

Charakterisierung von T-Zellsubpopulationen bei Granulomatose mit Polyangiitis



DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Juliane Fazio

Kiel 2012

Referent: Professor Dr. Dr. h. c. Thomas Bosch

Korreferent: Professor Dr. Dieter Kabelitz

Tag der mündlichen Prüfung: 22.11.2012

Zum Druck genehmigt: 22.11.2012

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Granulomatose mit Polyangiitis	2
1.2	Regulatorische T-Zellen	9
1.3	$\gamma\delta$ T-Zellen	10
2	Fragestellung	13
3	Material	15
3.1	Chemikalien	15
3.2	Medien, Puffer und Lösungen	16
3.3	Zytokine und sonstige Stimuli	18
3.4	Plasmide, Primer und Enzyme	18
3.5	Kits	20
3.6	Antikörper	20
3.7	Spenderkollektive	22
4	Methoden	23
4.1	Molekularbiologische Methoden	23
4.2	Biochemische Methoden	28
4.3	Zellbiologische Methoden	32
5	Ergebnisse	39
5.1	Generierung Proteinase 3–spezifischer T-Zellen	39
5.1.1	Herstellung dendritischer Zellen aus Monozyten des peripheren Blutes	39
5.1.2	Expression von Proteinase 3 in DCs	40
5.1.3	Herstellung von rekombinanter Proteinase 3	42
5.1.4	<i>Ex vivo</i> Generierung von T-Zelllinien	44
5.1.5	Generierung von T _{EM} über wiederholte autologe Restimulation	47
5.2	Regulatorische T-Zellen bei GPA	53
5.2.1	Einfluss von regulatorischen T-Zellen auf die Proliferation PR3-spezifischer Zellen	55

5.3	$\gamma\delta$ T-Zellen bei GPA	61
6	Diskussion	69
6.1	Generierung (und Charakterisierung) Proteinase 3 –spezifischer Effektor Memory T-Zellen (T_{EM})	69
6.2	Regulatorische T-Zellen bei GPA	73
6.3	$\gamma\delta$ T-Zellen bei GPA	76
7	Zusammenfassung	83
8	Summary	84
9	Literaturverzeichnis	85
10	Anhang	98
10.1	Danksagung	98
10.2	Curriculum vitae	99
10.3	Erklärung	101

Abkürzungen

AAV	ANCA-assoziierte Vaskulitiden
Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
ANCA	Antineutrophile zytoplasmatische Autoantikörper
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
APC	Allophycocyanin
β-ME	β-Mercaptoethanol
BrHPP	Bromo-Hydrin-Pyrophosphat
BSA	<i>bovine serum albumine</i> (Rinderserumalbumin)
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cpm	<i>counts per minute</i>
CS	chronische Sinusitis
CSS	Churg-Strauss Syndrom
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DC	<i>dendritic cell</i> (Dendritische Zelle)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
EBV	Epstein-Barr Virus
ECL	<i>Enhanced chemoluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> (Enzymgekoppelte immunchemische Analyse)
FACS	Fluoreszenz-aktivierter Zellsorter
FKS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	<i>forward scatter</i> (Vorwärtsstreulicht)
GFP	Grünfluoreszierendes Protein
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor
GPA	Granulomatose mit Polyangiitis
GS	gesunde Spender
HLA	Humane Leukozyten-Antigene
Ig	Immunglobulin
IFN-γ	Interferon-γ
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
LPS	Lipopolysaccharid
LRS	Leukozytenrückhaltesystem
MACS	Magnet-aktivierter Zellsorter
mAk	monoklonaler Antikörper
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MICA/B	<i>MHC I-related chain A/B</i>
MPA	Mikroskopische Polyangiitis
MS	Multiple Sklerose
PBMZ	periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
PFA	Paraformaldehyd
PHA	Phytohämagglutinin

PI	Propidiumjodid
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
RT	Raumtemperatur
SA	Streptavidin
SCDA	<i>Standard cell dilution analysis</i> (Standard-Zellverdünnungsanalyse)
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SE	Staphylococcus Enterotoxin
SLE	Systemischer Lupus Erythematoses
SSC	<i>side scatter</i> (Seitwärtsstreulicht)
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor α
TT	Tetanustoxoid
TZR	T-Zellrezeptor
üN	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
Z α M	Ziege-anti-Maus

1 Einleitung

Um sich vor Infektionen durch z.B. Bakterien oder Viren zu schützen, verfügt der Mensch über zwei Arme des Immunsystems, das angeborene und das adaptive Immunsystem. Zu dem angeborenen Immunsystem gehört u.a. auch die natürliche Schutzbarriere, welche von Haut und Schleimhäuten gebildet wird. Die zellulären Bestandteile dieses Teils der Abwehr bilden Makrophagen, dendritische Zellen (DCs), Monozyten, Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und Granulozyten, die wiederum unterteilt werden in Neutrophile, Eosinophile und Basophile. Granulozyten können u.a. antimikrobielle Peptide produzieren, die eine wichtige Rolle in der frühen Immunabwehr gegenüber mikrobiellen Erregern spielen. Weiterhin ist das Komplementsystem ein wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems.

Die zweite Achse der Immunabwehr bildet das adaptive Immunsystem, bestehend aus T- und B-Lymphozyten (T- bzw. B-Zellen). Überwinden Erreger die Abwehr des angeborenen Immunsystems, wird das adaptive Immunsystem aktiviert. Es werden dann u.a. zwei Gruppen von T-Zellen aktiviert. Diese können durch die Oberflächenexpression der Korezeptoren CD4 und CD8 (CD steht für *cluster of differentiation*) unterschieden werden. Die CD8 exprimierenden T-Zellen wirken nach Aktivierung direkt zytotoxisch, indem sie die infizierte Zelle lysieren. Die zweite große Gruppe von T-Zellen sind die CD4-positiven T-Zellen, welche auch als T-Helferzellen (Th) bezeichnet werden. CD4⁺ T-Zellen können abhängig von ihrem Zytokinmuster in funktionelle Untergruppen eingeteilt werden, die u.a. Th1, Th2 und Th17 Zellen einschließen. CD8⁺ T-Zellen erkennen ihr Antigen im Kontext von MHC-I-Molekülen, während CD4⁺ T-Zellen die Präsentation von Peptiden über den MHC-II-Komplex von Antigen-präsentierenden Zellen benötigen. Neben CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen existieren außerdem CD4 und CD8 doppelt negative $\gamma\delta$ T-Zellen, die in Kapitel 1.3 genauer erläutert werden.

Das Immunsystem schützt nicht nur vor Infektionen durch Krankheitserreger, sondern löst u.a. auch allergische Reaktionen aus und kann sich, wenn es falsch gesteuert oder nicht ausreichend kontrolliert wird, auch gegen körpereigene Antigene richten und dann eine Autoimmunerkrankung verursachen [1].

1.1 Granulomatose mit Polyangiitis

Die Granulomatose mit Polyangiitis (GPA) ist eine Autoimmunerkrankung mit bisher ungeklärter Ursache. Erstmals beschrieben wurde die Erkrankung 1931 von Karl Heinz Klinger als eine besondere Ausprägung der Krankheit Periarteriitis Nodosa [2]. Friedrich Wegener beschrieb ein detaillierteres Krankheitsbild und grenzte es von der Periarteriitis Nodosa ab [3, 4]. Die Bezeichnung Wegener'sche Granulomatose wurde 1954 durch Gabriel Godman und Jacob Churg eingeführt [5]. Die Leitung des American College of Rheumatology, der American Society of Nephrology und der European League Against Rheumatism (EULAR) änderten den Namen der Erkrankung 2011 in „Granulomatose mit Polyangiitis“ [6].

Die GPA gehört zu den primären systemischen Vaskulitiden (PSV), einer Gruppe seltener entzündlicher Blutgefäßerkrankungen, die nach den Definitionen der Chapel Hill Consensus Conference von 1992 unterteilt werden [7]. Hierzu gehören u.a. auch das Churg-Strauss Syndrom (CSS), die Takayasu's Arteriitis und Panarteritis Nodosa.

PSV kommen in Schleswig-Holstein mit einer Häufigkeit von ca. 46 Fällen pro 1 Million Einwohner pro Jahr vor, ANCA (*Antineutrophile cytoplasmatische Autoantikörper*) - assoziierte Vaskulitiden (AAV) haben eine Verbreitung von ca. 12 Fällen pro 1 Million Einwohner pro Jahr. Den größten Anteil macht dabei die GPA aus mit im Mittel 8,5 Erkrankungen pro 1 Million Einwohner pro Jahr. Die Häufigkeit der Erkrankungen steigt mit dem Alter an, so haben Personen über 50 Jahren 2 - 5-mal so häufig GPA wie Personen unter 50 Jahren. Eine signifikant unterschiedliche Häufigkeitsverteilung zwischen Männern und Frauen konnte bisher nicht gezeigt werden [8, 9].

Zu der Gruppe der AAV werden neben GPA u.a. auch das Churg-Strauss Syndrom (CSS) und die Mikroskopische Polyangiitis (MPA) gezählt [10]. Bei dieser Art der Autoimmunerkrankung kommt es zur Bildung von Antineutrophilen zytoplasmatischen Autoantikörpern (ANCA). In den meisten Fällen von GPA ist das Zielantigen der sog. cANCA (in Ethanol-fixierten Färbungen zytoplasmatisch (englisch: *cytoplasmic*) lokalisierte ANCA) die Proteinase (PR) 3, in einigen wenigen Fällen der generalisierten GPA finden sich pANCA gegen die Myeloperoxidase (MPO). pANCA sind perinukleär lokalisiert und in der Regel nicht gegen PR3 gerichtet. Sie finden sich häufiger bei dem Churg-Strauss-Syndrom oder bei der Mikroskopischen Polyangiitis [11].

Zu Beginn einer GPA handelt es sich meist um eine lokalisierte Form der Erkrankung, das heißt in bestimmten Geweben finden Entzündungsprozesse statt und es bilden sich dort

Granulome. Diese Gewebeneubildungen treten in der Initialphase der GPA besonders häufig in den oberen Atemwegen auf und bestehen vor allem aus Makrophagen und daraus abgeleiteten Zellen, aber auch aus neutrophilen Granulozyten, dendritischen Zellen (DCs), T- und B-Zellen, wie in Abb. 1 dargestellt [12, 13].

Im weiteren Verlauf der Krankheit kann diese sich auf den gesamten Organismus ausbreiten, man spricht dann von systemischer oder generalisierter GPA. Bei fast 80 % der Patienten entwickelt sich aus der lokalisierten Form der Erkrankung eine generalisierte GPA [14]. Neben der Bildung von Granulomen kommt es dann auch zu Entzündungen der kleineren Gefäße, wie kleineren Arterien, Venen und Kapillaren. Besonders typisch für die GPA ist die sog. Wegener-Trias, die Entwicklung einer nekrotisierenden Glomerulonephritis, sowie Vaskulitis und Granulombildungen in der Lunge als Krankheitsbild. Bleibt die Krankheit unbehandelt, so führt sie in 90 % der Fälle innerhalb von zwei Jahren zum Tod [15].

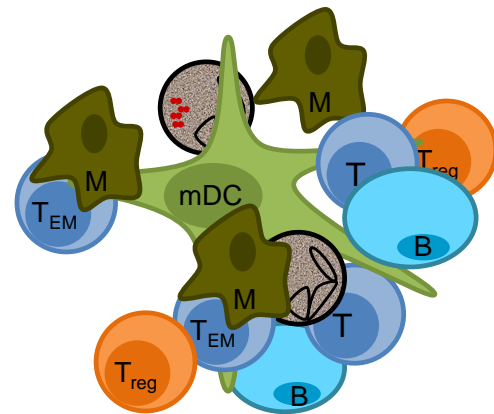


Abb. 1: Zelluläre Zusammensetzung eines Granuloms, bestehend aus Makrophagen, DCs, Neutrophilen, T- und B-Zellen.

Im lokalisierten Stadium der GPA weisen nur ca. 50 % der Fälle ANCA gegen das Autoantigen PR3 auf, im späteren generalisierten Stadium können bei bis zu 95 % der Patienten PR3-ANCA nachgewiesen werden [16]. Einen pathogenen Einfluss der ANCA auf den Verlauf der GPA konnte man bis heute nicht nachweisen, es gibt aber verschiedene Sachverhalte, die auf die wichtige Rolle der PR3-ANCA hindeuten [17]. Die Korrelation von ANCA-Titern im Serum von GPA-Patienten mit der Krankheitsaktivität bleibt umstritten. Es konnte aber in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass der Titer der PR3-ANCA in vielen Fällen ansteigt, kurz bevor der Patient einen Rückfall hat [18, 19], in anderen Untersuchungen konnte dieser Zusammenhang so nicht bestätigt werden [20].

Die Diagnostik der GPA ist häufig schwierig und erfolgt in einigen Fällen erst Jahre nach der ersten Manifestation der Krankheit. Für eine Diagnose der Erkrankung müssen immer mehrere Parameter untersucht werden. Neben der Analyse von serologischen Parametern wird vor allem die Spezifität der ANCA festgestellt. Diese sollte für eine hohe diagnostische Sicherheit immer über indirekte Immunfluoreszenz, also histologisch, und über ELISA ermittelt werden [21, 22]. Handelt es sich um ANCA negative Patienten, wird eine Diagnose umso schwieriger, daher werden gerade lokalisierte Erkrankungen oft erst spät erkannt. Weiterhin spielt natürlich der Organbefall eine Rolle bei der Diagnostik einer GPA. Für die Untersuchung des Organbefalls werden klinisch Magnet-Resonanz-Tomographie oder

Computer-Tomographie eingesetzt. Für die Bestätigung einer Vaskulitis werden Biopsien herangezogen, und besonders Biopsien des oberen Respirationstraktes bieten hier eine gute Möglichkeit zum Nachweis granulomatöser Entzündungen. Häufig werden außerdem Biopsien der Niere und der Haut untersucht.

Die Therapie einer GPA wird nach den Maßstäben des BVAS (Birmingham Vasculitis Activity Index) eingeleitet, welcher nach klinischen Merkmalen und Laborwerten eine Vaskulitisaktivität ermittelt [23]. Die Ausbreitung der Erkrankung (DEI, Disease Extension Index) berücksichtigt außerdem den Organbefall. Um eine Remission der GPA zu erreichen, wird zu Therapiebeginn in den meisten Fällen eine Kombination aus Cyclophosphamid und Corticosteroiden gegeben. Für den Erhalt der Remission wird die Therapie häufig auf Corticosteroide und Azathioprin umgestellt. Alternativ wird in einigen Fällen Methotrexat oder Leflunomid verabreicht. Im frühen Stadium der lokalisierten GPA reicht häufig eine Behandlung mit Trimethoprim-sulfamethoxazol zur Einleitung einer Remission aus [16].

Genetische Assoziationen bei der GPA bestehen vor allem zu einer Region auf dem Chromosom 6p21.3, welche unter anderem das Haupthistokompatibilitätsgen für HLA-DRB1*0401 enthält [24]. Es gibt außerdem Zusammenhänge von GPA bei ANCA-positiven Patienten mit Polymorphismen im Gen des Proteins Protein-Tyrosin-Phosphatase Non-Rezeptor (PTPN) 22, sowie Assoziationen von GPA mit einer verringerten Kopienanzahl des Fc γ -Rezeptors IIIb [25, 26].

Das Autoantigen Proteinase 3

Das Autoantigen der GPA, die PR3, wurde 1989 von Niles et al. identifiziert [27]. Es handelt sich bei diesem Protein um eine von vier homologen Serinproteasen, die in den azurophilen Granula von Neutrophilen und Monozyten vorkommen. Die Transkription der PR3-mRNA erfolgt nur während der frühen Stadien myeloider Differenzierung, in den ausgereiften Granulozyten und Monozyten ist die Transkription herunter reguliert und es wird keine neue PR3 nachproduziert. Das aus der mRNA abgelesene Protein besteht aus 222 Aminosäuren und enthält neben einer Signalsequenz außerdem noch ein Propeptid. Diese sogenannte Präpro-Form des Proteins wird in mehreren Schritten zu einem reifen Enzym prozessiert. Durch die Translokation des Proteins in das Endoplasmatische Retikulum (ER) wird die Signalsequenz abgetrennt, es kommt zu Glykosylierungen im ER und im Golgi-Apparat. Nach der Entfernung des Propeptids kann sich die Substratbindestelle zusammenlagern und das Protein erhält seine enzymatisch aktive Konformation. Erst durch die Translokation der PR3 in ein Kompartiment mit neutralem pH-Wert wird die PR3 wirklich aktiv [28].

Die PR3 ist ein multifunktionelles Protein, welches in Wachstum und Differenzierung myeloider Zellen involviert ist. Es kann antibiotische Wirkung haben und reguliert die Aktivität diverser Zytokine, wie z.B. IL-32, und Chemokine durch Proteolyse [29]. Weiterhin interagiert die PR3 mit Oberflächenrezeptoren, wie z.B. PAR (*protease-activated receptor*) auf DCs, wodurch es zur Zellaktivierung und anschließender Zytokinfreisetzung kommen kann [30].

