

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik  
(Department) Tübingen  
Abteilung Innere Medizin II  
(Schwerpunkt: Onkologie, Hämatologie, klinische Immunologie,  
Rheumatologie und Pulmologie)  
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. L. Kanz  
Sektion für Transplantationsimmunologie und Immunhämatologie  
Leiterin: Professor Dr. C. Müller

Identifizierung Interleukin-17 positiver  
Zellpopulationen bei Patienten mit rheumatoider Arthritis

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von

Paul Martin Schlegel

aus

Leipzig

2010

Dekan : Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter : Professor Dr. C. Müller

2. Berichterstatter : Professor Dr. I. Kötter

# Inhaltsverzeichnis

## 1. Einleitung

### 1.1. Rheumatoide Arthritis

- 1.1.1. Geschichte der Rheumatoiden Arthritis..... S. 1
- 1.1.2. Klinik der Rheumatoiden Arthritis..... S. 2
- 1.1.3. Epidemiologie und Ätiologie der Rheumatoiden Arthritis..... S. 5
- 1.1.4. Rolle der T-Zellen bei der Rheumatoiden Arthritis..... S. 6
- 1.1.5. Rolle der Zytokine bei der Rheumatoiden Arthritis..... S. 8

### 1.2. Interleukin 17

- 1.2.1. Entdeckung des Interleukin 17..... S. 11
- 1.2.2. Rezeptoren des Interleukin-17..... S. 12
- 1.2.3. Charakteristika der Mitglieder der IL-17 Familie..... S. 12
- 1.2.4. Das Th1/Th2-Paradigma..... S. 14
- 1.2.5. Differenzierung von naiven T-Zellen zu Th17-Zellen..... S. 15
- 1.2.6. Rolle von Interleukin 17 bei Autoimmunerkrankungen..... S. 18
- 1.2.7. Rolle von Interleukin 17 bei der Rheumatoiden Arthritis..... S. 19

### 1.3. Zielsetzung..... S. 21

## 2. Material und Methoden

- 2.1. Chemikalien..... S. 23
- 2.2. Material..... S. 23
- 2.3. Geräte..... S. 24
- 2.4. Software..... S. 24
- 2.5. Zelllinien..... S. 22
- 2.6. Patienten und Probanden..... S. 25
- 2.7. Isolierung mononukleärer Zellen aus Vollblut..... S. 28
- 2.8. Bestimmung der Anzahl vitaler Zellen mittels Trypanblau..... S. 29
- 2.9. Kryokonservierung der Zellen..... S. 29
- 2.10. Auftauen der Zellen..... S. 29
- 2.11. Stimulanzen
  - 2.11.1. Phytohämagglutinin (PHA)..... S. 30
  - 2.11.2. Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)/Ionomycin..... S. 30

2.11.3. MHC Klasse II CEFT Peptid Pool.....	S. 30
<b>2.12. Antikörper.....</b>	<b>S. 32</b>
<b>2.13. Durchflusszytometrie (FACS)</b>	
2.13.1. Grundlagen der Durchflusszytometrie.....	S. 33
2.13.2. FACS-Analyse von PBMC.....	S. 37
2.13.3. FACS-Analyse von B-Zelllinien.....	S. 39
2.13.4. Färbung von Kontroll-BEADS zur Kompensation.....	S. 40
2.13.5. Messung der Zellen am LSRII.....	S. 41
2.13.6. Ausschluß unspezifisch markierter Zellen.....	S. 41
2.13.7. Identifizierung lebendener und toter Zellen am FACS.....	S. 42
2.13.8. Datenauswertung.....	S. 43
2.13.9. Das Lymphozyten-Gate.....	S. 44
2.13.9.1. Bewertung der CD3 Markierung.....	S. 45
2.13.9.2. Bewertung der CD4 und CD8 Markierung.....	S. 46
2.13.9.3. Bewertung der CD28 Markierung.....	S. 47
2.13.9.4. Bewertung der CD25 Markierung.....	S. 48
2.13.9.5. Bewertung der CD56 Markierung .....	S. 49
2.13.9.6. Bewertung der intrazellulären Markierungen von IL-17 und IFN- $\gamma$ .....	S. 50
2.13.9.7. Nomenklatur der Gates.....	S. 52

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1. Standardisierung der Testreagenzien und Zytokinmengen**

3.1.1. Vergleich von Brefeldin und Monensin als Inhibitor der Zytokinsekretion.....	S. 53
3.1.2. Stimulationskinetik der PMBC zur Optimierung der Interleukin-17 Analyse.....	S. 54
3.1.3. Antikörpertitrations.....	S. 55
3.1.4. Untersuchung zum Einfluss von Einfrieren auf die FACS Detektion von Oberflächenantigenen sowie Interleukin-17 und Interferon- $\gamma$ .....	S. 57

#### **3.2. Charakterisierung von Lymphozytensubpopulationen und ihrer**

## **Zytokinsekretion von RA-Patienten im Vergleich zu Gesunden**

3.2.1. Unterschiede in der Gesamtheit der Lymphozytenpopulationen.....	S. 61
3.2.2. Identifizierung vitaler Zellen im Lymphozytengate.....	S. 64
3.2.3. CD3 <sup>+</sup> Lymphozyten im Gate I	
3.2.3.1. CD3 <sup>+</sup> /CD4 <sup>+</sup> Lymphozyten im Gate I.....	S. 66
3.2.3.2. CD3 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> Lymphozyten im Gate I.....	S. 66
3.2.3.3. CD3 <sup>+</sup> /CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> doppelt positive Lymphozyten im Gate I.....	S. 67
3.2.3.4. CD3 <sup>+</sup> /CD4 <sup>-</sup> /CD8 <sup>-</sup> doppelt negative Lymphozyten im Gate I.....	S. 68
3.2.4. CD3 <sup>-</sup> Zellen im Gate I	
3.2.4.1. CD3 <sup>-</sup> /CD4 <sup>+</sup> Zellen im Gate I.....	S. 69
3.2.4.2. CD3 <sup>-</sup> /CD8 <sup>+</sup> Zellen im Gate I.....	S. 70
3.2.5. CD25 <sup>+</sup> Lymphozyten im Gate I.....	S. 70
3.2.6. CD56 <sup>+</sup> Zellen im Gate I	
3.2.6.1. CD3 <sup>+</sup> /CD56 <sup>+</sup> NK-T-Zellen im Gate I.....	S. 72
3.2.6.2. CD3 <sup>-</sup> /CD56 <sup>+</sup> NK-Zellen im Gate I.....	S. 72
3.2.7. CD28 <sup>+</sup> Lymphozyten im Gate I.....	S. 75
3.2.8. IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen in verschiedenen Zellpopulationen	
3.2.8.1. CD3 <sup>+</sup> /IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Lymphozyten im Gate I.....	S. 77
3.2.8.2. CD3 <sup>-</sup> /IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen im Gate I.....	S. 79
3.2.8.3. CD25 <sup>+</sup> /IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Lymphozyten im Gate I.....	S. 81
3.2.8.4. CD28 <sup>-</sup> /IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Lymphozyten im Gate I.....	S. 82
3.2.9. Interleukin-17 <sup>+</sup> Zellen in verschiedenen Zellpopulationen	
3.2.9.1. IL-17 <sup>+</sup> Lymphozyten im Gate I und im Gate II.....	S. 85
3.2.9.2. CD3 <sup>+</sup> /IL-17 <sup>+</sup> Lymphozyten im Gate I.....	S. 86
3.2.9.3. CD3 <sup>-</sup> /IL-17 <sup>+</sup> Zellen im Gate I.....	S. 88
3.2.9.4. CD25 <sup>+</sup> /IL-17 <sup>+</sup> Lymphozyten im Gate I.....	S. 90
3.2.9.5. CD28 <sup>-</sup> /IL-17 <sup>+</sup> Lymphozyten im Gate I.....	S. 91
3.2.9.6. CD56 <sup>+</sup> /IL-17 <sup>+</sup> Lymphozyten im Gate I.....	S. 92
3.2.10. Interleukin-17 <sup>+</sup> Zellpopulationen	

3.2.10.1. Zellpopulationen der IL-17 <sup>+</sup> Zellen im Lymphozytengate I.....	S. 95
3.2.10.2. Zellpopulationen der IL-17 <sup>+</sup> Zellen im Lymphozytengate II.....	S. 97
3.2.11. IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Zellpopulationen	
3.2.11.1. Zellpopulationen der IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen im Lymphozytengate I.....	S. 99
3.2.11.2. Zellpopulationen der IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen im Lymphozytengate II.....	S. 101
3.2.12. IL-17 <sup>+</sup> /IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> doppelt positive Zellpopulationen.....	S. 104
<b>3.3.</b> Untersuchung der Interleukin-17 <sup>+</sup> /CD3 <sup>-</sup> Zellen.....	S. 106
<b>3.4.</b> Untersuchung von B-Zelllinien auf Interleukin-17 Expression.....	S. 108
<b>3.5.</b> Korrelation klinischer Parameter mit der IL-17 Expression.....	S. 110
<b>4. Diskussion</b>	
<b>4.1.</b> Interleukin-17 exprimierende Zellen in PBMC.....	S. 112
<b>4.2.</b> Unterschiede der Zellpopulationen bei RA-Patienten und Gesunden.....	S. 116
<b>4.3.</b> Unterschiede der IL-17 <sup>+</sup> Zellpopulationen bei RA-Patienten und Gesunden.....	S. 117
<b>4.4.</b> Stimulierbarkeit der Zellpopulation.....	S. 121
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	S. 124
<b>6. Abkürzungsverzeichnis.....</b>	S. 126
<b>7. Literaturverzeichnis.....</b>	S. 129
<b>8. Danksagung.....</b>	S. 142
<b>9. Lebenslauf.....</b>	S. 143

# 1 Einleitung

## 1.1 Rheumatoide Arthritis (RA)

### 1.1.1. Geschichte der RA

Bei Skelettuntersuchungen an Europäern und Nordafrikanern aus der Antike fanden sich Hinweise, dass schon vor mehr als 2000 Jahren verschiedene Erkrankungen des rheumatoiden Formenkreises, wie z.B. Osteoarthritis, Spondylitis ankylosans und Gicht auftraten.<sup>(1)</sup> Typische Läsionen der rheumatoiden Arthritis, wie gelenknahe Osteoporose und Knorpeldestruktion, wurden jedoch nicht gefunden. Andere palaeontopathologische Untersuchungen einiger Jahrtausende alter nordamerikanischer Stämme ergaben klare Belege, dass die RA in diesen Bevölkerungsgruppen schon sehr früh bestand.<sup>(91)</sup> Die Prävalenz der RA ist mit über 5% in einigen Bevölkerungsgruppen dieser geographischen Regionen auch heute noch außerordentlich hoch.

Erste Hinweise für ein Vorkommen der RA in Europa finden sich in Werken des niederländischen Malers Jacob Jordaens aus dem frühen 17. Jahrhundert (Abb. 1) und in einem 1676 von Sydenham veröffentlichten Fallbericht.



**Abbildung 1:** „La Familia de Jordaens en un Jardín“ by Jacob Jordaens (ca.1630) (Museo del Prado, Madrid, Spanien)

Garrod beschrieb 1859 die RA erstmals als klinisch eindeutige Krankheitsentität. Die Namensgebung „rheumatoide“ Arthritis sollte sie von den anderen beiden bereits bekannten Arthritisformen, dem rheumatischen Fieber und der Gicht, abgrenzen.

Der Norweger Erik Waaler entdeckte 1940 den sog. Rheumafaktor und zeigte dass der im Serum von Rheumapatienten häufig vorkommende Antikörper zu einer Hämagglutination mit Schaferythrozyten führt (Waaler-Rose-Test).

1957 definierte Charles Short die Rheumatoide Arthritis als Krankheitsentität, die sich von den seronegativen Sponyloarthropathien, der Osteoarthritis, dem systemischen Lupus Erythematodes und vielen anderen Erkrankungen durch definierte klinische Symptome abgrenzen lässt (s.u.).

### **1.1.2. Klinik der Rheumatoiden Arthritis**

Die Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine chronische, systemische Autoimmunerkrankung, welche sich primär an den Gelenke manifestiert und durch Entzündungsprozesse zu deren Zerstörung führen kann. Synovitische Kapselverdickungen und spindelförmige Gelenkschwellungen finden sich bevorzugt an den Fingergrund- und Fingermittelgelenken, sowie Hand- und Zehengrundgelenken. Die Fingerendgelenke bleiben in der Regel ausgespart. Die Krankheit beginnt mit dem Befall peripherer Gelenke und schreitet im Verlauf nach proximal fort.

Die Diagnose „Rheumatoide Arthritis“ kann nicht anhand einzelner klinischer, radiologischer oder serologischer Parameter gestellt werden. Zur Sicherung der Diagnose werden deshalb seit 1987 die Kriterien des „American College of Rheumatology“ (ACR)<sup>(6)</sup> herangezogen:

- Morgensteifigkeit in und um die Gelenke von mehr als einer Stunde Dauer
- Synovialitis (Arthritis) in mindestens drei Gelenkbereichen
- Synovialitis (Arthritis) der Hand-, Fingergrund- und Fingermittelgelenk
- symmetrischer Gelenkbefall
- subkutane Knoten (Rheumaknoten)
- positiver Rheumafaktor
- typische radiologische Veränderungen an den Händen

Bestehen vier der sieben Kriterien, so gilt die Diagnose der rheumatoide Arthritis als gesichert. Die ersten vier Kriterien müssen mindestens über sechs Wochen bestehen.

Als extraartikuläre Erscheinungsformen können Anämie, Müdigkeit, subkutane Rheumaknoten, viszerale Organbeteiligungen, Neuropathien, Skleritis, das Sjögren Syndrom sowie eine Nierenbeteiligung im Krankheitsverlauf auftreten.

Laborparameter werden zur Diagnose, Differentialdiagnose und insbesondere zur Verlaufskontrolle herangezogen. Hierbei spielen erhöhte Akute-Phase-Proteine (BSG, CRP), der Rheumafaktor und Antikörper gegen citrullinierte Peptid-/Protein-Antigene (anti-CCP) eine wichtige Rolle.

Der Rheumafaktor ist ein Autoantikörper, meist vom IgM Typ, der gegen den Fc-Teil von IgG Immunglobulinen gerichtet ist und bei 70-80% der RA-Patienten gefunden wird. Allerdings ist der Rheumafaktor für die Rheumatoide Arthritis nicht spezifisch, sondern kommt auch gehäuft beim Sjögren Syndrom (70%), dem systemischen Lupus Erythematodes (SLE) (20-30%), bei diversen Virusinfektionen sowie bei 5-10% der Gesunden vor.

Der anti-cyclische Citrulinpeptid (CCP) Antikörper kann mittels ELISA bei den meisten RA-Patienten nachgewiesen werden und kommt bei anderen Krankheitsbildern sehr viel seltener vor.<sup>(54)</sup>

Die Akut-Phase-Proteine sind sehr unspezifisch. Sie gelten jedoch als ein guter Parameter für die Entzündungsaktivität der Erkrankung.

Zur objektiven, klinischen Beurteilung des Verlaufs der RA seit einigen Jahren in Europa der „Disease Activity Score 28“ (DAS28) verwendet. Dieser von Prevoo et al.<sup>(89)</sup> modifizierte Wert berechnet sich aus folgenden für die Krankheit relevanten Aktivitätsparametern:

- Anzahl druckschmerzhafter Gelenke (dG)
- Anzahl geschwollener Gelenke (gG)
- Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG nach 1 Std, mm)
- Patientenurteil zur Krankheitsaktivität (VAS; mm)

Der DAS28 berechnet sich nach der Formel:

$$= 0,56 \times \sqrt{(\text{TJC } 28)} + 0,28 \times \sqrt{(\text{SJC } 28)} + 0,70 \times \log_{\text{nat}}(\text{BSG}) + 0,014 \times \text{VAS}$$

(TJC 28 = Anzahl druckschmerzhafter Gelenke basierend auf dem 28-Gelenke-Index;

SJC28 = Anzahl geschwollener Gelenke basierend auf dem 28-Gelenk-Index;

VAS = Visuelle analoge Schmerzskala von 0-100 in mm)

Nach Aletha et al.<sup>(3)</sup> gelten DAS28 Werte zwischen 0,4 und 2,4 als Zeichen für eine Remission, zwischen 2,4 und 3,6 für eine geringe Krankheitsaktivität, zwischen 3,6 und 5,5 für eine mittlere und >5,5 für eine hohe Krankheitsaktivität.

### 1.1.3 Epidemiologie und Ätiologie der Rheumatoiden Arthritis

Die Rheumatoide Arthritis ist die häufigste entzündliche Erkrankung des rheumatischen Formenkreises. Die Prävalenz beträgt weltweit 1%, wobei Frauen 3-4 Mal häufiger als Männer betroffen sind. Der Erkrankungsgipfel liegt zwischen dem 25.-50. Lebensjahr. Die Erkrankung geht mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität einher.

Für das Entstehen der Rheumatoiden Arthritis sowie für deren Schweregrad sind vermutlich verschiedene exogene Umweltfaktoren<sup>(104)</sup> sowie eine genetische Belastungen von Bedeutung.

Als endogene Risikofaktoren wurden hormonelle Faktoren identifiziert. Rauchen scheint die Entwicklung<sup>(98)</sup> der RA zu begünstigen und den Schweregrad<sup>(93)</sup> der RA negativ zu beeinflussen.

Vor mehr als 20 Jahren konnte ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten der RA und dem Vorkommen des vererbaren HLA-Merkmals DR4 nachgewiesen werden.<sup>(103)</sup> Es konnte gezeigt werden, dass die RA primär mit einer spezifischen Aminosäuresequenz in Position 70-74 der  $\beta$  Kette der HLA-DR Moleküle assoziiert ist. Diese verschiedenen HLA-DR Molekülen gemeinsame Sequenz wurde als „Shared Epitope“ (SE) bezeichnet.<sup>(31)</sup> Zu den HLA-DR Molekülen, die diese Sequenz aufweisen, zählen HLA-DR4 (HLA-DRB1\*0401, \*0404, \*0405, \*0408), HLA-DR1 (HLA-DRB1\*0101, \*0102) und HLA-DR10 (HLA-DRB1\*1001) sowie einzelne HLA-DR14 Varianten (\*1402 und \*1406).<sup>(117)</sup> Es ist jedoch noch unklar, in welchem molekularen Zusammenhang das „shared epitope“ zum Auftreten der Rheumatoiden Arthritis steht.

Eine Theorie geht davon aus, dass SE positive HLA-DR Moleküle artherogene Peptide präsentieren und zur Aktivierung autoreaktiver T-Zellen führen.

Eine andere Hypothese, die des „Molekularen Mimikry“, postuliert, dass SE positive HLA-DR Moleküle Ähnlichkeit zu exogenen Antigenen aufweisen und dadurch im Rahmen der Aktivierung von Immunreaktionen gegen diese

vermeintlichen Fremdantigene zu Autoreaktionen führen.

#### **1.1.4 Rolle der T-Zellen bei der Rheumatoiden Arthritis**

In der Pathogenese der RA soll nach heutigem Erkenntnisstand eine antigen-abhängige T-Zellaktivierung, die zu einer Expansion vor allem von Th1-Helferzellen führt, eine wichtige Rolle spielen.<sup>(24)</sup> So konnte in unterschiedlichen Tiermodellen, wie der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA) in Mäusen oder der adjuvanten Arthritis in Ratten, eine wichtige Rolle der T-Zellen gezeigt werden. Auch beim Menschen sind Th1-Zellen nachweislich an den gelenksnahen Entzündungsprozessen beteiligt. Allerdings konnte bis heute der Beweis nicht erbracht werden, dass für die Aktivierung dieser T-Zellen spezifische Antigene relevant sind.

Die T-Zellaktivierung soll zur Rekrutierung und Aktivierung von Monozyten und Makrophagen führen. Dies soll die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen und Proteasen stimulieren, die Fibroblastenproliferation sowie die synoviale Hyperplasie mit gesteigerter Angiogenese anregen und zur Destruktion von Knorpel und Knochen führen.

Bisher konnte keine spezielle T-Zellpopulation, die für die Entstehung und Aufrechterhaltung der chronisch-fortschreitenden Entzündungsreaktion verantwortlich ist, identifiziert werden.

Früher galt die RA als eine klassische „Th1-vermittelt“ Erkrankung, die durch eine vermehrte IFN- $\gamma$  Produktion sowie die Abwesenheit von Th2 Zytokinen charakterisiert ist. Neuere Untersuchungen zeigten, dass RA Patienten vermutlich auch ein Defizit an naiven T-Zellen aufweisen und verstärkt Effektor-T-Zellen anhäufen.

Als auffällig vergrößerte T-Zell-Population bei RA-Patienten wurden CD4<sup>+</sup>/CD28<sup>-</sup> T-Zellen beschrieben. Diese Zellen gelten als Effektorzellen, die als Zeichen von Seneszenz oder im Rahmen einer prolongierten Aktivierung gegen Virusantigene einen Verlust von CD28 aufweisen. Diese Zellen zeigen z.T. „NK-Zellaktivität“. Für ihre Aktivierung benötigen sie jedoch keine Kostimulation, da die de novo Expression von verschiedenen NK-Zellrezeptoren mit ko-stimulatorischen Funktionen zu einer Erniedrigung ihrer Aktivierungsschwelle führt.<sup>(114)</sup> In diesen Zellen konnte eine erhöhte Zytokinproduktion, insbesondere von IFN- $\gamma$ , sowie eine große Menge an intrazellulärem Perforin und Granzym B nachgewiesen werden.<sup>(85)</sup> Pawlik et al.<sup>(87)</sup> postulierten, dass der Schweregrad der Erkrankung mit der Menge der CD4<sup>+</sup>/CD28<sup>-</sup> T-Zellen im Blut korreliert. Patienten mit schwerer Gelenkbeteiligung oder extraartikulärer Manifestation hatten einen signifikant höheren Anteil an CD4<sup>+</sup>/CD28<sup>-</sup> T-Zellen im Blut. Darüberhinaus produzierten diese Zellen auch ohne Kostimulation vermehrt IFN- $\gamma$ .<sup>(79)</sup>

Demgegenüber konnte eine vermehrte Anzahl CD8<sup>+</sup>/CD28<sup>-</sup>-Zellen mit verminderter Produktion von IFN- $\gamma$  nach EBV antigenspezifischer Stimulation bei RA-Patienten im Vergleich zu Gesunden gefunden werden.<sup>(46)</sup>

Von besonderem Interesse sind auch FOXP3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen (T<sub>reg</sub>), die bezüglich des Auftretens von Autoimmunerkrankung im Tiermodell eine wichtige protektive Rolle spielen. Bei der RA wurden sowohl in der Synovia<sup>(109)</sup> als auch im Blut<sup>(76)</sup> vermehrt Tregs nachgewiesen. Diese regulatorischen T-Zellen scheinen bei Patienten mit RA im Vergleich zu Gesunden allerdings eine verminderte funktionelle Aktivität aufzuweisen.

Auch CD8<sup>+</sup>-Zellen sollen, zusätzlich zu Subpopulationen, die Zytotoxizität und IFN- $\gamma$  Produktion zeigen, eine immunregulatorische Subpopulation enthalten. Beschrieben wurde eine CD8<sup>+</sup>/CD28<sup>-</sup>/CD56<sup>+</sup>-Subpopulation im Blut und im Synovialgewebe von Gesunden und RA-Patienten, die eine inhibitorische Aktivität auf die CD4-T-Zell-Antworten in der Frühphase der Antigenstimulation

naïver T-Zellen sowie in der Differenzierung der CD4-Memory-Zellen besitzen soll.<sup>(19)</sup>

Als eine weitere, seit langem bekannte T-Zellabnormalität der RA kann die relative Lymphopenie angesehen werden, die sich durch eine reduzierte Zahl und Funktion von naïven CD4-Zellen auszeichnet.<sup>(30)</sup>

### **1.1.5 Rolle der Zytokine bei der Rheumatoiden Arthritis**

Zytokine spielen eine wichtige Rolle in der Regulation von Immunreaktionen, die mit der Pathogenese der RA in Zusammenhang gebracht werden. Viele Zytokine, die chronische Entzündungen begünstigen und zur Gelenkzerstörung führen können, scheinen im Synovialraum und im Blut von RA-Patienten vermehrt exprimiert und im Vergleich zu Gesunden dysreguliert zu sein.

Dazu zählen vor allem die Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1, die wichtige Regulatormoleküle verschiedener angeborener Immunreaktionen sind. Eine weitere wichtige Rolle in der Aktivierung und Funktion spezifischer T-Zellpopulationen spielen IFN- $\gamma$ , IL-15 und IL-17. Während TNF- $\alpha$ , IL-15, IL-17 bei RA-Patienten in der Synovialflüssigkeit und im Gewebe erhöht exprimiert werden, scheint IFN- $\gamma$  im entzündeten Gewebe nur in geringen Mengen vorzukommen.

Der Tumor-Nekrose Faktor alpha (TNF- $\alpha$ ) ist wegen der erhöhten Expression im Blut und im entzündeten Gewebe bei RA-Patienten heute ein wichtiges Ziel in der Therapie der Rheumatoiden Arthritis.<sup>(107)</sup> Die TNF- $\alpha$ -Blockade-Therapie erwies sich im Tierexperiment und auch beim Menschen als sehr effizient in der Hemmung der spezifischen Entzündungsprozesse.<sup>(105)</sup>

Die Hoffnung, weitere Mitglieder der TNF-Familie als therapeutische Zielstruktur zu etablieren, hat sich bisher nicht erfüllt. Die Blockade des viel versprechenden

Lymphotoxin- $\beta$  führte im Mausmodell gar zu einer Verschlechterung der Symptomatik.<sup>(32)</sup> Als neues Zielmolekül wird derzeit „TNF-like Weak Inducer of Apoptosis“ (TWEAK) diskutiert. Durch Gabe eines spezifischen Antagonisten für dieses Zytokin konnte der Schweregrad der RA im Mausmodell reduziert werden. Auch zeigte sich eine verminderte Angiogenese in der Synovia, eine reduzierte Gelenkentzündung und eine Abnahme der Gelenks- und Knochenerosion.<sup>(88)</sup>

Antagonisten gegen weitere Zytokine, vor allem gegen IL-1 und IL-6, befinden sich in vielversprechenden klinischen Versuchsphasen oder sind auch schon zugelassen.<sup>(7)</sup>

IL-32 gehört zu den neueren, bisher wenig erforschten Zytokinen, die bei der RA dysreguliert zu sein scheinen. In immunhistochemischen Analysen konnte eine signifikant erhöhte Expression von IL-32 bei RA, nicht jedoch bei Osteoarthritis-Patienten gezeigt werden.<sup>(42)</sup> In murinen Experimenten der RA zeigte sich eine Korrelation der Expression von IL-32, TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-1. Der Einsatz von TNF- $\alpha$ -Antagonisten führte auch zu einer deutlichen Reduktion von IL-32. Dies deutet auf eine TNF- $\alpha$ -abhängige Regulation von IL-32 hin.

Die Interaktion zwischen synovialen T-Zellen und Makrophagen verschlimmert die Entzündung und trägt zur Gelenksdestruktion bei. Die Interaktion zwischen T-Zellen und Monozyten führt über die vermehrte Produktion und Aktivierung von RANKL und den Zytokinen IL-15, IL-17, TNF- $\alpha$  und IL-1 zu einer erhöhten Osteoklastendifferenzierung und -funktion.<sup>(69)</sup>

Eine weitere wichtige Rolle bei der RA scheint auch die Interleukin-10 Familie zu spielen. Die neusten Mitglieder dieser Zytokinfamilie IL-20 und IL-22, gelten im Unterschied zu IL-10, als proinflammatorische Zytokine. Es konnte gezeigt werden, dass bei RA Patienten und im Mausmodell (CIA) sowohl IL-20 als auch seine 3 Rezeptoren erhöht in der Synovialmembran und in synovialen

Fibroblasten exprimiert werden. Hsu et al.<sup>(40)</sup> vermuten, dass IL-20 durch autokrine Stimulation von Fibroblasten und Makrophagen die Sekretion chemotaktischer Faktoren induziert, die ein Einwandern von Leukozyten begünstigen und die Entzündung voranschreiten lassen.

In neueren Studien wird IL-17 als zentrales Zytokin beschrieben,<sup>(61)</sup> dem eine wichtige Rolle in der Induktion von pathologischen Autoimmunreaktionen bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen zukommen soll. Es wird von spezialisierten T-Zellpopulationen produziert, durch IL-6, TGF- $\beta$ , IL-23 sowie durch IL-1 induziert<sup>(10)</sup> und durch IFN- $\gamma$  und IL-4 gehemmt (Kap. 1.2.5.).

## 1.2 Interleukin-17

### 1.2.1 Entdeckung des Interleukin-17

Interleukin-17 (IL-17) repräsentiert eine Zytokinfamilie, der 6 verschiedene Zytokine (IL17 A-F) angehören. Erstbeschrieben und kloniert wurde IL-17A 1993 von der Arbeitsgruppe um Rouvier.<sup>(92)</sup> Zunächst wurde dieses Zytokin unter der Bezeichnung CTLA8 als Produkt einer Hybridomazelle aus einer zytotoxischen T-Zelle der Maus und einer T-Zelle der Ratte identifiziert. Das dafür codierende Gen wurde von der Arbeitsgruppe um Rouvier in der Maus auf dem Chromosomen 1A und beim Menschen auf dem Chromosomen 6p12 (Tab. 1) lokalisiert.

In der genannten Arbeit<sup>(92)</sup> beschrieben Rouvier et al. auch eine Sequenzähnlichkeit von CTLA-8 mit dem offenen Leserahmen 13 des T-lymphotropen Herpesvirus Saimiri (HVS). Die Sequenzhomologie zwischen IL-17 und HVS 13 führte zur Hypothese, dass das Virus einen Teil des humanen IL-17 Gens sich zu eigen gemacht hat, um damit einen Überlebensvorteil im infizierten Wirt zu gewinnen.

In der Folge wurden fünf weitere IL-17 Familienmitglieder identifiziert. Zwischen den einzelnen Mitgliedern der IL-17 Familie besteht eine große Homologie. Dabei sind sich IL-17A und IL-17F am ähnlichsten. IL-17E (IL-25) hingegen, das unabhängig von den anderen Zytokinen entdeckt und zunächst IL-25 genannt wurde,<sup>(22)</sup> hat eine Strukturhomologie von nur 16% der primären Aminosäuren zum IL-17A der Maus und Ratte. Die IL-17-Zytokine zeigen keine Homologien zu anderen Proteinen von Säugetieren und bilden deshalb eine eigenständige Zytokinfamilie.

### 1.2.2 Rezeptoren der IL-17 Familie

IL-17 Rezeptoren wurden auf sehr vielen, unterschiedlichen humanen Zellen, wie z.B. NK-Zellen, Vorhautfibroblasten und auch B-Zellen identifiziert, so dass man das Vorkommen des Rezeptors als nahezu ubiquitär bezeichnen kann.<sup>(123)</sup> Die IL-17 Rezeptoren gehören zu den Typ I Transmembranproteinen, die keinerlei Ähnlichkeit mit anderen bekannten Zytokinrezeptoren haben. Bis heute konnten fünf verschiedene IL-17 Rezeptoren identifiziert werden: IL-17R (bzw. IL-17RA), IL-17RH1<sup>(94)</sup> und IL-17RL (receptor like)<sup>(35)</sup>, sowie IL-17RD und IL-17RE.<sup>(72)</sup>

### 1.2.3 Charakteristika der Mitglieder der IL-17 Familie

Aufgrund der sehr großen Ähnlichkeit sowohl bezüglich der Sequenz als auch des Vorkommens werden IL-17A und IL-17F häufig gemeinsam behandelt. Im weiteren Text dieser Arbeit wird IL-17 äquivalent zu IL-17A benutzt.

**Tabelle 1:** Die humane IL-17 Zytokinfamilie nach Kolls et al.<sup>(47)</sup>

Zytokin	Weitere Namen	Genort	Homologie des humanen mit dem murinen IL-17 in %
IL-17 A	IL-17, CTLA-8	6p12	62
IL-17B	CX1 NERF	5q32-34	88
IL-17C	CX2	16q24	83
IL-17D	IL-27	13q11	78
IL-17E	IL-25	14q11.1	81
IL-17F	ML-1	6p12	77

**Interleukin-17 A** wurde ursprünglich als Botenstoff von aktivierten CD4 Memory-T-Zellen im Blut beschrieben.<sup>(122),(23)</sup> Jedoch zeigten Daten, dass auch murine<sup>(33)</sup> und humane<sup>(96)</sup> CD8 Memory-T-Zellen (CD45RO<sup>+</sup>) nach Stimulation genauso wie Neutrophile<sup>(21)</sup> in der Lage sind IL-17A und IL-17F zu produzieren.

IL-17A und IL-17F liegen nur 46kb voneinander entfernt auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 beim Menschen und auf Chromosom 1 bei der Maus (Tab. 1). Beide Zytokine werden von einer gemeinsamen Promoterregion reguliert und transkribiert.<sup>(2)</sup>

**Interleukin-17 B** wurde durch gezielte Suche nach weiteren IL-17 homologen Sequenzen in einer cDNA Datenbank identifiziert und danach kloniert.<sup>(94),(57)</sup> IL-17B wird vor allem im Pankreas, Magen und Dünndarm so wie auch im Rückenmark exprimiert.<sup>(57),(71)</sup> Weder IL-17B noch IL-17C wird von Lymphozyten sezerniert.

**Interleukin-17 C** wurde im menschlichen Hoden, im Thymus, in der Milz und in der Prostata gefunden.<sup>(72)</sup>

**Interleukin-17 D** wurde durch Klonierung von Transkripten, die zu IL-17A Homologien zeigten mit Hilfe der RACE-PCR geklont und identifiziert. Es wird hauptsächlich von Skelettmuskulzellen, neuronalen Zellen, Herzmuskelzellen, dem Fettgewebe, der Lunge, dem Pankreas und in geringerem Umfang von nicht aktivierten CD4-T-Zellen produziert.<sup>(101)</sup> Im Gegensatz zu IL-17A und IL-17F wird IL-17D nicht von aktivierten T-Zellen exprimiert.

**Interleukin-17 E (IL-25)** ist das Zytokin, das sich in seiner Proteinsequenz am stärksten von den anderen Zytokinen der Familie unterscheidet. Es wird insbesondere in der Niere sowie auch in der Leber exprimiert. Geringere Mengen dieses Zytokins wurden in einer Reihe weiterer peripherer Organe beschrieben.<sup>(55)</sup>

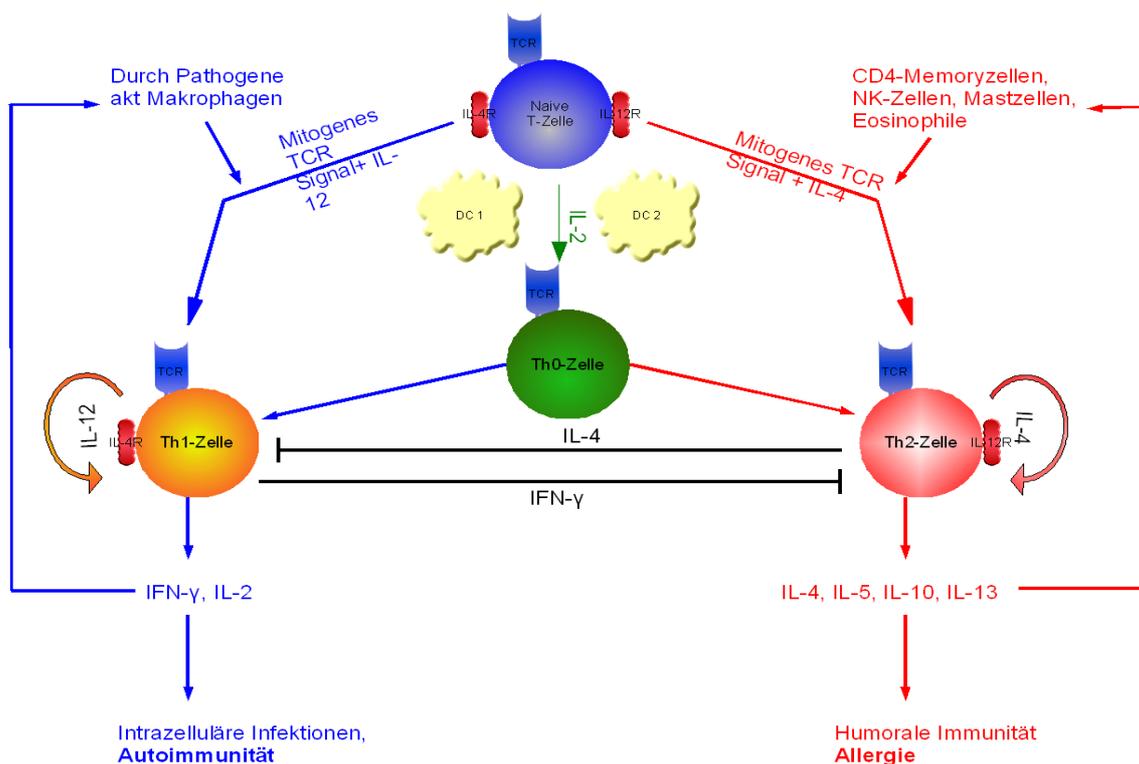
**Interleukin-17 F** weist ein dem IL-17A ähnliches Expressionsmuster auf. Es wird vorwiegend von aktivierten CD4 Zellen und Monozyten exprimiert.<sup>(102)</sup> Es gibt Anhaltspunkte dafür, dass IL-17F in chronischen und allergischen Entzündungsprozessen der Lunge eine Rolle spielt.<sup>(38), (121)</sup>

#### 1.2.4 Das Th1/Th2-Paradigma

Mit der Einführung der Klonierungstechnik für T-Zellen<sup>(100)</sup> fanden Forscher, dass ein Teil der antigen-stimulierten CD4-T-Zellklone den B-Zellen Hilfe zur Differenzierung zu antikörperproduzierenden Plasmazellen vermitteln können, während andere CD4-T-Zellen die Phagozytose durch Makrophagen und die Generierung von zytotoxischen T-Zellen fördern.<sup>(75)</sup> Solche Funktionsunterschiede konnten auf die Produktion von unterschiedlichen Zytokinen zurückgeführt werden, die heute als Th1 bzw. Th2 Zytokine bekannt sind. Mosmann und Coffmann postulierten 1987,<sup>(73)</sup> dass die CD4 T-Zellen sich aus zwei funktionell unterschiedlichen T-Zellpopulationen, den sogenannten Th1 und Th2 T-Zellen zusammensetzen. Th1-Zellen sind im Wesentlichen für die Stimulation von Hypersensitivität und Zell-vermittelter Immunität entsprechend einer Typ IV Reaktion nach Coombs und Gell verantwortlich, während Th2-Zellen die humoral-allergische Immunität stimulieren.<sup>(74)</sup> Im positiven Feedback fördert dabei jede funktionelle Subpopulation ihre eigene Expansion und hemmt im negativen Feedback, die des anderen Subtyps durch die jeweilige spezifische Zytokinsekretion (Abb. 2).

**Th1-Zellen** definieren sich vor allem durch die Sekretion von IFN- $\gamma$ , IL-12 und IL-2. IFN- $\gamma$  ist für die Aktivierung der Phagozytose von Pathogenen durch Makrophagen sowie für die Generierung von zytotoxischen T-Zellen zur Eliminierung intrazellulärer Pathogene essentiell.

**Th2-Zellen** produzieren vor allem IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13, die als B-Zell Wachstums- und Differenzierungsfaktoren zur Ausreifung von Plasmazellen mit bevorzugter Synthese von IgE dienen. Th2 Zytokine fördern auch die Reifung von Eosinophilen und inhibieren die Makrophagenfunktion.



**Abbildung 2:** Schaubild zur Darstellung des Th1/Th2 Paradigmas von Mosmann und Coffman, 1987

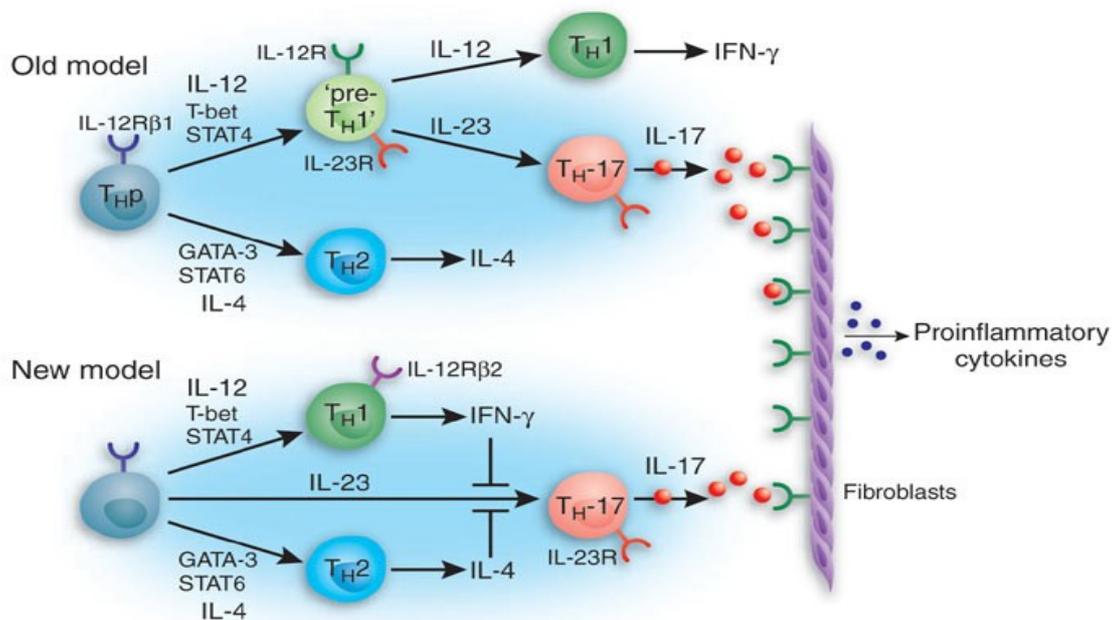
### 1.2.5 Die Differenzierung von naiven T-Zellen zu Th17-Zellen

IL-17 produzierende T-Zellen gelten heute als eine weitere funktionell wichtige CD4-T-Zellsubpopulation.<sup>(34)</sup> In Mausmodellen, der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) und der Kollagen induzierten Arthritis (engl. CIA) sowie der chronisch entzündlichen Darmerkrankung (CED),<sup>(11),(66)</sup> konnte gezeigt werden, dass das Ausschalten der IL-17 T-Zellpopulation zu einer Verminderung der Autoimmunphänomene führt. Zur Herkunft der IL-17 produzierenden T-Zellen wurden aus den experimentellen in vivo und in vitro Daten folgende Hypothesen entwickelt (Abb.3).

Zunächst wurde postuliert, dass Th1- und Th17-Zellen im frühen

Differenzierungsstadium eine gemeinsame Vorgängerzelle besitzen, die sich aus einer naiven CD4-Vorläuferzelle entwickelt hat. Diese „Th1-Vorgängerzelle“ oder „prä-Th1-Zelle“ soll sich je nach An- bzw. Abwesenheit von IL-12 oder IL-23 in Th1 und Th17 Zellen weiter differenzieren lassen.

Eine zweite Hypothese geht davon aus, dass sich die Th1- und Th17-CD4-Zelllinien völlig unabhängig voneinander entwickeln.<sup>(34),(84)</sup>



**Abbildung 3:** aus Wynn et al, 2005<sup>(112b)</sup>, das in dieser Zeichnung beschriebene IL-23 zur Differenzierung sollte um TGF-β ergänzt werden (s.u.)

Letztere Hypothese entspricht nach heutigem Erkenntnis am ehesten den natürlichen Gegebenheiten. So zeigten Harrington et al.<sup>(34)</sup>, dass polarisierte Th1-Zellen nicht mehr auf IL-23 ansprechen und dass IFN-γ, als wesentliches Zytokin der Th1 Differenzierung, ein potenter Inhibitor der Th17-Ausreifung ist. Ähnliches wurde auch für Th2-Zellen beschrieben. So lassen sich diese auch nicht durch IL-23 beeinflussen und IL-4 als Th2-Zytokin erwies sich als potenter Inhibitor der Th17-Differenzierung. Park et al.<sup>(84)</sup> konnten in in-vivo

Experimenten zeigen, dass die Induktion einer EAE in IFN- $\gamma$  (Th1) und T-bet (Th2) defizienten Mäusen zu einer ausgeprägten Th-17 Antwort führte.

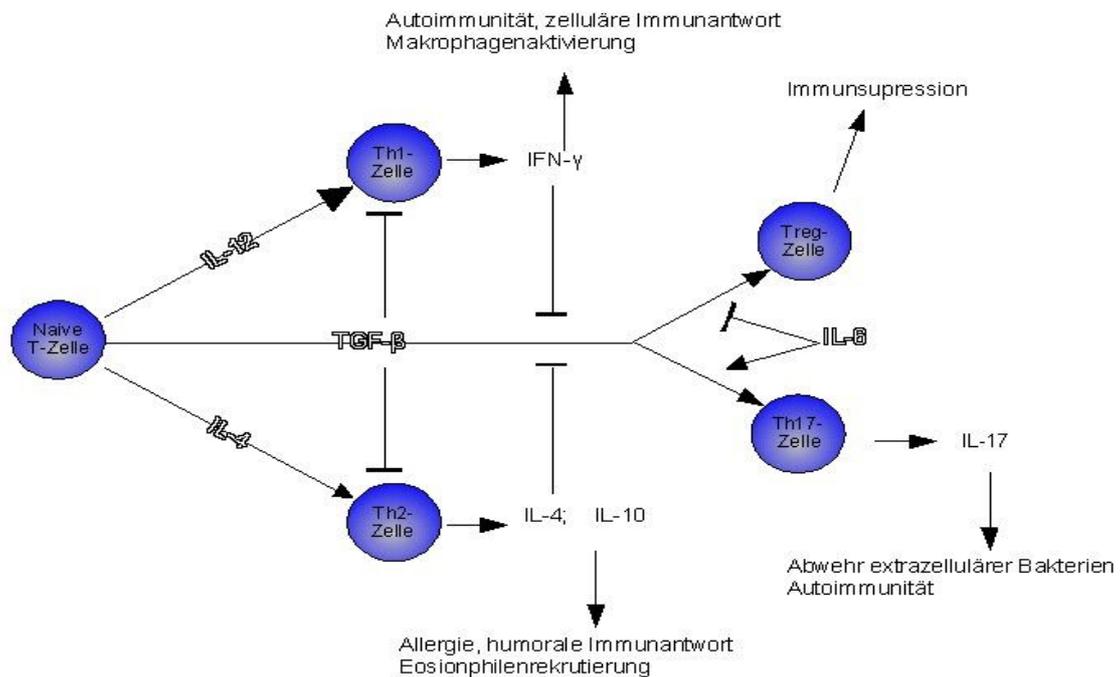
Obwohl IL-23 eine wichtige Rolle in der Th17 Differenzierung zu spielen scheint, haben mehrere Autoren auch eine IL-23 unabhängige Th17 Differenzierung beschrieben.<sup>(84),(64),(111)</sup> Alle drei Arbeitsgruppen berichteten unabhängig voneinander über TGF- $\beta$  als zur Differenzierung notwendigen Faktor.

