

III. Ergebnisteil

III.1. Separation von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Lymphozyten aus peripherem Blut

Durch Anwendung des vorher schon im Material- und Methodenteil beschriebenen MACS-Systems konnten $CD4^+$ bzw. $CD8^+$ T- Zellen aus PBMCs auf eine Reinheit von über 98% angereichert werden. Bei einigen Spendern wurden jedoch eine bedeutende Zahl an $CD4^+$ $CD8^+$ doppel-positiven Zellen beobachtet, deren Anteil teilweise bis zu 5% betrug.

Um eine Verfälschung der Ergebnisse durch diese $CD4^+$ $CD8^+$ Zellen zu verhindern wurden Multisort Beads benutzt, die nach der Separation abgelöst werden können. Dadurch konnte bei allen Proben eine Reinheit von mindestens 98% $CD4^+$ $CD8^-$ bzw. $CD8^+$ $CD4^-$ Zellen erreicht werden.

Abb. 3

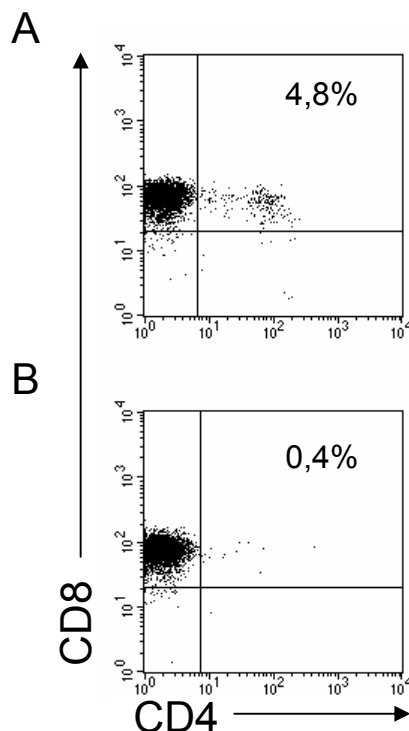


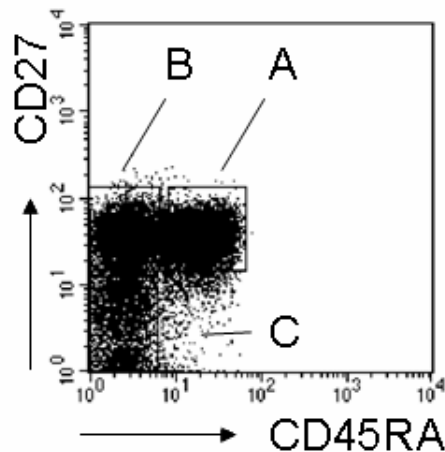
Abb. 3: Separation von $CD8^+$ T-Zellen aus peripherem Blut

Während nach einer positiven Separation von $CD8^+$ T-Zellen noch ein beträchtlicher Anteil von $CD4^+$ $CD8^+$ Zellen vorhanden ist (A), wurden diese in einem weiteren Schritt erfolgreich depletiert.

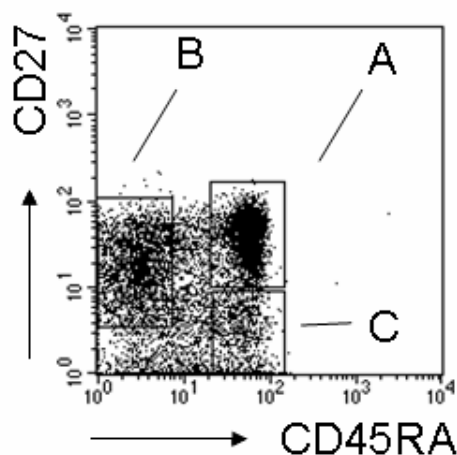
III.2. Frequenz von CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zell Subpopulationen im peripheren Blut

Wie in der Einleitung näher erläutert, können CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Lymphozyten anhand der Oberflächenexpression von CD27 und der CD45RA in funktionell unterschiedliche Subpopulationen eingeteilt werden. Es sollte untersucht werden, ob in dem prozentualen Anteil dieser Untergruppen an der Gesamtzahl der CD4⁺ bzw. CD8⁺ T- Zellen Unterschiede zwischen schon seit mehreren Jahren an Ankylosierender Spondylitis Erkrankten und gesunden Kontrollpersonen bestehen. Mittels Durchflusszytometrie wurde der Anteil der durch Oberflächenexpression von CD27 und CD45RA definierten Subpopulationen von CD4⁺ (Abb.4) und CD8⁺ (Abb.5) T-Lymphozyten im peripheren Blut ermittelt. Die Abbildungen zeigen jeweils repräsentative Färbungen und das Setzen von elektronischen Analysefenstern auf die einer T-Zell Subpopulation zugehörigen Zellen.

Die in Tab.2 und Tab.3 angegebenen Prozentzahlen bezeichnen die Frequenz der jeweiligen Subpopulation in der Gesamtheit der CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen im peripheren Blut. Die Differenz der Summe aller Subpopulationen zu 100% kommt dadurch zustande, dass Zellen, die durchflusszytometrisch nicht eindeutig einer Population zugeordnet werden konnten, nicht in die weitere Analyse mit einbezogen wurden. Da CD4⁺CD45RA⁺CD27⁻ und CD8⁺CD45RA⁻CD27⁻ T-Zellen sowohl in HLA B27-positiven als auch HLA B27-negativen Spendern häufig nicht in signifikanter Frequenz vorhanden waren, konnten sie nicht ausgewertet werden.