Eine von vielen Eigenschaften der PR3 ist die Zerstörung phagozytierter Mikroben, besonders *Escherichia coli* aber auch *Streptococcus faecalis* und *Candida albicans*. Auch der Abbau von Proteinen der Extrazellulären Matrix, wodurch diese von Neutrophilen passiert werden kann, gehört zu den Funktionen des Enzyms. Auf einem Teil der neutrophilen Granulozyten liegt die PR3 auch an die Membran gebunden vor, diese Bindung erfolgt über den Rezeptor NB1 (Neutrophiles Glykoprotein 1) [31]. Auch im Zytoplasma und auf der Zellmembran humaner Endothelzellen konnte Proteinase 3 nachgewiesen werden [32].

Die Frühpathogenese der GPA

Der Auslöser für die Erkrankung ist bis heute nicht gefunden worden. Man vermutet aber, dass es einen Zusammenhang zwischen einer bakteriellen Infektion und der Entwicklung von GPA geben könnte. Die stärkste Korrelation wurde dabei zu einer Infektion mit *Staphylococcus aureus* festgestellt. So konnten unter anderem Stegeman et al. 1994 bei GPA-Patienten eine erhöhte Rate von Besiedelungen der Nase mit *S. aureus* zeigen [33].

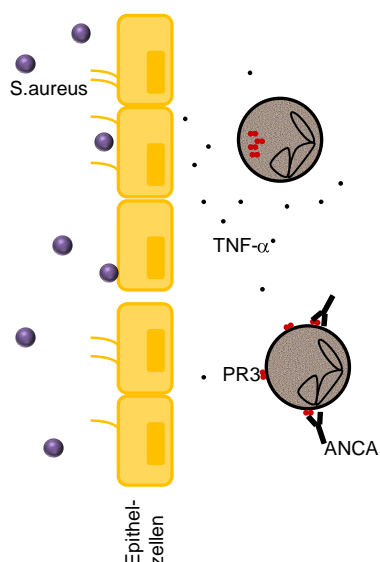


Abb. 2: Initiale Besiedelung mit *S. aureus* mit anschließender Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten.

Laudien et al. konnten diese Beobachtung im Vergleich zu Patienten mit Rheumatoider Arthritis, einer ebenfalls entzündlichen Autoimmunerkrankung, und solchen mit chronischer Sinusitis, einer Erkrankung der oberen Atemwege, die nicht systemisch auftritt, bestätigen. Laudien et al. konnten in dieser Arbeit bei 72 % der GPA-Patienten eine Besiedelung der Nase mit *S. aureus* zeigen und fanden außerdem eine erhöhte Rückfallrate bei diesen Patienten [34]. Weiterhin wurden Zusammenhänge zwischen Infektionen mit *Helicobacter pylori* und GPA gefunden [35]. Die Tatsache, dass eine antibakterielle Behandlung den Patienten, besonders solchen mit lokalisierter GPA, hilft und das Rückfallrisiko senkt, unterstützt die Annahme, dass eine Infektion der Auslöser für GPA sein könnte [36, 37]. Ulrich et al. konnten

Beeinträchtigungen der Cilienfunktionen in der Nasenschleimhaut von GPA-Patienten zeigen [38]. Es wird weiterhin vermutet, dass diese bakterielle Besiedelung u.a. mit *S. aureus* am respiratorischen Epithel zu einer Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten als erster Verteidigungslinie gegen die Infektion führt (siehe hierzu auch Abb. 2).

Die Rolle neutrophiler Granulozyten in der frühen Pathogenese der GPA wurde bereits intensiv untersucht. Falk et al. fanden über *in vitro* Studien heraus, dass Neutrophile durch ANCA aktiviert werden können und daraufhin reaktive Sauerstoffspezies und lytische

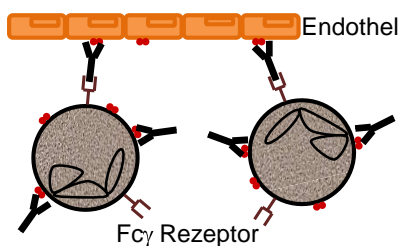


Abb. 3: Mögliche Interaktion von neutrophilen Granulozyten mit Endothelzellen

Enzyme freisetzen. Die Neutrophilen müssen voraktiviert sein, um so auf die ANCA-Interaktion reagieren zu können. Eine Voraktivierung der Zellen kann durch geringe Mengen proinflammatorischer Zytokine, wie $\text{TNF-}\alpha$ oder $\text{IL-1}\beta$ hervorgerufen werden und unter anderem zu einer Oberflächenexpression von PR3 auf den Neutrophilen führen [39]. An die so exponierte, membrangebundene PR3 und die ebenfalls auf der Oberfläche von Neutrophilen exprimierten $\text{Fc}\gamma$ -Rezeptoren können dann die ANCA binden und die Neutrophilen vollständig aktivieren [40]. Bei Patienten mit GPA konnte bereits eine erhöhte Oberflächenexpression von PR3 auf Neutrophilen nachgewiesen und mit einem gesteigerten Rückfallrisiko in Verbindung gebracht werden [41, 42]. Die für die Voraktivierung der Neutrophilen benötigten proinflammatorischen Zytokine könnten durch eine bakterielle Infektion provoziert werden. Kessenbrock et al. konnten zeigen, dass Neutrophile nach ANCA-Aktivierung sog. „Neutrophil Extracellular Traps“ (NETs) freisetzen, welche unter anderem auch das Autoantigen PR3 enthalten [43]. Die aus den Granula der Neutrophilen freigesetzten Enzyme, u.a. PR3, und reaktive Sauerstoffspezies führen im weiteren Verlauf zur Schädigung von Endothelzellen. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass PR3 auch auf Endothelzellen selbst exprimiert wird und dass Neutrophile nach ANCA-Aktivierung an Endothelzellen binden können (Abb. 3) [44, 32].

In das entzündete Gewebe werden dann weitere Leukozyten rekrutiert. Die hier frei vorliegende PR3 aus den Granula der Neutrophilen kann von Antigen-präsentierenden Zellen aufgenommen und prozessiert werden, wodurch Antigen-spezifische T-Zellen aktiviert werden können.

Csernok et al. haben festgestellt, dass DCs über ihren Rezeptor PAR-2 von PR3 aktiviert werden und dadurch von immaturren (iDCs) zu muren DCs (mDCs) ausdifferenzieren können. Während dieser Reifung können die iDCs die PR3 aufnehmen und prozessieren

und nach erfolgter Reifung im Kontext von MHCII-Komplexen präsentieren (Abb. 4). Dadurch werden vor allem Th1 Typ $CD4^+$ T-Zellen aktiviert, welche $IFN\gamma$ sezernieren [45].

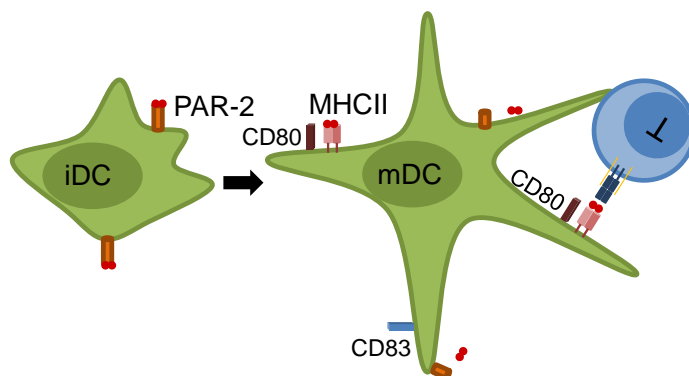


Abb. 4: **Reifung dendritischer Zellen über den PAR-2-Rezeptor** und Präsentation des Autoantigens PR3 an T-Zellen

Die erfolgreiche Behandlung von GPA-Patienten mit Antikörpern gegen T-Zellen hat gezeigt, welche bedeutende Rolle diese Zellen im Krankheitsverlauf spielen müssen [46].

In den granulomatösen Läsionen von GPA-Patienten konnten T-Zellen nachgewiesen werden. Nach Stimulation mit PR3 konnte auch die Proliferation von $CD4^+$ T-Zellen beobachtet werden. Die Frequenz von diesen PR3-spezifischen T-Zellen im Blut ist aber sehr gering [47-49]. Unabhängig von der Krankheitsaktivität wurden bei GPA-Patienten relativ und absolut verminderte Anzahlen von $CD4^+$ T-Zellen gefunden. Dies könnte auf die Rekrutierung der Zellen zu den erkrankten Geweben zurückzuführen sein, aber auch durch die Behandlung mit immunsupprimierenden Medikamenten bedingt sein [50]. Durch diese Reduktion ergibt sich ein verschobenes Verhältnis von $CD4^+$ zu $CD8^+$ T-Zellen und dadurch relativ erhöhte $CD8^+$ T-Zellzahlen. Ferner wurde bei GPA eine expandierte Subpopulation von $CD8^+CD28^+CD11b^+$ T-Zellen gefunden, welche *ex vivo* $IFN-\gamma$ produzieren [51]. Es konnten außerdem insgesamt Veränderungen bei den $CD4^+$ T-Zellen bei GPA verglichen mit gesunden Kontrollen nachgewiesen werden. Naive $CD4^+$ T-Zellen sind im Blut der Patienten vermindert, während $CD4^+$ T-Zellen des Effektor Memory Phänotyps (T_{EM}) dauerhaft expandiert sind [52]. Weiterhin wurde eine expandierte Population von $CD4^+$ T-Zellen gefunden, die kein CD28 exprimierten. Auf diesen Zellen wurde eine erhöhte Expression des späten Differenzierungsmarkers CD57 nachgewiesen und das Fehlen des Chemokinrezeptors CCR7 [53, 54]. Der Nachweis verkürzter Telomere bei einigen T-Zellen deutet ebenfalls auf eine andauernde Aktivierung und Zellteilung einiger T-Zellklone bei GPA hin [55]. Befinden sich GPA-Patienten in einer aktiven Phase der Erkrankung, so zeigt sich die Population dieser T_{EM} im Blut vermindert, übereinstimmend mit einer mutmaßlichen Wanderung dieser Zellen hin zu den entzündeten Geweben [56]. Weitere Veränderungen des Phänotyps der T_{EM} aus GPA-Patienten deuten auf ein mögliches zytotoxisches Potential

dieser Zellen hin, wie zum Beispiel auch die Oberflächenexpression des NKG2D-Moleküls, einem aktivierenden Rezeptor, der ursprünglich auf NK-Zellen gefunden wurde. NKG2D könnte auf diesen Zellen als Ersatz für den fehlenden kostimulatorischen Rezeptor CD28 dienen, indem er nach der Interaktion mit seinem Liganden die Zellen aktiviert. Der Ligand des NKG2D-Rezeptors, MIC A (*MHC Class 1 chain related molecule A*), wird u. a. auf Fibroblasten und Epithelzellen nach Stress oder Zellverletzungen exprimiert und könnte so den Zusammenhang zwischen aktivierten NKG2D⁺ CD4⁺ T_{EM} und den Gewebeschäden während der Vaskulitiserkrankung erklären [57]. In den CD4⁺ CD28⁻ T_{EM} wurde außerdem das Enzym Perforin gefunden, welches normalerweise in zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen und NK-Zellen vorkommt [53]. Im Zusammenhang mit Systemischem Lupus Erythematoses (SLE) wurde Perforin aber auch erhöht in CD4⁺ T-Zellen gefunden [58].

CD4⁺ T-Zellen lassen sich funktionell u.a. in Th1, Th2 und Th17 Zellen unterteilen. Th1 T-Zellen produzieren vor allem das Zytokin IFN- γ und übernehmen ihre Aufgaben im Rahmen der zellulären Immunantwort, während Th2 T-Zellen überwiegend das Zytokin IL-4 produzieren und in der Regulation der humoralen Immunantwort mitwirken. Bei Patienten mit GPA wurde vermehrt das Th1-Zytokin IFN- γ und weniger IL-4 in den granulomatösen Geweben gefunden [59, 60]. In verschiedenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass bei Patienten mit lokalisierter GPA das Th1-Zytokinmuster überwiegt, während bei Patienten mit aktiver Erkrankung im generalisierten Stadium eher ein Th2-Zytokinmuster vorliegt. Dieses Ergebnis ergab sich sowohl aus der Analyse von Patientenseren, als auch aus Untersuchungen von nasalem Granulomgewebe [61-65]. Popa et al. haben gezeigt, dass die Stimulation mit dem Autoantigen PR3 eine Th2-Antwort provoziert [48]. Die dritte Subpopulation, die proinflammatorischen Th17 T-Zellen, produzieren vor allem die Zytokine IL-17 und IL-22 und wurden besonders in letzter Zeit im Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen genauer untersucht. Bisher konnten keine Th17-Zellen in den entzündlichen Geweben von GPA-Patienten nachgewiesen werden. Abdulahad et al. konnten aber einen erhöhten Anteil von Th17-Zellen im Blut von GPA-Patienten nachweisen [66]. Sie konnten außerdem Autoantigen-spezifische Th17-Zellen vermehrt bei ANCA-positiven Patienten nachweisen.

Aktivierte Th1 T-Zellen produzieren IL-2, TNF- α und IFN- γ und induzieren die Reifung von Makrophagen. Das Zytokin IL-12 induziert eine Differenzierung in Th1-Zellen und es konnte gezeigt werden, dass Monozyten aus GPA-Patienten erhöhte Mengen dieses Zytokins produzieren, verglichen mit gesunden Kontrollen [67]. Die Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen ist ein weiterer Schritt auf dem Weg zur Granulombildung und Gewebedestruktion.

1.2 Regulatorische T-Zellen

Regulatorische T-Zellen (Treg) sind CD4⁺ T-Zellen, die u.a. durch starke Expression der α -Kette des IL-2-Rezeptors (CD25) auf ihrer Oberfläche gekennzeichnet sind. Sie werden als CD4⁺CD25^{high} Treg-Zellen definiert. Sie reifen im Thymus und haben, genau wie konventionelle T-Zellen, eine durch den T-Zellrezeptor (TZR) definierte Spezifität für je ein bestimmtes Antigen. Während der Reifung von T-Zellen im Thymus werden solche mit einer starken Reaktivität auf körpereigene Antigene normalerweise aussortiert („negative Selektion“) und gelangen somit nicht in das periphere Immunsystem. Treg hingegen erkennen körpereigene Antigen-MHC-Komplexe, werden im Thymus aber nicht aussortiert, sondern entwickeln suppressive Funktionen bei konstitutiver Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 (Forkheadbox P3). Diese im Thymus gereiften und von Beginn an FoxP3⁺ Treg nennt man natürliche Treg (nTreg). Weiterhin können aber auch Treg in der Peripherie induziert werden (iTreg). Diese sind nach Verlassen des Thymus noch negativ für FoxP3 und exprimieren den Transkriptionsfaktor erst nach Kontakt mit ihrem spezifischen Antigen [68, 69]. Trotz der starken Expression von CD25 auf der Zelloberfläche und der intrazellulären Expression von FoxP3 können humane Tregs nicht anhand dieser Marker eindeutig identifiziert werden, da beide Moleküle auch in konventionellen T-Zellen nach deren Aktivierung exprimiert bzw. herauf reguliert werden [70].

Treg-Zellen kontrollieren in gesunden Organismen die Immunantwort, unter anderem durch die Unterdrückung der Proliferation von Effektorzellen und die Verhinderung der Zytokinsekretion von Th1 Typ T-Zellen. Bei verschiedenen Erkrankungen, besonders Autoimmunerkrankungen, ist ein Defekt oder eine Fehlfunktion der Tregs beschrieben. So konnten z.B. Vigliette et al. 2004 zeigen, dass Treg bei Patienten mit Multipler Sklerose (MS) keine suppressive Funktion auf Effektor T-Zellen (CD4⁺CD25⁻ T-Zellen) ausüben [71]. Tregs sind z.B. auch bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis nur eingeschränkt funktionsfähig [72]. Abdulahad et al. fanden 2007 heraus, dass Tregs von GPA-Patienten in Remission eine defekte suppressive Funktion aufweisen im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Der ebenfalls beschriebene prozentuale Anstieg FoxP3⁺CD25^{high} T-Zellen kann nur mit Vorsicht als Anstieg der regulatorischen T-Zellen gewertet werden, da ja auch andere, nicht supprimierende, aktivierte CD4⁺ T-Zellen diese Marker exprimieren [73].