Dass in Ko-Kulturen mit LPS-aktivierten dendritischen Zellen (DC) und regulatorischen T-Zellen aus naiven T-Helfer-Zellen IL-17, nicht aber IL-4 oder IFN- $\gamma$  produzierende T-Zellpopulationen generiert werden können, wurde von Veldhoen et al. gezeigt.<sup>(111)</sup> Durch Blockade von TGF- $\beta$  konnte gezeigt werden, dass TGF- $\beta$  ein kritischer Faktor für die Differenzierung von Th17-Zellen ist und dass regulatorische T-Zellen nicht obligat für die Differenzierung von Th17-Zellen sind.

Zusätzlich zu TGF- $\beta$  werden zur Induktion und Differenzierung von Th17-Zellen noch weitere lösliche Faktoren benötigt, die von dendritischen Zellen nach Induktion über den TLR- oder MyD88-Signalweg sezerniert werden. Bei der Analyse solcher Faktoren, die für die Th17-Differenzierung besonders wichtig im Zusammenspiel mit TGF- $\beta$  sind, fand sich IL-6 als kritischer Kofaktor. In Experimenten ohne APC konnte gezeigt werden, dass TGF- $\beta$  und IL-6 auch alleine in der Lage sind die Th17-Differenzierung zu induzieren.<sup>(64)</sup>

Ausgehend von der Beobachtung, dass IFN- $\gamma$  und IL-4 die Th17-Differenzierung inhibieren, konnten Harrington et al.<sup>(34)</sup> zeigen, dass TGF- $\beta$  umgekehrt auch die Differenzierung von Th1- und Th2-Zellen inhibiert (Abb. 4).

IL-6 hingegen supprimiert die Differenzierung von naiven T-Zellen zu Foxp3<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen, die durch TGF- $\beta$  ebenfalls induziert werden.



**Abbildung 4:** Vereinfachte Darstellung der Differenzierung der Th17-Zellen unter dem Einfluss verschiedener Zytokine

IL-23 hingegen ist nach heutigem Kenntnisstand wahrscheinlich nicht für die Differenzierung zu Th17 Zellen notwendig, sondern spielt eine wichtige Rolle als Schlüsselzytokin für die Expansion und das Überleben von Th17-Zellen.<sup>(111)</sup>

### 1.2.6 Die Rolle von Interleukin-17 bei Autoimmunerkrankheiten

In vitro wie auch in vivo Beobachtungen deuten darauf hin, dass IL-17 produzierende T-Lymphozyten eine eigenständige Linie proinflammatorischer T-Helfer-Zellen darstellen, die nicht nur für die Abwehr spezifischer bakterieller Infektionen von Bedeutung sind, sondern auch durch ihre entzündungsfördernde und Treg hemmende Funktionen zur Induktion von Autoimmunphänomenen führen kann. Über eine erhöhte Produktion von IL-17 wurden bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen wie Morbus Crohn, Colitis Ulcerosa,<sup>(26)</sup> der Multiplen Sklerose,<sup>(65)</sup> dem systemischen Lupus erythematoses,<sup>(118)</sup> der rheumatoiden Arthritis,<sup>(50)</sup> aber auch bei

Transplantatabstoßungsreaktionen<sup>(5)</sup>, der Lyme Arthritis<sup>(15)</sup> und bei Asthma<sup>(53),(78)</sup> berichtet.

Die Rolle von IL-17 in der Abwehr von bakteriellen Entzündungen der Atemwege konnte in Mausmodellen gezeigt werden. Mäuse mit einer homozygoten Deletion des IL-17-Rezeptorgens, die mit *Klebsiella pneumoniae* infiziert wurden, zeigten deutlich verminderte Chemokinspiegel und damit assoziiert eine verminderte Einwanderung von Neutrophilen in die Lunge.<sup>(124)</sup> Die Neutrophilenrekrutierung schien von der Wirkung von IL-17A und IL-17F abzuhängen.<sup>(52)</sup> Als IL-17 produzierende Zellen wurden sowohl CD4+ als auch CD8+ Zellen vermutet.<sup>(33)</sup> Shibata et al.<sup>(95)</sup> berichteten auch über  $\gamma\delta$ -T-Zellen, die nach Stimulation mit IL-23 IL-17 produzierten.

Für die Bedeutung von IL-17 bei chronischen Atemwegserkrankungen wie der chronischen Bronchitis, dem chronisch obstruktiven pulmonalen Defizit (COPD) oder dem Asthma soll vor allem IL-17F verantwortlich sein.<sup>(38),(53),(58)</sup>

IL-17E soll im Unterschied zu IL-17A zu einer vermehrten Einwanderung von Eosinophilen<sup>(45)</sup> bei Entzündungen führen.

Auch Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) zeigen auf mRNA- und Proteinebene erhöhte IL-17 Level in der Darmmukosa<sup>(26)</sup>. Diese erhöhten Level waren spezifisch für Patienten mit Morbus Crohn oder Colitis Ulcerosa. Sie wurden nicht bei Infektionen des Gastrointestinal-Traktes (GIT), bei ischämischer Kolitis oder bei gesunden Personen gefunden.

### **1.2.7 Die Rolle von Interleukin-17 bei der Rheumatoiden Arthritis**

Die rheumatoide Arthritis ist eine chronische Systemerkrankung, die durch die Einwanderung aktivierter inflammatorischer Zellen in den Gelenkspalt, das Auftreten synovialer Hyperplasie, die Gefäßneubildung und chronische

Zerstörung von Knochen und Knorpel gekennzeichnet ist. Das Vorkommen spezifischer Autoantikörper (Rheumafaktor, anti-Citrullinierter Peptid Antikörper) sowie autoreaktiver T-Zellen spricht dafür, dass es sich bei der RA um eine Autoimmunerkrankung handelt.

IL-17A wurde bei RA-Patienten spontan von kultiviertem Synovialgewebe sezerniert<sup>(16)</sup> und deutlich erhöhte IL-17 Level wurden bei RA-Patienten in der Synovialflüssigkeit beobachtet.<sup>(41),(126)</sup>

In-vitro Studien zeigten, dass IL-17 über die Aktivierung des NFκB abhängigen Signaltransduktionsweges die Sekretion von IL-1, Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF-α), IL-6, IL-8 und Makrophagen inflammatorisches Protein (MIP-1α) aus Fibroblasten, Endothel und Epithelzellen stimuliert.<sup>(122),(23),(43)</sup> Auch soll IL-17 die Expression des Rezeptoraktivators des NFκB Liganden (RANKL) induzieren, der ein wichtiger Faktor in der Osteoklastenaktivierung und der Knochendestruktion bei der RA ist.<sup>(50)</sup> Darüber hinaus spielen synergistische Effekte von IL-17 mit IL-1 und TNF-α bei der Chemokin- und Zytokinproduktion aus kultivierten Synovialzellen<sup>(17),(44)</sup> sowie bei der Induktion von Knorpeldestruktion<sup>(110)</sup> eine bedeutende Rolle.

In Studien am Mausmodell der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA) konnte durch Blockade von IL-17 vor dem Ausbruch der Erkrankung sowohl die Inzidenz als auch der Schweregrad der Arthritis signifikant verringert werden.<sup>(59)</sup> Weitergehend führte eine Neutralisation von IL-17 nach Erkrankungsbeginn zu einer deutlichen Verlangsamung der Progression der Arthritis.<sup>(60)</sup> Umgekehrt führte sowohl eine lokale als auch eine systemische Überexpression von IL-17 zu einem beschleunigten Krankheitsbeginn und einer vermehrten synovialen Entzündung.<sup>(59)</sup> Demzufolge könnte die Modulation von IL-17 einen therapeutischen Ansatz für die Behandlung der RA bieten.

### 1.3 Zielsetzung

Die rheumatoide Arthritis ist eine systemische, entzündliche Gelenkerkrankung, bei deren Entstehung und Progression Zytokine wie IL-1, TNF- $\alpha$ , Lymphotoxin- $\beta$ , IL-15, IL-17 und IL-18 eine wichtige Rolle spielen.

Seit der Entdeckung von Interleukin-17 im Jahr 1993 durch Rouvier et al. fanden sich vielfältige Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen IL-17<sup>+</sup>-T-Helferzellen und Autoimmunerkrankungen wie dem Morbus Crohn, der Colitis Ulcerosa, der Multiplen Sklerose, dem systemischen Lupus erythematodes, der Lyme Arthritis und auch der rheumatoiden Arthritis.

Bei der rheumatoiden Arthritis wird Interleukin-17 eine wichtige Rolle sowohl bei der Entstehung als auch bei der Aufrechterhaltung der Erkrankung zugeschrieben. So wurden in der Synovialflüssigkeit und im Serum von RA-Patienten deutlich höhere IL-17 Level gemessen als bei Gesunden oder Osteoarthritis-Patienten. Im Mausmodell konnte durch die Blockade von IL-17 die Inzidenz sowie die Schwere der Erkrankung deutlich gesenkt werden. Darüber hinaus zeigten in-vitro Studien auch eine unmittelbare Beteiligung von IL-17 an der Knorpeldestruktion über die Aktivierung von Osteoklasten.

Als Herkunftszellen von IL-17 wurden bisher zumeist nur CD4<sup>+</sup> Th-17-Zellen diskutiert. Es gibt jedoch Hinweise, dass auch andere Zellen des Immunsystems IL-17 sezernieren können. So wurde über CD8<sup>+</sup>,  $\gamma\delta$ -T-Zellen und Neutrophile berichtet, die in der Lage sind, IL-17 zu sezernieren.

Ziel der Untersuchung dieser Studie war die Analyse IL-17 sezernierender Zellen im Blut der Patienten mit RA im Vergleich zu Gesunden. Im Vordergrund standen folgende Fragestellungen:

- a) Welche Zellen im Blut tragen zum erhöhten Vorkommen von IL-17 bei RA Patienten bei und bestehen in der Zellspezifität und -frequenz Unterschiede zu Gesunden?
- b) Lassen sich IL-17 sezernierende Zellen durch unspezifische Stimulation mit PHA und PMA/Ionomycin oder durch antigenspezifische Aktivierung mit einem Pool HLA KI.II restringierter Peptide bei RA-Patienten aktivieren bzw. expandieren und gibt es darin Unterschiede zu Gesunden?

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien

Brefeldin A	Sigma Aldrich, Taufkirchen
BSA (bovines Serumalbumin)	Sigma, Taufkirchen
CEF-Peptid-Pools	Panatecs, Tübingen
Cytofix/Cytoperm	BectonDickinson, Heidelberg,
Dimethylformamid	Sigma Aldrich, Taufkirchen
DMSO	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Ethidium Monoazid	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe
FACS-Flow	BectonDickinson, Heidelberg
FCS (fötale Kälberserum)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Ficoll-Dichtegradient	PAA, Pasching, Österreich
Heparin	Braun, Melsungen
Ionomycin	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Phosphate-buffered saline (PBS)	Gibco, Karlsruhe
Permash	BectonDickinson, Heidelberg
Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Phytohämagglutinin	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe
Polyglobin	Bayer AG, Leverkusen
Refobacin	Bayer AG, Leverkusen
RPMI-1640 Medium	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe
Trypanblau	Serva, Heidelberg

### 2.2 Material

Kryoröhrchen	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorfcups	Eppendorf AG, Hamburg
FACS-Röhrchen	BectonDickinson, Heidelberg
Pipettenspitzen	Eppendorf AG, Hamburg
24-Well-Platte + Deckel	Nunc GmbH, Wiesbaden

96-Well-Rundboden-Platte	Nunc GmbH, Wiesbaden
Neubauer-Zählkammer (+Deckglas)	Hecht, Sondheim
Blutentnahmemonovetten	Braun, Melsungen
Nitrozelluloseplatte MAHA S4510	Millipore, Eschborn, Deutschland
Zellkulturflaschen	Nunc GmbH, Wiesbaden

### **2.3 Geräte**

Zentrifuge	Beckman Coulter CL –GS6R (Beckmann Coulter GmbH, Krefeld)
Zentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5402 (Eppendorf AG, Hamburg)
Inkubator	Heraeus Typ BB 6220 CU (Heraeus Holding GmbH, Hanau)
Sterilbank	LaminAir, HBB 2448 (Heraeus Holding GmbH, Hanau)
Mikroskop	Laborlux K (Leitz, Wetzlar)
Wasserbad	Wasserbad MGW Lauda M20S (LAUDA DR. R. WOBSE GMBH, Lauda-Königshofen, D)
FACS	BD LSRII mit 355nm, 405nm, 488nm, 633nm Laser (BD Bioscience, Heidelberg)
Vortexer	Vortex Mixer NeoLab (Bender & Hobein AG, Zürich, CH)

### **2.4 Software**

FACS-Diva	Version 5.0.2.; BectonDickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
FlowJo	Version 7.2.1. Tree Star Inc., Ashland, OR, USA
Microsoft Excel	Office 2000, Microsoft Cooperation, USA
Prism	GraphPad Prism version 5.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego California USA

## 2.5 B-Zelllinien

**Tabelle 2:** Verwendete B-Zelllinien und deren Herkunft

	<b>B-Zelllinie</b>	<b>Herkunft</b>
1	OLGA	10 <sup>th</sup> International Histocompatibility Workshop
2	Boleth	10 <sup>th</sup> International Histocompatibility Workshop
3	AMAI	10 <sup>th</sup> International Histocompatibility Workshop
4	WT51	10 <sup>th</sup> International Histocompatibility Workshop
5	SA	10 <sup>th</sup> International Histocompatibility Workshop
6	BOB	Sektion Transplantationsimmunologie und Immunhämatologie, Universität Tübingen

Wir verwendeten EBV-transformierte B-Zelllinien (Tab. 2) in einem Vorversuch zur Stimulation von T-Zellen sowie zur Testung der Zelllinien auf IL-17 Produktion.

## 2.6 Patienten und Probanden

In Übereinstimmung mit den Richtlinien der Ethikkommission der Universität Tübingen (Ethikantrag-Nr: 13/2005V) und nach vorliegender Einverständniserklärung wurde RA-Patienten aus der rheumatologischen Ambulanz der Medizinischen Klinik Abteilung II der Universität Tübingen (Leitung: Prof. Dr. Ina Kötter) sowie Kontrollpersonen jeweils 50ml Blut in Heparin-Monovetten entnommen.

**Tabelle 3:** Geschlecht, Alter und klinische Charakteristika der untersuchten RA-Patienten (+- positiv, - Negativ, n.v. Nicht verfügbar)

		Alter	HLA	Dauer der RA	RF	Anti - CCP	CRP	Leukozytenzahl	BSG	DAS 28	Therapie
RA-Patient 1	♀	50 J.	n.v.	20 J.	+	+	0,87 mg/d l	7.580 / $\mu$ l	77 mm/h	3,13	Humira Spritzen s. c. Sandimmun 75 Prednisolon 7,5 mg
RA-Patient 2	♀	26 J.	n.v.	<1 J.	+	+	0,49 mg/d l	9.430 / $\mu$ l	7 mm/h	2,34	Decortin H 10 mg Methotrexat 15 mg s.c.
RA-Patient 3	♀	71 J.	n.v.	16 J.	+	+	Neg	8.650 / $\mu$ l	8 mm/h	4,11	Prednisolon 7,5 mg/W Methotrexat 20 mg Voltaren resinat
RA-Patient 4	♂	50 J.	n.v.	20 J	+	+	0,1 mg/d l	7.160 / $\mu$ l	5 mm/h	2,2	Quensyl 200 mg Prednisolon 5 mg
RA-Patient 5	♀	56 J.	A*01;03 B*35;58 DR*01;07	1 J	+	+	2,01 mg/d l	11.250 / $\mu$ l	21 mm/h	n.a	Methotrexat 15mg /W Decortin H 10mg Quensyl
RA-Patient 6	♀	71 J.	A*02;33 B*14;44 DR*07;15	5 J	+	+	1,98 mg/d l	18.020 / $\mu$ l	7 mm/h	n.a	Decortin H 10mg Azathioprin 50 10-1
RA-Patient 7	♀	79 J.	A*02;03 B*07 DR*13,15	8 J	-	-	Neg	6.540 / $\mu$ l	19 mm/h	2,7	Prednisolon 5 mg Lantarel 10 mg Enbrel 25 mg D
RA-Patient 8	♂	29 J.	B*27 neg	3 J	-	-	0,1 mg/d l	7.670 / $\mu$ l	4 mm/h	n.v.	Quensyl 200 1-0-1
RA-Patient 9	♀	70 J.	A*03;25 B*08;15 DR*03011; 0404	14 J	-	-	1,8 mg/d l	13.110 / $\mu$ l	29 mm/h	3,4	Prednisolon 5 mg

<b>RA-Patient 10</b>	♀	41 J.	DRB1*04	1 J	+	+	0,89 mg/d l	6.980 /µl	17 mm/h	2,4	Methotrexat 15 mg Prednisolon 7,5 mg
<b>RA-Patient 11</b>	♂	72 J.	n.v.	20 J	+	+	0,34 mg/d l	6.310 /µl	9 mm/h	3,03	Decortin H 9mg Humira 40mg s. c. / 14d Arava 20
<b>RA-Patient 12</b>	♀	65 J.	A*02 B*40;44 DR*04;15	24 J	+	+	4,32 mg/d l	13.230 /µl	77 mm/h	n.v.	Prednisolon 7,5
<b>RA-Patient 13</b>	♂	52 J.	A*01;03 B*15;35 DR*09;13	32 J	-	-	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.
<b>RA-Patient 14</b>	♀	68 J.	n.v.	1 J	+	+	1,14 mg/d l	7990 /µl	14 mm/h	3,67	Prednisolon 5 mg Hydroxychloroquin 400 mg
<b>RA-Patient 15</b>	♀	60 J.	n.v.	2 J	+	+	0,98 mg/d l	7.610 /µl	18 mm/h	2,6	Prednisolon 7,5 mg Methotrexat 15mg po /d
<b>RA-Patient 16</b>	♀	50 J.	A*01;11 B*52;55 DR*0401 1;0801	12 J	-	-	0,05 mg/d l	12370 /µl	2 mm/h	4,1	Decortin H 5mg
<b>RA-Patient 17</b>	♀	61 J.	n.v.	3 J	-	-	Neg	7.930 /µl	5 mm/h	1,97	Quensyl 200 mg Decortin H 2,5 mg
<b>RA-Patient 18</b>	♀	51 J.	n.v.	<1J	+	+	Neg	18.070 /µl	12 mm/h	1,9	Methotrexat 15mg/W Prednisolon 12,5 mg
<b>RA-Patient 19</b>	♂	69 J.	A*02; B*07;15 DR*07;15	10J	+	+	0,5 mg/d l	5.210 /µl	28 mm/h	2,75	Methotrexat 10 mg /W

<b>RA-Patient 20</b>	♀	43 J.	A*03;25 B*35;50	n.v.							
----------------------	---	-------	--------------------	------	------	------	------	------	------	------	------

Unter den Patienten (Tab. 3) waren 5 Männer und 15 Frauen, die im Durchschnitt 56,7 Jahre (26-79 J.) alt waren und deren mittlere Erkrankungsdauer zum Zeitpunkt der Blutentnahmen 10,21 Jahre (6Mon.-36 J.) betrug. Tabelle 3 zeigt die wichtigsten Laborparameter zur Beurteilung der RA-Aktivität. Im Mittel lag das CRP bei 0,97 mg/dl (0-4,32mg/dl), die Leukozytenzahl bei 9.728 / $\mu$ l (5.210-18.070/ $\mu$ l) und die BSG bei 19,97mm/h (2-77mm/h). Der DAS28 wurde bei 14 Patienten erhoben und lag im Mittel bei 2,89 (1,0-4,1). 16 Patienten wurden mit Kortikosteroiden, 7 mit Methotrexat und 8 Patienten mit weiteren Immunsuppressiva behandelt. Die klinischen und therapeutischen Daten von 2 Patienten waren nicht mehr verfügbar.

Unter den gesunden Probanden waren 8 Frauen und 12 Männer deren Durchschnittsalter 29,2 Jahre (20-47Jahre) betrug. Zum Zeitpunkt der Blutentnahme waren alle Kontrollpersonen nach eigener Aussage gesund.

## 2.7 Isolierung mononukleärer Zellen aus Vollblut

50ml heparinisiertes Blut wurden mit 100ml PBS verdünnt. Die mononukleären Zellen („peripheral blood mononuclear cells“, PBMC) wurden mittels Ficoll-Paque-Dichtegradientenzentrifugation isoliert.<sup>(14)</sup>

15ml Ficoll-Dichtegradient (Dichte 1,077g/l) wurden mit 30ml vorverdünntem Blut überschichtet und bei 800g für 30 min bei Raumtemperatur ohne Bremse zentrifugiert. Anschließend wurden die PBMC über der Ficoll-Schicht sorgfältig abpipetiert und mit PBS versetzt. Zum Waschen wurden die PBMC für 5 min bei 200g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 20ml PBS resuspendiert und erneut gewaschen.

## **2.8 Bestimmung der Anzahl vitaler Zellen mittels Trypanblau**

10µl der isolierten PBMC Suspension wurden mit 10µl 0,04%iger Trypanblaulösung gefärbt und in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Durchlichtmikroskop ausgezählt. Tote und beschädigte Zellen färben sich mit Trypanblau an und können so von lebenden Zellen unterschieden werden. Die gesamte Zellzahl errechnete sich folgendermaßen:

Mittelwert der Zellen in 4 Großquadranten  $\times 10^4 \times$  Verdünnung  $\times$  Ausgangsvolumen in ml

## **2.9 Kryokonservierung der Zellen**

Die gewaschenen und gezählten Zellen wurden mit „freezing medium“ (90% FCS 10% DMSO) auf  $6 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Es wurde jeweils 1ml zügig in Kryoröhrchen überführt und bei  $-80^\circ\text{C}$  im Gefrierschrank in Styroporträgern langsam abgekühlt. Nach 24h wurden die Zellen in einen Tank mit flüssigem Stickstoff ( $-192^\circ\text{C}$ ) überführt.

## **2.10 Auftauen der Zellen**

Bei Bedarf wurden die kryokonservierten PBMC direkt nach Entnahme aus dem flüssigen Stickstoff für 1 min in einem  $38^\circ\text{C}$  warmen Wasserbad angetaut und mit Kulturmedium (90% RPMI-1640 und 10% FCS) versetzt, um rasch das zelltoxische DMSO zu entfernen. Danach erfolgte ein zweimaliges Waschen der Zellen mit Kulturmedium und anschließendes Zählen der Zellen mit Bestimmung der Anzahl vitaler Zellen (Kap. 2.8.).

## **2.11 Stimulanzen**

### **2.11.1 Phytohämagglutinin (PHA)**

Das Mitogen Phytohämagglutinin (PHA) ist ein Glykoprotein (Lectin), das aus der Gartenbohne *Phaseolus vulgaris* gewonnen wird. Ähnlich wie Con A stimuliert PHA unspezifisch vor allem humane T-Lymphozyten.<sup>(48),(119)</sup>

Nach Austitrierung wurde PHA in einer Konzentration von 0,5% für 20h eingesetzt, da nach 20h die höchste Frequenz IL-17<sup>+</sup> Zellen gemessen wurden (Kap. 3.1.2.).

### **2.11.2 Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)/ Ionomycin**

Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) induziert rezeptorunabhängig eine Aktivierung der Proteinkinase C. Es wurde zusammen mit dem Calcium-Ionophor Ionomycin zur antigen-unspezifischen Aktivierung eingesetzt.<sup>106</sup> Zellen wurden mit 12,5ng PMA/ 0,5µg Ionomycin für 20h stimuliert.

### **2.11.3 MHC Klasse II CEFT-Pool**

23 Peptide mit bekannter definierter Bindungskapazität an MHC-Klasse II Moleküle wurden freundlicherweise von der Fa. Panatecs als MHC Kl. II spezifischer CEFT Pool zur Verfügung gestellt. Dieser Pool wurde in einer Konzentration von 2µg/Peptid pro 1x10<sup>6</sup> PBMC zur Testung der IL-17 Stimulierung eingesetzt. Die Peptide repräsentieren MHC Kl.II spezifische Epitope des Influenza A Virus, des Cytomegalie-Virus (CMV), des Epstein-Barr Virus (EBV) sowie des Tetanustoxins.

Tabelle 4: Sequenzen und bindende HLA-Klasse II Moleküle der Peptide im CEFT-Pool

<b>SEQUENZ</b>	<b>URSPRUNG</b>	<b>bindende(s) HLA-Klasse II Molekül</b>
1. FVFTLTVPSEK	Influenza A	HLA-DR4
2. SGPLKAEIAQRLEDV	Influenza A	HLA-DR1
3. YDVPDYASLRSLVASS	Influenza A	HLA-DR1
4. PYYTGEHAKAIGN	Influenza B	HLA-DR1
5. GQIGNDPNRDIL	Tetanus	HLA-DR3, -DR52c, -DR52a
6. PKYVKQNTLKLKLA	Influenza A	HLA-DRB1*0101
7. PKYVKQNTLKLAT	Influenza A	HLA-DR4
8. DRLRRDQKS	Influenza A	HLA-DR3
9. AGLTSLLVICSYLFISRG	EBV	HLA-DR15
10. QYIKANSKFIGITEL	Tetanus	HLA-DR15, -DR13, -DR11, -DR9, -DR8, -DR7, -DR3
11. QYIKANSKFIGITE	Tetanus	HLA-DR5, -DR11, -DRB1*1302, -DRB1*1104
12. FNNFTVSFWLRRVPAKLSA SHLE	Tetanus	HLA-DR11, -DR7, -DRB1*1101, -DR5, -DPW2
13. TSLYNLRRGTALA	EBV	HLA-DR-1
14. KFIKRYTPNNEIDSF	Tetanus	HLA-DRB1*1104, -DRB1*1101
15. VSIDKFRIFCKALNPK	Tetanus	HLA-DRB1*1101
16. VPGLYSPCRAFFNKEELL	EBV	HLA-DRB1*0701
17. DKREMWMACIKELH	CMV	HLA-DRB1*0801
18. TGHGARTSTEPTTDY	EBV	HLA-DRB3*0201
19. KELKRQYEKKLRQ	EBV	HLA-DRB3*0201, -DRB1*0301
20. RGYFKMRTGKSSIMRS	Influenza A	HLA-DRB1*1001, -DQA0102
21. TVFYNIIMPL	EBV	HLA-DQ2
22. AEGLRALLARSHVE	EBV	HLA-DR4
23. PGPLRSESIVYFMVFLQTHI	EBV	HLA-DR7

## 2.12 Antikörper

Tabelle 5: Liste der verwendeten monoklonalen Antikörper

<b>Antikörper</b>	<b>Fluor- eszenz- Markier- ung</b>	<b>Menge</b>	<b>Isotyp</b>	<b>Klon</b>	<b>Katalog Nr</b>	<b>Hersteller</b>
anti-humaner <b>CD3- Antikörper</b>	FITC	4µl	Mouse IgG1 <sub>κ</sub>	UCHT1	555332	BectonDickinson Heidelberg Deutschland
anti-humaner <b>IL-17 A Antikörper</b>	PE	20µl	Mouse IgG1 <sub>κ</sub>	eBio64 CAP17	12-7178	eBioscience, San Diego, USA
anti-humaner <b>CD4- Antikörper</b>	Pacific Blue	4µ	Mouse IgG1 <sub>κ</sub>	RPA- T4	300521	BioLegend, San Diego, USA
anti-humaner <b>CD56- Antikörper (NCAM)</b>	Alexa Fluor700	4,5µl	Mouse IgG1 <sub>κ</sub>	HCD56	318315	BioLegend, San Diego, USA
anti-humaner <b>CD25- Antikörper</b>	APC-Cy7	20µl	Mouse IgG1 <sub>κ</sub>	BC96	302614	BioLegend, San Diego, USA
anti-humaner <b>IFN-γ- Antikörper</b>	PE-Cy7	5µl	Mouse IgG1 <sub>κ</sub>	B27	557643	BectonDickinson , Heidelberg Deutschland
anti-humaner <b>CD28- Antikörper</b>	APC	3,5µl	Mouse IgG1 <sub>κ</sub>	CD28.2	559770	BectonDickinson , Heidelberg Deutschland
anti-humaner <b>CD8- Antikörper</b>	PerCP	5µl	Mouse IgG1 <sub>κ</sub>	SK1	345774	BectonDickinson , Heidelberg Deutschland

Anti-humaner <b>CD14- Antikörper</b>	APC	15µl	Mouse IgG1 <sub>κ</sub>	61D3	17-0149	eBioscience, San Diego, USA
Anti-humaner <b>CD14- Antikörper</b>	PE-Cy7	15µl	Mouse IgG1 <sub>κ</sub>	61D3	25-0149	eBioscience, San Diego, USA
Anti-humaner <b>CD20- Antikörper</b>	FITC	20µl	Mouse IgG1, κ	L27	345792	BectonDickinson , Heidelberg Deutschland
Anti-humaner <b>CD3- Antikörper</b>	Alexa Fluor 700	20µl	Mouse IgG1 <sub>κ</sub>	UCHT1	56- 0038-73	eBioscience, San Diego, USA

Alle Antikörper wurden als Reagenzien mit direkter Kopplung an den jeweiligen Fluoreszenzfarbstoff (FITC, PE, Alexa-Fluor700, APC, PerCP, PE-Cy7 oder APC-Cy7) verwendet und nach Titration (Kap. 3.1.3) in den angegebenen Mengen eingesetzt.

## 2.13 Durchflusszytometrie

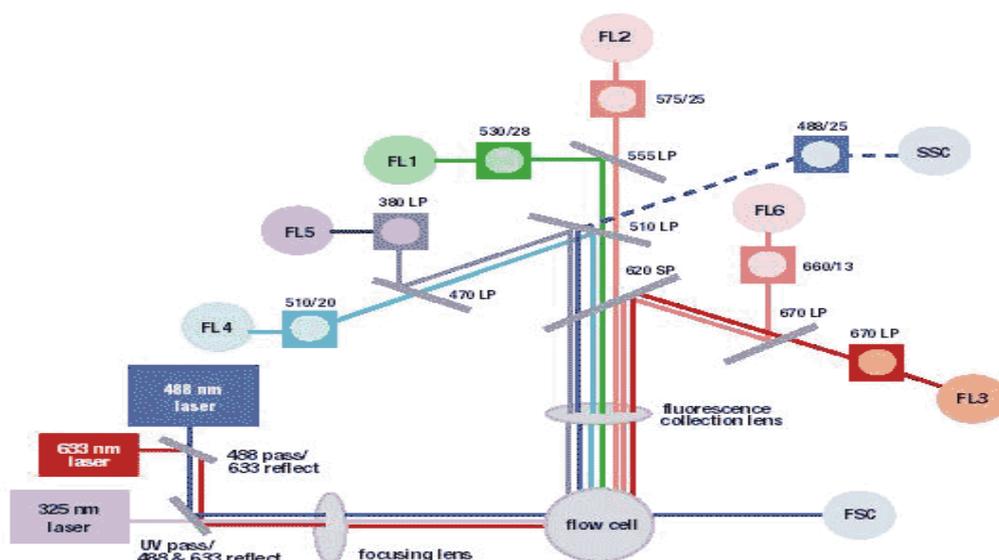
### 2.13.1 Grundlagen der Durchflusszytometrie

Die FACS-Technik wurde Ende der 60er Jahre an der Stanford University von Bonner, Sweet, Hulett, Herzenberg und anderen Wissenschaftlern entwickelt, um Durchflußzytometrie und Zellsorting an lebenden Zellen durchführen zu können.<sup>(37)</sup> Anfang der 70er Jahre brachte Becton Dickinson mit dem Patent von Herzenberg das erste kommerzielle FACS-Gerät auf den Markt.

Mithilfe der Durchflusszytometrie bzw. des „Fluorescence-Activated-Cell-Sorters“ (kurz: FACS) werden Partikel in einem Flüssigkeitsstrom anhand morphologischer sowie fluoreszenzmarkierter Eigenschaften erfasst und

analysiert.

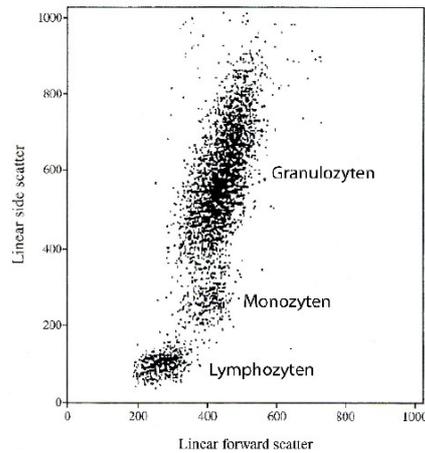
Das FACS besteht aus einer optischen sowie einer hydrodynamischen Komponente. Die hydrodynamische Fokussierung ermöglicht es, aus einer Zellsuspension einen Strom an Zellen zu schaffen, bei dem idealerweise nur eine Zelle pro Zeitpunkt durch den Laserfokus geführt wird. Dazu werden die Zellen der Probe im Sog einer Trägerflüssigkeit angesaugt und einzeln am Laser vorbeigeleitet.



**Abbildung 5:** Das optische System eines Durchflusszytometers; *Quelle: BD, Heidelberg, Deutschland*

Das optische System besteht aus verschiedenen Lasern, Spiegeln, Linsen, Filtern und Detektoren (Abb.5). Trifft der Laser auf eine Zelle im Probenstrom, so wird das Laserlicht in 2 Hauptrichtungen deflektiert. Man bezeichnet das Licht, das im geringen Winkel ( $3-10^\circ$ ) abgelenkt wird, als Vorwärtsstreulicht oder auch Forwardscatter (FSC). Diese abgelenkten Strahlen korrelieren mit der Zellgröße. Im Gegensatz dazu spricht man bei dem im  $90^\circ$ -Winkel abgelenkten Licht vom Seitwärtsstreulicht, dem Sidescatter (SSC), das mit der Zellgranularität, also der intrazellulären Komplexität zellulärer Strukturen

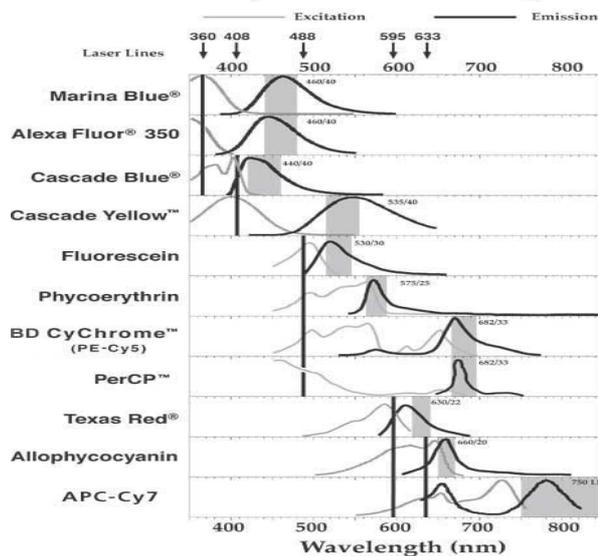
korreliert.



**Abbildung 6:** Zellen einer Vollblutprobe im FSC/SSC-Dot-Plot

An Hand von FSC und SSC können alle analysierten Zellpopulationen in einem 2-dimensionalen Dot-Plot Diagramm beschrieben (Abb.6) und durch Wahl geeigneter FSC/SSC- Werte spezifisch eingeschränkt bzw. für weitere Analysen elektronisch selektiert („elektronisches Gate“) werden.

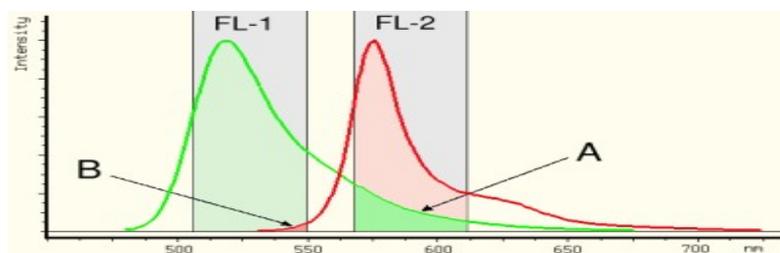
**Fluorochrome Dyes Used in Flow Cytometry**



**Abbildung 7:** Anregungs- und Emissionsspektren der einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe  
(Quelle: BD, Heidelberg, Germany)

Sind die Zellen mit einem oder mehreren fluoreszenzgekoppelten Antikörpern direkt oder über einen Zweit-Antikörper indirekt markiert, wird ein Teil der Lichtenergie durch das entsprechende Flurochrom absorbiert und Fluoreszenzlicht unterschiedlicher Wellenlänge emittiert (Abb. 7). Da unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe teilweise unterschiedliche Anregungsenergien benötigen, sind mehrere Laser für die Anregung der unterschiedlichen Fluoreszenzmarkierungen notwendig (z.B. der Argonenlaser: Wellenlänge 488nm regt u.a. FITC, PE, PerCP an).

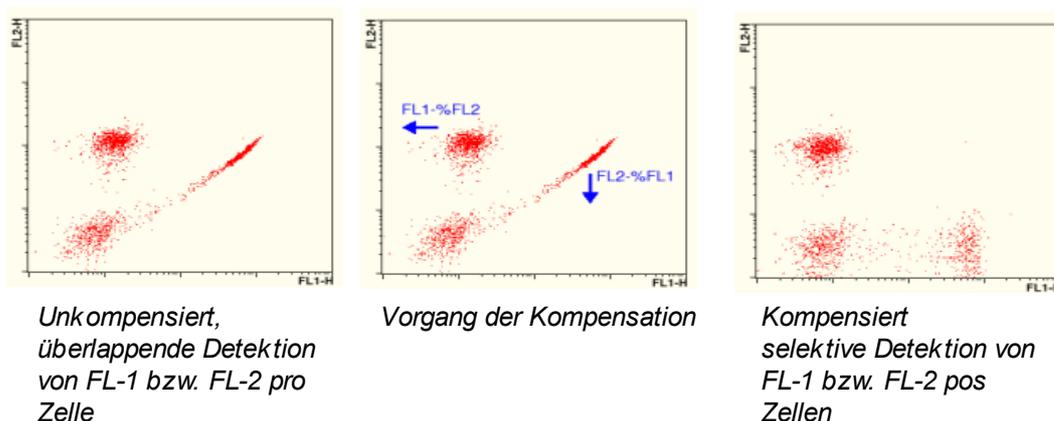
Das durch die Fluoreszenzfarbstoffe emittierte Licht (FITC:  $\lambda_{\max} = 519 \text{ nm}$ ; Alexa Fluor 488:  $\lambda_{\max} = 519 \text{ nm}$ ; PE:  $\lambda_{\max} = 575 \text{ nm}$ ; PE-Cy7:  $\lambda_{\max} = 785 \text{ nm}$ ; EMA  $\lambda_{\max} = 625 \text{ nm}$ ; PerCP:  $\lambda_{\max} = 678 \text{ nm}$ ; APC-Cy7  $\lambda_{\max} = 767 \text{ nm}$ ; Alexa700  $\lambda_{\max} = 719 \text{ nm}$ ; PacificBlue  $\lambda_{\max} = 455 \text{ nm}$ ) wird durch spezifische Spiegel und Filter so auf die Photodioden weitergeleitet (Abb.5), dass jede Photodiode möglichst nur das Licht eines einzigen Fluoreszenzfarbstoffes, sprich einer Wellenlänge, registriert.



**Abbildung 8:** Schaubild zur spektralen Überlappung

Da sich die Emissionsspektren einiger Fluoreszenzfarbstoffe unserer Mehrfachfärbungen überlagern (Abb.8) und somit von mehreren Photodioden erfasst werden (z.B. FL-1: detektiert Licht der Wellenlänge 530nm (grün); FL-2: detektiert Licht der Wellenlänge 542- 585 nm (orange)), ist es notwendig durch die sogenannte Kompensation Korrekturen bzw. Einschränkungen für eine selektive Detektion der Signale im Experiment einzubringen (Abb.9). Dabei wird versucht falsch positiv detektierte Signale im Bereich der Überschneidung

zweier Fluoreszenzen herauszurechnen. Bei älteren FACS-Geräten funktionierte dies über mechanische Spannungsregler an den Photodioden und musste deshalb vor der Messung angepasst und abgeschlossen werden. Die von uns verwendete Software FACSDiva bzw. FlowJo bieten die Möglichkeit, die Kompensation noch im Anschluss an die Messung rechnerisch durchzuführen. Vor der Messung wurde jedoch die Spannung der einzelnen Dioden so eingestellt, dass die ungefärbten Zellen in allen Farbkanälen negativ waren und nur eine geringe Autofluoreszenz in jedem Fluoreszenzkanal zeigten. Die Kompensation erfolgte anhand von Einzelmarkierungen mit den verschiedenen eingesetzten fluoreszenz-konjugierten Antikörpern entweder an unstimulierten Zellen oder an Beads.



**Abbildung 9:** Vorgang der Kompensation am Beispiel von detektierten Fluoreszenzen FL-1: CD4 FITC und FL-2: CD8 PE

### 2.13.2 FACS Analyse von PBMC

PBMC wurden auf Expression spezifischer Oberflächenantigene und Vorkommen intrazellulärer Zytokine mit und ohne Stimulation durch Mitogene und MHC Klasse II bindende Peptid-Pools mittels Mehrfachfärbung (max. 9-fach) mit direkt gekoppelten monoklonalen Antikörpern (CD3-FITC, CD4-PacificBlue, CD8-PerCP, CD25-APC-Cy7, CD28-APC, CD56-Alexa700) und Intrazellulärfärbung (IFN- $\gamma$ -PE-Cy7, IL-17-PE) gefärbt und analysiert.

Die eingefrorenen PBMC wurden zunächst aufgetaut (s.Kap. 2.10.), gezählt, mit Kulturmedium (90% RPMI-1640 medium/10% FCS/ Refobacin) auf  $10^6$  Zellen/ml eingestellt und steril in 12-Well-Platten überführt.

Zur Stimulation wurden jeweils  $10^6$  Zellen entweder nur mit 1ml Kulturmedium als Negativkontrolle, mit 12,5 ng/ml PMA und 0,5µg/ml Ionomycin, mit 0,5% PHA (5µl/ml) oder mit dem HLA KI. II Peptid Pool (2µg pro Peptid/ $10^6$  Zellen) für 20h im Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in einem Inkubationsvolumen von 1ml stimuliert.

Nach 2 Stunden wurde den Zellen 10 µg/ml Brefeldin A zugesetzt, um die Sekretion von Zytokinen aus dem Golgi Apparat zu hemmen und damit die intrazelluläre Zytokinakkumulation zu fördern.

Nach Ablauf der gesamten Inkubationszeit von 20h wurden die Zellen in 96-well Rundbodenplatten überführt, dazu nochmals gezählt und auf  $10^6$  Zellen pro 200µl eingestellt. Im Anschluß wurden 40µl 1%iges Polyglobin pro  $1 \times 10^6$  Zellen zum Blockieren unspezifischer Fc-Bindungsstellen zugesetzt. Gleichzeitig erfolgte die Zugabe von 1µl Ethidium-Monoazid (EMA) in einer Konzentration von 0,5µg/ml. Nach 10 Minuten Inkubation im Kühlschrank wurden die Zellen 10 Minuten lang einer UV-Lichtquelle ausgesetzt. Dabei bindet EMA an die interkalierte DNA toter Zellen (Kap. 2.13.7).

Anschließend wurden die PMBC mit FACS-Waschpuffer (PBS, BSA 0,1%, Natriumazid 0,025%) gewaschen. Die Zentrifugation erfolgte hier sowie im Weiteren bei 450G für jeweils 5min. Die extrazelluläre Färbung erfolgte anschließend durch Zugabe einer definierten Mischung an Antikörpern (Mastermix) gegen verschiedene Oberflächenantigene (CD3-FITC, CD4-PacificBlue, CD8-PerCP, CD25-APC-Cy7, CD28-APC, CD56-Alexa700) (Tab. 5), wobei die optimale Konzentration der einzelnen Antikörper in einer Titrationsreihe in vorherigen Versuchen bestimmt worden war (s. Kap. 3.1.3.). Die Inkubationszeit betrug 20min bei 4°C im Dunkeln. Nach einem weiteren Waschschrift mit FACS-Waschpuffer wurden die Zellen mit je 100µl/well Cytofix/Cytoperm-Lösung für 20min bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Nach dieser Fixierung und Permeabilisierung wurden die Zellen mit der PermWash/

Aqua bidest.-Lösung (Verhältnis 1:10) gewaschen. Die Zentrifugation erfolgte bei 2.500G für 4 min, da die permeabilisierten, fixierten Zellen bei geringeren Zentrifugalkräften herausgewaschen wurden. Zur intrazellulären Färbung (IFN- $\gamma$ -PE-Cy7, IL-17-PE) wurden die Testantikörper sowie die Isotypen in einem Inkubationsvolumen von mind. 30 $\mu$ l den Zellen zugesetzt und 30min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Abschließend wurden die Zellen mit PermWash/ Aqua bidest. gewaschen und in je 200 $\mu$ l FACS-Puffer in Rundboden FACS-Röhrchen gegeben. Direkt danach erfolgte die Messung aller Zellen am LSRII unter Verwendung der FACSDiva Software. Es wurde zwischen 100.000 und 800.000 Ereignissen gemessen, was einer Lymphozytenzahl im Gate I von ca. 50.000 bis 500.000 entsprach.

