

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie und
Klinische Immunologie der Medizinischen Fakultät der
Charité–Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Untersuchungen zu Wirkungen von TNF- α und des TNF- α
Blockers Infliximab auf Immunzellen**

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité–Universitätsmedizin Berlin

von

Reimara Haag
aus Beeskow

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. F. Buttgereit
 2. Prof. Dr. med. B. Manger
 3. Prof. Dr. med. R. Straub

Datum der Promotion: 14. 01. 2008

KURZDARSTELLUNG

Hintergrund: Das Zytokin TNF- α spielt eine wichtige Rolle sowohl in physiologischen, als auch in pathologischen Entzündungsreaktionen.

CD4 positive T-Lymphozyten (T-Helferzellen, Th-Zellen) repräsentieren eine Hauptgruppe der Zellen, die an der Immunantwort und an Autoimmunerkrankungen wie der Rheumatoiden Arthritis (RA) und Morbus Crohn (M. Crohn) beteiligt sind. Die anti TNF- α Behandlung mit Biologika wie Infliximab (Ifx), einem monoklonalen chimären Antikörper, reduzieren die Krankheitsaktivität bei Patienten mit RA, M. Crohn und anderen Autoimmunerkrankungen. Infliximab blockiert nicht nur lösliches TNF- α (sTNF- α), sondern bindet auch an das auf der Zellwand exprimierte membranständige TNF- α (mTNF- α).

In der vorliegenden Arbeit wurden die in vitro Effekte von Infliximab auf isolierte Th-Zellen untersucht. Die untersuchten Outcomeparameter waren der zelluläre Sauerstoffverbrauch, die Zytokinexpression, die Apoptoseinduktion und die Proliferation der Th-Zellen. Um mTNF- α vermittelte Effekte von Infliximab auf Th-Zellen zu untersuchen, wurde zuerst die Expression von mTNF- α auf stimulierten und unstimulierten Zellen angesehen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden Genexpressionssignaturen von ex vivo isolierten und in vitro mit TNF- α behandelten humanen Zellen verglichen mit Genexpressionsmustern von ex vivo isolierten Zellen von Patienten mit rheumatischen Erkrankungen.

Methoden: Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) wurden von gesunden Blutspendern gewonnen. MACS (Magnetic Cell Separation) isolierte CD4 positive T-Lymphozyten wurden mit oder ohne Infliximab inkubiert. Die Reinheit der Zellpopulation und ihre Viabilität wurden mittels Durchflusszytometrie überprüft.

Die mTNF- α -Expression wurde durch Färbung mit fluoreszenzgekoppeltem Infliximab untersucht. Für den zellulären Sauerstoffverbrauch, der amperometrisch mittels Clark Elektrode gemessen wurde, waren die Zellen entweder PMA/Ionomycin stimuliert oder unstimuliert. Die intrazelluläre Zytokinexpression von IL-2 und IFN- γ wurde mittels Durchflusszytometrie in

PMA/Ionomycin stimulierten und unstimulierten Zellen gemessen. Die Apoptose wurde nach Annexin-V/PJ Färbung durchflusszytometrisch in CD3/CD28 stimulierten und unstimulierten Zellen gemessen. Die Proliferation von CD3/CD28 stimulierten Th-Zellen wurde vier Tage nach initialer CFDA-SE Färbung (Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester) durchflusszytometrisch gemessen.

Aus Literaturdaten wurden durch TNF- α in humanen Zellen differentiell exprimierte Gene identifiziert. Diese Gene wurden mit Genen verglichen, die in einer anderen Untersuchung beschrieben wurden. Sie werden in Monozyten von Patienten mit einer rheumatischen Erkrankung differentiell exprimiert. Die untersuchten rheumatischen Erkrankungen waren Rheumatoide Arthritis (RA), Systemischer Lupus erythematodes (SLE), Osteoarthritis (OA) und Ankylosierende Spondylitis (AS).

Ergebnisse: mTNF- α wurde auf CD3/CD28 stimulierten, aber nicht auf unstimulierten Th-Zellen exprimiert. Obwohl mTNF- α 72 h nach der Stimulation auf 12% der Zellen gemessen wurde, konnte kein Effekt von Infliximab auf CD4 positive T-Zellen gefunden werden. Keiner der untersuchten Outcomeparameter veränderte sich, in stimulierten oder unstimulierten Zellen. Weder Veränderungen des Sauerstoffverbrauches, der intrazellulären Zytokinkonzentrationen (IL-2, IFN- γ), der Anzahl der apoptotischen Zellen, noch der Proliferationseigenschaften konnten beobachtet werden.

Bei den durch TNF- α regulierten Genen aus den Literaturdaten und den durch rheumatische Krankheiten differentiell exprimierten Genen finden sich zahlreiche Übereinstimmungen. Von den übereinstimmenden Genen wurden die 22 Gene ausgewählt, die in mehr als einem Artikel erwähnt waren. Unter diesen 22 übereinstimmenden Genen fanden sich viele, deren Proteine bei wichtigen Signalübertragungsprozessen eine Rolle spielen, wie NF κ B, STAT 1 und NF κ BIA.

Schlussfolgerung: Obwohl stimulierte Th-Zellen mTNF- α exprimieren und Infliximab an das membranständige TNF- α bindet, finden sich in vitro keine Effekte von Infliximab auf CD4 positive T-Zellen.

Die aktuelle Literatur und die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass ein wesentlicher Infliximab Effekt in der Normalisierung von krankheitsbedingten

Veränderungen in den Immunzellen von Patienten besteht. So normalisieren sich durch Autoimmunerkrankungen veränderte Zelleigenschaften nach Gabe von Ix, wie zum Beispiel in der Literatur beschriebene veränderte Apoptoseeigenschaften. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass normale periphere Th-Zellen gesunder Blutspender ihre Apoptoseeigenschaften nach in vitro Inkubation mit Ix nicht verändern.

TNF- α Wirkungen werden in Gensignaturen von Monozyten von Patienten mit entzündlichen Erkrankungen erkennbar. Bei dem Vergleich der Genexpressionssignaturen von TNF- α und inflammatorischen Erkrankungen zeigen sich zahlreiche übereinstimmende Gene.

Es konnte gezeigt werden, dass TNF- α eine systemische Signatur im peripheren Blut hinterlässt, obwohl sich die Entzündungen bei Autoimmunerkrankungen wie RA zumeist lokalisiert in den Gelenken ausprägen. Diese Signatur zeigt entzündungsrelevante Genexpressionsmuster.

ABSTRACT

Background: The cytokine TNF- α plays an important role in the physiological and pathological inflammatory reaction. CD4 positive T-lymphocytes represent a major fraction of the cell population involved in the immune response and in the pathophysiology of diseases like Rheumatoid Arthritis (RA) and M. Crohn. Anti-tumor-necrosis-factor- α treatment with biologicals such as Infliximab (Ifx), a chimeric monoclonal antibody, has been shown to reduce disease activity in RA, M. Crohn and other autoimmune diseases. Infliximab does not only block soluble TNF- α (sTNF- α) but also binds to the membrane-bound precursor form of TNF- α , called membrane TNF- α (mTNF- α).

Objectives: In this study, we have investigated the in vitro effects of Infliximab on highly purified human CD4 positive T-cells (Th-cells). The examined outcome parameters were cellular oxygen consumption, cytokine expression and the induction of apoptosis and proliferation of Th-cells. To find out whether effects of Ifx on Th-cells are due to interaction with mTNF- α , we studied the mTNF- α expression of stimulated and unstimulated Th-cells.

In the second part we compared gene expression patterns in human cells. We matched differential gene expression patterns of both human cells isolated ex vivo and stimulated with TNF-alpha in vitro with monocytes isolated ex vivo from patients with rheumatic disorders.

Methods: Mononuclear cells of the peripheral blood were obtained from healthy donors. MACS (Magnetic cell separation) isolated CD4 positive T-lymphocytes were incubated with or without Infliximab. Viability and pureness of the cells was determined by flow cytometry analysis.

The expression of mTNF- α was quantified by staining with Infliximab coupled to fluorescent dye and flow cytometry analysis. For the cellular oxygen consumption, determined amperometrically with a Clark type electrode, the cells were either stimulated by PMA/Ionomycin or unstimulated. Intracellular cytokine expression levels (IL-2, IFN- γ) of Th-cells stimulated by PMA/Ionomycin and unstimulated were measured by flow cytometry. Apoptosis rate was determined by flow cytometry after Annexin-V/PI staining of CD3/CD28 stimulated and unstimulated cells. Proliferation of CD3/CD28 stimulated Th-cells was

measured 4 days after an initial CFDA–SE (Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester) staining by flow cytometry.

A list was compiled of genes published as being differentially expressed after TNF– α stimulation of human cells. These gene expression patterns were matched with disease regulated genes in monocytes from another survey. The rheumatic diseases investigated in this survey were Rheumatoid Arthritis (RA), Systemic Lupus erythematoses (SLE), Osteoarthritis (OA) and Ankylosing Spondylitis (AS) .

Results: mTNF– α was expressed on CD3/CD28 stimulated CD4 positive T–cells, but mTNF– α expression was not found in unstimulated Th–cells.

Although mTNF– α was expressed on up to 12% of cells at 72 h after stimulation, we could not find any significant effect of Infliximab on Th–cells. None of the assayed outcome parameters changed in stimulated or unstimulated Th–cells. Neither changes in oxygen consumption, intracellular cytokine levels of IFN– γ and IL–2, number of apoptotic cells, nor the proliferation properties could be observed.

There were numerous concurrent TNF– α and disease regulated genes. Out of the concurrent genes we selected 22 genes, that were cited in more than one article. Many of these 22 genes play important roles in signaling processes like NF κ B, STAT 1 and NF κ BIA.

Conclusions: Although stimulated Th–cells express mTNF– α and Infliximab binds to mTNF– α there is no in vitro effect of lfx on Th–cells concerning the cytokine expression, apoptosis, proliferation and oxygen consumption. The current literature and the results of this thesis indicate that an essential mechanism of lfx action is to normalize disease induced changes in immune cells of patients in vivo. It is described by various authors that changes caused by inflammatory diseases, for example altered apoptosis properties were normalized after treatment with lfx. In this study it could be shown that normal peripheral Th–cells of healthy donors do not change their apoptosis properties after in vitro incubation with lfx.

TNF– α regulated gene expression patterns are similar to those seen in patients with inflammatory disorders. Comparing the gene expression patterns of TNF– α and inflammatory diseases, there are numerous concurrent genes.

It could be shown that TNF- α leaves a systemic signature in the peripheral blood as if the inflammation in autoimmune disorders like RA is mostly developed locally in the involved joints. This TNF- α signature resembles inflammation relevant gene expression patterns.

SCHLAGWÖRTER

Infliximab

humane CD4 positive T-Zellen

mTNF- α

TNF- α differentiell exprimierte Gene

Genexpressionsmuster

KEYWORDS

Infliximab

human CD4 positiv T-cells

mTNF- α

TNF- α differentially expressed Genes

Gene expression patterns

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	12
1.1	TNF- α	14
1.2	TNF-α: Schlüsselzytokin physiologischer und pathologischer Immunantwort	16
1.2.1	Lokale TNF- α Wirkungen	16
1.2.2	Systemische TNF- α Wirkungen	16
1.2.3	Weitere TNF- α Funktionen in der Immunabwehr	17
1.2.4	TNF- α in der chronischen Entzündung	17
1.3	Behandlung autoimmuner und entzündlicher Erkrankungen	18
1.3.1	Infliximab	19
1.4	Infliximab und mTNF-α	22
1.5	TNF-α Signaturen	23
1.6	Fragestellung der Arbeit	24
2	MATERIAL UND METHODEN	26
2.1	Puffer und Medien	26
2.2	Filterpräparation	26
2.3	Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation	27
2.4	CD4-Zellsortierung	27
2.5	Zellzählung	29
2.6	Zellaktivierung	29
2.6.1	Zellaktivierung durch anti CD3/CD28 Antikörper	29
2.6.2	Zellaktivierung durch PMA/Ionomycin	30
2.7	Infliximab	30
2.8	Durchflusszytometrie	31
2.9	mTNF-α Messung	32
2.10	Zytokinmessung	34
2.11	Proliferation	35
2.12	Apoptose	35
2.13	Sauerstoffverbrauchsmessung	36
2.14	Procedere für den Vergleich TNF-α-und krankheitsregulierter Gene	38
2.14.1	Differentiell exprimierte Gene durch TNF- α	38
2.14.2	Differentiell durch entzündliche Erkrankungen exprimierte Gene	38

2.15	Statistik	39
3	ERGEBNISSE	40
3.1	mTNF-α	40
3.2	Wirkungen von Infliximab auf CD4 positive T-Zellen	42
3.2.1	Sauerstoffverbrauch	42
3.2.2	Zytokinsynthese	44
3.2.3	Proliferation	47
3.2.4	Apoptose	49
3.3	Vergleich von TNF-α-und krankheitsregulierten Genen	51
3.3.1	TNF- α differentiell exprimierte Gene in der Literatur	51
3.3.2	Ausgewählte übereinstimmende Gene	52
3.3.3	Verteilung der TNF- α regulierten Gene in den Erkrankungen	54
4	DISKUSSION	55
4.1	mTNF-α und Reverses Signaling	55
4.1.1	mTNF- α Expression und Wirkung als Ligand	55
4.1.2	mTNF- α als Rezeptor und Reverses Signaling	57
4.2	Infliximab Wirkungen	60
4.2.1	Ifx bei Rheumatoider Arthritis	60
4.2.2	Infliximab bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen	66
4.2.3	Infliximab Wirkungen auf T-Lymphozyten	69
4.3	Differentielle Genexpression durch TNF-α	71
4.3.1	Bedeutung einzelner Gene	72
4.3.2	Bedeutung krankheitsspezifischer Gene	75
5	ZUSAMMENFASSUNG	77
6	LITERATURVERZEICHNIS	79
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	85
8	DANKSAGUNG	87
9	LEBENS LAUF	88
10	EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG	89

1 EINLEITUNG

Das menschliche Immunsystem reagiert mit verschiedenen Mechanismen auf das Eindringen von Pathogenen. An dieser Immunantwort sind eine Vielzahl von Organen, Zellen und Botenstoffen beteiligt. Im Wesentlichen wird zwischen der angeborenen und der erworbenen Immunität unterschieden.

Zu den Zellen der angeborenen Immunität zählen die Monozyten und Makrophagen. Diese erkennen über die CD 14 Rezeptoren (CD steht für Differenzierungscluster = Cluster of differentiation) an der Zelloberfläche typische Strukturen der Pathogene, wie zum Beispiel Lipopolysaccharide von Bakterien. Die so erkannten Pathogene werden durch Phagozytose und Verdauung in Lysosomen eliminiert. Die Zellen der angeborenen Immunität sind unter anderem auch für die Antigenpräsentation zuständig. Dabei werden Fragmente phagozytierter Pathogene zusammen mit MHC I und II Molekülen an der Zelloberfläche präsentiert. Die MHC Moleküle sind für die antigenerkennenden Zellen als Erkennungsstruktur wichtig, so werden MHC I tragende Zellen von CD 8 positiven T-Zellen und MHC II von CD4 positiven T-Zellen erkannt.

Die erworbene Immunität teilt sich noch einmal in zwei Systeme, in die humorale und die zelluläre Immunität auf. Die Haupteffektorzellen der humoralen Immunität sind die B-Lymphozyten, die über membrangebundene Antikörper mit großer Spezifität fremde Strukturen (Antigene) erkennen. Gegen diese Antigene werden dann Antikörper produziert, die im Blut zirkulieren. Die Antikörper markieren die Antigene durch ihre Bindung für Eliminationsmechanismen der angeborenen Immunität. Die Antigen-Antikörper Komplexe werden durch Fresszellen aufgenommen (Phagozytose) und durch das Komplementsystem lysiert.

Das zweite System der erworbenen Immunität ist die so genannte zelluläre Immunität, deren Haupteffektorzellen die T-Lymphozyten sind. Diese Zellen erkennen und zerstören intrazelluläre Pathogene, wie Viren und einige Bakterien- und Parasitenarten. Die zytotoxischen T-Zellen, die das CD8 Molekül an ihrer Oberfläche tragen, erkennen Körperzellen, die mit Viren infiziert sind. Die Viren vermehren sich intrazellulär unter Ausnutzung des

zelleigenen Syntheseapparates, töten die Zellen dann ab und setzen dabei neue Viruspartikel frei. Virusantigen wird jedoch an der Zelloberfläche der befallenen Zellen exprimiert und von zytotoxischen T-Zellen erkannt. Diese können dann die Zelle abtöten und so die Infektion kontrollieren.

Das Oberflächenmolekül CD4 tragende T-Zellen werden als T-Helferzellen (Th-Zellen) bezeichnet und in zwei Untergruppen mit unterschiedlichen Funktionen eingeteilt. Die Th1 Zellen sind für die Bekämpfung intrazellulärer Bakterieninfektionen, zum Beispiel durch *Mycobacterium tuberculosis*, den Erreger der Tuberkulose zuständig. Die Th1 Zellen werden durch antigentragende MHC II-Zellen aktiviert und setzen durch Sekretion Botenstoffe wie Zytokine und Chemokine frei, die andere Immunzellen wie Makrophagen an den Infektionsherd locken. Die zweite Gruppe der CD4 positiven T-Zellen, die Th2 Zellen, können B-Zellen aktivieren, die dann Antikörper gegen extrazelluläre Pathogene produzieren. Diese Fähigkeit führte dazu, dass die CD4 Zellen auch als T-Helferzellen bezeichnet werden (Janeway und Travers, 2002).

Chemokine bewirken die Wanderung der Immunzellen, besonders der Lymphozyten und Phagozyten, zum Ort der Entzündung über einen Chemokingradienten.

Zytokine sind Proteine, die die Stärke und Dauer der Immunantwort regulieren und die Reaktionen der Effektorzellen untereinander abstimmen. Es gibt immunregulatorische Zytokine, die am Wachstum und an der Differenzierung von Lymphozyten und Monozyten beteiligt sind. Zu dieser Gruppe gehören die Interleukine (IL)-2, 4 und 10, Interferon (IFN)- γ und der transformierende Wachstumsfaktor (TGF)- β . Eine weitere Gruppe bilden die proinflammatorischen Zytokine, zu denen IL-1, TNF- α und IL-6 zählen. Diese Zytokine werden hauptsächlich von den phagozytierenden Zellen als Reaktion auf Pathogene gebildet.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Wirkungen des proinflammatorischen Zytokins TNF- α untersucht anhand von Gen-Signaturen in Monozyten von Patienten mit verschiedenen inflammatorischen Erkrankungen. Des Weiteren wurde die Wirkung des, in der klinischen Praxis bereits verwendeten anti TNF- α Antikörpers Infliximab auf isolierte Th-Zellen untersucht.

1.1 TNF- α

Der Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) ist ein hauptsächlich von Monozyten/Makrophagen und T-Zellen (Vassalli, 1992) produziertes Zytokin mit vielfältigen Funktionen in der Immunantwort. Es liegt entweder als sezerniertes lösliches Protein (sTNF- α), oder als zellassoziertes membrangebundenes mTNF- α vor. TNF- α bindet an die Tumornekrosefaktor-Rezeptoren TNFR-1 (p55) und TNFR-2 (p75) und induziert damit die Expression von Genen, die im Entzündungsgeschehen eine wichtige Rolle spielen. So ist TNF- α der stärkste Aktivator des Transkriptionsfaktors NF κ B, der die meisten TNF- α Effekte vermittelt (Zeidler, 2001). Beide TNF-Rezeptoren können NF κ B aktivieren. TNFR-1 gehört zur Gruppe der sogenannten „Todes-Rezeptoren“, die intrazellulär eine sogenannte Todesdomäne tragen, die Apoptose initiiert. Allerdings kann die Bindung an TNFR-1 auch Apoptose verhindern, dies scheint von der jeweiligen rezeptortragenden Zelle und dem Aktivierungsstatus der Zelle abhängig zu sein (Beg und Baltimore, 1996; Wang et al., 1998). TNFR-2 ist ein sogenannter „Ligand-Passing-Rezeptor“, der nach Bindung mit TNF- α das Molekül zum TNFR-1 weiterleitet. Die Rezeptoren interagieren über die TNFR assoziierten Faktoren (TRAFs) mit dem Zellinneren.

Ziele für TNF- α sind alle Zellen mit Ausnahme von Erythrozyten. Die Expression von TNF- α wird unter anderem durch verschiedene Zytokine, Endotoxine, virale Bestandteile und Neoplasien stimuliert.

Das membranständige oder auch transmembrane Protein mTNF- α ist die Vorform des löslichen TNF- α . Neben einem extrazellulären gibt es einen amino-terminalen Anteil, der in die Zelle hineinreicht. Das membranständige TNF- α wurde im Jahr 1988 zum ersten Mal von Kriegler et al. beschrieben (Kriegler et al., 1988). Die Metalloprotease TACE (TNF- α converting enzyme) aus der ADAM (a disintegrin and metalloproteinase)-Familie spaltet von dem aus 233 Aminosäuren bestehenden 26 kD transmembranen Protein 157 Aminosäuren ab. Auf diese Weise entsteht das sTNF (17kD), das sich in Trimeren zusammenlagert und in dieser Form an die TNF- α -Rezeptoren bindet und sie aktiviert (Papadakis und Targan, 2000). Beide Formen sind biologisch aktiv (Mitoma et al., 2005). Lösliches TNF- α induziert Effekte in den

Rezeptor-tragenden Zellen. Dagegen kann das transmembrane TNF- α bidirektional wirken. Zum einen löst es das klassische Signaling in Rezeptor tragenden Zellen durch Zell-zu-Zell-Kontakte aus. Es wurde beschrieben, dass mTNF- α der hauptsächlich aktivierende Ligand des TNFR-2 ist und damit ein wichtiger Regulator der Entzündungsreaktion im lokalen Gewebe (Grell et al., 1995). Zum anderen wird über den zytoplasmatischen Teil des mTNF- α auch ein Signaling in der TNF- α tragenden Zelle selbst angestoßen („Reverses Signaling“, Abb.1).

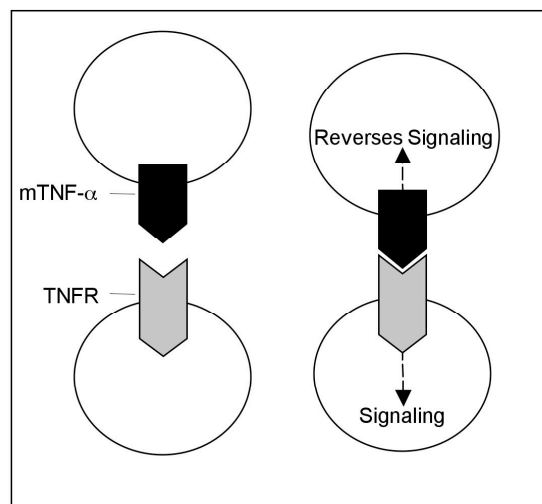


Abb. 1: mTNF- α Signaling und Reverses Signaling.

Verschiedene Autoren beschreiben Effekte des Reversen Signalings durch mTNF- α .

Die Bindung von löslichen TNF- α Rezeptoren an mTNF- α induziert eine intrazelluläre Calcium-Erhöhung in RAW264.7-Zellen (murine Makrophagen) (Watts et al., 1999). Die Sequenz der intrazellulären mTNF- α Domäne ist evolutionär stark konserviert. Dieser Befund deutet auf eine wichtige Rolle dieser Region hin. Des Weiteren beschreiben die Autoren den Phosphorylungsstatus des zytoplasmatischen mTNF- α Anteils. Die Bindung des sTNFR führt neben dem Calciumeinstrom zu einer Dephosphorylierung des mTNF. Eine Casein Kinase (CKI= serine/threonine kinase) kann diese Region wieder phosphorylieren. Die Autoren fanden einen Zusammenhang zwischen dem mTNF- α Phosphorylungsstatus und dem sTNFR induzierten

Calciumeinstrom, da dieser durch einen Phosphataseinhibitor und durch einen CKI Inhibitor abgeschwächt werden kann (Watts et al., 1999).

In Monozyten wurde durch die Bindung von verschiedenen anti TNF- α Antikörpern, unter anderem Infliximab, an mTNF- α durch Reverses Signaling eine LPS Resistenz erreicht. Die Monozyten produzierten nach der Vorstimulation mit Infliximab nun durch Zugabe von LPS keine Zytokine mehr, sie befanden sich in einem Anergiestatus (Eissner et al., 2000). Dieses „Silencing“ der Monozyten scheint über den intrazellulären MAPK/ERK Signalweg reguliert zu sein (Kirchner et al., 2004).

1.2 TNF- α : Schlüsselzytokin physiologischer und pathologischer Immunantwort

1.2.1 Lokale TNF- α Wirkungen

In der lokalen Immunabwehr spielt TNF- α eine entscheidende Rolle bei der Verhinderung der Ausbreitung der Infektion.

Bei einer lokalen Verletzung aktivieren Lipopolysaccharide gramnegativer Bakterien Makrophagen, die an der Oberfläche das TLR (Toll-like Rezeptor) 4 Protein exprimieren. Dieses löst die Freisetzung von TNF- α ins Gewebe aus. TNF- α steigert in den Blutgefäßen den Blutfluss und erhöht die Permeabilität der Gefäßwände für Flüssigkeit, Proteine und Zellen. Auf diese Weise kommt es zu einem vermehrten Einstrom dieser Substanzen in das infizierte Gewebe. Außerdem fördert TNF- α die Adhäsion von Leukozyten und Thrombozyten, wodurch sich in den Gefäßen im Bereich der Entzündung Thromben bilden, die die Gefäße verschließen und so die Ausbreitung der Infektion über das Gefäßsystem verhindern. Die Flüssigkeit und die Immunzellen aus dem Entzündungsgebiet werden in regionale Lymphknoten abgeleitet, wo sie die adaptive Immunreaktion initiieren (Janeway und Travers, 2002).

1.2.2 Systemische TNF- α Wirkungen

Bei einer systemischen Infektion wie zum Beispiel einer Sepsis, kann die Reaktion des gesamten Organismus auf TNF- α lebensbedrohliche Ausmaße annehmen.

Wenn TNF- α im gesamten Blutgefäßsystem freigesetzt wird, wirkt es auf sämtliche kleinen Blutgefäße. Die erhöhte Durchblutung und Permeabilität führt zu einem systemischen Ödem und die verstärkte Adhäsion von Thrombozyten verursacht eine disseminierte intravasale Gerinnung. Es kommt zum Verbrauch der Gerinnungsfaktoren (Verbrauchskoagulopathie), in deren Folge Blutungen und Multiorganversagen entstehen können.