Abb. 4**Abb.4:** CD4⁺ T-Zell Subpopulationen im peripheren Blut

Dargestellt ist eine Färbung von CD45RA und CD27 auf peripheren CD4⁺ T-Zellen eines repräsentativen Spenders. Vergleichbare elektronischen Analysefenster (=Gates) wurden in allen Spendern gesetzt. Die Gates bezeichnen in (A) naive CD45RA⁺CD27⁺, (B) Gedächtnis CD45RA⁻CD27⁺ und (C) differenzierte Gedächtnis CD45RA⁻CD27⁻CD4⁺ T-Zellen.

Abb. 5**Abb. 5:** CD8⁺ T-Zell Subpopulationen im peripheren Blut

Dargestellt ist eine Färbung von CD45RA und CD27 auf peripheren CD8⁺ T-Zellen eines repräsentativen Spenders. Vergleichbare elektronischen Analysefenster (=Gates) wurden in allen Spendern gesetzt. Die Gates bezeichnen in (A) naive CD45RA⁺CD27⁺, (B) Gedächtnis CD45RA⁻CD27⁺ und (C) Effektor CD45RA⁺CD27⁻ CD8⁺ T-Zellen.

Tab. 2

Spender	Naive	Gedächtnis	diff. Gedächtnis
HLA B27^{neg}	39,56 %	36,19 %	8,76 %
Gesunde	(22,51 ⇔ 63,21)	(20,88 ⇔ 50,97)	(4,41 ⇔ 19,6)
HLA B27^{pos}	35,68 %	43,15 %	8,61 %
Gesunde	(18,28 ⇔ 59,35)	(28,71 ⇔ 47,38)	(2,72 ⇔ 17,72)
HLA B27^{pos}	46,17 %	29,89 %	6,99 %
AS Patienten	(21,1 ⇔ 62,6)	(23,7 ⇔ 58,65)	(2,34 ⇔ 17,42)

Tab. 2: Frequenz verschiedener CD4⁺ T-Zell Subpopulationen im peripheren Blut, dargestellt ist der Median, in Klammern Spannweite.

Tab. 3

Spender	Naive	Gedächtnis	Effektor
HLA B27^{neg}	36,76 %	21,29 %	4,83 %
Gesunde	(14,17 ⇔ 81,79)	(6,62 ⇔ 30,09)	(1,1 ⇔ 13,04)
HLA B27^{pos}	47,12 %	23,20 %	1,94 %
Gesunde	(16,69 ⇔ 73,31)	(13,17 ⇔ 23,85)	(1,17 ⇔ 8,75)
HLA B27^{pos}	48,07 %	13,06 %	3,34 %
AS Patienten	(27,69 ⇔ 80,85)	(6,5 ⇔ 29,59)	(0,94 ⇔ 20,35)

Tab. 3: Frequenz verschiedener CD8⁺ T Zell-Subpopulationen im peripheren Blut, dargestellt ist der Median, in Klammern Spannweite.

Zusammengefasst wurde die prozentuale Verteilung der durch CD27 und CD45RA definierten Subpopulationen sowohl bei CD4⁺ als auch bei CD8⁺ T-Zellen untersucht. Die Analyse ergab folgendes:

Während unter CD4⁺ T-Zellen sowohl naive, als auch Gedächtnis T-Zellen relativ häufig sind, beträgt die Frequenz der differenzierten Gedächtnis CD4⁺ T-Zellen im peripheren Blut meist unter 10%.

In CD8⁺ T-Zellen ist meist die grösste Subpopulation die der naiven CD8⁺ T-Zellen, während der Prozentsatz der Effektor CD8⁺ T-Zellen nur um die 5% beträgt. Dabei gilt jedoch sowohl für CD4⁺, als auch für CD8⁺ T-Zellen, dass sehr grosse interindividuelle Unterschiede zu sehen sind.

Jedoch erbrachte der Vergleich zwischen HLA B27-negativen gesunden Kontrollpersonen, HLA B27-positiven gesunden und an ankylosierender Spondylitis erkrankten Spendern keine statistisch signifikanten Unterschiede. Dies trifft sowohl auf die Verteilung der CD4⁺, als auch der CD8⁺ T-Zell Subpopulationen im peripheren Blut zu.

III.3. Identifizierung von T-Zell Subpopulationen mit verminderter Zytokinproduktion in HLA B27-positiven Personen

In der Arbeit von Rudwaleit et al (25) konnte gezeigt werden, dass sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ Zellen in HLA B27-positiven Personen eine verminderte Zytokinproduktion aufweisen. Es konnte jedoch mit der dabei verwendeten Methode keine Aussage darüber getroffen werden, ob die Gesamtheit der CD4⁺ bzw. CD8⁺ T Zellen oder ausschließlich eine oder mehrere Subpopulationen betroffen sind. Kenntnis darüber könnte jedoch wichtige Hinweise darauf liefern, wo die Ursache dieses Phänomens liegt. Ausserdem wäre es dadurch möglich, die Relevanz dieses Defekts im Rahmen von physiologischen und pathologischen Immunreaktionen einzuschätzen.

