$ -Synthese in synovialen Th Zellen durch lösliche Mediatoren innerhalb eines Zytokinnetzwerkes eröffnet neue therapeutische Optionen zur Behandlung der RA: in 3.4.3 wurde gezeigt, dass die $\text{IFN}\gamma$ -Synthese maßgeblich über die Aktivierung der p38-MAPKinase erfolgt; durch Blockierung dieses Signalweges mittels spezifischer Inhibitoren könnte die lokale Entzündung im Gelenk kontrolliert werden; da eine p38-Aktivierung weder für die Th1-Entwicklung (Berenson, et al., 2006), die TCR-induzierte $\text{IFN}\gamma$ -Synthese (3.4.3), noch für Proliferation (Geginat et al., 2001) essentiell ist, würde eine therapeutische Blockade von p38 Antigen-spezifische Antworten im Rahmen von Infektionen zulassen und so keine generelle Immunsuppression nach sich ziehen.

Eine erste Anwendung des p38-Inhibitors SB203580 in Arthritismodellen führte zu einer reduzierten Krankheitsaktivität (Badger et al., 1996); die Behandlung einer experimentell induzierten Arthritis der Ratte mit dem p38-Inhibitor SC-409 zog eine verringerte Kochendestruktion nach sich (Mbalaviele et al., 2006). Dass p38 von der Industrie zunehmend als potenzielles Zielmolekül zur Behandlung von Entzündung (Schieven, 2005) angesehen wird, spiegelt sich auch in der wachsenden Zahl an Publikationen über die Synthese von Inhibitor-Derivaten wider (Brown et al., 2004).