Klapa et al. haben beobachtet, dass die Anzahl von CD4⁺CD25^{high} bei GPA erhöht ist, innerhalb dieser Population aber weniger Zellen FoxP3 und CCR4 exprimieren. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass nach Stimulation mit PR3 und IFN- α eine verminderte Suppressivität gegenüber den CD4⁺ T-Zellen besteht. Die proliferierenden CD4⁺CD25^{high}

Treg-Zellen waren in diesem Szenario negativ für FoxP3 und CCR4. Dieses Ergebnis deutet auf eine gestörte Funktion der Treg-Zellen bei GPA hin. In GPA Granulomen wurden außerdem erhöhte Zahlen von Tregs gefunden [74].

Morgan et al. konnten zeigen, dass Treg aus gesunden Kontrollen und aus GPA-Patienten ohne PR3-ANCA die Proliferation PR3-spezifischer CD4⁺ T-Zellen inhibieren können. Tregs aus GPA-Patienten mit PR3-ANCA im Blut fehlt diese Funktion [75]. Es kann also durchaus ein Zusammenhang zwischen einer Fehlfunktion der Tregs und der Entwicklung des autoimmunen Charakters der GPA bestehen.

TGF- β begünstigt die regulatorische Funktion FoxP3⁺ Treg-Zellen. Befinden sich diese Zellen hingegen in einem inflammatorischen Zytokinmilieu, in Anwesenheit von z.B. IL-1 β , IL-6 usw., wie es im Bereich eines Granuloms zu finden ist, so können sich Tregs in nicht-regulatorische Th17-produzierende Zellen verwandeln [57]. Die dadurch erhöhte Menge von IL-17 im Serum fördert eine weitere Entwicklung der Entzündung und der Bildung von Granulomen [76].

1.3 $\gamma\delta$ T-Zellen

Der Anteil von $\gamma\delta$ T-Zellen im Blut gesunder Menschen liegt zwischen ein und fünf Prozent der CD3⁺ T-Lymphozyten insgesamt. Ein weit größerer Anteil von $\gamma\delta$ T-Zellen befindet sich in den (peripheren) Geweben, z.B. im Bereich des Darms und der Haut [77, 78]. $\gamma\delta$ T-Zellen exprimieren anstelle des konventionellen $\alpha\beta$ -TZR einen Rezeptor bestehend aus einer γ - und einer δ -Kette auf ihrer Oberfläche. In der Regel fehlen den $\gamma\delta$ T-Zellen außerdem die Korezeptoren CD4 bzw. CD8 auf ihrer Zelloberfläche.

Innerhalb der $\gamma\delta$ -T-Zellpopulation unterscheidet man aufgrund der variablen TZR Gen-Sequenz vor allem zwei Subpopulationen: solche, die eine V δ 1-Kette in ihrem TZR enthalten und solche, die eine V δ 2-Kette exprimieren. Im Blut der meisten gesunden Erwachsenen tragen 50-90 % der $\gamma\delta$ T-Zellen einen TZR bestehend aus einer V δ 2- und einer V γ 9-Kette. Für die Heterodimerbildung des $\gamma\delta$ -TZR sind außerdem Paarungen mit den Ketten V γ 2, 3, 4, 5 und 8 im Menschen möglich [79, 80]. Im Blut steigt die Zahl der V γ 9V δ 2⁺ $\gamma\delta$ T-Zellen von der Geburt bis zur Pubertät an [81]. Ab einem Alter von 30 Jahren nimmt die Zahl der V δ 2⁺ $\gamma\delta$ T-Zellen wieder ab [82]. Im Blut gesunder Erwachsener befinden sich in den meisten Fällen mehr V δ 2⁺ $\gamma\delta$ T-Zellen als V δ 1⁺ [83].

Funktionell haben die beiden genannten Subpopulationen gemeinsam, dass sie ihre Antigene MHC-unabhängig, also ohne die Präsentation über klassische MHC Klasse I- oder

MHC Klasse II-Moleküle auf Antigen-präsentierenden Zellen (APZ), erkennen können, sie unterscheiden sich aber in der Art der Antigene, die sie wahrnehmen. Während $V\delta 1^+$ T-Zellen vor allem Stress-induzierte Antigene, wie z.B. MICA, erkennen, werden $V\delta 2^+$ T-Zellen u.a. durch sog. Phosphoantigene und Aminobisphosphonate aktiviert [84-87]. Phosphoantigene, wie z.B. IPP (Isopentenyl-Pyrophosphat), entstehen bei der Isoprenoidsynthese im Rahmen der Cholesterolverstellung, welche in Bakterien über den sog. Rohmer- oder „Nicht-Mevalonat“-Weg gebildet werden [88]. Auch bei der eukaryotischen Synthese von Cholesterin über den Mevalonat-Weg entsteht als Zwischenprodukt IPP, allerdings in einer zu geringen Konzentration, um $V\gamma 9V\delta 2^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen aktivieren zu können, da es erst in einem mikromolaren Bereich wirksam wird [89]. Aminobisphosphonate können durch die Hemmung der Farnesyl-Pyrophosphat-Synthase die Konzentration von IPP innerhalb von z.B. Tumorzellen erhöhen und somit zur Aktivierung von $\gamma\delta$ T-Zellen führen [90]. Ein weiteres Phosphoantigen, welches bei der Isoprenoidsynthese innerhalb des bakteriellen Nicht-Mevalonat-Weges gebildet wird, hat sich als potentester Aktivator von $V\delta 2^+$ T-Zellen herausgestellt, (E)-4-Hydroxy-3-Methyl-But-2-enyl-Pyro-Phosphat (HMB-PP) führt bereits in einer picomolaren Konzentration zu der Aktivierung von $V\delta 2^+$ T-Zellen. Das synthetisch hergestellte Phosphoantigen Bromo-Hydrin-Pyrophosphat (BrHPP) aktiviert ebenfalls $V\delta 2^+$ T-Zellen und wird *in vitro* für die Stimulation dieser Zellen eingesetzt [91].

Um proliferieren zu können, sind $\gamma\delta$ T-Zellen auf die IL-2-Produktion von $CD4^+$ T-Zellen angewiesen oder *in vitro* auf die Zugabe von exogenem IL-2, da sie dieses nicht selbst synthetisieren können [92].

$\gamma\delta$ T-Zellen haben eine Vielzahl von Funktionen. So können sie z.B. nach Aktivierung die Th1 typischen Zytokine IFN- γ und TNF- α produzieren. Allerdings können humane $\gamma\delta$ T-Zellen auch geringe Mengen IL-4 und IL-17 sezernieren, je nachdem unter welchen Bedingungen sie kultiviert werden [77, 93-95]. Weiterhin wurde für $\gamma\delta$ T-Zellen eine suppressive Funktion gegenüber $CD4^+$ T-Zellen nachgewiesen [96-98]. $\gamma\delta$ T-Zellen können außerdem zytotoxisch aktiv werden, z.B. gegen infizierte Makrophagen oder bestimmte Tumorzellen [99, 100]. Der TZR von $\gamma\delta$ T-Zellen hat eine verhältnismäßig geringe Diversität und wird daher von den Zellen als eine Art Mustererkennungsrezeptor eingesetzt. $\gamma\delta$ T-Zellen exprimieren außerdem auch klassische Mustererkennungsrezeptoren, wie TLRs (Toll Like Rezeptoren), mit denen sie auf bakterielle und virale Infektionen reagieren können [101]. Brandes et al. konnte außerdem eine Antigen-präsentierende Funktion der $\gamma\delta$ T-Zellen zeigen [102]. Eine Zuordnung der $\gamma\delta$ T-Zellen zum angeborenen oder adaptiven Immunsystem gestaltet sich als

schwierig, da sie Eigenschaften beider Bereiche vereinen, daher betrachtet man sie heute als Bindeglied zwischen beiden Teilen des Immunsystems.

Über $\gamma\delta$ T-Zellen im Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen, im speziellen mit AAV, ist wenig bekannt. Bedenkt man, dass $\gamma\delta$ T-Zellen z.B. Stress-induzierte Moleküle wie MIC A/B erkennen können und die Endothelzellen bei Vaskulitiden durchaus Stress ausgesetzt sind, so erscheint eine Beteiligung von $\gamma\delta$ T-Zellen an der Entwicklung von GPA möglich, wenn nicht gar wahrscheinlich.

Bei Morbus Behcet, einer multisystemischen Erkrankung, bei der es zu Gefäßentzündungen u.a. an Augen, Gelenken, auf der Haut und im Gehirn kommen kann, wurden $\gamma\delta$ T-Zellen relativ intensiv untersucht. Man fand eine erhöhte Anzahl von $\gamma\delta$ T-Zellen im Blut, welche nach Aktivierung erhöhte Mengen der Serinprotease Granzym A sezernieren [103, 104]. Es konnte außerdem eine bevorzugte Aktivierung von $V\delta 1^+$ verglichen mit $V\delta 2^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen gezeigt werden [105]. Bei Takayasu's Arteriitis, einer chronischen granulomatösen Vaskulitis der großen Gefäße, wurden bei Patienten mit aktiver Erkrankung erhöhte $\gamma\delta$ -T-Zellzahlen im Blut festgestellt, bei Patienten in einer nicht aktiven Phase der Krankheit war das nicht der Fall. Verglichen mit Kontrollen fanden Chauhan et al. in Takayasu's Arteriitis vermehrt $V\delta 1^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen [106]. Im Zusammenhang mit GPA wurden bisher lediglich $\gamma\delta$ T-Zellen in den Kapillaren der Niere nachgewiesen [107]. Auffälligkeiten im Bezug auf die $\gamma\delta$ T-Zellen wurden darüber hinaus in AAV bis heute nicht gefunden bzw. gar nicht erst untersucht.

2 Fragestellung

Aus dem bisher gewonnenen Wissen über die GPA ergibt sich die folgende Hypothese über die frühe Pathogenese der Erkrankung (Abb. 5).

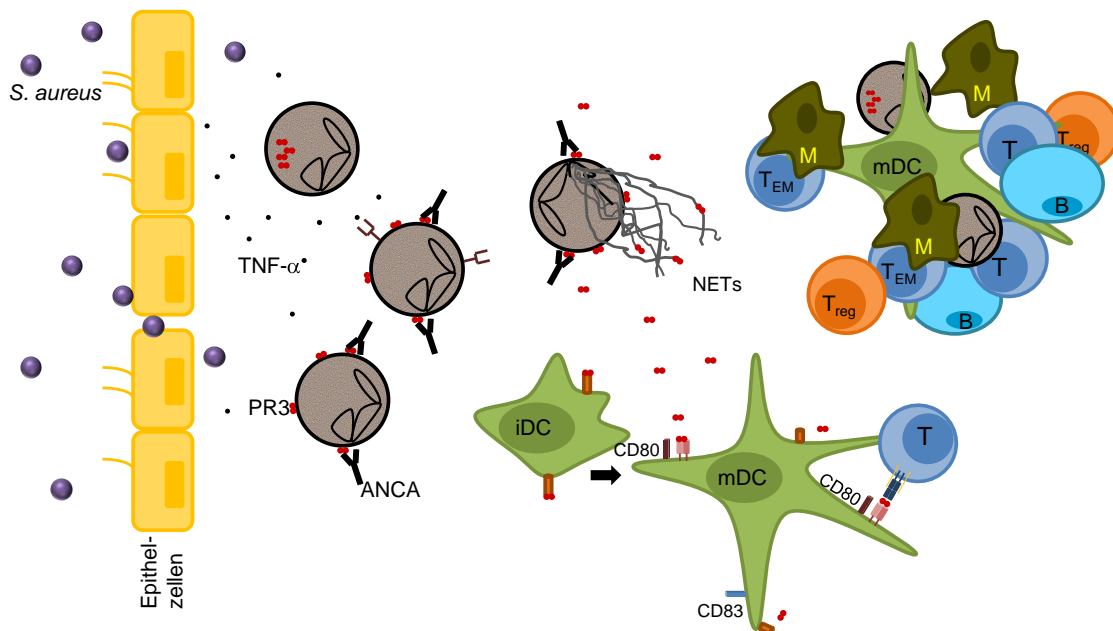


Abb. 5: Hypothese zur Frühpathogenese der GPA. Eine genaue Erläuterung der Darstellung befindet sich im nachfolgenden Text.

Durch eine Barriestörung des respiratorischen Epithels kann es zu einer chronischen Besiedelung mit bakteriellen Erregern wie z.B. *S. aureus* kommen. Diese Infektion führt zu einer Rekrutierung neutrophiler Granulozyten, welche nach Aktivierung den Inhalt ihrer Granula, u.a. PR3, freisetzen. Die PR3 induziert über den Rezeptor PAR-2 auf dendritischen Zellen deren Reifung. Die mDCs können die PR3 dann als Antigen den T-Zellen präsentieren und damit eine Expansion von T_{EM} herbeiführen. Aus dieser ersten Ansammlung von Immunzellen entwickeln sich durch die Rekrutierung weiterer T- und B-Zellen, welche zur Produktion von ANCA angeregt werden, sog. ektopische lymphatische Strukturen, das Granulom [108].

Im Fokus der vorliegenden Arbeit befand sich die T-Zell-Dynamik bei der Frühpathogenese der GPA. Die in Patienten mit GPA nachgewiesenen PR3-spezifischen T-Zellen sind nur in sehr geringer Anzahl im Blut vertreten und entziehen sich dadurch einer eingehenderen Untersuchung. Die erste Aufgabe dieser Arbeit war daher die Generierung von PR3-spezifischen T-Zellen und deren Charakterisierung.

Weiterhin sollten die bereits beschriebenen funktionellen Defizite von Treg besonders im Hinblick auf die Regulation der PR3-spezifischen T-Zellen eingehender untersucht werden.

Da nicht nur Treg sondern auch $\gamma\delta$ T-Zellen eine regulatorische Funktion aufweisen, ergab sich die Frage nach dem Einfluss und der Funktion der $\gamma\delta$ T-Zellen im Zusammenhang mit der Frühpathogenese der GPA.

3 Material

3.1 Chemikalien

Alle häufig verwendeten Standard-Laborchemikalien wurden von den Firmen Biochrom AG, Life Technologies, Merck, Serva, Sigma und Roth bezogen.

Name	Bezugsquelle
Acrylamid/Bisacrylamid	Serva, Heidelberg
Agarose	Life Technologies, Karlsruhe
Akkutase	Life Technologies, Karlsruhe
Ampicillin	Sigma, Taufkirchen
APS	Sigma, Taufkirchen
BCA Protein Assay Reagenz	Pierce, München
BSA	Serva, Heidelberg
CaCl ₂	Merck, Darmstadt
Coomassie Protein Assay Reagenz	Thermo Fisher Scientific
Complete Proteaseinhibitor	Roche, Mannheim
CTAB	Merck, Darmstadt
Cytofix/Cytoperm	BD Biosciences, Heidelberg
DMSO	Calbiochem, Darmstadt
ECL Plus	GE Healthcare, München
EDTA	Sigma, Taufkirchen
Eosin	Serva, Heidelberg
Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ficoll-Hypaque	Biochrom AG, Berlin
FKS	Life Technologies, Darmstadt
Glutamin	Biochrom AG, Berlin
ImmoMix™	Bioline, Luckenwalde
IPTG	Gerbu, Gaiberg
Mass Ruler DNA Ladder Mix	Fermentas, St. Leon-Rot
Methanol	Roth, Karlsruhe
Milchpulver	Frema Granovita, Heimertingen
NaF	Merck, Darmstadt
NaN ₃	Sigma, Taufkirchen
NP-40	Fluka, Buchs, CH
PBS	Biochrom AG, Berlin
Penicillin	Biochrom AG, Berlin
Perm/Wash	BD Biosciences, Heidelberg
PFA	Sigma, Taufkirchen

Primer	TIBMoIBiol, Berlin
Propidiumjodid	Serva, Heidelberg
Protein Größenstandard	Biorad, München
RPMI1640	Life Technologies, Darmstadt
Streptomycin	Biochrom AG, Berlin
Temed	Serva, Heidelberg
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Merck, Darmstadt
Tween 20	Sigma, Taufkirchen
X-VIVO15	Lonza, Köln

3.2 Medien, Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Substanz	Konzentration
DNA-Auftragspuffer	Bromphenolblau	0,25 % (w/v)
	Glycerin	30 % (v/v)
	H ₂ O	
Einfriermedium	DMSO	10 % (v/v)
	FKS	90 % (v/v)
ELISA-Waschpuffer	PBS	
	Tween 20	0,05 % (v/v)
Eosin für Zellzählung	PBS	
	Eosin	0,2 % (w/v)
Ethidiumbromidlösung	H ₂ O	
	EtBr	2 mg/ml
FACS-Fixierlösung	PBS	
	PFA	1 % (w/v)
FACS-Waschpuffer (WP)	PBS	
	NaN ₃	0,1 % (w/v)
	BSA	1 % (w/v)
Kulturmedium für Primär- und Suspensionszellen	RPMI 1640	
	FKS	10 % (v/v)
	Penicillin/Streptomycin	1 % (v/v)
	Glutamin	2 mM
LB-Agar	LB-Medium	
	Agar-Agar	15 g/L
LB-Medium	Pepton	1 % (w/v)
	Hefe-Extrakt	0,5 % (w/v)
	NaCl	0,025 % (w/v)