Durch die hier etablierte verbesserte Methode war es nun erstmals möglich in den durch CD45RA und CD27 definierten CD4 bzw. CD8 Subpopulationen die Expression der Zytokine TNF α , IFN γ , IL-4 und IL-10 auf der Einzellzebene zu erfassen. Somit war ein genauerer Vergleich zwischen HLA B27-negativen und -positiven gesunden und an AS erkrankten Spendern möglich und die Identifizierung der für die geringere Produktion in HLA B27-positiven Spendern verantwortlichen Zellsubpopulationen.

Da in Übereinstimmung mit Rudwaleit et al in dieser Studie kein Unterschied zwischen HLA B27-positiven gesunden und an AS erkrankten Spendern bestand, wurde die Gesamtheit der HLA B27-positiven Spender, gesunde und an AS erkrankte, mit HLA B27-negativen gesunden Spendern verglichen.

Die Analyse der Zytokinproduktion in verschiedenen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell Subpopulationen erbrachte folgende Ergebnisse:

CD27⁺ CD45RA⁻ Gedächtnis T-Zellen von HLA B27-positiven Spendern zeigten einen signifikant geringeren Prozentsatz an TNF α (Median 71,4%) and IFN γ Produzenten (Median 69,7%) als HLA B27-negative Kontrollspender (TNF α 85,1%; $p \leq 0.027$; IFN γ 82,7%, $p \leq 0.026$, Abb. 6).

Abb. 6

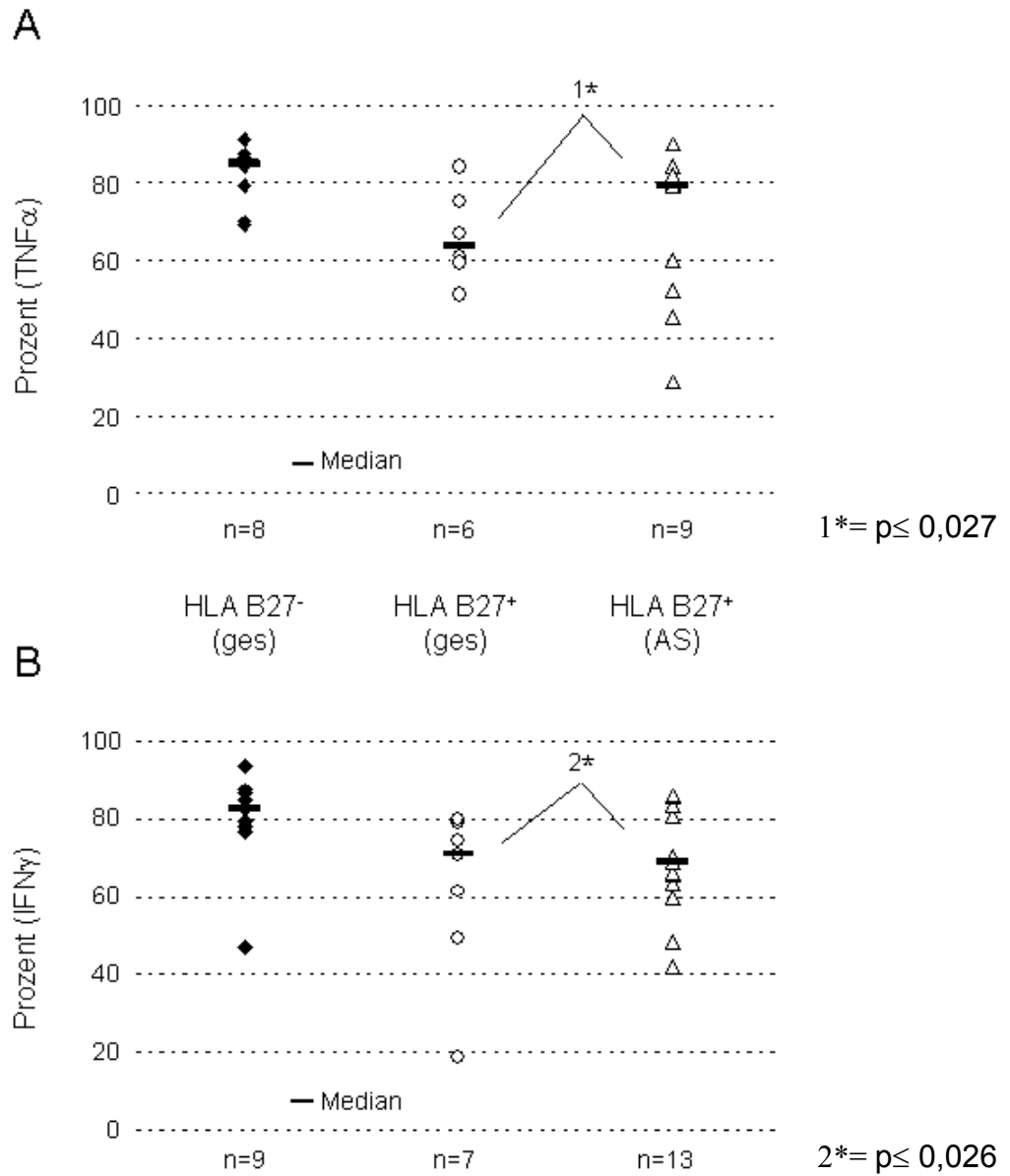


Abb. 6: TNF α und IFN γ Expression in Gedächtnis CD8⁺ T-Zellen

Nach 6h PMA/Ionomycin Stimulation zeigten CD45RA⁻CD27⁺ Gedächtnis CD8⁺ T-Zellen von HLA B27-positiven Personen eine signifikant geringere Expression der Zytokine TNF α ($p \leq 0,027$) und IFN γ ($p \leq 0,026$) als HLA-B27-negative Kontrollen.