1.2.3 Weitere TNF- α Funktionen in der Immunabwehr

Neben den lokalen und systemischen Wirkungen hat TNF- α noch weitere Funktionen in der Immunabwehr.

Es wirkt neben Interleukin 1 und 6 als endogenes Pyrogen indem es durch Verstellung des Temperatur-Sollwertes im Hypothalamus zu einer Erhöhung der Körpertemperatur führt. Das gleiche Resultat hat die Wirkung von TNF- α auf Fett- und Muskelgewebe. Hier stimuliert es katabole Prozesse zur Bereitstellung von Energie für den Entzündungsprozess. Die erhöhte Körpertemperatur vermindert die virale und bakterielle Replikation, führt zu schnellerer Antigenverarbeitung und verstärkt die spezifische Immunreaktion. TNF- α stimuliert die Hepatozyten in der Leber zur Produktion von Akute-Phase-Proteinen wie dem C-reaktiven Protein (CRP) und dem mannabindenden Lektin. Diese Faktoren sind an der Aktivierung des Komplementsystems und an der Opsonisierung beteiligt. Im Knochenmark und im Endothel mobilisiert TNF- α Neutrophile Granulozyten, die für die Phagozytose von Erregern zuständig sind. Dendritische Zellen werden zur Wanderung zu den Lymphknoten und zur Reifung stimuliert. Sie leiten die adaptive Immunantwort ein, da sie kostimulatorisch wirken und Antigen präsentieren.

1.2.4 TNF- α in der chronischen Entzündung

Im Mausmodell konnte experimentell gezeigt werden, dass die Überexpression von TNF- α Krankheitsbilder auslösen kann, die der Arthritis und den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ähneln. Umgekehrt konnten diese TNF- α Wirkungen durch Neutralisation des TNF- α entscheidend beeinflusst werden (Zwerina et al., 2005).

Bei der Rheumatoiden Arthritis spielt TNF- α in der Erhaltung der Entzündung eine wichtige Rolle. Es induziert die Produktion von Prostaglandin-E₂ und matrixdegradierenden Enzymen in Synovialfibroblasten und Chondrozyten. Das proinflammatorische Zytokin ist sowohl im Serum, als auch im Synovialgewebe betroffener Gelenke vermehrt vorhanden (Beckham et al., 1992; Chu et al., 1991). Im Synovialgewebe fördert TNF- α die Ausdifferenzierung von Monozyten in Osteoklasten. Außerdem stimuliert TNF- α synoviale Fibroblasten zur Synthese von weiteren proinflammatorischen Zytokinen und Metalloproteasen, die den Gelenkknorpel angreifen und hemmt die Proteoglykansynthese der Chondrozyten. Auf diese Weise trägt TNF- α zur Knorpel- und Gelenkdestruktion bei (Zwerina et al., 2005).

Auch bei der chronisch entzündliche Darmerkrankung Morbus Crohn wurden erhöhte TNF- α Konzentrationen im Serum und in der Darmmukosa nachgewiesen (Cornillie et al., 2001; Schwab und Klotz, 2001).

Wie wichtig TNF- α in der Pathogenese chronisch entzündlicher Erkrankungen, wie der Rheumatoiden Arthritis und beim Morbus Crohn ist, zeigt sich letztendlich auch durch die Effektivität der anti TNF- α Therapie, die die akuten, aber auch die chronischen Entzündungsreaktionen stark hemmt.

1.3 Behandlung autoimmuner und entzündlicher Erkrankungen

Die medikamentöse Behandlung von Autoimmunkrankheiten lässt sich im Wesentlichen in zwei Gruppen einteilen. Zur symptomatischen Therapie werden analgetisch-antiphlogistische Substanzen wie nichtsteroidale Antiphlogistika (NSAID) und Glukokortikoide eingesetzt. Mit den sogenannten Basistherapeutika (DMARD, disease-modifying antirheumatic drugs) soll langfristig in den Krankheitsverlauf der rheumatischen Erkrankungen eingegriffen werden. Zu dieser Gruppe von Pharmaka gehören Antimalariamittel, Sulfasalazine, Goldpräparate und Methotrexat.

In den letzten Jahren wurden zunehmend spezifische Therapeutika entwickelt. Zu diesen, auch als Biologika bezeichneten Substanzen, zählen Zytokininhibitoren wie der in der vorliegenden Arbeit untersuchte TNF- α Blocker Infliximab.

Neben Infliximab sind in Deutschland außerdem Etanercept und Adalimumab

zugelassen. Etanercept ist ein rekombinantes TNF- α -Rezeptor II (p75)-IgG Fusionsprotein. Es besteht aus dem extrazellulären Teil des TNFR II gekoppelt an humanes IgG. Etanercept wird in Deutschland zur Behandlung der RA, bei juveniler chronischer Arthritis, bei Psoriasis-Arthritis, bei Morbus Bechterew und bei Psoriasis eingesetzt.

Adalimumab ist ein vollständig humaner anti TNF- α Antikörper, der für die Behandlung der RA und der Psoriasis-Arthritis zugelassen ist.

Das therapeutische Ziel bei der Behandlung mit TNF- α Blockern besteht darin, das überschüssige TNF- α zu eliminieren. Bei zu niedrigen TNF- α Konzentrationen steigt jedoch im Körper das Risiko für opportunistische Infektionen, da TNF- α ein wichtiger Mediator der Immunabwehr und Homöostase ist. TNF- α hemmt unter anderem das Tumor-Wachstum und induziert in virusinfizierten Zellen Apoptose (Nestorov, 2005).

1.3.1 Infliximab

Infliximab wirkt über die Bindung an sTNF- α und mTNF- α (Scallon et al., 2002). Es neutralisiert das lösliche TNF- α und blockiert die Interaktion des membranständigen TNF- α mit den TNFR-tragenden Zellen und verhindert so proinflammatorische TNF- α Wirkungen. Die Frage, inwieweit Infliximab auch Effekte durch die Bindung an mTNF- α über das Reverse Signaling auf die mTNF- α tragenden Zellen hat, ist ein Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Infliximab (Ifx) ist ein monoklonaler, chimärer, für TNF- α spezifischer Antikörper. Chimär bedeutet, dass der Antikörper aus Bestandteilen zweier verschiedener Spezies hergestellt wurde, in diesem Fall aus Mensch und Maus. Das Molekulargewicht beträgt 149,100 Dalton.

In Deutschland ist Ifx für die Behandlung der folgenden Autoimmunerkrankungen zugelassen: Rheumatoide Arthritis (RA), Ankylosierende Spondylitis (AS, auch unter dem Namen Morbus Bechterew bekannt), Psoriasis-Arthritis, Morbus Crohn, Colitis ulcerosa und Psoriasis.

Ifx hat sich in der Behandlung dieser Erkrankungen, insbesondere bei Versagen der herkömmlichen Therapien, als sehr wirksam erwiesen. Es beeinflusst nachhaltig die Symptomatik der Autoimmunerkrankungen. So konnte zum Beispiel bei Patienten mit RA eine deutlichen Besserung der

Krankheitssymptome, ein Abfall der Entzündungsparameter, eine Hemmung der Progression der Gelenkzerstörung und eine Verbesserung der Lebensqualität gezeigt werden (Elliott et al., 1994; Lipsky et al., 2000). Die Behandlung mit Infliximab ist eine Dauertherapie, sie führt nicht zur Heilung, denn sie greift nur symptomatisch in den Verlauf der Autoimmunerkrankungen ein. In sehr seltenen Fällen kommt es jedoch nach Absetzen zu langfristigen Remissionen (Listing et al., 2006).

Die Empfehlungen der „Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie“ für die Therapie mit Infliximab lauten derzeit:

1. Gesicherte Diagnose einer RA.
2. Versagen von mindestens zwei konventionellen DMARD (eines davon Methotrexat) nach mindestens 6 monatiger Therapie.
3. Applikation als Infusion (initial in den Wochen 0, 2 und 6, nachfolgend alle 8 Wochen).
4. Dosis: 3 mg/kg KG.
5. Therapie nur in Kombination mit niedrigdosiertem Methothrexat (Gefahr der Antikörperbildung und abnehmende Wirkung bei Monotherapie).
6. Kontinuierliche Überwachung von Wirksamkeit und Verträglichkeit durch einen internistischen Rheumatologen (bei Kindern: pädiatrischer Rheumatologe).
7. Therapieende nach 12 Wochen wenn keine signifikante Besserung der klinischen und humoralen Entzündungsaktivität vorliegt.

Infliximab wird nur parenteral eingesetzt und hat eine Halbwertszeit von 7–10 Tagen, abhängig von der therapeutisch eingesetzten Konzentration (Nestorov, 2005).

Für die Behandlung des M. Crohn gilt, dass Infliximab bei therapieresistenten Verläufen und Fisteln wirksam ist, jedoch nur bei Versagen der Standardtherapie und klarer Indikationsstellung eingesetzt werden soll, da als mögliche Therapiefolge Lymphomerkrankungen beschrieben wurden. (Harrison, 2003, S.1857)

Als Nebenwirkungen der Infliximabtherapie sind eine erhöhte Anfälligkeit für schwerwiegende Infektionserkrankungen beschrieben. Es treten unter der

Therapie zum Beispiel gehäuft Tuberkuloseinfektionen auf, zum Teil mit letalem Verlauf. Des Weiteren wurde unter der Therapie die Bildung von anti DNS-Antikörpern mit dem Auftreten eines Krankheitsbildes ähnlich dem Systemischen Lupus erythematoses (SLE) beobachtet. Auch vermehrt auftretende schwerwiegende Haut- und Tumorerkrankungen, besonders Lymphome, wurden beschrieben (Sari et al., 2006) (Keystone, 2005). Allerdings sind Therapiestudien über einen längeren Beobachtungszeitraum abzuwarten, um mit Sicherheit sagen zu können, ob die beobachteten Nebenwirkungen krankheits- oder therapiebedingt sind.

Als Kontraindikationen und Abbruchgründe für die Behandlung mit Infliximab gelten eine frühere bzw. eine aktuelle Tuberkuloseerkrankung, Infektionen und das Auftreten einer SLE Symptomatik. Während der Therapie sollte keine Vakzination mit Lebendimpfstoffen erfolgen. Besondere Vorsicht bei der Infliximab-Therapie ist bei Vorliegen von Lymphomen, lymphoproliferativen Erkrankungen, Tumoren und chronischen Viruserkrankungen (HIV, Hepatitis B und C) geboten.

1.4 Infliximab und mTNF- α

Inwieweit das Reverse Signaling bei den Infliximab Wirkungen eine Rolle spielt, ist nicht vollständig bekannt.

Neben den genannten blockierenden und neutralisierenden Wirkungen von Infliximab ist auch eine Hemmung oder Induktion des Reversen Signalings in den mTNF- α tragenden Zellen beschrieben (Abb. 2).

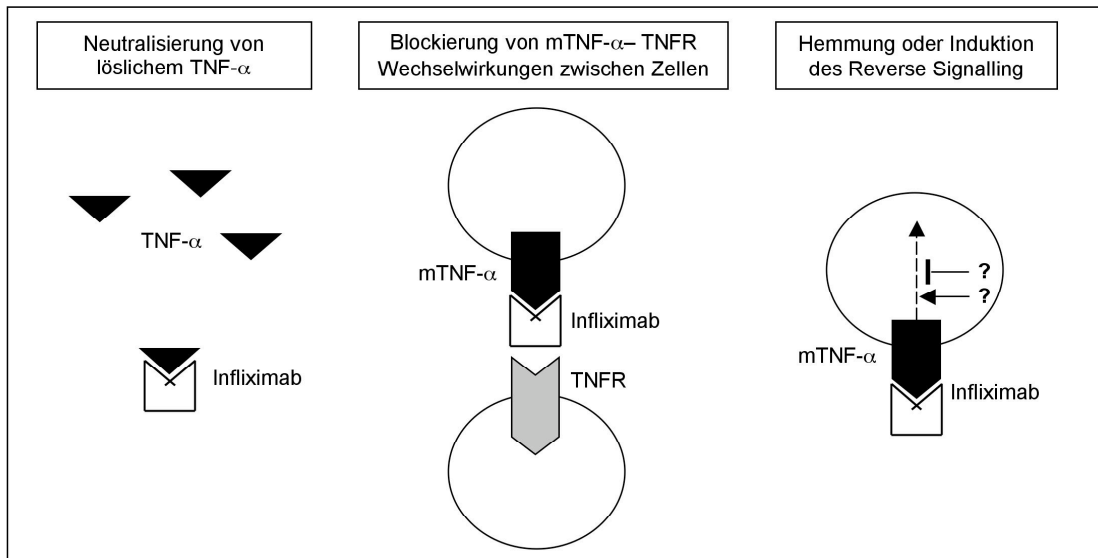


Abb. 2: Molekulare Wirkungen von Infliximab.

Es liegen einige Arbeiten zu Effekten von mTNF- α in Monozyten vor, die einen antiinflammatorischen Effekt beschreiben, erkennbar an der ausbleibenden Stimulierbarkeit durch LPS (Kirchner et al., 2004). Es wird angenommen, dass dieses „Silencing“ von Monozyten über die Aktivierung des MEK/ERK Signalweges verläuft, jedoch sind die molekularen Mechanismen bislang unklar. Auch wird die Induktion von Apoptose durch Reverses mTNF- α Signaling in Monozyten diskutiert. Übereinstimmend werden in der Literatur inhibitorische Wirkungen des mTNF- α Signalings auf die Effektorfunktionen der Monozyten beschrieben.

Demgegenüber sind die wenigen Untersuchungsergebnisse zum Reversen mTNF- α Signaling in T-Zellen widersprüchlich. So wird nach Ligation des mTNF- α einerseits über stimulatorische Effekte berichtet, messbar an vermehrter Bildung von E-Selektin (Ferran et al., 1994), IL-2 und IFN- γ (Higuchi et al., 1997). Andererseits wurden auch inhibitorische Effekte

beschrieben, messbar an verminderter Bildung von IFN- γ und TNF- α in aktivierten T-Zellen (Agnholt und Kalsoft, 2001). Auch der Effekt des Reversen mTNF- α Signalings auf die Apoptose von T-Zellen wird kontrovers diskutiert, wobei die publizierten Befunde zwischen ausbleibender Wirkung auf Apoptose und Proliferation (Agnholt und Kalsoft, 2001) bzw. Induktion von Apoptose (ten Hove et al., 2002) variieren.

1.5 TNF- α Signaturen

In der vorliegenden Arbeit wurden die Wirkungen von TNF- α auf Immunzellen untersucht:

- (a) indirekt durch die Untersuchung der Effekte von anti TNF- α und
- (b) direkt durch die Identifikation von TNF- α Signaturen.

Bei rheumatischen Erkrankungen spielt TNF- α als wichtiges proinflammatorisches Zytokin eine entscheidende Rolle. Eine noch nicht publizierte Untersuchung beschäftigt sich mit der Frage, ob es bei Erkrankten in den Zellen des peripheren Blutes einen „Zytokinabdruck“ gibt (Grützkau et al., Artikel zur Publikation eingereicht). Für die rheumatischen Erkrankungen RA, OA, SLE, AS konnte ein charakteristisches krankheitsspezifisches Genexpressionsmuster in Monozyten nachgewiesen werden. Es zeigt sich, dass sich auch Krankheiten, deren Krankheitsfokus eigentlich lokal begrenzt ist, im gesamten Immunsystem abbilden. Dies gilt zum Beispiel für die Gelenkentzündung bei der RA.

In der vorliegenden Arbeit wird untersucht, ob sich die durch RA, OA, SLE und AS exprimierten Gene in Zellen wiederfinden, die direkt mit TNF- α behandelt worden sind. Dazu wurde die publizierte Literatur nach Genen durchsucht, die dort als durch TNF- α differentiell exprimiert beschrieben sind.

Es soll hier sowohl nach Übereinstimmungen, als auch nach den Funktionen der gefundenen Gene, die sowohl durch entzündliche Erkrankungen, als auch durch TNF- α differentiell exprimiert werden, gefragt werden.

1.6 Fragestellung der Arbeit

TNF- α ist ein Schlüsselzytokin sowohl in der physiologischen, als auch in der pathologischen Immunantwort. Einige Funktionen und Wirkungsweisen von TNF- α sind bereits gut bekannt, doch treten im Zusammenhang mit der anti TNF- α Therapie auch neue Fragen auf.

Es gibt zahlreiche Untersuchungen von Infliximab-Wirkungen auf verschiedene Zelltypen, so auf Monozyten, Makrophagen und T-Lymphozyten aus dem Darm von an M. Crohn erkrankten Patienten. Dabei finden sich einige Untersuchungen, die mit Zellreihen durchgeführt wurden, bei denen zum Teil mTNF- α stabil transfiziert wurde. Diese Zellen haben möglicherweise veränderte Eigenschaften im Vergleich zu Zellen von gesunden Menschen. Deshalb war es ein Gegenstand der vorliegenden Arbeit die Infliximab Wirkungen auf eine wichtige Immunzellgruppe, die CD4 positiven T-Lymphozyten von gesunden Blutspendern zu untersuchen. Ziel war es einen Baustein zur Aufklärung der Infliximab Mechanismen beizutragen, die dem therapeutischen Erfolg dieses Medikamentes zu Grunde liegen.

Mit Hilfe von Genexpressionsmustern lassen sich in der Zukunft eventuell neue, weniger invasive Möglichkeiten zur Vorhersage von Diagnose und Prognose von Autoimmunerkrankungen entwickeln, wenn bestimmte Markergene für Krankheiten aus dem peripheren Blut von Patienten bestimmt werden können. Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob es Übereinstimmungen gibt zwischen Genexpressionsmustern, die durch rheumatische Erkrankungen reguliert sind und differentiell durch TNF- α exprimierten Genen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die TNF- α Effekte, und deren Beeinflussung durch Infliximab im Bezug auf die folgenden Fragen untersucht.

1. Wird TNF- α auf der Zellmembran von Th-Zellen exprimiert?
2. Welche Expressionskinetik hat das membranständige TNF- α ?
3. Wird mTNF- α auf stimulierten und unstimulierten Th-Zellen exprimiert?
4. Ändert Infliximab durch Bindung an mTNF- α den Sauerstoffverbrauch, die Zytokinsynthese, die Apoptose und die Proliferation von humanen isolierten CD4 positiven T-Zellen?

5. Welchen Einfluss hat das Reverse Signaling durch mTNF- α bei den Infliximabeffekten?
6. Welche intrazellulären Signalkaskaden sind an eventuell vorhandenen Infliximabwirkungen mittels mTNF- α beteiligt?
7. Welche durch TNF- α differentiell exprimierten Gene in humanen Zellen sind in der Literatur beschrieben?
8. Gibt es Übereinstimmungen bei den TNF- α regulierten Genen aus der Literatur und den durch rheumatische Erkrankungen (RA, OA, SLE, AS) differentiell exprimierten Genen?
9. Haben die übereinstimmenden Gene entzündungsrelevante und/oder krankheitsrelevante Funktionen?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Puffer und Medien

Die folgenden Puffer und Medien wurden verwendet (Tab. 1).

Tab. 1: Puffer und Medien.

Puffer / Medium	Zusammensetzung
RPMI Kulturmedium mit Glukose	RPMI 1640; 10 % (v/v) FCS, 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin, 0,1 % (v/v) 50mM β -Mercaptoethanol \pm 11,1 mM Glukose
Phosphate buffered saline (PBS) pH 7,6	80 mM Na_2HPO_4 ; 19mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 100 mM NaCl
PBS / BSA (Bovine serum albumin)	Siehe PBS positiven 1%(w/v) BSA
PBS/BSA/Azid	PBS positiven 0,5% (w/v) BSA positiven 0,02% (w/v) Na N_3

2.2 Filterpräparation

Ausgangsmaterial zur Gewinnung der Th-Zellen waren Leukozytenfilter, die bei der Blutspende verwendet werden, um aus dem Spenderblut die Immunzellen zu isolieren. Diese werden bei der Übertragung von Blutprodukten nicht benötigt und können nicht gespendet werden. Die Leukozytenfilter kamen aus dem Institut für Tranfusionsmedizin der Charité, wo gesunde Erwachsene zur Blutspende zugelassen sind. Die Filter waren zum Zeitpunkt der Präparation jeweils nicht älter als zwei Stunden.

Der Filter wurde aus dem Schlauchsystem geschnitten, das sich in den Schläuchen befindliche Blut wurde in 50ml Falconröhrchen aufgefangen. Der Filter wurde mit eiskaltem PBS BSA entgegen der Filterrichtung solange gespült, bis drei 50mL Röhrchen mit dem Blut-Puffer-Gemisch gefüllt waren. Diese wurden im 37°C Wasserbad erwärmt.

2.3 Ficoll–Dichtegradientenzentrifugation

Die Gewinnung von PBMC aus Vollblut mittels Ficoll beruht auf dem Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation. Ficoll–Hypaque (Ficoll–Paque™ Plus, Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) hat eine definierte Dichte von 1,077g/ml. Diese ist größer, als die Dichte von Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten, aber geringer als die Dichte von Erythrozyten und der meisten Granulozyten.

Zur Gewinnung der PBMC wurde das Ficoll vorsichtig mit dem Blut–Puffer–Gemisch überschichtet. Nach der Zentrifugation (20 min ohne Bremse, bei Raumtemperatur und 2000 rpm (836 x g), Heraeus Labofuge Zentrifuge) reicherten sich die PBMC`s aufgrund ihrer Dichte in der Interphase zwischen Ficoll und Plasma an. Die Erythrozyten und Granulozyten sedimentierten unter die Ficoll–Schicht auf den Boden des Röhrchens.

Die Interphase wurde vorsichtig mit einer 10 mL Glaspipette mit Akkupipettierhilfe (Pipetus–akku, Hirschmann) so abgenommen, dass kein Ficoll mit überführt wurde, da dieses zytotoxisch wirkt und eine geringe Zellausbeute zur Folge haben kann.

Die so gewonnenen zwei 50 mL Röhrchen mit den PBMC Suspensionen wurden in PBS/BSA gewaschen und anschließend durch Zentrifugation pelletiert (Heraeus Labofuge 400R Zentrifuge, 1200 rpm (280 g), mit Bremse, 10 Minuten).

2.4 CD4–Zellsortierung

Die Gewinnung einer reinen Zellpopulation von CD4 positiven T–Zellen aus PBMC erfolgte durch magnetische Zellsortierung (MACS, Magnetic Cell Separation).

Die PBMC Pellets wurden in je 720µl PBS/BSA gelöst. Zum blockieren der unspezifischen Fc–Rezeptoren wurden je 80µl des humanen Immunglobulins Flebogamma (Grifols Deutschland GmbH, 50 mg/mL) zugegeben und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden je 200µl an Magnetbeads gekoppelte anti CD4 Antikörper (Milteny Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland) zu den PBMC gegeben und für 15 min bei 12°C inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die Zellsuspensionen mit PBS/BSA aufgefüllt und zentrifugiert (Heraeus

Labofuge 400R Zentrifuge, 1200 rpm (280 g), gebremst, 10 Minuten). Die Pellets wurden in 2,5 ml PBS/BSA aufgenommen. Es folgte die magnetische Zellseparierung nach dem folgenden Prinzip.

Die Magnetbeads sind paramagnetisch, das heißt, sie sind lediglich in einem magnetischen Feld aktiv. Die Zellsuspension wurde über eine Stahlwollsäule gegeben, die sich in einem starken Magnetfeld befindet. Die markierten Zellen wurden in der Säule im Magnetfeld zurückgehalten, die unmarkierten Zellen flossen ungehindert durch. Anschließend wurde die Säule aus dem Magnetfeld entfernt und die markierten Zellen wurden eluiert. Hier beschrieben ist die Zellsortierung mittels Positivselektion, nach dem gleichen Prinzip können aber auch die nicht zu untersuchenden Zellen markiert und ausgefiltert werden (Negativselektion).

Die Zellsortierung erfolgte entweder automatisch mit dem Auto-MACS (auto Macs™ Separator, Milteny) oder per Hand.

Die Reinheit jeder Zellsortierung wurde beim MACS-Check mittels Durchflusszytometrie kontrolliert. Dazu wurden von der Zellsuspension der sortierten Zellen 25 µl abgenommen und zu einer vorher vorbereiteten Färbelösung mit FITC markierten CD4 und PE markierten CD3 Antikörpern (Anti human IgG1, Deutsches Rheumaforschungszentrum Berlin) gegeben. Das Färbevolumen der Lösung betrug 100µl. Die Antikörper gegen die Oberflächenmoleküle wurden jeweils vorher austitriert, das heißt, es wurde in Probefärbungen die Konzentration bestimmt, mit der das beste Färbeergebnis erreicht wird. anti CD3PE wurde in einer Konzentration von 1:200 und anti CD4FITC in einer Konzentration von 1:500 eingesetzt. Zur Färbelösung wurde wieder Flebogamma (10µl, entspricht 1:10) zugegeben. Die Lösung wurde 15 Minuten auf Eis inkubiert, anschließend wurde 1ml PBS/BSA zugegeben und in einer Eppendorfszentrifuge (Heraeus Biofuge fresco) bei 4°C und 2300 rpm (502 x g) für 8 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in 400µl PBS/BSA aufgenommen und am Durchflußzytometer gemessen, unmittelbar vor der Messung wurde Propidiumjodid (0,1 mg/mL, Sigma) im Verhältnis 1:100 zugegeben. Propidiumjodid (PJ) färbt DNA-Bestandteile, eine Zellfärbung erfolgt daher nur bei nicht mehr intakter Zellmembran. Mit Hilfe der

CD3/CD4-Färbung konnte die Reinheit, durch die PJ-Färbung die Viabilität der Zellen überprüft werden

Die CD4 positiven T-Zellen wurden für Untersuchungen weiter verwendet, wenn die Reinheit mehr als 99% und die Viabilität mehr als 95% betrug.

2.5 Zellzählung

Die Zellen wurden mit dem Zellzählgerät Casy (Casy Cell Counter, Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland) gezählt. Aus einem Leukozytenfilter konnten durchschnittlich etwa 30×10^7 CD4 positive T-Zellen gewonnen werden.