Material

	H ₂ O	auf 1 L
MACS-Puffer	PBS EDTA BSA	2 mM 0,5 % (w/v)
PBS-T	PBS Tween 20	0,1 % (v/v)
PI	PBS EDTA PI	5 mM 1 mg/ml
Sammelgel (5 %)	H ₂ O Tris Acrylamid/Bisacrylamid SDS	125 mM 5 % (v/v) 0,1 % (w/v)
SDS-Laufpuffer	Tris Glycin SDS	25 mM 192 mM 1 % (w/v)
SDS-Probenpuffer (4x)	Tris pH 6,8 SDS Glycerin Bromphenolblau β-Mercaptoethanol	250 mM 8 % (w/v) 40 % (v/v) 0,005 % (w/v) 16 % (v/v)
Staining-Puffer	PBS FCS NaN ₃	1 % 0,09 %
SOC-Medium	Pepton Hefe-Extrakt NaCl KCl pH auf 7,0 einstellen, mit Wasser auf auffüllen und autoklavieren Glucose 1 M MgCl ₂ 1 M	2 % (w/v) 0,5 % (w/v) 0,05 % (w/v) 0,25 % (w/v) auf 485ml 2 % (v/v) 1 % (v/v)
TAE-Puffer 50x (für Agarosegelelektrophorese)	Tris Essigsäure 0,5 M EDTA pH 8 H ₂ O	24,2 % (w/v) 5,7 % (v/v) 10 % (v/v) auf 1 L
TNE-Lysepuffer	Tris NaCl NP-40 EDTA NaF Na ₃ VO ₄	50 mM 150 mM 1 % (v/v) 2 mM 10 mM 1 mM

	Complete	4 % (v/v)
Transblotpuffer	Tris	25 mM
	Glycin	192 mM
	Methanol	20 % (v/v)
Trenngel (10 oder 15 %)	H ₂ O	
	Tris	375 mM
	Acrylamid/Bisacrylamid	10 oder 15 % (v/v)
	SDS	0,1 % (v/v)

3.3 Zytokine und sonstige Stimuli

Tab. 1: Zytokine und sonstige Stimuli

Name	Hersteller	Einsatzkonzentration
BrHPP	Innate Pharma	300 nM
GM-CSF	R&D, Berlex	20 ng/ml
IL-2	Novartis	50 U/ml
IL-4	R&D	10 ng/ml
Ionomycin	Calbiochem	500 ng/ml
LPS	Sigma	0,01 ng/ml - 10 µg/ml
PHA	Murex	0,5 µg/ml
PMA	Sigma	10 ng/ml
Proteinase 3	Orgentec	0,1 µg/ml
Staphylococcus Enterotoxin A	Toxin Technology	2 ng/ml
Staphylococcus Enterotoxin B	Serva	2 ng/ml
Staphylococcus Enterotoxin C	Toxin Technology	2 ng/ml
Staphylococcus Enterotoxin D	Serva	2 ng/ml
Staphylococcus Enterotoxin E	Serva	2 ng/ml
Tetanustoxoid	Toxin Technology	ca. 10 ng/ml
TNF- α	PeptoTech	50 ng/ml
Zoledronat	Novartis	5 µM

3.4 Plasmide, Primer und Enzyme

Tab. 2: Plasmide

Name	Bezugsquelle
pFlagCMV2	Kodak
pcDNA3.1	Life Technologies
pGEX-3X	Amersham Pharmacia Biotech

Tab. 3: Primer

Nummer	Name	Sequenz	Schmelztemperatur [°c]	Verwendung
1	PR3-370-R	gTTTgTTCTCCgCgTCg	54	Sequenzierung
2	PR3-255-F	CCAgCgCCTggTgAACg	58	Sequenzierung
3	PR3-545-F	ATgTCACCgTggTCACC	54	Sequenzierung
4	FlagPR3-Hind3	CCAAgCTTATCgTgggCgggCAC	70	Flag Tag-Herstellung von PR3
5	FlagPR3-Xba1	CCTCTAgATCACAgCgTggAACggATC	66	Flag Tag-Herstellung von PR3
6	FlagPR3-F	ACCATggACTACAAAgACgAT	60	Umklonierung in pcDNA3
7	FlagPR3-R	TTCTCTAgATCACAgCgTggA	62	Umklonierung in pcDNA3
8	PR3-EcoR1-r	CCCgAATTCTCACAgCgTggAA	63	Umklonierung in pGEX-3X
9	PR3-EcoR1-f	CTCgAATTCCATCgTgggCggg	68	Umklonierung in pGEX-3X
10	IL 2-F	AACTCACAggATgCTCACATTT	60	qRT-PCR
11	IL 2-R	TTAgCACTTCCTCCAgAggTTTg	60	qRT-PCR
12	Actin-F	ggCTCCggCATgTgCAA	60	qRT-PCR
13	Actin-R	CATgTCgTCCCAgTTggTgA	60	qRT-PCR

Tab. 4: Enzyme

Name	Hersteller
EcoR1	New England Biolabs
FaktorXa	New England Biolabs
Hind3	New England Biolabs
T4-Ligase	New England Biolabs
Platinum Taq DNA Polymerase	Life Technologies
Xba1	New England Biolabs

3.5 Kits

Name	Bezugsquelle
Big Dye Terminator 1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems
CD3 ⁺ T-Zellisolierung	Dynal Biotech, Hamburg
CD4 ⁺ T-Zellisolierung	Miltenyi, Bergisch-Gladbach
CD14 ⁺ Monozytenisolierung	Miltenyi, Bergisch-Gladbach
CD25 ⁺ Treg-Depletion	Miltenyi, Bergisch-Gladbach
DC Nukleofector Kit	Lonza, Köln
DyeEx 2.0 spin Kit	Qiagen, Hilden
Gene Clean	Mobio, Carlsbad, US
IFN- γ DuoSet ELISA	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt
IFN- γ Secretion Assay	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt
IL-4 DuoSet ELISA	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt
Maxi-Prep	Qiagen, Hilden
TOPO-TA Cloning Kit	Life Technologies, Darmstadt
Trucount™ Absolutzellzählung	BD Biosciences, Heidelberg

3.6 Antikörper

Tab.5: Monoklonale Antikörper für die Durchflusszytometrie

Antigen	Klon	Einsatzkonzentration	Bezugsquelle	Konjugat	Spezies
CD2	OKT11	6 $\mu\text{g/ml}$	ATCC	Biotin	Maus-IgG1 κ
CD3	SK7	2,5 $\mu\text{g/ml}$	BD Biosciences	PE	Maus-IgG1 κ
CD4	SK3	0,6 $\mu\text{g/ml}$	BD Biosciences	FITC, PE	Maus-IgG1 κ
CD4	OKT4	7,5 $\mu\text{g/ml}$	ATCC	unkonjugiert	Maus-IgG2b
CD8	SK1	2,5 $\mu\text{g/ml}$	BD Biosciences	FITC, PE	Maus-IgG1 κ
CD8	OKT8	3 - 4,5 $\mu\text{g/ml}$	ATCC	unkonjugiert, FITC	Maus-IgG2a
CD14	M Φ P9	5 $\mu\text{g/ml}$	BD Biosciences	FITC, PE	Maus-IgG2b
CD25	2A3	1,25 $\mu\text{g/ml}$	BD Biosciences	PE	Maus-IgG1 κ
CD27	M-T271	1:2	BD Biosciences	PE	Maus-IgG1 κ
CD45RA	HI 100	5 $\mu\text{g/ml}$	Biolegend	FITC	Maus-IgG2b

CD69	L78	0,6 µg/ml	BD Biosciences	PE	Maus-IgG1κ
CD83	HB15e	1:2	BD Biosciences	PE	Maus-IgG1κ
MHC-I	W6/32	20 µg/ml	ATCC	Biotin	Maus-IgG1κ
TCRαβ	BMA031	20 µg/ml	Life Technologies	FITC, Biotin	Maus-IgG2b
TCRγδ	B1	50 µg/ml	BD Biosciences	APC	Maus-IgG1κ
TCRγδ	11F2	50-84 µg/ml	BD Biosciences	FITC, PE, APC	Maus-IgG1κ
Vδ1	TS8.2	30 µg/ml	Thermo Scientific	FITC	Maus-IgG1κ
Vδ2	IMMU389	1:2	Beckmann&Coulter	FITC	Maus-IgG1κ
Vδ2	B6	100 µg/ml	BD Biosciences	PE	Maus-IgG1κ
Vδ2	B6	2 µg/ml	Biolegend	PerCP	Maus-IgG1κ
Vγ9	7A5	3-4,5 µg/ml	eigene Herstellung	Biotin, FITC	Maus-IgG1κ

Tab.6: Isotypkontrollen

Antigen	Klon	Bezugsquelle	Konjugat	Spezies
IgG1κ	X40	BD Biosciences	FITC, PE, APC	Maus
IgG1κ	MG115	Life Technologies	Biotin	Maus
IgG2a	X39	BD Biosciences	FITC, PE	Maus

Tab.7: Sekundärantikörper

Name	Bezugsquelle	Einsatzkonzentration	Konjugat	Spezies
Kaninchen-anti-Maus	Dianova	1:10000	POD	IgG
Ziege-anti-Maus	Life Technologies	5 µg/ml	PE	IgG (H+L)
Streptavidin	Caltag	100 µg/ml	APC	
Streptavidin	BD Biosciences	1 µg/ml	PE	

Tab.8: Antikörper für Westernblotting

Antigen	Klon	Bezugsquelle	Einsatzkonzentration	Konjugat	Spezies
Flag	M2	Sigma	1:1000	unkonjugiert	Maus-IgG1κ
PR3		Abnova	1:5000	unkonjugiert	Maus, polyklonal

Für Antikörper mit unbekannter Ausgangskonzentration wurde die eingesetzte Verdünnung angegeben. Alle angegebenen Einsatzkonzentrationen wurden zuvor durch Titration ermittelt.

3.7 Spenderkollektive

Das Material von 24 weiblichen und 24 männlichen Patienten mit GPA wurde aus dem Klinikum Bad Bramstedt bezogen. Es konnten in den meisten Fällen 30-35 ml heparinisieretes Vollblut bezogen werden. Das Alter der Patienten lag zwischen 27 und 77 Jahren.

Auch das Patientenmaterial von 6 weiblichen und 4 männlichen am Churg-Strauss-Syndrom erkrankten Personen im Alter zwischen 20 und 73 Jahren wurde aus der o.g. Klinik bezogen. Es stand hier in allen Fällen 5 ml heparinisieretes Vollblut zur Verfügung.

Die Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein am Campus Kiel stellte je 5 ml heparinisieretes Vollblut von 10 Patienten mit chronischer Sinusitis im Alter zwischen 35 und 83 Jahren zur Verfügung.

Als gesunde Vergleichsspender dienten Leukozytenkonzentrate, Leukozytenrückhaltesysteme (LRS; zurückgehaltene Zellen nach Thrombozytenspenden) oder frisches Vollblut gesunder Spender. Leukozytenkonzentrate und LRS wurden vom Institut für Transfusionsmedizin am UK-SH, Campus Kiel bezogen.

4 Methoden

4.1 Molekularbiologische Methoden

4.1.1 Klonierung des Gens für reife Proteinase 3 in einen eukaryotischen Expressionsvektor

Das für Proteinase 3 kodierende Gen lag zu Beginn dieser Arbeit in der für das Prä-Pro-Enzym kodierenden Form in dem Vektor pTracerSV40 vor. Für eine verbesserte Nachweisbarkeit wurde das Protein mit einem Flag Tag versehen. Hierfür wurde der Anteil des Gens für das reife Protein aus pTracerSV40 in den Vektor pFlagCMV2 umklontiert.

Mittels PCR wurde über die beiden Primer FlagPR3-Hind3 und FlagPR3-Xba1 die DNA-Sequenz für reife Proteinase 3 aus dem Vektor amplifiziert und mit Schnittstellen für die Restriktionsenzyme HindIII und XbaI versehen.

PCR-Ansatz:	pTracerSV40-PR3	32 ng
	Primer	1 µl
	dNTPs	2 µl
	taq Polymerase	1 U
	10x Puffer	2 µl
	Mg ²⁺	0,6 µl
	H ₂ O	11,2 µl

Es wurde dafür das folgende PCR-Programm in einem PCR-Gerät von Biometra gewählt:

Schritt 1	95 °C, 2 min	} 5 Zyklen
Schritt 2	95 °C, 15 Sekunden	
Schritt 3	62 °C, 15 Sekunden	
Schritt 4	72 °C, 2 min	
Schritt 5	95 °C, 15 Sekunden	} 32 Zyklen
Schritt 6	64 °C, 15 Sekunden	
Schritt 7	72 °C, 2 min	
Schritt 8	72 °C, 4 min	

Nach Ablauf des Programms wurde in einem 1 % Agarosegel der Erfolg der PCR überprüft. War die PCR erfolgreich, so wurde der restliche PCR-Ansatz für die Klonierung weiter verwendet.

Das PCR-Produkt wurde mit dem TOPO-TA Cloning Kit der Firma Life Technologies über die von der Taq-Polymerase während der PCR erzeugten polyA Überhänge am 3'Ende (unabhängig von einer Restriktionsschnittstelle) in den TOPO-Vektor ligiert und anschließend in kompetente One Shot® *E. coli* Bakterien (ebenfalls von Life Technologies) transformiert. Hierfür wurden 50 µl der *E.coli* Bakterien mit dem gesamten TOPO-Ansatz vorsichtig

gemischt, 30 Minuten auf Eis inkubiert und für 30 Sekunden bei 42 °C einem Hitzeschock ausgesetzt. Nach der Zugabe von 900 µl SOC Medium wurde die Transformation für eine Stunde bei 37 °C und 250 Upm geschüttelt. Die Kultur wurde zu 10 und 90 % auf zwei mit Ampicillin (100 µg/ml) behandelten Agarplatten ausgestrichen. Nach 16 Stunden Inkubation bei 37 °C wurden Kolonien der TOPO-Klonierung von den Agarplatten in je 3 ml LB-Medium überführt. Aus diesen Mini-Kulturen wurde nach Inkubation üN (über Nacht) bei 37 °C und 250 Upm die Plasmid-DNA der Bakterien mit Hilfe der CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid)-Methode isoliert.

Isolierung von Plasmid-DNA durch CTAB

1,5 ml der Bakterien-Kultur wurden für 5 Minuten bei 5000 Upm sedimentiert. Das Pellet wurde in 200 µl STET (8 % Saccharose, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM EDTA, 0,1 % (v/v) Triton X-100) mit 50 mg/ml Lysozym resuspendiert. Nach 45 Sekunden bei 100 °C wurden die unerwünschten Zellbestandteile 10 Minuten bei 14000 Upm pelletiert. Das Pellet wurde mit einem Zahnstocher entfernt und die Lösung mit 8 µl CTAB (5 % (w/v)) gründlich durchmischt. Die bakterielle Plasmid-DNA konnte so aus der Lösung gebunden und bei 14000 Upm für 5 Minuten sedimentiert werden. Es folgte die Zugabe von 300 µl NaCl und 750 µl 100 % EtOH zu dem Pellet, welches kräftig gemischt wurde. Nach 10 Minuten bei 14000 Upm wurde das Pellet mit 1000 µl 70 % EtOH für 5 Minuten bei 14000 Upm gewaschen, bevor die DNA getrocknet und in 39 µl H₂O mit 1 µl RNase (10 mg/ml) aufgenommen wurde.

Im anschließenden Restriktionsverdau wurde überprüft, ob die Plasmid-DNA der Bakterienklone das gewünschte DNA-Fragment enthält.

Restriktionsverdau:	DNA	3 µl
	HindIII	10 U
	XbaI	20 U
	10x Puffer	2 µl
	mit H ₂ O auf	20 µl auffüllen

Der Verdau erfolgte für 2 Stunden bei 37 °C und wurde in einem 1 % Agarosegel analysiert. Die DNA der Klone, welche ein Insert enthielt, wurde mit den Primern PR3-370-R, PR3-255-F und PR3-545-F und dem BigDye Terminator 1.1 Cycle Sequencing Kit sequenziert. Die Aufreinigung der Sequenzierungsreaktion erfolgte mit dem DyeEx 2.0 Spin Kit nach Herstellerprotokoll.

Es wurde ein Klon ausgewählt, welcher das vollständige Insert in der korrekten Orientierung enthielt. Die DNA dieses Klons wurde mit den Enzymen HindIII und XbaI verdaut. Parallel wurde der Vektor pFlagCMV2 mit den gleichen Enzymen verdaut, beides in einem 1 %

Agarosegel aufgetrennt und die Banden des geschnittenen Vektors bzw. des Inserts mit dem Gene Clean Kit von Mobio nach Anleitung aus dem Gel extrahiert und dann in einem Ligationsansatz üN bei 14 °C inkubiert.