Zusätzlich war eine signifikant verminderte Expression von $\text{TNF}\alpha$ auch in $\text{CD27}^- \text{CD45RA}^+$ Effektor CD8^+ T-Zellen nachweisbar: in HLA B27-positiven Personen produzierten nur 43,2%, verglichen mit 75,6% in HLA B27-negativen Spendern ($p \leq 0,045$), nach polyklonaler *in vitro* Stimulation $\text{TNF}\alpha$. Während jedoch auch für $\text{IFN}\gamma$ mit 66,3% in HLA B27-positiven verglichen mit 84,4% in HLA B27-negativen Personen eine eindeutig geringere Frequenz beobachtet wurde (Abb. 7), war dieser Unterschied statistisch knapp nicht signifikant ($p \leq 0,062$). Interessanterweise wurden bei naiven $\text{CD8}^+ \text{CD27}^+ \text{CD45RA}^+$ T-Zellen keinerlei signifikante Unterschiede hinsichtlich $\text{TNF}\alpha$ oder $\text{IFN}\gamma$ Expression gefunden ($\text{TNF}\alpha$ 7,4% vs. 6,3% $p \leq 0,6$; $\text{IFN}\gamma$ 6,5% vs. 3,1% $p \leq 0,1$).

Bei dem Vergleich der Zytokinproduktion in den verschiedenen CD4^+ T-Zell Subpopulationen wurden für alle untersuchten Zytokine keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen HLA B27-positiven und -negativen Spendern beobachtet.

Schlussfolgerung: Gedächtnis und Effektor CD8^+ T-Zellen wurden als diejenigen Zellpopulationen identifiziert, die für die geringere Expression der Zytokine $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IFN}\gamma$ in HLA B27-positiven Personen verantwortlich sind (s. Bsp. Abb.8).