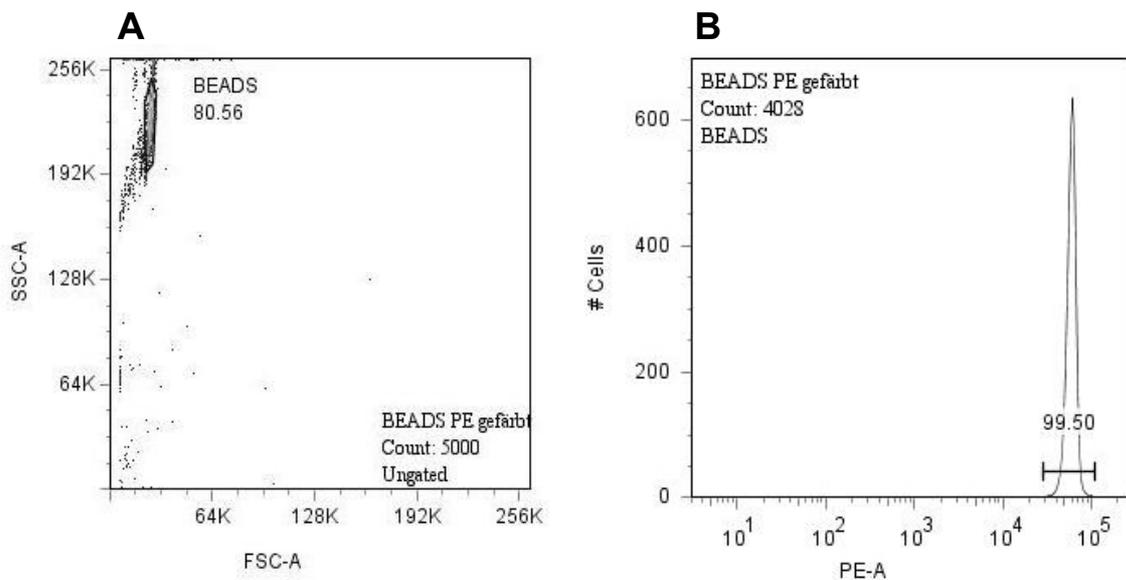
### **2.13.3 FACS-Analyse von B-Zelllinien**

Zur Analyse der IL-17 Expression in anderen Zellen des Immunsystems wurden auch B-Zelllinien untersucht (s. Kap. 2.5.).

Zu  $10^6$  Zellen der B-Zelllinien wurden für 20h 10 $\mu$ g Brefeldin A zur Hemmung der Zytokinsekretion zugegeben. Anschließend wurden die B-Zellen genau wie die PBMC (s. Kap. 2.13.2) mit EMA gefärbt und mit Polyglobin geblockt. Oberflächenfärbungen wurden verständlicherweise keine durchgeführt. Die B-Zellen wurden anschließend auch mit je 100 $\mu$ l/well Cytofix/Cytoperm-Lösung fixiert und permeabilisiert. Nach dem Waschen mit der PermWash/Aqua bidest.-Lösung (Verhältnis 1:10) wurden die Zellen entweder mit 20 $\mu$  PE-gekoppelten anti-IL-17 Antikörper (Tab.5) oder mit 20 $\mu$ l IgG1 PE-gekoppelten Maus-Isotyp-Antikörper und 10 $\mu$ l Aqua bidest in einem Gesamtvolumen von 30 $\mu$ l 30min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach dem abschließenden Waschen mit PermWash/Aqua bidest wurden die Proben in Rundboden FACS-Röhrchen überführt und sofort am LSRII unter Verwendung der FACSDiva Software gemessen.

### 2.13.4 Färbung von Kontroll-BEADS zur Kompensation

Um möglichst gute Kompensationsbedingungen zu erreichen wurden anti-Maus IgGk gekoppelte BEADS und negative Kontrollbeads ohne Bindungskapazität verwendet. Die anti-Maus IgGk gekoppelten BEADS sind Mikropartikel aus Polystyrol, die an die  $\kappa$ -Leichtketten von murinen Antikörpern binden. An diese BEADS wurden die eingesetzten Fluoreszenz-gekoppelten murinen anti-humanen monoklonalen Antikörper gebunden. Da diese Kontrollmarkierungen mit den im Experiment verwendeten Antikörpern durchgeführt wurden, ließen sich exakte Kompensationen der spektralen Überlappung der eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe mit Hilfe der Software durchführen. Es wurden jeweils 10 $\mu$ l BEADS in 100 $\mu$ l FACS-Puffer mit der Menge des im Experiment eingesetzten Antikörpers markiert. Nach 20min Inkubation wurden die BEADS 1min lang bei 12.000G zentrifugiert, die Überstände abgekippt und mit 100 $\mu$ l FACS-Puffer in Polyethylen-Rundboden-FACS-Röhrchen überführt.



**Abbildung 10:** Beispiel der Kompensation mit BEADS **A:** FSC-SSC Dot-Plot der BEADS **B:** Histogramm der mit anti-IL-17-PE-Antikörpern markierten BEADS im Gate aus Abbildung A

### **2.13.5 Messung der Zellen am LSRII**

In jedem Assay wurden unmarkierte Zellen zur Darstellung der vorhandenen Zellheterogenitäten im Dot-Plot (FSC, SSC) analysiert. Da Lymphozyten kleiner und weniger granuliert als Monozyten sind, befindet sich ihre Population links unterhalb der Monozytenpopulation (Abb. 6). Diese Lymphozytenpopulation, welche ruhenden Lymphozyten entspricht, wurde durch elektronisches Gating selektiert und als G1 bezeichnet. Die Zellen mit einer größeren Granularität, welche aktivierten Lymphozyten entsprachen, wurden im Gate G2 eingeschlossen (Abb.12).

Anschließend wurde die Spannung der einzelnen Detektionsdioden anhand der ungefärbten Kontrolle so eingestellt, dass die Dioden nur ein schwaches definiertes Signal für diese Population weiterleiteten.

Die Messung von fluoreszenzmarkierten unstimulierten Zellen oder BEADS als Positivkontrolle (Kap 2.13.4.) diente als Grundlage für die Kompensation der Fluoreszenzfarbstoffe der 9-fach markierten Zellen.

### **2.13.6 Ausschluß unspezifisch markierter Zellen**

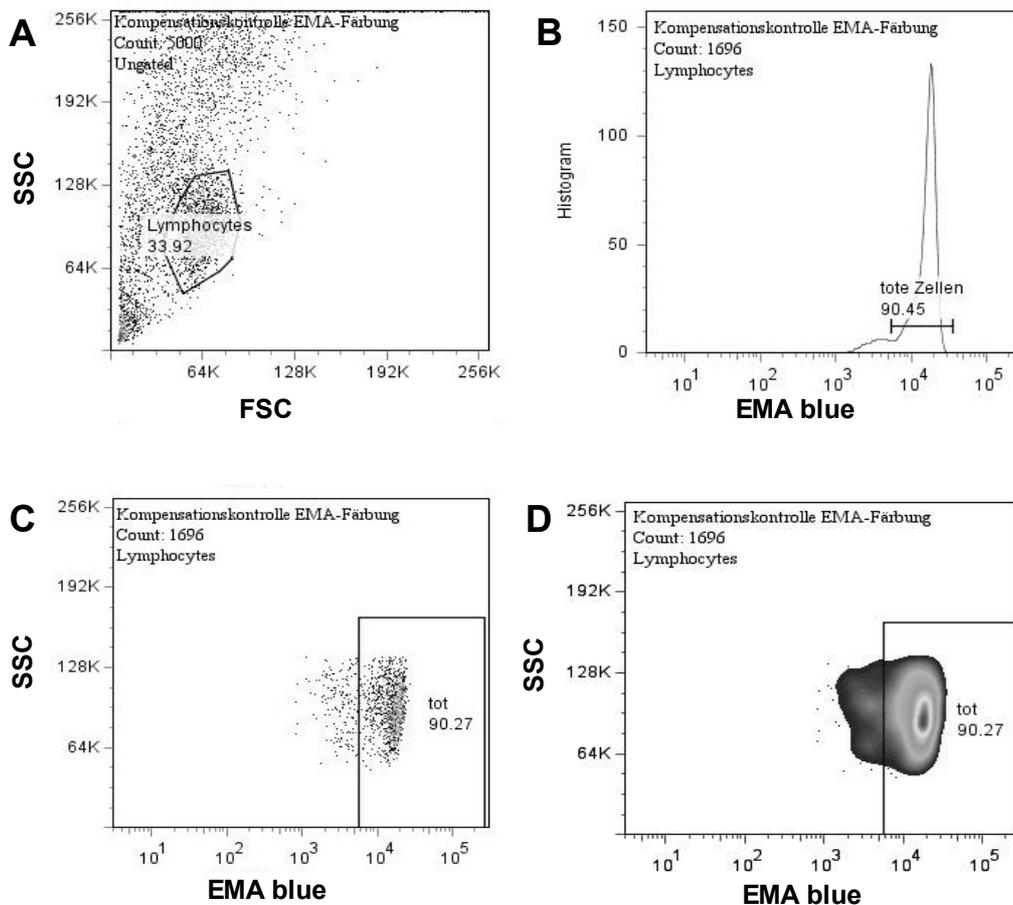
In den Proben wurden durch Beurteilung der EMA-Färbung die toten Zellen ausgeschlossen (Kap.2.13.7 + Abb. 11). Dazu wurden die EMA negativen, lebenden Zellen durch elektronisches Gaten selektiert und nur diese lebenden Zellen wurden in den weiteren Analysen ausgewertet.

Die markierten lebenden Zellen einer jeden Probe und Stimulation wurden mit Hilfe des Histogramms, des Dot-Plots und des Dichteplots in positive und negative Populationen unterschieden. Zur Unterscheidung der positiven und negativen Zellen wurden sowohl die Autofluoreszenzen der ungefärbten, unstimulierten Zellen sowie die unkompensierten Einzelfärbungen und, falls möglich, die Isotypen herangezogen. Dabei wurden Zellen als positiv erachtet,

sobald sie eine deutlich abgrenzbare Population zeigten oder eine stärkere Fluoreszenz als die Autofluoreszenz und die Isotypen aufwiesen.

### **2.13.7 Identifizierung lebender und toter Zellen am FACS**

Ethidium-Monoazid (EMA) bindet irreversibel an interkalierte DNA und wird daher zur Unterscheidung von toten und lebenden Zellen in der FACS-Analyse verwendet. Die Färbung erfolgte in Anlehnung an das Protokoll der Arbeitsgruppe De Rosa et al.<sup>(20)</sup> Als Positivkontrolle wurden in jedem Test nicht markierte Zellproben für 45min im Wasserbad bei 52°C zur Induktion von Apoptose inkubiert und danach mit EMA markiert (Abb.11). Die Positivkontrolle diente der Kompensation der EMA-Markierung gegenüber den anderen verwendeten Fluoreszenzen und zur Definition und vergleichenden Darstellung der EMA-Fluoreszenz-Intensität toter Zellen. In jeder Probe wurden durch EMA-Markierung die toten Zellen ausgeschlossen, indem durch elektronisches Gaten EMA negative Zellen selektiert wurden.



**Abbildung 11:** EMA markierte PBMC nach Induktion von Apoptose im Wasserbad bei 52°C für 45min

**A:** PBMC im FSC-SSC-Dot Plot; **B:** Zellen im Gate von Abb. A im Fluoreszenzhistogramm dargestellt; C und D: Zellen wie aus B in weiteren Darstellungen **C:** im SSC-FL3 Dot Plot; **D:** im SSC-FL3 Dichte-Plot

### 2.13.8 Datenauswertung

Die Auswertungen der mit der Software FACS Diva ermittelten Messdaten des LSR II erfolgte mit Hilfe der Software FlowJo.

Nur Zellen innerhalb der definierten Gates (G1, G2 bzw. der BEADS-Populationen) wurden berücksichtigt. Somit wurden Zellen anderer Größe und Granularität sowie tote Zellen von Beginn an nicht mit in die Analyse eingeschlossen.

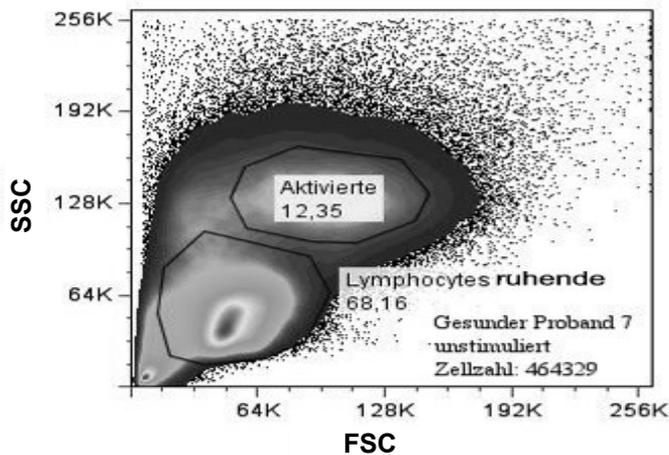
Zunächst wurden die aus den Kontrollmarkierungen der BEADS bzw. Zellen errechneten Signalkorrektur- bzw. Kompensationswerte auf die spezifisch gefärbten Zellen übertragen. Die automatisch durchgeführten Kompensationen wurden durch Vergleich aller Färbungen miteinander kontrolliert und wenn nötig manuell korrigiert. Zusätzlich wurde für die intrazellulären Messungen der Zytokine durch die unkompenzierte Analyse von Einzelfärbungen der intrazellulären Zytokine ausgeschlossen, dass durch Kompensation und Mehrfachfärbung falsch positive Ergebnisse errechnet wurden (Abb. 18). Anschließend wurden wie folgend beschrieben die Gates der verschiedenen Markierungen gesetzt (Kap. 2.13.9ff). Da es sich um Mehrfachmarkierungen (9-fach) handelt, ließen sich verschiedene Zellpopulationen identifizieren und der relative Anteil der Zytokine (IL-17, IFN- $\gamma$ ) an diesen Populationen messen (Kap. 2.8., Kap. 2.9., Kap.2.10.). Außerdem wurde auch der relative Anteil der verschiedenen Zellpopulationen an den zytokinexprimierenden Zellen (IL-17, IFN- $\gamma$ ) bestimmt (Kap. 3.2.11., Kap. 3.2.12.). Diese Daten wurden in Excel<sup>®</sup>-Dateien exportiert und dort geordnet. Die statistische und grafische Auswertung der Daten erfolgte mit der Software Prism<sup>®</sup>.

Als statistische Prüfverfahren wurden nicht-parametrische Tests verwendet, da nur einige Datensätze dem „D'Agostino und Pearson“ Test auf Normalverteilung gerecht wurden. Zum Vergleich zwischen RA-Patienten und Gesunden wurde der „Mann-Whitney-U-Test“ verwendet, da es sich hier um unabhängige Variablen handelte. Wurden jedoch bei Patienten oder Testpersonen, die unterschiedlichen Stimulantien miteinander verglichen, so kam der „Wilcoxon-Test“ zum Einsatz, da es sich um abhängige Stichproben handelte. In der graphischen Darstellung sind der Median und das 95%-Konfidenzintervall abgebildet.

### **2.13.9 Das Lymphozyten-Gate**

Bei allen Probanden konnten an unstimulierten Zellen im Lymphozytenbereich des FSC/SSC Dot-Plots zwei Populationen unterschieden werden (Abb.12).

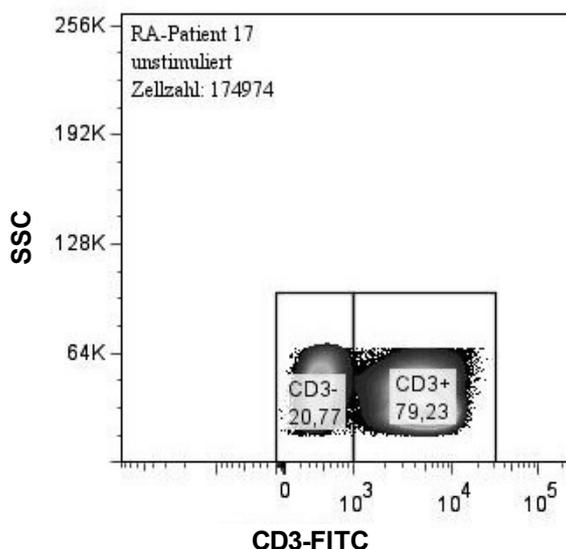
Gate I mit vorwiegend kleinen Zellen geringer Granularität enthält vermutlich überwiegend ruhende Lymphozyten. Während Zellen im Gate II größer und stärker granuliert sind und somit eher aktivierten Lymphozyten entsprechen.



**Abbildung 12:** Dargestellt sind unstimulierten PBMC des gesunden Probanden 7 im Pseudodotplot FSC gegen SSC

### 2.13.9.1 Bewertung der CD3 Markierung

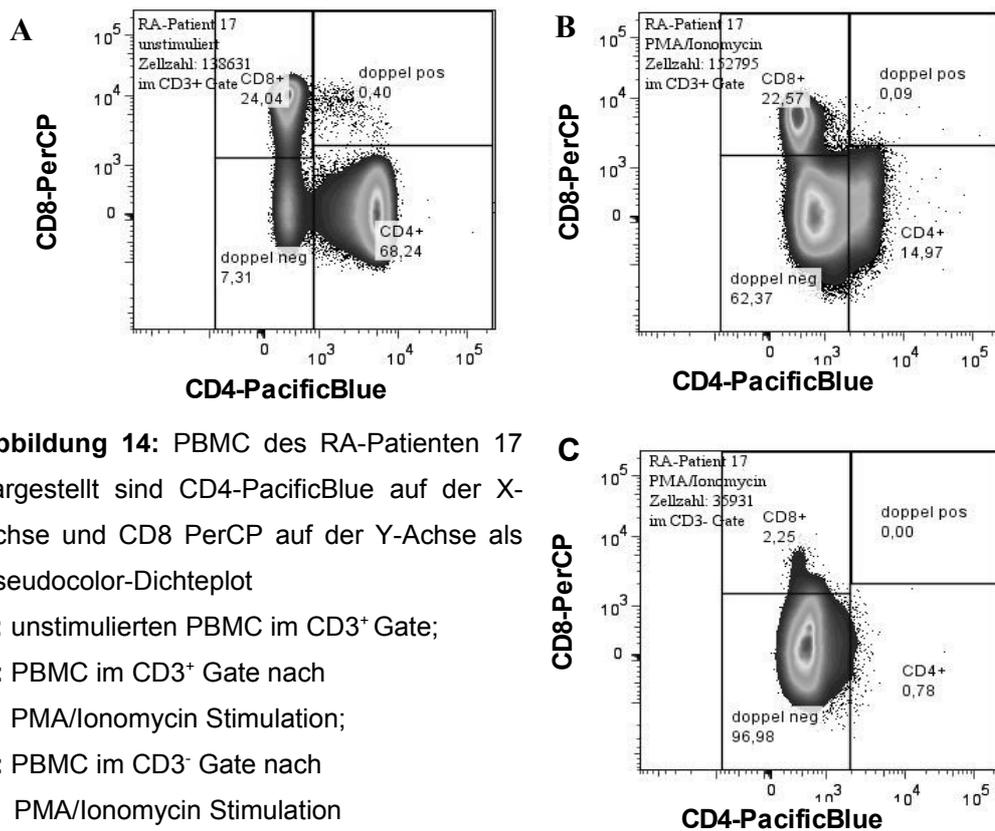
CD3-FITC gefärbte PBMC (Abb. 13) ließen sich stets eindeutig in positive und negative Populationen unterscheiden, auch wenn nach PHA-Stimulation häufig eine Herabregulierung von CD3 zu beobachten war (Kap. 3.2.3.).



**Abbildung 13:** CD3-FITC Markierung der EMA negativen (lebenden) Zellen im Lymphozytengate Gate I des RA-Pat. 17: Darstellung des Pseudocolour-Dichteplots der CD3 FITC Werte auf der X-Achse gegen SSC auf der Y-Achse

### **2.13.9.2 Bewertung von CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> Zellen**

CD4<sup>+</sup> sowie CD8<sup>+</sup> Zellen wurden im Gate der CD3<sup>+</sup> PBMC im Pseudocolour-Dichteplot mit CD4-Pacific Blue markierten Zellen auf der X-Achse gegen CD8-PerCP markierten Zellen auf der Y-Achse dargestellt (Abb.14A). Daraus ließ sich sowohl der Anteil der CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> doppelt positiven als auch der CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup> doppelt negativen Zellen messen (Abb. 14). Die Stimulation mit PMA/Ionomycin führte zu einer Herabregulierung der Expression von CD4 an der Oberfläche<sup>(4)</sup>, ein Phänomen, das für das Gating positiver CD4<sup>+</sup> Zellen ein Problem darstellte und von Weyand et al 1987 erstbeschrieben wurde.<sup>(116)</sup> Es ließen sich die CD4<sup>+</sup> und die CD4<sup>-</sup> Population nach PMA/Ionomycin Stimulation nicht mehr klar voneinander abgrenzen (Abb.14B). Deshalb wurde um die CD4 positiven Zellen zu identifizieren, das CD4<sup>+</sup> Gate so gesetzt, dass der CD4<sup>+</sup> Anteil an den CD3<sup>-</sup> Zellen kleiner als 1% war (Abb.14C) um sicher keine falsch positiven CD4 Zellen mit ins Gating einzuschließen. Es wurden mit dieser Methode jedoch vermutlich CD4 positive Zellen ins Gate der doppelt negativen Zellen mit eingeschlossen und als falsch negativ gemessen.



**Abbildung 14:** PBMC des RA-Patienten 17 dargestellt sind CD4-PacificBlue auf der X-Achse und CD8 PerCP auf der Y-Achse als Pseudocolor-Dichteplot

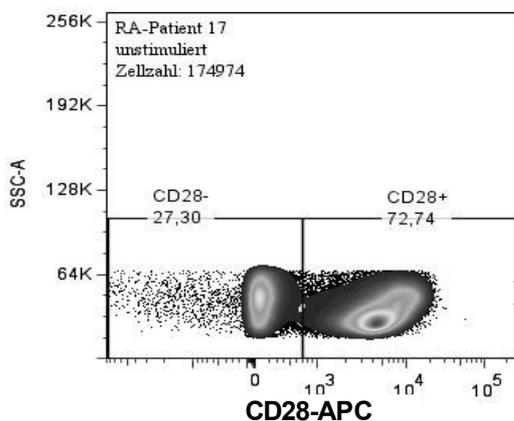
**A:** unstimulierten PBMC im CD3<sup>+</sup> Gate;

**B:** PBMC im CD3<sup>+</sup> Gate nach PMA/Ionomycin Stimulation;

**C:** PBMC im CD3<sup>-</sup> Gate nach PMA/Ionomycin Stimulation

### 2.13.9.3 Bewertung der CD28 Markierung

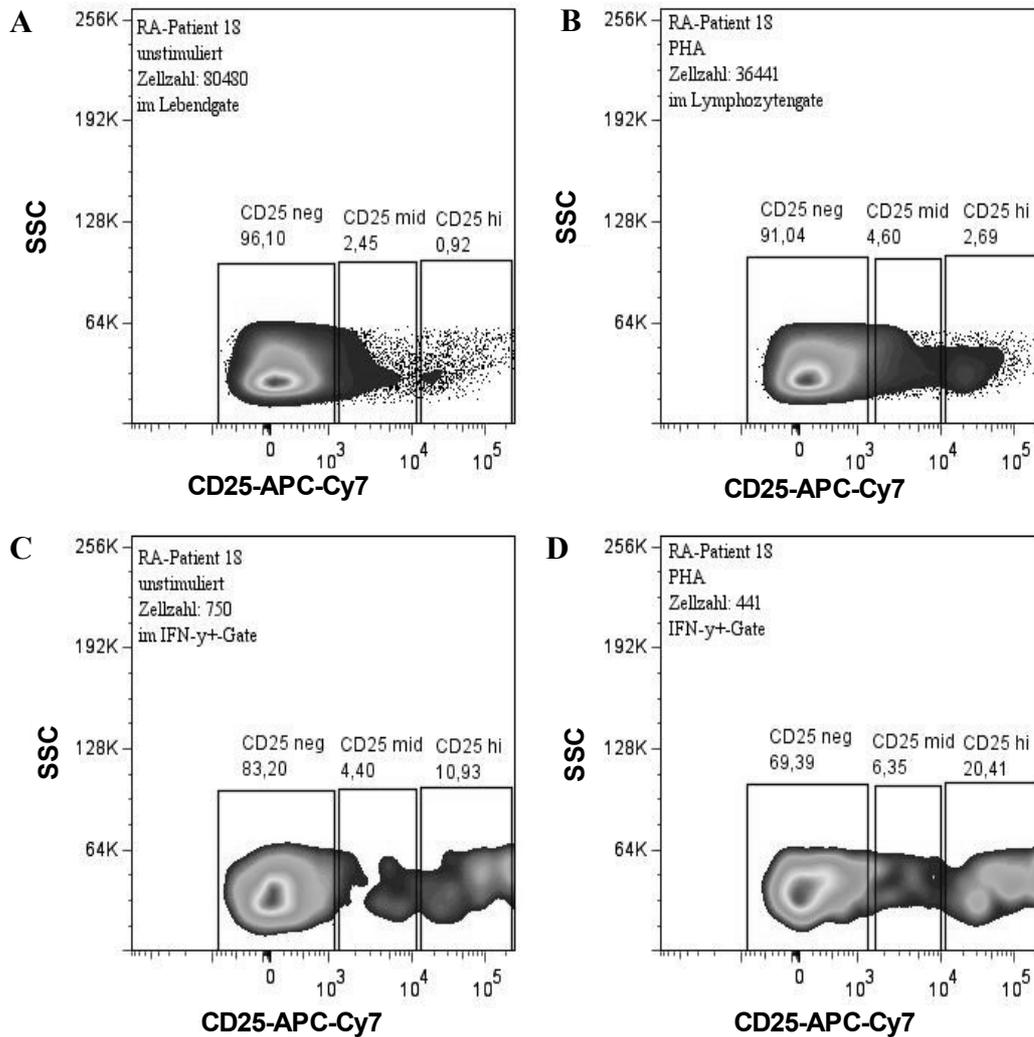
CD28-APC gefärbte PBMC ließen sich stets deutlich in eine positive und eine negative Population unterscheiden (Abb.15). Die Stimulation mit PMA/Ionomycin oder mit PHA führte zu einer Herabregulierung von CD28, wobei sich weiterhin die CD28<sup>+</sup> von der CD28<sup>-</sup> Population deutlich abgrenzen ließ.



**Abbildung 15:** CD28-APC markierte PBMC im Lymphozytengate I des RA-Patienten 17 sind mit CD28-APC auf der X-Achse und SSC auf der Y-Achse als Pseudocolor-Dichteplot dargestellt.

#### 2.13.9.4 Bewertung der CD25 Markierung

CD25-APC-Cy7 markierte Zellen wurden in die Populationen CD25<sup>hi</sup>, CD25<sup>mid</sup> und CD25<sup>neg</sup> unterteilt (Abb.16). Um die CD25<sup>neg</sup>-Population eindeutig erfassen zu können, wurden die unmarkierten Zellen bzw. die Autofluoreszenz der Zellen zum Negativvergleich herangezogen. Als CD25<sup>mid</sup>- Population wurden jene Zellen bezeichnet, deren Fluoreszenz größere als die der negativen Zellen war, die jedoch nicht weit in den positiven Bereich hineinreichten. Abzugrenzen war die CD25<sup>mid</sup>- Population von der CD25<sup>hi</sup>-Population besonders gut nach Stimulation mit PHA (Abb.16B). Diese 2 verschiedenen CD25<sup>+</sup> Zellpopulationen zeigten sich als relevant für die Beurteilung der INF- $\gamma$  positiven Zellen, die eine deutliche CD25<sup>hi</sup> und eine CD25<sup>neg</sup> Population aufwiesen (Abb.16 C+D).

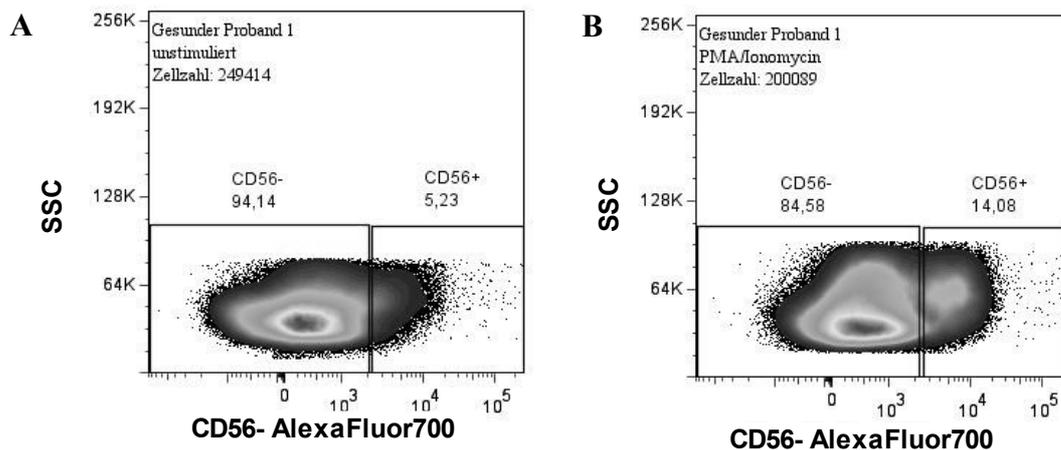


**Abbildung 16:** CD25 APC-Cy7 markierte PBMC auf der X-Achse versus SSC auf der Y-Achse des RA-Patienten 18. **A:** unstimulierten Lymphozyten im Gate I; **B:** Lymphozyten nach PHA Stimulation im Gate I; **C:** unstimuliert Lymphozyten im Gate IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen; **D:** Lymphozyten nach PHA Stimulation im Gate IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen

### 2.13.9.5 Bewertung der CD56 Markierung

CD56 markierte Zellen wurden in eine positive und in eine negative Population unterschieden. Da diese sich teilweise nur schwer abgrenzen ließen (Abb.17A), wurden zunächst die mit PMA/Ionomycin stimulierten Zellen untersucht, bei denen sich eine getrennte, deutlich positive Population darstellte (Abb. 17B).

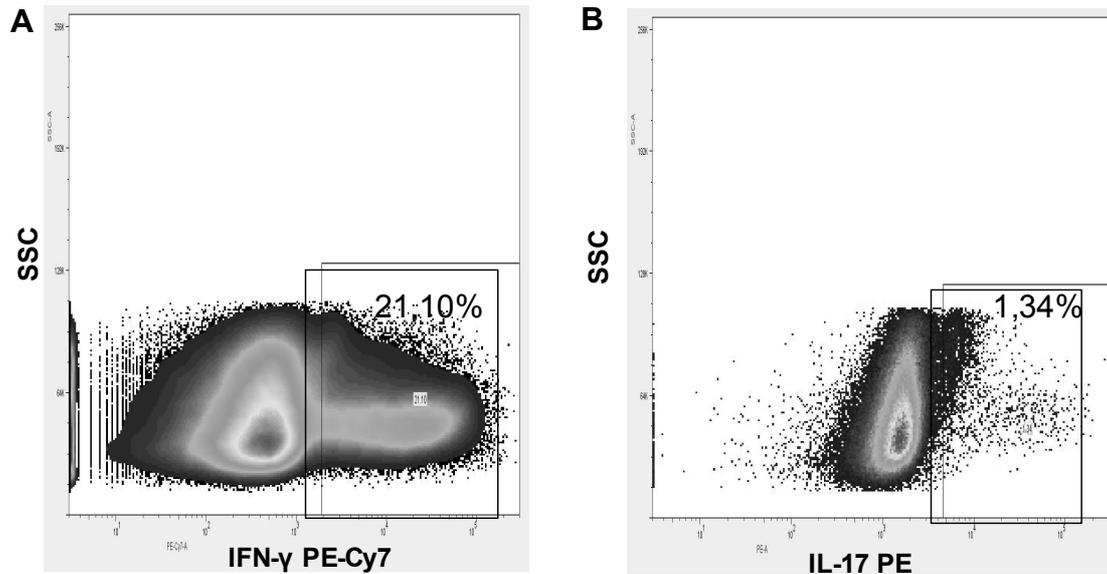
Zum Vergleich wurden auch stets die ungefärbten Zellen als Referenz für die CD56 negativen Zellen herangezogen. Eine CD56<sup>hi</sup> Population, wie sie für lymphatisches Gewebe beschrieben ist, ließ sich erwartungsgemäß im Blut nicht finden.



**Abbildung 17:** Pseudocolor-Dichteplot Darstellung der PBMC des gesunden Probanden 1. Nach Markierung mit CD56-APC-Cy7 auf der X-Achse versus SSC auf der Y-Achse. **A:** unstimulierte Zellen; **B:** mit PMA/Ionomycin stimulierte Zellen

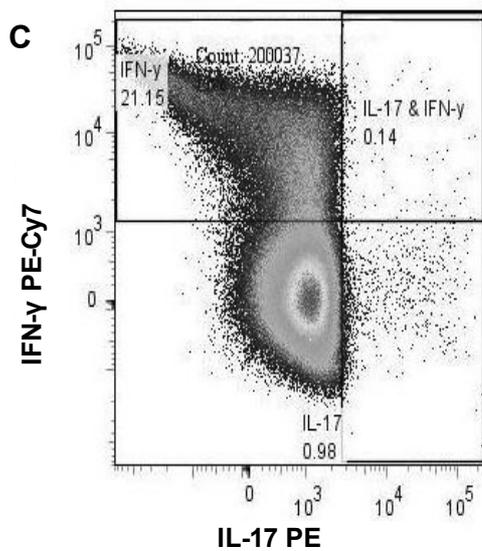
### 2.13.9.6 Bewertung der intrazellulären Markierungen von IL-17 und IFN- $\gamma$

Interleukin-17 und Interferon- $\gamma$  markierte Zellen ließen sich schwer in positive und negative Populationen unterscheiden, da die jeweilige Zytokinexpression jeweils eher einem Kontinuum entsprach. Die Gates wurden mit Hilfe der ungefärbten Zellen, der Isotypen sowie der Einzelfärbung (Abb. 18 A+B) gesetzt. Die Einzelfärbung wurde notwendig, da die computergestützte Kompensation unzureichend war und manuell korrigiert werden musste.



**Abbildung 18:**

Vergleich von unkompensierten Einzelmarkierung zu den kompensierten Mehrfachfärbungen am Beispiel des gesunden Probanden 13



**A:** Unkompensierten Einfachmarkierung von IFN- $\gamma$  PE-Cy7 auf der X-Achse gegen SSC auf der Y-Achse an Lymphozyten im Gate I

**B:** Unkompensierte Einfachmarkierung von IL-17 PE auf der X-Achse gegen SSC auf der Y-Achse an Lymphozyten im Gate I

**C:** kompensierte Mehrfachmarkierung von IL-17 PE Markierung auf der X-Achse gegen IFN- $\gamma$  Markierung auf der Y-Achse

Die Gates wurden sowohl für jeden Probanden als auch für jedes Stimulans spezifisch gesetzt.

#### **2.13.9.7 Nomenklatur des Gatings**

Die Gates wurde im Folgende alle in übereinstimmender Reihenfolge mit der Reihenfolge des Gatings benannt. Das heißt, beispielsweise, dass für die Population  $CD3^+/CD4^+/CD28^-$  zunächst die  $CD3^+$  Zellen selektiert wurden, anschließend die  $CD4^+$  Zellen und der Anteil der  $CD28^-$  Zellen an der  $CD3^+/CD4^+$  Population angegeben wird.

### 3 Ergebnisse

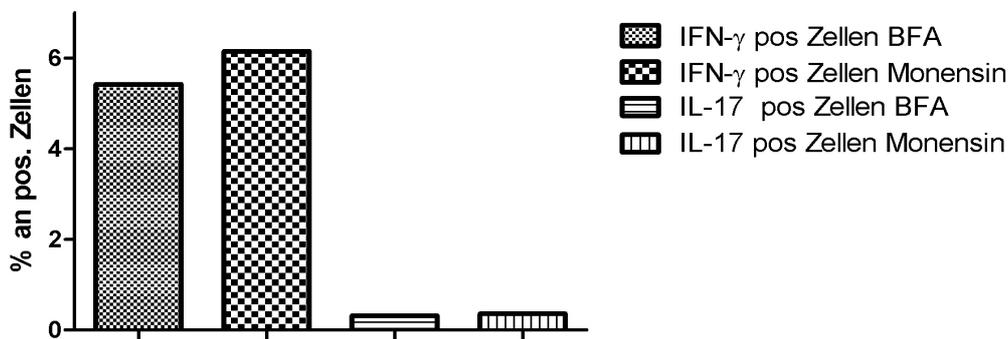
#### 3.1 Standardisierung der Testreagenzien und Zytokindetektion

##### 3.1.1 Vergleich von Brefeldin und Monensin als Inhibitor der Zytokinsekretion

**Brefeldin A** ist ein transporthemmendes Ionophor, das erstmalig im Pilz *Penicillium brefeldianum* beschrieben wurde. Durch die Inhibition des Proteintransports vom endoplasmatischen Retikulum in den Golgi-Apparat kommt es zu einer intrazellulären Akkumulation neu synthetisierter Proteine.<sup>(27)</sup>

Eine weitere Möglichkeit der Sekretionsinhibition ist die Zugabe von **Monensin**, das aus dem Pilz *Streptomyces cinnamonensis* stammt. Monensin stört den intrazellulären Natrium-H<sup>+</sup>-Gradienten, insbesondere der Golgi-Region und behindert somit die Freisetzung sekretorischer Vesikel.<sup>(70)</sup>

Es wurden in einem Vergleichsexperiment 106 PMBC über Nacht mit PMA/Ionomycin (20ng PMA und 2µg Ionomycin) stimuliert und für weitere 4h entweder mit 10µg Brefeldin A oder mit 4µMol Monensin die Zytokubsekretion geblockt. Danach wurde eine intrazelluläre Anfärbung von IFN-γ und IL-17 durchgeführt, um die Potenz der Sekretionsinhibition der beiden Substanzen miteinander zu vergleichen.



**Abbildung 19:** Prozentualer Anteil der IFN- $\gamma$  bzw. IL-17 positiven Zellen an Lymphozyten im Gate I nach PMA/Ionomycin Stimulation, die entweder mit Brefeldin A (BFA) oder mit Monensin in der Zytokinsekretion geblockt wurden

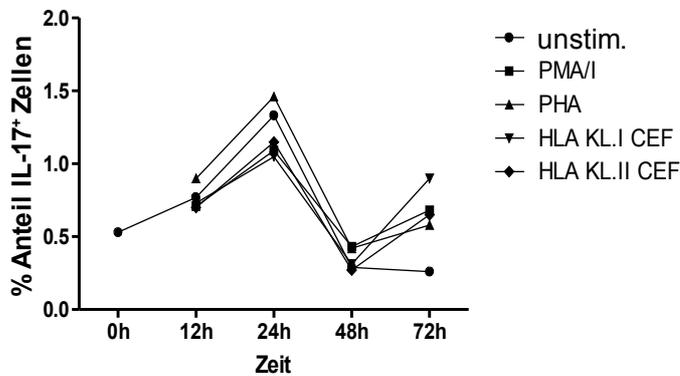
Es zeigte sich, dass mit Monensin geblockte Zellen eine geringfügig höhere Menge an intrazellulärem IFN- $\gamma$  sowie IL-17 aufwiesen (Abb. 19). Es wurde jedoch im Weiteren Brefeldin A als Sekretionsinhibitor verwendet, da die Unterschiede zwischen beiden Sekretionsinhibitoren gering waren. Ausschlaggebend für die Entscheidung für Brefeldin A, dass eine Inkubation mit Monensin für mehr als 18h zu einer höheren Rate an toten Zellen führte, wie in der Literatur beschrieben,<sup>(80)</sup> als die Zugabe von Brefeldin A.

### 3.1.2 Stimulationskinetik der PBMCs zur Optimierung der Interleukin 17

#### Analytik

Um den Zeitpunkt der maximalen Interleukin 17 Expression zu ermitteln wurde eine Stimulationskinetik an PBMC eines gesunden Probanden (Proband 2) durchgeführt. Die Zellen wurden zum Zeitpunkt 0h entweder mit PMA/Ionomycin (25ng/2 $\mu$ g), PHA (5 $\mu$ l/ml), HLA KI.I Peptid Pool aus 23 Peptiden (je 2 $\mu$ g/Peptid) oder dem HLA KI. II Peptid Pool (je 2 $\mu$ g/Peptid) pro 10<sup>6</sup> Zellen stimuliert.

Nach Ablauf der angegebenen Zeit wurden die stimulierten Zellen für weitere 4h mit Brefeldin A blockiert. Anschließend wurden die Zellen markiert (s.Kap. 2.13.2.) und sofort am FACS analysiert.

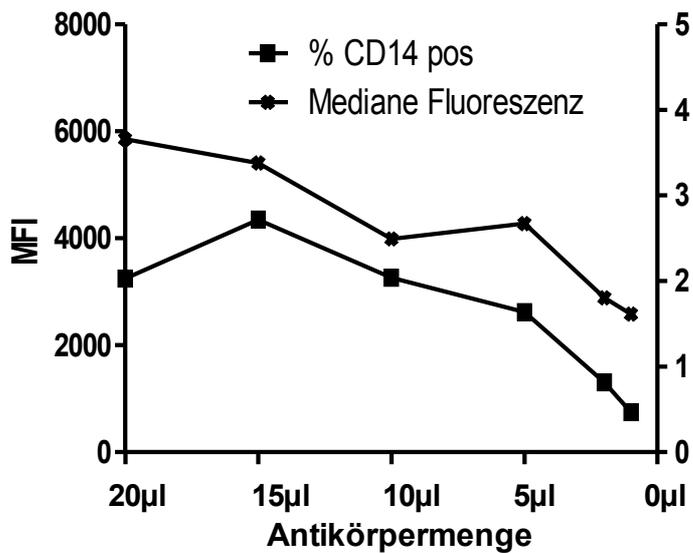


**Abbildung 20:** Schaubild zur Kinetik der Interleukin 17 Expression; Zeitverlauf des Anteils IL-17<sup>+</sup> Lymphozyten im Gate I des Probanden 2 in Abhängigkeit von den angegebenen Stimulantien

Ein Anstieg der Interleukin 17 Expression konnte nach 24h für alle verwendeten Stimulantien festgestellt werden (Abb. 20). Nach 48h war ein steiler Abfall der IL-17 Expression zu verzeichnen. Im weiteren Verlauf war nach 72h ein erneuter Anstieg zu beobachten.

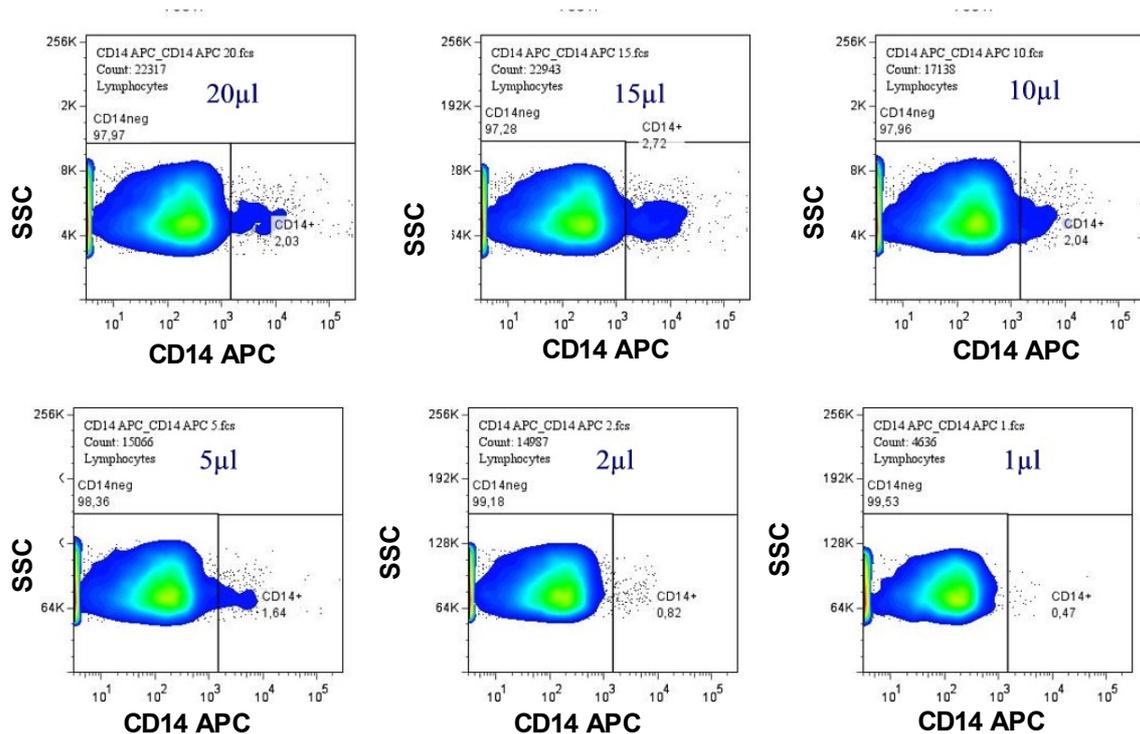
### 3.1.3 Antikörpertitrationsen

Um die optimale Antikörpermengung für die verschiedenen Fluoreszenzmarkierungen zu ermitteln, wurden alle verwendeten direkt markierten Antikörper in Vorversuchen austitriert. Zielpunkt der Titration war der Verdünnungswert, bis zu dem kein wesentlicher Abfall in der mittleren Fluoreszenz zu beobachten war. Dies soll hier am Beispiel von CD14 APC gezeigt werden.



**Abbildung 21:** FACS Ergebnisse der Titration des CD14 spezifischen APC-markierten Antikörpers an Lymphozyten im Gate I des Gesunden Probanden 4; Dargestellt sind die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) (auf der Y-Achse links) und der prozentuale Anteil der CD 14 positiven Zellen (auf der Y-Achse rechts) in Abhängigkeit von der verwendeten Antikörpermenge

Die mittlere Fluoreszenzintensität nahm bei CD14 APC Antikörperzugabe von weniger als 15µl deutlich ab (Abb. 21). Auch die Anzahl der als CD14<sup>+</sup> detektierten Zellen war bis zu dieser Titrationsstufe konstant. Im Pseudodotplot (Abb. 22) war ebenfalls eine klare Abgrenzung von positiver und negativer Population unterhalb von 15µl Antikörpermenge nicht mehr möglich. Daher wurden in den weiteren Versuchen 15µl des CD14 APC Antikörpers eingesetzt (Kap. 2.12.+ Tabelle 5).