Ligationsansatz:	Vektor	80 ng
	Insert	34 ng
	10x Puffer	2 µl
	Ligase	800 U
	mit H ₂ O auf	20 µl auffüllen

Transformation in XL1 Blue

Die Hälfte des Ligationsansatzes wurde durch vorsichtiges Pipettieren mit 200 µl kompetenter *E.coli* Zellen XL1 Blue (innerhalb der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt) vermischt und für 30 Sekunden auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 2 Minuten bei 42 °C und anschließenden 10 Minuten auf Eis wurden 800 µl SOC Medium zugegeben und für 1 Stunde bei 37 °C und 250 Upm inkubiert. Es wurden 10 % der Kultur auf einer Agarplatte und die restlichen 90 % auf einer zweiten Platte ausgestrichen. Von den Platten wurden nach einer Nacht bei 37 °C einzelne Bakterienkolonien entnommen und in 3 ml LB-Medium überführt. Aus diesen üN Kulturen wurde mit der CTAB-Methode die Plasmid-DNA isoliert und in einem Restriktionsverdau mit anschließendem Agarosegel der Einbau des Inserts kontrolliert. Die Sequenz für die mit einem Flag Tag versehenen maturen PR3 wurde aus dem Vektor pFlagCMV2 in den Vektor pcDNA3.1 umklont. Die PCR erfolgte mit den Primern FlagPR3-F und FlagPR3-R. Im Anschluss wurde erneut eine TOPO-Klonierung durchgeführt. Das Gen wurde mit EcoRI herausgeschnitten und der Vektor mit demselben Enzym linearisiert. Der Vektor wurde mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert, um zu verhindern, dass dieser sich ohne Insert wieder verschließt. Die Ligation und Transformation erfolgten wie oben beschrieben. Nachdem durch Sequenzierung die Orientierung und Richtigkeit überprüft worden war, wurde eine Isolierung von Plasmid-DNA im großen Maßstab durchgeführt nach Herstellerangaben des dafür verwendeten Maxi-Präp Kits von Qiagen.

4.1.2 Klonierung des Gens für reife Proteinase 3 in einen prokaryotischen Expressionsvektor

Für die Generierung einer rekombinanten PR3 (rPR3) in *E. coli* wurde das für die reife (mature) Proteinase 3 kodierende Gen zunächst aus dem Vektor pcDNA3/PR3_m über die Primer PR3-EcoRI-r und PR3-EcoRI-f in einer PCR heraus amplifiziert und durch die Primer mit EcoRI-Schnittstellen versehen.

PCR-Ansatz:	10xPuffer	2 µl
	Mg ²⁺	0,6 µl
	Taq-Polymerase	1 U
	Primer je	1 µl
	DNA	1 µl
	dNTPs	2 µl
	H ₂ O	12,2 µl

Es wurde das gleiche Programm verwendet, wie in 4.1.1 beschrieben.

Ein Teil der PCR wurde auf ihren Erfolg hin im Gel überprüft und der zweite Teil mit einem TOPO-TA-Cloning Kit in den TOPO-Vektor (Life Technologies) nach Anleitung des Herstellers kloniert. Die so erhaltene Plasmid-DNA wurde in spezielle im Kit enthaltene kompetente Zellen transformiert und diese üN auf einer Ampicillin-haltigen Agarplatte bei 37 °C inkubiert. Es wurden zehn der gewachsenen Kolonien gepickt und direkt in einer PCR (Ansatz wie oben) überprüft. Die zum Animpfen der PCR verwendete Spitze wurde anschließend in 3 ml LB-Medium überführt und üN bei 37 °C und 250 Upm inkubiert. Die DNA dieser Klone wurde mittels Mini-Prep (CTAB-Methode wie in 4.1.1 beschrieben) isoliert und nach Verdau mit EcoRI in einem 1 % Agarosegel analysiert. Die DNA eines positiven Klons wurde weiterhin verwendet, um das 700 bp Fragment in einen prokaryotischen Expressionsvektor umzuklonieren. Sowohl das Insert als auch der Vektor pGEX-3X wurden für 2 Stunden bei 37 °C wie folgt inkubiert:

Enzym EcoRI	0,5 µl
DNA	1 µg
10xPuffer	2 µl
H ₂ O	16,5 µl

Direkt im Anschluss an die Restriktion wurde der Vektor in einem Dephosphorylierungsansatz behandelt:

Restriktionsansatz	20 µl
10fach Puffer	2,26 µl
alkalische Phosphatase	1,3 µl

- 30 min bei 37 °C
- Zugabe 1 µl alkalische Phosphatase
- 30 min bei 37 °C
- 10 min bei 65 °C

Die beiden Komponenten wurden anschließend üN bei 14 °C ligiert:

T4-Ligase	2 µl
Ligationspuffer	2 µl
Vektor	80 ng
Insert	30 ng
add H ₂ O auf	20 µl

Der Ligationsansatz wurde wie in 4.1.1 beschrieben in kompetente *E. coli* Bakterien transformiert. Von den üN bei 37 °C auf einer Ampicillin-haltigen Platte gewachsenen Bakterienkolonien wurden zehn gepickt und sowohl mittels PCR (s.o.) als auch Restriktionsverdau mit EcoRI (s.o.) überprüft. Eine anschließende Sequenzierung gab endgültig Auskunft über die richtige Orientierung des Inserts und die Vollständigkeit des Plasmids in den Klonen.

Sequenzierungsansatz:	DNA	500 ng
	Sequencing Mix	2 µl
	Primer je	1 µl
	5x Puffer	4 µl
	add H ₂ O auf	20 µl

4.1.3 Quantifizierung von IL-2-mRNA Expression mit qRT-PCR

Mit Hilfe der quantitativen Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) ist es möglich die Menge einer bestimmten mRNA in einer Probe zu ermitteln. Die isolierte RNA wurde dafür zunächst in stabile cDNA umgeschrieben. Die Analyse der mRNA, in diesem Fall IL-2-mRNA, erfolgt dabei gegen ein Referenzgen, welches durch die unterschiedliche Stimulation der Zellen weitgehend unbeeinflusst bleibt. Dafür wurde im Rahmen dieser Arbeit die Aktin-mRNA verwendet. Die bei jedem Elongationszyklus vorliegende DNA-Menge kann anhand der messbaren Fluoreszenz ermittelt werden, da während der DNA-Synthese der Farbstoff Sybr Green in diese interkaliert und dabei sein Absorptionsmaximum verändert. Je mehr Ausgangsmaterial in einer Probe vorhanden war, umso niedriger ist der sog. ct-Wert, der angibt, wann die Fluoreszenzintensität der Probe die Hintergrundfluoreszenz übersteigt.

Für die Analyse der IL-2-mRNA-Produktion CD4 positiver T-Zellen nach Stimulation mit Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) und Ionomycin wurden die Zellen zunächst in je 1 ml Trisure Lysepuffer 5 Minuten bei RT lysiert. Nach der Zugabe von 200 µl Chloroform wurden die Proben für eine Minute kräftig geschüttelt und erneut 2 - 3 Minuten bei RT inkubiert. Nach einer zwanzigminütigen Zentrifugation bei 12000 g und 4 °C befand sich die RNA gelöst in der wässrigen Phase. Proteine, DNA und Lipide wurden in der unteren und mittleren Phase gesammelt. Die RNA-haltige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 600 µl Isopropanol sowie 1 µl Glykogen bei 4 °C üN inkubiert. Nach 10 Minuten Zentrifugation bei 12000 g und 4 °C wurde die gewonnene RNA zwei Mal mit 75 % Ethanol gewaschen (7500 g für 5 Minuten bei 4°C). Die RNA wurde durch Verdunstung getrocknet und abschließend in Wasser aufgenommen. Nach der Ermittlung der RNA-Konzentration durch Messung der optischen Dichte im Nanodrop der Firma Peqlab (Erlangen) wurden je

0,2 µg RNA für die Synthese von cDNA eingesetzt. Auf ein Volumen von 12 µl mit Wasser eingestellt wurde die RNA in Gegenwart eines OligodT₁₂V-Primers (10 pmol) für exakt 5 Minuten bei 60 °C inkubiert und die Probe anschließend auf Eis für mindestens 5 Minuten wieder abgekühlt.

cDNA-Ansatz: dNTPs	1 µl
Reaktionspuffer	4 µl
Reverse Transkriptase	0,25 µl
H ₂ O	0,75 µl

Die cDNA-Synthese erfolgte dann im Thermoblock für 60 Minuten bei 37 °C und wurde anschließend 10 Minuten bei 72 °C inkubiert um die Reverse Transkriptase zu inaktivieren. Mit dem NukleoSpin Extract 2 Kit wurde die cDNA gereinigt.

Die qRT-PCR erfolgte anschließend in dem Rotorgene 3000 (LTF, Wasserburg am Inn).

PCR-Ansatz: ImmoMix	10 µl
Sybr Green	0,4 µl
Primer (10 pmol)	0,8 µl
cDNA	2,5 µl
H ₂ O	6,3 µl

Als Referenzgen wurde die Menge der Aktin-mRNA untersucht. Es wurde für beide Gene folgendes Programm zur Analyse verwendet:

Schritt 1	95 °C für 10 Minuten	} 40 Zyklen
Schritt 2	95 °C für 20 Sekunden	
Schritt 3	60 °C für 20 Sekunden	
Schritt 4	72 °C für 20 Sekunden	

4.2 Biochemische Methoden

4.2.1 Herstellung von rekombinanter Proteinase 3

Es wurden drei der Klone ausgewählt, die wie unter 4.1.2 beschrieben hergestellt wurden, mit welchen eine Mini-Expression durchgeführt wurde, um herauszufinden, welcher von diesen dreien die größte Menge des gewünschten Fusionsproteins produziert. Mit Hilfe einer Mini-Expression wird das Fusionsprotein aus den Bakterien isoliert.

Mini-Expression

Jeder der ausgewählten Bakterienklone wurde in 3 ml LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) überführt und üN bei 37 °C und 250 Upm inkubiert. Jeweils 1,5 ml dieser Vorkultur wurden in 4,5 ml frisches LB-Medium überführt und erneut für 1,5 Stunden bei 37 °C und 250 Upm inkubiert. Nach Zugabe von je 100 mM IPTG wurde für 4-5 Stunden bei 37 °C und 250 Upm die Produktion von Proteinen in den Bakterien induziert, bevor diese bei 3500 Upm für 5 Minuten bei RT pelletiert wurden. Das Bakterienpellet wurde in 900 µl kaltem PBS (4 °C) resuspendiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es folgte eine Ultraschallbehandlung über 3 x 5 Sekunden, anschließend wurden je 100 µl Triton X-100 (10 %) zugegeben und gründlich gemischt. Für die Lyse wurden die Zellen 20 Minuten auf Eis inkubiert. Nach 10 Minuten Zentrifugation bei 14000 Upm und 4 °C wurde der Überstand jeweils in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 30 µl Glutathion-Beads (1:2 in PBS) für 1 Stunde bei 4 °C rotiert. Die Beads wurden daraufhin drei Mal mit PBS gewaschen und zum Schluss in 30 µl PBS aufgenommen. Nach Zugabe von 15 µl 4fach SDS-Probenpuffer wurden die Beads 4 Minuten bei 100 °C erhitzt und danach in einer 10 % SDS-PAGE (siehe 4.2.3) aufgetrennt. Im Westernblot (ebenfalls 4.2.3) wurden die Proben mit anti-PR3- und anti-GST-Antikörpern überprüft. Der Klon mit der höchsten Expression des GST-Fusionsproteins wurde für die Maxi-Expression weiter verwendet.

Maxi-Expression

Eine Vorkultur aus 2 x 100 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und dem entsprechenden Klon wurde üN bei 37 °C und 250 Upm gezüchtet. Je 33 ml dieser Vorkultur wurde in 300 ml frisches LB-Medium mit Ampicillin in einen 1 L Kolben überführt und für mindestens 1 Stunde weiter geschüttelt bei 37 °C. Die Proteinproduktion erfolgte nach Zugabe von 100 mM IPTG für 4 - 5 Stunden bei 37 °C und 250 Upm. Die Bakterien wurden für 10 Minuten bei 5000 Upm pelletiert und je drei der Pellets in 36 ml kaltem PBS resuspendiert und vereinigt. Zum Aufschließen der Zellen wurden diese 4 x 5 Sekunden mit Ultraschall behandelt. Es wurde je 4 ml 10 % Triton X-100 zugefügt und die Zellen für 20 Minuten auf Eis lysiert. Bei 13000 Upm und 4 °C für 30 Minuten wurden die nicht löslichen Zellbestandteile aus der Proteinlösung entfernt. In die Lösung wurde je 1 ml Glutathion-Beads (1:2 in PBS) gegeben und diese üN bei 4 °C rotiert.

Mit Hilfe eines Elutionspuffers (50 mM Tris (pH8,0), 30,75 mg reduziertes Glutathion mit H₂O auf 10 ml aufgefüllt), welcher frisch hergestellt wurde, konnte das Fusionsprotein wieder von den Beads gelöst werden. Das im Puffer enthaltene Glutathion verdrängte das GST-Tag von den Beads durch seine höhere Affinität zu diesen. Dazu wurden die Beads so lange immer wieder mit 1 ml des Elutionspuffers für 10 Minuten bei RT rotiert, bis in der

Proteinbestimmung kein Protein im Puffer mehr nachgewiesen werden konnte. Das erhaltene Fusionsprotein wurde mit Hilfe von Amicon-Zentrifugationsröhrchen in PBS umgepuffert.

Um die PR3 als Stimulus für humane Zellen einsetzen zu können, musste der GST-Anteil des Fusionsproteins wieder entfernt werden. Der Vektor pGEX-3X bietet zu diesem Zweck eine Schnittstelle für das Enzym FaktorXa. Über die dadurch im Fusionsprotein enthaltene Schnittstelle konnten die beiden Proteine wieder voneinander getrennt werden. Dazu wurden je 50 µg Fusionsprotein mit 1 µg FaktorXa für 6 Stunden bei 23 °C inkubiert. Der GST-Anteil wurde erneut über Beads aus der Lösung entfernt. Es erfolgte erneut eine Kontrolle über Westernblot mit anti-PR3 und anti-GST Antikörpern.

Nachweis von Lipopolysaccharid

Da die so hergestellte rPR3 aus *E. coli*-Bakterien stammte, war ein Verbleib von Lipopolysaccharid (LPS), dem Hauptbestandteil der Bakterienzellmembran, in der Proteinlösung nicht auszuschließen. Um eine unspezifische Stimulation von humanen Zellen in späteren Versuchen durch die Anwesenheit von LPS einschätzen zu können, wurde die rPR3 auf den Gehalt von LPS mittels LAL-Test überprüft.

Der LAL-Test wurde in der Gruppe von Herrn Dr. Christian Alexander am Forschungszentrum Borstel durchgeführt.

4.2.2 Herstellung von Gesamtzelllysaten

Die zu untersuchenden Zellen wurden zwei Mal für 5 Minuten bei 1300 Upm mit PBS gewaschen. Anschließend fand die Lyse für 10 Minuten auf Eis in TNE-Lysepuffer statt. Durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 14000 Upm und 4 °C wurden die unerwünschten Zellbestandteile pelletiert. Die im Überstand gelösten Proteine konnten im Westernblot analysiert werden.

4.2.3 Westernblotanalyse

Proteinkonzentrationsbestimmung

Zur Ermittlung der Konzentration von Proteinen, z.B. in Gesamtzelllysaten oder Proteinpräparationen, wurden zwei verschiedene Methoden eingesetzt. Für Lösungen mit nur wenig zu erwartendem Protein wurde die sensitivere BCA-Methode benutzt, in den meisten Fällen jedoch erfolgte die Proteinbestimmung mit der Coomassie Brilliant Blue Methode.

Proteine reduzieren zweiwertige Kupferionen (Cu^{2+}) zu Cu^+ , das BCA-Reagenz (Bicinchoninsäure) bildet anschließend aus je zwei BCA-Molekülen mit einem Cu^+ Komplex, welche bei einer Wellenlänge von 562 nm eine messbare Absorption aufweisen. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers und für die Messung wurde eine BSA-Standardreihe von 0,2 – 1 mg/ml als Vergleich mitgeführt.

Coomassie bildet Komplexe mit Proteinen in Lösung. Das Absorptionsmaximum des Coomassie verschiebt sich dadurch von 470 zu 595 nm. Es wurden je 1 ml Coomassie Protein Assay Reagenz mit 1 - 5 μl der zu analysierenden Proteinlösung gemischt und im Spektralphotometer gemessen. Zum Vergleich wurde eine Kalibrierungsgerade mit definierten Konzentrationen BSA angelegt.