Abb. 7

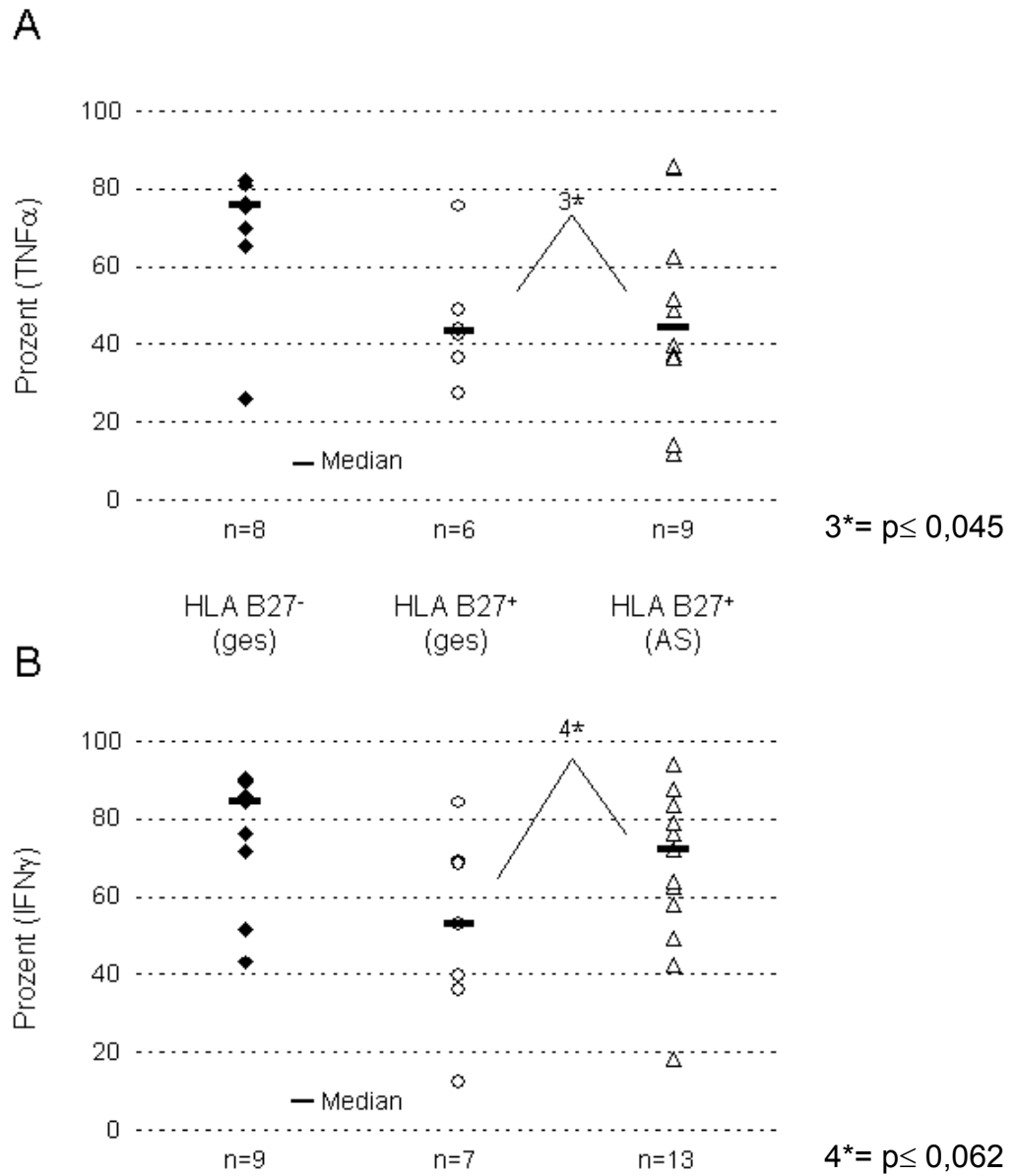


Abb. 7: TNF α und IFN γ Expression in Effektor CD8⁺ T-Zellen

Nach 6h PMA/Ionomycin Stimulation zeigten CD45RA⁺CD27⁻ Effektor CD8⁺ T-Zellen von HLA B27-positiven Personen eine signifikant geringere Expression der Zytokine TNF α ($p \leq 0,045$) und eine verminderte Frequenz an IFN γ Produzenten ($p \leq 0,062$) als HLA B27-negative Kontrollen.

Abb. 8

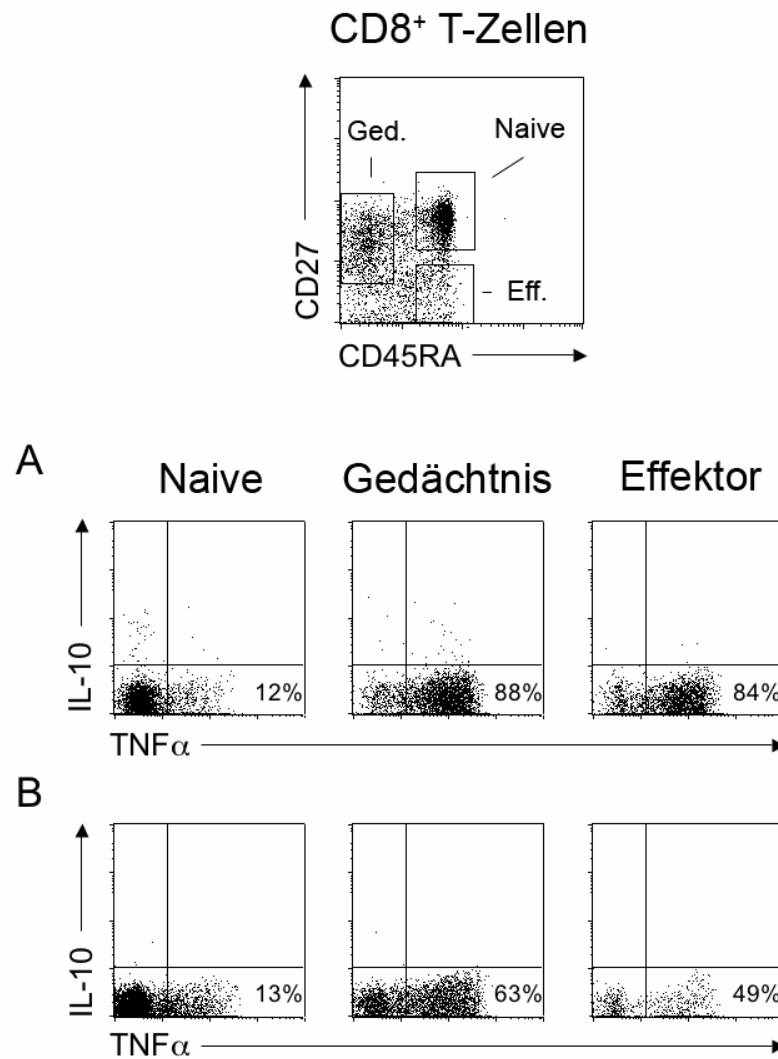


Abb. 8: TNF α Expression in CD8⁺ T-Zell Subpopulationen in einem HLA B27-negativen(A) und HLA B27-positiven(B) Spender

Dargestellt sind Beispiele für die Analyse der TNF α Expression in den verschiedenen CD8⁺ T-Zell Subpopulationen.

III.4. *In vivo* TH1/TH2 Differenzierung der Gedächtnis CD4⁺ T-Zell Subpopulationen

Wie in der Einleitung beschrieben, basiert eine vereinfachte Einteilung von CD4⁺ T-Zellen in TH1, bzw. TH2 Zellen vor allem auf der Expression von IFN γ bei Nicht-expression von IL-4, bzw. umgekehrt. Da der Verlust von CD27 eine besondere CD4⁺ Gedächtniszellpopulation charakterisiert, die einerseits laut Literatur mehrfach stimuliert wurde, andererseits aber wohl auch eine gesteigerte Produktion von IL-4 aufweist (siehe Einleitung), sollten darauf aufbauend folgende Fragestellungen untersucht werden:

- führt die mehrfache *in vivo* Stimulation der infolgedessen CD27-negativen differenzierten Gedächtnis Th Zellen zu einem stärkeren TH1, bzw. TH2 Zytokinexpressionsmuster ?
- bedingt die generell geringere Expression von proinflammatorischen Zytokinen in HLA B27-positiven Personen eine schwächere TH1, bzw. stärkere TH2 Differenzierung ?