2.6 Zellaktivierung

2.6.1 Zellaktivierung durch anti CD3/CD28 Antikörper

Die Aktivierung mittels anti CD3 Antikörpern (UCHT-1, 4,24 mg/ml, Deutsches Rheumaforschungszentrum) gegen den T-Zell-Rezeptor und anti CD28 Antikörpern (1mg/ml, BD Pharmingen™ Biosciences, Deutschland) gegen den kostimulatorischen Oberflächenmarker CD28 entspricht einer spezifischen T-Zell-Stimulation. Diese ähnelt der Aktivierung im Körper, wo für die Aktivierung der naiven T-Zelle durch ein Peptidantigen am T-Zell-Rezeptor (CD3) ein kostimulatorisches Signal über den CD28 Rezeptor nötig ist.

Die CD3/CD28 Antikörper wurden entweder an Microbeads, oder an Zellkulturplatten gekoppelt eingesetzt. Für die Kopplung an Beads wurden 238 µl Microbeads ($2,10 \times 10^8$ particles/ml, Polybeadpolystyrene, 6,0 micron Microsphere, Polysciences, Eppelheim, Deutschland), 5 µl anti CD3 Antikörperlösung und 20 µl anti CD 28 Antikörperlösung in 15 ml PBS gegeben und bei 37°C 1,5 Stunden geschüttelt. Die Lösung wurde pelletiert (3000 U/min, 10 min), anschließend in 15 ml Medium (RPMI 1640 mit Penicillin/Streptomycin) wieder gelöst und für 1 Stunde bei Raumtemperatur belassen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 0,5 ml Medium aufgenommen und bis zum Einsatz bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Die Bead-Antikörper-Lösung wurde in einer Konzentration von 1,5 Beads/Zelle zur Stimulation eingesetzt.

Für die Antikörperkopplung an Zellkulturplatten wurden Platten mit 96 Vertiefungen (96 Well-Platten) mit flachem Boden verwendet. Die Platten wurden mit 100 µl PBS/Well vorgespült. Anschließend wurde die, jeweils für

den Versuch benötigte Anzahl von Wells mit 100 μ l CD3 Antikörper–PBS–Lösung in einer Endkonzentration von 10 μ g/ml befüllt. Die nicht benötigten Wells wurden mit PBS gefüllt, um die Verdunstung im Brutschrank gering zu halten. Die Platten wurden für 5 Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die Antikörperlösung aus den Wells abpipettiert und verworfen. Die Zellen wurden auf eine Konzentration von 2×10^6 /ml eingestellt, anti CD28 Antikörperlösung wurde in einer Endkonzentration von 5 μ g/ml direkt zur Zellsuspension gegeben. Pro Well wurden 250 μ l der Zellösung inkubiert.

2.6.2 Zellaktivierung durch PMA/Ionomycin

Um die Th–Zellen sehr stark, aber unspezifisch zu aktivieren, wurde Phorbol–12–Myristat–13–Acetat (PMA) und Ionomycin verwendet (beide Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland). PMA lag gelöst in 70% Ethanol in einer Konzentration von 1 mg/ml vor und wurde in einer Endkonzentration von 10 ng/ml eingesetzt. Ionomycin lag in einer Konzentration von 1 mg/ml in DMSO vor und wurde in einer Endkonzentration von 1 μ g/ml eingesetzt. Für die Stimulation mit PMA/Ionomycin wurden die Zellen auf eine Konzentration von 4×10^6 /ml eingestellt.

2.7 Infliximab

Das verwendete Infliximab (Remicade) lag als Pulver zur Herstellung einer Infusionslösung vor. Die 100mg wurden in 10ml sterilem Aqua dest. gelöst. Von dieser Lösung wurden 2 ml abgenommen und dialysiert, um die zusätzlichen Inhaltsstoffe, wie Saccharose, Polysorbat 80–Emulgator, Dinatriumhydrogenphosphat und Natriumdihydrogenphosphat zu entfernen. Die Lösung wurde in Dialyseröhrchen gefüllt, die mit einer semipermeablen Membran verschlossen wurden. Die Röhrchen wurden in einem 2 Liter Becherglas mit PBS mittels eines Magneten gerührt. Das PBS wurde in Abständen von einer Stunde zweimal gewechselt, dann wurde es über Nacht belassen.

Die so gewonnene dialysierte Antikörperlösung wurde aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt. Bei der Verwendung wurde darauf geachtet, dass die Aliquots nicht

mehr als dreimal aufgetaut und wieder eingefroren wurden.

Für die Färbungen des membranständigen TNF- α wurde an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppeltes Infliximab (Ifx) verwendet. Die Kopplung an FITC und Cy5 erfolgte im Deutschen Rheumaforschungszentrum Berlin.

Das fluoreszenzgekoppelte Ifx wurde mit einer intrazellulären TNF- α Färbung, wie sie in Kapitel 2.10 für andere Zytokine beschrieben wird, austitriert. Es zeigte sich, dass für IfxFITC die besten Färbungen bei einer Endkonzentration von 1:500 und für IfxCy5 von 1:250 zu erreichen waren.

2.8 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie stellt ein optisches Meßsystem für einzelne Partikel dar, die sich in einem Flüssigkeitsstrom bewegen. Das Prinzip beruht darauf, dass Zellen und verschiedene mikroskopisch kleine Partikel anhand ihrer Größe, Struktur und Oberflächenbeschaffenheit unterschieden werden können. Die Zellen werden in einem laminaren Probenstrom einzeln an einem Laser vorbeigeleitet, wobei ein Streulicht entsteht. Das Vorwärtstreulicht (FSC), das in Verlängerung der Strahlrichtung entsteht, wenn der Laser auf die einzelne Zelle trifft, korreliert mit der Zellgröße. Durch Strukturen innerhalb der Zelle werden die Lichtstrahlen in einem 90° Winkel reflektiert, dieses Licht wird als Seitwärtstreulicht (SSC) bezeichnet und stellt ein Maß für die Granularität der Zelle dar.

Für verschiedene Messungen werden die Zellen mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern markiert. Die Fluoreszenzfarbstoffe werden bei der Messung von einem Laserstrahl erfasst und angeregt, woraufhin Licht in einer bestimmten Wellenlänge (siehe Tabelle 2) emittiert und von Photodetektoren registriert wird. Für verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe entsteht ein spezifisches Signal, wodurch auch Mehrfachfärbungen möglich werden.

Tab. 2: Für die durchflusszytometrischen Messungen verwendete Fluoreszenzfarbstoffe.

Fluorochrome	Exzitation [nm]	Fluoreszenz [nm]	Abkürzung
Allophycocyanin	650	660	APC
Annexin V	488	515	–
Carboxyfluorescein–Diacetatsuccinimidylester	488	538	CFDA–SE
Fluorescein–Isothiocyanat	495	525	FITC
Indodicarbocyanin	651	674	Cy5
Propidiumjodid	350, 536	611	PJ
Phycoerythrin	488, 565	578	PE

Für die durchflusszytometrische Messung wurde ein FACS–Calibur™ (Becton Dickinson GmbH, Bergisch Gladbach Deutschland) verwendet, das mit einem Rechner zur Datenakquisition und–analyse verbunden war. Bei jeder Probe wurden die Daten von mindestens 10.000 Zellen aufgenommen. Die Auswertung erfolgte mit den Softwareprogrammen CellQuest™ (Version 3.3, BD Biosciences, San José, USA) und FCS Express™ (Version 1.0, De Novo Software, Thornhill, Kanada). Die Daten wurden als eindimensionale Histogramme oder als zweidimensionale Punkt–Bilder (Dot–plots) dargestellt und analysiert.

2.9 mTNF– α Messung

Zur Messung des membranständigen TNF– α wurden die Th–Zellen wie in Kapitel 2.6.2 beschrieben mit PMA/Ionomycin stimuliert. Um ein Färbesystem zu etablieren, wurden für die stimulierten Zellen, und parallel dazu für die unstimulierten Zellen, jeweils 5 Ansätze durchgeführt. Neben der Färbung mit FITC gekoppeltem I α x, wurden 3 Kontrollen gemessen. Als erste Kontrolle dienten die ungefärbten Zellen, nur mit Flebogamma behandelt, um unspezifische Färbungen zu überprüfen. Die zweite Kontrolle war eine Isotypkontrolle mit einem Antikörper gegen humanes IgG1 (IgG1 mouse FITC). Als dritte Kontrolle diente ein Ansatz, in dem lösliches TNF– α im Überschuss zu

den Zellen gegeben wurde und nach einer Vorinkubationszeit Ix-FITC zugefügt wurde. Mit dieser Kontrolle wurde die Bindung von Ix-FITC an rezeptorgebundenes lösliches TNF- α überprüft.

Um die physiologische Stimulation nachzuahmen, wurde die Kinetik der mTNF- α Expression mit einer anti CD3/CD28 Stimulation, wie in Kapitel 2.6.1 beschrieben, durchgeführt. Parallel wurde die Proliferation der Zellen gemessen, um zu untersuchen, wie das mTNF- α in den einzelnen Generationen exprimiert wird. Da die Fluoreszenz der CFDA-SE-Färbung im selben Kanal des Durchflusszytometers wie FITC gemessen wird, wurde für die mTNF- α Färbung diesmal an Cy5 gekoppeltes Infliximab verwendet.

Die Th-Zellen wurden mit anti CD3 an Zellkulturplatten gebunden und anti CD28-Antikörpern stimuliert. Es wurde immer eine unstimulierte Kontrolle mitgeführt. Die Messungen wurden nach 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h durchgeführt. Es wurden 1×10^6 Zellen jeweils für die Färbung stimulierter Zellen und unstimulierter Zellen in Eppendorf-Tubes abgenommen. Die Zellen wurden abzentrifugiert, in je 60 μ l Flebogamma/PBS/BSA Lösung (1:10) aufgenommen und für 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde für Kontrolle, Färbung und Block in drei Eppendorfröhrchen zu je 20 μ l aufgeteilt. Zum Block wurden 5 μ l ungekoppeltes Infliximab zugegeben, zu Kontrolle und Färbung jeweils 5 μ l PBS/BSA, anschließend wurde die Zellsuspension wieder für 10 min auf Eis inkubiert. Das an Cy5 gekoppelte Infliximab wurde in einer Endkonzentration von 1:250 eingesetzt. Diese Konzentration hatte in einer vorausgegangenen Titration das optimale Färbeergebnis ergeben. Es wurde eine Vorverdünnung von 1:125 Ix-Cy5/PBS/BSA hergestellt und diese in einem Verhältnis von 1:2 zur Zellsuspension gegeben. Zu den 25 μ l Zellsuspension der Proben Färbung und Block wurden 25 μ l vorverdünnte Färbelösung gegeben, zur Kontrolle wurden 25 μ l PBS/BSA gegeben. Es folgte wieder ein Inkubationsschritt auf Eis für 10 min. Anschließend wurden die Zellen mit 1ml PBS/BSA gewaschen und abzentrifugiert (Heraeus Biofuge fresco, bei 4°C und 2300 rpm (502 x g) für 8 Minuten). Die Zellen wurden in 400 μ l PBS/BSA aufgenommen und am Durchflusszytometer gemessen.

2.10 Zytokinmessung

Für die Bestimmung der Produktion von Interleukin-2 (IL-2) und Interferon γ (IFN- γ) wurden die Th-Zellen auf eine Konzentration von 1×10^6 /ml eingestellt. Es wurde je 1 ml Zellsuspension in ein Well einer 24-Well-Platte gegeben. Infliximab wurde in Endkonzentrationen von 10 und 20 μ g/ml zugegeben. Es gab vier verschiedene Zeitpunkte der Zugabe von Infliximab. Infliximab wurde 12 Stunden (1. Ansatz) und eine Stunde (2. Ansatz) vor der Stimulation zu den Th-Zellen gegeben und bei 37°C im Brutschrank vorinkubiert. Für den 3. Ansatz wurde Infliximab gleichzeitig mit den stimulierenden Substanzen zur Kultur gegeben, für den 4. Ansatz eine Stunde nach Stimulation.

Die Stimulierung der PBMCs erfolgte mit 10 ng/ml PMA und 1 μ g/ml Ionomycin wie in Kapitel 2.6.2 beschrieben.

Nach 2 h Inkubation im Brutschrank erfolgte die Zugabe von 5 mg/ml Brefeldin A (*Penicillium brefeldianum*, Sigma Aldrich, Deutschland) und weitere 3 h Inkubation im Brutschrank, um die Sekretion der durch die Stimulation produzierten Zytokine zu unterdrücken. Brefeldin A ist ein Makrolid-Antibiotikum, das spezifisch die Translokation von Proteinen vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat unterbindet.

Die Zellen wurden aus den Wells in Eppendorf Röhren überführt, abzentrifugiert und mit 2% Formaldehyd fixiert. Nach 20min wurde der Fixierungsschritt durch waschen mit PBS gestoppt. Die Zellen wurden pelletiert und in PBS/BSA/Azid aufbewahrt.

Zur Zytokinmessung am Durchflusszytometer wurden die Zytokine IL-2 und IFN- γ intrazellulär angefärbt, weshalb zur Färbelösung Saponin (Sigma) gegeben wurde, das die Zellmembran permeabilisiert. Die Färbelösung wurde wie folgt angesetzt: 2,617 ml PBS/BSA, 300 μ l 5% Saponinlösung, 60 μ l Beriglobin (50 mg/ml), 7,5 μ l anti human IL-2APC (0,2 mg/ml), 15 μ l anti human IFN- γ FITC. Pro Eppendorf-Röhren wurden 100 μ l Färbelösung zugegeben und für 10 min auf Eis im Dunkeln inkubiert, anschließend wurden die Zellen in PBS/BSA gewaschen und am Durchflusszytometer gemessen.

2.11 Proliferation

Die Proliferation CD4 positiver T-Zellen wurde durch Färbung mit (6)-Carboxyfluorescein-Diacetate-Succinimidyl-Ester (CFDA-SE) untersucht. CFDA-SE bindet irreversibel an intrazelluläre Proteine, ohne die Zellfunktionen zu beeinträchtigen. Die initiale Fluoreszenz halbiert sich mit jeder Zellteilung, so dass die Tochtergenerationen jeweils abgegrenzt werden können. Vor der Färbung wurden die sortierten Zellen zweimal mit PBS gewaschen, um BSA-Reste zu entfernen, da der Farbstoff an Proteine bindet. Für die Färbung wurden die Zellen auf eine Konzentration von 1×10^7 /ml eingestellt. CFDA-SE war in einer Konzentration von 5 mM in DMSO gelöst und wurde in einer Endkonzentration von 1 μ M eingesetzt. Die Zellen wurden 3,5 min bei Raumtemperatur mit CFDA-SE inkubiert. Der Färbevorgang wurde mit mindestens der vierfachen Menge PBS/BSA abgestoppt. Die Zellen wurden abzentrifugiert und anschließend zweimal mit Zellkulturmedium gewaschen, um überschüssige Färbereste aus der Kultur zu entfernen. Die Zellen wurden erneut gezählt und auf eine Konzentration von 1×10^6 /ml eingestellt und mit 1 ml/Well auf eine 24-Well-Platte aufgeteilt. Infliximab wurde in Endkonzentrationen von 20, 10, 1, 0,1 und 0,01 μ g/ml zugegeben und die Zellkulturen wurden für eine halbe Stunde im Brutschrank bei 37°C vorinkubiert. Als Inhibierungskontrolle wurde ein Ansatz mit Cyclosporin A (CsA) 5 nM und als Stimulierungskontrolle ein Ansatz mit Aqua dest. mitgeführt. Anschließend wurden pro Well zur Stimulation 15 μ l CD3/28-Bead-Lösung zugegeben. Die Zellen wurden für 4 Tage in der Kultur belassen. Am dritten Tag wurde von jedem Well die Hälfte des Zellkulturmediums ausgetauscht. Am vierten Tag wurden die Zellen in Eppendorf-Röhrchen abgenommen, abzentrifugiert, zweimal gewaschen und anschließend am Durchflusszytometer gemessen.

2.12 Apoptose

Zur Messung der Apoptose wurde eine Doppelfärbung der Th-Zellen mit Annexin-V-FITC und Propidiumjodid (PJ) durchgeführt. Das Phospholipid bindende Protein Annexin-V detektiert Phosphatidylserin (PS). Phosphatidylserin wird in der frühen Phase der Apoptose von der Innenseite an die Außenseite der Zellmembran verschoben. PJ bindet an DNA-Fragmente

bei bereits nicht mehr intakter Zellmembran. Man ist durch die Doppelfärbung in der Lage, apoptotische und nekrotische Zellen voneinander zu unterscheiden. Für die Färbung wurde ein Apoptose–Kit (Annexin V–FITC Apoptosis Detection Kit 1, BD Pharmingen) verwendet.

Die T–Zellen wurden mit anti CD3–Antikörpern (an Zellkulturplatten gebunden) und anti CD28–Antikörpern, wie bereits beschrieben, stimuliert und im Brutschrank inkubiert. Nach 2 Tagen wurden sie aus der Kultur genommen, gewaschen, gezählt, auf eine Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml eingestellt und erneut auf Zellkulturplatten aufgeteilt. Infliximab wurde in Endkonzentrationen von 20, 10 und 1 $\mu\text{g/ml}$ zugegeben und die Zellen wurden für 24 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Die Zellen wurden aus den Kulturplatten in Eppendorf–Röhrchen überführt und zweimal in PBS gewaschen. Anschließend wurden sie in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml in 1:10 mit Aqua dest. verdünntem Bindungs–Puffer resuspendiert. Der Puffer enthält Calcium, da Annexin nur in Anwesenheit von Calcium an Phosphatidylserin bindet. Von der Zellsuspension wurden 100 μl , also 1×10^5 Zellen abgenommen, je 5 μl Annexin–V–FITC und PJ wurden zugegeben. Die Zellsuspension wurde vorsichtig gemischt und für 15 min im Dunkeln inkubiert. 500 μl von dem 1:10 verdünnten Bindungs–Puffer wurden zugegeben und die gefärbten Zellen wurden innerhalb einer Stunde am Durchflusszytometer gemessen, da PJ toxisch auf die Zellen wirkt.

2.13 Sauerstoffverbrauchsmessung

Der Sauerstoffverbrauch der T–Zellen als Parameter des Zellmetabolismus wurde mittels einer Clark–Elektrode gemessen (Strathkelvin Instruments, Glasgow, Großbritannien). Die amperometrische Messung beruht auf der Reduktion von Sauerstoff an einer Goldelektrode (Kathode) zu Wasser. An der Kathode wird eine Spannung angelegt, durch die Reduktion von Sauerstoff entsteht ein Stromfluß. Aus der Messlösung strömt durch den entstehenden Konzentrationsgradienten Sauerstoff nach. Die pro Zeiteinheit an der Kathode reduzierte Sauerstoffmenge, messbar durch den Stromfluss, ist proportional zum Sauerstoffgehalt des Messmediums.

Die Kalibrierung der Elektrode auf 100 % Sauerstoffgehalt erfolgte durch

Luftsauerstoff-gesättigtes Zellkulturmedium. Dessen Sauerstoffgehalt beträgt bei 37 °C 211 µM, weil sich bei normalem Luftdruck, 20,9 % Sauerstoffgehalt der Luft und 37 °C maximal 4,7 ml Sauerstoff in 1 l Zellkulturmedium lösen. Nach ausreichender Äquilibrierung waren so 147,7 nmol Sauerstoff in 0,7 ml der Zell-Suspension gelöst.

Bei der Sauerstoffverbrauchsmessung wurden 700 µl Zellsuspension (0,5–1,5x10⁷ Zellen/ml) in die Messkammer gegeben. Während der Messung war die Zellsuspension durch ein angeschlossenes Thermostat (Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland) auf 37 °C temperiert. Ein integriertes Rührsystem (Janke & Kunkel GmbH & Co. KG-IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland) gewährleistete eine ausreichende Äquilibrierung mit Luftsauerstoff, eine kontinuierliche Durchmischung und eine optimale Diffusion des Sauerstoffs zur Elektrode. Der sich infolge der Zellatmung kontinuierlich vermindern Sauerstoffgehalt der Messlösung wurde über ein angeschlossenes Sauerstoffmessgerät mit integriertem Schreiber (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Schweden) als Anstieg einer Kurve registriert. Ixf wurde in steigender Konzentration zur Zelllösung gegeben, so dass Endkonzentrationen von 0,01; 0,1; 1; 10; und 20 µg/ml entstanden. Als Kontrolle wurde Aqua dest. (Lösungsmittel von Ixf) zugegeben.

Die Berechnung des Sauerstoffverbrauchs erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{O}_2 - \text{Verbrauch} [\text{nmol}/\text{min}/10^7 \text{Zellen}] = \frac{\text{Dx} [\text{cm}/\text{min}] \times 147,7 [\text{nmol}]}{\text{D}_{100\%} [\text{cm}] \times c}$$

c = Zellzahl, D100 % = Meßbereich, Dx = Anstieg der Kurve

2.14 Procedere für den Vergleich TNF- α - und krankheitsregulierter Gene

2.14.1 Differentiell exprimierte Gene durch TNF- α

Es wurde in der Internetdatenbank PubMed nach Veröffentlichungen gesucht, in denen TNF- α regulierte Gene beschrieben worden sind. Es wurden ausschließlich Gene in humanen Zellen und Zelllinien eingeschlossen und aus den publizierten Genen wurde eine Liste erstellt. Die durch TNF- α exprimierten Gene aus der Literatur sollten mit Genen verglichen werden, die in Monozyten von Patienten mit entzündlichen Erkrankungen exprimiert werden. Ideal für diesen Vergleich wären Untersuchungen in Monozyten gewesen, diese sind jedoch in der derzeitigen Literatur nicht beschrieben.

Die 508 gefundenen, TNF- α regulierten Gene kamen aus den folgenden Veröffentlichungen: (Buntinx et al., 2004; Gallagher et al., 2003; Osawa et al., 2002; Pedron et al., 2003; Roy et al., 2005; Shi et al., 2004; Viemann et al., 2004; Yamamoto et al., 2004; Zhang et al., 2004). Um die Gene untereinander vergleichen zu können, wurde als Bezeichnung für jedes Gen die Affymetrix Identifizierung (Affy. ID) bestimmt. Aus der Literatur ergab sich eine Liste mit 345 verschiedenen Affy. IDs von TNF- α differentiell exprimierten Genen.

2.14.2 Differentiell durch entzündliche Erkrankungen exprimierte Gene

Die durch TNF- α differentiell exprimierten Genen wurden mit einer Genliste, die von den krankheitsregulierten Genen erstellt worden waren, verglichen.

Die Genlisten wurden im Rahmen eines anderen Projektes (Grützkuh et al., Artikel eingereicht zur Publikation) erhoben und für diesen Vergleich freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die folgenden methodischen Beschreibungen sind dem eben genannten Artikel entnommen.

Die Genlisten der krankheitsregulierten Gene stammen aus Monozyten von mehr als 100 Patienten mit den entzündlichen Erkrankungen Rheumatoide Arthritis (RA), Osteoarthritis (OA), Systemischer Lupus erythematoses (SLE), Ankylosierende Spondylitis (AS) und Normal Spendern als Kontrollen.

Alle Patienten befanden sich in einem aktiven Krankheitsstadium. Die Krankheitsaktivität war mittels krankheitsspezifischer Scores erhoben worden

(z.B. DAS, BASDAI, SLEDAI). Die Patienten erhielten je nach Erkrankung unterschiedliche medikamentöse Therapien (u.a. NSAID, Methotrexat, Prednisolon). Die RA, SLE und AS Patienten hatten erhöhte Entzündungsparameter (C-reaktives Protein, Blutsenkungsgeschwindigkeit). Die OA Patienten hatten eine Kniegelenksarthrose im Endstadium und warteten auf eine Endoprothesenoperation. Die Kontrollgruppe waren gesunde Spender im Alter von 20–60 Jahren, die keine Entzündungszeichen zeigten und keine Medikamente einnahmen.

Die krankheitsinduzierten Gene wurden von Grützkau et al. durch die im folgenden Abschnitt kurz skizzierten Methoden erhoben.

Es wurden von Patienten und Kontrollen jeweils 100 ml Blut entnommen und durch kombinierte MACS und FACS Sortierung wurden Monozyten (CD14 positiv), T-Helfer-Lymphozyten (CD4 positiv), zytotoxische T-Lymphozyten (CD8 positiv), Granulozyten (CD15 positiv) und NK-Zellen (CD3-/CD56 positiv) gewonnen. Die Reinheit und Viabilität nach der Sortierung betrug mehr als 98%. Die Transkriptionsanalyse der Monozyten wurde mit HGU133A Microarrays von Affymetrix durchgeführt.

Die Liste der differentiell durch Krankheiten exprimierten Gene in Monozyten umfasst 1930 Affy IDs.

2.15 Statistik

Für alle Messungen wurden jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen angegeben. Bei den Apoptosemessungen wurde der Wilcoxon Test für verbundene Stichproben verwendet. Es lagen verbundene Stichproben vor, da der Messwert jeweils mit der Kontrolle verglichen wurde, die aus demselben Leukozytenfilter, also vom selben Probanden stammt.

Der erforderliche Test konnte nur für die Apoptosemessungen angewendet werden, da für die anderen Messungen die Stichprobengröße unter der für den Test erforderlichen Anzahl von $n=6$ lag.

3 ERGEBNISSE

3.1 mTNF- α

TNF- α wird intrazellulär synthetisiert und an der Zelloberfläche als membranständiges TNF- α (mTNF- α) exprimiert. Von dem mTNF- α an der Zelloberfläche wird durch ein Enzym (TACE) das lösliche TNF- α (sTNF- α) abgespalten.

Das membranständige TNF- α sollte auf Th-Zellen mit Hilfe von fluoreszenzgekoppeltem Infliximab nachgewiesen werden.

Zunächst wurde untersucht, ob mTNF- α auf unstimulierten oder PMA/Ionomycin stimulierten Zellen exprimiert wird. Dazu wurde ein Färbesystem etabliert, das durch verschiedene Kontrollen überprüft wurde. Die erste Kontrolle waren ungefärbte Zellen. Mit der Isotypkontrolle (Antikörper gegen humanes IgG1) wurde die Spezifität der Färbung überprüft. Durch die Zugabe eines Überschusses von löslichem TNF- α wurde gezeigt, dass es sich nicht um eine Färbung von an TNF Rezeptoren gebundenes sTNF- α handelt (in der Abb. 3 nicht gezeigt). Und schließlich konnte die Färbung mit der Zugabe von ungekoppeltem Infliximab vor der Zugabe des FITC gekoppelten Infliximab blockiert werden (Abb. 3).

Es zeigte sich, dass mTNF- α nur auf stimulierten Th-Zellen exprimiert wird.