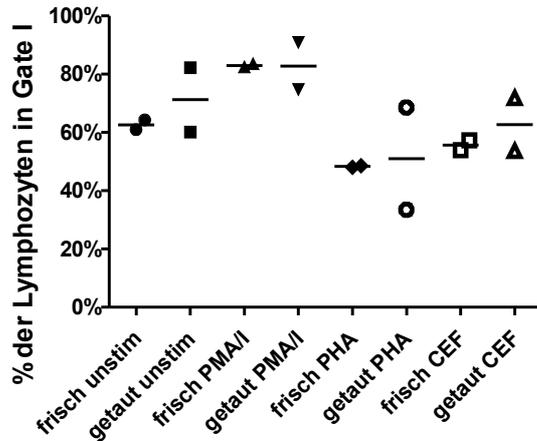


**Abbildung 22:** FACS-Analyse der CD14 APC Antikörpertitration; Darstellung des SSC auf der Y-Achse gegen CD14-APC auf der X-Achse als Pseudocolor-Dotplot nach Zugabe unterschiedlicher Mengen des Antikörpers

### 3.1.4 Untersuchung zum Einfluss von Einfrieren auf die FACS Detektion von Oberflächenantigenen und Interleukin-17 bzw. Interferon- $\gamma$

Um den Einfluss des Einfrierens auf die Expression der untersuchten Lymphozytenantigene und der Zytokinproduktion zu untersuchen, wurde in 2 unabhängigen Experimenten an PBMC zweier Probanden die Expression spezifischer Marker direkt nach Isolierung und nach Kryokonservierung (Kap. 2.9 & 2.10.) miteinander verglichen. Dazu wurden die frisch isolierten bzw. aufgetauten PBMC mit PMA/Ionomycin, PHA und den HLA-Klasse II Peptid Pool (in den Abbildungen CEF genannt) nach obengenannten Protokoll (Kap. 2.13.2) stimuliert.

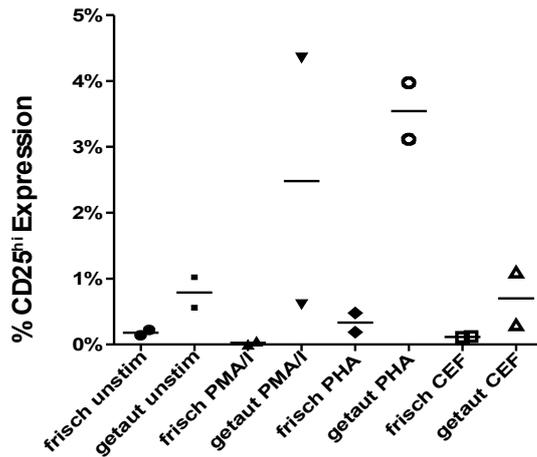
### Lymphozyten in Gate I



**Abbildung 23:** % Anteil der Zellen, die im Gate I der Lymphozyten von frisch isolierten oder aufgetauten PBMC in Abhängigkeit von der Stimulation mit PHA, PMA/Ionomycin oder dem HLA-KI. II Peptid Pool (CEF)

Die kryokonservierten Zellen wiesen mehr Lymphozyten in Gate I auf als die frisch isolierten Zellen (Abb. 23). Den größten Anteil an Lymphozyten in Gate I zeigten, die frischen wie auch die aufgetauten, mit PMA/Ionomycin stimulierten PBMC. Gate II Lymphozyten scheinen durch Einfrieren und PMA/Ionomycin Stimulation bevorzugt abzusterben. Den geringsten Anteil an Lymphozyten in Gate I wiesen PBMC nach PHA Stimulation auf.

### CD 25 Expression an Lymphozyten im Gate I

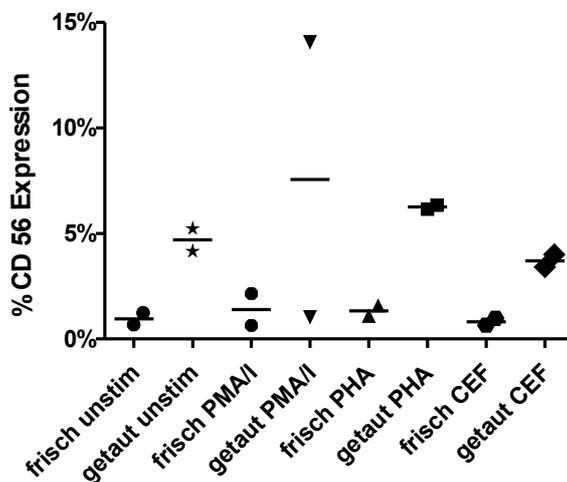


**Abbildung 24:** % Anteil CD25<sup>hi</sup> Zellen im Gate I der Lymphozyten von frischen und aufgetauten PBMC unstimuliert und nach verschiedenen Stimulationen

Aufgetaute Zellen hatten einen deutlich größeren Anteil an CD25<sup>hi</sup>-Zellen als frisch isolierte PBMC (Abb. 24). Nach Stimulation mit PMA/Ionomycin und PHA war nur bei aufgetauten Zellen ein Anstieg der CD25<sup>hi</sup>-Population verglichen mit den unstimulierten Zellen festzustellen.

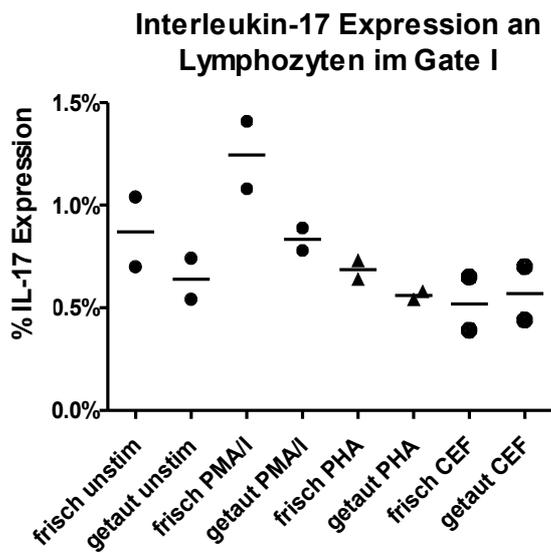
Bezüglich der Expression von CD28 unterschieden sich frisch isolierte und aufgetaute Zellen kaum voneinander.

### CD 56 Expression an Lymphozyten im Gate I



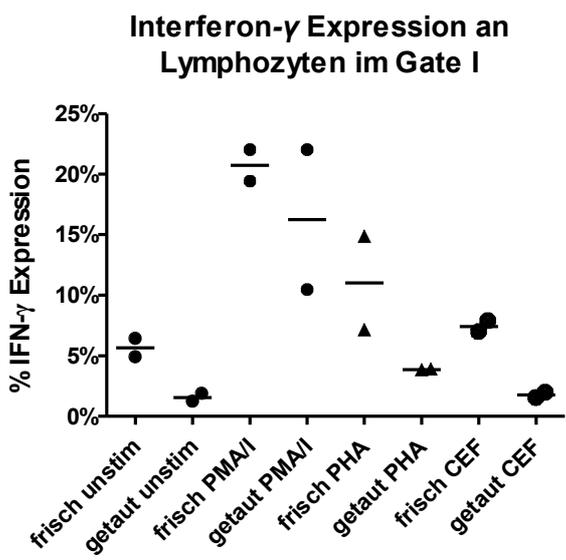
**Abbildung 25:** % Anteil CD56<sup>+</sup> Zellen im Gate I frisch isolierter sowie aufgetauter PBMC unstimuliert und nach verschiedenen Stimulationen

Die CD56<sup>+</sup> Zellen im Gate I der Lymphozyten waren nach Auftauen im Vergleich zu frisch isolierten vermehrt. Nach PHA und PMA/Ionomycin Stimulation nahm insbesondere bei den aufgetauten Zellen der Anteil CD56<sup>+</sup> Zellen zu (Abb. 25).



**Abbildung 26:** % Anteil Interleukin-17 positiver Zellen im Gate I der Lymphozyten von frisch isolierten und aufgetauten PBMC, unstimuliert und nach verschiedenen Stimulationen

Der Anteil der IL-17 positiven Zellen im Gate I der Lymphozyten war bei frisch isolierten Zellen im Vergleich zu aufgetauten höher (Abb.26). In beiden Vergleichsgruppen induzierte PMA/Ionomycin die Expression von IL-17 am stärksten, wobei auch hier ein Vorteil der Verwendung von frischen Zellen zu beobachten war.



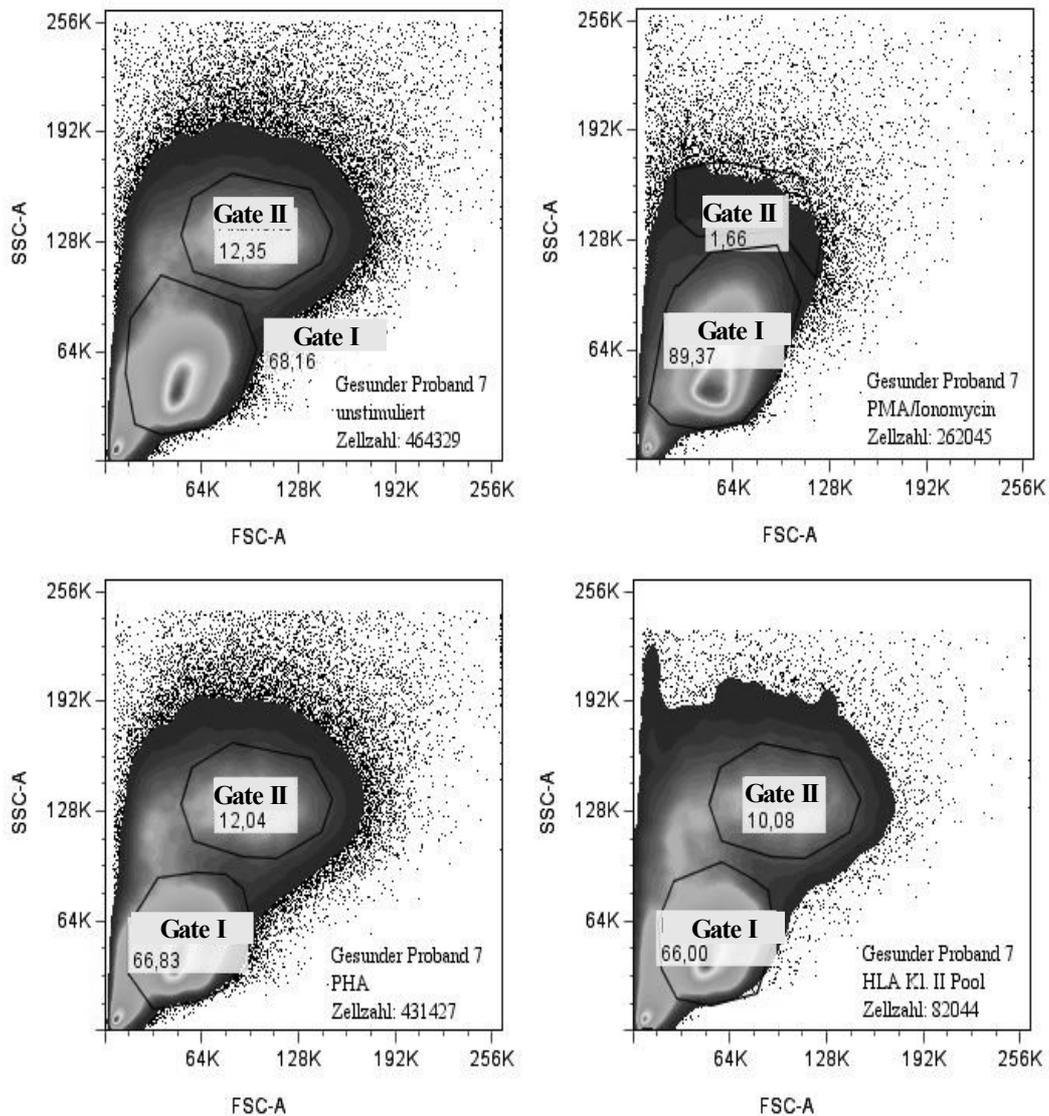
**Abbildung 27:** % Anteil IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen im Gate I der Lymphozyten von frisch isolierten und aufgetauten PBMC unstimuliert und nach verschiedenen Stimulationen

Auch die IFN- $\gamma$  Expression war in frisch isolierten unstimulierten PBMC höher als in aufgetauten PBMC (Abb. 27). Die unspezifische Stimulation mit PHA und PMA/Ionomycin führte in beiden Populationen zu einem deutlich größeren Anteil IFN- $\gamma^+$  Zellen, während bei antigen-spezifischer Aktivierung mit Klasse II restringierten CEF Pool Peptiden nur eine geringere Vermehrung verglichen zu den unstimulierten Zellen zu beobachten war.

### **3.2 Charakterisierung von Lymphozytenpopulationen und ihre Zytokinsekretion von RA-Patienten im Vergleich zu Gesunden**

#### **3.2.1 Unterschiede der Lymphozytenpopulationen**

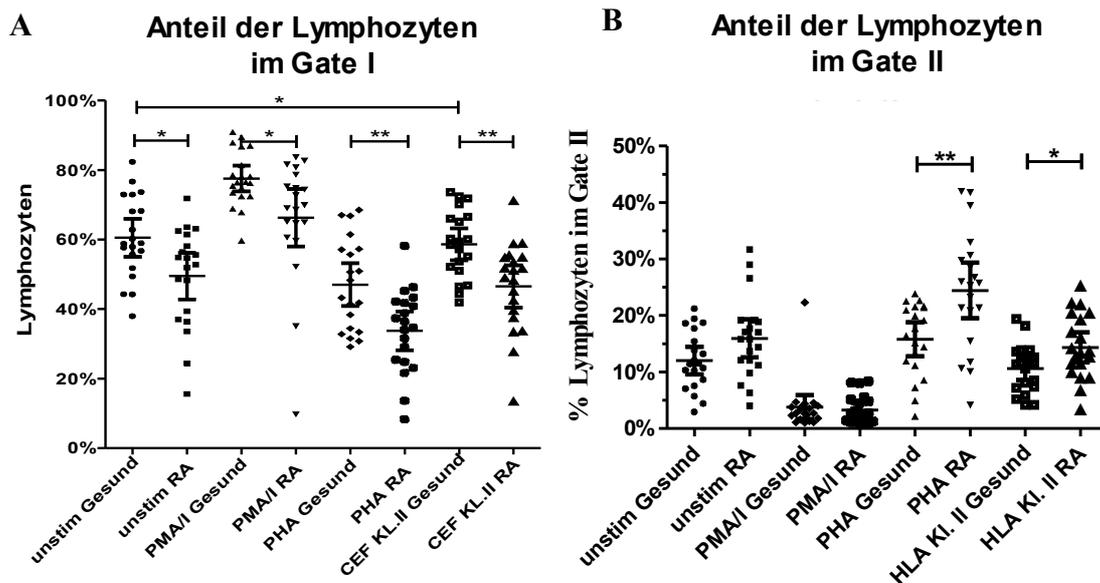
PBMC der RA-Patienten und gesunden Personen konnten nach Größe und Granularität in zwei Lymphozytenpopulationen, Gate I und Gate II unterschieden werden (Abb. 29 + Kap.2.13.9).



**Abbildung 28:** FACS-Analyse der PBMC des gesunden Probanden 7. Unterscheidung von zwei Lymphozytenpopulationen nach Größe (FSC, X-Achse) und Granularität (SSC, Y-Achse) **A:** unstimulierte PBMC; **B:** nach PMA/Ionomycin Stimulation; **C:** nach PHA Stimulation; **D:** nach Stimulation mit HLA KI. II Peptiden

Neben einer Hauptpopulation, der Lymphozytenpopulation in Gate I, fand sich eine weitere größere und stärker granulierte Population von Lymphozyten im Gate II, die bei den einzelnen Probanden unterschiedlich stark variierte

(Abb.28). Es kann vermutet werden, dass es sich bei den Zellen im Gate II zum Teil um aktivierte Lymphozyten handelt. Kaum existent war diese Population nach PMA/Ionomycin Stimulation (Abb. 29), da vermutlich ein großer Teil der primär aktivierten Zellen durch die 24h-stündige Stimulation zum Absterben gebracht wurde.



**Abbildung 29:** Anteile der **A:** Lymphozyten im Gate I **B:** Lymphozyten im Gate II an allen gemessenen Zellen; Dargestellt sind die Einzelwerte, die Mittelwerte sowie das 95% Konfidenzintervall, (\*-p < 0,05; \*\*-p < 0,01)

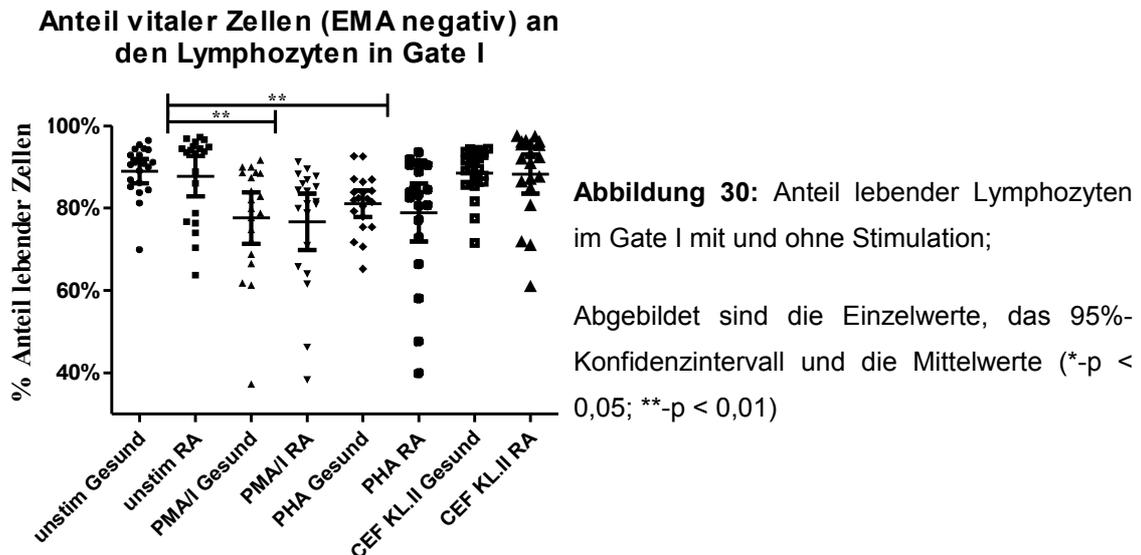
RA-Patienten wiesen nach allen Stimulationen im Vergleich zu Gesunden signifikant geringere ( $p < 0,05$ ) Anteile an Lymphozyten im Gate I und größere Anteile an Lymphozyten im Gate II als Gesunde auf (Abb. 29A). Besonders groß war dieser Unterschied nach Stimulation mit PHA und dem HLA Klasse II Peptid-Pool ( $p < 0,01$ ).

Nach PMA/Ionomycin Stimulation lagen die meisten Lymphozyten im Gate I, da die Stimulation vermutlich eine große Anzahl der Lymphozyten im Gate II zum Absterben brachte.

Dagegen ließen sich bei RA-Patienten und Gesunden nach Stimulation mit PHA

( $p < 0,001$ ) oder dem HLA-Klasse II Peptid-Pool ( $p < 0,05$ ) signifikant weniger Lymphozyten im Gate I verglichen mit unstimulierten Zellen detektieren.

### 3.2.2 Identifizierung vitaler Zellen im Lymphozytengate



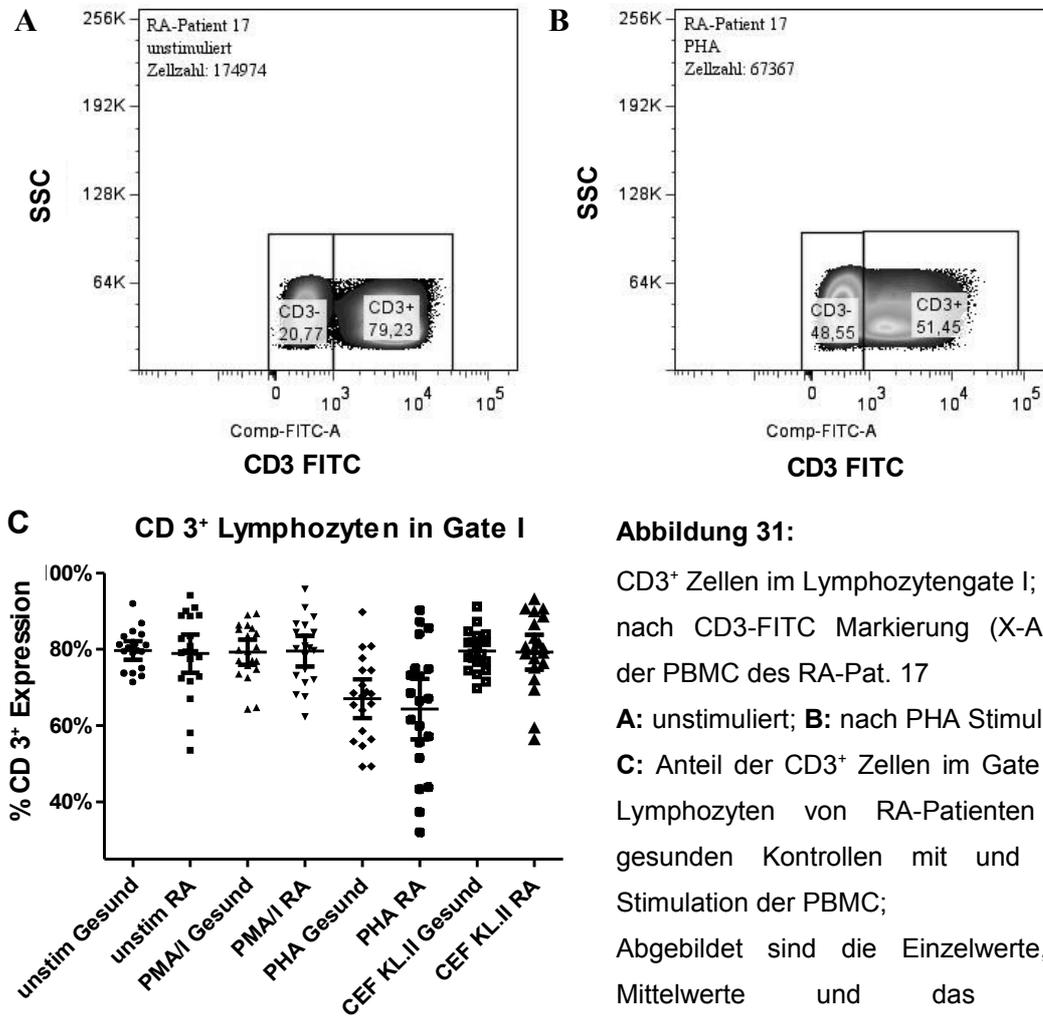
Um nur vitale Zellen in die Analyse einzuschließen wurden die toten Zellen, wie bereits beschrieben (Kap. 2.13.7), mit Hilfe der EMA-Färbung identifiziert und von der weiteren Analyse durch elektronisches Gating ausgeschlossen. Es konnten keinerlei Unterschiede zwischen gesunden Probanden und RA-Patienten bezüglich der Vitalität der Zellen festgestellt werden (Abb. 30).

Die Stimulation mit PMA/Ionomycin und mit PHA führte zu einer signifikant geringeren Rate an lebenden Zellen ( $p < 0,01$ ) verglichen mit den unstimulierten Zellen. Nach Stimulation mit den HLA Klasse II Peptiden zeigten sich hingegen keine Unterschiede bezüglich der Vitalität der Zellen.

### 3.2.3 CD3<sup>+</sup> Lymphozyten im Gate I

Der CD3 Komplex ist Teil des funktionellen T-Zell-Rezeptors. Während der T-Zell-Rezeptor für die Erkennung von MHC-Peptid Komplexen zuständig ist,

übernimmt der CD3-Komplex die Aufgabe der Signaltransduktion nach Ligandenbindung.

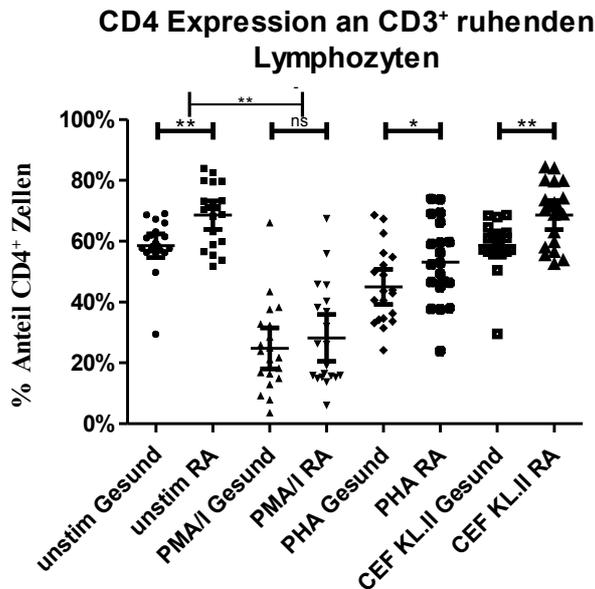


**Abbildung 31:** CD3<sup>+</sup> Zellen im Lymphozytengate I; nach CD3-FITC Markierung (X-Achse) der PBMC des RA-Pat. 17  
**A:** unstimuliert; **B:** nach PHA Stimulation; **C:** Anteil der CD3<sup>+</sup> Zellen im Gate I der Lymphozyten von RA-Patienten und gesunden Kontrollen mit und ohne Stimulation der PBMC; Abgebildet sind die Einzelwerte, die Mittelwerte und das 95%-Konfidenzintervall

RA-Patienten und Gesunde unterschieden sich nicht signifikant in der Frequenz der CD3<sup>+</sup> Lymphozyten im Gate I voneinander (Abb. 31 C). Nach Stimulation mit PHA nahm der prozentuale Anteil der CD3<sup>+</sup> Lymphozyten im Gate I in beiden Gruppen signifikant ( $p < 0,001$ ) durch Herabregulierung von CD3 an der Oberfläche ab (Abb. 31 A+B).

### 3.2.3.1 CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> Lymphozyten im Gate I

CD4 und CD8 sind Ko-Rezeptoren der T-Zellen. Während CD4 an MHC Klasse II bindet, ist CD8 ein MHC Klasse I Ligand. Ein geringer Anteil der T-Zellen im Blut exprimiert auch beide Oberflächenproteine oder keines von beiden.<sup>(81),(86)</sup>



**Abbildung 32:** Anteil der CD4<sup>+</sup> Zellen an den CD3<sup>+</sup> Lymphozyten im Gate I, Abgebildet sind die Einzelwerte, das 95%-Konfidenzintervall und die Mittelwerte (ns= nicht signifikant; \* p< 0,05; \*\* p<0,01)

Der Anteil der CD4<sup>+</sup> Zellen an CD3<sup>+</sup> Lymphozyten im Gate I war bei RA-Patienten signifikant höher als bei Gesunden (Abb. 32).

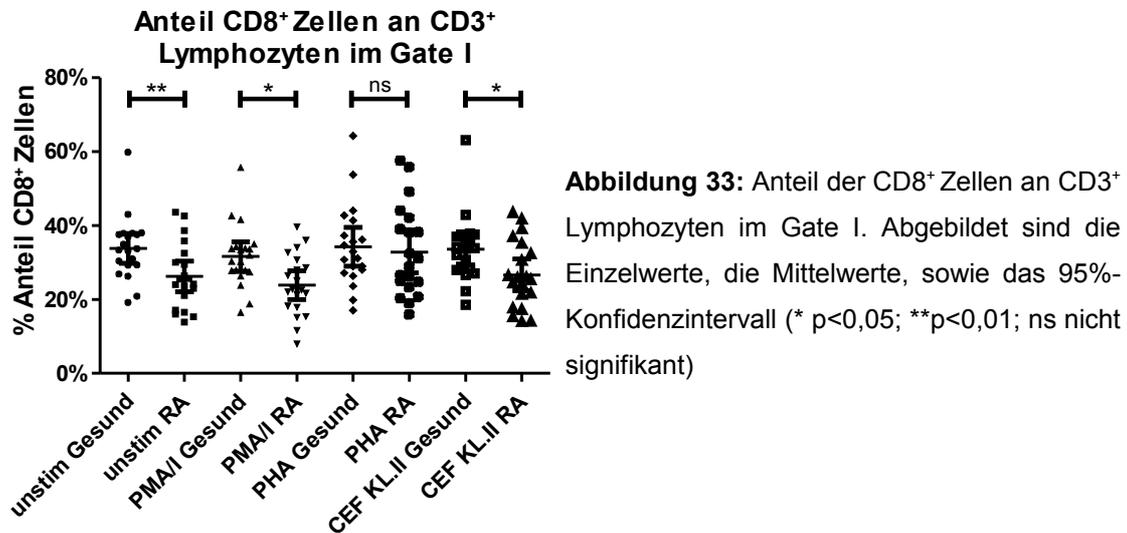
Nach Stimulation mit PMA/Ionomycin und PHA (Kap.2.13.9.2) ließ sich eine Herabregulierung von CD4 an der Oberfläche der Lymphozyten beider Gruppen beobachten. Nach PMA/Ionomycin Stimulation war kaum ein Unterschied mehr zwischen Gesunden und RA-Patienten feststellbar.

### 3.2.3.2 CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Lymphozyten im Gate I

Gesunde zeigten verglichen mit RA-Patienten einen signifikant größeren Anteil an CD8<sup>+</sup> Lymphozyten im Gate I (Abb. 33).

RA-Patienten und Gesunde wiesen nach PHA Stimulation einen signifikant

höheren Anteil ( $p < 0,05$ )  $CD8^+$  Lymphozyten im Gate I als unstimulierte Zellen auf und unterschieden sich nicht mehr signifikant voneinander.

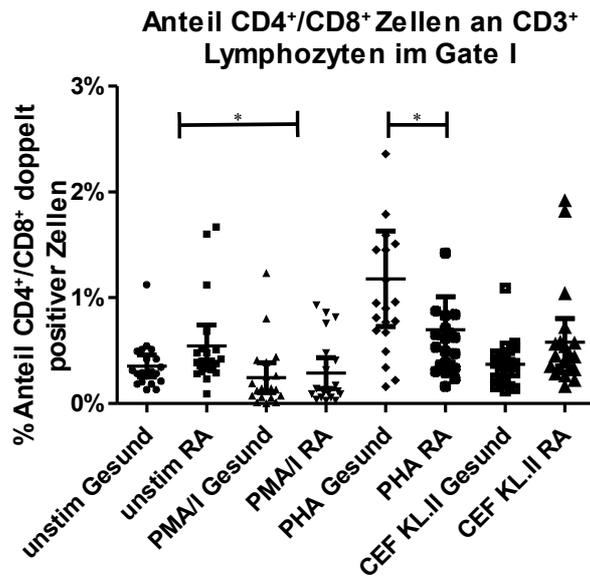


### 3.2.3.3 $CD3^+/CD4^+/CD8^+$ doppelt positive Lymphozyten im Gate I

Die Frequenz der  $CD4^+/CD8^+$  doppelt positiven  $CD3^+$  Lymphozyten im Gate I unterschied sich nicht signifikant bei gesunden Probanden und RA-Patienten. Dennoch zeigten PBMC der RA-Patienten unstimuliert, wie auch nach Stimulation mit PMA/Ionomycin und HLA KI.II Peptiden einen tendenziell höheren Anteil als Gesunde (Abb. 34).

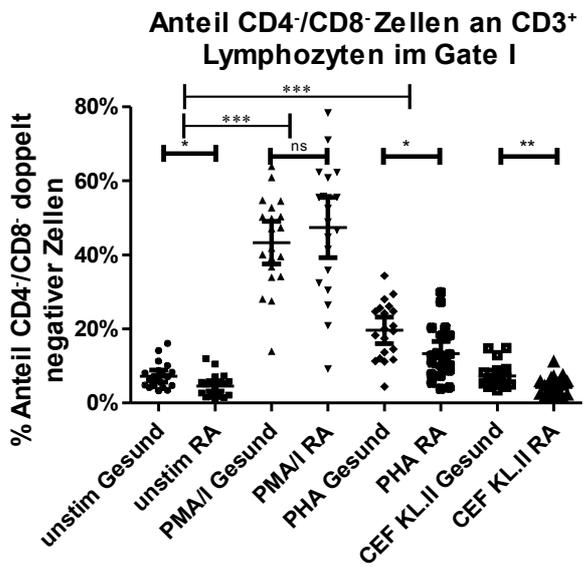
Ingesamt führte die Stimulation mit PMA/Ionomycin im Vergleich zu den unstimulierten Zellen zu einem signifikanten Abfall, dieser doppelt positiven Zellen ( $p < 0,05$ ).

Im Gegensatz dazu erhöhte die Stimulation mit PHA in beiden Gruppden Anteil doppelt positiver Zellen im Vergleich zu den unstimulierten Zellen, wobei sich die Gesunden signifikant ( $p < 0,05$ ) von den RA-Patitenten unterschieden.



**Abbildung 34:** Frequenz der CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> doppelt positiven Zellen an CD3<sup>+</sup> Lymphozyten im Gate I; abgebildet sind die Einzelwerte, die Mittelwerte, sowie das 95%-Konfidenzintervall (\* p<0,05; \*\*p<0,01; ns nicht signifikant)

### 3.2.3.4 CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup> doppelt negative Lymphozyten im Gate I



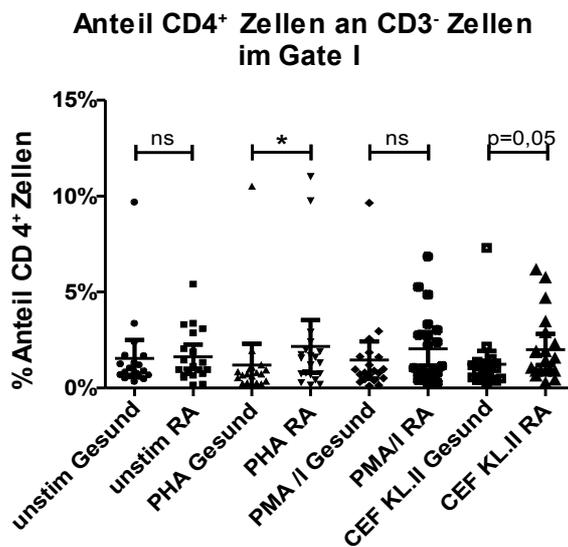
**Abbildung 35:** Anteil der CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup> doppelt negativen Zellen an den CD3<sup>+</sup> Lymphozyten im Gate I; abgebildet sind die Einzelwerte, die Mittelwerte, sowie das 95%-Konfidenzintervall (\* p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\* p<0,0001; ns nicht signifikant)

Der Anteil der CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup> doppelt negativen Zellen an den CD3<sup>+</sup> Lymphozyten im Gate I war bei Gesunden signifikant größer als bei RA-Patienten (Abb. 35). Nach Stimulation mit PHA oder PMA/Ionomycin stieg die Frequenz der doppelt

negativen Zellen verglichen mit den unstimulierten PBMC signifikant ( $p < 0,0001$ ) an. Dies scheint mit der Herabregulierung von CD4 durch PHA oder PMA/Ionomycin in Zusammenhang zu stehen (Kap. 2.13.9.2. und 3.2.3.1.)

### 3.2.4 CD3<sup>-</sup> Zellen im Gate I

#### 3.2.4.1 CD3<sup>-</sup>/CD4<sup>+</sup> Zellen im Gate I

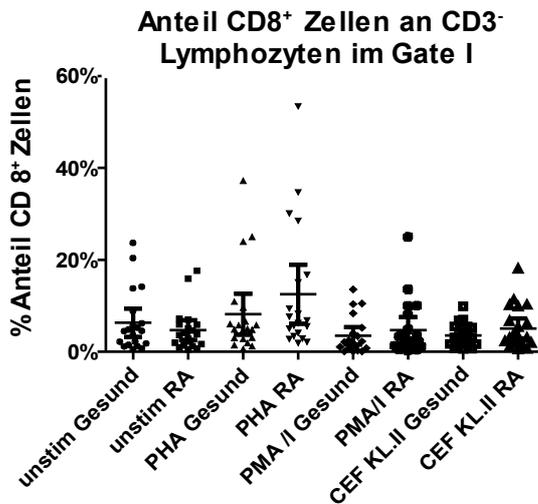


**Abbildung 36:** Anteil der CD4<sup>+</sup>-Zellen an CD3<sup>-</sup> Zellen im Gate I; Abgebildet sind die Einzelwerte, das 95%-Konfidenzintervall und die Mittelwerte; (\*  $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; ns nicht signifikant)

Der Anteil der CD4<sup>+</sup>-Zellen an den CD3<sup>-</sup> Zellen im Gate I war bei RA-Patienten, größer als bei Gesunden (Abb.36). Signifikant war der Unterschied jedoch nur nach PHA Stimulation.

Die Stimulationen mit PMA/Ionomycin und PHA führte, im Gegensatz zur Beobachtung an der CD3<sup>+</sup> Population, zu keiner Herabregulierung von CD4.

### 3.2.4.2 CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Zellen im Gate I



**Abbildung 37:** Anteil der CD8<sup>+</sup> Zellen an den CD3<sup>+</sup> Zellen im Gate I; Abgebildet sind die Einzelwerte, das 95%-Konfidenzintervall und die Mittelwerte

Die Anteile der CD8<sup>+</sup> Zellen an den CD3<sup>+</sup> Zellen zeigten keine Unterschiede zwischen Gesunden und RA-Patienten (Abb. 37). Auch zeigten sich keine signifikanten Unterschiede nach den unterschiedlichen Stimulationen, wenn gleich die Stimulation mit PHA zu einer etwas vermehrten CD8 Expression führte.

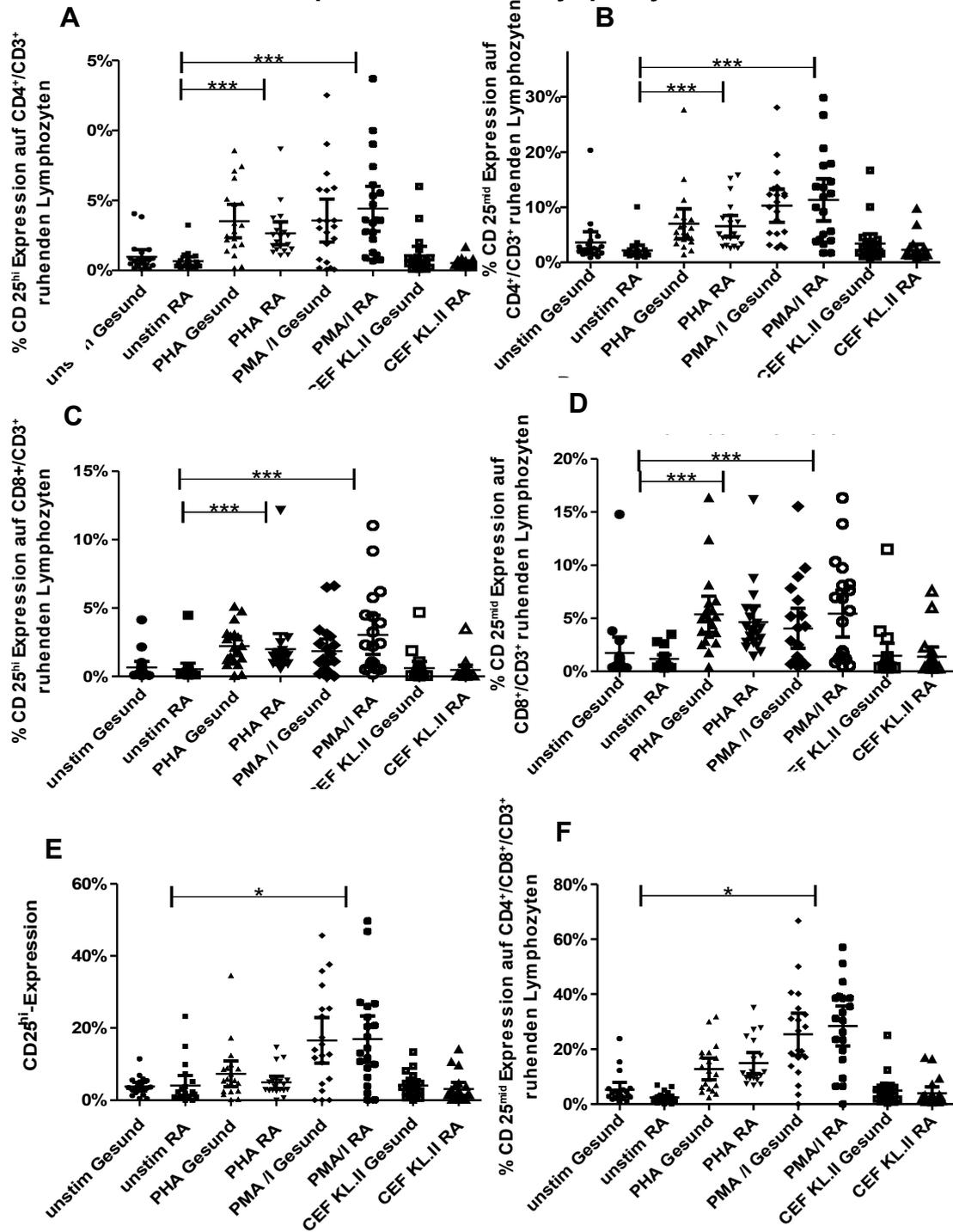
Eine CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Zellpopulation im Gate I konnte nicht identifiziert werden.

### 3.2.5 CD25<sup>+</sup> Lymphozyten im Gate I

CD25 bezeichnet die  $\alpha$ -Kette des IL-2 Rezeptors. CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>hi</sup> Zellen sollen eine regulatorische Funktion (Treg) besitzen, weshalb ihrem Vorkommen bei Autoimmunerkrankungen ein besonderes Interesse gilt. CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>/CD25<sup>hi</sup> Zellen hingegen werden auf Grund ihrer Eigenschaften als Suppressor-T-Zellen bezeichnet.

Die Anzahl der CD25<sup>hi</sup> und der CD25<sup>mid</sup> Zellen innerhalb der CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> Lymphozyten unterschied sich nicht signifikant bei Gesunden und RA-Patienten. Nach Stimulation mit PHA und PMA/Ionomycin war der Anteil der CD25<sup>+</sup> Zellen an CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> Lymphozyten im Gate I im Vergleich zu den unstimulierten Zellen in beiden Gruppen signifikant erhöht ( $p < 0,001$ ).

### CD 25 Expression der CD3<sup>+</sup> Lymphozyten im Gate I



**Abbildung 38:** Expression von CD25<sup>hi</sup> (links) und CD25<sup>mid</sup> (rechts) auf CD3<sup>+</sup> Lymphozyten im Gate I **A:** CD25<sup>hi</sup> auf CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> Zellen; **B:** CD25<sup>mid</sup> auf CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> Zellen; **C:** CD25<sup>hi</sup> auf CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Zellen; **D:** CD25<sup>mid</sup> auf CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Zellen; **E:** CD25<sup>hi</sup> auf CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Zellen; **F:** CD25<sup>mid</sup> auf CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Zellen; Abgebildet sind die Einzelwerte, die Mittelwerte, sowie das 95%-Konfidenzintervall (\* p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\* p<0,001)

Ebenso verhielt sich die CD25 Expression auf den CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Lymphozyten im Gate I, wenn auch bei geringeren Frequenzen (Abb. 38 C+D).

Die doppelt positiven (CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>) Lymphozyten im Gate I von Gesunden und RA-Patienten unterschieden sich bezüglich der CD25 Expression ebenfalls nicht voneinander (Abb. 38 E+F). Verglichen mit den CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> und CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Lymphozyten im Gate I zeigten sie allerdings deutlich höhere Anteile an CD25<sup>+</sup> Zellen. Nach PMA/Ionomycin Stimulation fanden sich bei den doppelt positiven (CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>) Zellen signifikant höhere Anteile an CD25<sup>+</sup> Zellen als bei den unstimulierten Zellen.

### **3.2.6 CD56<sup>+</sup> Zellen im Gate I**

CD56, N-CAM, ist ein Zelladhäsionsmoleküle, das von NK-Zellen (CD3<sup>-</sup>) und NK-T-Zellen (CD3<sup>+</sup>) exprimiert wird. Spezifische Subpopulationen von NK-Zellen<sup>(9)</sup> und NK-T-Zellen<sup>(112),(49),(67)</sup> können zusätzlich CD4 bzw. CD8 exprimieren.

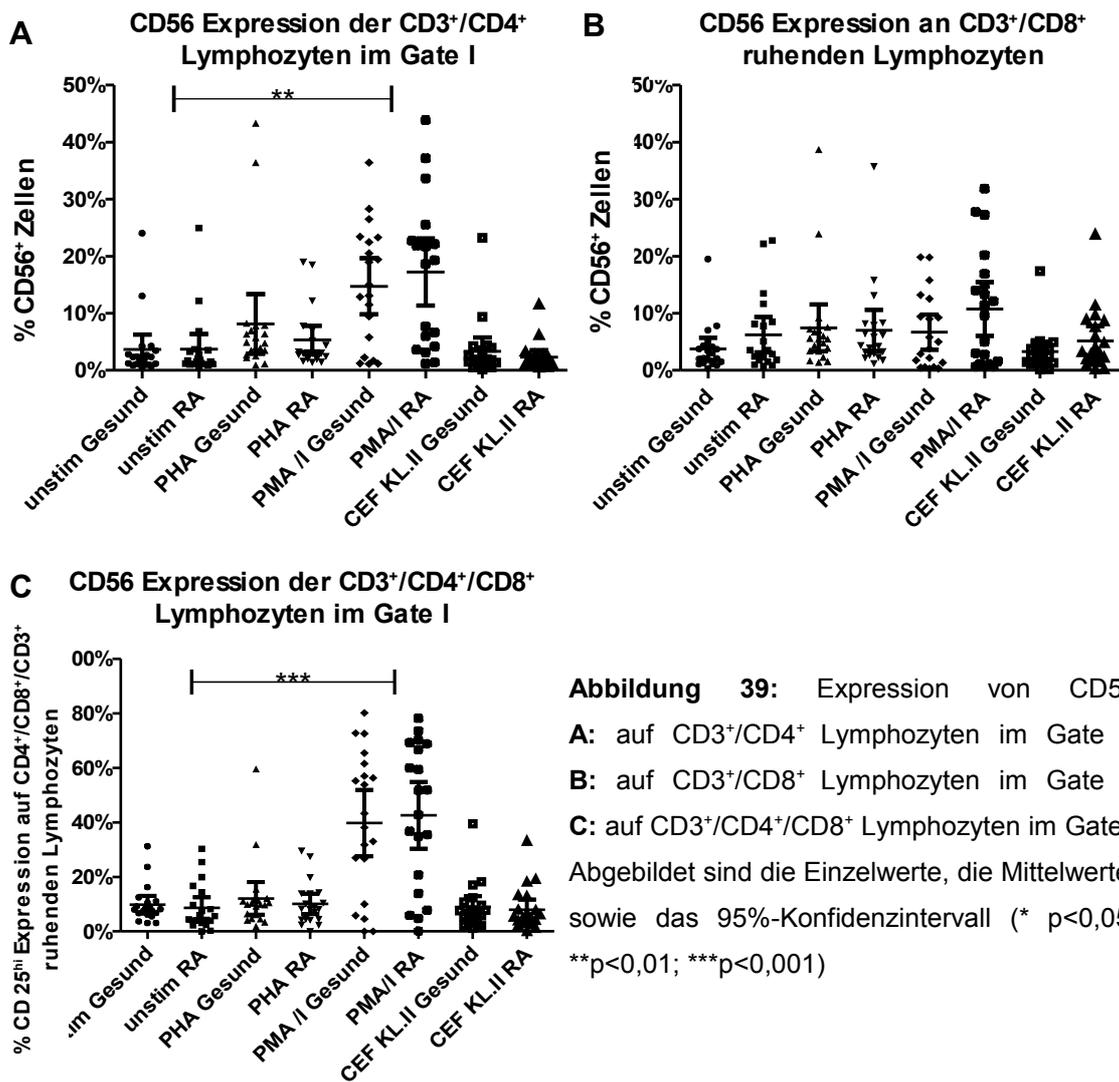
#### **3.2.6.1 CD3<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup> NK-T-Zellen im Gate I**

Gesunden und RA-Patienten unterschieden sich in allen Proben nicht in der CD56 Expression der CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> Lymphozyten (Abb. 39A). Nach Stimulation mit PHA oder PMA/Ionomycin kam es in beiden Gruppen verglichen mit den unstimulierten Zellen zu einem signifikanten Anstieg CD56<sup>+</sup> NK-T-Zellen ( $p < 0,01$ ). Auffällig war, dass einige Testpersonen, Gesunde und Patienten, besonders hohe CD56-Frequenzen aufwiesen.