Als Mass für die TH1 bzw. TH2 Differenzierung in den verschiedenen Gedächtnis CD4⁺ T-Zell Subpopulationen wurde hier die Korrelation von IFN γ und IL-4 gewählt. Dabei wird der Korrelationskoeffizient Phi(ϕ) berechnet aus dem Vergleich des bei zufälliger Koexpression von IFN γ und IL-4 zu erwartendem Prozentsatz an Zellen, die gleichzeitig beide Zytokine exprimieren, mit der Frequenz an Doppelproduzenten, die man tatsächlich beobachtet hat.

Eine positive Korrelation bedeutet, dass z.B. IL-4- produzierende Zellen mit größerer Wahrscheinlichkeit in der Gruppe der IFN γ exprimierenden Zellen zu finden sind als in der Gruppe der nicht IFN γ Produzenten und umgekehrt.

Eine negative Korrelation zeigt sich dadurch, dass eine Zelle, die eines der beiden Zytokine exprimiert mit grösserer Wahrscheinlichkeit das andere Zytokine nicht produziert. Dabei kann ϕ Werte zwischen -1 , bei negativer, und $+1$ bei positiver Korrelation annehmen.

Zum Beispiel würde man In Abb.9 in CD27⁺ Gedächtnis CD4⁺ T-Zellen bei insgesamt

$$5,25\% (IL-4^+ IFN\gamma^-) + 1,32\% (IL-4^+ IFN\gamma^+) = \text{insgesamt } 6,57\% \text{ IL-4 und} \\ 19,3\% (IFN\gamma^+ IL-4^-) + 1,32\% (IL-4^+ IFN\gamma^+) = \text{insgesamt } 20,64\% \text{ IFN}\gamma \text{ Produzenten}$$

erwarten, dass bei zufälliger Ko-Expression von IFN γ und IL-4

$$(6,57 \times 20,64) / 100 = 1,35\%$$

aller Zellen beide Zytokine exprimieren, ein Wert der sich von den tatsächlich beobachteten 1,32% Doppelproduzenten nur marginal unterscheidet.

In CD27⁻ differenzierten Gedächtniszellen hingegen mit

$$4,66\% (IL-4^+ IFN\gamma^-) + 2,63\% (IL-4^+ IFN\gamma^+) = \text{insgesamt } 7,29\% \text{ IL-4 und} \\ 2,63\% (IFN\gamma^+ IL-4^-) + 71\% (IL-4^+ IFN\gamma^+) = \text{insgesamt } 73,63\% \text{ IFN}\gamma \text{ Produzenten}$$

würde man hingegen rein statistisch

$$(7,29 \times 73,63) / 100 = 5,37\%$$

Doppelproduzenten erwarten. Dies steht im Gegensatz zu den in Realität beobachteten 2,63%. Daraus lässt sich dann ein Korrelationskoeffizient Phi(ϕ) von -0,24 errechnen, der einen negativen Zusammenhang zwischen IFN γ und IL-4 Expression anzeigt.