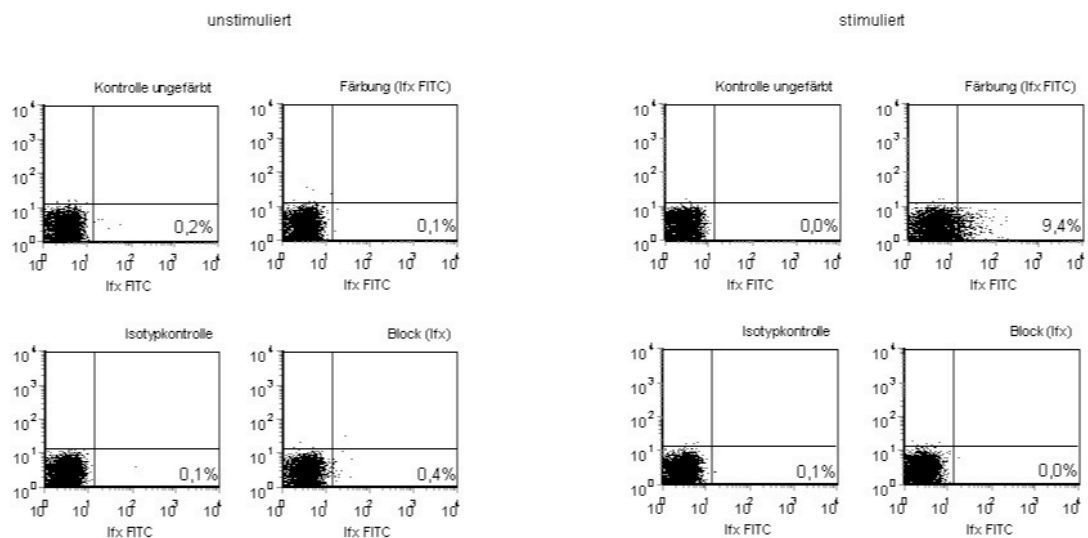


Abb. 3: mTNF- α Expression. Durchflusszytometrische Messung der IfxFITC Färbung und der entsprechenden Kontrollen von PMA/Ionomycin stimulierten (6h) und unstimulierten Th-Zellen.

Anschließend wurde untersucht, wie sich die Kinetik der mTNF- α Expression auf den Th-Zellen über einen Zeitraum von fünf Tagen darstellt. Dazu wurde eine Messung pro Tag durchgeführt. Zur Sicherstellung des langen Überlebens der Zellen wurde nicht mit PMA/Ionomycin sondern mit anti CD3/CD28 Antikörpern stimuliert. Diese Stimulation ähnelt der physiologischen Situation in vivo, wo zur Aktivierung der T-Zellen neben dem T-Zell-Rezeptor (CD3) ein kostimulatorisches Signal über das Oberflächenmolekül CD28 nötig ist.

Sortierte Th-Zellen wurden mit anti CD3/CD28 Antikörpern, an Zellkulturplatten gekoppelt, stimuliert und inkubiert. Nach 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h wurden jeweils Zellaliquots entnommen und gefärbt. Die Färbung erfolgte mit den Kontrollen des weiter oben beschriebenen Färbesystems. Parallel dazu wurden jeweils unstimulierte Zellen entsprechend behandelt. Auch sie wurden in Zellkulturplatten inkubiert und zu den Messzeitpunkten parallel zu den stimulierten Zellen gefärbt und durchflusszytometrisch gemessen.

Die unstimulierten T-Zellen exprimierten kein mTNF- α , für die stimulierten Zellen konnte die in Abb. 4 dargestellte Kinetik gemessen werden (n=4).

Nach 24 h Stimulation waren 4,3% ($\pm 1,2\%$) der Th-Zellen Ix-Cy5 positiv, nach 48 h 10,3% ($\pm 2,6\%$), nach 72 h Stimulation war mit 11,9% ($\pm 0,9\%$) gefärbter Zellen das Maximum der mTNF-Expression erreicht. Nach 96 h waren nur noch 5,5% ($\pm 2,1\%$) mTNF positiv und nach 120 h 3,1% ($\pm 2,1\%$) (Abb. 4).

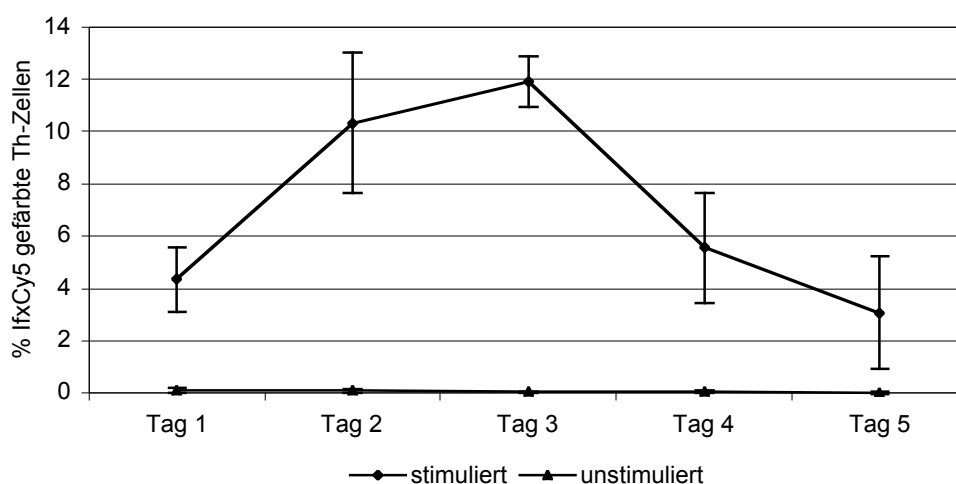


Abb. 4: mTNF- α -Kinetik. mTNF- α Färbungen, durchgeführt mit Infliximab an Cy5 gekoppelt in unstimulierten und CD3/CD28 stimulierten Th-Zellen. Es werden Mittelwerte und Standardabweichungen von Zellen aus 4 verschiedenen Leukozytenfiltern gesunder Blutspender gezeigt.

3.2 Wirkungen von Infliximab auf CD4 positive T-Zellen

3.2.1 Sauerstoffverbrauch

Die Sauerstoffverbrauchsmessung dient als ein Maß für den Zellmetabolismus. CD4 positive T-Zellen wurden in der Messkammer unter ständiger Durchmischung durch einen Magnetrührer inkubiert. Der Sauerstoffverbrauch wurde erst ohne Zugabe von Infliximab bestimmt. Anschließend wurde Infliximab in steigenden Konzentrationen (0,01 µg/ml–120 µg/ml) so zur Messlösung gegeben, dass die jeweils angegebenen Endkonzentrationen entstanden.

Der Sauerstoffverbrauch der Th-Zellen veränderte sich durch die Zugabe von Infliximab nicht signifikant. Dies gilt sowohl für unstimulierte Zellen, als auch für PMA/Ionomycin stimulierte Zellen (Abb. 5).

Ohne Infliximab betrug der Sauerstoffverbrauch bei unstimulierten Zellen 1,81 nmol O₂/min/10⁷ Zellen (± 0,46), mit 0,01 µg/ml Infliximab 1,79 nmol O₂/min/10⁷ Zellen (± 0,39), mit 0,1 µg/ml Infliximab 1,65 nmol O₂/min/10⁷ Zellen (± 0,6), mit 1 µg/ml Infliximab 1,73 nmol O₂/min/10⁷ Zellen (± 0,25), mit 10 µg/ml Infliximab 1,62 nmol O₂/min/10⁷ Zellen (± 0,23), mit 20 µg/ml Infliximab 1,52 nmol O₂/min/10⁷ Zellen (± 0,26) und mit 120 µg/ml Infliximab 1,67 nmol O₂/min/10⁷ Zellen (± 0,23). Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen von vier verschiedenen Leukozytenfiltern gesunder Blutspender (n=4).

Für die PMA/Ionomycin stimulierten Zellen wurde ohne Infliximab ein Sauerstoffverbrauch von 1,3 nmol O₂/min/10⁷ Zellen (± 0,5) gemessen, mit 0,01 µg/ml Infliximab sank der Verbrauch leicht auf 1,23 nmol O₂/min/10⁷ Zellen (± 0,46) mit 0,1 µg/ml Infliximab auf 1,2 nmol O₂/min/10⁷ Zellen (± 0,46) mit 1 µg/ml Infliximab auf 1,15 nmol O₂/min/10⁷ Zellen (± 0,42) , mit 10 µg/ml Infliximab auf 1,12 nmol O₂/min/10⁷ Zellen (± 0,4), mit 20 µg/ml Infliximab auf 1,09 nmol O₂/min/10⁷ Zellen (± 0,39) und mit 120 µg/ml Infliximab auf 1,07 nmol O₂/min/10⁷ Zellen (± 0,38). Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen von Th-Zellen aus drei verschiedenen Leukozytenfiltern gesunder Blutspender (n=3).

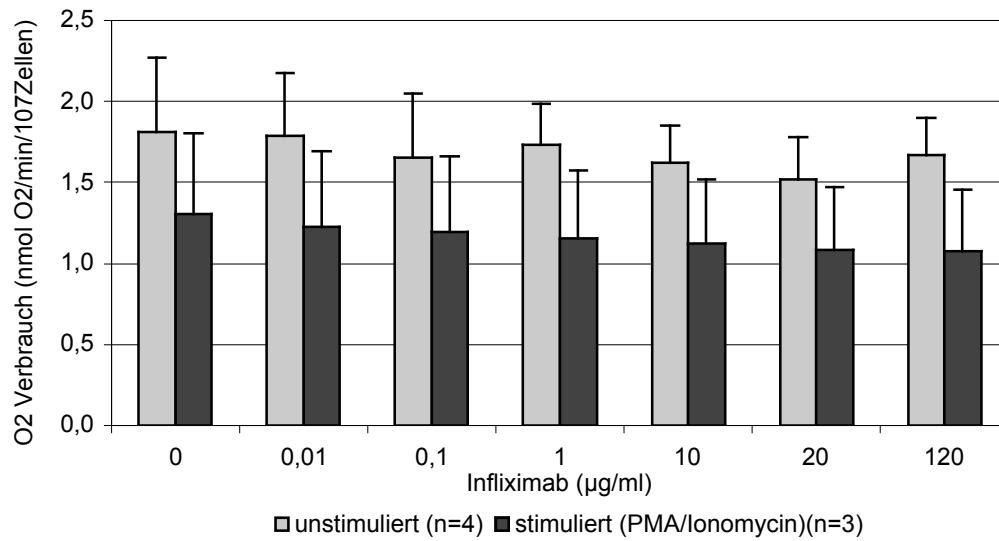


Abb. 5: Sauerstoffverbrauch. Effekt von Infliximab in verschiedenen Konzentrationen auf den absoluten Sauerstoffverbrauch von unstimulierten (n=4) und PMA/Ionomycin stimulierten (n=3) humanen CD4 positiven T-Zellen, angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen.

3.2.2 Zytokinsynthese

Es wurde untersucht, welchen Einfluss Infliximab auf die Zytokinproduktion von Th-Zellen hat. Dazu wurden CD4 sortierte Th-Zellen unter verschiedenen Bedingungen mit 20 µg/ml Infliximab inkubiert. Es wurden vier verschiedene Ansätze mit unterschiedlichen Inkubationszeiten gewählt. Infliximab wurde 12 Stunden (1. Ansatz) und eine Stunde (2. Ansatz) vor der Stimulation zu den Th-Zellen gegeben und bei 37°C im Brutschrank vorinkubiert, um kostimulatorische Effekte des Infliximab auf die Zellen zu erfassen. Für den 3. Ansatz wurde Infliximab gleichzeitig mit den stimulierenden Substanzen zur Kultur gegeben, für den 4. Ansatz eine Stunde nach der Stimulation.

Die vier verschiedenen Ansätze wurden für 5 h bei 37°C mit PMA/Ionomycin stimuliert. Nach dieser Zeit wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Anschließend wurden die Zytokine Interleukin-2 und Interferon-γ intrazellulär angefärbt und mittels Durchflusszytometrie gemessen.

Es zeigte sich, dass Infliximab unabhängig vom Zeitpunkt der Zugabe bei stimulierten Th-Zellen im Vergleich zur Kontrolle keinen Einfluss auf die Produktion von IL-2 und IFN-γ hat. Die Daten stammen aus 3 verschiedenen Leukozytenfiltern gesunder Blutspender (Abb.6).

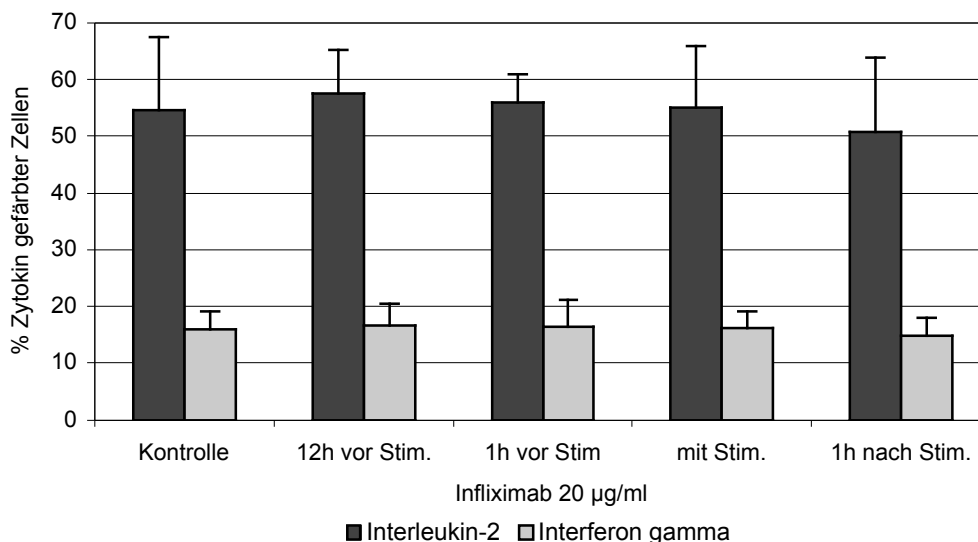


Abb. 6: Zytokinsynthese. Es wird die Wirkung von Infliximab, zugegeben zu verschiedenen Zeitpunkten, auf die Zytokinproduktion (IL-2, IFN-γ) von PMA/Ionomycin stimulierten Th-Zellen gezeigt. Es sind Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 verschiedenen Leukozytenfiltern angegeben.

Außerdem konnte auch bei unstimulierten CD4 positiven T-Zellen kein stimulatorischer Effekt des Infliximab Antikörpers gezeigt werden. Bei diesen Proben war keinerlei Zytokinproduktion nachweisbar. Ohne Infliximab waren 0,06% (\pm 0,02%) der unstimulierten Zellen IL-2 APC positiv und 0,3% (\pm 0,04%) IFN- γ FITC positiv. Bei Inkubation mit 20 μ g/ml Infliximab waren 0,06% (\pm 0,01%) der unstimulierten Zellen IL-2 und 0,6% (\pm 0,3%) IFN- γ positiv. Auch die Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen Infliximab zeigte im Vergleich zur Kontrolle keinen Unterschied in der Zytokinsynthese. Die stimulierten Zellen ohne Infliximab waren zu 70,8% (\pm 0,9%) IL-2 APC positiv, bei Inkubation mit 20 μ g/ml Infliximab produzierten 62,8% (\pm 5,5%) der Zellen IL-2, bei 10 μ g/ml Infliximab 70,2% (\pm 2,5%) und bei 1 μ g/ml Infliximab 70,4% (\pm 0,8%) der Zellen. 15,9% (\pm 0,3%) der stimulierten Zellen ohne Infliximab waren IFN- γ FITC positiv. Mit 20 μ g/ml Infliximab waren 14,6% (\pm 1,4%) der Zellen IFN- γ positiv, mit 10 μ g/ml Infliximab 15,6% (\pm 1,1%) und mit 1 μ g/ml Infliximab 14,9% (\pm 0,5%) (Abb. 7).

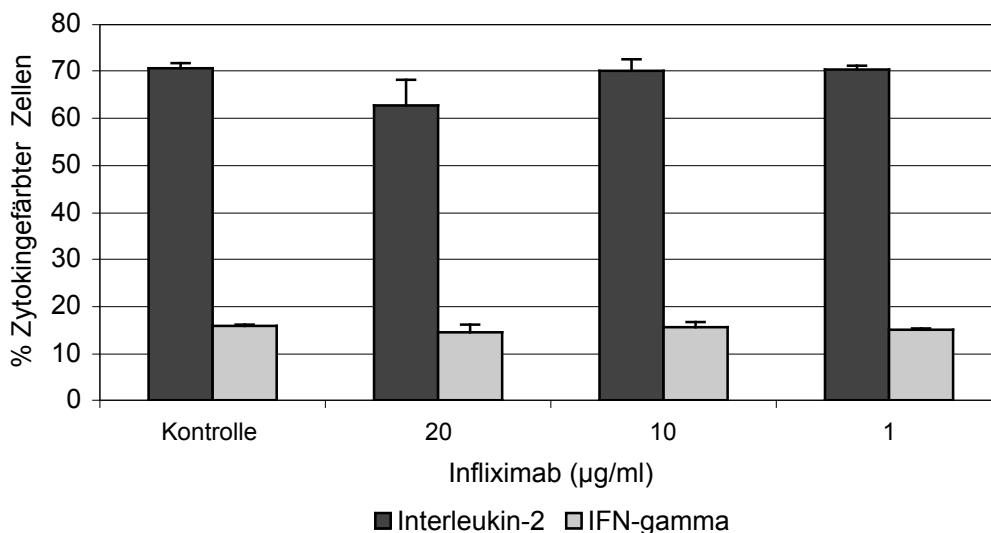


Abb. 7: Zytokinmessung. Auswirkungen von Infliximab in verschiedenen Konzentrationen auf die Zytokinproduktion (IL-2, IFN- γ) von Th-Zellen eines Leukozytenfilters, angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung von drei Messungen eines Ansatzes.

Die Angaben sind Mittelwerte aus je drei Messungen pro Ansatz von Zellen eines Filters. Auf weitere Ansätze mit anderen Filtern wurde verzichtet, da die Messungen bei drei verschiedenen Filtern keinen Unterschied zwischen den Mittelwerten nach Zugabe von 20 µg/ml Infliximab und der Kontrolle zeigten (siehe Abb. 6/7).

3.2.3 Proliferation

Es wurde untersucht, ob Infliximab einen Einfluss auf die Proliferation von Th-Zellen hat.

Aus drei verschiedenen Leukozytenfiltern gesunder Blutspender wurden Th-Zellen isoliert, mit CFDA-SE (Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester) gefärbt und anschließend stimuliert (unter Benutzung von anti CD3/CD28 Antikörpern, gekoppelt an Beads). Infliximab wurde in verschiedenen Konzentrationen der Kultur zugesetzt (20 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml, 0,1 µg/ml, 0,01 µg/ml). Für jede Konzentration wurde eine Doppelbestimmung vorgenommen. Die Zellen wurden für vier Tage bei 37°C inkubiert, anschließend wurden im Durchflusszytometer die CFDA-SE gefärbten Zellen gemessen.

Als Inhibierungskontrolle wurden 5 nM Cyclosporin A, welches die Proliferation hemmt, zu den Zellen gegeben.

In der Auswertung wurden die einzelnen Generationen sorgfältig diskriminiert und die Prozentzahlen der proliferierten Zellen in den Generationen erfasst.

Es zeigte sich kein Effekt von Infliximab auf die Proliferation von CD4 positiven T-Zellen (Abb. 8).

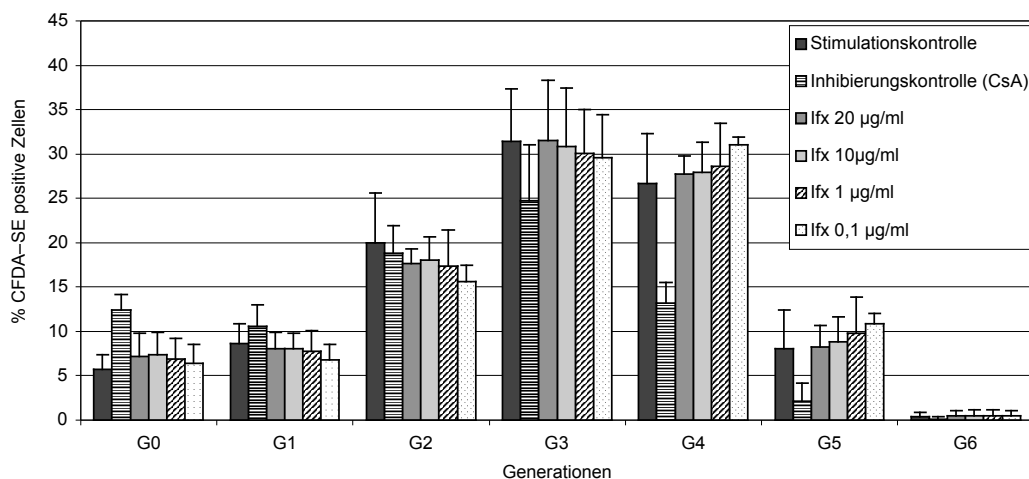


Abb. 8: Proliferation I. Einfluss von Ifx in verschiedenen Konzentrationen auf die Proliferation von anti CD3/CD28 stimulierten Th-Zellen. Angegeben sind die Prozentanteile der proliferierten Zellen in den einzelnen Generationen. Es werden die Mittelwerte und Standardabweichungen von Doppelbestimmungen pro Ansatz aus 3 Leukozytenfiltern gezeigt.

Interessanterweise deutete sich an, dass je niedriger die Konzentration des zugegebenen Infliximab war, desto mehr Zellen konnten in der 5. Generation gemessen werden. Dies soll die folgende Abbildung verdeutlichen, bei der nur die höchste (20 µg/ml) und die niedrigste (0,01 µg/ml) gemessene Konzentration Infliximab im Vergleich zur Stimulationskontrolle dargestellt wird. Es zeigte sich eine Tendenz für einen leichten stimulatorischen Effekt von Infliximab auf die Proliferation. Allerdings konnte für die geringe Fallzahl (n=3) keine Signifikanz errechnet werden.

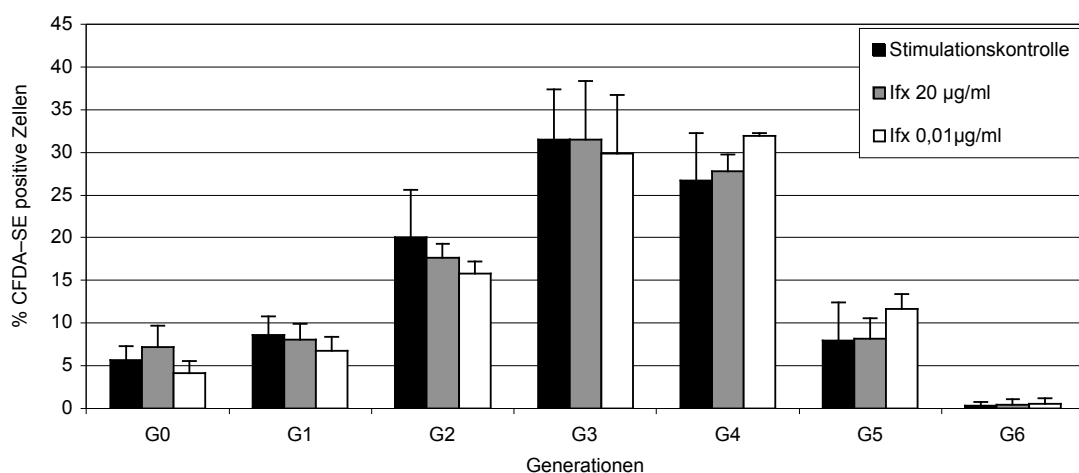


Abb. 9: Proliferation II. Wirkung der höchsten (20 µg/ml) und der niedrigsten (0,01 µg/ml) Konzentration Ifx auf die Proliferation von Th-Zellen im Vergleich zur Stimulationskontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von Doppelbestimmungen pro Ansatz aus 3 verschiedenen Leukozytenfiltern.

3.2.4 Apoptose

Es wurde die Wirkung von Infliximab auf die Apoptoserate von Th-Zellen untersucht. Als Positivkontrolle für das Apoptoseassay diente der Translationsinhibitor Camptothecin. Gut reproduzierbar ist dabei die Induktion von Apoptose in Jurkat Zellen, einer humanen Tumorzelllinie.

Die Inkubationszeit von 20–24 h, die für das Assay mit Infliximab gewählt wurde, ist für Camptothecin zu lang, da nach dieser Zeit die Zellen bereits Annexin V und Propidium Jodid (PJ) positiv sind. Das zeigt, dass sie nicht mehr primär apoptotisch, sondern bereits nekrotisch sind. Annexin-V detektiert Phosphatidylserin, das in der frühen Phase der Apoptose messbar ist. PJ bindet an DNA-Fragmente bei nicht mehr intakter Zellmembran nekrotischer Zellen.

Deshalb wurden die Jurkat Zellen nur für 4 h mit Camptothecin in Konzentrationen von 12–50 μM bei 37°C inkubiert. Nach dieser Zeit betrug die Spontanapoptoserate 7,3%. Camptothecin induzierte in einer Konzentration von 12 μM in 48,4% der Zellen Apoptose.

Für die Positivkontrolle in Th-Zellen wurde für Camptothecin aus den oben genannten Gründen eine Inkubationszeit von 6h gewählt. Nach dieser Zeit waren jedoch nur 11,7 ($\pm 5,8$)% der sortierten Th-Zellen Annexin V FITC positiv (n=4) (Abb. 10).

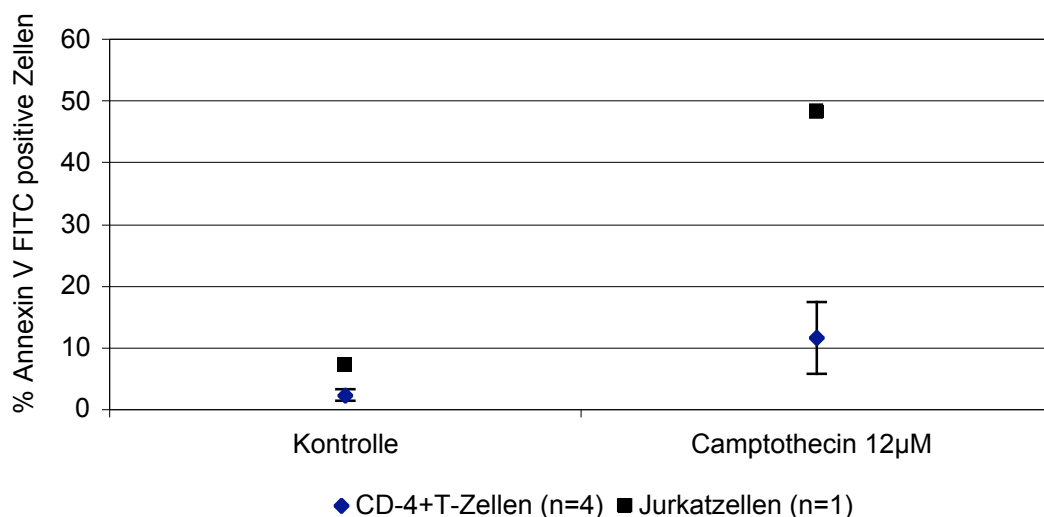


Abb. 10: Kontrollversuch des Apoptoseassays. Gezeigt wird die Induktion von Apoptose in Jurkatzellen (n=1) und Th-Zellen (n=4) mit dem Translationsinhibitor Camptothecin, angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen.