In der CD56 Expression der CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Lymphozyten im Gate I zeigten sich ebenfalls keine Unterschiede zwischen RA-Patienten und Gesunden (Abb. 39B). Nur nach PMA/Ionomycin Stimulation wiesen RA-Patienten vermehrt CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup> NK-T-Zellen auf.

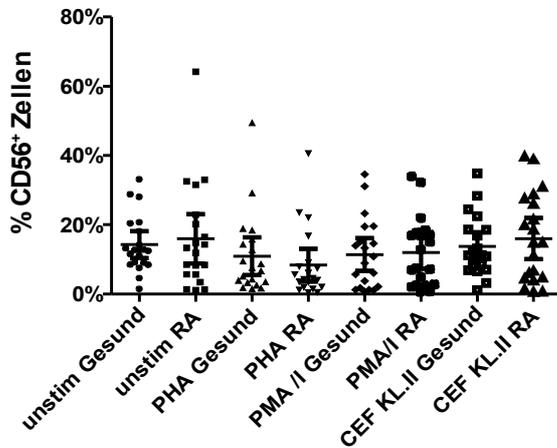
Auch die doppelt positiven CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Lymphozyten im Gate I zeigten keinen unterschiedliche CD56 Expression von RA-Patienten und Gesunden

(Abb. 39C). Ein zu den unstimulierten Zellen höchst signifikanter ( $p < 0,001$ ) Anstieg der CD56 Expression fand sich in beiden Gruppen nach PMA/Ionomycin Stimulation. Im Vergleich zu den  $CD3^+/CD4^+$  und den  $CD3^+/CD8^+$  Lymphozyten im Gate I zeigten die doppelt positiven  $CD3^+/CD4^+/CD8^+$  Lymphozyten im Gate I einen deutlich höheren Anteil an  $CD56^+$  NK-T-Zellen.



### 3.2.6.2 CD3<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup> NK-Zellen im Gate I

CD56 Expression der CD3<sup>+</sup> Zellen im Gate I

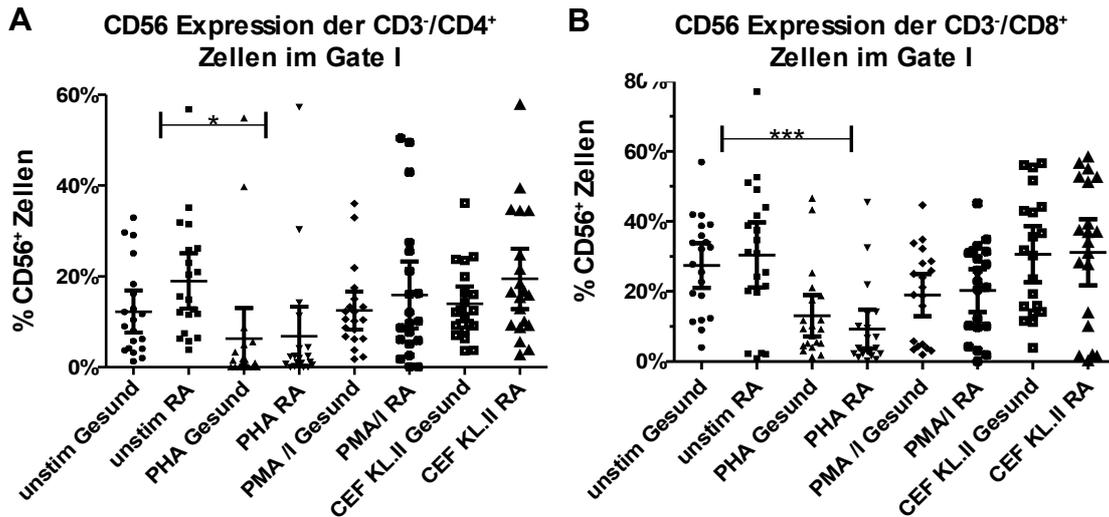


**Abbildung 40:** CD56 Expression der CD3<sup>+</sup> Lymphozyten im Gate I. Abgebildet sind die Einzelwerte, das 95%-Konfidenzintervall und die Mittelwerte

Mit den CD3<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup> Zellen im Gate I wurden vor allem NK-Zellen erfasst. Gesunde und RA-Patienten unterschieden sich nicht im Anteil der NK-Zellen an den CD3<sup>+</sup> Zellen. Nach Stimulation mit PMA/Ionomycin oder mit PHA nahm der Anteil der NK-Zellen verglichen mit den unstimulierten Lymphozyten ab (Abb. 40).

Die CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> Zellen im Gate I der RA-Patienten exprimierten deutlich mehr CD56 als die Gesunden (Abb. 41A). Nach Stimulation mit PHA nahm die CD56 Expression im Vergleich zu den unstimulierten Zellen signifikant ( $p < 0,05$ ) ab, wonach sich Gesunde und RA-Patienten nicht mehr unterschieden.

Zwischen Gesunden und RA-Patienten war kein deutlicher Unterschied in der CD56 Expression auf den CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Lymphozyten im Gate I zu beobachten (Abb. 41B). Die Stimulation mit PHA ( $p < 0,001$ ) und mit PMA/Ionomycin (ns) führte zu einer deutlichen Abnahme der CD56<sup>+</sup> NK-Zellen in der CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Lymphozytenpopulation verglichen mit den unstimulierten Zellen.



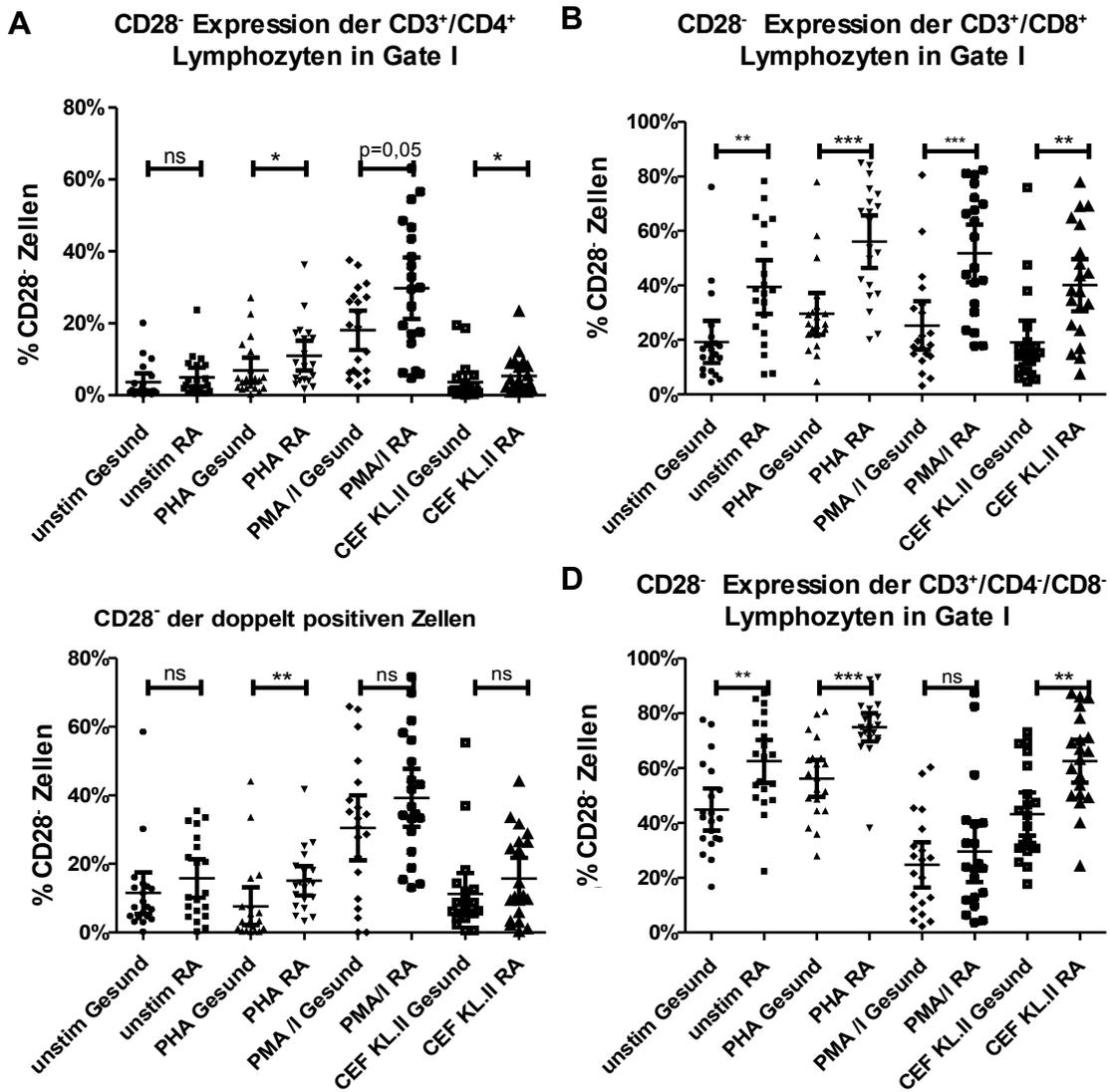
**Abbildung 41:** Anteil der NK-Zellen an **A:** CD4<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup> Zellen im Gate I; **B:** CD8<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup> Zellen im Gate I; Abgebildet sind die Einzelwerte, das 95%-Konfidenzintervall und die Mittelwerte (\* p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001)

### 3.2.7 CD28<sup>+</sup> Lymphozyten im Gate I

CD28 wird als kostimulatorischer Rezeptor auf den meisten CD4<sup>+</sup> T-Zellen exprimiert und ist durch Bindung mit CD80 bzw. CD86 auf den antigenpräsentierenden-Zellen in die T-Zell-Aktivierung involviert.

Die Expression von CD28 auf CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> Lymphozyten im Gate I war bei stimulierten PBMC von RA-Patienten signifikant geringer als bei der gesunden Vergleichsgruppe (Abb. 42A). Die Stimulation mit PHA und PMA/Ionomycin führte zu einer zusätzlichen höchst signifikanten (p< 0,0001) Zunahme von CD28<sup>-</sup> Zellen verglichen mit den unstimulierten Zellen.

Die CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Lymphozyten der RA-Patienten wiesen unabhängig von der getesteten Stimulation signifikant mehr CD28<sup>-</sup> Zellen als die Gesunden auf (Abb. 42B). Ebenso nahm die Frequenz der CD28<sup>-</sup> Zellen nach Stimulation mit PHA und PMA/Ionomycin verglichen mit den unstimulierten PBMC signifikant (p< 0,01) zu.



**Abbildung 42:** Anteil der CD28<sup>-</sup> Zellen **A:** an CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> Lymphozyten im Gate I; **B:** an CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Lymphozyten im Gate I; **C:** an CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Lymphozyten im Gate I; **D:** an CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup> Lymphozyten im Gate I; Abgebildet sind die Einzelwerte, die Mittelwerte, sowie das 95%-Konfidenzintervall (ns- nicht signifikant; \*-p<0,05; \*\*-p<0,01; \*\*\*-p<0,001; \*\*\*\*-p<0,0001)

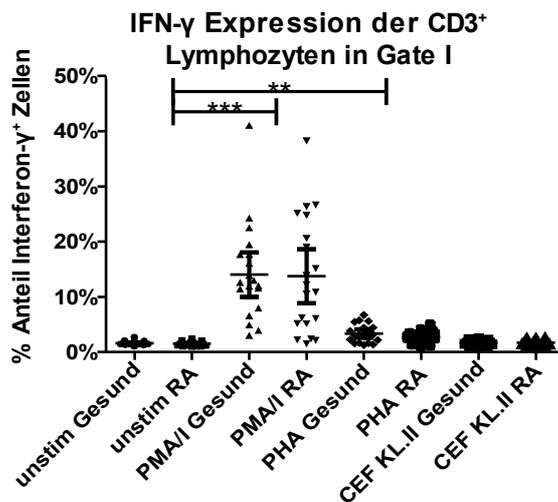
Auch bei den doppelt positiven CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Lymphozyten im Gate I zeigten RA-Patienten verglichen mit den Gesunden einen erhöhten Anteil an CD28<sup>-</sup> Zellen (Abb. 42C), der sich allerdings nur nach PHA Stimulation als signifikant erhöht zeigte. Es waren nur nach PMA/Ionomycin Stimulation, nicht nach PHA Stimulation, signifikant (p<0,001) mehr CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Zellen CD28 negativ

als ohne Stimulation.

Die doppelt negativen CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup> Lymphozyten zeigten bei RA-Patienten einen signifikant höheren Anteil an CD28<sup>-</sup> Zellen (Abb. 42D). Nach Stimulation mit PMA/Ionomycin fiel auf, dass im Gegensatz zu den CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> und CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Lymphozytenpopulationen, die doppelt negativen CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup> Lymphozyten einen signifikant geringeren Anteil CD28<sup>-</sup> Zellen enthielten als nach den anderen Stimulationen. Dies ist wahrscheinlich durch die Herabregulierung von CD4 durch die PMA/Ionomycin Stimulation zu erklären.

### 3.2.8 Vorkommen IFN-γ<sup>+</sup> Zellen in verschiedenen Zellpopulationen

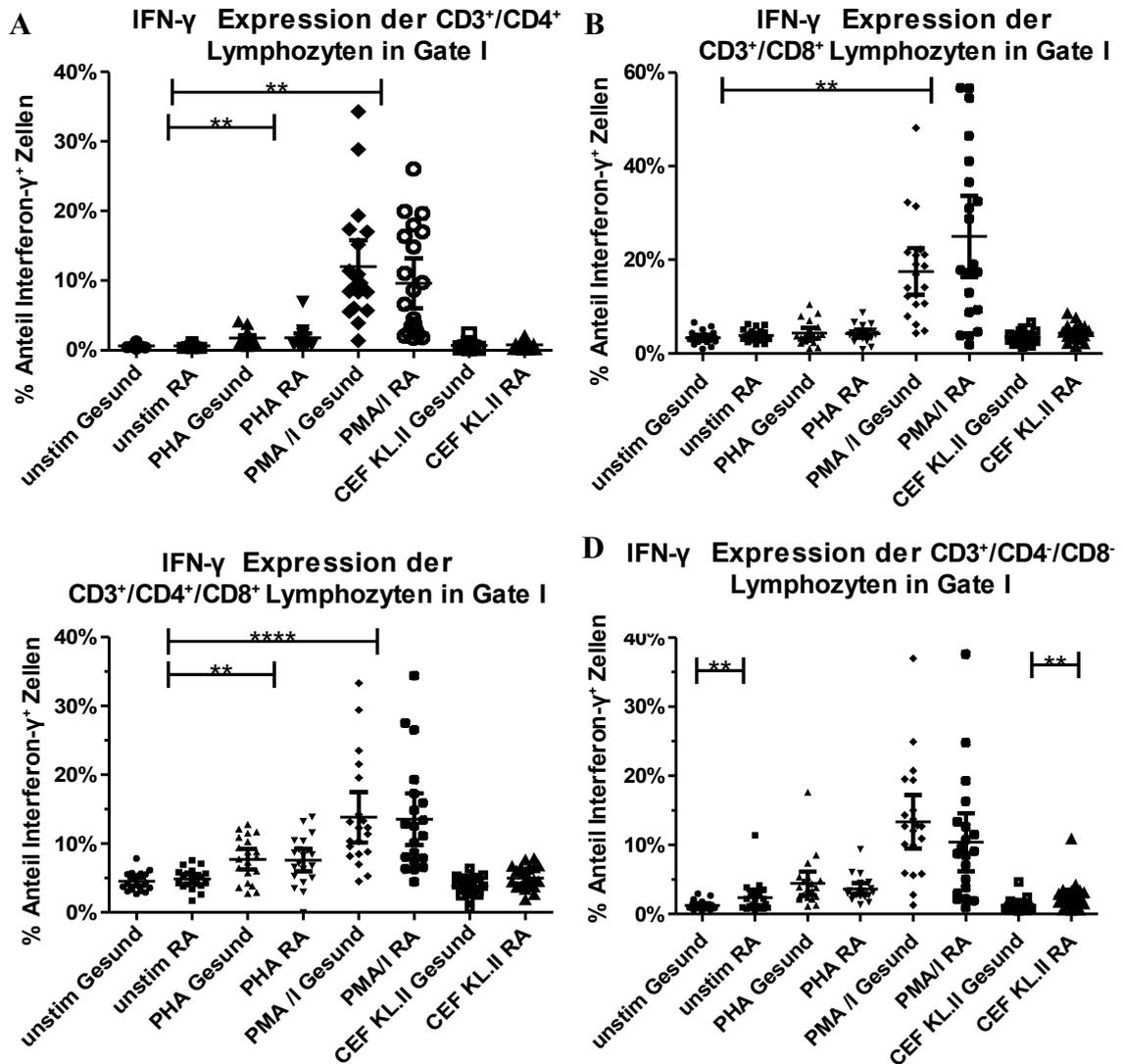
#### 3.2.8.1 IFN-γ<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup>-Lymphozyten im Gate I



**Abbildung 43:** Anteil Interferon-γ<sup>+</sup> Zellen an CD3<sup>+</sup> Lymphozyten im Gate I; Abgebildet sind die Einzelwerte, das 95%-Konfidenzintervall und die Mittelwerte (\*-p<0,05; \*\*-p<0,01; \*\*\*-p<0,001)

Der Anteil der IFN-γ produzierenden Zellen an den CD3<sup>+</sup> Lymphozyten im Gate I unterschied sich bei Gesunden und RA-Patienten kaum. Gesunde hatten jedoch einen geringfügig höheren Anteil IFN-γ produzierender CD3<sup>+</sup> Zellen (Abb.43). Nach Stimulation mit PHA (p<0,01) und PMA/Ionomycin (p<0,001) nahm bei den gesunden Kontrollen sowie bei den RA-Patienten der Anteil der

IFN- $\gamma$  positiven CD3<sup>+</sup> höchst signifikant gegenüber den unstimulierten Zellen zu.



**Abbildung 44:** Anteil der Interferon- $\gamma$  sezernierenden Zellen; **A:** an CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> Lymphozyten im Gate I; **B:** an CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Lymphozyten im Gate I; **C:** an CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Lymphozyten im Gate I; **D:** an CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup> Lymphozyten im Gate I; Abgebildet sind die Einzelwerte, das 95%-Konfidenzintervall und die Mittelwerte (\*- $p < 0,05$ ; \*\*- $p < 0,01$ ; \*\*\*- $p < 0,001$ ; \*\*\*\*- $p < 0,0001$ )

Gesunde Probanden und RA-Patienten unterschieden sich kaum in der IFN- $\gamma$  Expression der unstimulierten CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> Lymphozyten. Nach Stimulation mit PHA und PMA/Ionomycin zeigte sich eine höchst signifikante ( $p < 0,001$ )

Zunahme des Anteils IFN- $\gamma$  exprimierender Zellen bei Gesunden und Patienten gegenüber den unstimulierten (Abb. 44A). Nach PMA/Ionomycin Stimulation ließ sich bei Gesunden verglichen mit den RA-Patienten ein größerer Anteil IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> produzierender CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> Zellen beobachten.

Im Gegensatz dazu zeigten die CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Lymphozyten von RA-Patienten unabhängig von der Stimulation einen höheren Anteil an IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen als die Gesunden (Abb. 44B). Zu einer höchst signifikanten ( $p < 0,001$ ) Zunahme des Anteils IFN- $\gamma$  sezernierender CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Zellen kam es nach Stimulation mit PMA/Ionomycin in beiden Gruppen.

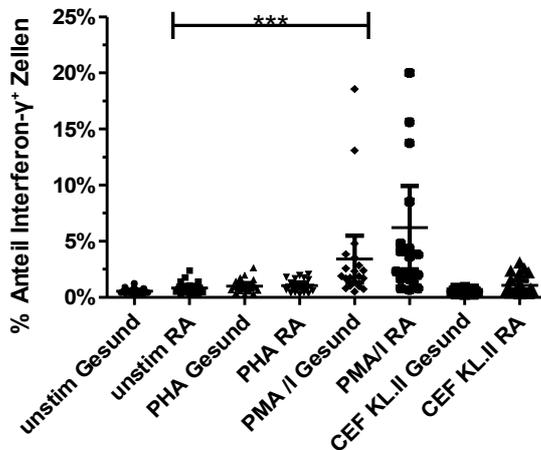
Im Anteil IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> produzierender CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Zellen unterschieden sich Gesunden kaum von RA-Patienten (Abb. 44C). In beiden Gruppen zeigte sich ein hoch signifikant höherer Anteil IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Zellen nach Stimulation mit PHA ( $p < 0,01$ ) und mit PMA/Ionomycin ( $p < 0,0001$ ) verglichen mit den unstimulierten PBMCs.

RA-Patienten hatten unstimuliert und nach Stimulation mit HLA KI.II Peptiden ( $p < 0,01$ ) einen höheren Anteil IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup> PBMC verglichen mit Gesunden (Abb. 44D). Im Gegensatz dazu wiesen Gesunde nach Stimulation mit PHA und PMA/Ionomycin einen größeren Anteil IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup> Zellen als RA-Patienten auf.

### **3.2.8.2 IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD3<sup>-</sup>-Zellen im Gate I**

Die Anteile IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen an den CD3<sup>-</sup> Zellen waren bei RA-Patienten höher als bei Gesunden (Abb. 45). Nach Stimulation mit PMA/Ionomycin zeigten sich in beiden Gruppen höchst signifikant ( $p < 0,001$ ) höhere Frequenzen IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen verglichen mit unstimulierten Zellen.

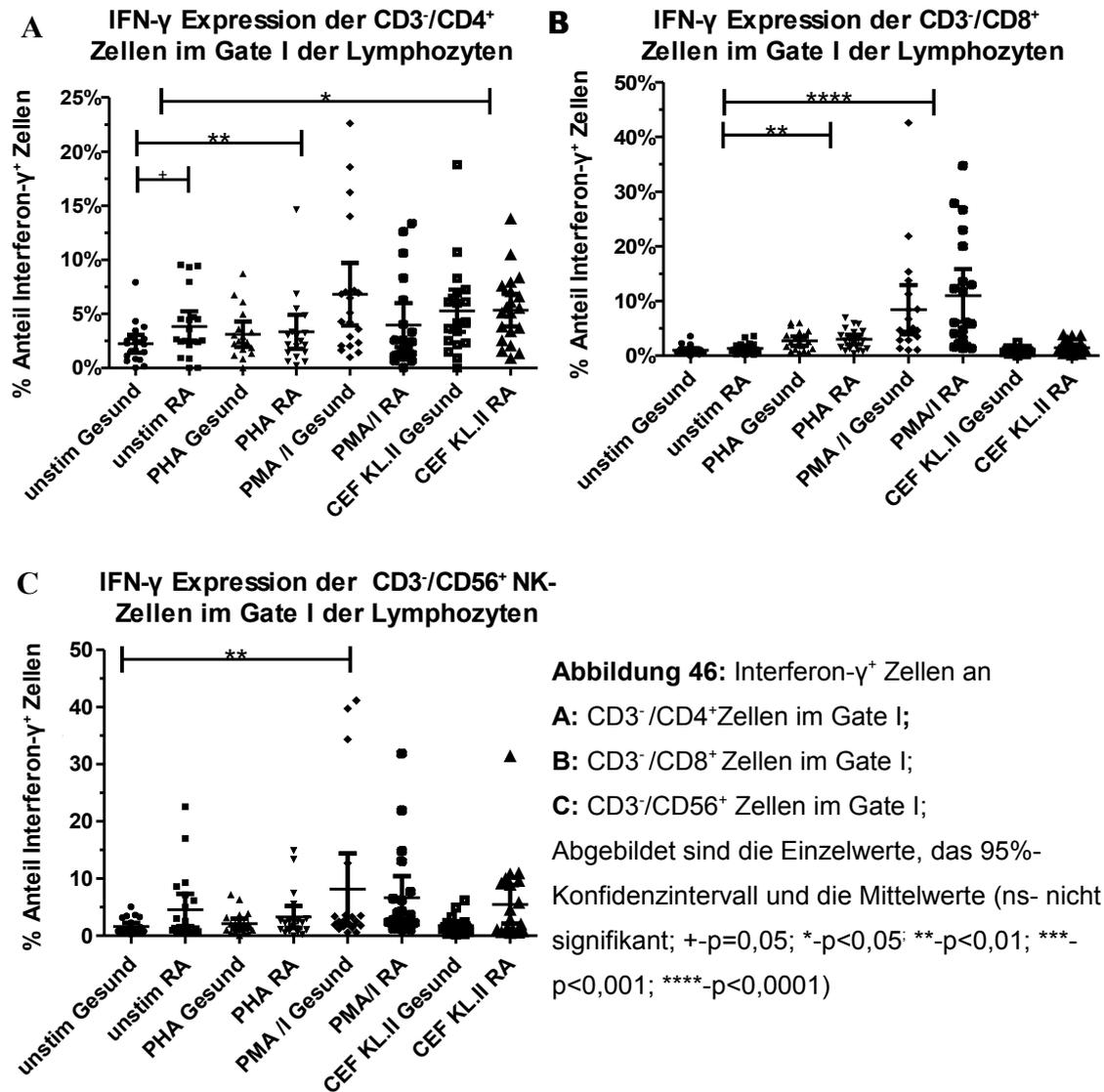
### IFN- $\gamma$ Expression der CD3<sup>+</sup> Zellen im Gate I der Lymphozyten



**Abbildung 45:** Interferon- $\gamma$  produzierende CD3<sup>+</sup> Zellen im Gate I der Lymphozyten; Abgebildet sind die Einzelwerte, das 95%-Konfidenzintervall und die Mittelwerte (\*- $p < 0,05$ ; \*\*- $p < 0,01$ ; \*\*\*- $p < 0,001$ )

Der Anteil IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen an CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> Zellen war unstimuliert bei RA-Patienten deutlich höher ( $p = 0,05$ ) als bei Gesunden (Abb. 46A). Hingegen führte die Stimulation mit PMA/Ionomycin im Vergleich zu den unstimulierten Zellen nur bei den Gesunden zu einer signifikant höheren ( $p < 0,01$ ) Frequenz IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen. Nach Stimulation mit HLA KI.II Peptiden war bei beiden Gruppen der Anteil IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen signifikant ( $p < 0,05$ ) höher als bei den unstimulierten Zellen. RA-Patienten zeigten nach allen Stimulationen einen deutlich höheren Anteil IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Zellen als Gesunde (Abb. 48B). Auch im Vergleich zu den unstimulierten Zellen waren die prozentualen Anteile der IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen an den CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Zellen nach Stimulation mit PHA ( $p < 0,01$ ) und PMA/Ionomycin ( $p < 0,0001$ ) in beiden Gruppen signifikant höher.

Der Anteil IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD3<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup> NK-Zellen war bei RA-Patienten in der unstimulierten Lymphozytenpopulation, sowie nach Stimulation mit PHA und HLA KI.II Peptiden höher als bei Gesunden (Abb. 46C). Die Stimulation mit PMA/Ionomycin führte zu deutlich, bei den Gesunden sogar signifikant ( $p < 0,01$ ), höheren Frequenzen IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen verglichen mit den unstimulierten Zellen und es ließ sich kein Unterschied mehr zwischen RA-Patienten und Gesunden feststellen.

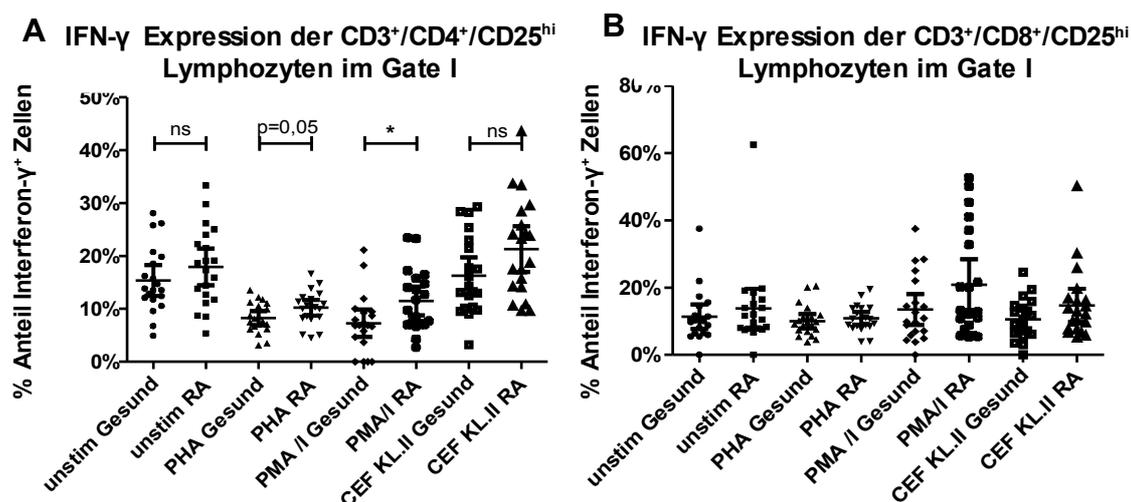


### 3.2.8.3 IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>-Lymphozyten im Gate I

Deutlich höhere Werte für IFN- $\gamma$  produzierende CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>hi</sup> Lymphozyten zeigten sich bei RA-Patienten verglichen mit Gesunden in allen Analysen. Statistisch signifikant waren die Unterschiede allerdings nur nach Stimulation mit PHA und PMA/Ionomycin (Abb. 47A). Im Vergleich zu den unstimulierten Zellen war dabei nach Stimulation mit PMA/Ionomycin und PHA in beiden Testgruppen ein signifikantes Absinken der IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen in den

CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>hi</sup> Lymphozyten zu beobachten.

CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>/CD25<sup>hi</sup> Suppressor-T-Zellen von RA-Patienten wiesen nach allen Stimulationen höhere IFN-γ<sup>+</sup> Anteile als die gesunden Probanden auf (Abb. 47B). Zwischen den unterschiedlichen Stimulationen zeigten sich kaum Unterschiede.



**Abbildung 47:** Anteile Interferon-γ produzierender Zellen innerhalb

**A:** der CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>hi</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen im Gate I

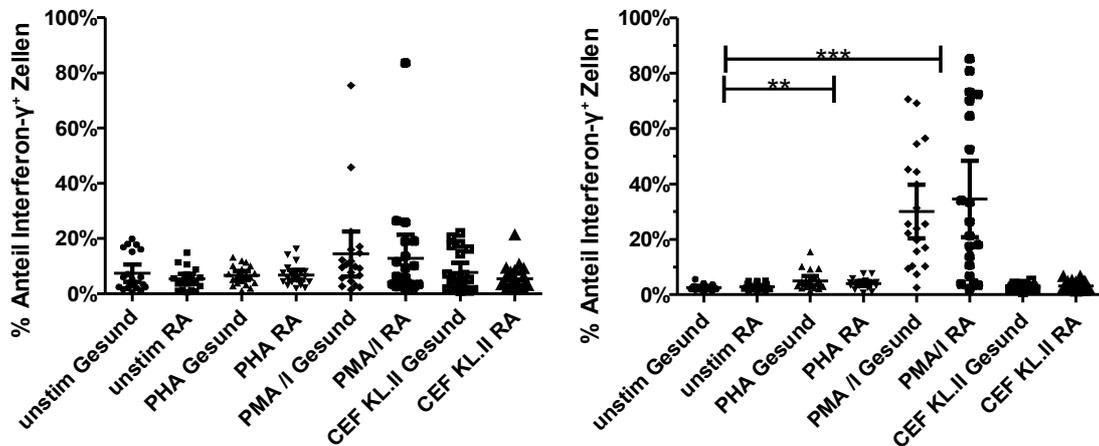
**B:** der CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>/CD25<sup>hi</sup>-Suppressor-T-Zellen im Gate I;

abgebildet sind die Einzelwerte, die Mittelwerte sowie das 95%-Konfidenzintervall; (ns- nicht signifikant; \* $p < 0,05$ )

### 3.2.8.4 IFN-γ<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup>-Lymphozyten im Gate I

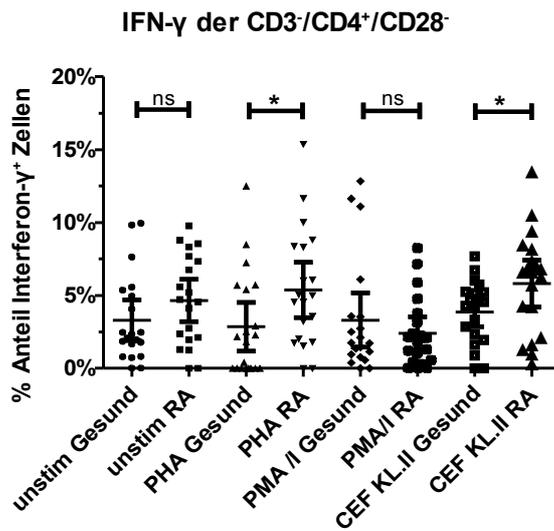
Bezüglich der Anteile IFN-γ<sup>+</sup> Zellen an CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD28<sup>-</sup> Lymphozyten zeigten sich unabhängig von der Stimulationen keine Unterschiede zwischen Gesunden und RA-Patienten (Abb. 48A). Nur die PMA/Ionomycin Stimulation führte in beiden Gruppen zu deutlich höheren Frequenzen IFN-γ<sup>+</sup> Zellen verglichen mit den unstimulierten. Im Vergleich zu den CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> Zellen zeigten die CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD28<sup>-</sup> Lymphozyten höhere Anteile IFN-γ<sup>+</sup> Zellen.

**A** IFN- $\gamma$  Expression der CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD28<sup>neg</sup> Lymphozyten im Gate I **B** IFN- $\gamma$  Expression der CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>/CD28<sup>neg</sup> Lymphozyten im Gate I



**Abbildung 48:** Interferon- $\gamma$  sezernierende Zellen; **A:** innerhalb der CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD28<sup>-</sup> Lymphozyten im Gate I; **B:** innerhalb der CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>/CD28<sup>-</sup> Lymphozyten im Gate I; dargestellt sind die Einzelwerte, die Mittelwerte sowie das 95%-Konfidenzintervall; (ns- nicht signifikant; \* - p<0,05; \*\*-p<0,01; \*\*\*-p<0,001)

IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>/CD28<sup>-</sup> Zellen waren sowohl bei RA-Patienten als auch bei Gesunden nach Stimulation mit PHA (p<0,01) oder PMA/Ionomycin (p<0,001) sehr signifikant gegenüber den unstimulierten Zellen erhöht (Abb. 48B). Der relative Anteil IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>/CD28<sup>-</sup> Zellen unterschied sich bei Gesunden und RA-Patienten nicht. Verglichen mit den CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Zellen zeigten insbesondere nach PMA/Ionomycin Stimulation die CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>/CD28<sup>-</sup> Zellen größere Anteile an IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen.

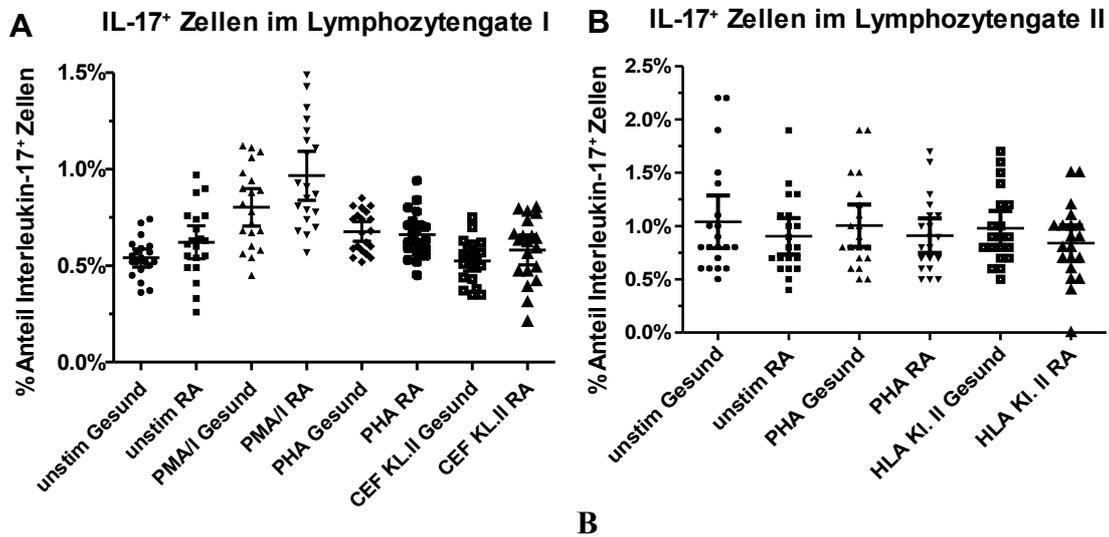


**Abbildung 49:** Interferon- $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen innerhalb der CD3<sup>-</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD28<sup>-</sup> Zellen im Lymphozytengate I; Abgebildet sind die Einzelwerte, das 95%-Konfidenzintervall und die Mittelwerte (ns- nicht signifikant; \* - p<0,05.)

Der Anteil IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD3<sup>-</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD28<sup>-</sup> Zellen war, außer nach PMA/Ionomycin Stimulation, bei RA-Patienten deutlich höher als bei Gesunden (Abb. 49). Diese Zellpopulation nahm bei RA-Patienten nach Stimulation mit PMA/Ionomycin verglichen mit unstimulierten Zellen signifikant (p<0,05) ab, während die der Gesunden unverändert blieb. Die Stimulation mit PHA führte zu keiner erheblichen Veränderung dieser Populationen im Vergleich zu den unstimulierten Zellen.

### 3.2.9 Vorkommen IL-17<sup>+</sup> Zellen in verschiedenen Zellpopulationen

#### 3.2.9.1 IL-17<sup>+</sup> Lymphozyten im Gate I und im Gate II



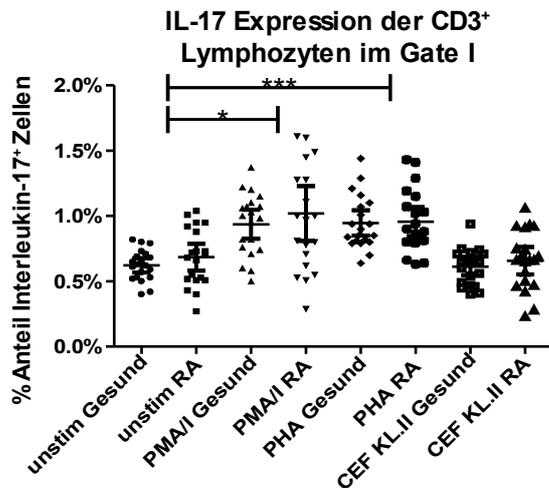
**Abbildung 50:** Interleukin-17<sup>+</sup> Zellen **A:** im Gate I der Lymphozyten; **B:** im Gate II der Lymphozyten; Dargestellt sind die Einzelwerte, die Mittelwerte und das 95%-Konfidenzintervall

RA-Patienten wiesen ohne Stimulation einen größeren, jedoch nicht signifikant differenten, Anteil an IL-17<sup>+</sup> Lymphozyten im Gate I als Gesunde auf (Abb. 50A). Nach Stimulation mit PHA war dieser Unterschied nicht mehr vorhanden. Durch PMA/Ionomycin Stimulation konnte bei Gesunden wie auch bei Patienten ein deutlicher Anstieg der IL-17<sup>+</sup> Zellen im Gate I beobachtet werden. Weder die Stimulation mit PHA noch mit dem HLA Kl. II Peptidpool führten im Gate I oder im Gate II zu einem sichtbaren Anstieg der IL-17<sup>+</sup> Zellen.

Im Gate II der Lymphozyten zeigten Gesunde generell einen größeren Anteil IL-17<sup>+</sup> Zellen als RA-Patienten (Abb. 50B). Die IL-17<sup>+</sup> Anteile an Lymphozyten im Gate II waren in beiden Gruppen und unabhängig von der Stimulation höher als im Gate I.

Nach PMA/Ionomycin Stimulation konnte keine Lymphozytenpopulation im Gate II beobachtet werden (Abb. 28B + Kap. 3.2.1).

### 3.2.9.2 IL-17<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup>-Lymphozyten im Gate I



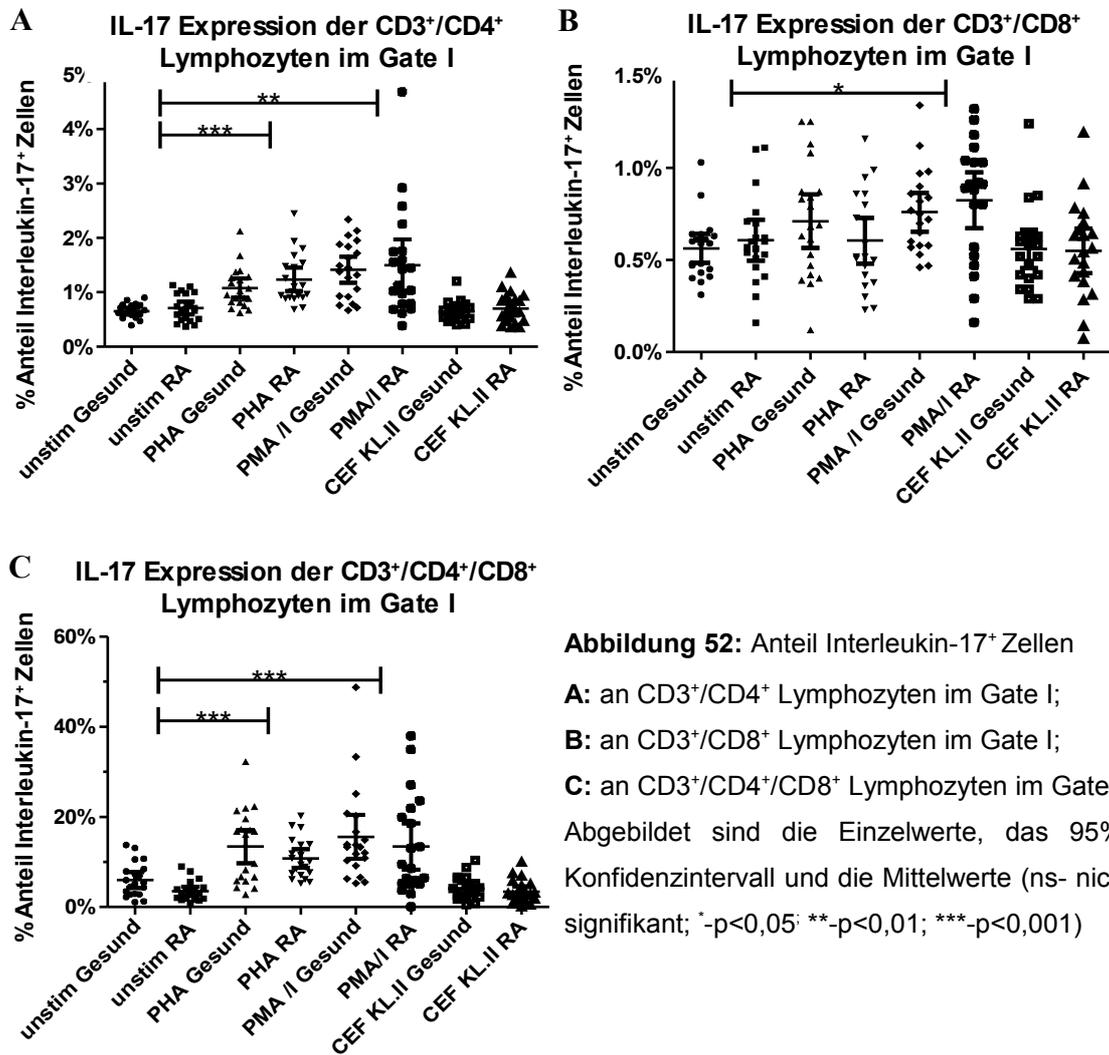
**Abbildung 51:** IL-17<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> Lymphozyten im Gate I; Dargestellt sind die Einzelwerte, die Mittelwerte und das 95%-Konfidenzintervall (ns-nicht signifikant; \*-p<0,05; \*\*-p<0,01; \*\*\*-p<0,001)

Die Fraktion Interleukin-17<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> Lymphozyten im Gate I war bei RA-Patienten nach allen Stimulationen größer als bei Gesunden (Abb. 51). Eine signifikante Zunahme des Anteils IL-17<sup>+</sup> Zellen an den CD3<sup>+</sup> Zellen zeigte sich für beide Gruppen nach Stimulation mit PHA (p<0,001) und PMA/Ionomycin (p<0,05) verglichen mit den unstimulierten Zellen.

CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen von RA-Patienten exprimierten geringfügig mehr Interleukin-17 als Gesunde. Nach PHA (p<0,001) und PMA/Ionomycin (p<0,01) Stimulation war der Anteil der IL-17<sup>+</sup> Zellen in beiden Testgruppen signifikant gegenüber den unstimulierten Zellen erhöht (Abb. 52A).

Unstimuliert und nach Stimulation mit HLA KI. II Peptiden zeigten sich keine Unterschiede der IL-17 Expression der CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T-Killer-Zellen zwischen RA-Patienten und Gesunden. Nach Stimulation mit PMA/Ionomycin zeigten sich bei RA-Patienten mehr IL-17<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Zelle als bei Gesunden (Abb. 52B). Hingegen war die IL-17<sup>+</sup> Zellfraktion der CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Lymphozyten der RA-Patienten nach Stimulation mit PHA im Vergleich zu den unstimulierten Zellen im Mittel unverändert, während sie bei Gesunden zunahm. Der Anteil der IL-17<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Zellen nahm in beiden Gruppen nach PMA/Ionomycin Stimulation

verglichen mit den unstimulierten Zellen signifikant ( $p < 0,05$ ) zu.



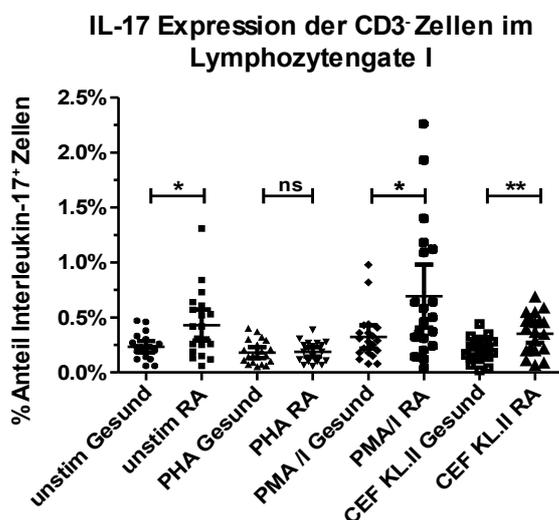
Gesunde wiesen auch einen höheren Anteil IL-17<sup>+</sup> Zellen an den CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> doppelt positiven Lymphozyten als RA-Patienten auf (Abb. 52C). Eine höchst signifikante ( $p < 0,001$ ) Zunahme des IL-17 Anteils an den doppelt positiven Zellen ließ sich nach Stimulation mit PHA und PMA/Ionomycin verglichen mit den unstimulierten Zellen in beiden Gruppen beobachten.

Insgesamt zeigten die CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Zellen beider Testgruppen sehr hohe Anteile IL-17<sup>+</sup> Zellen verglichen mit den einfach positiven CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> (Abb. 52A)

oder CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> (Abb.52B) Zellen. Die Anteile IL-17<sup>+</sup> Zellen an den CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> doppelt positiven Lymphozyten betragen im Mittel unstimuliert und nach Stimulation mit HLA KI. II Peptiden 4- 5% und nach Stimulation mit PMA/Ionomycin und PHA 12- 15%, während der Anteil IL-17<sup>+</sup> Zellen an den CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> Lymphozyten im Gate I im Mittel nur bei 1,6% nach Stimulation mit PMA/Ionomycin lag.

### 3.2.9.3 IL-17<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup>-Zellen im Gate I

RA-Patienten wiesen unstimuliert und nach allen Stimulationen, außer nach PHA, signifikant höhere IL-17<sup>+</sup> Anteile an CD3<sup>-</sup> Zellen als Gesunde auf (Abb. 53). Nach Stimulation mit PHA reduzierten sich diese Populationen bei beiden Gruppen verglichen mit den unstimulierten und der Anteil IL-17<sup>+</sup> Zellen schien nicht mehr weit über der Hintergrund Fluoreszenz zu liegen. CD3<sup>-</sup> Zellen zeigten aber nach Stimulation mit PMA/Ionomycin im Vergleich zu unstimulierten Zellen, insbesondere bei RA-Patienten, deutlich erhöhte Anteile an IL-17<sup>+</sup> Zellen.

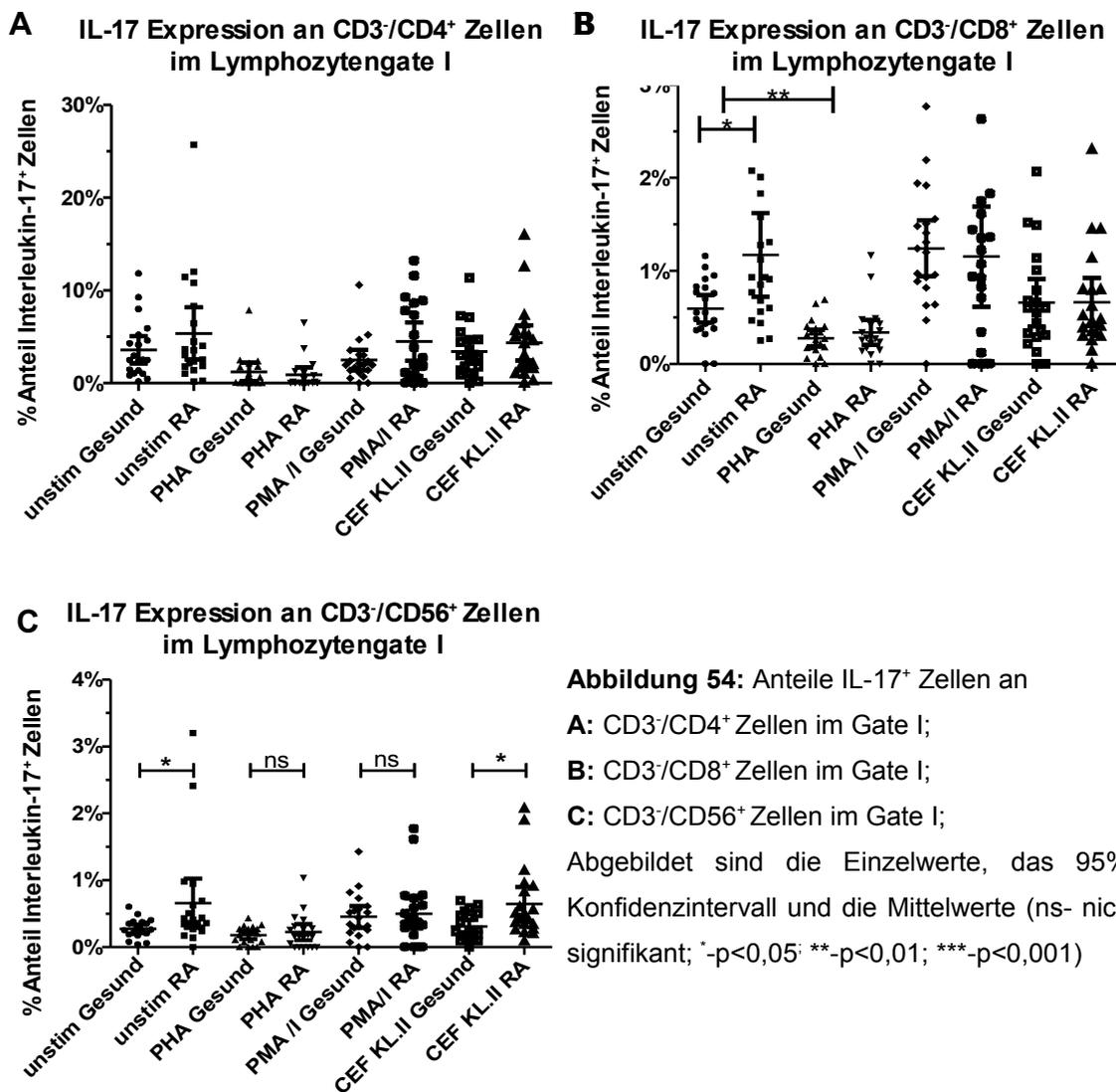


**Abbildung 53:** Anteil Interleukin-17<sup>+</sup> Zellen an CD3<sup>-</sup> Zellen im Lymphozytengate I; Abgebildet sind die Einzelwerte, das 95%-Konfidenzintervall und die Mittelwerte (ns-nicht signifikant; \*-p<0,05; \*\*-p<0,01; \*\*\*-p<0,001)

Die CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> Zellen im Lymphozytengate I der RA-Patienten hatten

unstimuliert, nach Stimulation PMA/Ionomycin oder mit HLA KI.II Peptiden einen deutlich höheren Anteil an IL-17<sup>+</sup> Zellen als die gesunde Vergleichsgruppe (Abb. 54A).

Der Anteil IL-17<sup>+</sup> Zellen betrug unstimuliert 3-5% der CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> Zellen und stellte damit nach den CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> doppelt positiven Zellen die Zellpopulation mit den zweithöchsten Anteil IL-17<sup>+</sup> Zellen dar. Nach Stimulation mit PHA (p<0,05) und mit PMA/Ionomycin (nicht signifikant) war in beiden Testgruppen der IL-17<sup>+</sup> Anteil der CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> Zellen niedriger als bei den unstimulierten.



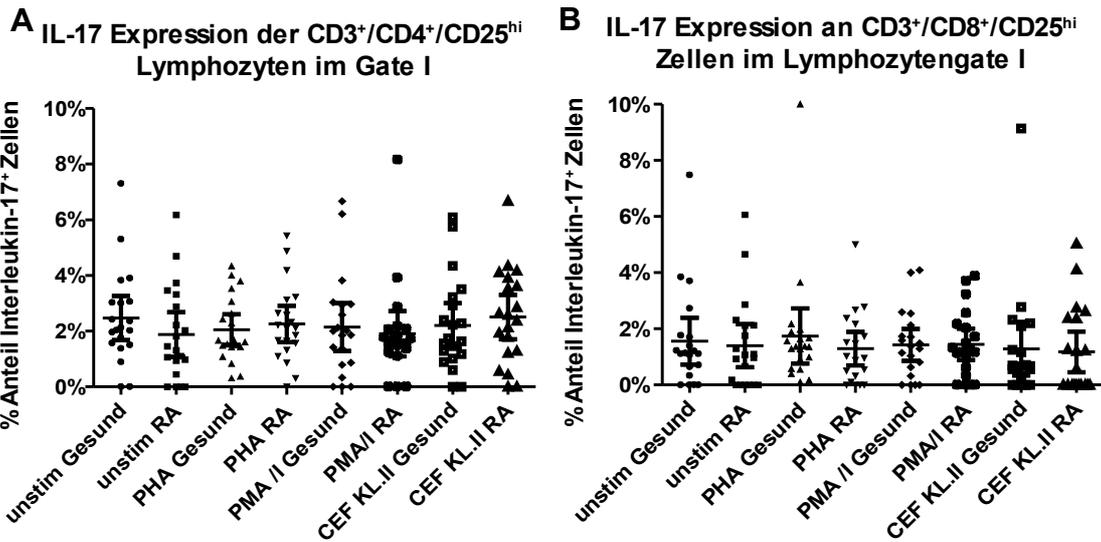
Unstimuliert wiesen CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Lymphozyten von RA-Patienten einen signifikant größeren Anteil IL-17<sup>+</sup> Zellen ( $p < 0,05$ ) als Gesunde auf (Abb. 54B). Dieser Unterschied zwischen Gesunden und RA-Patienten bestand nach Stimulation nicht mehr. Nach Stimulation mit PHA fielen die IL-17<sup>+</sup> Zellen verglichen mit unstimulierten Zellen sogar signifikant ab ( $p < 0,01$ ).

RA-Patienten wiesen verglichen mit Gesunden einen teilweise signifikant höheren Anteil IL-17<sup>+</sup> an CD3<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup> NK-Zellen auf (Abb. 54C). Nach Stimulation mit PHA nahm der Anteil der IL-17<sup>+</sup> Zellen an den NK-Zellen verglichen mit den unstimulierten Zellen in beiden Gruppen deutlich ab. Nach Stimulation mit PMA/Ionomycin nahm der Anteil IL-17<sup>+</sup> Zellen an den NK-Zellen verglichen mit den unstimulierten Populationen bei Gesunden zu, während der IL-17<sup>+</sup> Anteil der RA-Patienten abnahm.

#### **3.2.9.4 IL-17<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>-Lymphozyten im Gate I**

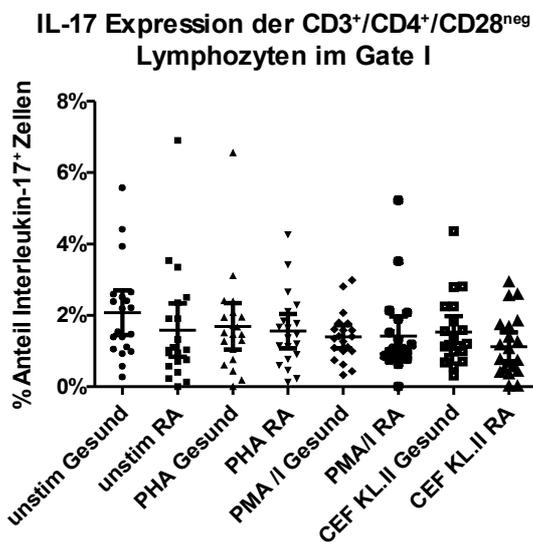
Die Anteile der Interleukin 17<sup>+</sup> an CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>hi</sup> Lymphozyten im Gate I lagen für Gesunde und Patienten nach allen Stimulationen zwischen 1,8%-2,5% (Abb. 55A) und waren signifikant größer als bei den CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> Lymphozyten (Abb. 52A).

Auch bezüglich der Interleukin-17<sup>+</sup> Anteile an CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>/CD25<sup>hi</sup> Lymphozyten im Gate I unterschieden sich Gesunde und RA-Patienten nach den verschiedenen Stimulationen kaum (Abb. 55B). Insgesamt waren die Anteile IL-17<sup>+</sup> Zellen den CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>/CD25<sup>hi</sup> Lymphozyten signifikant größer als an den CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Zellen.



**Abbildung 55:** Anteile Interleukin-17<sup>+</sup> Zellen **A:** an CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>hi</sup> Lymphozyten im Gate I **B:** an CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>/CD25<sup>hi</sup> Lymphozyten im Gate I; abgebildet sind die Einzelwerte, die Mittelwerte sowie das 95%-Konfidenzintervall

### 3.2.9.5 IL-17<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup>-Lymphozyten im Gate I

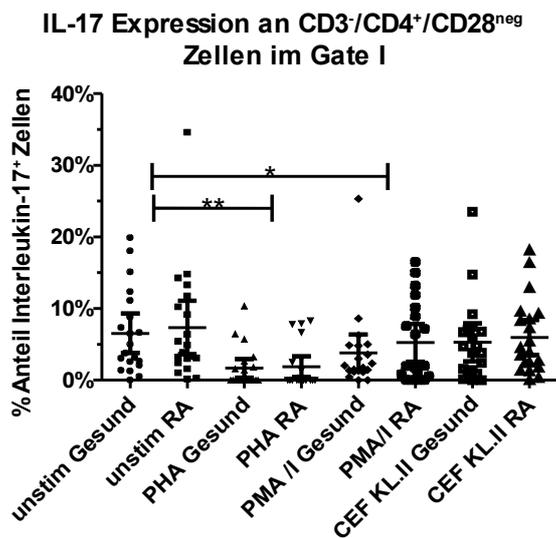


**Abbildung 56:** Interleukin-17<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD28<sup>-</sup> Lymphozyten im Gate I; dargestellt sind die Einzelwerte, die Mittelwerte sowie das 95%-Konfidenzintervall

Trotz hoher IL-17<sup>+</sup> Frequenzen (~2%) an CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD28<sup>-</sup> Lymphozyten im Gate I konnten keine Unterschiede zwischen Gesunden und RA-Patienten, sowie nach den Stimulationen gefunden werden (Abb. 56). Jedoch lagen diese

IL-17 Anteile deutlich über denen der CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> Zellen (Abb.52A).

Die CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>/CD28<sup>neg</sup> und die CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>/CD28<sup>neg</sup> Lymphozyten zeigten bezüglich der IL-17<sup>+</sup> Anteile verglichen mit den CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> und den CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Zellen keine nennenswerten Unterschiede.



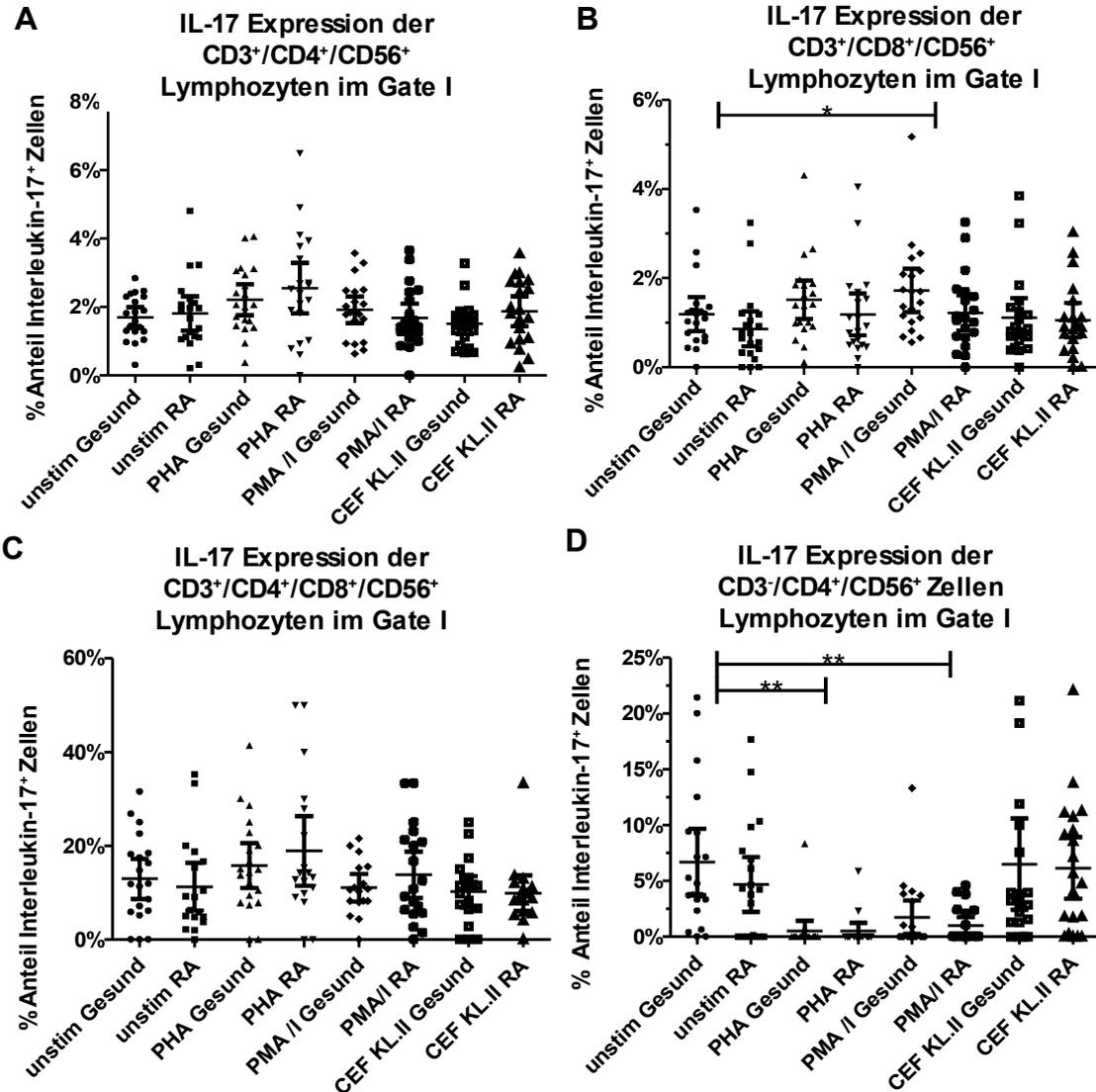
**Abbildung 57:** Frequenzen der IL-17<sup>+</sup> Zellen innerhalb der CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD28<sup>-</sup> Lymphozyten im Gate I; Abgebildet sind die Einzelwerte, das 95%-Konfidenzintervall und die Mittelwerte (ns- nicht signifikant; \*-p<0,05; \*\*-p<0,01; \*\*\*-p<0,001)

RA-Patienten zeigten nach allen Stimulationen einen geringfügig höheren Interleukin-17<sup>+</sup>Anteil an CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD28<sup>-</sup> Lymphozyten im Gate I als Gesunde (Abb. 57). Nach Stimulation mit PHA (p<0,01) und PMA/Ionomycin (p<0,05) nahm der Anteil IL-17 positiver Zellen verglichen mit den unstimulierten Zellen in dieser Population signifikant ab. Die höchsten Anteile an IL-17<sup>+</sup> Zellen (6-7%) zeigten die unstimulierten CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD28<sup>-</sup> Zellen. Des Weiteren wiesen die CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD28<sup>-</sup> Zellen etwas höhere Anteile an IL-17<sup>+</sup> Zellen auf als die CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> Zellen.

### 3.2.9.6 IL-17<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup>-Lymphozyten im Gate I

Die Anteile IL-17<sup>+</sup> Zellen an CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup> NK-T-Zellen unterschieden sich weder vor noch nach Stimulation bei RA-Patienten und Gesunden (Abb. 58A).

Der Anteil IL-17<sup>+</sup> Zellen war an den CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup> NK-T-Zellen jedoch deutlich größer als an den CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen (Abb.52A).



**Abbildung 58:** Anteil Interleukin-17<sup>+</sup> Zellen **A:** an CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup> Lymphozyten im Gate I; **B:** an CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup> Lymphozyten im Gate I; **C:** an CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup> Lymphozyten im Gate I; **D:** an CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup> Lymphozyten im Gate I; Abgebildet sind die Einzelwerte, die Mittelwerte, sowie das 95%-Konfidenzintervall (ns- nicht signifikant; \* -p<0,05; \*\* -p<0,01; \*\*\* -p<0,001)

Gesunde Probanden hatten einen deutlichen, allerdings nicht signifikant größeren Anteil IL-17<sup>+</sup> Zellen an CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup> Lymphozyten als RA-Patienten (Abb. 58B). Nach Stimulation mit PMA/Ionomycin zeigte sich in beiden Gruppen eine signifikante Zunahme ( $p < 0,05$ ) der IL-17<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup> Zellen verglichen mit den unstimulierten Zellen. Im Vergleich zu den CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Zellen lag dabei der Anteil der IL-17<sup>+</sup> Zellen bei den CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup> Zellen deutlich höher.

CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup> Lymphozyten zeigten sowohl bei Gesunden als auch bei RA-Patienten einen sehr hohen Anteil IL-17<sup>+</sup> Zellen. Unterschiede zwischen Gesunden und RA-Patienten sowie nach den Stimulationen zeigten sich nicht.

Gesunde wiesen einen größeren Anteil an IL-17<sup>+</sup> positiven Zellen an den CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup> Zellen als RA-Patienten auf (Abb. 58C). Nach Stimulation mit PHA oder PMA/Ionomycin zeigten beide Gruppen einen signifikant ( $p < 0,01$ ) geringeren Anteil IL-17<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup> Zellen als die unstimulierten Zellen.

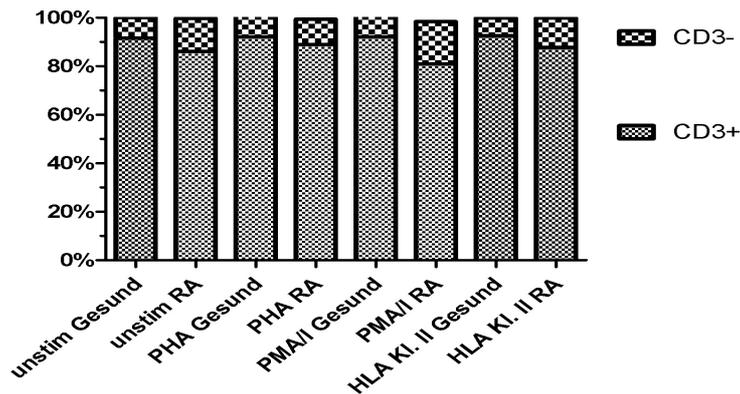
Die IL-17 Expression der CD3<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup> NK-Zellen wurden oben bereits beschrieben (Kap. 3.2.9.3. & Abb. 54C).

### 3.2.10 Verteilung der IL-17<sup>+</sup> Zellen auf verschiedene Zellpopulationen

#### 3.2.10.1 Zellpopulationen der IL-17<sup>+</sup> Zellen im Lymphozytengate I

Zunächst wurden die IL-17<sup>+</sup> Zellen im Gate I bezüglich ihrer CD3 Expression miteinander verglichen.

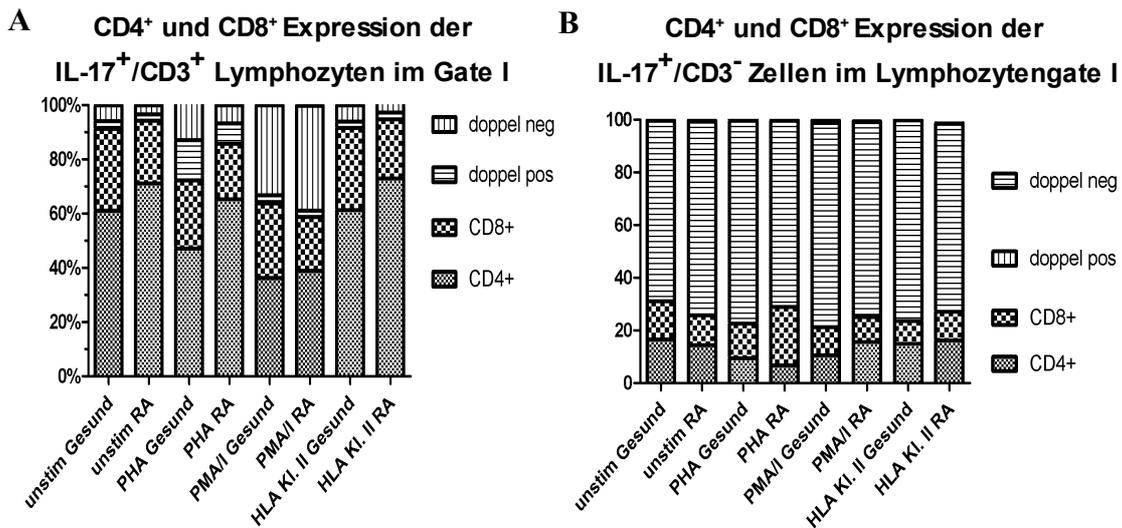
CD3 Expression der IL-17<sup>+</sup> Zellen im Lymphozytengate I



**Abbildung 59:** Analyse der CD3 Expression der IL-17<sup>+</sup> Zellen im Gate I; abgebildet sind die Mittelwerte

Mit mehr als 80% war der größte Teil der IL-17<sup>+</sup> Zellen im Lymphozytengate I bei Gesunden und RA-Patienten CD3 positiv. RA-Patienten zeigten nach allen Stimulationen dennoch einen höheren Anteil CD3<sup>-</sup> Zellen innerhalb der IL-17<sup>+</sup> Zellen als Gesunde (Abb. 59). Ein Unterschied der so bei unselektionierten Lymphozyten im Gate I (Abb. 31A) nicht bestand. Bezüglich der einzelnen Stimulantien ließen sich keine Unterschiede der CD3 Expression feststellen.

Zur weiteren Differenzierung wurden sowohl die IL17<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup> als auch die IL-17<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup> Zellen im Gate I der Lymphozyten auf ihre CD4 und CD8 Expression hin untersucht.



**Abbildung 60:** Vergleich der Anteile der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen im Gate I **A:** an IL-17<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup> Zellen **B:** an IL-17<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup> Zellen; abgebildet sind die Mittelwerte

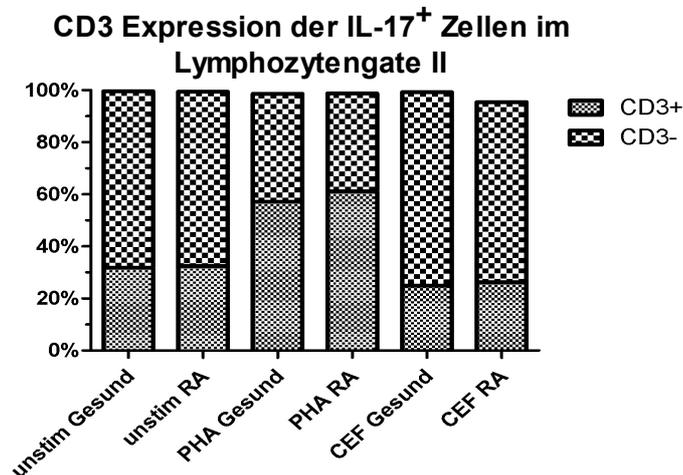
Die größte Population der IL-17<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup> Lymphozyten im Gate I exprimierte erwartungsgemäß CD4<sup>+</sup> (Abb. 60A). Diese Population war bei RA-Patienten unstimuliert und nach allen Stimulationen größer als bei Gesunden. Dieser Unterschied war signifikant in der unstimulierten Population ( $p < 0,01$ ), sowie nach Stimulation mit PHA ( $p < 0,0001$ ) und HLA KI.II Peptiden ( $p < 0,01$ ). Jedoch bestand dieser signifikante Unterschied auch bei den CD3<sup>+</sup> Zellen, die kein IL-17 exprimierten (Abb.32).

Nach Stimulation mit PHA zeigte sich insbesondere bei den gesunden Probanden ein großer Anteil (~15%) doppelt positiver Zellen an den IL-17<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup> Lymphozyten im Gate I.

Den größten Anteil an IL-17<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup> Zellen im Gate I stellten die doppelt negativen Zellen (Abb. 60B). Die Anteile der CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> Zellen an IL-17<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup> Lymphozyten im Gate I unterschieden sich nach den getesteten Stimulationen sowie zwischen den beiden Testgruppen nicht signifikant.

### 3.2.10.2 Zellpopulationen der IL-17<sup>+</sup> Zellen im Lymphozytengate II

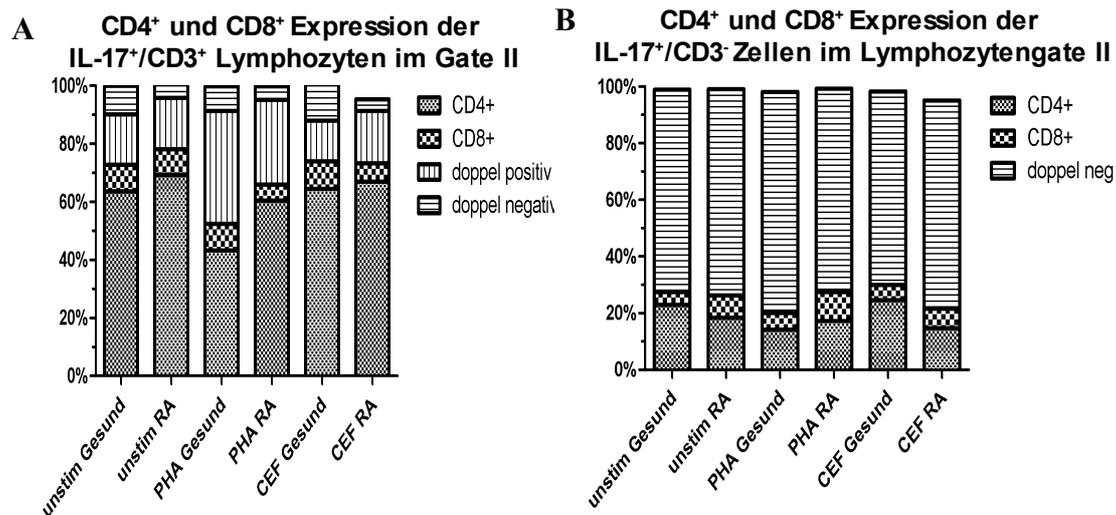
Die IL-17<sup>+</sup> Zellen im Gate II wurden zunächst bezüglich ihrer CD3 Expression untersucht.



**Abbildung 61:** Anteil der CD3 exprimierenden Zellen an den IL-17<sup>+</sup> Zellen im Gate II der Lymphozyten; abgebildet sind die Mittelwerte

Die CD3 Expression der IL-17<sup>+</sup> Zellen im Gate II von Gesunden und RA-Patienten unterschied sich nicht (Abb. 61). Nach Stimulation mit PHA war der Anteil an CD3<sup>+</sup> Zellen bei Gesunden und Patienten sehr signifikant ( $p < 0,01$ ) erhöht gegenüber den unstimulierten Zellen.

Zur weiteren Differenzierung wurden die IL-17<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup> sowie die IL-17<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup> Zellen im Gate II bezüglich ihrer CD4 und CD8 Expression untersucht.



**Abbildung 62:** Vergleich der Anteile der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen im Gate II **A:** die IL-17<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup> Zellen **B:** die IL-17<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup> Zellen; abgebildet sind die Mittelwerte

Den größten Anteil an IL-17<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup> Lymphozyten im Gate II hatten die CD4<sup>+</sup> Zellen (Abb. 62A). Deren Anteil war bei RA-Patienten deutlich größer als bei Gesunden. Nach Stimulation mit PHA war dieser Unterschied signifikant ( $p < 0,01$ ). Des Weiteren verminderte sich nach Stimulation mit PHA bei RA-Patienten und Gesunden der Anteil CD4<sup>+</sup> Zellen an den IL-17<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup> Zellen verglichen mit den unstimulierten Zellen signifikant ( $p < 0,05$ ). Den zweitgrößten Anteil an den IL-17<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup> Lymphozyten hatten die doppelt positiven CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Zellen. Deren Anteil erhöhte sich nach Stimulation mit PHA bei Gesunden und RA-Patienten verglichen mit den unstimulierten Zellen signifikant ( $p < 0,01$ ). Der Anteil CD8<sup>+</sup> Zellen an den IL-17<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup> Lymphozyten im Gate II wurde dagegen durch die Stimulationen nicht beeinflusst. Gesunde wiesen einen höheren Anteil CD8<sup>+</sup> Zellen als RA-Patienten auf. Der Anteil doppelt negativer Zellen an IL-17<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup> Lymphozyten im Gate II war bei Gesunden unstimuliert und nach allen Stimulationen deutlich größer als bei RA-Patienten.

Den größten Anteil an den IL-17<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup> Zellen im Lymphozytengate II hatten die doppelt negativen Zellen (Abb. 62B). Der Anteil der CD4<sup>+</sup> Zellen an den IL-17<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup> Zellen war, außer nach PHA Stimulation, bei Gesunden größer als bei

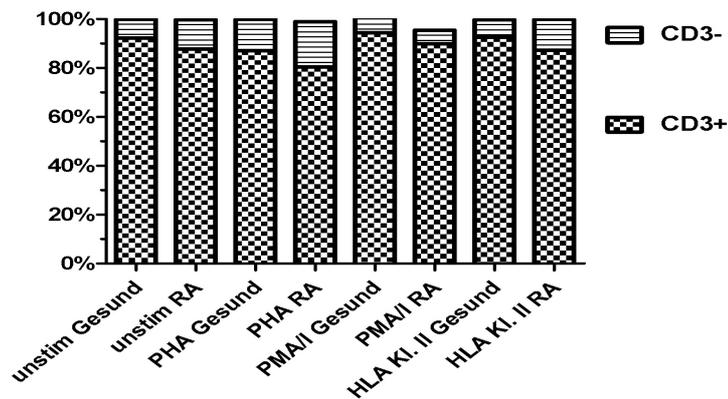
RA-Patienten. Im Gegensatz dazu war der Anteil der CD8<sup>+</sup> Zellen an den IL-17<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup> Zellen im Gate II nach allen Stimulationen bei RA-Patienten größer als bei Gesunden.

### 3.2.11 Verteilung der IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen auf verschiedene Zellpopulationen

#### 3.2.11.1 Zellpopulationen der IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen im Lymphozytengate I

Um die IFN- $\gamma$  produzierenden Zellen im Gate I der Lymphozyten weiter zu spezifizieren, wurden die IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen gated und bezüglich ihrer CD3 Expression untersucht (Abb.63).

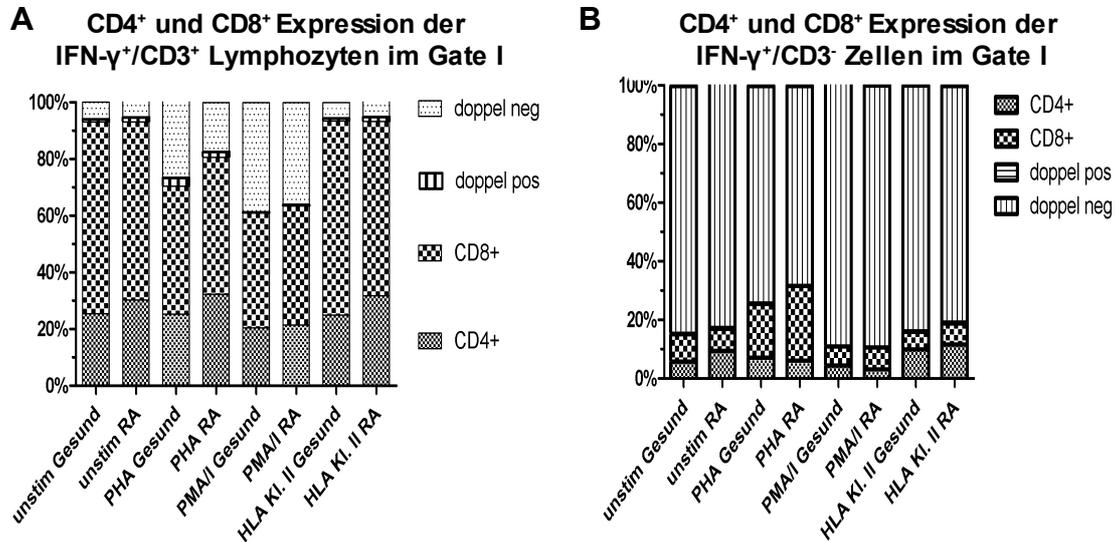
**CD3 Expression der IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen im Lymphozytengate I**



**Abbildung 63:** Vergleich der Anteile der CD3 Expression der IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen im Gate I; abgebildet sind die Mittelwerte

RA-Patienten hatten verglichen mit Gesunden einen größeren Anteil CD3<sup>-</sup> Zellen an den IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen im Gate I (Abb. 63). Dieser Unterschied war nach Stimulation mit HLA KI.II Peptiden signifikant ( $p < 0,05$ ). Nach Stimulation mit PHA nahm sowohl bei den RA-Patienten als auch bei den Gesunden der Anteil CD3<sup>-</sup> Zellen zu.

Im Weiteren wurden die IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup> und die IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup> Zellen im Gate I bezüglich ihrer CD4 und CD8 Expression weiter differenziert.



**Abbildung 64:** Vergleich der Anteile der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen **A:** an IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup> Zellen im Gate I; **B:** an IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup> Zellen im Gate I; abgebildet sind die Mittelwerte

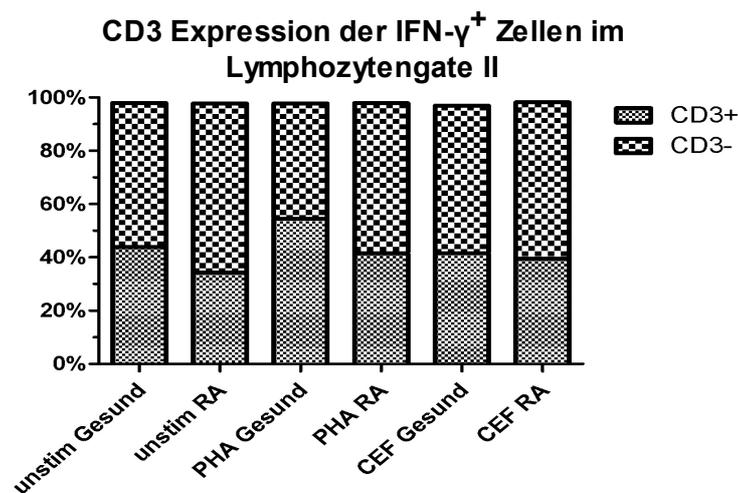
Den größten Anteil an IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup> Lymphozyten im Gate I hatten CD8<sup>+</sup> Zellen (Abb. 64A). Der Anteil CD8<sup>+</sup> Zellen unterschied sich bei Gesunden und RA-Patienten nicht. Der Anteil CD4<sup>+</sup> Zellen an den IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup> Zellen im Gate I war bei RA-Patienten unstimuliert und nach allen Stimulationen größer als bei Gesunden. Nach Stimulation mit PHA zeigte sich ein mit den anderen Stimulationen verglichen großer Anteil doppelt positiver Zellen. Der Anteil doppelt negativer Zellen an den IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup> Lymphozyten im Gate I war bei Gesunden unstimuliert und nach allen Stimulationen größer als bei RA-Patienten. Der größte Anteil doppelt negativer Zellen an den IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup> Lymphozyten im Gate I ließ sich nach Stimulation mit PMA/Ionomycin beobachten. Dies lässt sich durch mit der Downregulation von CD4 durch PMA/Ionomycin-Stimulation erklären (Kap.2.13.9).

Die größte Population der IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup> Zellen im Gate I der Lymphozyten

stellten die doppelt negativen Zellen dar (Abb. 64B). Diese Population war nach allen Stimulationen bei Gesunden größer als bei RA-Patienten. Die CD8<sup>+</sup> Zellen stellten den zweitgrößten Anteil an den IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup> Zellen. RA-Patienten zeigten einen größeren Anteil an CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup> Zellen, in der unstimulierten Population sowie nach Stimulation mit dem HLA KI.II Peptid Pool, als Gesunde. Nach PHA und PMA/Ionomycin Stimulation zeigte sich bezüglich des CD4<sup>+</sup> Anteils an den IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup> Zellen kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

Doppelt positive Zellen, die CD3 negativ waren, ließen sich erwartungsgemäß, nicht detektieren.

### 3.2.11.2 IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen im Lymphozytengate II



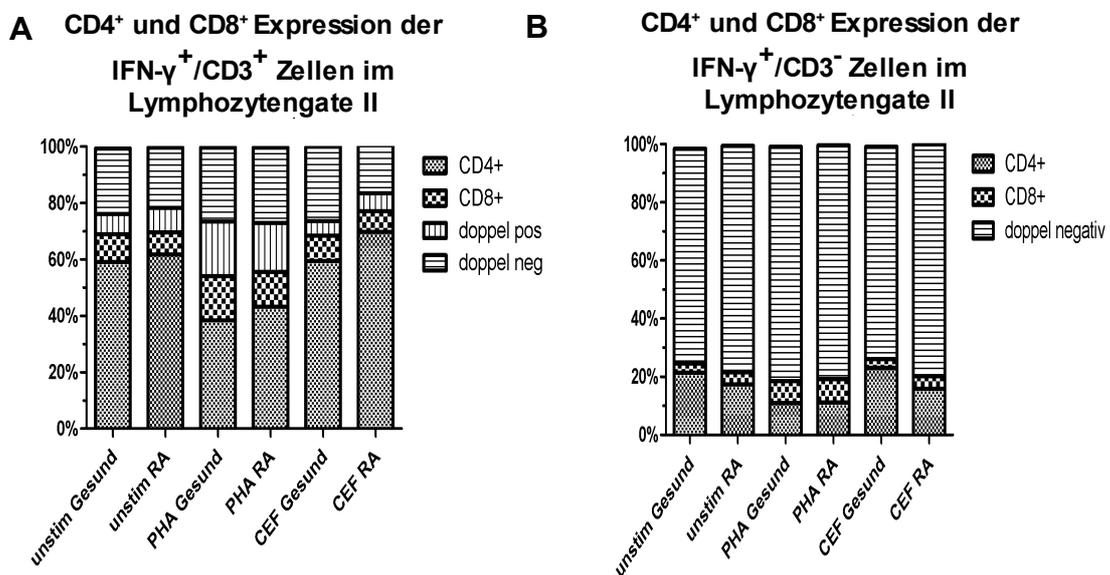
**Abbildung 65:** Vergleich der anteiligen CD3 Expression der IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen im Gate II; abgebildet sind die Mittelwerte

Zur besseren Charakterisierung der IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen im Lymphozytengate II wurden auch diese bezüglich ihrer CD3 Expression untersucht.

Der überwiegende Anteil der IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen im Gate II war, im Gegensatz zu den Zellen im Gate I (Abb. 63), CD3 negativ (Abb. 65). RA-Patienten hatten unstimuliert und nach PHA Stimulation einen deutlich höheren Anteil CD3<sup>-</sup> IFN-

$\gamma^+$  Zellen im Gate II als Gesunde. Nach Stimulation mit dem HLA KI.II Peptid-Pool bestand dagegen kein Unterschied zwischen Gesunden und RA-Patienten. Die Stimulation mit PMA/Ionomycin führte vermutlich zum Absterben von Lymphozyten im Gate II, so dass diese im Gate II nach PMA/I Stimulation nicht mehr detektiert werden konnten (Kap. 3.2.2. + Abb. 28 + Abb. 30).

Zur genaueren Identifizierung der  $\text{IFN-}\gamma^+$   $\text{CD3}^+$  und auch  $\text{CD3}^-$  Zellen im Lymphozytengate II wurde die CD4 und CD8 Expression dieser Populationen betrachtet.



**Abbildung 66:** Vergleich der Anteile der  $\text{CD4}^+$  und  $\text{CD8}^+$  Zellen im Gate II **A:** an  $\text{IFN-}\gamma^+$ / $\text{CD3}^+$  Zellen **B:** an  $\text{IFN-}\gamma^+$ / $\text{CD3}^-$  Zellen; abgebildet sind die Mittelwerte

Die  $\text{CD4}^+$  Zellen stellten den größten Anteil der  $\text{IFN-}\gamma^+$ / $\text{CD3}^+$  Lymphozyten im Gate II dar (Abb. 66A). Bei RA-Patienten war der  $\text{CD4}^+$  Anteil nach allen Stimulationen, wie bei den Lymphozyten im Gate I (Abb.64A), größer als bei Gesunden.

Die  $\text{CD4}^-/\text{CD8}^-$  doppelt negativen Zellen stellten mit 17-27% der  $\text{IFN-}\gamma^+$ / $\text{CD3}^+$  Lymphozyten im Gate II eine weitere große Population dar. Dieser Anteil an

doppelt negativen Zellen war bei Gesunden größer als bei RA-Patienten. Zwischen den einzelnen Stimulantien ließen sich keine Unterschiede in den Anteilen der doppelt negativen Zellen an den IFN- $\gamma^+$ /CD3 $^+$  Lymphozyten im Gate II feststellen.