Abb. 9

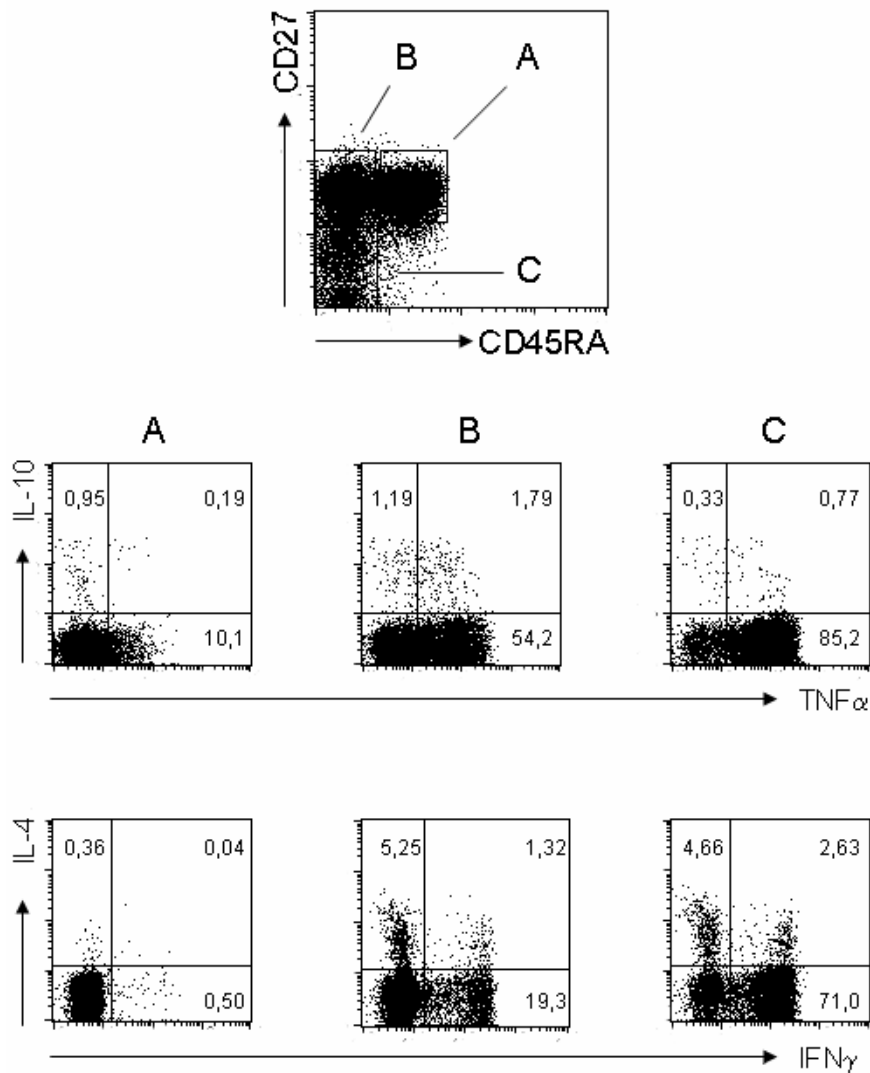
CD4⁺ Th-Zellen

Abb. 9: Zytokinsekretionsanalyse in verschiedenen CD4⁺ T-Zell Subpopulationen
 Dargestellt ist ein Beispiel für die Analyse der IL-10/TNF α (obere Reihe) bzw. IL-4/IFN γ (untere Reihe) Expression in (A) CD45RA⁺CD27⁺ naiven, (B) CD45RA⁻CD27⁺ Gedächtnis und (C) CD45RA⁻CD27⁻ differenzierten Gedächtnis CD4⁺ T-Zellen.

Ein Vergleich des Korrelationskoeffizienten ϕ in Gedächtnis und differenzierten Gedächtnis CD4⁺ T-Zellen erbrachte folgende Ergebnisse:

In CD27⁺ Gedächtnis Zellen war mit einem Korrelationskoeffizient ϕ von $-0,01$ (bzw. $-0,01/0,00$ bei HLA B27-positiven Gesunden und AS Patienten) eine zufällige Koexpression von IFN γ und IL-4 nachweisbar.

In CD4⁺ CD45RA⁻CD27⁻ mehrfach in vivo stimulierten differenzierten Gedächtnis Zellen jedoch war im Gegensatz dazu eine negative Korrelation von IFN γ und IL-4 Produktion zu sehen. Die ϕ Werte waren bei allen 3 Spendergruppen mit $-0,18$ (bzw. $-0,1; -0,15$) signifikant geringer als in der jeweiligen CD27⁺ Population (jeweils $p \leq 0,001$, Abb.10).

In dem weiteren Vergleich zwischen den jeweiligen Gedächtnis CD4⁺ T- Zell Subpopulationen zwischen HLA B27-negativen und HLA B27-positiven gesunden Personen untereinander oder mit an Ankylosierender Spondylitis erkrankten HLA B27-positiven Patienten waren aber keine statistisch signifikanten Unterschiede feststellbar (Tab.4).

Abb. 10:

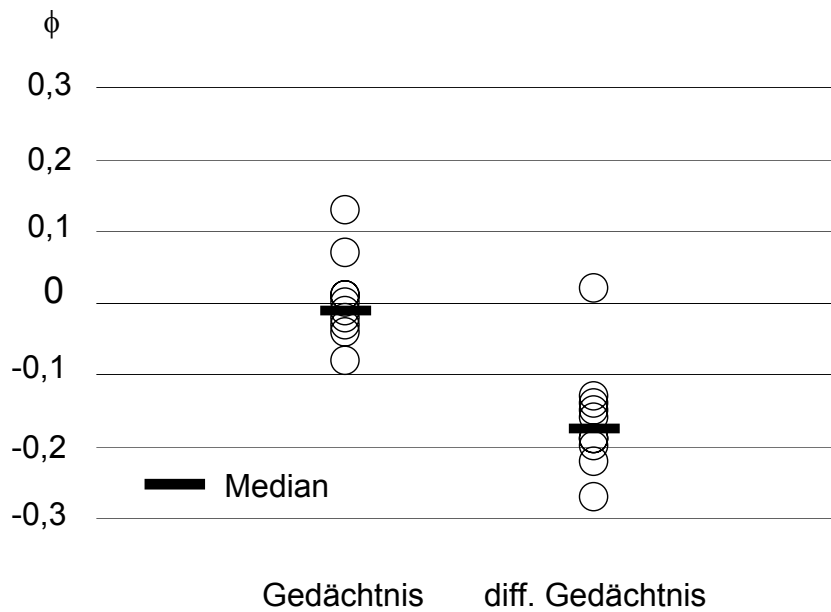


Abb. 10: Korrelationskoeffizient ϕ in $CD27^+$ Gedächtnis und $CD27^-$ differenzierten Gedächtnis $CD4^+$ T-Zellen in gesunden Spendern (n=10).

Tab. 4

Spender	$CD45RA^-CD27^+$	$CD45RA^+CD27^-$
HLA B27 ^{neg}	-0,01	-0,18
Gesunde	(-0,08 \Leftrightarrow -0,13)	(-0,27 \Leftrightarrow 0,02)
HLA B27 ^{pos}	-0,01	-0,10
Gesunde	(-0,02 \Leftrightarrow 0,03)	(-0,22 \Leftrightarrow -0,06)
HLA B27 ^{pos}	-0,01	-0,15
AS Patienten	(-0,07 \Leftrightarrow 0,03)	(-0,46 \Leftrightarrow -0,03)

Median, in Klammern Spannweite

Tab.4: $IFN\gamma$ und IL-4 Korrelationskoeffizient ϕ in Gedächtnis Th Zellsubpopulationen in peripherem Blut.