Die Abbildung 11 zeigt den Einfluss von Infliximab auf die Apoptoseinduktion in stimulierten CD4 positiven T-Zellen. Die Zellen wurden entsprechend der mTNF-Kinetik 2 Tage mit CD3/CD28 stimuliert, damit eine maximale mTNF- α Expression erreicht wurde.

Die Zellen wurden aus der Kultur genommen und gewaschen, um im Überstand vorhandene, beeinflussende Faktoren, wie lösliches TNF aus der Kultur zu entfernen. Dann wurde Infliximab in verschiedenen Konzentrationen (20 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml) zugegeben und für 20 bis 24 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Annexin V FITC und Propidium Jodid (PJ) gefärbt. Die Annexin V FITC positiven, aber PJ negativen Zellen stellen den Anteil der primär apoptotischen Zellen dar und werden hier abgebildet (Abb. 11).

In 6 Ansätzen von unterschiedlichen Leukozytenfiltern gesunder Blutspender betrug die Apoptoserate der Kontrolle ohne Infliximab 2,3% (\pm 0,9%) Annexin V FITC positive T-Zellen, die Zugabe von Infliximab in verschiedenen Konzentrationen hatte keinen Einfluss auf die Apoptoserate. Bei lfx 1 μ g/ml wurden 2,2% (\pm 0,8%) Annexin V FITC positive T-Zellen gemessen, bei lfx 10 μ g/ml 2% (\pm 0,4%) und bei lfx 20 μ g/ml 2,2% (\pm 0,7%).

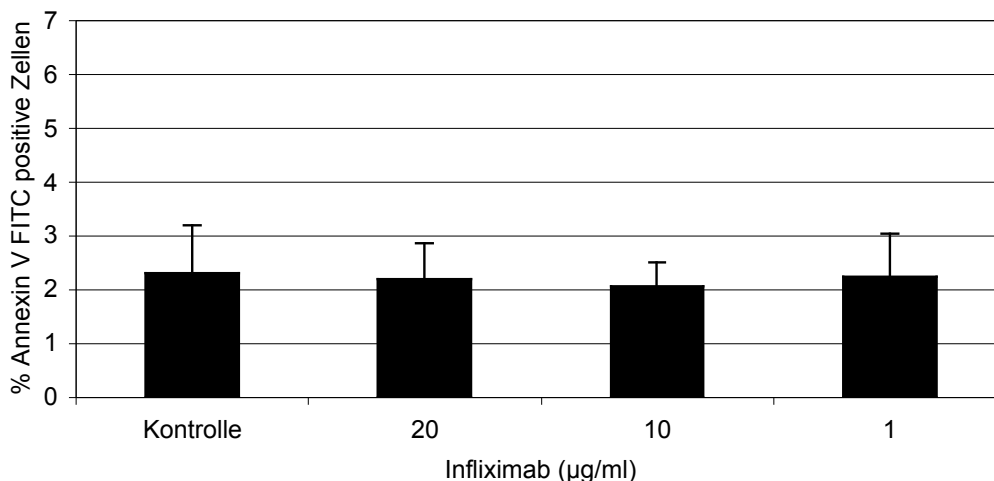


Abb. 11: Apoptosemessung. Th-Zellen wurden 48 h mit anti CD3/CD28 Antikörpern stimuliert. Anschließend wurden sie 20–24 h mit lfx in verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen von 6 Ansätzen aus verschiedenen Leukozytenfiltern.

3.3 Vergleich von TNF- α - und krankheitsregulierten Genen

3.3.1 TNF- α differentiell exprimierte Gene in der Literatur

Für den Vergleich von TNF- α - und krankheitsregulierten Genen wurde eine Genliste aus Literaturdaten erstellt. Das Vorgehen ist schematisch in Abbildung 12 dargestellt.

In der Literatur fanden sich 9 Artikel zum Thema der TNF- α regulierten Genexpression in humanen Zellen. In den 9 Artikeln wurden 508 Gene als durch TNF- α differentiell exprimiert beschrieben. Es wurden die 345 Affymetrix Identifizierungen (ID`s) dieser Gene verwendet, um eine Vergleichbarkeit mit den krankheitsregulierten Genen zu ermöglichen. Manche Gene sind mit unterschiedlichen Namen bekannt, daher die unterschiedliche Anzahl von Genen und Affymetrix ID`s. Von diesen 345 Affymetrix ID`s waren bei dem Vergleich 97 Gene auch in der Liste der krankheitsregulierten Gene zu finden. Das heißt 28,1% der durch TNF- α differentiell exprimierten Gene finden sich unter den krankheitsregulierten Genen wieder. Unter diesen 97 übereinstimmenden TNF- α - und krankheitsregulierten Genen sind 22, die in mehr als einem der verwendeten Artikel erwähnt sind.

Die in den verwendeten Artikeln vorkommenden humanen Zellen waren fetale Hepatozyten (Hc), eine Oligodendroglioma Zelllinie (HOG), vaskuläre Endothelzellen (HUVEC), eine intestinale Epithelzellreihe (Caco-2), primäre Synoviozyten, rheumatische synoviale Fibroblasten (RASf), microvaskuläre Endothelzellen (HMEC-1) und Chondrosarkoma Zellen (SW 1353).

Die krankheitsregulierten Gene stammten aus einer Arbeit von Grützkau et al., die zur Publikation eingereicht ist. Sie wurden für diesen Vergleich freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Genexpressionen wurden in Monozyten von Patienten mit Rheumatoider Arthritis (RA), Osteoarthritis (OA), Systemischem Lupus erythematodes (SLE) und Ankylosierender Spondylitis (AS) gemessen.

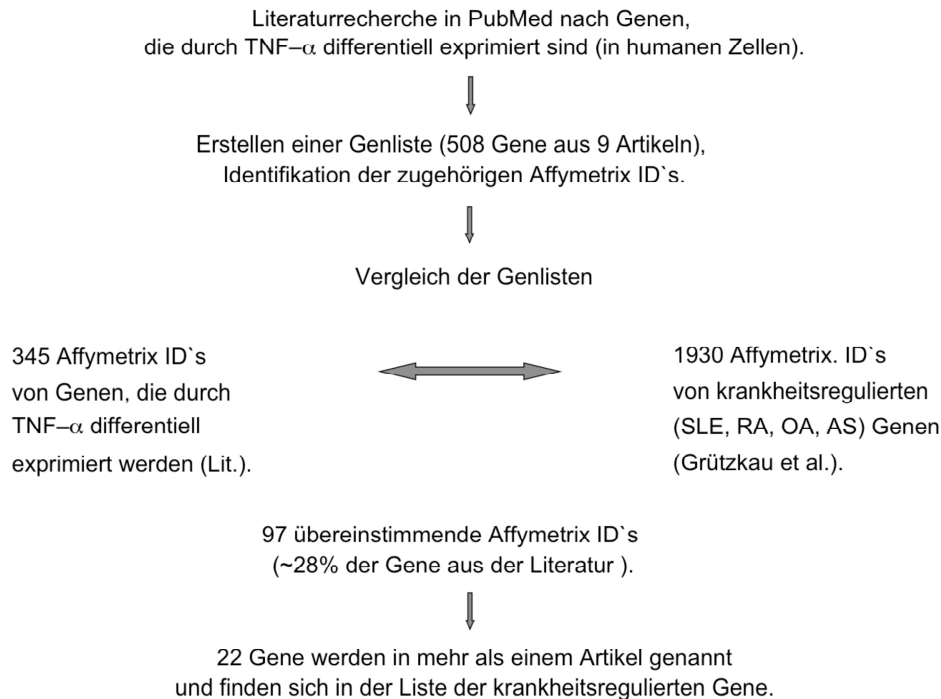


Abb. 12: Vergleich TNF- α - und krankheitsregulierter Gene. Procedere zum Erstellen und Vergleichen der Listen von differentiell durch TNF- α - und entzündliche Erkrankungen exprimierten Genen.

3.3.2 Ausgewählte übereinstimmende Gene

Unter den 97 übereinstimmenden TNF- α - und krankheitsregulierten Genen sind 22, die ausgewählt wurden, da sie in mehr als einem der verwendeten Artikel erwähnt sind. Diese Auswahl wurde getroffen, um sich orientierend zuerst mit besonders relevanten Genen zu beschäftigen.

Unter den 22 ausgewählten Genen finden sich einige, die bei intrazellulären Signalübertragungsprozessen wichtige Funktionen inne haben. Dazu gehören Gene, wie STAT 1, und NF κ B 1 und 2. Weiter finden sich Gene, die für Zytokine (IL-1B, IL-15) und für Rezeptoren und Liganden codieren, unter anderem ICAM 1 und CXCL 1, 2 und 10 und Gene aus der TNF Familie (TNFSF 10 oder TRAIL und TNFAIP 2 und 3).

Sie sind in Tabelle 3 bezüglich ihrer Funktion geordnet zusammengefasst.

Tab. 3: Differentiell exprimierte Gene. Gene, die differentiell durch TNF- α exprimiert werden, in der Literatur (in mehr als einem Artikel genannt) sind und durch die Erkrankungen RA, OA, SLE und AS reguliert werden.

Signaling	
STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa
JUNB	Jun B proto-oncogene
NFKBIA	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha
NFKB1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 (p105)
NFKB2	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2 (p49/p100)
Zytokine	
IL1B	Interleukin 1, beta
IL15	Interleukin 15
Rezeptor/Ligand	
ICAM1	Intercellular adhesion molecule 1 (CD54), human rhinovirus receptor
CXCL1	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha)
CXCL10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10
CXCL2	Chemokine (C-X-C motif) ligand 2
CCL2	Chemokine (C-C motif) ligand 2
IFN Antwort	
MGC27165	Hypothetical protein MGC27165
G1P2	Interferon, alpha-inducible protein (clone IFI-15K)
MX2	Myxovirus (influenza virus) resistance 2 (mouse)
TNF Familie	
TNFSF10	Tumornekrosefaktor (Ligand) superfamily, member 10
TNFAIP2	Tumornekrosefaktor alpha-induziertes Protein 2
TNFAIP3	Tumornekrosefaktor alpha-induziertes Protein 3
Weitere	
PFKFB3	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3
AKAP9	A kinase (PRKA) anchor protein (yotiao) 9
CALR	Calreticulin
IER3	Immediate early response 3

3.3.3 Verteilung der TNF- α regulierten Gene in den Erkrankungen

Es wurde weiter betrachtet, ob die TNF- α regulierten Gene aus der Literatur in einer der Erkrankungen vermehrt exprimiert werden. So wäre zum Beispiel zu vermuten, dass sich mehr Übereinstimmungen der TNF- α regulierten Gene mit den RA regulierten Genen finden würden. Dies kann vermutet werden, da TNF- α in der Pathogenese insbesondere dieser Erkrankung eine wesentliche Rolle spielt. Es zeigte sich aber, dass die Verteilung der ausgewählten durch TNF- α differentiell exprimierten Gene aus der Literatur in den einzelnen Erkrankungen ungefähr gleich war. Von den 22 TNF- α regulierten Genen finden sich 11 in der Gruppe der RA Patienten, 15 bei den OA Patienten, und 12 in der Gruppe der SLE Patienten (Abb. 13). Die Gruppe der AS Patienten bildet eine Ausnahme, hier finden sich nur 2 der 22 TNF- α regulierten Gene. Einige Gene aus der Literatur waren in mehreren Erkrankungen wiederzufinden, so kommt die 22 übersteigende Gesamtzahl der Gene in der Abbildung zustande. Die krankheitsregulierte Genexpression wurde im Vergleich zu Normal Spendern (Normal Donor, ND) ermittelt.

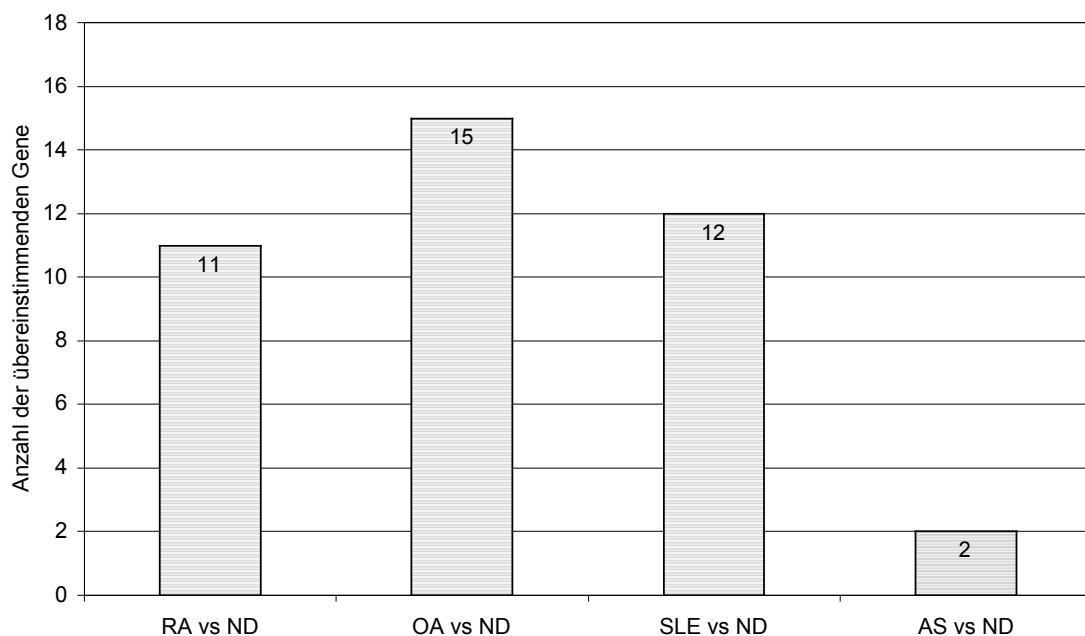


Abb. 13: Anzahl der übereinstimmenden Gene nach Erkrankungen geordnet. Verteilung der durch TNF- α differentiell exprimierten Gene aus der Literatur (Liste der 22 Gene) in den einzelnen Erkrankungen (RA, OA, SLE, AS jeweils im Vergleich zu Normal Spendern, ND). Einige Gene aus der Literatur sind bei mehreren Erkrankungen exprimiert.

4 DISKUSSION

4.1 mTNF- α und Reverses Signaling

Es wird in der Literatur immer wieder die Frage aufgeworfen, ob mTNF- α für die Infliximab-Effekte bei der Behandlung von Autoimmunerkrankungen eine Rolle spielt. Membranständiges TNF- α wird als Vorläufer des löslichen sTNF- α auf verschiedenen Immunzellen exprimiert, unter anderem auf den, in dieser Arbeit untersuchten, Th-Zellen. In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit im Kontext mit den derzeitigen Erkenntnissen über die Expression von mTNF- α diskutiert. Dabei wird vor allem der Zusammenhang von mTNF- α und dem Reversen Signaling berücksichtigt.

4.1.1 mTNF- α Expression und Wirkung als Ligand

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Kinetik der mTNF- α -Expression auf humanen Th-Zellen erstellt, die bisher nicht in der Literatur beschrieben ist. Es zeigte sich, dass mTNF- α über einen Zeitraum von 5 Tagen auf den Th-Zellen exprimiert wird, mit einem Maximum am dritten Tag. Weiterhin wurde gezeigt, dass mTNF- α auf stimulierten, nicht jedoch auf unstimulierten Th-Zellen exprimiert wird.

Diese Kinetik unterscheidet sich von den bisher publizierten Ergebnissen für eine mTNF- α -Expression auf Monozyten. Solomon et al. berichteten, dass die Abspaltung des löslichen TNF- α schon 15 Minuten nach der Stimulation beginnt und nach 45 Minuten kaum noch mTNF- α auf der Zelloberfläche nachzuweisen ist (Solomon et al., 1997). Für T-Lymphozyten beschreiben allerdings schon Crowe et al. (Crowe et al., 1995) eine längere Halbwertszeit von mTNF- α .

Kriegler et al. beschrieben 1988 als erste die Expression von mTNF- α auf Monozyten (Kriegler et al., 1988). 1990 zeigten Kinghabwala et al., dass mTNF- α auch auf stimulierten humanen T-Zellen exprimiert wird und dass Cyclosporin A (CsA) und Methylprednisolon diese Expression prätranslational hemmen können (Kinkhabwala et al., 1990). Die mTNF- α Expression auf

aktivierten Th-Zellen beschrieben Aversa et al. 1993, sie arbeiteten dabei mit einem T-Zellklon (Aversa et al., 1993).

Es wird davon ausgegangen, dass mTNF- α von dem Enzym TACE (TNF- α converting enzyme) von der Zelloberfläche abgespalten wird. Wenn es nicht abgetrennt wird, wird es wieder in die Zelle internalisiert (Newton et al., 2001). Warum konnte nun in der vorliegenden Arbeit bei Th-Zellen das mTNF- α über 5 Tage auf der Zelloberfläche angefärbt werden? Es wäre möglich, dass auch in den untersuchten Th-Zellen das mTNF- α zwischen den Messzeitpunkten wieder internalisiert oder abgespalten worden ist. Die andauernde Stimulation durch die antikörperbeschichteten Zellkulturplatten und durch Zell-zu-Zell Kontakte könnte dazu geführt haben, dass mTNF- α immer wieder neu an die Zelloberfläche gebracht worden ist. Wenn davon ausgegangen wird, dass mTNF- α zwischen den Messzeitpunkten (alle 24 h) wieder internalisiert worden ist, hätten die Messzeitpunkte der Kinetik einen stichprobenhaften Charakter. Weitere Untersuchungen, mit mehr als einem Messzeitpunkt am Tag sollten diese Frage klären.

Viele Autoren, die sich mit dem mTNF- α und dem bidirektionalen Signaling beschäftigen, diskutieren die Problematik, dass oft lösliches TNF- α fälschlicherweise für membranständiges TNF- α gehalten wird. Sie meinen damit, an einen TNF-Rezeptor gebundenes sTNF- α . Dieses rezeptorgebundene lösliche TNF- α würde dann bei der mTNF- α Färbung mitdetektiert und verfälsche die Werte. So beschreiben Solomon et al, dass diese Problematik durch Waschen mit saurer Lösung, die das sTNF- α aus der Rezeptorbindung löst, einbezogen werden kann (Solomon et al., 1997). Andere Autoren haben die Ergebnisse ihrer Versuche durch eine Kontrolle mit TNF-Rezeptorblockade überprüft. Dieses Vorgehen wurde in der vorliegenden Arbeit ebenso erwogen. Es wurde davon jedoch Abstand genommen, um eventuell vorhandene eigene Effekte des TNFR-Blockers auf die Rezeptor- und mTNF- α tragenden Zellen zu vermeiden.

In dieser Arbeit wurde als Kontrolle zur mTNF- α Färbung neben der üblichen Isotypkontrolle auch ein Parallelansatz mit einem Überschuss an löslichem TNF- α mitgeführt. Auch zu dieser Probe wurde wie bei der Färbung fluoreszenzgekoppeltes Infliximab zugegeben. Im Unterschied zum

Färbeansatz wurden nach Zugabe von TNF- α im Überschuss keine Ix gefärbten Zellen gemessen. Wir gehen davon aus, dass sich Infliximab an das lösliche TNF- α im Überstand gebunden hat und mit diesem ausgewaschen worden ist. Das an die TNF- α Rezeptoren gebundene sTNF- α scheint sich ebenfalls durch unsere Waschschriffe aus der Bindung gelöst zu haben, da sich sonst die Prozentzahl der gefärbten Infliximab positiven Zellen nach Zugabe des löslichen TNF- α erhöht hätte. Insgesamt ist also davon auszugehen, dass mit der Färbung tatsächlich membranständiges TNF- α detektiert wurde.

Verschiedene Autoren beobachten schon seit über 10 Jahren, dass mTNF- α auch in seiner gebundenen Form an der Zelloberfläche eine Funktion in der Immunantwort hat. Es wirkt als Ligand, indem es an umliegende Zellen bindet, und mit der Bindung verschiedene Mechanismen auslöst. So zeigten Aversa et al., dass mTNF- α auf aktivierten Th-Zellen zur B-Zellaktivierung beiträgt. Dabei löst es ein kostimulatorisches Signal durch Zell-zu-Zell Kontakt aus, welches zur B-Zellaktivierung in einer Zellreihe führt (Aversa et al., 1993). Membranständiges TNF- α wird auch auf HIV-infizierten CD4 positiven Zellen exprimiert und ist involviert in die polyklonale B-Zell-Aktivierung bei HIV Patienten (Macchia et al., 1993). Diesen Effekt beschreiben auch Higuchi et al. für mTNF- α , das auf HTLV-1 (human T-cell lymphotropic virus Type 1) infizierten T-Zellen exprimiert ist (Higuchi et al., 1997). Auf LPS aktivierten Monozyten, löst mTNF- α in vaskulären Endothelzellen Apoptose aus (Eissner et al., 1995).

4.1.2 mTNF- α als Rezeptor und Reverses Signaling

Neben seiner eben besprochenen Wirkung als Ligand, scheint mTNF- α , auch als Rezeptor zu fungieren. Es wird von einer bidirektionalen Wirkung gesprochen. In eine Richtung („Vorwärts Signaling“) wirkt das mTNF- α durch Bindung an TNF Rezeptoren benachbarter Zellen. Der andere Mechanismus verläuft rückwärtsgerichtet über das mTNF- α in die, das Oberflächenmolekül exprimierende Zelle (siehe auch Abb. 1). In diesem Zusammenhang wird das sogenannte Reverse Signaling diskutiert.

In der vorliegenden Arbeit sollten die Effekte des Reversen Signalings erstmals in humanen Th-Zellen des peripheren Blutes gesunder Probanden untersucht

werden. Es konnte gezeigt werden, dass die CD4 positiven T-Zellen mTNF- α nach Stimulation mit anti CD3/CD28 Antikörpern exprimieren. Die Expression wurde in einem Zeitraum von 5 Tagen gemessen und erreichte ein Maximum nach 2 bis 3 Tagen (siehe hierzu auch Abb. 4).

Anschließend an die Expressionskinetik wurden die Wirkungen von Infliximab auf verschiedenen Zellprozesse der Th-Zellen in vitro untersucht. Für die untersuchte Immunzellgruppe zeigten sich in unseren Experimenten keine Veränderungen des Sauerstoffverbrauches, der intrazellulären Zytokinkonzentrationen (IL-2, IFN- γ), der Anzahl der apoptotischen Zellen oder der Proliferationseigenschaften.

Den vorliegenden Ergebnissen zufolge löst Infliximab durch Bindung an mTNF- α kein Reverses Signaling aus, das einen Einfluss auf die untersuchten Zellprozesse in Th-Zellen hat.

Die mTNF- α Regulation, die in der Expressionskinetik beschrieben wurde, wurde in die Untersuchungen zur Apoptose von Th-Zellen einbezogen. Infliximab wurde nach zweitägiger Stimulation zur Zellkultur gegeben. Nach dieser Zeit, ist mTNF- α maximal auf den Zellen exprimiert. Andere Autoren (Catrina et al., 2005; Di Sabatino et al., 2004; Mitoma et al., 2005; ten Hove et al., 2002; Van den Brande et al., 2003) hatten postuliert, dass die von ihnen beschriebene, durch lfx induzierte Apoptose möglicherweise durch Reverses Signaling in den mTNF- α tragenden Zellen ausgelöst wird. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit für humane CD4 positive T-Zellen nicht bestätigt werden. Es fand sich keine Induktion von Apoptose in den untersuchten Zellen, obwohl Infliximab an das mTNF- α , wie in der Kinetik gezeigt, bindet.

Allerdings gibt es dazu auch in der Literatur widersprüchliche Aussagen, so konnten Agnholt et al. in Darm T-Lymphozyten von Patienten mit M. Crohn und gesunden Kontrollpersonen ebenfalls keine Induktion von Apoptose durch Infliximab finden (Agnholt und Kaltoft, 2001). Auch für Monozyten finden sich in der Literatur unterschiedliche Aussagen. So beschreiben Kirchner et al., dass sie in einer Monozyten Zelllinie weder nach 4–noch nach 8–ständiger Inkubation mit Infliximab eine vermehrte Apoptose messen konnten (Kirchner et al., 2004), während Lügering et al. Infliximab induzierte Apoptose in Monozyten von M. Crohn Patienten beschreiben (Lügering et al., 2001). Diese Unterschiede in den

Apoptoseeigenschaften von Monozyten lassen sich möglicherweise dadurch erklären, dass Lügering et al. ihre Untersuchungen mit Zellen von erkrankten Patienten, Kirchner et al. jedoch mit einer Monozyten Zellreihe durchführten.

1994 konnten Ferran et al. zeigen, dass die Behandlung von Maus-T-Zellen mit anti TNF- α Antikörpern die CD3-vermittelte Genexpression von Zytokinen beeinflusst. So wurde die IFN- γ mRNA Expression hoch- und die IL-4 mRNA Expression herunterreguliert. Die Autoren postulieren, dass dies auf einer direkten Interaktion zwischen mTNF- α und den anti TNF- α Antikörpern beruht (Ferran et al., 1994).

Die Behandlung mit anti TNF- α Antikörpern induziert Lyse von murinen Myelomzellen mit stabil exprimiertem, rekombinanten mTNF- α . Dies wurde in Zellen gezeigt, die mit Lymphozyten aus dem peripheren Blut oder Kaninchen Komplement kokubiert wurden (Scallon et al., 1995).

Higuchi et al. zeigten, dass mTNF- α sowohl als Ligand (B-Zell-Aktivierung), als auch als Rezeptor fungiert. Eine Behandlung mit anti TNF- α Antikörpern stimulierte die Sekretion von IL-2 und IFN- γ , zwei wesentlichen Zytokinen der Th-1 Antwort und eine Erhöhung des intrazellulären Calciums in virusinfizierten Zellen (Higuchi et al., 1997).