Wie bei den Lymphozyten im Gate I, zeigten Lymphozyten im Gate II von Gesunden nach allen Stimulationen einen größeren Anteil CD8 $^+$  an IFN- $\gamma^+$ /CD3 $^+$  Zellen als RA-Patienten. Nach Stimulation mit PHA zeigte sich der Anteil der CD8 $^+$  Zellen an den IFN- $\gamma^+$ /CD3 $^+$  Lymphozyten im Gate II gegenüber den unstimulierten Zellen bei Gesunden und RA-Patienten als signifikant ( $p < 0,05$ ) erhöht.

Der Anteil der doppelt positiven Zellen an den IFN- $\gamma^+$ /CD3 $^+$  Lymphozyten im Gate II unterschied sich bei Gesunden und bei RA-Patienten nicht. Allerdings konnte ein höchst signifikant ( $p < 0,001$ ) höherer Anteil doppelt positiver Zellen nach Stimulation mit PHA bei Gesunden und Patienten im Vergleich zu den unstimulierten Populationen festgestellt werden.

Die IFN- $\gamma^+$ /CD3 $^-$  Zellen im Gate II exprimierten zum größten Teil weder CD4 noch CD8 (Abb.66B).

Gesunde Probanden hatten nach allen Stimulationen verglichen mit den RA-Patienten einen etwas größeren Anteil CD4 $^+$  Zellen an den IFN- $\gamma^+$ /CD3 $^-$  Zellen im Gate II.

Der Anteil von CD8 $^+$  an IFN- $\gamma^+$ /CD3 $^-$  Zellen war sowohl bei RA-Patienten als auch bei Gesunden gering. Nach Stimulation mit PHA war der Anteil CD8 $^+$  Zellen an IFN- $\gamma^+$ /CD3 $^-$  Zellen im Gate II der Lymphozyten in beiden Testgruppen signifikant ( $p < 0,05$ ) größer als in der unstimulierten Population.

### **3.2.12 IL-17 und IFN- $\gamma$ positive Zellpopulationen**

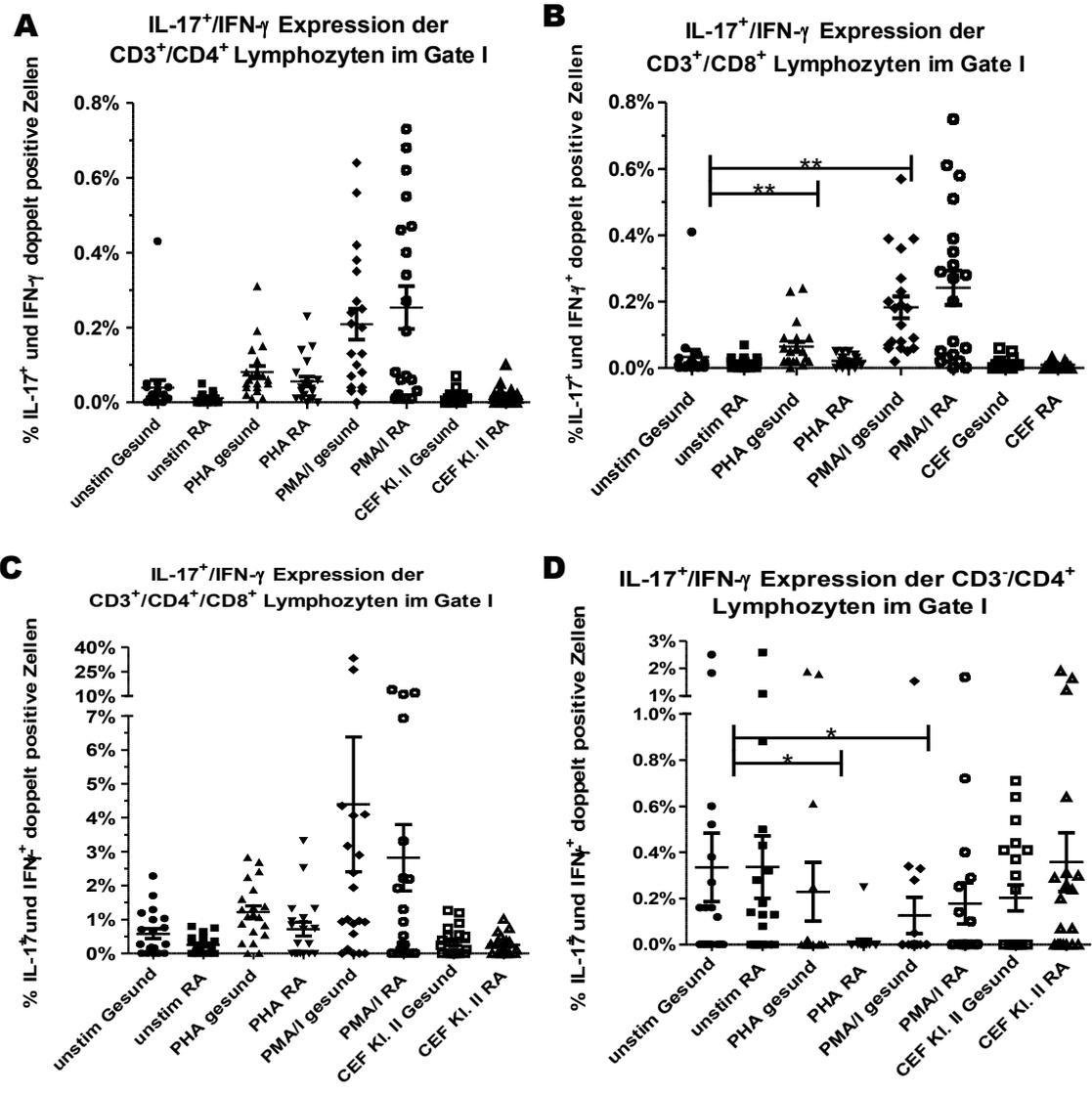
Es konnten in einigen Subpopulationen Zellen detektiert werden, die sowohl IFN- $\gamma$  als auch IL-17 produzierten.

Bei den CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> Lymphozyten im Gate I konnten diese IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>/IL-17<sup>+</sup> doppelt positiven Zellen nur nach Stimulation mit PMA/Ionomycin beobachtet werden (Abb. 67A). Gleiches zeigten auch die CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Zellen mit etwas geringeren Frequenzen (Abb. 67B).

Als IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>/IL-17<sup>+</sup> doppelt positive Zellen in den unstimulierten PBMC zeigten sich in CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Lymphozyten im Gate I (Abb. 67C). Nach Stimulation mit PMA/Ionomycin oder PHA nahm die IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>/IL-17<sup>+</sup> doppelt positive Fraktion signifikant ( $p < 0,01$ ) im Vergleich zu den unstimulierten Zellen zu. Bei einigen Probanden waren die Anteile der IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>/IL-17<sup>+</sup> positiver Zellen (5-40%) an den CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Lymphozyten besonders hoch.

Bei CD3<sup>-</sup>/CD4<sup>+</sup> Zellen fanden sich IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>/IL-17<sup>+</sup> doppelt positive Zellen auch ohne Stimulation (Abb. 67D). Nach Stimulation mit PMA/Ionomycin und PHA zeigten die CD3<sup>-</sup>/CD4<sup>+</sup> Zellen jedoch signifikant geringere Anteile IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>/IL-17<sup>+</sup> doppelt positiven Zellen als ohne Stimulation.

In weiteren CD3<sup>-</sup> Populationen konnten keine IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>/IL-17<sup>+</sup> doppelt positiven Zellen detektiert werden.



**Abbildung 67:** Anteil IL-17<sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> doppelt positiver Zellen im Lymphozytengate I; **A:** an CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> Zellen; **B:** an CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Zellen; **C:** an CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Zellen; **D:** an CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> Zellen; Abgebildet sind die Einzelwerte, die Mittelwerte, sowie das 95%-Konfidenzintervall (ns nicht signifikant; \* -p<0,05; \*\* -p<0,01; \*\*\* -p<0,001)

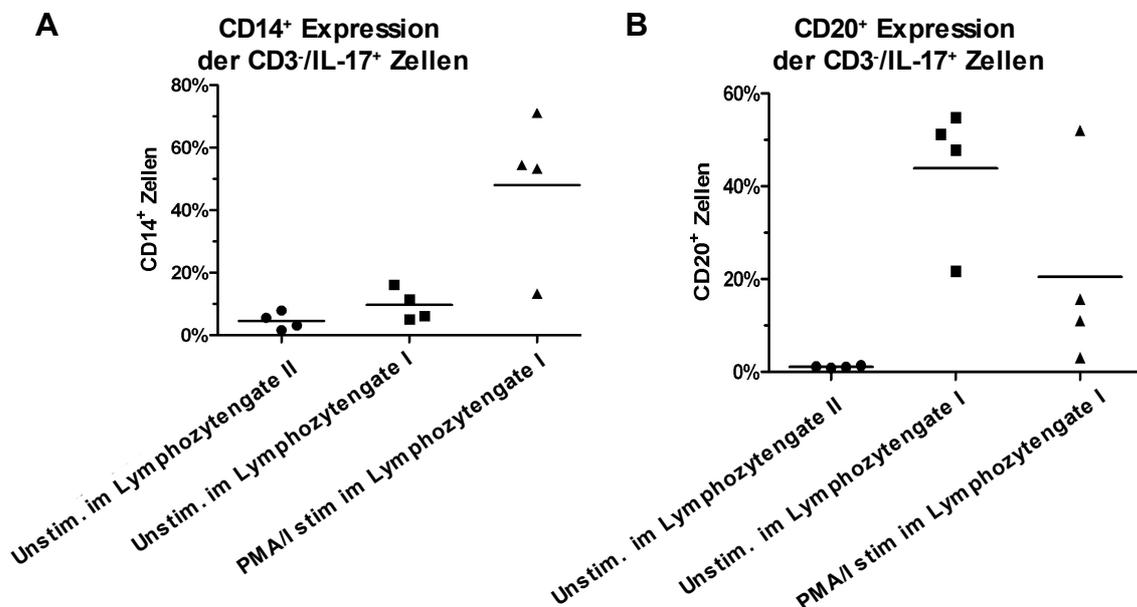
### 3.3 Untersuchung der CD3<sup>-</sup>/Interleukin-17<sup>+</sup> Zellen

Da IL-17 nicht nur von CD3<sup>+</sup> Zellen, sondern auch von CD3<sup>-</sup> Zellen exprimiert wurde, wurde bei 2 Gesunden sowie 2 RA-Patienten untersucht, ob CD3<sup>-</sup>/IL-17<sup>+</sup> Zellen den B-Zellmarker CD20 oder den LPS-Rezeptor CD14 exprimieren. Die ausgewählten Individuen wiesen einen hohen Anteil IL-17<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup> Zellen im Lymphozytengate I auf.

Der LPS-Rezeptor CD14 wird von Makrophagen, Monozyten, einigen dendritischen Zellen und etwas schwächer von Granulozyten exprimiert. Er erkennt im Zusammenspiel mit Toll-Like Rezeptoren das Lipopolysaccharid von gramnegativen Bakterien.

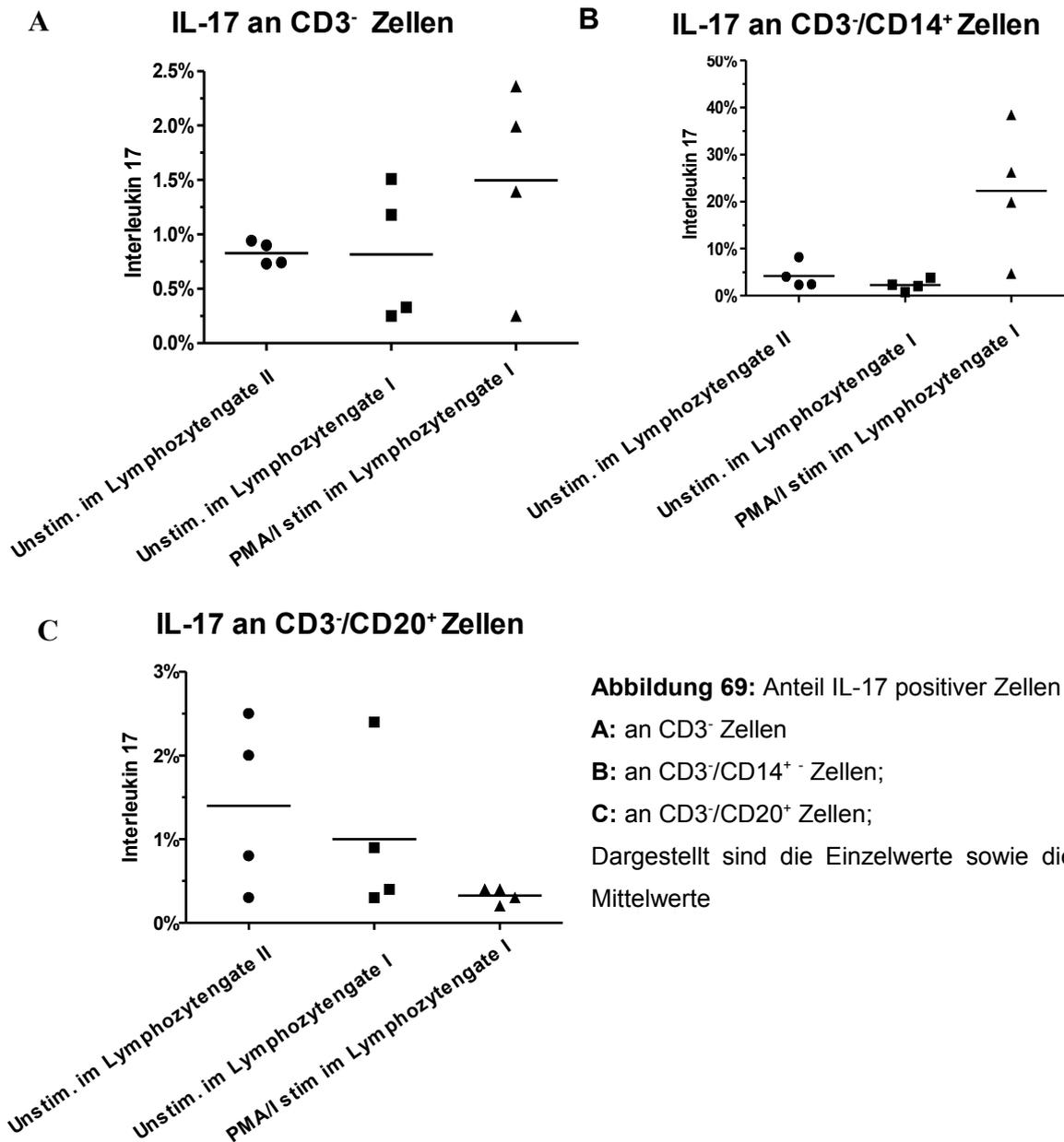
CD20 wird von sich entwickelnden und reifen B-Zellen exprimiert. CD20 Oligomere bilden einen Ca<sup>2+</sup>-Kanal und spielen eventuell eine Rolle in der Regulation der B-Zellaktivierung.

Zunächst wurde die CD14 bzw. CD20 Expression der CD3<sup>-</sup>/IL-17<sup>+</sup> Zellen im Gate I und im Gate II der Lymphozyten betrachtet.



**Abbildung 68:** CD14 bzw. CD20 Expression der CD3<sup>-</sup>/IL-17<sup>+</sup> Zellen **A:** CD14 Expression; **B:** CD20 Expression; Dargestellt sind die Einzelwerte und die Mittelwerte

CD14 wurde von 50% der CD3<sup>+</sup>/IL-17<sup>+</sup> Zellen nach Stimulation mit PMA/Ionomycin exprimiert (Abb. 68A). Des Weiteren exprimierten die Zellen im Gate I der Lymphozyten mehr CD14 als Zellen im Gate II. Bemerkenswerterweise exprimierten die beiden RA-Patienten mehr CD14 als die Gesunden (nicht dargestellt).



**Abbildung 69:** Anteil IL-17 positiver Zellen  
**A:** an CD3<sup>+</sup> Zellen  
**B:** an CD3<sup>+</sup>/CD14<sup>+</sup> Zellen;  
**C:** an CD3<sup>+</sup>/CD20<sup>+</sup> Zellen;  
 Dargestellt sind die Einzelwerte sowie die Mittelwerte

Die höchsten CD20<sup>+</sup> Anteile an CD3<sup>+</sup>/IL-17<sup>+</sup> Zellen mit ~45% im Mittel, zeigten die Zellen im Gate I der Lymphozyten ohne Stimulation (Abb. 68B). Von den CD3<sup>+</sup>/IL-17<sup>+</sup> Zellen im Lymphozytengate II exprimierten hingegen nur ca. 1% CD20<sup>+</sup>.

Besonderes nach Stimulation mit PMA/Ionomycin zeigten CD3<sup>+</sup>/CD14<sup>+</sup> Zellen einen großen Anteil an IL-17 positiven Zellen im Lymphozytengate I (Abb. 69B). Bemerkenswerterweise zeigten alle CD3<sup>+</sup>/CD14<sup>+</sup> Zellen deutlich höhere IL-17<sup>+</sup> Anteile als die unselektionierten CD3<sup>+</sup> Zellen (Abb. 69A).

CD3<sup>+</sup>/CD20<sup>+</sup> PMBC unterschieden sich bezüglich ihrer IL-17 Expression nur geringfügig von den unselektionierten CD3<sup>+</sup> Zellen (Abb. 69C). Nach PMA/Ionomycin Stimulation zeigten sie sogar geringere IL-17 Frequenzen als die unselektionierten CD3<sup>+</sup> Zellen.

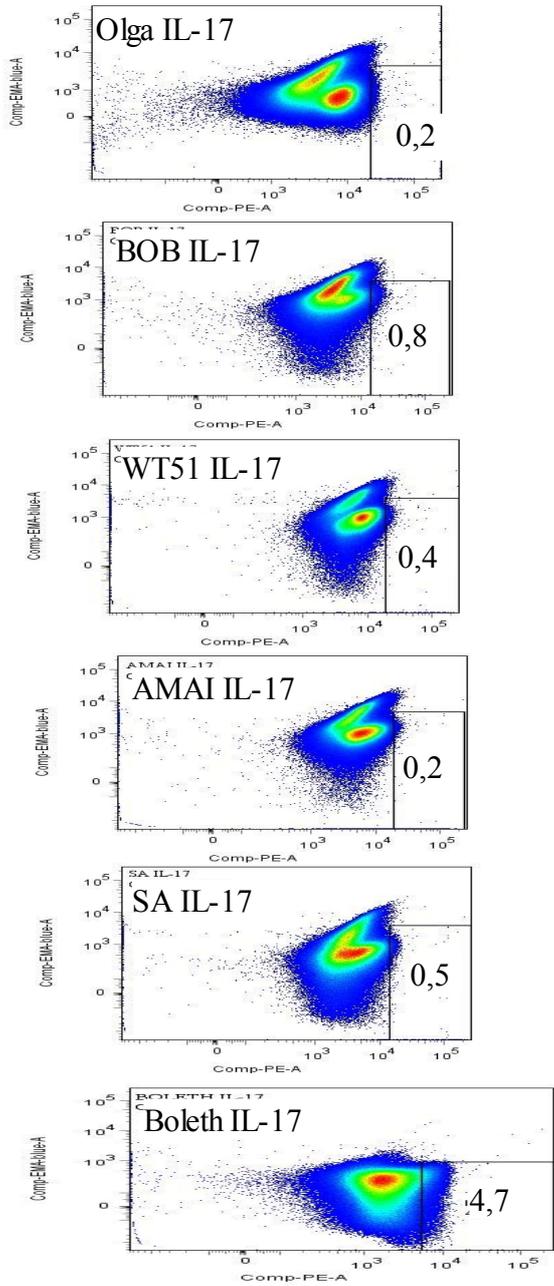
### **3.4 Untersuchung von B-Zelllinien auf IL-17 Expression**

Da IL-17 von CD3<sup>+</sup>/CD20<sup>+</sup> B-Zellen von Probanden exprimiert wurde, wurden vergleichend auch EBV transformierte B-Zelllinien auf die Expression von IL-17 untersucht.

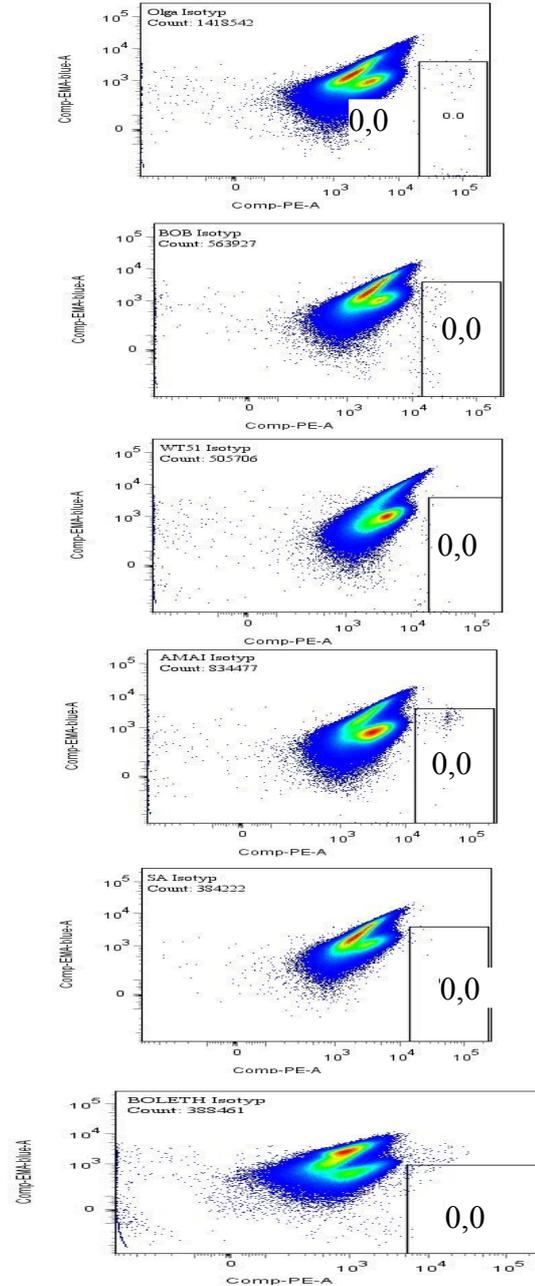
Einige B-Zelllinien, AMAI und Olga, zeigten nur sehr geringe (0,2%) Frequenzen an IL-17<sup>+</sup> Zellen (Abb. 70). Ob es sich um echt positive Zellen oder nur um ein Hintergrundsignal handelt, sollte mit einer PCR überprüft werden.

Weitere B-Zelllinien, WT51, BOB und SA, wiesen IL-17 in Frequenzen zwischen 0,4-0,8% auf. Die Zelllinie Boleth hingegen hatte gar einen Anteil IL-17<sup>+</sup> Zellen der 4,8% betrug.

### Markierung mit IL-17 Antikörper



### Markierung mit IL-17 Isotyp



**Abbildung 70:** IL-17 Expression der EBV transformierten B-Zellen nach IL-17 PE Markierung (linke Spalte) und Isotypfärbungen (rechte Spalte) auf der X-Achse und EMA Färbung auf der Y-Achse.

### **3.5 Korrelation klinischer Parameter mit der IL-17 Expression**

Da in der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis die Expression von Interleukin-17 vor allem für das Auftreten von Knochenerosionen eine wichtige Rolle spielen soll, wurde untersucht ob eine Korrelation zwischen den klinischen Parametern BSG, CRP, Leukozytenzahl, DAS28, der Erkrankungsdauer oder dem Patientenalter und dem Anteil von IL-17 an den verschiedenen Subpopulationen bestand.

Da die IL-17 Frequenzen häufig nicht der Normalverteilung entsprachen, wurde die Berechnung mit Hilfe des Spearmans Rangkorrelationskoeffizienten durchgeführt.

Zwischen den klinischen Parametern und dem Anteil IL-17 positiver Zellen an den bezeichneten Subpopulationen konnte kein Zusammenhang festgestellt werden.

Dies mag zum einen an der eher geringen Fallzahl liegen. Andererseits muß auch bedacht werden, dass die Patienten alle therapiert werden und umso schwerer die Erkrankung ist desto intensiver ist auch die Therapie. Die in der Studie untersuchten Patienten wiesen einen Mittelwert von 2,89 des DAS28 auf (Kap.2.6.+ Tab.3). Der DAS28 lag für 14 Patienten vor, bei 6 Patienten war der DAS28 <2,6, was nach Fransen et al<sup>(25)</sup> einer klinischen Remission mit Erfüllung der ARA Kriterien entspricht. Weitere 5 Patienten wiesen einen DAS28 <3,6 auf, der nach Aletaha et al<sup>(3)</sup> als geringe Krankheitsaktivität klassifiziert wird. Nur 3 Patienten hatten einen DAS28 zwischen 3,6 und 4,1, was einer mittleren Krankheitsaktivität entspricht. Die in der Studie untersuchten Patienten waren demnach sehr gut therapiert. Berücksichtigt werden muss auch die Tatsache, dass 16 Patienten mit Kortikosteroiden, 8 Patienten immunsuppressiv und 7 weitere noch mit Methotrexate behandelt wurden. Inwieweit diese Therapien zu Veränderungen der untersuchten Lymphozytenpopulationen führten, läßt sich aus den Ergebnissen auch unter Berücksichtigung der Kontrollen nicht sicher erschließen. Chakir et al<sup>(18)</sup> konnten zeigen, dass Asthmapatienten nach einer

14-tägigen Behandlung mit Kortikosteroiden signifikant geringere Frequenzen an IL-17<sup>+</sup> im Epithel aufwiesen als vor der Behandlung. Trotzdem waren die IL-17 Frequenzen, der behandelten Asthmapatienten noch signifikant höher als die der Kontrollgruppe. Miranda-Carús et al<sup>(69)</sup> zeigten mit Hilfe der RT-PCR, dass T-Zellen von RA-Patienten, welche 3 Tage mit Medium kultiviert worden waren, signifikant höhere IL-17 mRNA Level aufwiesen als die T-Zellen, denen MTX zugegeben worden war.

## 4. Diskussion

Die Rheumatoide Arthritis zählt zu den systemischen Autoimmunerkrankung, deren Pathogenese wahrscheinlich unter Beteiligung von T-Zellen vermittelt wird.<sup>(24),(62),(106)</sup> Seit der Erstbeschreibung von Interleukin-17 im Jahr 1996 durch Fossiez et al.<sup>(23)</sup> fanden viele Arbeitsgruppen<sup>(16),(50),(61),(68),(108),(126)</sup> sowohl im Mausmodell als auch beim Menschen Hinweise dafür, dass IL-17+ T-Helferzellen eine wichtige proinflammatorische Rolle bei Gelenkentzündungen und bei der rheumatoiden Arthritis spielen könnten.<sup>(28),(83)</sup> Interleukin-17+ T-Helferzellen sollen auch bei anderen Autoimmunerkrankungen wie bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen,<sup>(26)</sup> dem systemischen Lupus Erythematoses,<sup>(118)</sup> bei Asthma<sup>(53),(78)</sup> und der Multiplen Sklerose<sup>(65)</sup> pathogenetisch relevant sein.

Im Vordergrund dieser Untersuchung stand die Frage nach dem Phänotyp und der Frequenz IL-17 sezernierender Zellen im Blut von RA-Patienten im Vergleich zu gesunden Personen. Ferner wurde überprüft, in wieweit sich diese Zellen durch unspezifische oder antigenspezifische Stimuli beeinflussen bzw. aktivieren lassen.

### 4.1. Interleukin-17 exprimierende Zellen in PBMC

Mit Hilfe von „Multi-Color“ Färbungen für die ein Set von 8 direkt an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelte monoklonale Antikörper eingesetzt wurde, sollte in dieser Studie zunächst die Zusammensetzung der IL-17<sup>+</sup> Zellen bei Gesunden charakterisiert werden. Dazu wurden 20 gesunde Kontrollpersonen untersucht.

Als wesentliche Interleukin-17 produzierende Zellen im Blut wurden die sogenannten Th17-Zellen identifiziert, die neben den Th1, Th2 und Treg Zellen eine neue Subpopulation der CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen darstellen.<sup>(34)</sup> Es handelt sich

dabei um CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen, die sich von den herkömmlichen bekannten Th<sub>1</sub>/Th<sub>2</sub> T-Helfer-Zellpopulationen<sup>(75)</sup> dadurch unterscheiden, dass sie in ihrer Entwicklung durch IL-12 (Th<sub>1</sub>) sowie IL-4 (Th<sub>2</sub>) gehemmt werden und durch TGF-β gefördert werden<sup>(34)</sup> (Kap.1.2.5.).

In dieser Studie wurde ohne Stimulation IL-17 im Mittel von ca. 0,6% der CD3<sup>+</sup> Lymphozyten der gesunden Probanden exprimiert (Abb. 51). In absoluten Zahlen entspricht dies durchschnittlich 1.186 IL-17<sup>+</sup> Zellen pro 187.000 CD3<sup>+</sup> Zellen von 235.000 gemessenen Zellen im Lymphozytengate. Ca. 60% (≅ 718 Zellen) dieser unstimulierten CD3<sup>+</sup>/IL-17<sup>+</sup> Zellen exprimierten gleichzeitig CD4 (Abb. 65A) und stellten somit erwartungsgemäß die größte IL-17<sup>+</sup> Zellpopulation bei Gesunden und bei RA-Patienten dar.

Neben CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/IL-17<sup>+</sup> Th17-Zellen fanden sich im Blut Gesunder auch CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T-Killer-Zellen, die IL-17<sup>+</sup> exprimierten, wobei diese ca. 30% der CD3<sup>+</sup>/IL-17<sup>+</sup> Zellen ausmachten (Abb. 65A). Shin et al<sup>(97)</sup> hatten 1998 gezeigt, dass humane CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Zellen ähnlich hohe IL-17 Level wie CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> aufweisen können. Im Gegensatz dazu waren in dieser Studie die IL-17 Level der CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Zellen nach allen Stimulationen deutlich geringer als die der Th17 Zellen (Abb.52A+B, Tab.6). He et al<sup>(36)</sup> hatten im Mausmodell postuliert, dass Interleukin-17 produzierende CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Zellen über einen anderen Mechanismus, als die CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> Th17 Zellen stimuliert werden und eine wichtige Rolle bei der Kontakthypersensitivitätsreaktion spielen könnten. In der vorliegenden Studie fanden sich jedoch keine solchen Hinweise auf stimulationsabhängige Unterschiede zwischen CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>/IL-17<sup>+</sup> T-Killer-Zellen und CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/IL-17<sup>+</sup> Th17 Zellen.

Eine dritte IL-17<sup>+</sup> Zellpopulation fand sich unter der kleinen Population CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> doppelt positiven Lymphozyten (Abb. 52C). Hofstetter et al<sup>(39)</sup> hatten über eine IL-17 Expression in doppelt positiven Zellen in murinen Thymozyten berichtet. In humanen PMBC waren 1985 erstmalig diese

CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Lymphozyten beschrieben worden.<sup>(13)</sup> Ein im Vergleich zu Gesunden vermehrtes Vorkommen von CD4<sup>hi</sup>/CD8<sup>hi</sup> doppelt positiven PBMC, wie bei den RA-Patienten in dieser Studie, wurde für Patienten mit Autoimmunerkrankungen wie multipler Sklerose<sup>(77)</sup> und atopischer Dermatitis<sup>(8)</sup> gezeigt. Innerhalb der doppelt positiven CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Lymphozyten aus PBMC fanden sich bei gesunden Probanden ein großer Anteil IL-17<sup>+</sup> Zellen (6%  $\cong$  36 Zellen).

Auch NK-T-Zellen wurden als Quelle von IL-17 beschrieben.<sup>(12),(29)</sup> Ebenso fand sich in dieser Studie eine IL-17<sup>+</sup> Zellfraktion an CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup> NK-T-Zellen (Abb. 58B). Diese war signifikant größer als die IL-17<sup>+</sup> Zellfraktion der CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T-Killer-Zellen.

Innerhalb der CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> Zellen zeigte sich unstimuliert eine große IL-17<sup>+</sup> Fraktion von 2,5% bei gesunden Probanden ( $\cong$  absolut 23 Zellen) (Abb. 55A), die signifikant größer war als bei nicht weiter definierten CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen. Hingegen gab es auch einige gesunde Probanden bei denen sich in der CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> Population kein IL-17 nachweisen ließ. Die CD25 Expression charakterisiert typischerweise regulatorische T-Zellen. Da sich CD25 aber auch auf der Oberfläche anderer aktivierter T-Zellen findet, konnte in dieser Studie nicht weiter geklärt werden welcher Zellpopulation dieses CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>/IL-17<sup>+</sup> Zellen angehören und in welcher Beziehung sie zu den T<sub>reg</sub> stehen.

Auch unter CD3<sup>-</sup> Zellen im Gate I unstimulierten Lymphozyten wurden IL-17 positive Zellen identifiziert (Abb. 53). Als CD3<sup>-</sup> Zellen, die eventuell Interleukin-17 sezernieren könnten diskutierten Gaston et al.<sup>(29)</sup> und Weaver et al.<sup>(115)</sup> NK-Zellen, Neutrophile und Granulozyten sowie Makrophagen.<sup>(99)</sup> Neutrophile und Granulozyten waren in dieser Studie in den Analysenproben nicht zu erwarten, da die PBMCs mit Lymphozyten und Monozyten von Neutrophilen und anderen polymorphnukleären Zellen über einen Ficoll-Dichtegradienten abgetrennt

worden waren.

Der mittlere Anteil der CD3<sup>-</sup>/IL-17<sup>+</sup> Zellen an allen IL-17<sup>+</sup> Zellen der gesunden Probanden im Gate I betrug 8,8% ( $\hat{=}$  absolut 115 CD3<sup>-</sup>/IL-17<sup>+</sup> Zellen von 1301 IL-17<sup>+</sup> Zellen) (Abb. 64). Es konnten jedoch nicht bei allen Probanden, insbesondere bei den gesunden Kontrollen, CD3<sup>-</sup>/IL-17<sup>+</sup> Zellen nachgewiesen werden.

Einige der CD3<sup>-</sup>/IL-17<sup>+</sup> Zellen der gesunden Probanden exprimierten auch CD4 (Abb. 65B). Bei diesen CD3<sup>-</sup>/CD4<sup>+</sup> Zellen fand sich unstimuliert mit 3,6% ein großer Anteil ( $\hat{=}$  absolut 19 Zellen) IL-17<sup>+</sup> Zellen (Abb. 54A + Tab. 6). Page et al<sup>(82)</sup> beschrieben, dass die Stimulation mit PMA/PHA zu einer plasmazellartigen Veränderung der Morphologie der Interleukin-17 produzierenden CD3<sup>-</sup>/CD4<sup>+</sup> Zellen führt. In unserer Studie zeigten sich diese morphologischen Veränderungen nach Stimulation mit PHA, aber nicht nach PMA/Ionomycin Stimulation. Des Weiteren beschrieb diese Arbeitsgruppe, dass es sich dabei um T-Helfer-Zellen handelt, die den CD3 Rezeptor, allerdings nicht den CD4 Rezeptor, durch Stimulation verlieren.

Da CD4 jedoch auch auf Vorläufern von Dendriten und Monozyten zu finden ist, könnten diesen CD3<sup>-</sup>/CD4<sup>+</sup>/IL-17<sup>+</sup> Zellen einer Zellpopulation des myelomonozytären Systems angehören. Um welche Zellen es sich bei diesen CD3<sup>-</sup>/CD4<sup>+</sup>/IL-17<sup>+</sup> Zellen handelt müssen weitere Analysen klären.

Eine kleine IL-17<sup>+</sup> Zellfraktion (0,59%) konnte auch innerhalb der CD3<sup>-</sup>/CD8<sup>+</sup> Zellpopulation (Abb. 65B) identifiziert werden.

Das NK-Zellen IL-17 exprimieren können berichteten verschiedene Arbeitsgruppen.<sup>(12),(90),(115)</sup> Ebenso zeigte sich in dieser Studie ein kleiner Anteil IL-17<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup>/CD56<sup>+</sup> NK-Zellen (Abb. 54C).

Ein großer Teil (65%, Abb. 65B) der IL-17<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup> Zellen exprimierte weder CD4,

CD8 noch CD56. Ein gewisser Teil dieser Zellen konnte durch weitere Mehrfachmarkierungen an einzelnen Zellproben als CD20<sup>+</sup> B-Zellen (43%) und als CD14<sup>+</sup> Monozyten (10%) (Abb. 68B) charakterisiert werden.

Übereinstimmend mit diesen Beobachtungen sind Berichte von Song et al.<sup>(99)</sup> sowie von Zhu et al.<sup>(125)</sup> über IL-17 sezernierende murine Makrophagen. Humane Monozyten, die IL-17 produzieren, beschrieben Starnes et al.<sup>(102)</sup> sowie andere Autoren.<sup>(115),(29),(99)</sup>

Für ein Vorkommen von IL-17 in der B-Zellreihe sprechen in dieser Studie auch Untersuchungen an verschiedenen EBV-transformierten B-Zelllinien (Kap. 3.4). Während einige B-Zelllinien wie Olga und AMAI nahezu keine IL-17<sup>+</sup> Zellfraktionen (~0,2%) über der Background Fluoreszenz aufwiesen (Abb. 70), zeigten andere B-Zelllinien geringe IL-17<sup>+</sup> Zellsubpopulationen. In der B-Zelllinie Boeth ließ sich sogar ein großer Anteil IL-17<sup>+</sup> Zellen von 4,7% beobachten. Interleukin-17 ließ sich in dieser B-Zelllinie Boeth auch durch den Nachweis entsprechender mRNA bestätigen. Welche B-Zellschubpopulation in vivo IL-17 exprimieren, müssen weitere Studien klären.

#### **4.2. Unterschiede der Lymphozytenpopulationen bei RA-Patienten und Gesunden**

Unter den CD3<sup>+</sup> Lymphozyten im Gate I von RA-Patienten fand sich ein größerer Anteil CD4<sup>+</sup> (Abb. 32) und CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> doppelt positiver Zellen (Abb. 34) verglichen mit den gesunden Kontrollpersonen. Das vermehrte Vorkommen CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Lymphozyten bei Autoimmunerkrankungen beschrieben bereits verschiedene Autoren.<sup>(8),(77)</sup>

Entsprechend ließen sich innerhalb der CD3<sup>+</sup> Lymphozytenpopulationen der Gesunden mehr CD8<sup>+</sup> (Abb. 33) und mehr CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup> doppelt negative (Abb. 35) Zellen als bei den RA-Patienten nachweisen.

RA-Patienten hatten in allen Zellfraktionen der CD3<sup>+</sup> unstimulierten

Lymphozyten im Gate I einen geringeren Anteil CD28<sup>+</sup> Zellen als Gesunde (Abb. 42) wie dies auch in der Literatur mehrfach beschrieben und mit T-Zell-Abnormalität bei der RA assoziiert worden ist.<sup>(30)</sup>

CD3<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup> NK-Zellen waren, wie in der Literatur beschrieben,<sup>(67)</sup> bei RA-Patienten, außer nach PHA Stimulation, in einer größeren Frequenz vorhanden als bei Gesunden (Abb. 41).

### **4.3. IL-17<sup>+</sup> Zellpopulationen bei RA-Patienten und Gesunden**

Mehrfach wurde darüber berichtet, dass RA-Patienten verglichen mit Osteoarthritis Patienten in der Synovialflüssigkeit wie auch im Überstand von dendritischen PBMC signifikant erhöhte IL-17 Spiegel im ELISA gezeigt hatten.<sup>(51),(126)</sup> In dieser Studie wurde nachgewiesen, dass RA-Patienten diese erhöhten Werte im Überstand von PBMC auch mit einer erhöhten IL-17 Frequenz von IL-17<sup>+</sup> Zellen im Blut der Patienten korrelieren.

Dennoch war der Anteil der IL-17 Fraktionen an der CD3<sup>+</sup> Lymphozytenpopulation bei Gesunden und RA-Patienten nicht signifikant unterschiedlich (Kap.3.2.9.2 + Tab.6). Ähnlich wie in dieser Studie hatten auch Yamada et al<sup>(120)</sup> für CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> Zellen keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrollen und RA-Patienten berichtet. Diese Autoren berichten ebenso, dass IL-17<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> Lymphozyten auch in der Synovialflüssigkeit und im Synovialgewebe von RA-Patienten im Vergleich zu Osteoarthritis Patienten zwar erhöht waren, aber nur eine kleine Population der CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation darstellen. Auch die Ergebnisse dieser Studie an PBMC ergeben, dass die CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup> Zellen nur eine kleine, geringfügig erhöhte Population der CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> Lymphozyten bei RA-Patienten (Abb.52A) ähnlich wie bei gesunden Personen im Blut bildet.

Anders als in Tiermodellen der RA scheinen beim Menschen Veränderungen in Th17 Zellen im Blut wie auch Synovialgewebe bei den zu beobachtenden T-Zell-Veränderungen nicht vorrangig zu sein. Damit bleibt offen, ob und welche Bedeutung den Th17 Zellen in der Pathogenese der RA beim Menschen zukommen. Es müssen weitere Studien zeigen, ob die Unterschiede zwischen

den vorliegenden Ergebnissen und dem Tiermodell auf die Therapie zurückzuführen sind oder ob es sich um echte Unterschiede zwischen Mensch und Tiermodell handelt.

Gesunde und RA-Patienten unterschieden sich signifikant nur im Anteil der IL-17<sup>+</sup> Zellen an der kleinen CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> doppelt positiven Lymphozytenpopulation, wobei Gesunde eine größere IL-17 Zellfraktion als RA-Patienten aufwiesen (Abb. 52C). Da diese Population jedoch sehr klein ist, beeinflusst sie die IL-17<sup>+</sup> Zellfraktion an den CD3<sup>+</sup> Zellen zu Gunsten der Gesunden verglichen mit den RA-Patienten nur geringfügig.

Eine signifikant größere IL-17<sup>+</sup> Zellfraktion zeigten RA-Patienten gegenüber gesunden Probanden an den unstimulierten CD3<sup>-</sup> Zellen im Gate I (0,43%  $\hat{=}$  157 Zellen vs. 0,23%  $\hat{=}$  115 Zellen) (Abb. 53).

Eine große IL-17 Zellfraktion zeigte dabei vor allem die CD3<sup>-</sup>/CD4<sup>+</sup> Population, mit 5,6% bei RA-Patienten und mit 3,6% bei Gesunden (Abb. 54A). Ob es sich um die von Page et al.<sup>(82)</sup> beschriebenen Th1-Zytokin produzierenden Lymphozyten handelte, die die CD3 Expression verloren haben oder um Progenitoren von Monozyten oder anderen myelomonozytären Zellen müssen weitere Studien zeigen.

Auch die CD3<sup>-</sup>/CD8<sup>+</sup> Zellen hatten bei RA-Patienten (1,17%  $\hat{=}$  22 Zellen) unstimuliert einen signifikant ( $p < 0,01$ ) größeren Anteil IL-17<sup>+</sup> Zellen als bei gesunden Probanden (0,59%  $\hat{=}$  18 Zellen) (Abb. 54B). Zu einem großen Teil exprimierten diese Zellen CD56 und scheinen somit den NK-Zellen anzugehören.

**Tabelle 6:** Rel. Frequenzen der Interleukin-17<sup>+</sup> Zellen an verschiedenen Lymphozytenpopulationen bei RA-Patienten und Kontrollen (mittlere Prozentanteile an der jeweiligen elektronisch selektierten Zellpopulation)

	Unstim. Gesund	Unstim. RA	PHA Gesund	PHARA	PMAI Gesund	PMAI RA	HLA KI.II Gesund	HLA KI.II RA
Lymphozyten im Gate I	0,54	0,62	0,68	0,66	0,8	0,97	0,52	0,58
Lymphozyten im Gate II	1,04	0,91	1,01	0,91			0,98	0,84
CD3+ Lymphozyten im Gate I	0,62	0,69	0,95	0,96	0,94	1,02	0,61	0,66
CD3+ Lymphozyten im Gate II	2,26	3,17	3,52	4,09			2,01	2,04
CD3+/CD4+ Lymphozyten im Gate I	0,65	0,71	1,08	1,24	1,42	1,5	0,65	0,7
CD3+/CD4+ Lymphozyten im Gate II	2,32	3,44	3,18	4,51			2,15	2,22
CD3+/CD8+ Lymphozyten im Gate I	0,56	0,61	0,71	0,61	0,76	0,83	0,56	0,55
CD3+/CD8+ Lymphozyten im Gate II	1,71	2,39	2,2	1,28			1,51	1,28
CD3+/dop pos Lymphozyten im Gate I	6	3,53	13,43	10,78	15,6	13,43	4,12	3,39
CD3+/dop pos Lymphozyten im Gate II	4,56	5,44	7,34	8,45			4,02	5,19
CD3+/dop neg Lymphozyten im Gate I	0,46	0,57	0,58	0,49	0,79	0,84	0,45	0,52
CD3+/dop neg Lymphozyten im Gate II	1,99	1,01	1,48	1,09			1,75	0,79
CD3- Lymphozyten im Gate I	0,23	0,43	0,18	0,19	0,32	0,7	0,2	0,35
CD3- Lymphozyten im Gate II	0,79	0,62	0,49	0,4			0,87	0,7
CD3-/CD4+ Lymphozyten im Gate I	3,6	5,35	1,04	0,85	2,48	4,27	3,41	4,33
CD3-/CD4+ Lymphozyten im Gate II	2,04	2,28	2,56	1,67			1,41	2,04
CD3-/CD8+ Lymphozyten im Gate I	0,59	1,17	0,28	0,34	1,24	1,15	0,66	0,66
CD3-/CD8+ Lymphozyten im Gate II	1,66	2,86	1,16	1,27			2,06	1,64
CD3-/CD56 + Lymphozyten im Gate I	0,27	0,66	0,18	0,22	0,45	0,5	0,31	0,65
CD3-/dop neg Lymphozyten im Gate I	0,19	0,33	0,15	0,22	0,25	0,51	0,16	0,27
CD3-/dop neg Lymphozyten im Gate II	0,63	0,52	0,42	0,31			0,73	0,66

Eine signifikant größere IL-17<sup>+</sup> Zellfraktion fand sich bei RA-Patienten (0,66%  $\hat{=}$  39 Zellen) verglichen mit Gesunde( 0,27%  $\hat{=}$  19 Zellen) auch in den CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> NK-Zellen (Abb. 54C, Tab. 6). Ebenso berichteten in den letzten Jahren verschiedene andere Arbeitsgruppen<sup>(90),(12),(115)</sup>, dass NK-Zellen in der Lage sind IL-17 zu exprimieren.