SDS-PAGE

Das Detergenz SDS (Sodiumdodecylsulfat) bindet an Proteine und überdeckt deren Eigenladung, wodurch negativ geladene Komplexe entstehen. Disulfidbrücken in den Komplexen können z.B. durch β -ME im Probenpuffer reduziert werden. Durch die einheitliche Ladung der Proteine können diese dann nur nach ihrer Größe differenziert werden. Die Auftrennung erfolgt dabei durch einen Molekularsiebeffekt der porösen Struktur von Polyacrylamid. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Trenngele mit einem Polyacrylamidanteil von 10 und 15 % verwendet.

Ein 5 % Sammelgel über dem sog. Trenngel sorgt für eine gleichmäßige Ausrichtung und Ankonzentrierung der Proteine.

Westernblot

Der Transfer der in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (Macherey-Nagel) erfolgte in einem elektrischen Feld bei 100 V und entsprechenden mA für 1 Stunde. Das Gel wurde hierfür auf die Membran geschichtet und beides umgeben von Filtermembranen in eine Westernblotkammer von Biorad eingesetzt. Die Spannung wurde in der Kammer geleitet durch Transblotpuffer, das System wurde während des Laufs gekühlt.

Nachdem der Transfer auf die Nitrozellulose erfolgt war, wurde die Membran für mindestens 1 Stunde in einer 5 % Milchpulver-PBST-Lösung (MP-PBS-T) unter Schütteln blockiert. Dadurch wurden alle freien Proteinbindestellen auf der Membran mit dem Milchpulverprotein belegt und es konnte im weiteren Verlauf nur noch eine spezifische Antikörperbindung stattfinden.

Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte ebenfalls in 5 % MP-PBS-T, üN bei 4 °C rotierend. Nach drei Waschschritten mit PBS-T auf einem Schüttler fand die Inkubation mit

dem sekundären Antikörper für 1 Stunde bei RT statt. Nach 1 Stunde Waschen in PBS-T mit mehrfachem Pufferwechsel wurde für 4 Minuten mit ECL Plus inkubiert. In dieser Zeit setzte die an den sekundären Antikörper gebundene Peroxidase das Substrat um und die Lumineszenz konnte durch Exposition auf Hyper-ECL-Filmen (GE Healthcare, München) sichtbar gemacht werden. Nach 1 bis 60 minütiger Exposition wurden die Filme entwickelt und fixiert.

4.3 Zellbiologische Methoden

4.3.1 Isolierung von peripheren mononukleären Zellen (PBMZ)

Mononukleäre Zellen können aus peripherem Blut mittels Dichtegradientenzentrifugation von den anderen Blutzellen über ihre spezifische Dichte separiert werden.

Durch Zentrifugation des in PBS verdünnten Blutes geschichtet auf Ficoll-Hypaque-Trennlösung, welche eine Dichte von 1,077 g/ml hat, wurden die verschiedenen Blutzellen nach ihrer Dichte getrennt. Im Überstand befanden sich nach der Zentrifugation Blutplasma und Thrombozyten, im Interphasering sammelten sich die Lymphozyten und unterhalb des Ficolls pelletieren Granulozyten und Erythrozyten.

Für die Separation wurde das Blut mindestens 1:2 mit PBS verdünnt, im Fall von LRS 1:5, und davon 30 - 35 ml auf 15 ml Ficoll-Lösung geschichtet. Die Zentrifugation erfolgte bei 2000 Upm für 20 Minuten ohne Bremse. Für die Gewinnung von Lymphozyten wurde der Interphasering gesammelt und 5 Minuten bei 1600 Upm mit PBS gewaschen um restliches Ficoll-Hypaque zu entfernen. In zwei weiteren Waschschrritten mit PBS für 10 Minuten bei 1000 Upm wurden die restlichen Thrombozyten entfernt. Die aufgereinigten Zellen wurden in X-VIVO15 (serumfreies Medium ohne weitere Zusätze) oder Kulturmedium aufgenommen.

4.3.2 Kryokonservierung

Für eine längerfristige Lagerung von lebenden Zellen können diese bei -196 °C in flüssigem Stickstoff eingefroren werden. Das verwendete Einfriermedium muss Dimethylsulfoxid (DMSO) enthalten, welches die Bildung von Kristallen in den Zellen verhindert und somit die Integrität der Zellen schützt.

Zunächst wurden bis zu maximal $3,5 \times 10^7$ Zellen (bei sehr großen Zellen deutlich weniger) für 5 Minuten bei 1300 Upm pelletiert und anschließend in 1 ml Einfriermedium (10 % DMSO

und 90 % FKS) resuspendiert. Um den folgenden Einfrierprozess etwas zu verlangsamen, wurden die Behältnisse mit den Zellen in mehrere Schichten Zellstoff eingewickelt. Nach wenigen Tagen (max. 7) Lagerung bei -80 °C wurden die Zellen in den flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen wurden die Zellen zügig von -196 °C in 37 °C überführt und schnellstmöglich in 10 ml Kulturmedium aufgenommen. Die vollständige Beseitigung des DMSOs erfolgte durch zwei Waschschrte mit Kulturmedium, bevor Zellzahl und -vitalität überprüft und die Zellen in Kultur genommen wurden.

4.3.3 Zellseparation mit dem Magnet-aktivierten Zellsorter (MACS)

Die Separation von Zellen aus dem Blut gesunder Spender oder von Patienten mit Hilfe des MACS-Systems der Firma Miltenyi wurde im Rahmen dieser Arbeit für verschiedene Zellsubpopulationen angewendet. Es wurden sowohl Zellpopulationen aus den PBMZ depletiert, als auch einzelne Populationen, wie etwa CD4⁺ T-Zellen isoliert. In allen Fällen erfolgte die Zellseparation nach den Angaben des Herstellers.

1. Positivselektion von Monozyten über CD14 MicroBeads
2. Depletion von Treg über CD25 MicroBeads
3. Positivselektion von CD4⁺ T-Zellen über CD4 MicroBeads II

Das Prinzip der Zellseparation mit MACS beruht auf der Markierung von Oberflächenmolekülen, welche nur von bestimmten Zelltypen exprimiert werden, mit spezifischen Antikörpern. Bei einer Positivselektion werden die Zellen von Interesse mit Antikörpern, welche an magnetische Kügelchen gebunden sind, markiert und anschließend in einem magnetischen Feld zurückgehalten und so von den unmarkierten Zellen getrennt. Bei der Negativisolierung werden alle unerwünschten Zelltypen markiert und zurückgehalten, während die Zellen von Interesse das magnetische Feld unberührt passieren.

4.3.4 Herstellung dendritischer Zellen (DC)

Dendritische Zellen können durch die Gabe von Zytokinen aus den Monozyten des peripheren Bluts differenziert werden. Hierfür wurden über CD14 MicroBeads der Firma Miltenyi Monozyten positiv aus PBMZ gesunder Spender selektioniert. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Reinheit der Monozyten wurde durchflusszytometrisch mit anti-CD14 Antikörpern (mAk) überprüft. Die Zellen wurden anschließend in einer Dichte von 0,5 - 1x10⁶ Zellen/ml in Zellkulturmedium mit GM-CSF und IL-4 für 5 Tage bei 37 °C inkubiert. In dieser Zeit erfolgte die Entwicklung von den Monozyten

zu immaturren DCs (iDCs), welche anhand der Marker CD14 (auf Monozyten) und CD83 (auf DCs) überprüft wurde. Danach wurde das Medium der Zellen gewechselt und frisches Medium mit GM-CSF, IL-4 sowie TNF- α zugegeben. Innerhalb der folgenden 24 Stunden reiften die iDCs zu maturen DCs (mDCs) aus, dies wurde über die Expression von CD83 im Durchflusszytometer überprüft. mDCs können in Medium mit den o.g. Zytokinen für ca. drei Wochen in Kultur gehalten werden, ohne sich dabei zu vermehren oder zu sterben.

4.3.5 Expansion von T-Zellen mit Hilfe eines „Feedercocktails“

Primäre T-Lymphozyten können durch allogene, also von einem fremden Spender stammende, so genannte Fütterzellen („feeder cells“) zur Zellteilung angeregt werden. Hierfür wurden PBMZ eines gesunden Spenders und EBV-Linienzellen (mit dem Epstein-Barr-Virus transformierte B-Zellen aus laboreigener Herstellung) im Verhältnis 10:1 gemischt. Die Fütterzellen wurden vor der Zugabe zu den Zielzellen mit 60 Gray (EBVs) bzw. 40 Gray (PBMZ) bestrahlt, um deren Proliferation zu verhindern, aber ihre Fähigkeit zur Antigenpräsentation zu erhalten. Als polyklonaler Stimulus wurde in dem so genannten Feedercocktail für T-Zellen 0,5 $\mu\text{g/ml}$ PHA verwendet. Es wurden je 1×10^6 bestrahlte allogene PBMZ und 1×10^5 bestrahlte EBVs zu je 1×10^6 Zielzellen gegeben. Das Zellwachstum erfolgte dann über einen Zeitraum von ca. 2 - 3 Wochen, bevor eine erneute Restimulation erforderlich wurde.

4.3.6 Durchflusszytometrische Analyse

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können Zellen nach der Markierung mit mAk phänotypisch analysiert werden. Im Durchflusszytometer (in dieser Arbeit wurde ein FACSCalibur von BD Biosciences verwendet) werden Zellen aus einer Suspension durch die umgebende Trägerflüssigkeit in der Messküvette vereinzelt und passieren dann einen Laserstrahl. Durch Größe und Granularität der jeweiligen Zelle wird das Licht des Lasers unterschiedlich stark abgelenkt. So können Zellen über das sog. Vorwärts- (*forward scatter*, FSC) und Seitwärtsstreulicht (*side scatter*, SSC) differenziert werden. Weitere Phänotypisierungen sind durch Markierung der Zellen mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern möglich. Diese Markierungen der Zellen können auf der Oberfläche aber auch im Zellinneren durchgeführt werden. Es besteht außerdem die Möglichkeit zwischen lebenden und toten Zellen zu unterscheiden.

Oberflächenmarkierung

Für die Antikörpermarkierung von Molekülen auf der Zelloberfläche wurden 1×10^5 bis 1×10^6 Zellen in 96 Vertiefungen Spitzbodenplatten pelletiert und in den entsprechenden Antikörperlösungen resuspendiert. Je Antikörper wurden 7 - 10 μl eingesetzt. Die Inkubation mit dem Erstantikörper erfolgte für 25 Minuten bei 4 °C im Dunkeln. Anschließend wurden die Zellen zwei Mal mit FACS-Waschpuffer (WP) für 4 Minuten bei 4 °C und 1000 Upm gewaschen. Wurden direkt an Fluoreszenz-Farbstoff gekoppelte Antikörper verwendet, so konnten die Zellen danach abschließend in 1 % PFA-Lösung fixiert und bis zu zwei Wochen im Kühlschrank gelagert werden. Bei unmarkierten Erstantikörpern wurde ein markierter Sekundärantikörper für 15 Minuten bei 4 °C zugegeben. Es folgten zwei weitere Waschschrte in FACS-WP wie oben, bevor auch hier die Zellen in 1 % PFA-Lösung fixiert wurden.

Intrazelluläre Markierung

Es wurden ca. 2×10^5 Zellen in 96 Kavitäten Spitzbodenplatten einmal mit kaltem Staining-Puffer gewaschen (1000 Upm und 4 °C für 4 Minuten), bevor mit 100 μl Cytofix/Cytoperm für 20 Minuten bei 4 °C permeabilisiert wurde. Es folgten zwei Waschschrte mit je 200 μl Perm/Wash für 4 Minuten bei 1000 Upm. Die Zellen wurden dann in je 100 μl Antikörperlösung für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschrten mit Perm/Wash wurden die Zellen in Staining-Puffer aufgenommen und sofort am Durchflusszytometer gemessen.

Zelltodanalyse durch PI-Markierung

PI dringt nach dem Tod einer Zelle durch die sich auflösende Zellmembran in diese ein. Eine intakte Zellmembran kann von PI nicht passiert werden und es können so lebende (PI-negative) und tote (PI-positive) Zellen im Durchflusszytometer unterschieden werden.

Die zu untersuchenden Zellen wurden zunächst in PBS für 5 Minuten bei 1300 Upm gewaschen und daraufhin in PI-Lösung resuspendiert. Die Messung erfolgte nach 15 Minuten Inkubation.

4.3.7 Proliferationstest mit ^3H -Thymidin

Während der Proliferation verdoppeln Zellen ihre DNA. Befindet sich radioaktives (^3H) Thymidin im Medium, so wird dieses an Stelle von normalem Thymidin in die DNA eingebaut. Mit Hilfe eines Szintillationszählers kann, wie im Folgenden erklärt, die

Radioaktivität in Form von *counts per minute* (cpm), also Impulse pro Minute, in einer Probe ermittelt werden. Die gemessene Radioaktivität ist dabei direkt proportional zu der erfolgten Proliferation.

Die Zellen wurden abhängig vom Versuchsaufbau an bestimmten Tagen für 16 Stunden mit je 20 µl (1 µCi) ³H-Thymidin versetzt. Nach Ablauf der Inkubation wurden die Zellen bis zur Messung bei -20 °C eingefroren. Am Tag der Messung wurden die aufgetauten Proben auf Filtermembranen übertragen. Diese wurden getrocknet und mit Wachs beschichtet, welches als Szintillator wirkte und die Radioaktivität der Proben in Lichtenergie umwandelte, die im β-Counter quantifiziert werden konnte.

4.3.8 Absolutzellzahlbestimmung mit der *Standard Cell Dilution Analysis* (SCDA)

Die SCDA-Methode ermöglicht die Bestimmung der Absolutzellzahlen von bis zu drei Zellpopulationen über die parallele durchflusszytometrische Analyse der Zellen von Interesse mit einer definierten Anzahl sog. Standardzellen. Die Standardzellen bestehen aus einer Population mit möglichst einheitlich großen Zellen (z.B. CD4⁺ T-Zellen), welche durch die Färbung vieler verschiedener Oberflächenmoleküle mit gleichfarbig markierten Antikörpern stark in einer Farbe fluoreszieren, z.B. FITC. Die zu untersuchenden Zellen werden ebenfalls mit mAk markiert, fluoreszieren aber durch die Verwendung von Kombinationen weiterer Farbstoffe, wie z.B. PE in einem anderen Bereich. Durch die Zugabe von exakt 10⁵ Standardzellen pro ml in 0,2 µg/ml Propidiumjodid (PI) können zum einen die toten Zellen ausgeschlossen und zum anderen die Absolutzellzahlen der vitalen Zellen ermittelt werden. Die geringe Konzentration von nur 0,2 µg/ml PI ermöglicht die Analyse der PI⁺ Zellen in der Fluoreszenz 2 und lässt so parallel die Messung von Zellen zu, welche mit einem Farbstoff für die Fluoreszenz 3 markiert wurden, wie z.B. PE. Nach der Messung im Durchflusszytometer kann aus dem Quotienten der zu untersuchenden Zellpopulation und der Standardzellen durch Multiplikation mit der Anzahl der zugegebenen Standardzellen die Absolutzellzahl der Zellen von Interesse ermittelt werden. Bsp.: (% CD4⁺ T-Zellen/ % Standardzellen)x10⁴ = CD4⁺ T-Zellen absolut.

Herstellung von Standardzellen

Es wurden CD4⁺ T-Zellen aus frischen PBMZ über ein Negativselektionskit von Miltenyi nach Protokoll des Herstellers isoliert. Um eine möglichst intensive Färbung der Zellen zu erhalten, wurden mehrere Oberflächenmoleküle auf den CD4⁺ T-Zellen zunächst mit einem primären Antikörper beladen:

1. biotinylierter anti-MHC-Klasse I mAk (W6/32)
2. biotinylierter anti-CD2 mAk (Okt11)
3. anti- $\alpha\beta$ -TZR (BMA031)
4. biotinylierter anti-CD4 (Okt4)

Die Zellen wurden für 20 Minuten bei 4 °C inkubiert, einmal mit WP 5 Minuten bei 1300 Upm gewaschen und mit Ziege-anti-Maus ($Z\alpha M$)-Biotin weitere 20 Minuten bei 4 °C inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschritten wie zuvor wurden die Zellen mit Avidin-FITC, welches an Biotin bindet, für 20 Minuten bei 4 °C im Dunkeln markiert. Nach zwei abschließenden Waschschritten wurden die Zellen in einer Konzentration von 10^7 Zellen/ml in 1 % PFA aufgenommen. Die Standardzellen waren für ca. 6 Monate stabil.