Im Unterschied zu den eben genannten Autoren wurden die Untersuchungen zur Zytokinsynthese in der vorliegenden Arbeit in humanen Th-Zellen durchgeführt. Es zeigte sich kein Effekt von Infliximab auf die Zytokinsynthese von IL-2 und IFN- γ . Die Th-Zellen, die hier untersucht worden sind, waren weder mit mTNF- α stabil transfiziert, wie die Zellen, die Scallon et al. verwendeten, noch waren sie virusinfiziert, wie die HTLV-1 (human T-cell lymphotropic virus Type 1) Zellen, die Higuchi et al. und Harashima et al. in ihren Arbeiten untersuchten. Wir führen die ausbleibenden Effekte von Ifx auf die Zytokinsynthese in unseren Experimenten auf die unterschiedlichen Eigenschaften der untersuchten Zellen zurück.

Harashima et al. untersuchten neben den HTLV-1 Zellen auch Th-Zellen. Eine Aktivierung mittels anti TNF- α Antikörpern gegen mTNF- α auf einer HTLV-1 infizierten T-Zelllinie und auf aktivierten normalen Th-Zellen führt zur Induktion des Adhäsionsmoleküls E-Selektin auf den Zellen. Die maximale Expression findet sich etwa 12–24 h nach Aktivierung. In Jurkat oder HeLa Zellen mit stabil

transfizierten mTNF- α wurde E-Selektin durch Behandlung mit Antikörpern gegen TNF- α mit einer ähnlichen Kinetik induziert. mTNF- α positive Jurkat Zellen regulierten E-Selektin auch hoch, wenn sie in Zell-zu-Zell Kontakt mit TNFR tragenden HeLa Zellen kamen. Bisher war man davon ausgegangen, dass E-Selektin nur auf Endothelzellen exprimiert wird. Die Hochregulierung auf Immunzellen sei möglicherweise wichtig für lokale Zell Adhäsionen und Interaktionen, so die Autoren (Harashima et al., 2001).

Mitoma et al. untersuchten das Reverse Signaling durch Infliximab im Vergleich zu Etanercept. Sie verwendeten für ihre Untersuchungen humane Jurkat Zellen, die mit mTNF- α stabil transfiziert waren. Sie zeigten, dass Infliximab E-Selektin und Apoptose induziert und die Proliferation hemmt (Mitoma et al., 2005). Anders als Mitoma et al. fanden wir in unseren Untersuchungen keinen Einfluss von Ix auf die Proliferations- oder Apoptoseeigenschaften von humanen Th-Zellen. Jedoch lassen sich die ausbleibenden Effekte auch hier mit den unterschiedlichen Eigenschaften von Zellreihen, wie den Jurkat Zellen, transfiziert mit mTNF- α und unveränderten Th-Zellen gesunder Blutspender erklären.

Die Literatur zu den Infliximab Wirkungen ist sehr umfangreich, deshalb soll sie in den folgenden Kapiteln unter besonderer Berücksichtigung der beiden wichtigsten Erkrankungen bei denen Infliximab eingesetzt wird, und vor dem Hintergrund der eigenen Ergebnisse näher betrachtet werden.

4.2 Infliximab Wirkungen

4.2.1 Ix bei Rheumatoider Arthritis

Die Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine chronische Erkrankung, die durch eine Entzündung der Synovialmembran charakterisiert ist und zur Zerstörung von Knochen und Knorpel führt (Tak und Bresnihan, 2000) (Firestein, 2003). Die Synovialmembran (Synovialis) besteht aus faser- und gefäßreichem Bindegewebe und einer der Gelenkfläche zugewandten Deckzellschicht, den Synoviozyten. Durch die lockere gewebliche Beschaffenheit, die ausgeprägte Vaskularisation und die Expression von Adhäsionsmolekülen, Chemokinen und Zytokinen ist die Gelenkentzündung primär in der Synovialmembran lokalisiert

und greift von dort auf die intraartikulären Strukturen über (Zeidler, 2001, S. 64 ff). Charakteristisch für das Erkrankungsbild der RA ist eine hypertrophierte und ödematöse Synovialis. Es findet sich eine Akkumulation von T-Zellen, Plasma-Zellen, Makrophagen, B-Zellen, Neutrophilen Granulozyten, Mastzellen, NK-Zellen und Dendritischen Zellen in der Synovialmembran (Tak, 2005). Die Th-Zellen sind wesentlich für die Entzündung verantwortlich. Sie sezernieren Chemokine und Zytokine und locken damit weitere Entzündungszellen an, außerdem induzieren sie die Teilung und Vermehrung bereits eingewanderter Zellen (z.B. B-Lymphozyten) (Zeidler, 2001, S. 65). In betroffenen Gelenken von RA Patienten sind CD4 positive T-Zellen die größte Zellpopulation in der Synovia (Kurosaka und Ziff, 1983). Auch die gestörte Apoptose und eine Angiogeneese im geschädigten Gelenk tragen wahrscheinlich zur erhöhten Zellansammlung bei.

Es konnte gezeigt werden, dass bei Patienten mit RA die Konzentration des proinflammatorischen Zytokins TNF- α sowohl im Serum, als auch im Synovium erhöht ist (Beckham et al., 1992; Chu et al., 1991).

Infliximab wird bei der Rheumatoiden Arthritis mit gutem Erfolg eingesetzt. Der beschriebene positive Effekt scheint über verschiedene Mechanismen vermittelt zu sein. Es scheint durch die Infliximab Therapie zu einer verminderten Einwanderung von Entzündungszellen zu kommen, weiter scheint Ifx die Angiogeneese zu hemmen und krankheitsbedingte Veränderungen, wie ein Zytokinungleichgewicht zu normalisieren.

Eine verminderte Einwanderung von Zellen an den Ort der Entzündung durch Gabe von Ifx (Tak et al., 1996) könnte auf den TNF- α neutralisierenden Effekt zurückzuführen sein, da TNF- α lokal die Invasion von Entzündungszellen begünstigt (siehe Einleitung). Es wurde gezeigt, dass nach der Therapie mit Infliximab die Expression von Adhäsionsmolekülen (Tak et al., 1996) und die Chemokinkonzentration (Taylor et al., 2000) im Synovialgewebe vermindert waren. Ebenso waren die zirkulierenden löslichen Adhäsionsmoleküle vermindert (Paleolog et al., 1996). Zusätzlich scheint Infliximab einen hemmenden Effekt auf die verstärkte Angiogeneese im arthritischen Gelenk zu haben (Taylor et al., 2004). Damit wird die Einwanderung von Entzündungszellen in das Gelenk erschwert.

Kürzlich konnten Valencia et al. zeigen, dass Regulatorische T-Zellen (Tregs)

von RA Patienten ihre hemmende Funktion auf die Proliferation und Zytokinsynthese von CD 4 positive T-Zellen verloren haben. Nach der Therapie mit Infliximab war die Fähigkeit der Tregs zur Hemmung von CD4 positiven Zellen wieder hergestellt (Valencia et al., 2006).

Periphere CD4 positive T-Zellen von Patienten mit RA wurden als autoreaktiv beschrieben. Sie exprimieren nicht mehr das kostimulatorische Oberflächenmolekül CD 28, sondern MHC-Klasse I erkennende NK-Zell-Rezeptoren (Namekawa et al., 2000; Snyder et al., 2002). Im Vergleich zu gesunden Kontrollpatienten haben RA Patienten weniger naive CD4 positive T-Zellen, während der periphere T-Zell-Pool atypische hyperreagible Vermehrung zeigt (Ponchel et al., 2002).

Des Weiteren wurde gezeigt, dass eine verminderte Th1-Antwort bei Patienten im Vergleich zu Kontrollen vorliegt. Die Zellen des peripheren Blutes von Rheumapatienten produzieren weniger IFN- γ und mehr IL-4, als Zellen von gesunden Kontrollen (Haddad et al., 1998). IFN- γ wird als der Prototyp der Th-1 Zytokine betrachtet, so dass Kawashima et al. (Kawashima und Miossec, 2005) von einem systemischen Th-1 Defekt bei RA sprechen, da sie bei stimulierten PBMC eine verminderte IFN- γ Produktion im Vergleich zur Kontrolle nachweisen konnten. Nach Therapie mit Infliximab regulierten die klinischen Infliximab Responder die IFN- γ Expression wieder hoch, bei den Non-Respondern bleibt diese Regulation aus.

Als weitere Infliximab Wirkungen bei der RA werden Effekte wie die Herabregulierung von synovialer Zytokinexpression (Ulfgren et al., 2000) und die Reduktion der Serumspiegel der Matrix-Metallo-Proteinasen (MMP-1, MMP-3) diskutiert (Brennan et al., 1997).

Bezugnehmend auf die wichtige Rolle, die die Zytokine IFN- γ und IL-2 auch in der RA spielen, wurden diese in der vorliegenden Arbeit gewählt, um die Infliximab Wirkungen auf die Zytokinexpression von Th-Zellen zu untersuchen. In den peripheren Th-Zellen gesunder Probanden zeigten sich keine Infliximab Effekte auf die Zytokinsynthese. Diese Ergebnisse stehen nicht im Widerspruch zu den Untersuchungen anderer Autoren. Kawashima et al. beschreiben zwar einen Infliximab Effekt auf die IFN- γ Expression, allerdings normalisierte sich durch die Behandlung mit Infliximab in ihren Untersuchungen ein

krankheitsbedingter Defekt. In der vorliegenden Arbeit wurden Zellen gesunder Blutspender untersucht, bei denen jener systemische Th-1 Defekt, der von Kawashima et al. als pathognomonisch für die RA beschrieben worden ist, nicht vorliegt.

Wagner et al. (Wagner et al., 2004) konnten zeigen, dass CD4 positive T-Zellen, die von RA Patienten und gesunden Kontrollen entnommen wurden, ex vivo in Kokultur mit Monozyten zur Proliferation angeregt werden konnten und dass durch die Gabe von Infliximab dieser Effekt gehemmt werden konnte. In der vorliegenden Arbeit wurden die sortierten Th-Zellen mit Antikörpern gegen CD3/CD28 stimuliert und zur Proliferation gebracht. Es zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle kein Effekt von Infliximab in verschiedenen Konzentrationen auf die Proliferation der Zellen. Allenfalls deutete sich als Tendenz an, dass Infliximab in niedrigen Konzentrationen (0,01 µg/ml) einen stimulatorischen Effekt auf die Proliferation der Th-Zellen hatte (siehe Abb. 9). Möglicherweise wirkt Infliximab in niedrigen Konzentrationen über mTNF-α kostimulatorisch zu der CD3/CD28 Aktivierung.

In der Therapie der RA scheint auch die Regulation der Apoptose eine wichtige Rolle zu spielen. In der Pathogenese der RA wird eine beeinträchtigte Apoptose von Zellen aus betroffenen Gelenken als möglicher Mechanismus beschrieben (Baier et al., 2003).

In der Synovialmembran entzündeter Gelenke scheinen sich weniger apoptotische Zellen zu befinden. Dies wird mit der dort vorherrschenden NFκB-Aktivierung in Zusammenhang gebracht. Der Transkriptionsfaktor NFκB inhibiert die TNF-α- und Fas-vermittelte Apoptose in Zellen wie Makrophagen und Fibroblasten (Muller-Ladner et al., 2002). Infliximab blockiert die TNF-α induzierte NFκB-Aktivierung und wirkt so proapoptotisch (Van den Brande et al., 2003). Auch bei Morbus Crohn wurde dieser proapoptotische Infliximab Effekt, unter anderem auf Monozyten beschrieben (Lugering et al., 2001).

Catrina et al. konnten in vitro zeigen, dass eine Inkubation mit Infliximab bei Monozyten/Makrophagen aus der Synovialflüssigkeit von betroffenen Gelenken von RA-Patienten zur Apoptose dieser Zellen führte. Monozyten aus dem peripheren Blut derselben Patienten gingen nach Behandlung mit Infliximab deutlich weniger in die Apoptose. Für Lymphozyten konnte dieser

proapoptotische Infliximab-Effekt nicht gezeigt werden, weder lokal in der Synovialflüssigkeit, noch im peripheren Blut (Catrina et al., 2005). Diese Ergebnisse von Catrina et al. stehen im Einklang mit denen der vorliegenden Arbeit. Für die peripheren Th-Zellen zeigte sich keine proapoptotische Wirkung von Infliximab. Auch Smeets et al. konnten keine Infliximab induzierte Apoptose im Synovium von RA Patienten finden (Smeets et al., 2003). Zwar konnten die Autoren zeigen, dass 48 h nach einer Einzelgabe Infliximab die Anzahl der Makrophagen, T-Zellen und Plasmazellen abnahmen, jedoch konnten sie keinen Anstieg der Anzahl apoptotischer Zellen nachweisen.

Die Ergebnisse von Catrina et al. deuten an, dass die wesentlichen Effektorzellen für die Infliximab vermittelte Apoptose Monozyten sind und, dass der Haupteffekt lokal im entzündeten Gelenk erreicht wird, da die Veränderungen im peripheren Blut deutlich geringer sind.

Des Weiteren scheinen einige wichtige Effekte des Infliximab bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis aus einer Normalisierung von Zellfunktionen, die durch die RA gestört sind, zu resultieren. So wird für die RA ein Th1 Defekt mit erniedrigten IFN- γ Spiegeln beschrieben und eine beeinträchtigte Apoptose in Zellen der Synovialmembran. Beide krankheitsbedingten Defekte werden durch die Therapie mit Infliximab normalisiert.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Resultaten der vorliegenden Arbeit, dem fehlenden Effekt von Infliximab auf die Apoptose und die Zytokinsekretion (IL-2, IFN- γ) in CD4 positiven T-Lymphozyten gesunder Blutspender. Es wurden nur Zellen des peripheren Blutes untersucht, denen mutmaßlich kein Defekt zu Grunde liegt.

Es kann daraus geschlossen werden, dass Infliximab seine entzündungsmodulierenden Effekte nur an Zellen mit inflammatorisch veränderten Eigenschaften ausübt. Damit wirkt es besonders am Entzündungsfokus, bei RA demnach an den Gelenken.

Catrina et al. kommen in ihren Arbeiten jedoch zu einer anderen Schlussfolgerung. Sie diskutieren, dass Infliximab Apoptose in aktivierten, nicht jedoch in ruhenden T-Lymphozyten induzieren kann. Die T-Lymphozyten im rheumatischen Gelenk befinden sich in einem Zustand der Anergie (Morita et al., 1998; Ulfgren et al., 1995). Sie sind also anders als die Darm-Lymphozyten bei M. Crohn nicht aktiviert. Zu diesem Schluss kommen auch van den Brande

et al. (Van den Brande et al., 2003) und Ten Hove et al. (ten Hove et al., 2002). Die Autoren zeigten, dass Infliximab Apoptose in aktivierten Darm-Lymphozyten auslöst.

In der vorliegenden Arbeit konnten aber weder proapoptotische Effekte von Infliximab auf unstimulierte, noch auf stimulierte CD4 positive T-Lymphozyten gezeigt werden.

Im folgenden Kapitel wird weiter darauf eingegangen, dass auch die Darm T-Lymphozyten bei M.Crohn veränderte Eigenschaften haben und somit möglicherweise nicht mit Zellen des peripheren Blutes gesunder Blutspender verglichen werden können.

Möglicherweise spielen akzessorische Zellen in der Aktivierung der CD4 positiven T-Lymphozyten eine entscheidende Rolle. Diese fehlten in unseren Untersuchungen, da isolierte Effekte auf diese wichtige Untergruppe der T-Lymphozyten untersucht werden sollten. Wir untersuchten eine sehr reine Zellpopulation mit >99% CD4 positiven Zellen, wir erreichten diese hohe Reinheit, indem wir mit magnetischer Zellsortierung (MACS) arbeiteten. Ziel war es gerade über die Th-Zellen zu einer Aussage zu kommen. Des Weiteren sollten unerwünschte Nebeneffekte durch andere Zellen vermieden werden.

Die experimentellen Bedingungen entsprechen jedoch nicht der Situation in vivo. Im Körper liegen CD4 positive T-Zellen nie isoliert vor und, die an der Immunabwehr beteiligten Zellen aktivieren und beeinflussen sich wechselseitig. Bei den experimentellen Bedingungen wurde jedoch darauf geachtet, dass die Aktivierungsart der Zellen der Aktivierung im Körper möglichst ähnelt. So wurden die Zellen über den T-Zellrezeptor CD3 und den kostimulatorischen Rezeptor CD 28 aktiviert. Die fehlenden Effekte lassen sich auch nicht dadurch erklären, dass die Zellen möglicherweise durch diese Stimulation nicht ausreichend aktiviert worden sind. An der guten Proliferation der Zellen ließ sich die erfolgte Aktivierung deutlich ablesen. Diese zeigte sich sowohl mikroskopisch in der Cluster-Bildung der Zellen, als auch durchflusszytometrisch anhand der Streuung der Zellen im Dot Plot und der Zellteilung.

4.2.2 Infliximab bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Wie auch für die RA beschrieben, spielt TNF- α in der Pathogenese und Therapie der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wie M. Crohn und Colitis ulcerosa eine wichtige Rolle. Die Konzentration des Zytokins ist sowohl im Serum, als auch in der Darmmukosa bei Patienten mit diesen Erkrankungen erhöht (Cornillie et al., 2001; Rutgeerts et al., 1999; Schwab und Klotz, 2001). Pathophysiologisch liegt diesen Erkrankungen eine Aktivierung der Th-Zellen zu Grunde. M.Crohn ist durch eine Th-1 Antwort charakterisiert, bei der die proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IFN- γ zu einer transmuralen granulomatösen Entzündung führen. Bei der Colitis ulcerosa führt eine Th-2 Antwort (charakteristische Zytokine sind IL-4, IL-5 und IL-13) zu einer eher oberflächlichen Schleimhautentzündung, die für diese Erkrankung typisch ist.

Die Aktivität der proinflammatorischen Zytokine scheint bei Patienten mit diesen Erkrankungen nicht ausreichend reguliert zu sein. Es herrscht ein Ungleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischen Mediatoren, die zum Erkrankungsbild der chronischen Entzündung führt (Harrison, 2003, S. 1846ff).

Die Lamina propria liegt im Darm der intestinalen Epithelzellschicht an und ist durch lymphoide Strukturen und freie Immunzellen wie Lymphozyten, Plasmazellen, Makrophagen und eosinophile Granulozyten charakterisiert. Sie bildet zusammen mit organisiertem lymphatisches Gewebe (den Peyer'schen Plaques, mesenterialen Lymphknoten, Appendix) und intraepithelialen Lymphozyten das Mukosa assoziierte lymphatische Gewebe des Darms (GALT = "gut associated lymphoid tissue"), welches das größte immunologische Organ des Körpers ist. Die Anzahl der Zellen in der Lamina propria, die bei erkrankten Patienten lösliches TNF- α sezernieren, scheint erhöht zu sein (Breese et al., 1994; Reinecker et al., 1993).

Infliximab wird in der Behandlung des Glukokortikoid-refraktären M. Crohn eingesetzt. Es kann sowohl klinisch eine Remission der Erkrankung, als auch eine endoskopisch sichtbare Heilung der betroffenen Darmabschnitte induzieren (Targan et al., 1997; van Dullemen et al., 1995).

Es scheint allerdings unwahrscheinlich zu sein, dass der positive lfx Effekt allein über die Neutralisierung des sTNF- α zustande kommt. Infliximab kann einerseits eine Langzeitremission induzieren, die nicht allein durch einen

Neutralisierungseffekt zu erklären ist. Andererseits ist das sTNF- α neutralisierende Fusionsprotein Etanercept, das in der Therapie der RA eingesetzt wird, bei M. Crohn nicht wirksam. Deshalb werden neben dem neutralisierenden Effekt weitere Mechanismen diskutiert.

Wie bei der RA scheint auch in der Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankung M. Crohn die gestörte Apoptose eine wichtige Rolle zu spielen (Boirivant et al., 1999; Ina et al., 1999). Die unkontrollierte Proliferation von aktivierten Lamina propria T-Lymphozyten, die aus diesem Defekt resultiert, scheint zur chronischen Entzündung der Darmmukosa beizutragen.

In den letzten Jahren haben sich verschiedene Veröffentlichungen mit der Thematik der Infliximab induzierten Apoptose bei M. Crohn beschäftigt.

Van den Brande et al. konnten zeigen, dass Infliximab Apoptose in aktivierten peripheren Lymphozyten und in Lamina propria T-Lymphozyten von Patienten induzieren kann. Dabei wurden die untersuchten Zellen in einer Lymphozyten Reaktion mit von Monozyten abgeleiteten Dendritischen Zellen aktiviert. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Infliximab Caspase 3 in den genannten Zellen induziert und möglicherweise über diesen Weg Apoptose induziert wird (Van den Brande et al., 2003).

Lügering et al. konnten zeigen, dass die Bindung von Infliximab an mTNF- α in Monozyten von Patienten mit chronisch aktivem M. Crohn zur Apoptose der Monozyten über einen Fas-abhängigen Weg führte (Lugering et al., 2001). Infliximab induziert auch in vivo Apoptose in Lamina propria T-Zellen und in CD3/CD28 aktivierten Jurkat-Zellen, wie ten Hove et al. berichteten (ten Hove et al., 2002).

Di Sabatino et al. untersuchten in ihrer Arbeit periphere T-Zellen (magnetisch CD3 sortiert) und Lamina propria T-Zellen von M. Crohn Patienten und gesunden Kontrollen. Die Autoren konnten zeigen, dass nach 10 wöchiger Behandlung mit Infliximab in vivo in den Lamina propria T-Zellen Apoptose induziert wird. Auch in vitro fanden sie diesen Effekt sowohl bei den Darmzellen, als auch bei peripheren T-Zellen. Bei gesunden Kontrollen fanden sie zwar eine niedrigere aber, mit um die 40%, immer noch deutliche Apoptoserate in den untersuchten Zellarten (Di Sabatino et al., 2004).

Die Autoren der oben genannten Arbeiten beschreiben einheitlich, dass Infliximab Apoptose in Zellen von Patienten mit chronisch entzündlichen

Darmerkrankungen induzieren kann. Sie postulieren, dass ein wesentlicher Effekt von Infliximab in der Behandlung der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, insbesondere aber bei M. Crohn, in der Induktion von Apoptose zu sehen ist.

Dem widersprechen die Ergebnisse zu denen Agnholt et al. kommen. Die Autoren beschreiben zwar, dass Infliximab die Produktion von IFN- γ ex vivo entnommener Zellen von Patienten und gesunden Kontrollen hemmt. Ebenso finden sie auch in vitro bei T-Lymphozyten aus dem Darm von Patienten eine gehemmte Produktion von IFN- γ und TNF- α . Jedoch können sie in ihren Untersuchungen keine Induktion von Apoptose durch Infliximab in den von ihnen untersuchten Zelltypen nachweisen. Zu den untersuchten Zellen gehören neben den Darm T-Lymphozyten von Patienten und gesunden Kontrollen auch eine CD4 positive Zelllinie (LTC) (Agnholt und Kaltoft, 2001). Die Autoren kommen zu dem Schluss, dass der positive Infliximab Effekt bei M. Crohn durch die Reduktion der proinflammatorischen Zytokine IFN- γ und TNF- α in den Darm T-Lymphozyten zu erklären sei.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterscheiden sich von denen der genannten Autoren dadurch, dass hier ausschließlich periphere Th-Zellen von gesunden Normal Spendern untersucht wurden. Außerdem wurde mit der verwendeten Methode der magnetisch aktivierten Zellsortierung eine Reinheit der untersuchten Th-Zellen von mehr als 99% erreicht. Dies kommt am ehesten den Untersuchungen von Di Sabatino et al. nahe, die mit der magnetischen CD3 Sortierung eine Reinheit der peripheren T-Zellen von 94% erreichten. Die Ergebnisse zu denen diese Autoren kommen, nämlich eine Induktion von Apoptose durch Infliximab-Behandlung, konnte jedoch nicht reproduziert werden. Durch die Zugabe von Infliximab in verschiedenen Konzentrationen konnte in der vorliegenden Arbeit keine Veränderung der Apoptoserate gezeigt werden. Möglicherweise ist dies durch die fehlenden kostimulatorischen Effekte der zytotoxischen CD8 positiven T-Zellen zu erklären. Die CD8 positiven T-Zellen tragen ebenfalls das CD3 Oberflächenmolekül, nicht jedoch CD4. Diese Zellgruppe (CD3+/CD8+Zellen) dürfte in der von Di Sabatino et al. untersuchten Population eine Rolle gespielt haben.

Ob also Infliximab auch im peripheren Blut einen hemmenden Einfluss auf das

Entzündungsgeschehen hat, kann nicht abschließend geklärt werden. Unter unseren experimentellen Bedingungen, in denen versucht wurde eine Entzündung durch die Stimulation mit anti CD3/CD28 Antikörpern zu imitieren, scheinen jedenfalls die Th-Zellen nicht für Infliximab induzierte Veränderungen der Apoptoseeigenschaften zuständig zu sein.

4.2.3 Infliximab Wirkungen auf T-Lymphozyten

Ein Review von Sieper und Van den Brande (Sieper und Van Den Brande, 2005) diskutiert die Frage, welchen Effekt Infliximab auf T-Lymphozyten hat.

Die gefundenen Wirkungen bei RA und M. Crohn widersprechen sich in soweit, als dass Infliximab in Darm T-Lymphozyten Apoptose induzieren kann, in T-Zellen des rheumatoiden Gelenks jedoch nicht. Die Autoren diskutieren hier als Ursache den unterschiedlichen Aktivierungsstatus der Zellen. Während die Darmzellen aktiviert sind, befinden sich die Synovialzellen im betroffenen Gelenk in einem Stadium der Anergie, also auch in einem Zustand der verminderten Aktivierbarkeit.

Bei Patienten mit Ankylosierender Spondylitis, einer Erkrankung aus dem rheumatischen Formenkreis, in deren Behandlung Infliximab ebenfalls wirksam ist (Braun et al., 2002), konnten Effekte von Ix auf T-Zellen gezeigt werden. Nach 6-wöchiger Therapie reduzierte sich die Produktion von IFN- γ und TNF- α , sowohl von unspezifisch (PMA/Ionomycin) stimulierten, als auch von Antigen-spezifisch stimulierten T-Zellen.