Darüber hinaus fanden sich bei Patienten und Gesunden CD3<sup>-</sup> Zellen, die weder CD4, CD8 noch CD56 exprimierten. RA-Patienten (0,33%) scheinen unstimuliert eine signifikant größere IL-17<sup>+</sup> Fraktion dieser Zellen als Gesunde (0,19%) aufzuweisen. In einzelnen Testproben konnte gezeigt werden, dass diese Zellen hauptsächlich CD20<sup>+</sup> B-Zellen und CD14<sup>+</sup> Monozyten enthielten (Kap.3.3). Bisher war über B-Zellen, die in der Lage sind IL-17 zu sezernieren in der Literatur noch nicht berichtet worden. Monozyten sollen dagegen verschiedene Arbeitsgruppen<sup>(29),(99) (102),(115)</sup> zu Folge in der Lage sein IL-17 zu sezernieren

Inwieweit auch CD3<sup>-</sup> IL-17<sup>+</sup> Zellen für die Pathogenese der RA von Bedeutung sind, muss in weiteren Studien überprüft werden.

Ähnlich wie in der Studie von Yamada et al.<sup>(120)</sup> konnte auch in dieser Analyse der Frequenz an CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup> Zellen keine Korrelation zu den klinischen Parametern wie auch dem DAS28 gefunden werden (Kap. 3.5). Ebenso wenig ergaben sich auch Korrelationen der anderen nachgewiesenen IL-17<sup>+</sup> Zellpopulationen zu klinischen Parametern.

Bei der Bewertung der Ergebnisse dieser Studie muss berücksichtigt werden, dass alle untersuchten Patienten geringe oder mäßige Krankheitsaktivität aufwiesen, wie es auch in ihr niedriger DAS28 erkennen lässt (Tab.3, Kap.2.6). Es kommt hinzu, dass die Patienten verschiedene Therapien erhielten, die Einfluss auf IL-17<sup>+</sup> Zellpopulationen ausüben könnten. Der Einfluß der verschiedenen Therapien auf die einzelnen IL-17<sup>+</sup> Zellpopulationen konnte in

dieser Studie nicht evaluiert werden. Es konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass die Therapie mit Kortikosteroiden<sup>(18)</sup> und MTX<sup>(69)</sup> zu verringerten Frequenzen von IL-17<sup>+</sup> Zellen führen kann.

#### **4.4. Stimulierbarkeit der Zellpopulation**

Arbeiten von Ziolkowska et al.<sup>(126)</sup> und Lenarczyk et al.<sup>(56)</sup> hatten gezeigt, dass in humane PBMC sowohl mit PHA als auch mit PMA/Ionomycin die IL-17 Produktion stimuliert werden kann. In dieser Studie führte die Stimulationen mit PHA und mit PMA/Ionomycin auch zu einer Zunahme der IL-17<sup>+</sup> Zellfraktion. Dabei wurden nicht alle Subpopulationen in denen IL-17 detektiert wurde gleichermaßen durch die beiden Stimulanzen stimuliert. Ferner wurden auch Unterschiede zwischen Gesunden und RA-Patienten beobachtet.

So ließ sich die IL-17<sup>+</sup> Zellfraktion innerhalb der CD3<sup>+</sup> T-Zellen, wie dies auch von Lenarczyk et al.<sup>(56)</sup> beschrieben worden war, durch die unspezifische Mitogenstimulation mit PMA/Ionomycin zu einem höchst signifikanten IL-17 Anstieg ( $p < 0,0001$ ) im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollen stimulieren. Die Zunahme der IL-17<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> Zellen nach Stimulation mit PHA<sup>(113),(126)</sup> oder PMA/Ionomycin<sup>(63),(126)</sup> in PBMC von Gesunden in dieser Studie glichen dabei vorbeschriebenen Werten. Nach PMA/Ionomycin Stimulation ließen sich darüberhinaus auch IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>/IL-17<sup>+</sup> doppelt positive Zellen in der Zellpopulation der CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen finden (Abb. 59A). Ähnlich wie für die IL-17<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> Lymphozyten, waren nach unspezifischer Mitogenstimulation mit PMA/Ionomycin auch signifikant höhere Frequenzen an IL-17<sup>+</sup> Zellen in den CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T-Killer-Zellen (Abb. 52B) zu sehen. Ebenso konnten IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>/IL-17<sup>+</sup> doppelt positiven Zellen nach PMA/Ionomycin Stimulation in den CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Lymphozyten beobachtet werden (Abb. 59B).

Auch die Mitogenstimulation mit PHA führte, wie in der Literatur beschrieben,<sup>(13)</sup> zu einer signifikanten ( $p < 0,001$ ) Erhöhung der Frequenz doppelt positiver CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Zellen in den PBMC (Abb. 34). Der Anteil IL-17<sup>+</sup> Zellen an

dieser doppelt positiven Zellpopulation ließ sich durch Stimulation mit PHA (13,43%  $\cong$  106 Zellen absolut IL-17<sup>+</sup> Zellen) und mit PMA/Ionomycin (15,6%  $\cong$  65 Zellen absolut IL-17<sup>+</sup> Zellen) höchst signifikant ( $p < 0,0001$ ) im Vergleich zu den CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup> Lymphozyten und den unstimulierten Zellen steigern (Abb. 52A+C).

Insgesamt zeigte sich damit, dass in vitro die unspezifische Aktivierung mit PMA/Ionomycin bzw. die Mitogenstimulation mit PHA zu einem Anstieg der IL-17<sup>+</sup> Zellen in verschiedenen Subpopulationen der CD3<sup>+</sup> T-Zellen bei Gesunden und RA-Patienten führen konnte.

Auch innerhalb der CD3<sup>-</sup> Zellen ließ sich durch Mitogenstimulation mit PMA/Ionomycin eine Erhöhung der IL-17<sup>+</sup> Zellen anregen (Tab.6 & Abb. 53). Hingegen war innerhalb der CD3<sup>-</sup>/CD4<sup>+</sup> Zellen durch Stimulation mit PMA/Ionomycin eine deutlichen Abnahme der IL-17<sup>+</sup> Zellen zu beobachten. Bemerkenswerterweise stieg bei Gesunden die IL-17<sup>+</sup> Zellfraktion in der CD3<sup>-</sup>/CD56<sup>+</sup> NK-Zell-Population nach PMA/Ionomycin Stimulation signifikant an, während sie bei RA-Patienten abnahm.

Monozyten (CD3<sup>-</sup>/CD14<sup>+</sup>) wiesen nach PMA/Ionomycin Stimulation ein sehr viel höheren Anteil (22,3%) IL-17<sup>+</sup> Zellen (Abb. 69B) verglichen mit den unstimulierten CD3<sup>-</sup>/CD14<sup>+</sup> Zellen (5%) (Abb. 69B) auf. B-Zellen ließen sich nicht durch Mitogene stimulieren (Abb.69B).

Anders als die Stimulation mit PMA/Ionomycin führte PHA zu einer signifikanten Abnahme der IL-17<sup>+</sup> Zellen an den CD3<sup>-</sup> Zellpopulationen in PBMC von Gesunden und Patienten verglichen mit den unstimulierten Zellen (Tab.6 & Abb.53). Ob dies durch eine Reduktion/Apoptose oder durch eine Stimulation bzw. Differenzierung von T-Zellen bedingt war, konnte in dieser Studie nicht geklärt werden.

Die Stimulation mit HLA KI. II restringierten Peptiden, die vor allem aus

verschiedenen Virusproteinen abgeleitet waren führten in vitro zu keiner Veränderung der IL-17<sup>+</sup> Zellpopulationen. Dies lässt darauf schließen, dass eine HLA-abhängige antigen-spezifische Stimulation für die Aktivierung der IL-17<sup>+</sup> Zellen nicht ausreicht.

Es sind weitere Studien sowohl im Menschen als auch im Mausmodell nötig um die Bedeutung von IL-17 für die rheumatoiden Arthritis zu erfassen. Bei RA-Patienten Bedarf es zusätzlicher Untersuchungen, um die IL-17 produzierenden Zellen in ihrer Funktion, Regulation und Dynamik sowie den Einfluß der Therapie weiter zu beschreiben.

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass neben den bekannten Th17-Helfer-Populationen, die im Vergleich zu Gesunden bei RA-Patienten mit niedriger Krankheitsaktivität nicht signifikant erhöht war, bisher nicht klar differenzierte CD3<sup>+</sup> und CD3<sup>-</sup> PBMC im Blut von RA-Patienten an der Produktion von IL-17 beteiligt sind. Bezogen auf eine gleiche Anzahl von Ficoll isolierten mononukleären Zellen scheinen bei RA-Patienten zu einem signifikant erhöhten Anteil auch CD3<sup>-</sup> Populationen an der Synthese von IL-17 beteiligt zu sein. Hier könnten insbesondere auch NK-Zellen, CD3<sup>-</sup>/CD4<sup>+</sup> myelomonozytäre Zellen und B-Zellen für die Entwicklung der rheumatoiden Arthritis von Bedeutung sein. Zukünftige Arbeiten sollten daher auch die Frequenz und Dynamik der CD3<sup>-</sup> Zellpopulationen in Blut und entzündeten Gelenken berücksichtigen.

## 5. Zusammenfassung

IL-17 ist ein proinflammatorisches Zytokin, das vermehrt in der Synovialflüssigkeit sowie im Serum von RA-Patienten gefunden wurde und eine wichtige Rolle in der Pathogenese der RA spielen soll. Als zellulärer Ursprung von IL-17 wurde eine spezifische Th17 Zellpopulation beschrieben. Aber auch andere T- und nicht-T-Zellen wie NK-Zellen,  $\gamma\delta$ -Zellen, Neutrophile, Granulozyten und Monozyten sollen IL-17 produzieren können.

Diese Arbeit hatte zum Ziel, die Heterogenität Interleukin-17 produzierender Zellen bei Gesunden und RA-Patienten aufzuzeigen und nach ihrer Verteilung zu vergleichen. Darüber hinaus untersuchte diese Arbeit, ob IL-17<sup>+</sup> Zellpopulationen von Gesunden und RA-Patienten sich durch unspezifische Mitogenstimulation mit PHA und PMA/Ionomycin und spezifische Stimulation mit HLA KI.II restringierten Peptiden beeinflussen ließen.

Diese Studie konnte zeigen, dass nicht nur CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> Th<sub>17</sub> Zellen an der Produktion von IL-17 beteiligt sind, sondern die IL-17 produzierenden Zellen eine große Gruppe heterogener Zellen ist.

In dieser Arbeit ließ sich wie auch schon in anderen Arbeiten beobachten, dass PBMC von RA-Patienten mehr IL-17<sup>+</sup> Zellen als PBMC von Gesunden aufweisen. Bei Gesunden und RA-Patienten enthielten die CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> Th17-Zellen erwartungsgemäß die größte Population an IL-17<sup>+</sup> Zellen. Darüber hinaus konnten CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowie CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> doppelt positive Zellen als IL-17 Produzenten charakterisiert werden. Weiter zeigten auch CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup> NK-T-Zellen einen hohe Anteil IL-17<sup>+</sup> Zellen. Signifikante Unterschiede bezüglich des IL-17 Anteils zwischen Gesunden und RA-Patienten konnten in diesen CD3<sup>+</sup> T-Zellpopulationen jedoch nicht festgestellt werden.

Im Gegensatz dazu unterschieden sich CD3<sup>-</sup> Zellpopulationen bezüglich ihrer IL-17<sup>+</sup> Zellfraktionen von RA-Patienten und Gesunden signifikant. In diesen CD3<sup>-</sup> Zellpopulationen hatten RA-Patienten deutliche, teils signifikant größere IL-17 Zellfraktionen als Gesunde, weshalb sie eine besondere Rolle bei der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis spielen könnten. Diese CD3<sup>-</sup>/IL-17<sup>+</sup> Zellen konnten als NK-Zellen, CD3<sup>-</sup>/CD4<sup>+</sup> Zellen, B-Zellen und Monozyten charakterisiert werden. Auch durch ihre geringere Stimulierbarkeit bzw. gar Verminderung der IL-17 Zellfraktion nach Stimulation unterschieden sich diese CD3<sup>-</sup> Zellpopulationen von den CD3<sup>+</sup> T-Zellen der RA-Patienten. Welche pathogenetische Bedeutung bei der RA diese IL-17 produzierenden CD3<sup>-</sup> Zellen haben müssen weitere Studien jedoch erst noch zeigen.

## 6. Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
Ak	Antikörper
APC	Allophycocyanin
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
BFA	Brefeldin A
CCP	zyklische citrulinierter Peptide (engl. cyclic citrullinated peptide)
CD	Klassifikation von Oberflächenproteinen (engl. cluster of differentiation)
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankung
CIA	Collagen Induzierte Arthritis (Mausmodell für Rheumatoide Arthritis)
CRP	C-Reaktives Protein
CTLA	zytotoxisches T-Lymphozyten Antigen
DAS28	klinisches Punktesystem mit der Beurteilung von 28 Gelenken (disease activity score)
DC	dendritische Zellen (engl. dendritic cells)
DMSO	Dimethylsulfoxid
EAE	experimentelle autoimmune Encephalomyelitis (Mausmodell für Multiple Sklerose)
e.c.	Extrazellulär
et al.	und andere (Latein: et alii)
ER	endoplasmatisches Reticulum
EBV	Epstein-Barr-Virus
EMA	Ethidium-Mono-Azid
FACS	fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (engl. fluorescence-activated-cell-sorter)
FCS	fötale Kälberserum (engl. fetal calf serum)
FL	Fluoreszenzlicht
FSC	Vorwärtsstreuung (engl. forward scatter)
FITC	Fluorescein Isothiocyanat

g	Gramm
G	Fliehkraft
GP	gesunder Proband
h	Stunden
HCMV	humanes Cytomegalovirus
HLA	humanes Leukozyten Antigen
HVS	Herpes Virus Samiri
i.c.	intrazellulär
IFN- $\gamma$	Interferon-gamma
IL	Interleukin
J	Jahre
LASER	light amplification by stimulated emission of radiation
LPS	Lipopolysaccharid
MHC	major histocompatibility complex
mAb	monoklonaler Antikörper
MCP	Monozyten chemotaktisches Protein
Mio.	Million
min	Minuten
ml	Milliliter
Mon.	Monate
MTX	Methotrexate
$\mu$ l	Mikroliter
PBMC	periphere mononukleäre Blutzellen "peripheral blood mononuclear cells"
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung "phosphat buffered saline"
PCR	Polymerasekettenreaktion ("polymerase chain reaction")
pH	pondus Hydrogenii
PHA	Phytohämagglutinin
PE	Phycoerythrin
PerCP	Perinidin Chlorophyll Protein
PMA	phorbol-12-myristat-13-acetat

RA	rheumatoide Arthritis
SD	Standardabweichung
SSC	Seitwärtsstreulicht (engl. sideward scatter)
TCR	T-Zell-Rezeptor („T-cell-Rezeptor“)
TGF	Tumor Wachstumsfaktor („Tumor Growth Factor“)
TNF	Tumor Nekrosefaktor
T <sub>reg</sub>	regulatorische T-Zellen
TWEAK	TNF-artiger schwache Apoptose Auslöser (engl. TNF-like weak apoptosis inducator)

## Literaturverzeichnis

1. Aceves-Avila, F. J., Báez-Molgado, S., Medina, F. & Fraga, A. (1998). Paleopathology in osseous remains from the 16th century. A survey of rheumatic diseases *The Journal of Rheumatology* 25, 776-82.
2. Akimzhanov AM, Yang XO, Dong C (2007). Chromatin remodeling at (IL17-)IL-17F cytokine gene locus during inflammatory helper T cell differentiation. *J Biol Chem.* 282, 5969-72.
3. Aletaha D, Ward MM, Machold KP, Nell VPK, Stamm T, Smolen JS (2005). Remission and active disease in rheumatoid arthritis: Defining criteria for disease activity states. *Arthritis and Rheumatism* 52, 2625-2636.
4. Amberger M, Groll S, Günaydin I, Deuter C, Vonthein R, Kötter I (2007). Intracellular cytokine patterns in Behçet's disease in comparison to ankylosing spondylitis - influence of treatment with interferon- $\alpha$ 2a. *Clin Exp Rheumatol.* 4, S52-7.
5. Antonysamy MA, Fanslow WC, Fu F, Li W, Qian S, Troutt AB, Thomson AW (1999). Evidence for a role of IL-17 in organ allograft rejection: IL-17 promotes the functional differentiation of dendritic cell progenitors. *J Immunol.* 162, 577-584.
6. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS, et al. (1988). The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism* 31, 315-324.
7. Asquith DL, M. I. (2007). Emerging cytokine targets in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 19, 246-251.
8. Bang, K., Lund, M., Wu, K., Mogensen, S. C. & Thestrup-Pedersen, K. (2001). CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> (thymocyte-like) T lymphocytes present in blood and skin from patients with atopic dermatitis suggest immune dysregulation. *Br J Dermatol.* 144, 1140-7.
9. Bernstein, H. B., Plasterer, M. C., Schiff, S. E., Kitchen, C. M. R., Kitchen, S. & Zack, J.A. (2006). CD4 expression on activated NK cells: ligation of CD4 induces cytokine expression and cell migration. *J Immunol.* 177, 3669-76.

10. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441, 235-238.
11. Bettelli E, K. V. (2005). IL-12- and IL-23-induced T helper cell subsets: birds of the same feather flock together. *J Exp Med.* 201, 169-171.
12. Bird, L. (2008). NKT cells: NKT cells join the IL-17 gang. *Nat Rev Immunol.* 8, 324-324.
13. Blue, M. L., Daley, J. F., Levine, H., Craig, K. A. & Schlossman, S.F. (1986). Biosynthesis and surface expression of T8 by peripheral blood T4+ cells in vitro. *J Immunol.* 137, 1202-7.
14. Boyum A (1964). Separation of white blood cells. *Nature* 204, 793-794.
15. Burchill MA, Nardelli DT, England DM, DeCoster DJ, Christopherson JA, Callister SM, Schell RF (2003). Inhibition of interleukin-17 prevents the development of arthritis in vaccinated mice challenged with *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun.* 71, 3437-3442.
16. Chabaud M, Durand JM, Buchs N, Fossiez F, Page G, Frappart L, Miossec P (1999). Human interleukin-17: A T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum.* 42, 963-970.
17. Chabaud M, Page G, Miossec P (2001). Enhancing effect of IL-1, IL-17, and TNF-alpha on macrophage inflammatory protein-3alpha production in rheumatoid arthritis: regulation by soluble receptors and Th2 cytokines. *J Immunol.* 167, 6015-6020.
18. Chakir, J., Shannon, J., Molet, S., Fukakusa, M., Elias, J., Laviolette, M., Boulet, L. & Hamid, Q. (2003). Airway remodeling-associated mediators in moderate to severe asthma: effect of steroids on TGF-beta, IL-11, IL-17, and type I and type III collagen expression. *J Allergy Clin Immunol.* 111, 1293-8.
19. Davila E, Kang YM, Park YW, Sawai H, He X, Pryshchep S, Goronzy JJ, Weyand CM (2005). Cell-based immunotherapy with suppressor CD8+ T cells in rheumatoid arthritis. *J Immunol.* 174, 7292-7301.
20. De Rosa SC, Herzenberg LA, Herzenberg LA, Roederer M (2001). 11-color, 13-parameter flow cytometry: identification of human naive T cells by phenotype, function, and T-cell receptor diversity. *Nat Med.* 7, 245-248.
21. Ferretti S, Bonneau O, Dubois GR, Jones CE, Trifilieff A (2003). Il-17, produced by

lymphocytes and neutrophils, is necessary for lipopolysaccharide-induced airway neutrophilia: IL-15 as a possible trigger. *J Immunol.* 170, 2106-2112.

**22.** Fort MM, Cheung J, Yen D, Li J, Zurawski SM, Lo S, Menon S, Clifford T, Hunte B, Lesley R, Muchamuel T, Hurst SD, Zurawski G, Leach MW, Gorman DM, Rennick DM (2001). IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo. *Immunity* 15, 985-995.

**23.** Fossiez F, Djossou O, Chomarat P, Flores-Romo L, Ait-Yahia S, Maat C, Pin JJ, Garrone P, Garcia E, Saeland S, Blanchard D, Gaillard C, Das Mahapatra B, Rouvier E, Golstein P, Banchereau J, Lebecque S (1996). T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med.* 183, 2593-2603.

**24.** Fox DA (1997). The role of T cells in the immunopathogenesis of rheumatoid arthritis: new perspectives. *Arthritis and Rheumatism* 40, 598-609.

**25.** Fransen J, Creemers MCW, Van Riel PLCM (2004). Remission in rheumatoid arthritis: agreement of the disease activity score (DAS28) with the ARA preliminary remission criteria. *Rheumatology (Oxford, England)* 43, 1252-1255.

**26.** Fujino S, Andoh A, Bamba S, Ogawa A, Hata K, Araki Y, Bamba T, Fujiyama Y (2003). Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* 52, 65-70.

**27.** Fujiwara T, Oda K, Yokota S, Takatsuki A, Ikehara Y (1988). Brefeldin A causes disassembly of the Golgi complex and accumulation of secretory proteins in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 263, 18545-18552.

**28.** Gaffen, S. L. (2004). Biology of recently discovered cytokines: interleukin-17 -a unique inflammatory cytokine with roles in bone biology and arthritis. *Arthritis Res Ther.* 6, 240-7.

**29.** Gaston, J. S. H. (2008). Cytokines in arthritis -the 'big numbers' move centre stage. *Rheumatology (Oxford, England)* 47, 8-12.

**30.** Goronzy, J. J. & Weyand, C.M. (2005). Rheumatoid arthritis. *Immunol Rev.* 204, 55-73.

**31.** Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ (1987). The shared epitope hypothesis. an approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid

arthritis. *Arthritis and Rheumatism* 30, 1205-1213.

32. Han S, Zhang X, Marinova E, Ozen Z, Bheekha-Escura R, Guo L, Wansley D, Booth G, Fu Y, Zheng B (2005). Blockade of lymphotoxin pathway exacerbates autoimmune arthritis by enhancing the Th1 response. *Arthritis and Rheumatism* 52, 3202-3209.
33. Happel KI, Zheng M, Young E, Quinton LJ, Lockhart E, Ramsay AJ, Shellito JE, Schurr JR, Bagby GJ, Nelson S, Kolls JK (2003). Cutting edge: roles of Toll-like receptor 4 and IL-23 in IL-17 expression in response to *Klebsiella pneumoniae* infection. *J Immunol.* 170, 4432-4436.
34. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT (2005). Interleukin 17-producing CD4<sup>+</sup> effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol.* 6, 1123-1132.
35. Haudenschild D, Moseley T, Rose L, Reddi AH (2002). Soluble and transmembrane isoforms of novel interleukin-17 receptor-like protein by RNA splicing and expression in prostate cancer. *J Biol Chem.* 277, 4309-4316.
36. He, D., Wu, L., Kim, H. K., Li, H., Elmets, C. A. & Xu, H. (2006). CD8<sup>+</sup> IL-17-producing T cells are important in effector functions for the elicitation of contact hypersensitivity responses. *J Immunol.* 177, 6852-8.
37. Herzenberg LA, Parks D, Sahaf B, Perez O, Roederer M, Herzenberg LA (2002). The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from Stanford. *Clinical Chemistry* 48, 1819-1827.
38. Hizawa, N., Kawaguchi, M., Huang, S. & Nishimura, M. (2006). Role of interleukin-17F in chronic inflammatory and allergic lung disease. *Clin Exp Allergy.* 36, 1109-14.
39. Hofstetter, H. H., Lühder, F., Toyka, K. V. & Gold, R. (2006). IL-17 production by thymocytes upon CD3 stimulation and costimulation with microbial factors. *Cytokine* 34, 184-97.
40. Hsu Y, Li H, Hsieh M, Liu M, Huang K, Chin L, Chen P, Cheng H, Chang M (2006). Function of interleukin-20 as a proinflammatory molecule in rheumatoid and experimental arthritis. *Arthritis and Rheumatism* 54(9), 2722-2733.
41. Hwang S, K. H. (2005). Expression of il-17 homologs and their receptors in the

- synovial cells of rheumatoid arthritis patients. *Mol Cells*. 19, 180-184.
42. Joosten LAB, Netea MG, Kim S, Yoon D, Oppers-Walgreen B, Radstake TRD, Barrera P, van de Loo FAJ, Dinarello CA, van den Berg WB (2006). IL-32, a proinflammatory cytokine in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 103, 3298-3303.
43. Jovanovic DV, Di Battista JA, Martel-Pelletier J, Jolicoeur FC, He Y, Zhang M, Mineau F, Pelletier JP (1998). IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages. *J Immunol*. 160, 3513-3521.
44. Katz Y, Nativ O, Beer Y (2001). Interleukin-17 enhances tumor necrosis factor alpha-induced synthesis of interleukins 1,6, and 8 in skin and synovial fibroblasts: a possible role as a "fine-tuning cytokine" in inflammation processes. *Arthritis and Rheumatism* 44, 2176-2184.
45. Kim MR, Manoukian R, Yeh R, Silbiger SM, Danilenko DM, Scully S, Sun J, DeRose ML, Stolina M, Chang D, Van GY, Clarkin K, Nguyen HQ, Yu YB, Jing S, Senaldi G, Elliott G, Medlock ES (2002). Transgenic overexpression of human IL-17e results in eosinophilia, B-lymphocyte hyperplasia, and altered antibody production. *Blood* 100, 2330-2340.
46. Klatt T, Ouyang Q, Flad T, Koetter I, Bühring H, Kalbacher H, Pawelec G, Müller CA (2005). Expansion of peripheral CD8+ CD28- T cells in response to Epstein-Barr virus in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 32, 239-251.
47. Kolls, J. K. & Lindén, A. (2004). Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* 21, 467-76.
48. Kornfeld R, K. S. (1970). The structure of a phytohemagglutinin receptor site from human erythrocytes. *J Biol Chem*. 245, 2536-2545.
49. Korosec, P., Osolnik, K., Kern, I., Silar, M., Mohorcic, K. & Kosnik, M. (2007). Expansion of pulmonary CD8+CD56+ natural killer T-cells in hypersensitivity pneumonitis. *Chest* 132, 1291-7.
50. Kotake S, Udagawa N, Takahashi N, Matsuzaki K, Itoh K, Ishiyama S, Saito S, Inoue K, Kamatani N, Gillespie MT, Martin TJ, Suda T (1999). IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J*

*Clin Invest.* 103, 1345-1352.

- 51.** Kyoung-Woon Kim, Mi-La Cho, Mi-Kyung Park, Chong-Hyeon Yoon, Sung-Hwan Park, Sang- & Heon Lee and Ho-Youn Kim (2005). Increased interleukin-17 production via a phosphoinositide 3-kinase/Akt and nuclear factor  $\kappa$ B-dependent pathway in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 7, 139-148.
- 52.** Laan M, Cui ZH, Hoshino H, Lötval J, Sjöstrand M, Gruenert DC, Skoogh BE, Lindén A (1999). Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in the airways. *J Immunol.* 162, 2347-2352.
- 53.** Laan M, L. (2002). Il-17 as a potential target for modulating airway neutrophilia. *Curr Pharm Des.* 8, 1855-1861.
- 54.** Lee DM, S. P. (2003). Clinical utility of the anti-CCP assay in patients with rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis.* 62, 870-874.
- 55.** Lee J, Ho WH, Maruoka M, Corpuz RT, Baldwin DT, Foster JS, Goddard AD, Yansura DG, Vandlen RL, Wood WI, Gurney AL (2001). IL-17E, a novel proinflammatory ligand for the IL-17 receptor homolog IL-17rh1. *J Biol Chem.* 276, 1660-1664.
- 56.** Lenarczyk, A., Helsloot, J., Farmer, K., Peters, L., Sturgess, A. & Kirkham, B. (2000). Antigen-induced IL-17 response in the peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of healthy controls. *Clin Exp Immunol.* 122, 41-8.
- 57.** Li H, Chen J, Huang A, Stinson J, Heldens S, Foster J, Dowd P, Gurney AL, Wood WI (2000). Cloning and characterization of IL-17B and IL-17C, two new members of the IL-17 cytokine family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97, 773-778.
- 58.** Lindén A, Hoshino H, Laan M (2000). Airway neutrophils and interleukin-17. *Eur Respir J.* 5, 973-977.
- 59.** Lubberts E, Joosten LA, Oppers B, van den Bersselaar L, Coenen-de Roo CJ, Kolls JK, Schwarzenberger P, van de Loo FA, van den Berg WB (2001). IL-1-independent role of IL-17 in synovial inflammation and joint destruction during collagen-induced arthritis. *J Immunol.* 167, 1004-1013.
- 60.** Lubberts E, Koenders MI, Oppers-Walgreen B, van den Bersselaar L, Coenen-de Roo CJ, Joosten LAB, van den Berg WB (2004). Treatment with a neutralizing anti-

murine interleukin-17 antibody after the onset of collagen-induced arthritis reduces joint inflammation, cartilage destruction, and bone erosion. *Arthritis and Rheumatism* 50, 650-659.

**61.** Lubberts E, Koenders MI, van den Berg WB (2005). The role of T-cell interleukin-17 in conducting destructive arthritis: lessons from animal models. *Arthritis Res Ther.* 7, 29-37.

**62.** Lundy, S. K., Sarkar, S., Tesmer, L. A. & Fox, D.A. (2007). Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. T lymphocytes. *Arthritis Res Ther.* 9, 202.

**63.** Maek-A-Nantawat, W., Buranapraditkun, S., Klaewsongkram, J. & Ruxrungtham, K. (2007). Increased interleukin-17 production both in helper T cell subset Th17 and CD4-negative T cells in human immunodeficiency virus infection. *Viral Immunology* 20, 66-75.

**64.** Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO, Hatton RD, Wahl SM, Schoeb TR, Weaver CT (2006). Transforming growth factor-beta induces development of the T(h)17 lineage. *Nature* 441, 231-234.

**65.** Matusevicius D, Kivisäkk P, He B, Kostulas N, Ozenci V, Fredrikson S, Link H (1999). Interleukin-17 mrna expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 5, 101-104.

**66.** McKenzie BS, Kastelein RA, Cua DJ (2006). Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway. *Trends in Immunology* 27, 17-23.

**67.** Michel, J. J., Turesson, C., Lemster, B., Atkins, S. R., Iclozan, C., Bongartz, T., Wasko, M. C., Matteson, E. L. & Vallejo, A.N. (2007). CD56-expressing T cells that have features of senescence are expanded in rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism* 56, 43-57.

**68.** Miossec, P. (2003). Interleukin-17 in rheumatoid arthritis: if T cells were to contribute to inflammation and destruction through synergy. *Arthritis and Rheumatism* 48, 594-601.

**69.** Miranda-Carús M, Benito-Miguel M, Balsa A, Cobo-Ibáñez T, Pérez de Ayala C, Pascual-Salcedo D, Martín-Mola E (2006). Peripheral blood T lymphocytes from patients with early rheumatoid arthritis express RANKL and interleukin-15 on the cell surface and promote osteoclastogenesis in autologous monocytes. *Arthritis and*

*Rheumatism* 54, 1151-1164.

**70.** Mollenhauer HH, Morré DJ, Rowe LD (1990). Alteration of intracellular traffic by monensin; mechanism, specificity and relationship to toxicity. *Biochimica et Biophysica Acta* 1031, 225-246.

**71.** Moore EE, Presnell S, Garrigues U, Guilbot A, LeGuern E, Smith D, Yao L, Whitmore TE, Gilbert T, Palmer TD, Horner PJ, Kuestner RE (2002). Expression of IL-17b in neurons and evaluation of its possible role in the chromosome 5q-linked form of charcot-marie-tooth disease. *Neuromuscul Disord.* 12, 141-150.

**72.** Moseley TA, Haudenschild DR, Rose L, Reddi AH (2003). Interleukin-17 family and IL-17 receptors. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 14, 155-174.

**73.** Mosmann TR, C. R. (1987). Two types of mouse helper T-cell clone. *Immunology Today* 8, 223-227.

**74.** Mosmann TR, C. R. (1989). Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol.* 7, 145-173.

**75.** Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol.* 136, 2348-2357.

**76.** Möttönen M, Heikkinen J, Mustonen L, Isomäki P, Luukkainen R, Lassila O (2005). CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cells with the phenotypic and functional characteristics of regulatory T cells are enriched in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol.* 140, 360-367.

**77.** Munschauer, F. E., Stewart, C., Jacobs, L., Kaba, S., Ghorishi, Z., Greenberg, S. J. & Cookfair, D. (1993). Circulating CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in multiple sclerosis. *J Clin Immunol.* 13, 113-8.

**78.** Nakae S, Komiyama Y, Nambu A, Sudo K, Iwase M, Homma I, Sekikawa K, Asano M, Iwakura Y (2002). Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses. *Immunity* 17, 375-387.

**79.** Namekawa T, Wagner UG, Goronzy JJ, Weyand CM (1998). Functional subsets of CD4 T cells in rheumatoid synovitis. *Arthritis and Rheumatism* 41, 2108-2116.

**80.** O'Neil-Andersen NJ, L. D. (2002). Differential modulation of surface and

intracellular protein expression by T cells after stimulation in the presence of monensin or brefeldin A. *Clin Diagn Lab Immunol.* 9, 243-250.

- 81.** Ortolani, C., Forti, E., Radin, E., Cibin, R. & Cossarizza, A. (1993). Cytofluorimetric identification of two populations of double positive (CD4+,CD8+) T lymphocytes in human peripheral blood. *Biochem Biophys Res Commun.* 191, 601-9.
- 82.** Page, G., Sattler, A., Kersten, S., Thiel, A., Radbruch, A. & Miossec, P. (2004). Plasma cell-like morphology of Th1-cytokine-producing cells associated with the loss of CD3 expression. *Am J Pathol.* 164, 409-17.
- 83.** Paradowska, A., Maśliński, W., Grzybowska-Kowalczyk, A. & Łacki, J. (2007). The function of interleukin 17 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 55, 329-34.
- 84.** Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang Y, Wang Y, Hood L, Zhu Z, Tian Q, Dong C (2005). A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol.* 6, 1133-1141.
- 85.** Park W, Weyand CM, Schmidt D, Goronzy JJ (1997). Co-stimulatory pathways controlling activation and peripheral tolerance of human CD4+ CD28- T cells. *Eur J Immunol.* 27, 1082-1090.
- 86.** Patel, S. S., Wacholtz, M. C., Duby, A. D., Thiele, D. L. & Lipsky, P.E. (1989). Analysis of the functional capabilities of CD3+CD4-CD8- and CD3+CD4+CD8+ human T cell clones. *J Immunol.* 143, 1108-17.
- 87.** Pawlik A, Ostanek L, Brzosko I, Brzosko M, Masiuk M, Machalinski B, Gawronska-Szklarz B (2003). The expansion of CD4+CD28- T cells in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 5, R210-3.
- 88.** Perper SJ, Browning B, Burkly LC, Weng S, Gao C, Giza K, Su L, Tarilonte L, Crowell T, Rajman L, Runkel L, Scott M, Atkins GJ, Findlay DM, Zheng TS, Hess H (2006). Tweak is a novel arthritogenic mediator. *J Immunol.* 177, 2610-2620.
- 89.** Prevoo ML, van 't Hof MA, Kuper HH, van Leeuwen MA, van de Putte LB, van Riel PL (1995). Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 38, 44-48.
- 90.** Roark, C. L., Simonian, P. L., Fontenot, A. P., Born, W. K. & O'Brien, R.L. (2008).

- gammadelta T cells: an important source of IL-17. *Curr Opin Immunol.* 20, 353-7.
91. Rothschild BM, Turner KR, DeLuca MA (1988). Symmetrical erosive peripheral polyarthritis in the late archaic period of alabama. *Science* 241, 1498-1501.
92. Rouvier E, Luciani MF, Mattéi MG, Denizot F, Golstein P (1993). CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene. *J Immunol.* 150, 5445-5456.
93. Saag KG, Cerhan JR, Kolluri S, Ohashi K, Hunninghake GW, Schwartz DA (1997). Cigarette smoking and rheumatoid arthritis severity. *Ann Rheum Dis.* 56, 463-469.
94. Shi Y, Ullrich SJ, Zhang J, Connolly K, Grzegorzewski KJ, Barber MC, Wang W, Wathen K, Hodge V, Fisher CL, Olsen H, Ruben SM, Knyazev I, Cho YH, Kao V, Wilkinson KA, Carrell JA, Ebner R (2000). A novel cytokine receptor-ligand pair. Identification, molecular characterization, and in vivo immunomodulatory activity. *J Biol Chem.* 275, 19167-19176.
95. Shibata K, Yamada H, Hara H, Kishihara K, Yoshikai Y (2007). Resident  $\nu\{\delta\}1+$   $\{\gamma\}\{\delta\}$  T cells control early infiltration of neutrophils after Escherichia coli infection via IL-17 production. *J Immunol.* 178, 4466-4472.
96. Shin HC, Benbernou N, Esnault S, Guenounou M (1999). Expression of IL-17 in human memory CD45RO+ T lymphocytes and its regulation by protein kinase a pathway. *Cytokine* 11, 257-266.
97. Shin, H. C., Benbernou, N., Fekkar, H., Esnault, S. & Guenounou, M. (1998). Regulation of IL-17, IFN-gamma and IL-10 in human CD8(+) T cells by cyclic AMP-dependent signal transduction pathway. *Cytokine* 10, 841-50.
98. Silman AJ, Newman J, MacGregor AJ (1996). Cigarette smoking increases the risk of rheumatoid arthritis. Results from a nationwide study of disease-discordant twins. *Arthritis Rheum.* 39, 732-735.
99. Song, C., Luo, L., Lei, Z., Li, B., Liang, Z., Liu, G., Li, D., Zhang, G., Huang, B. & Feng, Z. (2008). IL-17-producing alveolar macrophages mediate allergic lung inflammation related to asthma. *J Immunol.* 181, 6117-24.
100. Sredni B, Tse HY, Schwartz RH (1980). Direct cloning and extended culture of antigen-specific MHC-restricted, proliferating T lymphocytes. *Nature* 283, 581-583.
101. Starnes T, Broxmeyer HE, Robertson MJ, Hromas R (2002). Cutting edge:IL-17D,

- a novel member of the IL-17 family, stimulates cytokine production and inhibits hemopoiesis. *J Immunol.* 169, 642-646.
- 102.** Starnes, T., Robertson, M. J., Sledge, G., Kelich, S., Nakshatri, H., Broxmeyer, H. E. & Hromas, R. (2001). Cutting edge: IL-17F, a novel cytokine selectively expressed in activated T cells and monocytes, regulates angiogenesis and endothelial cell cytokine production. *J Immunol.* 167, 4137-40.
- 103.** Stastny P (1978). Association of the B-cell alloantigen DRw4 with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med.* 298, 869-871.
- 104.** Symmons D, H. B. (2000). Early inflammatory polyarthritis: Results from the Norfolk arthritis register with a review of the literature. I. Risk factors for the development of inflammatory polyarthritis and rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford, England)* 39, 835-843.
- 105.** Taylor PC, Peters AM, Paleolog E, Chapman PT, Elliott MJ, McCloskey R, Feldmann M, Maini RN (2000). Reduction of chemokine levels and leukocyte traffic to joints by tumor necrosis factor alpha blockade in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism* 43, 38-47.
- 106.** Toh, M. & Miossec, P. (2007). The role of T cells in rheumatoid arthritis: new subsets and new targets *Current Opinion in Rheumatology* 19, 284-8.
- 107.** Toussirot E, W. D. (2007). The use of TNF-alpha blocking agents in rheumatoid arthritis: an update. *Expert Opin Pharmacother.* 8, 2089-2107.
- 108.** Udagawa, N., Kotake, S., Kamatani, N., Takahashi, N. & Suda, T. (2002). The molecular mechanism of osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.* 4, 281-9.
- 109.** Valencia X, Stephens G, Goldbach-Mansky R, Wilson M, Shevach EM, Lipsky PE (2006). Tnf downmodulates the function of human CD4+ CD25hi T-regulatory cells. *Blood* 108, 253-261.
- 110.** Van Bezooijen RL, Van Der Wee-Pals L, Papapoulos SE, Löwik CWGM (2002). Interleukin 17 synergises with tumour necrosis factor alpha to induce cartilage destruction in vitro. *Ann Rheum Dis.* 61, 870-876.
- 111.** Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B (2006). TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo

- differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 24, 179-189.
- 112.** Vergelli, M., Le, H., van Noort, J. M., Dhib-Jalbut, S., McFarland, H. & Martin, R. (1996). A novel population of CD4+CD56+ myelin-reactive T cells lyses target cells expressing CD56/neural cell adhesion molecule. *J Immunol.* 157, 679-88.
- 113.** Vernal, R., Dutzan, N., Chaparro, A., Puente, J., Antonieta Valenzuela, M. & Gamonal, J. (2005). Levels of interleukin-17 in gingival crevicular fluid and in supernatants of cellular cultures of gingival tissue from patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 32, 383-9.
- 114.** Warrington KJ, Takemura S, Goronzy JJ, Weyand CM (2001). CD4+,CD28- T cells in rheumatoid arthritis patients combine features of the innate and adaptive immune systems. *Arthritis Rheum.* 44, 13-20.
- 115.** Weaver, C. T., Hatton, R. D., Mangan, P. R. & Harrington, L.E. (2007). IL-17 Family Cytokines and the Expanding Diversity of Effector T Cell Lineages. *Annu Rev Immunol.* 25, 821-52.
- 116.** Weyand CM, Goronzy J, Fathman CG (1987). Modulation of CD4 by antigenic activation. *J Immunol.* 138, 1351-1354.
- 117.** Winchester R (1994). The molecular basis of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Adv Immunol.* 56, 389-466.
- 118.** Wong CK, Ho CY, Li EK, Lam CW (2000). Elevation of proinflammatory cytokine (IL-18, IL-17, IL-12) and Th2 cytokine (IL-4) concentrations in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 9, 589-593.
- 119.** Yachnin S, Allen LW, Baron JM, Svenson RH (1972). The potentiation of phytohemagglutinin-induced lymphocyte transformation by cell-cell interaction; a matrix hypothesis. *Cell Immunol.* 3, 569-589.
- 120.** Yamada, H., Nakashima, Y., Okazaki, K., Mawatari, T., Fukushi, J., Kaibara, N., Hori, A., Iwamoto, Y. & Yoshikai, Y. (2008). Th1 but not Th17 cells predominate in the joints of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 67, 1299-304.
- 121.** Yang, X. O., Chang, S. H., Park, H., Nurieva, R., Shah, B., Acero, L., Wang, Y., Schluns, K. S., Broaddus, R. R., Zhu, Z. & Dong, C. (2008). Regulation of inflammatory responses by IL-17F. *J Exp Med.* 205, 1063-75.
- 122.** Yao Z, Painter SL, Fanslow WC, Ulrich D, Macduff BM, Spriggs MK, Armitage

RJ (1995). Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells. *J Immunol.* 15, 5483-5486.

**123.** Yao Z, Spriggs MK, Derry JM, Strockbine L, Park LS, VandenBos T, Zappone JD, Painter SL, Armitage RJ (1997). Molecular characterization of the human interleukin (IL)-17 receptor. *Cytokine* 9, 794-800.

**124.** Ye P, Rodriguez FH, Kanaly S, Stocking KL, Schurr J, Schwarzenberger P, Oliver P, Huang W, Zhang P, Zhang J, Shellito JE, Bagby GJ, Nelson S, Charrier K, Peschon JJ, Kolls JK (2001). Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J Exp Med.* 194, 519-527.

**125.** Zhu, X., Mulcahy, L. A., Mohammed, R. A., Lee, A. H., Franks, H. A., Kilpatrick, L., Yilmazer, A., Paish, E. C., Ellis, I. O., Patel, P. M. & Jackson, A.M. (2008). IL-17 expression by breast-cancer-associated macrophages: IL-17 promotes invasiveness of breast cancer cell lines. *Breast Cancer Research : BCR* 10, R95.

**126.** Ziolkowska M, Koc A, Luszczkiewicz G, Ksiezopolska-Pietrzak K, Klimczak E, Chwalinska-Sadowska H, Maslinski W (2000). High levels of IL-17 in rheumatoid arthritis patients: IL-15 triggers in vitro IL-17 production via cyclosporin A-sensitive mechanism. *J Immunol.* 164, 2832-2838.

## **8. Danksagung**

Ich möchte mich bedanken bei Frau Prof. Müller für die Vergabe des Themas, die gute Betreuung und die ständige Unterstützung durch Rat und Tat.

Ein ganz besonderer Dank gilt Frau Ingeborg Steiert, welche mich mit viel Geduld und Einsatz unterstützt hat und die viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Prof. Kötter für die Kooperation und bei Schwester Gabi Reichert für die Koordination der Blutentnahmen der Patienten in der rheumatologischen Ambulanz, sowie bei den zahlreichen Patienten die sich zur Teilnahme an dieser Studie bereit erklärt haben.

Auch den Mitarbeitern der AG Pawelec und AG Klein, die für Fragen immer offen und hilfsbereit waren, gilt mein Dank.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen freiwilligen Probanden der Sektion, die sich trotz einiger Angst der Blutentnahme stellten.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei meiner geliebten Freundin Carolin Sixt für die stetige Unterstützung und Motivation.

Ein großer und besonderer Dank gilt auch meinen Eltern, die mir mein Studium ermöglichten und mich stetig unterstützt haben und mir diese Arbeit ermöglicht haben.

## 9. Lebenslauf

Paul Martin Schlegel  
geboren am 02.August 1982  
in Leipzig

### Schulischer und beruflicher Werdegang:

1989 – 1993	Schiller-Grundschule in Kornwestheim
1993 – 2002	Ernst-Sigle Gymnasium in Kornwestheim
Juni 2002	Abitur am Ernst-Sigle Gymnasium, Kornwestheim
2002 – 2004	Vorklinischer Abschnitt des Medizinstudiums an der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen
September 2004	Ärztliche Vorprüfung, 1.Staatsexamen
2004 – 2007	Klinischer Abschnitt des Medizinstudiums an der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen
2007/2008	Praktisches Jahr 1. Anästhesiologie – Universitätsklinik Tübingen 2. Innere Medizin – Université de Genève, Schweiz 3. Chirurgie – University of Stellenbosch, Südafrika
26. Mai 2009	Ärztliche Prüfung, 2.Staatsexamen