Der SCDA wurde je an verschiedenen Tagen durchgeführt, abhängig von den zu untersuchenden Zellen, indem die Zellen zunächst mit 100 μ l PBS pro Vertiefung für 4 Minuten bei 1100 Upm gewaschen wurden. Nach Zugabe von je 10 μ l Antikörpergemisch (z.B. anti-CD4 mAk (OKT4) unkonjugiert, anti-CD8 mAk (OKT8) unkonjugiert und OKT8 FITC-markiert) für 25 Minuten bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Es wurde erneut für 4 Minuten bei 1100 Upm gewaschen, diesmal mit FACS-WP. Die Markierung mit je 10 μ l des Zweitantikörpers $Z\alpha M$ -PE (1:60) erfolgte für 15 Minuten bei 4 °C im Dunkeln. Nach einem letzten Waschschriff mit FACS-WP wurde jede Probe mit genau 10^4 Standardzellen in 100 μ l FACS-WP mit PI resuspendiert und sofort im FACS gemessen.

Für die Analyse der Proliferation von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen wurden die $CD4^+$ T-Zellen mit anti-CD4 mAk und $Z\alpha M$ -PE markiert, sie erschienen dadurch einfach positiv in der Fluoreszenz 2 am Durchflusszytometer. Die $CD8^+$ T-Zellen wurden mit einer Kombination aus anti-CD8-FITC und anti-CD8-unkonjugiert mit $Z\alpha M$ -PE als Zweitantikörper markiert. Die $CD8^+$ T-Zellen erschienen doppelt positiv in Fluoreszenz 1 und 2. Die Fluoreszenz 1 der $CD8^+$ T-Zellen war dabei aber deutlich weniger intensiv, als die Fluoreszenz 1 der ausschließlich mit FITC markierten Standardzellen.

Für die Proliferationsanalyse von $CD4^+$ T-Zellen und $V\delta 2^+$ T-Zellen wurde für die Markierung der $CD4^+$ T-Zellen ebenfalls anti-CD4 mit $Z\alpha M$ -PE verwendet. Die Kombination der Antikörper zur Markierung der $V\delta 2^+$ T-Zellen bestand aus anti- $V\gamma 9$ mAk (7A5) mit FITC markiert sowie unkonjugiert mit $Z\alpha M$ -PE. In diesem Fall erschienen die $V\delta 2^+$ T-Zellen doppelt positiv und die $CD4^+$ T-Zellen ebenfalls einfach positiv in Fluoreszenz 2.

4.3.9 IFN- γ Secretion Assay

Werden T-Zellen durch ein Antigen aktiviert, so beginnen sie Zytokine zu produzieren und sezernieren diese in das sie umgebende Medium. Im Fall von Th1 T-Zellen ist das vor allem IFN- γ . Für den IFN- γ Secretion assay der Firma Miltenyi wurden die Antigen-stimulierten Zellen, in dieser Arbeit PBMZ, mit einem Antikörper beladen, welcher auf der Oberfläche der Zellen haftete und von den Zellen freigesetztes Zytokin auf deren Oberfläche bindet. Durch einen zweiten, ebenfalls gegen das Zytokin IFN- γ gerichteten Antikörper mit einer PE-Markierung war es anschließend möglich, die IFN- γ -produzierenden, also aktivierten Zellen von den nicht aktivierten Zellen im Durchflusszytometer zu unterscheiden.

4.3.10 Zytokinbestimmung über ELISA

Mit Hilfe einer enzymgekoppelten immunchemischen Analyse ist es möglich die Konzentration von Proteinen in einer Lösung zu ermitteln. Dafür werden Antikörper z.B. gegen ein Zytokin auf 96 Kavitäten Maxisorb Platten gebunden. Wird z.B. Zellkulturüberstand in diese Platten gegeben, so binden die Antikörper das entsprechende Zytokin aus dem Überstand. Es wird anschließend mit einem zweiten Antikörper gegen ein anderes Epitop des Zytokins inkubiert, an welchen dann ein Peroxidase-gekoppelter Sekundärantikörper binden kann. Die Peroxidase kann schließlich ein Substrat umsetzen, dessen Farbintensität proportional zur Menge an Protein ist und im ELISA Reader (Infinite M200 ELISA Reader, Tecan Group) gemessen werden kann. Im Vergleich mit einer Standardreihe kann die Menge an Zytokin aus dem Überstand ermittelt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Analysen der Zytokine IFN- γ , TNF- α , IL-4 und IL-1 β nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

4.3.11 Statistik

Die Datenauswertung und die statistischen Analysen erfolgten mit den Programmen Microsoft Office Excel sowie Prism GraphPad. Eine Signifikanz von $p \leq 0,05$ wurde mit * dargestellt, ein signifikanter Unterschied von $p \leq 0,01$ wurde mit ** angezeigt und eine Darstellung von *** bedeutet die höchste Signifikanz von $p \leq 0,001$. Der in den einzelnen Fällen verwendete Test zur Untersuchung der Signifikanz wurde jeweils im Ergebnisteil entsprechend angegeben. Alle verwendeten statistischen Tests waren nicht parametrisch und zweiseitig.

5 Ergebnisse

5.1 Generierung Proteinase 3–spezifischer T-Zellen

Um eine genauere Analyse von T-Zellen gegen PR3 als Autoantigen in der GPA zu ermöglichen, sollten im ersten Teil der hier vorliegenden Arbeit PR3-spezifische T-Zelllinien hergestellt werden. Die Etablierung einer Methode zur Generierung dieser Linien erfolgte zunächst mit dem Blut gesunder Spender, da hier größere Mengen Blut und somit Zellmaterial zur Verfügung stand, welches einfacher beschafft werden konnten. Es war bekannt, dass auch in gesunden Spendern diese Zellen in geringer Frequenz vorliegen [49]. In den meisten Versuchsreihen wurde nach der Erprobung der Methode ein Versuch mit Patientenmaterial durchgeführt.

5.1.1 Herstellung dendritischer Zellen aus Monozyten des peripheren Blutes

Im Rahmen der ersten Versuchsreihe sollten dendritische Zellen mit der DNA für das Autoantigen PR3 transfiziert und nach erfolgter PR3 Expression die spezifischen T-Zellen stimuliert werden. Dendritische Zellen wurden mit Hilfe von Zytokinen aus Monozyten des peripheren Blutes generiert. Dafür wurden über CD14 MicroBeads die Monozyten aus PBMZ positiv selektioniert. Abb. 6 zeigt die durchflusszytometrische Analyse der PBMZ vor der Monozytenisolierung (A) und die separierten Monozyten (B) im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht. Die Markierung der Monozyten mit einem Antikörper gegen CD14 (C) zeigt, dass die Zellen zu 97% rein waren.

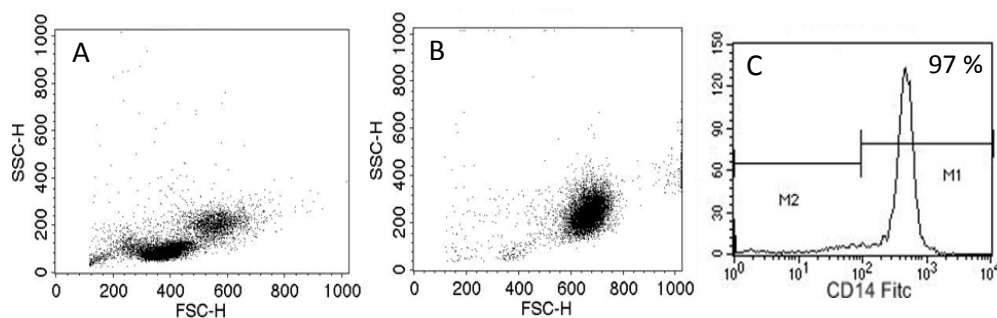


Abb. 6: Durchflusszytometrische Analyse von Gesamt-PBMZ (A) und aufgereinigten Monozyten (B+C). Dot Plot Analyse von Zellen im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht (A+B) und CD14 FITC Markierung von Monozyten nach Aufreinigung (C).

Die isolierten Monozyten wurden zunächst für 5 Tage mit den Zytokinen IL-4 und GM-CSF zu unreifen (immaturen) DCs (iDCs) differenziert. Durch Inkubation mit den o.g. Zytokinen plus zusätzlicher TNF- α -Stimulation für weitere 48 Stunden erfolgte die Differenzierung zu reifen (maturen) DCs (mDCs). In Abb. 7 ist die Entwicklung der DCs anhand von Oberflächenmolekülen nachzuvollziehen.

Die Markierung der DCs mit CD14 FITC in Abb. 7A zeigt, dass iDCs noch schwach CD14 positiv sind, mDCs jedoch kein CD14 mehr auf der Zelloberfläche exprimieren. Dendritische Zellen regulieren während ihrer Reifung das kostimulatorische Molekül CD83 hoch, welches auf iDCs nur gering exprimiert wird, dafür aber stark auf der Oberfläche ausgereifter mDCs

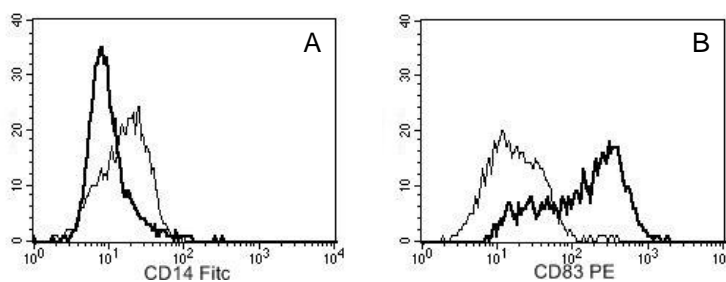


Abb. 7:
Durchflusszytometrische Analyse des Reifungszustands dendritischer Zellen. Markierung von iDCs (dünne Linie) und mDCs (dicke Linie) mit CD14 FITC (A) und CD83 PE (B). Die Markierung der iDCs erfolgte an Tag 5, die der mDCs an Tag 6 der Differenzierung.

detektierbar ist. Die ausgereiften DCs wurden vor der weiteren Verwendung auf ihre Reinheit im FACS untersucht (hier nicht gezeigt), indem eine Analyse mit monoklonalen Antikörpern gegen CD3, CD19 und CD56 durchgeführt wurde. Die mDCs waren stets negativ für die genannten Antigene und konnten für Transfektionen eingesetzt werden.

5.1.2 Expression von Proteinase 3 in DCs

Es folgten Versuche zur Transfektion der mDCs mit PR3. Dazu wurde das Konstrukt pcDNA3-FlagPR3_m verwendet, dessen Klonierung in 3.2.1 beschrieben wurde.

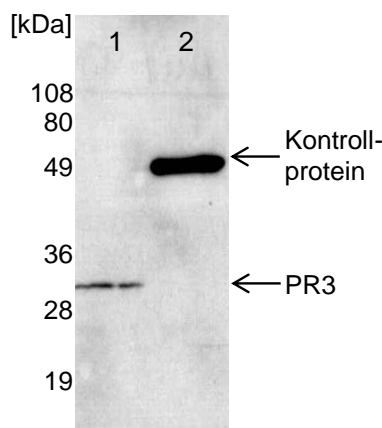


Abb. 8: Westernblotanalyse von transfizierten mDCs mit α Flag und Z α M-POD. Es wurden 1×10^6 Zellen mit dem Dendritic Cell Nukleofector Kit und $5 \mu\text{g}$ pcDNA3-FlagPR3_m (1) bzw. $5 \mu\text{g}$ eines Kontrollproteins mit Flag-Epitop (2) nach Vorschrift transfiziert. Nach 24 Stunden wurden Gesamtzelllysate hergestellt.

In Abb. 8 ist eine Westernblotanalyse transfizierter DCs gezeigt. Es wurden 1×10^6 mDCs mit $5 \mu\text{g}$ pcDNA3-FlagPR3_m mit dem Human Dendritic Cell Nukleofector Kit von Amaxa nach Vorschrift transfiziert und nach 24 Stunden Gesamtzelllysate hergestellt. Der Nachweis erfolgte mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers gegen das an die PR3 fusionierte Flag-Epitop. Als Kontrolle wurden parallel DCs mit einem ebenfalls mit einem Flag-Epitop versehenen Kontrollprotein transfiziert. Aus Abb. 8 wird deutlich, dass die Expression des Kontrollproteins in den DCs deutlich stärker ist als die der PR3. Im Mikroskop war vor der Herstellung der Zelllysate zu erkennen, dass in den mit PR3 transfizierten DCs ein deutlich höherer Anteil toter Zellen vorhanden war. Um eine effiziente Transfektion von DCs mit einer möglichst niedrigen Sterberate der Zellen zu erzielen, wurden noch zahlreiche weitere Methoden erprobt. Unter anderem wurde eine Transfektion der DCs über Elektroporation sowie verschiedenste Transfektionsreagenzien getestet. Die Transfektionen wurden außerdem nicht nur mit Plasmid-DNA sondern zum Teil auch mit *in vitro* hergestellter RNA durchgeführt. Da nur mit der hier gezeigten Methode der Amaxa-Nukleofektion eine Expression der PR3 in DCs im Westernblot nachgewiesen werden konnte, wurde diese Transfektionsmethode weiter angewendet.

Im Folgenden wurden mDCs aus den Monozyten eines gesunden Spenders wie oben beschrieben hergestellt und mit PR3 transfiziert. Parallel zu den mDCs wurden autologe CD3⁺ T-Zellen über negative Separation isoliert. Die CD3⁺ T-Zellen wurden für die Zeit der DC-Differenzierung und der Transfektion, also insgesamt für 6 Tage, bei -196°C gelagert. Für einen Proliferationsansatz wurden die PR3-transfizierten mDCs mit den aufgetauten CD3⁺ T-Zellen im Verhältnis 1:10 für 5 - 7 Tage kokultiviert. Parallel wurden mDCs ohne Zugabe eines Plasmids transfiziert und ebenfalls mit T-Zellen kokultiviert. Zu einem Teil des Ansatzes wurden die für mDCs nötigen Zytokine (also IL-4, GM-CSF und TNF α) zugegeben. Die Proliferation der CD3⁺ T-Zellen wurde über den Einbau von ³H-Thymidin an den Tagen 5,6 und 7 analysiert.

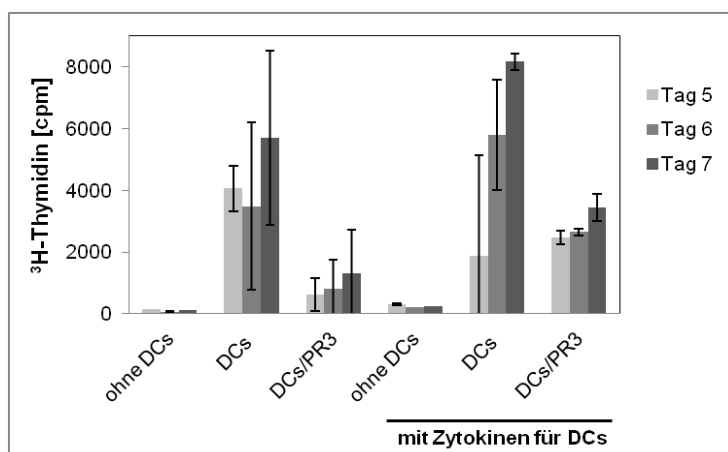


Abb. 9: Proliferationsanalyse von CD3⁺ T-Zellen mit mDCs.

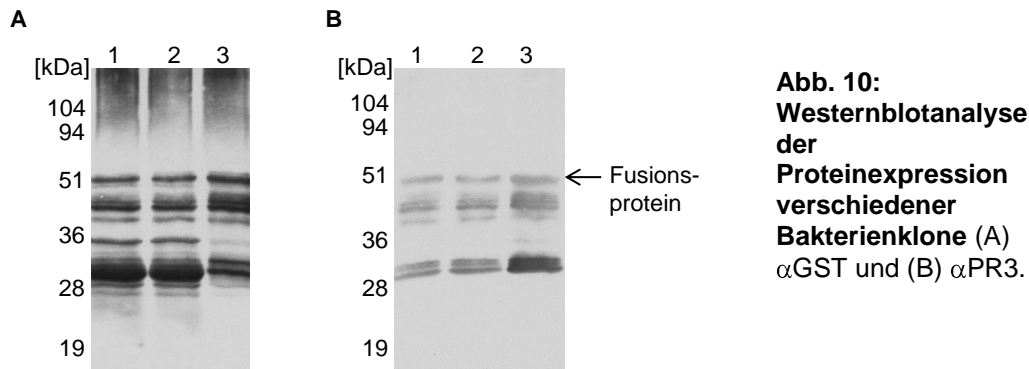
Je 1×10^5 CD3⁺ T-Zellen wurden für 5 - 7 Tage mit 1×10^4 DCs mit und ohne Zytokine für DCs inkubiert. Die DCs waren ohne Plasmid oder mit PR3 transfiziert mit dem Human Dendritic Cell Nukleofector Kit. An den Tagen 5 - 7 wurde der Einbau von ³H-Thymidin analysiert. Angegeben sind Mittelwerte aus dreifachen Messungen mit Standardabweichung.