Die Frage, welche Effekte Ix auf T-Zellen hat, ist nicht nur für den Erfolg, sondern auch für die Sicherheit und Verträglichkeit der Therapie wichtig. Unter der Ix Therapie wurde bei einigen Patienten ein dem Systemischen Lupus erythematodes (SLE) gleichendes Syndrom beobachtet. Dieses könnte durch die kompensatorische T-Zell-Aktivierung als Antwort auf die andauernd reduzierte Zytokinproduktion erklärt werden (Sieper und Van den Brande, 2005).

Reduzierte T-Zell Funktionen sind möglicherweise auch an der verminderten Abwehr von intrazellulären Erregern, wie von Mycobacterium tuberculosis, des Erregers der Tuberkulose (TBC) beteiligt (Keane et al., 2001). Allerdings wird zum Beispiel bei der Rheumatoiden Arthritis generell ein vermehrtes Auftreten von Tuberkulose beobachtet. Dies könnte wiederum auf den systemischen Th1

Defekt bei RA mit verminderten Spiegeln von IFN- γ zurückgeführt werden, da IFN- γ eine wichtige Rolle in der Abwehr der TBC-Erreger spielt (Kawashima und Miossec, 2005).

In der vorliegenden Arbeit konnten, die für T-Zellen und Monozyten beschriebenen Infliximab Effekte in Th-Zellen gesunder Blutspender nicht reproduziert werden. Es konnte gezeigt werden, dass Infliximab auf periphere CD4 positive T-Zellen bezüglich des Energiestoffwechsels, gemessen am Sauerstoffverbrauch und bezüglich der Zytokinproduktion (IL-2 und IFN- γ), Proliferation und Apoptose in vitro keine Effekte hat.

Die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit wurden mit Zellen von gesunden Blutspendern durchgeführt. So können die anderen Publikationen widersprechenden Ergebnisse auf die nicht veränderten Zelleigenschaften zurückgeführt werden. Andere Autoren beschreiben jedoch auch Infliximab Effekte gemessen an Zellen von gesunden Kontrollen (Di Sabatino et al., 2004). Diese Untersuchungen stehen im Widerspruch zu den vorliegenden Ergebnissen, lassen sich aber durch ein unterschiedliches methodisches Vorgehen und andere Versuchsbedingungen erklären. So verwendeten Di Sabatino et al. in ihren Untersuchungen CD3 sortierte T-Zellen, die neben den CD4 positiven T-Helferzellen auch die CD8 positiven zytotoxischen T-Zellen umfassen.

Vor dem Hintergrund der eigenen Untersuchungen und der aktuellen Literatur, kann postuliert werden, dass der positive Infliximab Effekt in Krankheiten wie M. Crohn und RA eng mit den pathophysiologischen Veränderungen der Zellen durch die chronisch entzündlichen Erkrankungen zusammenhängt.

Da Infliximab nicht, wie vor den Versuchen vermutet, auf CD4 positive T-Zellen gesunder Blutspender wirkt, wurden keine weiterführenden intrazellulären Untersuchungen, zur Bedeutung des mTNF- α für Signalprozesse von Th-Zellen durchgeführt.

4.3 Differentielle Genexpression durch TNF- α

Die rheumatischen Krankheiten Rheumatoide Arthritis (RA), Osteoarthritis (OA), Systemischer Lupus erythematodes (SLE) und Ankylosierende Spondylitis (AS) hinterlassen typische reproduzierbare Spuren in den Gen-Expressions-Mustern von Monozyten (Grützkau et al., Artikel zur Publikation eingereicht). Die Autoren zeigen, dass die Monozyten krankheitsspezifische Transkriptionsunterschiede aufweisen. Mit Hilfe dieser Genexpressionen lassen sich in der Untersuchung die einzelnen Krankheitsbilder voneinander und von Normalspendern, als Vergleichsgruppe abgrenzen. Die Autoren sprechen von krankheitsspezifischen Zytokinsignaturen.

Die erhobene Genanalyse aus dieser Untersuchung diente als Grundlage zur Bearbeitung der Frage, ob es Übereinstimmungen gibt zwischen krankheitsexprimierten Genen von inflammatorischen Erkrankungen und Genen, die differentiell durch das proinflammatorische Zytokin TNF- α exprimiert werden. Des Weiteren sollte genauer betrachtet werden, welche Funktionen die übereinstimmenden Gene haben.

Für den Vergleich wurden mittels einer Literaturrecherche durch TNF- α exprimierte Gene erfasst. Diese wurden mit den differentiell durch die Erkrankungen (RA, OA, SLE, AS) exprimierten Genen aus der oben genannten Untersuchung verglichen. Bei dem Vergleich fanden sich übereinstimmende Gene. Von den übereinstimmenden, differentiell exprimierten Genen, wurden orientierend die ausgewählt, die in mehr als einer Publikation als durch TNF- α exprimiert beschrieben sind. Diese 22 Gene sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Eine weitere Frage war, ob sich für die TNF- α exprimierten Gene aus der Literatur eine vermehrte Übereinstimmung mit den differentiell exprimierten Genen der Gruppe der RA Patienten zeigen. Da TNF- α eine wesentliche Rolle insbesondere in der Pathophysiologie der RA spielt, wurde von mehr Übereinstimmungen ausgegangen, als mit den anderen untersuchten Erkrankungen OA, SLE, und AS. Allerdings konnte diese Annahme mit dem Datenvergleich nicht bestätigt werden (Abb. 13).

Für einen Datenvergleich zu Interferon- γ , der parallel durchgeführt wurde zeigte sich, dass die IFN- γ regulierten Gene am meisten Übereinstimmungen mit

denen der SLE Patienten hatten. Hier zeigte sich der Zusammenhang zwischen Erkrankung und beschriebenem Schlüsselzytokin. Möglicherweise zeigen sich die Übereinstimmungen von TNF- α exprimierten und RA exprimierten Genen, wenn der Vergleich nicht auf die 22, in mehr als einem Artikel publizierten Gene beschränkt bleibt. Allerdings lässt sich die ausbleibende ausschließliche oder zumindest vermehrte Übereinstimmung in der Gruppe der RA Patienten auch durch die Omnipräsenz von TNF- α in der Pathophysiologie aller entzündlicher Erkrankungen erklären.

4.3.1 Bedeutung einzelner Gene

Bei den übereinstimmenden Genen, die sowohl durch TNF- α , als auch durch die genannten Erkrankungen differentiell exprimiert worden sind, fanden sich viele Gene, die bei intrazellulären Signalprozessen eine wichtige Rolle spielen, so zum Beispiel STAT 1, und NF κ B 1 und 2. Des Weiteren fanden sich Gene, die für Rezeptoren und Liganden codieren, unter anderem ICAM 1 und CXCL 1, 2 und 10 und Gene aus der TNF Familie (TNFSF 10 oder TRAIL und TNFAIP 2 und 3).

Warum sind diese Gene sowohl durch Erkrankungen im peripheren Blut (Monozyten), als auch durch TNF- α in verschiedenen humanen Zellen (u.a. Fibroblasten, Synoviozyten) induziert?

Der Transkriptionsfaktor NF κ B spielt eine wichtige Rolle in der Zellproliferation und Differenzierung. Er kann durch eine Vielzahl verschiedener Stimuli aktiviert werden, so durch Bakterien, Viren und Zytokine (u.a. TNF- α). Er kontrolliert die Expression von verschiedenen inflammatorischen Zytokinen, Chemokinen, Immunrezeptoren und Adhäsionsmolekülen.

Liegt eine akute Entzündung vor, wird NF κ B schnell und stark mittels TNF- α über die TNF Rezeptoren aktiviert. Bei einer länger andauernden Rezeptorstimulation, wie sie in Autoimmunerkrankungen vorliegt, verändert sich die Signalschwelle der Rezeptoren für die Aktivierung. Die initiale starke Aktivierung wird durch regulatorische Feedback Mechanismen gehemmt (Clark et al., 2005). Eine Aktivierung der TNF-Rezeptoren führt über die intrazelluläre sogenannte „Todesdomäne“ (death domain) des TNFR-1 und nachfolgend über Caspase 8-Aktivierung zur Apoptoseinduktion.

Da die TNF Rezeptor vermittelte Aktivierung von NF κ B auch Apoptose hemmt (Beg und Baltimore, 1996), kann die Aktivierung von TNFR also sowohl den programmierten Zelltod induzieren, als auch hemmen. Von welchen Mechanismen abhängt, ob der eine oder der andere Weg eingeschlagen wird, ist noch nicht vollständig geklärt. Es scheint sowohl die Art der Zelle, als auch deren Aktivierungsstatus eine Rolle zu spielen (van Deventer, 2001). Noch schwieriger wird die Überlegung zur Induktion von Apoptose, wenn man den TNF- α Blocker Infliximab einbezieht. Es wurde gezeigt, dass Ix über Caspase-8 in Monozyten von M. Crohn Patienten Apoptose induzieren kann (Lugering et al., 2001). Es können also gegenteilige Prinzipien (TNF- α und anti TNF- α) Apoptose induzieren, genauso kann aber auch eine Substanz (TNF- α) gegenteilige Effekte haben, nämlich Induktion und Hemmung von Apoptose.

Bei dem in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Vergleich waren beide Wege durch TNF- α und die Erkrankungen aktiviert. Es wurde NF κ B, als Apoptoseinhibitor in der Genliste gefunden. Aber auch TNFSF 10 (=TRAIL), einer der klassischen sogenannten „Todes Rezeptoren“, der Apoptose induzieren kann, wurde übereinstimmend gefunden.

Auch aus der Familie der Januskinasen (JNK) wurde bei dem Vergleich unter den 22 übereinstimmenden Genen eine Untergruppe, nämlich JUNB genannt. Januskinasen sind durch Zellstressoren aktivierte Proteinkinase und gehören zur MAPK Familie. Sie werden durch UV-Licht und proinflammatorische Zytokine, wie TNF- α aktiviert und aktivieren Gene, die verschiedene Zellfunktionen, wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose kontrollieren (Varfolomeev und Ashkenazi, 2004). In Zellen wo NF κ B blockiert wird, ist JNK an der Signalkette von TNF- α Stimulation zu Caspase 8 beteiligt. Es bleibt unklar, wann welcher Weg eingeschlagen wird. Die Mechanismen von Entzündungshemmung, beziehungsweise -förderung zeigen aber, dass wesentliche intrazelluläre Prozesse der Inflammation reguliert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden bereits publizierte, durch TNF- α in verschiedenen humanen Zellen exprimierte Gene verwendet. Die Gene wurden per Literaturrecherche zusammengestellt. Für einen direkten Vergleich der krankheitsabhängig exprimierten Gene mit TNF- α regulierten Genen wären Genexpressionsprofile in humanen Monozyten besser geeignet. Dieser

Vergleich sollte folgen.

Jenner et al. (Jenner und Young, 2005) haben kürzlich ein Review veröffentlicht, in dem sie sich methodisch ähnlich mit einer Literaturrecherche, der Thematik induzierter Gene durch Pathogene genähert haben.

Sie vergleichen in dem Review 32 publizierte Studien, mit verschiedenen Wirt-Pathogen Interaktionen. Dabei finden sie ein typisches Genexpressionsmuster, das durch die verschiedensten Pathogene (u.a. Viren, Bakterien u. Pilze, aber auch nur Proteine als Komponenten von Pathogenen) in verschiedenen Zellen und Geweben hervorgerufen wird. Sie bezeichnen dieses Muster als „Generelles Alarmsignal für Infektionen“.

Interessanterweise finden sich aus der in der vorliegenden Arbeit zusammengestellten Tabelle der 22 differentiell exprimierten Gene 11 in dem Genexpressionsprofil wieder, das Jenner et al. beschrieben haben.

Das Genexpressionsmuster, das charakteristisch für Infektionen ist, ähnelt dem Genexpressionsprofil durch TNF- α und entzündliche Erkrankungen. Bei den Genen, die die Inflammation vermitteln, finden sich übereinstimmend IL-1 β und CXCL1 und 2. Die Autoren beschreiben dieses Cluster als allgemeines transkriptionelles Programm, von welchem die Entzündung induziert wird, die der Infektion folgt. Unter den IFN stimulierten Genen, die eine zentrale Rolle in der Virusabwehr spielen, finden sich übereinstimmend MX2 und CXCL-10. Unter den Aktivatoren der Immunantwort finden sich gemeinsam die Transkriptionsfaktoren STAT 1 und NF κ B 1 und 2 und JUNB, unter den Inhibitoren der Immunantwort NFKBIA und TNFAIP 3. Dies zeigt, dass je nach Fortschreiten der Infektion und der Abwehrreaktion die Zellen mit negativem Feedback durch Hemmung, oder mit positivem Feedback durch Aktivierung der Immunantwort reagieren können.

STATs sind an der intrazellulären Signalwirkung von vielen Zytokinen beteiligt, es sind zytoplasmatische Substratproteine (**S**ignal**t**ransduktoren für **a**ktiviert**e** Transkription). Die Zytokin-Rezeptor-Bindung an der Zelloberfläche führt zur intrazellulären Aktivierung von sogenannten Januskinasen (JAKs), die STATs phosphorylieren. Die Phosphorylierung führt zur Dimerisierung und zur Translokation in den Zellkern. Dort binden STATs an spezifische DNA Bindungssequenzen in Genpromotoren und bewirken als Transkriptionsfaktoren die Aktivierung der Gene (Seyffert, 2003, S.141).

Die STAT 1 Induktion wird sowohl von TNF- α beeinflusst (Ahmed und Ivashkiv, 2000), als auch durch die Synovialflüssigkeit aus betroffenen Gelenken von RA Patienten (Wang et al., 1995).

Die übereinstimmend gefundenen differentiell exprimierten Gene spielen wichtige Rollen in der Inflammation. Die Untersuchungen von Jenner et al. zu den Wirt-Pathogen-Interaktionen, die Übereinstimmungen mit unseren Ergebnissen zeigen, unterstreichen die Relevanz der beschriebenen Zytokinsignatur.

Zusammenfassend lässt sich aussagen, dass TNF- α als Prototyp proinflammatorischer Zytokine eine systemische Signatur im peripheren Blut hinterlässt, obwohl sich die Entzündungen bei Autoimmunerkrankungen wie der RA zum Teil nur lokalisiert in den Gelenken ausprägen. Diese Signatur zeigt entzündungsrelevante Genexpressionsmuster.

4.3.2 Bedeutung krankheitsspezifischer Gene

Die Möglichkeit, dass sich Zeichen einer lokalisierten Entzündung spezifisch im peripheren Blut abbilden, wirft neue Möglichkeiten für die Handhabung von Prognostik, Diagnostik und Therapie im klinischen Alltag auf.

Für die Rheumatoide Arthritis könnte das zum Beispiel bedeuten, dass mittels einer Blutentnahme, die für den Patienten im Vergleich zu einer Gelenkpunktion nur wenig belastend ist und weniger Risiken birgt, wichtige Fragen geklärt werden könnten. So könnten krankheitsspezifische Gene in frühen Erkrankungsstadien die Diagnose sichern. Dies wäre eine Erweiterung des diagnostischen Repertoires neben den bereits etablierten, aber nicht ausreichend sensitiven und spezifischen Parametern, wie zum Beispiel den Rheumafaktoren.

Für die Therapie der Autoimmunerkrankungen könnten in der Zukunft vielleicht prognostische Screeningverfahren auf der Basis von Genanalysen etabliert werden. Hier wären sie als eine Möglichkeit interessant vor der Behandlung Responder und Non-Respondern von teuren und risikobehafteten Therapien zu ermitteln. Das würde zum Beispiel für die Behandlung mit Biologika wie Infliximab von Bedeutung sein, die sehr teuer sind und ein schwerwiegendes Nebenwirkungsprofil haben. Wenn nur Responder behandelt werden, würde dies sowohl die enormen Kosten der Therapie, als auch das individuelle Risiko

von erheblichen Nebenwirkungen, wie Lymphomerkrankungen, Tuberkulose, Herzinsuffizienz und Leberversagen herabsetzen.

Lequerre et al. haben sich mit dieser Problematik beschäftigt und gezeigt, dass es möglich ist Therapieresponder nach Infliximab Gabe zu identifizieren (Lequerre, et al., 2006). Sie konnten mit ihren Genanalysen die klinischen Responder von den Non-Respondern nach 3 Monaten Therapie mit Ifx unterscheiden. Wenn es möglich wäre Therapieresponder mit der Hilfe von Genanalysen früher zu erfassen, könnte dies einen Beitrag zur Sicherheit der Biologikatherapie sein.

Weitere Untersuchungen müssen klären, ob und wie es möglich ist Testverfahren auf der Basis von Genanalysen zu entwickeln, die nicht invasiv die Möglichkeiten von Diagnostik und Prognose in der klinischen Praxis erweitern.

Anschließend an diese Arbeit, die sich orientierend mit TNF- α induzierten Genen in humanen Zellen beschäftigt hat, sind Untersuchungen in humanen Monozyten geplant. Es soll ein Genexpressionsprofil TNF- α regulierter Gene in Monozyten von gesunden Probanden erstellt werden. Dieses soll wiederum mit den krankheitsregulierten Genen in Monozyten verglichen werden, die auch in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden. Nachfolgend sollen sich funktionelle Untersuchungen zu einzelnen Genen in zellrelevanten Prozessen anschließen. Diese Untersuchungen sollen weitere Einsichten in die Möglichkeiten von Genprofilanalysen bei Autoimmunerkrankungen, besonders bei rheumatischen Erkrankungen bringen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Das Zytokin TNF- α spielt sowohl in physiologischen, als auch in pathologischen Entzündungsreaktionen eine Schlüsselrolle. In der vorliegenden Arbeit wurden TNF- α Wirkungen auf Immunzellen und ihre Beeinflussung durch den anti TNF- α Blocker Infliximab untersucht. Dabei wurden Charakteristika der membranständigen TNF- α Expression auf isolierten Th-Zellen gesunder Blutspender beschrieben.

Es wurde gezeigt, dass mTNF- α auf CD3/CD28 stimulierten Th-Zellen exprimiert wird. In der mTNF- α Färbung mittels fluoreszenzgekoppeltem Infliximab zeigte sich bei der durchflusszytometrischen Messung 72 h nach der Stimulation mit 12% gefärbter Zellen die maximale Expression. Auf unstimulierten Zellen war kein mTNF- α nachweisbar.

Das mTNF- α ist als Vorläufer des löslichen TNF- α auf Immunzellen exprimiert. Es wirkt als Ligand über die Bindung an TNF Rezeptoren. Ob es auch als Rezeptor über ein Reverses Signaling wirkt, war ein Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Anhand der Wirkungen auf den Sauerstoffverbrauch, die Zytokinsynthese, die Apoptose und die Proliferation von humanen isolierten CD4 positiven T-Zellen, sollte die Wirkung von Infliximab auf elementare Zellprozesse in vitro untersucht werden. Bezüglich dieser Parameter konnten keine Effekte von Infliximab auf CD4 positive T-Zellen gefunden werden. Keiner der untersuchten Outcome Parameter veränderte sich, weder in stimulierten noch in unstimulierten Zellen. Es konnten keine Veränderungen des Sauerstoffverbrauches, der intrazellulären Zytokinkonzentrationen (IL-2, IFN- γ), der Anzahl der apoptotischen Zellen oder der Proliferationseigenschaften beobachtet werden. Mit den vorliegenden Ergebnissen konnte kein Effekt des Infliximab auf das Reverse Signaling durch mTNF- α nachgewiesen werden. Obwohl stimulierte CD4 positive T-Zellen mTNF- α exprimieren, wie durch die Kinetik gezeigt wurde und obwohl Infliximab an das membranständige TNF- α bindet, wie durch die Färbung mit fluoreszenzgekoppeltem Infliximab nachgewiesen wurde, zeigte sich kein Effekt von Infliximab auf die untersuchten Th-Zellen.

Andere Autoren haben Effekte von Ixf auf das Reverse Signaling in

verschiedenen Immunzellgruppen gezeigt. Die ausbleibenden Effekte in der vorliegenden Arbeit kann auf die hohe Reinheit der CD4 positiven T-Zellen und die fehlenden Zellveränderungen durch eine Autoimmunerkrankung zurückgeführt werden. Es wurden Zellen gesunder Blutspender untersucht.

Weiterhin beschäftigte sich die Arbeit mit TNF- α vermittelter, differentieller Genexpression und deren Vergleich mit krankheitsregulierter Genexpression.

In der Literatur sind Untersuchungen zu durch TNF- α differentiell exprimierten Genen in verschiedenen humanen Zellen beschrieben. Im Vergleich mit diesen Genexpressionsmustern zeigten sich Übereinstimmungen mit den Expressionsmustern durch entzündliche Erkrankungen, die in einer anderen Untersuchung beschrieben sind. Durch RA, OA, SLE und AS werden Gene in Monozyten von Patienten differentiell exprimiert, die sich zum Teil übereinstimmend auch in der Literatur als durch TNF- α differentiell exprimiert finden.

In der vorliegenden Arbeit wurden 22 Gene beschrieben, die sowohl in mehr als einer Publikation als durch TNF- α exprimiert genannt wurden, als auch krankheitsreguliert waren. Unter den übereinstimmenden Genen finden sich viele, die in wichtigen Signalübertragungsprozessen eine Rolle spielen, so NF κ B, STAT 1 und NF κ BIA.

Die TNF- α Wirkungen werden in Gensignaturen von Monozyten von Patienten mit entzündlichen Erkrankungen erkennbar. Bei dem Vergleich von TNF- α - und krankheitsregulierten Genexpressionsmustern wurden Veränderungen gefunden, die typisch für eine TNF- α vermittelte Inflammationsreaktion zu sein scheinen.

Es konnte gezeigt werden, dass TNF- α eine systemische Signatur im peripheren Blut hinterlässt, obwohl sich die Entzündungen bei Autoimmunerkrankungen wie RA lokalisiert in den Gelenken ausprägen. Diese Signatur zeigt entzündungsrelevante Genexpressionsmuster.

In der Zukunft könnten möglicherweise Screeningverfahren auf der Basis von Genanalysen für die Diagnostik und Prognostik von Autoimmunerkrankungen entwickelt werden. Diese könnten das Repertoire um eine nicht-invasive Möglichkeit zur Diagnostik von Erkrankungen wie der RA erweitern.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Agnholt, J. and Kaltoft, K. (2001): Infliximab downregulates interferon-gamma production in activated gut T-lymphocytes from patients with Crohn's disease, *Cytokine* (vol. 15), No. 4, pp. 212-22.
- Ahmed, S. T. and Ivashkiv, L. B. (2000): Inhibition of IL-6 and IL-10 signaling and Stat activation by inflammatory and stress pathways, *J Immunol* (vol. 165), No. 9, pp. 5227-37.
- Aversa, G.; Punnonen, J. and de Vries, J. E. (1993): The 26-kD transmembrane form of tumor necrosis factor alpha on activated CD4+ T cell clones provides a costimulatory signal for human B cell activation, *J Exp Med* (vol. 177), No. 6, pp. 1575-85.
- Baier, A.; Meineckel, I.; Gay, S. and Pap, T. (2003): Apoptosis in rheumatoid arthritis, *Curr Opin Rheumatol* (vol. 15), No. 3, pp. 274-9.
- Beckham, J. C.; Caldwell, D. S.; Peterson, B. L.; Pippen, A. M.; Currie, M. S.; Keefe, F. J. and Weinberg, J. B. (1992): Disease severity in rheumatoid arthritis: relationships of plasma tumor necrosis factor-alpha, soluble interleukin 2-receptor, soluble CD4/CD8 ratio, neopterin, and fibrin D-dimer to traditional severity and functional measures, *J Clin Immunol* (vol. 12), No. 5, pp. 353-61.
- Beg, A. A. and Baltimore, D. (1996): An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death, *Science* (vol. 274), No. 5288, pp. 782-4.
- Boirivant, M.; Marini, M.; Di Felice, G.; Pronio, A. M.; Montesani, C.; Tersigni, R. and Strober, W. (1999): Lamina propria T cells in Crohn's disease and other gastrointestinal inflammation show defective CD2 pathway-induced apoptosis, *Gastroenterology* (vol. 116), No. 3, pp. 557-65.
- Braun, J.; Brandt, J.; Listing, J.; Zink, A.; Alten, R.; Golder, W.; Gromnica-Ihle, E.; Kellner, H.; Krause, A.; Schneider, M.; Sorensen, H.; Zeidler, H.; Thriene, W. and Sieper, J. (2002): Treatment of active ankylosing spondylitis with infliximab: a randomised controlled multicentre trial, *Lancet* (vol. 359), No. 9313, pp. 1187-93.
- Breese, E. J.; Michie, C. A.; Nicholls, S. W.; Murch, S. H.; Williams, C. B.; Domizio, P.; Walker-Smith, J. A. and MacDonald, T. T. (1994): Tumor necrosis factor alpha-producing cells in the intestinal mucosa of children with inflammatory bowel disease, *Gastroenterology* (vol. 106), No. 6, pp. 1455-66.
- Brennan, F. M.; Browne, K. A.; Green, P. A.; Jaspar, J. M.; Maini, R. N. and Feldmann, M. (1997): Reduction of serum matrix metalloproteinase 1 and matrix metalloproteinase 3 in rheumatoid arthritis patients following anti-tumour necrosis factor-alpha (cA2) therapy, *Br J Rheumatol* (vol. 36), No. 6, pp. 643-50.
- Buntinx, M.; Gielen, E.; Van Hummelen, P.; Raus, J.; Ameloot, M.; Steels, P. and Stinissen, P. (2004): Cytokine-induced cell death in human oligodendroglial cell lines. II: Alterations in gene expression induced by interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha, *J Neurosci Res* (vol. 76), No. 6, pp. 846-61.
- Catrina, A. I.; Trollmo, C.; af Klint, E.; Engstrom, M.; Lampa, J.; Hermansson, Y.; Klareskog, L. and Ulfgren, A. K. (2005): Evidence that anti-tumor necrosis factor therapy with both etanercept and infliximab induces apoptosis in macrophages, but not lymphocytes, in rheumatoid arthritis joints: extended report, *Arthritis Rheum* (vol. 52), No. 1, pp. 61-72.
- Chu, C. Q.; Field, M.; Feldmann, M. and Maini, R. N. (1991): Localization of tumor necrosis factor alpha in synovial tissues and at the cartilage-pannus junction in patients with rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum* (vol. 34), No. 9, pp. 1125-32.
- Clark, J.; Vagenas, P.; Panesar, M. and Cope, A. P. (2005): What does tumour necrosis factor excess do to the immune system long term? *Ann Rheum Dis* (vol. 64 Suppl 4), pp. iv70-6.
- Cornillie, F.; Shealy, D.; D'Haens, G.; Geboes, K.; Van Assche, G.; Ceuppens, J.; Wagner, C.; Schaible, T.; Plevy, S. E.; Targan, S. R. and Rutgeerts, P. (2001): Infliximab induces potent anti-inflammatory and local immunomodulatory activity but no systemic immune suppression in patients with Crohn's disease, *Aliment Pharmacol Ther* (vol. 15), No. 4, pp. 463-73.
- Crowe, P. D.; Walter, B. N.; Mohler, K. M.; Otten-Evans, C.; Black, R. A. and Ware, C. F.