III.5. Charakterisierung der Zytokinproduktion in Gedächtnis CD4⁺ T-Zell Subpopulationen

Die oben beschriebene verstärkte TH1 bzw. TH2 Differenzierung von CD27⁻ differenzierten Gedächtnis CD4⁺ T Zellen könnte durch eine gleichbleibende Frequenz an IFN γ bzw. IL-4 Zytokinproduzenten bei weniger Doppelproduzenten zustande kommen. Andererseits würde aber auch ein gleichbleibender Prozentsatz an IFN γ /IL-4 Doppelproduzenten bei insgesamt gesteigerter Frequenz an Zytokinproduzenten in einer negativen Korrelation resultieren.

Um dies genauer zu untersuchen wurde zwischen CD27⁺ und CD27⁻ Gedächtnis CD4⁺ T Zellen der Prozentsatz an Zellen verglichen, die IFN γ , IL-4, TNF α oder IL-10 exprimieren (Abb.11).

Wie bereits in Kap. III.3. beschrieben, unterschieden sich HLA B27-negative und HLA B27-positive Spender nicht signifikant in der Frequenz an IFN γ , TNF α , IL-4 bzw. IL-10 Produzenten.

Zusammen mit der stärkeren TH1 bzw. TH2 Differenzierung (s.a. III.4.) konnte jedoch auch eine signifikant gesteigerte Zytokinexpression in CD27⁻ differenzierten Gedächtnis CD4⁺ T-Zellen festgestellt werden: So exprimierten z.B. in HLA B27-negativen gesunden Spendern 22,3% aller Gedächtnis CD4⁺ T-Zellen das Zytokin IFN γ nach 6stündiger PMA/Ionomycin Stimulation. Im Unterschied dazu waren es mit 40,9% ein signifikant gesteigerter Prozentsatz in CD27⁻ differenzierten Gedächtnis CD4⁺ T- Zellen ($p \leq 0,001$). Ähnlich war es bei TNF α (46,3% vs. 73%; $p \leq 0,001$) und IL-4 (3,2% vs. 8,6%; $p \leq 0,002$). Im Falle von IL-10 war zwar eine höhere Expression feststellbar, dieser Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant (3,2% vs. 4,7%; $p \leq 0,44$). Auch bei Betrachtung der Frequenz an TNF α /IL-10 bzw. IFN γ /IL-4 Doppelproduzenten in den jeweiligen Gedächtnis CD4⁺ T Zell Subpopulationen war ein Anstieg in CD27⁻ differenzierten CD4⁺ T- Zellen erkennbar, der jedoch ebenfalls nicht das Signifikanzniveau erreichte (TNF α /IL10: 1,5% vs. 2,6%; $p \leq 0,16$), wenn auch im Falle von IFN γ /IL-4 nur knapp (0,7% vs. 1,7%; $p \leq 0,06$).

Abb. 11

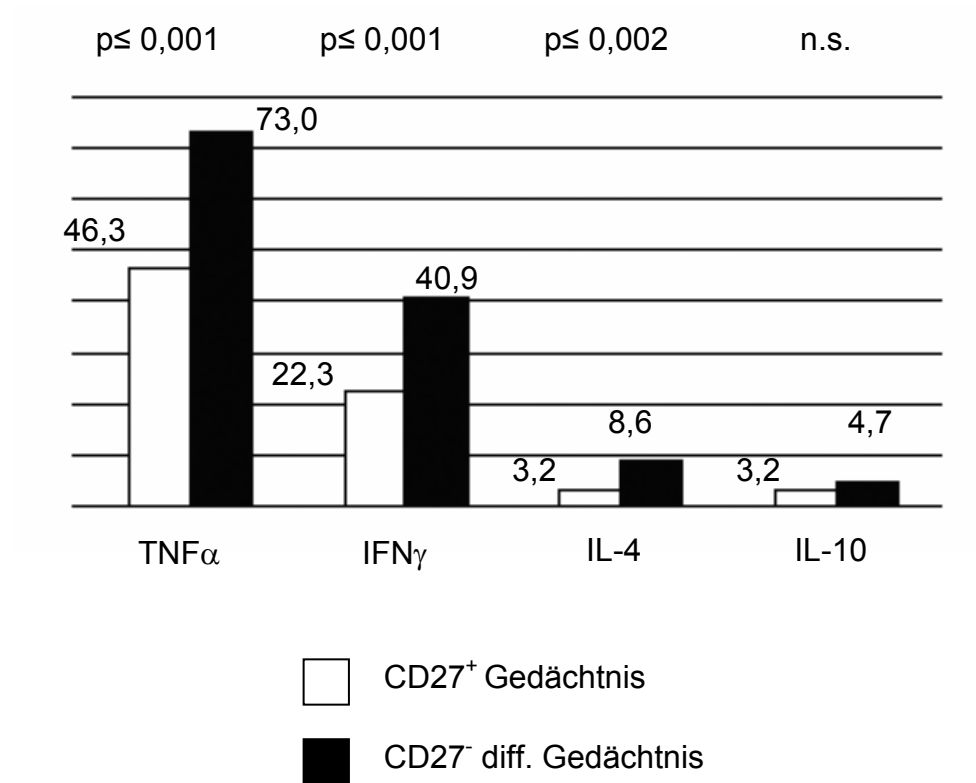


Abb.11: Zytokinsekretion in Gedächtnis CD4⁺ T Zell Subpopulationen in gesunden Spendern.

Nach 6h PMA/Ionomycin Stimulation exprimierte der dargestellte Prozentsatz an Gedächtnis, bzw. differenzierten Gedächtnis CD4⁺ T-Zellen die Zytokine IFN γ , TNF α , IL-4 und IL-10.