- (1995): A metalloprotease inhibitor blocks shedding of the 80-kD TNF receptor and TNF processing in T lymphocytes, *J Exp Med* (vol. 181), No. 3, pp. 1205-10.
- Di Sabatino, A.; Ciccocioppo, R.; Cinque, B.; Millimaggi, D.; Morera, R.; Ricevuti, L.; Cifone, M. G. and Corazza, G. R. (2004): Defective mucosal T cell death is sustainably reverted by infliximab in a caspase dependent pathway in Crohn's disease, *Gut* (vol. 53), No. 1, pp. 70-7.
- Eissner, G.; Kirchner, S.; Lindner, H.; Kolch, W.; Janosch, P.; Grell, M.; Scheurich, P.; Andreesen, R. and Holler, E. (2000): Reverse signaling through transmembrane TNF confers resistance to lipopolysaccharide in human monocytes and macrophages, *J Immunol* (vol. 164), No. 12, pp. 6193-8.
- Eissner, G.; Kohlhuber, F.; Grell, M.; Ueffing, M.; Scheurich, P.; Hieke, A.; Multhoff, G.; Bornkamm, G. W. and Holler, E. (1995): Critical involvement of transmembrane tumor necrosis factor-alpha in endothelial programmed cell death mediated by ionizing radiation and bacterial endotoxin, *Blood* (vol. 86), No. 11, pp. 4184-93.
- Elliott, M. J.; Maini, R. N.; Feldmann, M.; Kalden, J. R.; Antoni, C.; Smolen, J. S.; Leeb, B.; Breedveld, F. C.; Macfarlane, J. D.; Bijl, H. and et al. (1994): Randomised double-blind comparison of chimeric monoclonal antibody to tumour necrosis factor alpha (cA2) versus placebo in rheumatoid arthritis, *Lancet* (vol. 344), No. 8930, pp. 1105-10.
- Ferran, C.; Dautry, F.; Merite, S.; Sheehan, K.; Schreiber, R.; Grau, G.; Bach, J. F. and Chatenoud, L. (1994): Anti-tumor necrosis factor modulates anti-CD3-triggered T cell cytokine gene expression in vivo, *J Clin Invest* (vol. 93), No. 5, pp. 2189-96.
- Firestein, G. S. (2003): Evolving concepts of rheumatoid arthritis, *Nature* (vol. 423), No. 6937, pp. 356-61.
- Gallagher, J.; Howlin, J.; McCarthy, C.; Murphy, E. P.; Bresnihan, B.; FitzGerald, O.; Godson, C.; Brady, H. R. and Martin, F. (2003): Identification of Naf1/ABIN-1 among TNF-alpha-induced expressed genes in human synoviocytes using oligonucleotide microarrays, *FEBS Lett* (vol. 551), No. 1-3, pp. 8-12.
- Grell, M.; Douni, E.; Wajant, H.; Lohden, M.; Clauss, M.; Maxeiner, B.; Georgopoulos, S.; Lesslauer, W.; Kollias, G.; Pfizenmaier, K. and et al. (1995): The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor, *Cell* (vol. 83), No. 5, pp. 793-802.
- Haddad, A.; Biennu, J. and Miossec, P. (1998): Increased production of a Th2 cytokine profile by activated whole blood cells from rheumatoid arthritis patients, *J Clin Immunol* (vol. 18), No. 6, pp. 399-403.
- Harashima, S.; Horiuchi, T.; Hatta, N.; Morita, C.; Higuchi, M.; Sawabe, T.; Tsukamoto, H.; Tahira, T.; Hayashi, K.; Fujita, S. and Niho, Y. (2001): Outside-to-inside signal through the membrane TNF-alpha induces E-selectin (CD62E) expression on activated human CD4+ T cells, *J Immunol* (vol. 166), No. 1, pp. 130-6.
- Harrison TR; Dietel M (Hrsg.); (2003): *Harrisons Innere Medizin*, 15. Auflage, ABW Wissenschaftsverlag, Berlin; Leiben.
- Higuchi, M.; Nagasawa, K.; Horiuchi, T.; Oike, M.; Ito, Y.; Yasukawa, M. and Niho, Y. (1997): Membrane tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) expressed on HTLV-I-infected T cells mediates a costimulatory signal for B cell activation--characterization of membrane TNF-alpha, *Clin Immunol Immunopathol* (vol. 82), No. 2, pp. 133-40.
- Ina, K.; Itoh, J.; Fukushima, K.; Kusugami, K.; Yamaguchi, T.; Kyokane, K.; Imada, A.; Binion, D. G.; Musso, A.; West, G. A.; Dobrea, G. M.; McCormick, T. S.; Lapetina, E. G.; Levine, A. D.; Ottaway, C. A. and Fiocchi, C. (1999): Resistance of Crohn's disease T cells to multiple apoptotic signals is associated with a Bcl-2/Bax mucosal imbalance, *J Immunol* (vol. 163), No. 2, pp. 1081-90.
- Janeway CA; Travers P; Walport M; Shlomchik M; (2002): *Immunologie*, 5. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin.
- Jenner, R. G. and Young, R. A. (2005): Insights into host responses against pathogens from transcriptional profiling, *Nat Rev Microbiol* (vol. 3), No. 4, pp. 281-94.
- Kawashima, M. and Miossec, P. (2005): Effect of treatment of rheumatoid arthritis with infliximab on IFN gamma, IL4, T-bet, and GATA-3 expression: link with improvement of systemic inflammation and disease activity, *Ann Rheum Dis* (vol. 64), No. 3, pp. 415-8.

- Keane, J.; Gershon, S.; Wise, R. P.; Mirabile-Levens, E.; Kasznica, J.; Schwieterman, W. D.; Siegel, J. N. and Braun, M. M. (2001): Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent, *N Engl J Med* (vol. 345), No. 15, pp. 1098-104.
- Keystone, E. C. (2005): Safety of biologic therapies--an update, *J Rheumatol Suppl* (vol. 74), pp. 8-12.
- Kinkhabwala, M.; Sehajpal, P.; Skolnik, E.; Smith, D.; Sharma, V. K.; Vlassara, H.; Cerami, A. and Suthanthiran, M. (1990): A novel addition to the T cell repertory. Cell surface expression of tumor necrosis factor/cachectin by activated normal human T cells, *J Exp Med* (vol. 171), No. 3, pp. 941-6.
- Kirchner, S.; Boldt, S.; Kolch, W.; Haffner, S.; Kazak, S.; Janosch, P.; Holler, E.; Andreesen, R. and Eissner, G. (2004): LPS resistance in monocytic cells caused by reverse signaling through transmembrane TNF (mTNF) is mediated by the MAPK/ERK pathway, *J Leukoc Biol* (vol. 75), No. 2, pp. 324-31.
- Kirchner, S.; Holler, E.; Haffner, S.; Andreesen, R. and Eissner, G. (2004): Effect of different tumor necrosis factor (TNF) reactive agents on reverse signaling of membrane integrated TNF in monocytes, *Cytokine* (vol. 28), No. 2, pp. 67-74.
- Kriegler, M.; Perez, C.; DeFay, K.; Albert, I. and Lu, S. D. (1988): A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF, *Cell* (vol. 53), No. 1, pp. 45-53.
- Kurosaka, M. and Ziff, M. (1983): Immunoelectron microscopic study of the distribution of T cell subsets in rheumatoid synovium, *J Exp Med* (vol. 158), No. 4, pp. 1191-210.
- Lequerre, T.; Gauthier-Jauneau, A. C.; Bansard, C.; Derambure, C.; Hiron, M.; Vittecoq, O.; Daveau, M.; Mejjad, O.; Daragon, A.; Tron, F.; Le Loet, X. and Salier, J. P. (2006): Gene profiling in white blood cells predicts infliximab responsiveness in rheumatoid arthritis, *Arthritis Res Ther* (vol. 8), No. 4, p. R105.
- Lipsky, P. E.; van der Heijde, D. M.; St Clair, E. W.; Furst, D. E.; Breedveld, F. C.; Kalden, J. R.; Smolen, J. S.; Weisman, M.; Emery, P.; Feldmann, M.; Harriman, G. R. and Maini, R. N. (2000): Infliximab and methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. Anti-Tumor Necrosis Factor Trial in Rheumatoid Arthritis with Concomitant Therapy Study Group, *N Engl J Med* (vol. 343), No. 22, pp. 1594-602.
- Listing, J.; Strangfeld, A.; Rau, R.; Kekow, J.; Gromnica-Ihle, E.; Klopsch, T.; Demary, W.; Burmester, G. R. and Zink, A. (2006): Clinical and functional remission: even though biologics are superior to conventional DMARDs overall success rates remain low--results from RABBIT, the German biologics register, *Arthritis Res Ther* (vol. 8), No. 3, p. R66.
- Lugering, A.; Schmidt, M.; Lugering, N.; Pauels, H. G.; Domschke, W. and Kucharzik, T. (2001): Infliximab induces apoptosis in monocytes from patients with chronic active Crohn's disease by using a caspase-dependent pathway, *Gastroenterology* (vol. 121), No. 5, pp. 1145-57.
- Macchia, D.; Almerigogna, F.; Parronchi, P.; Ravina, A.; Maggi, E. and Romagnani, S. (1993): Membrane tumour necrosis factor-alpha is involved in the polyclonal B-cell activation induced by HIV-infected human T cells, *Nature* (vol. 363), No. 6428, pp. 464-6.
- Mitoma, H.; Horiuchi, T.; Hatta, N.; Tsukamoto, H.; Harashima, S.; Kikuchi, Y.; Otsuka, J.; Okamura, S.; Fujita, S. and Harada, M. (2005): Infliximab induces potent anti-inflammatory responses by outside-to-inside signals through transmembrane TNF-alpha, *Gastroenterology* (vol. 128), No. 2, pp. 376-92.
- Morita, Y.; Yamamura, M.; Kawashima, M.; Harada, S.; Tsuji, K.; Shibuya, K.; Maruyama, K. and Makino, H. (1998): Flow cytometric single-cell analysis of cytokine production by CD4+ T cells in synovial tissue and peripheral blood from patients with rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum* (vol. 41), No. 9, pp. 1669-76.
- Muller-Ladner, U.; Gay, R. E. and Gay, S. (2002): Role of nuclear factor kappaB in synovial inflammation, *Curr Rheumatol Rep* (vol. 4), No. 3, pp. 201-7.
- Namekawa, T.; Snyder, M. R.; Yen, J. H.; Goehring, B. E.; Leibson, P. J.; Weyand, C. M. and Goronzy, J. J. (2000): Killer cell activating receptors function as costimulatory molecules on CD4+CD28null T cells clonally expanded in rheumatoid arthritis, *J Immunol* (vol. 165), No. 2, pp. 1138-45.

- Nestorov, I. (2005): Clinical pharmacokinetics of TNF antagonists: how do they differ? *Semin Arthritis Rheum* (vol. 34), No. 5 Suppl1, pp. 12-8.
- Newton, R. C.; Solomon, K. A.; Covington, M. B.; Decicco, C. P.; Haley, P. J.; Friedman, S. M. and Vaddi, K. (2001): Biology of TACE inhibition, *Ann Rheum Dis* (vol. 60 Suppl 3), pp. iii25-32.
- Osawa, Y.; Nagaki, M.; Banno, Y.; Brenner, D. A.; Asano, T.; Nozawa, Y.; Moriwaki, H. and Nakashima, S. (2002): Tumor necrosis factor alpha-induced interleukin-8 production via NF-kappaB and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathways inhibits cell apoptosis in human hepatocytes, *Infect Immun* (vol. 70), No. 11, pp. 6294-301.
- Paleolog, E. M.; Hunt, M.; Elliott, M. J.; Feldmann, M.; Maini, R. N. and Woody, J. N. (1996): Deactivation of vascular endothelium by monoclonal anti-tumor necrosis factor alpha antibody in rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum* (vol. 39), No. 7, pp. 1082-91.
- Papadakis, K. A. and Targan, S. R. (2000): Tumor necrosis factor: biology and therapeutic inhibitors, *Gastroenterology* (vol. 119), No. 4, pp. 1148-57.
- Pedron, T.; Thibault, C. and Sansonetti, P. J. (2003): The invasive phenotype of *Shigella flexneri* directs a distinct gene expression pattern in the human intestinal epithelial cell line Caco-2, *J Biol Chem* (vol. 278), No. 36, pp. 33878-86.
- Ponchel, F.; Morgan, A. W.; Bingham, S. J.; Quinn, M.; Buch, M.; Verburg, R. J.; Henwood, J.; Douglas, S. H.; Masurel, A.; Conaghan, P.; Gesinde, M.; Taylor, J.; Markham, A. F.; Emery, P.; van Laar, J. M. and Isaacs, J. D. (2002): Dysregulated lymphocyte proliferation and differentiation in patients with rheumatoid arthritis, *Blood* (vol. 100), No. 13, pp. 4550-6.
- Reinecker, H. C.; Steffen, M.; Witthoef, T.; Pflueger, I.; Schreiber, S.; MacDermott, R. P. and Raedler, A. (1993): Enhanced secretion of tumour necrosis factor-alpha, IL-6, and IL-1 beta by isolated lamina propria mononuclear cells from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease, *Clin Exp Immunol* (vol. 94), No. 1, pp. 174-81.
- Roy, S.; Khanna, S.; Shah, H.; Rink, C.; Phillips, C.; Preuss, H.; Subbaraju, G. V.; Trimurtulu, G.; Krishnaraju, A. V.; Bagchi, M.; Bagchi, D. and Sen, C. K. (2005): Human genome screen to identify the genetic basis of the anti-inflammatory effects of *Boswellia* in microvascular endothelial cells, *DNA Cell Biol* (vol. 24), No. 4, pp. 244-55.
- Rutgeerts, P.; D'Haens, G.; Targan, S.; Vasilias, E.; Hanauer, S. B.; Present, D. H.; Mayer, L.; Van Hogezand, R. A.; Braakman, T.; DeWoody, K. L.; Schaible, T. F. and Van Deventer, S. J. (1999): Efficacy and safety of retreatment with anti-tumor necrosis factor antibody (infliximab) to maintain remission in Crohn's disease, *Gastroenterology* (vol. 117), No. 4, pp. 761-9.
- Sari, I.; Akar, S.; Birlik, M.; Sis, B.; Onen, F. and Akkoc, N. (2006): Anti-Tumor Necrosis Factor-alpha-Induced Psoriasis, *J Rheumatol* (vol. 33), No. 7, pp. 1411-4.
- Scallon, B.; Cai, A.; Solowski, N.; Rosenberg, A.; Song, X. Y.; Shealy, D. and Wagner, C. (2002): Binding and functional comparisons of two types of tumor necrosis factor antagonists, *J Pharmacol Exp Ther* (vol. 301), No. 2, pp. 418-26.
- Scallon, B. J.; Moore, M. A.; Trinh, H.; Knight, D. M. and Ghayeb, J. (1995): Chimeric anti-TNF-alpha monoclonal antibody cA2 binds recombinant transmembrane TNF-alpha and activates immune effector functions, *Cytokine* (vol. 7), No. 3, pp. 251-9.
- Schwab, M. and Klotz, U. (2001): Pharmacokinetic considerations in the treatment of inflammatory bowel disease, *Clin Pharmacokinet* (vol. 40), No. 10, pp. 723-51.
- Seyffert W; Balling R; (2003): *Lehrbuch der Genetik*, 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg; Berlin.
- Shi, J.; Schmitt-Talbot, E.; DiMattia, D. A. and Dullea, R. G. (2004): The differential effects of IL-1 and TNF-alpha on proinflammatory cytokine and matrix metalloproteinase expression in human chondrosarcoma cells, *Inflamm Res* (vol. 53), No. 8, pp. 377-89.
- Sieper, J. and Van Den Brande, J. (2005): Diverse effects of infliximab and etanercept on T lymphocytes, *Semin Arthritis Rheum* (vol. 34), No. 5 Suppl1, pp. 23-7.
- Smeets, T. J.; Kraan, M. C.; van Loon, M. E. and Tak, P. P. (2003): Tumor necrosis factor alpha blockade reduces the synovial cell infiltrate early after initiation of treatment, but apparently not by induction of apoptosis in synovial tissue, *Arthritis Rheum* (vol. 48), No. 8, pp. 2155-62.

- Snyder, M. R.; Muegge, L. O.; Offord, C.; O'Fallon, W. M.; Bajzer, Z.; Weyand, C. M. and Goronzy, J. J. (2002): Formation of the killer Ig-like receptor repertoire on CD4+CD28null T cells, *J Immunol* (vol. 168), No. 8, pp. 3839-46.
- Solomon, K. A.; Covington, M. B.; DeCicco, C. P. and Newton, R. C. (1997): The fate of pro-TNF-alpha following inhibition of metalloprotease-dependent processing to soluble TNF-alpha in human monocytes, *J Immunol* (vol. 159), No. 9, pp. 4524-31.
- Tak, P. P. (2005): Effects of infliximab treatment on rheumatoid synovial tissue, *J Rheumatol Suppl* (vol. 74), pp. 31-4.
- Tak, P. P. and Bresnihan, B. (2000): The pathogenesis and prevention of joint damage in rheumatoid arthritis: advances from synovial biopsy and tissue analysis, *Arthritis Rheum* (vol. 43), No. 12, pp. 2619-33.
- Tak, P. P.; Taylor, P. C.; Breedveld, F. C.; Smeets, T. J.; Daha, M. R.; Kluin, P. M.; Meinders, A. E. and Maini, R. N. (1996): Decrease in cellularity and expression of adhesion molecules by anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody treatment in patients with rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum* (vol. 39), No. 7, pp. 1077-81.
- Targan, S. R.; Hanauer, S. B.; van Deventer, S. J.; Mayer, L.; Present, D. H.; Braakman, T.; DeWoody, K. L.; Schaible, T. F. and Rutgeerts, P. J. (1997): A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. Crohn's Disease cA2 Study Group, *N Engl J Med* (vol. 337), No. 15, pp. 1029-35.
- Taylor, P. C.; Peters, A. M.; Paleolog, E.; Chapman, P. T.; Elliott, M. J.; McCloskey, R.; Feldmann, M. and Maini, R. N. (2000): Reduction of chemokine levels and leukocyte traffic to joints by tumor necrosis factor alpha blockade in patients with rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum* (vol. 43), No. 1, pp. 38-47.
- Taylor, P. C.; Steuer, A.; Gruber, J.; Cosgrove, D. O.; Blomley, M. J.; Marsters, P. A.; Wagner, C. L.; McClinton, C. and Maini, R. N. (2004): Comparison of ultrasonographic assessment of synovitis and joint vascularity with radiographic evaluation in a randomized, placebo-controlled study of infliximab therapy in early rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum* (vol. 50), No. 4, pp. 1107-16.
- ten Hove, T.; van Montfrans, C.; Peppelenbosch, M. P. and van Deventer, S. J. (2002): Infliximab treatment induces apoptosis of lamina propria T lymphocytes in Crohn's disease, *Gut* (vol. 50), No. 2, pp. 206-11.
- Ulfgren, A. K.; Andersson, U.; Engstrom, M.; Klareskog, L.; Maini, R. N. and Taylor, P. C. (2000): Systemic anti-tumor necrosis factor alpha therapy in rheumatoid arthritis down-regulates synovial tumor necrosis factor alpha synthesis, *Arthritis Rheum* (vol. 43), No. 11, pp. 2391-6.
- Ulfgren, A. K.; Lindblad, S.; Klareskog, L.; Andersson, J. and Andersson, U. (1995): Detection of cytokine producing cells in the synovial membrane from patients with rheumatoid arthritis, *Ann Rheum Dis* (vol. 54), No. 8, pp. 654-61.
- Valencia, X.; Stephens, G.; Goldbach-Mansky, R.; Wilson, M.; Shevach, E. M. and Lipsky, P. E. (2006): TNF downmodulates the function of human CD4+CD25hi T-regulatory cells, *Blood* (vol. 108), No. 1, pp. 253-61.
- Van den Brande, J. M.; Braat, H.; van den Brink, G. R.; Versteeg, H. H.; Bauer, C. A.; Hoedemaeker, I.; van Montfrans, C.; Hommes, D. W.; Peppelenbosch, M. P. and van Deventer, S. J. (2003): Infliximab but not etanercept induces apoptosis in lamina propria T-lymphocytes from patients with Crohn's disease, *Gastroenterology* (vol. 124), No. 7, pp. 1774-85.
- van Deventer, S. J. (2001): Transmembrane TNF-alpha, induction of apoptosis, and the efficacy of TNF-targeting therapies in Crohn's disease, *Gastroenterology* (vol. 121), No. 5, pp. 1242-6.
- van Dullemen, H. M.; van Deventer, S. J.; Hommes, D. W.; Bijl, H. A.; Jansen, J.; Tytgat, G. N. and Woody, J. (1995): Treatment of Crohn's disease with anti-tumor necrosis factor chimeric monoclonal antibody (cA2), *Gastroenterology* (vol. 109), No. 1, pp. 129-35.
- Varfolomeev, E. E. and Ashkenazi, A. (2004): Tumor necrosis factor: an apoptosis JuNKie? *Cell* (vol. 116), No. 4, pp. 491-7.
- Vassalli, P. (1992): The pathophysiology of tumor necrosis factors, *Annu Rev Immunol* (vol. 10), pp. 411-52.

- Viemann, D.; Goebeler, M.; Schmid, S.; Klimmek, K.; Sorg, C.; Ludwig, S. and Roth, J. (2004): Transcriptional profiling of IKK2/NF-kappa B- and p38 MAP kinase-dependent gene expression in TNF-alpha-stimulated primary human endothelial cells, *Blood* (vol. 103), No. 9, pp. 3365-73.
- Wagner, U.; Pierer, M.; Wahle, M.; Moritz, F.; Kaltenhauser, S. and Hantzschel, H. (2004): Ex vivo homeostatic proliferation of CD4+ T cells in rheumatoid arthritis is dysregulated and driven by membrane-anchored TNFalpha, *J Immunol* (vol. 173), No. 4, pp. 2825-33.
- Wang, C. Y.; Mayo, M. W.; Korneluk, R. G.; Goeddel, D. V. and Baldwin, A. S., Jr. (1998): NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation, *Science* (vol. 281), No. 5383, pp. 1680-3.
- Wang, F.; Sengupta, T. K.; Zhong, Z. and Ivashkiv, L. B. (1995): Regulation of the balance of cytokine production and the signal transducer and activator of transcription (STAT) transcription factor activity by cytokines and inflammatory synovial fluids, *J Exp Med* (vol. 182), No. 6, pp. 1825-31.
- Watts, A. D.; Hunt, N. H.; Wanigasekara, Y.; Bloomfield, G.; Wallach, D.; Roufogalis, B. D. and Chaudhri, G. (1999): A casein kinase I motif present in the cytoplasmic domain of members of the tumour necrosis factor ligand family is implicated in 'reverse signalling', *Embo J* (vol. 18), No. 8, pp. 2119-26.
- Yamamoto, Y.; Ishizu, A.; Ikeda, H.; Otsuka, N. and Yoshiki, T. (2004): Dexamethasone increased plasminogen activator inhibitor-1 expression on human umbilical vein endothelial cells: an additive effect to tumor necrosis factor-alpha, *Pathobiology* (vol. 71), No. 6, pp. 295-301.
- Zeidler, H.; (2001): *Interdisziplinäre klinische Rheumatologie*, Springer Verlag, Berlin; Heidelberg; New York; Barcelona; Hongkong; London; Mailand; Paris; Singapur; Tokio.
- Zhang, H. G.; Hyde, K.; Page, G. P.; Brand, J. P.; Zhou, J.; Yu, S.; Allison, D. B.; Hsu, H. C. and Mountz, J. D. (2004): Novel tumor necrosis factor alpha-regulated genes in rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum* (vol. 50), No. 2, pp. 420-31.
- Zwerina, J.; Redlich, K.; Schett, G. and Smolen, J. S. (2005): Pathogenesis of rheumatoid arthritis: targeting cytokines, *Ann N Y Acad Sci* (vol. 1051), pp. 716-29.

7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ADAM	A Disintegrin and Metalloproteinase
AS	Ankylosierende Spondylitis (Morbus Bechterew)
BSA	Bovine Serum Albumin
CFDA–SE	Carboxyfluorescein–Diacetatsuccinimidylester
CD	Cluster of Differentiation
CRP	C–reaktives Protein
CXCL	Chemokin Ligand
Cy5	Indodicarbocyanin
FITC	Fluorescein–Isothiocyanat
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HTLV–1	Human T–cell lymphotropic Virus Typ 1
ICAM	Interzelluläre Adhäsionsmoleküle
IFN– γ	Interferon gamma
Ifx	Infliximab
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
JNK	Januskinasen
kD	Kilo Dalton
MACS	Magnetic Cell Separation
MHC	Major Histokompatibilitäts Komplex
mTNF– α	Membranständiges TNF– α
ND	Normal Donor (Normalspender)
NF κ B	Nuklear Faktor Kappa B
OA	Osteoarthritis (Arthrose)
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphate buffered Saline
PJ	Propidiumjodid
PMA	Phorbol–12–Myristat–13–Acetat
RA	Rheumatoide Arthritis
RPMI	Zellkulturmedium (Roswell Park Memorial Institute)
SLE	Systemischer Lupus erythematoses
STAT	Signaltransduktoren für aktivierte Transkription

sTNF- α	Soluble (lösliches) TNF- α
TACE	TNF- α Convertierungs-Enzym
TGF- β	Transformierender Wachstumsfaktor beta
TLR-4	Toll-like Rezeptor 4
Th-Zellen	T Helfer Zellen
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha

8 DANKSAGUNG

Ich danke meinen Betreuern Dr. Ria Baumgrass (DRFZ Berlin) und Prof. Frank Buttgereit (Charité Berlin), den Mitarbeitern beider Arbeitsgruppen, meiner Familie und meinen Freunden für die unterschiedliche und vielfältige Unterstützung beim Erstellen dieser Arbeit.

9 LEBENSLAUF

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

10 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbst und ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Berlin, den 4. Juli 2007