Das Ergebnis ist in Abb. 9 dargestellt. Es zeigte sich, dass CD3⁺ T-Zellen alleine nicht proliferieren, die Zugabe der mDCs, die ohne Plasmid transfiziert wurden, allerdings regte die Proliferation der Zellen an. Wurden PR3-transfizierte mDCs zugegeben, so war eine deutlich schwächere Proliferation zu sehen im Vergleich zu den CD3⁺ T-Zellen mit mDCs, die ohne Plasmid transfiziert wurden. Dieser Effekt konnte ebenfalls in Anwesenheit von Zytokinen für DCs beobachtet werden, allerdings proliferierten die Zellen insgesamt stärker. Die verminderte Proliferation in Anwesenheit der PR3-transfizierten mDCs könnte auf eine höhere Sterblichkeit der DCs nach PR3-Transfektion im Vergleich zur Transfektion ohne Plasmid zurückzuführen sein. Die Proliferation der CD3⁺ T-Zellen nach Zugabe der ohne Plasmid behandelten DCs könnte auf die Generierung der Zellen zurückzuführen sein. Die DCs wurden während der Differenzierung in RPMI-Medium mit 10% FKS kultiviert. Die DCs könnten während ihrer Generierung Bestandteile des FKS aus dem Medium aufgenommen und diese dann präsentiert haben. Auch wenn der Proliferationsansatz in serumfreiem X-Vivo15-Medium, also ohne FKS-Zusatz, durchgeführt wurde, könnten die DCs noch Bestandteile des FKS auf ihrer Oberfläche präsentiert haben, welche ausreichen würden, um eine Proliferation der CD3⁺ T-Zellen zu bewirken.

5.1.3 Herstellung von rekombinanter Proteinase 3

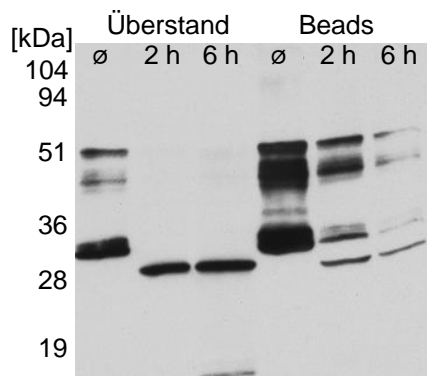
Für die unter 5.1.2 beschriebene Methode der Generierung PR3-spezifischer T-Zellen benötigt man viel Blut eines Spenders, um zunächst DCs und anschließend T-Zellen zu isolieren bzw. zu generieren.

Da von GPA-Patienten nur eine sehr begrenzte Menge von 30 - 35ml Vollblut zur Verfügung stand, wurde eine weitere Methode zur Stimulation PR3-spezifischer T-Zellen aus PBMZ entwickelt. Hierfür wurde zunächst das Antigen PR3 rekombinant hergestellt. Das Gen für die reife PR3 wurde hierfür in den prokaryotischen Expressionsvektor pGEX-3X kloniert und in kompetente *E.coli* Bakterien transformiert. Durch den Vektor wurde die Glutathion-S-Transferase (GST) an die PR3 fusioniert. In Abb. 10 ist die Proteinexpression einiger ausgewählter Bakterienklone gezeigt. Der Nachweis des Proteins erfolgte mit α GST (A) und α PR3 (B) Antikörpern. Es wird deutlich, dass der Klon Nr. 3 die größte Menge des gewünschten Proteins produzierte. In der Höhe von 51 kDa befindet sich das Fusionsprotein, bestehend aus PR3 (28 - 30 kDa) und dem GST-Anteil (25-27 kDa). Mit Klon Nr. 3 wurden anschließend Proteinexpressionen im großen Maßstab durchgeführt.



Um später Stimulationen nur mit dem PR3-Anteil des Fusionsproteins durchführen zu können, wurde der GST-Anteil mit Hilfe von FaktorXa wieder abgespalten.

Für das Enzym FaktorXa befand sich im Vektor pGEX-3X eine Schnittstelle, welche im Fusionsprotein zwischen GST und PR3 exprimiert wurde. Nach dem Verdau des Fusionsproteins wurde der GST-Anteil über Glutathion-Sepharoseperlen aus der Proteinlösung entfernt. In einer Westernblotanalyse mit anti-PR3 Antikörper wurde der Verdau nach 2 Stunden und 6 Stunden überprüft (Abb. 11). Es zeigt sich, dass im Überstand nur noch PR3 auf einer Höhe von 28-30 kDa nachgewiesen werden konnte. In der Lösung befand sich also kein GST-Fusionsprotein mehr, welches auf einer Höhe von 51 kDa erschienen wäre. Nach zwei Stunden Verdau befand sich an den Glutathionbeads noch eine größere Menge Protein, nach sechs Stunden war der Verdau nahezu vollständig.



Bei einem in E.coli-Bakterien rekombinant hergestellten Protein kann die Anwesenheit von LPS (Lipopolysaccharid), einem Bestandteil der Bakterienmembran gram-negativer Bakterien, nie ganz ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund wurde die Menge von LPS in der Proteinlösung über einen LAL-Test bestimmt. Dieser wurde am Forschungszentrum Borstel im Labor von Dr. Christian Alexander durchgeführt.

Probe	LPS-Gehalt [pg/ μ g]
1. Produktion rPR3	1318
2. Produktion rPR3	28
PR3 von Orgentec	5

Tab. 9: LPS-Gehalt verschiedener PR3-Präparationen ermittelt über den LAL-Assay Coamatic Chromo-LAL K (Chromogenix). Die Analyse wurde durchgeführt von Dr. Christian Alexander im Forschungszentrum Borstel. Untersucht wurden zwei Produktionen rekombinanter PR3 im Vergleich zu der kommerziell erhältlichen PR3 der Firma Orgentec.

Untersucht wurden zwei Chargen der rekombinant hergestellten PR3 sowie die von der Firma Orgentec produzierte, native PR3. Es konnte gezeigt werden, dass die erste Charge rekombinanter PR3 1318 pg/ μ g und die zweite Charge 28 pg/ μ g LPS enthielt. In der PR3 der Firma Orgentec konnten 5 pg/ μ g LPS nachgewiesen werden.

Auf die Einsatzkonzentrationen der Proteinasen von 0,1 μ g/ml bezogen bedeutet das eine maximale LPS-Menge von 0,13 ng/ml bei der rPR3 und 0,0004 ng/ml bei der PR3-Org.

5.1.4 Ex vivo Generierung von T-Zelllinien

Es wurde bereits gezeigt, dass in Patienten mit GPA aber auch in gesunden Spendern PR3-reaktive CD4⁺ T-Zellen existieren [48]. Da diese jedoch nur in sehr geringer Frequenz vorkommen, müssen sie zunächst aus dem Blut der Patienten isoliert und anschließend *in vitro* expandiert werden, damit eine intensivere Charakterisierung möglich ist.

Mit Hilfe eines IFN- γ *Secretion assay* der Firma Miltenyi sollten die PR3-reaktiven Zellen direkt *ex vivo* aus Patienten-PBMZ angereichert werden. Aktivierte Th1 T-Zellen produzieren das Zytokin IFN- γ und geben dieses in das sie umgebende Medium ab. Mit Hilfe des *Secretion assay* kann durch Antikörper das Zytokin auf der Zelloberfläche der aktivierten Zelle festgehalten und mit einem weiteren Antikörper gegen das Zytokin dieses nachgewiesen werden. So können durch Antigen aktivierte T-Zellen innerhalb eines heterogenen Zellgemischs identifiziert werden. Die PBMZ wurden dafür für 16 Stunden mit dem Antigen PR3 stimuliert und anschließend der Assay nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Auf eine Anreicherung der IFN- γ -sezernierenden Zellen über MACS-Säulen wurde jedoch verzichtet und stattdessen eine Sortierung der Zellen am FACSAria vorgenommen, um die Zellen möglichst zu schonen. Es wurde bei diesem Assay davon ausgegangen, dass durch die PR3 CD4⁺ T-Zellen des Typs Th1 aktiviert wurden, welche anschließend das Zytokin IFN- γ freisetzen. Für die Sortierung am FACSAria wurden daher anhand einer Positiv- und einer Negativkontrolle die CD4⁺ und IFN- γ ⁺ Zellen ausgewählt.

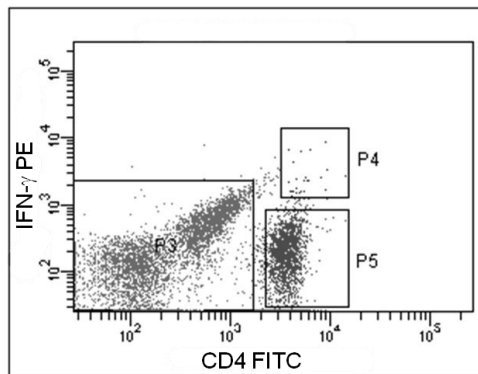


Abb. 12: Dot Plot Analyse einer Sortierung PR3-stimulierter Zellen am FACS Aria. In der Region P4 eingegrenzte Zellen wurden als doppelt positive, PR3-reaktive CD4⁺ T-Zellen identifiziert und sortiert.

In Abb. 12 sind die CD4⁺ aber IFN- γ T-Zellen (P5) als nicht PR3-reaktiv gegenüber den CD4⁺ Zellen abgegrenzt worden, welche nicht weiter von Interesse waren. In P4 wurden die doppelt positiven Zellen eingeschlossen, also jene, die CD4 auf ihrer Oberfläche exprimierten und IFN- γ positiv waren. Diese wurden als PR3-reaktive Zellen angesehen und einzeln in Vertiefungen einer Rundbodenplatte mit 96 Kavitäten sortiert. In jeder Vertiefung lagen 1×10^3 bestrahlte Epstein-Barr-Virus transformierte B-Zellen und 1×10^4 bestrahlte PBMZ als Feederzellen in Medium mit dem Mitogen PHA vor. Mit dieser Methode wurden CD4⁺ T-Zellklone generiert, welche anfänglich mit der rekombinanten PR3 oder der PR3-Org stimuliert worden waren. Die Zellen wurden nun bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Es wurden pro Spender je zwei Platten mit 96 Vertiefungen für jedes verwendete Antigen isoliert und die übrigen positiven Zellen zu einer Linie vereinigt. Die Zellklone, welche proliferierten, wurden mit Hilfe von Fütterzellen und PHA weiter expandiert.

Um die Spezifität der T-Zellklone zu überprüfen, wurden diese nach ausreichender Expansion erneut im autologen System mit PR3 stimuliert. Es wurden hierfür PBMZ desselben Spenders mit dem entsprechenden Antigen inkubiert und vor der Zugabe zu den T-Zellklonen bestrahlt. Eine Bestrahlung der mit Antigen vorinkubierten PBMZ bei 40 Gray hat verhindert, dass die darin enthaltenen T-Zellen auf den Antigenstimulus reagierten. So konnte im Folgenden nur die Reaktion der T-Zellklone untersucht werden.

Zum Nachweis der Reaktivität der T-Zellen wurden Aktivierungsmarker auf der Zelloberfläche (Daten nicht gezeigt) und IFN- γ im Zellkulturüberstand analysiert. Die Analyse der Aktivierungsmarker CD69 und CD25 ergab keine Hochregulation der beiden Moleküle auf einem der Klone nach Stimulation mit PR3. Nur nach Inkubation der T-Zellen in Anwesenheit von PHA wurden die beiden Aktivierungsmarker heraufreguliert.

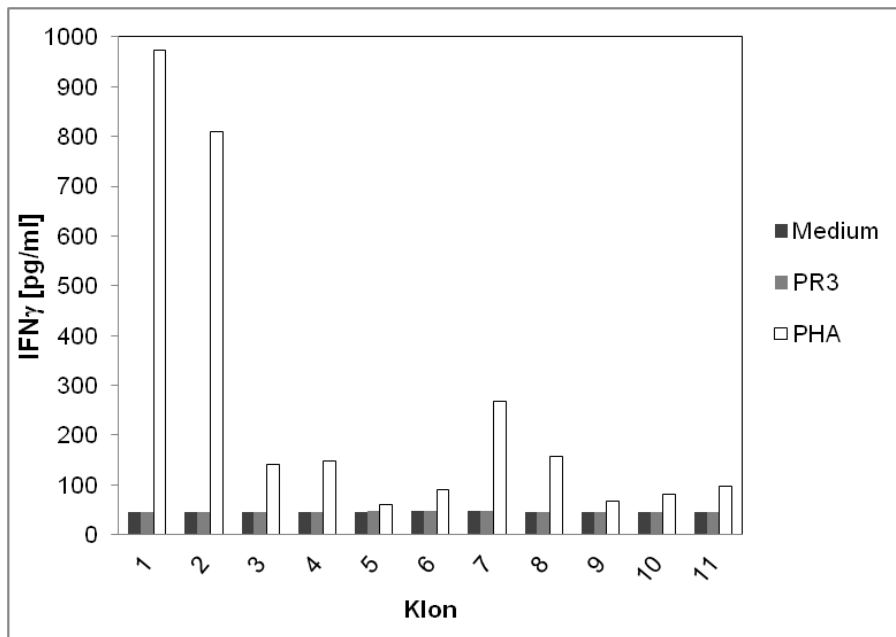


Abb. 13: IFN- γ ELISA von Zellkulturüberständen potentieller PR3-spezifischer CD4⁺ T-Zellklone nach Restimulation. Je 1×10^5 T-Zellen wurden mit 5×10^4 autologen bestrahlten PBMZ für 2 Tage in Medium, mit PR3 oder PHA inkubiert. Es wurden Überstände an Tag 1 und 2 gesammelt und im IFN- γ ELISA analysiert, hier wurde Tag 2 dargestellt.

Abb. 13 zeigt die Ergebnisse eines IFN- γ ELISA mit Zellkulturüberständen von Tag 1 und 2 nach autologer Restimulation. Als Negativkontrolle dienten T-Zellen in Medium und als Positivkontrolle wurden die T-Zellen mit PHA stimuliert. Die eingesetzte PR3 entsprach immer derjenigen, die für die Primärstimulation verwendet worden war, das heißt, Klone, die auf rPR3 reagiert hatten, wurden auch mit rPR3 restimuliert und solche, die auf PR3-Org reagiert hatten, wurden mit PR3-Org erneut inkubiert. Aus Abb. 13 wird deutlich, dass alle untersuchten T-Zellklone nur nach PHA-Stimulation IFN- γ in den Überstand abgegeben haben. Das war auch an dem hier nicht gezeigten Tag 1 der Fall. Eine Aktivierung durch PR3 konnte also bei keinem der T-Zellklone nachgewiesen werden.

Der hier beschriebene Versuch wurde mit dem Blut eines GPA-Patienten durchgeführt. Nach der Sortierung waren 23 CD4⁺ T-Zellklone dieses Spenders gewachsen und wurden weiter expandiert. Die Zellen von fünf dieser Klone konnten nicht expandiert werden, sondern starben. Für die Restimulation zur Überprüfung der Antigenspezifität wurden 11 der verbliebenen Klone verwendet, da von den übrigen zu diesem Zeitpunkt noch keine ausreichende Menge zur Verfügung stand.

Um die Methode zu etablieren, wurde der hier beschriebene Ansatz zur Generierung PR3-spezifischer T-Zellen im Verlauf dieser Arbeit so oder in ähnlicher Form auch mit dem Blut von drei gesunden Spendern durchgeführt (Daten nicht gezeigt) da bekannt war, dass auch

gesunde Spender autoreaktive T-Zellen in ähnlichem Umfang aufweisen wie GPA-Patienten [49]. Es konnte jedoch von keinem der verwendeten Spender eine PR3-spezifische T-Zelllinie oder ein spezifischer T-Zellklon isoliert werden.

5.1.5 Generierung von T_{EM} über wiederholte autologe Restimulation

Da eine *ex vivo* Generierung PR3-spezifischer T-Zellen, wie in 5.1.4 beschrieben, weder aus dem Blut gesunder Spender noch aus Patientenblut möglich war, wurde in einem weiteren Experiment versucht, die PR3-reaktiven Zellen innerhalb der PBMZ zunächst anzureichern. Da die Proliferation von autoreaktiven T-Zellen in gesunden Organismen normalerweise durch regulatorische T-Zellen verhindert wird, wurde in parallel stattfindenden Experimenten der Einfluss von regulatorischen T-Zellen auf die Proliferation PR3-spezifischer T-Zellen untersucht, welche in Kapitel 5.2.1 ausführlich erläutert sind.

Ein Beispiel für eine solche Proliferationsanalyse nach Treg-Depletion aus den PBMZ eines gesunden Spenders ist in Abb. 14 gezeigt. Hierfür wurden die Treg mit Hilfe von CD25MicroBeads aus den PBMZ depletiert. Anschließend wurden 1×10^5 PBMZ oder PBMZ ohne Treg pro Vertiefung in X-Vivo-Medium für 12 Tage mit rPR3 stimuliert und die Proliferation an den Tagen 6, 8, 10 und 12 mit Hilfe von ^3H -Thymidininkorporation analysiert.

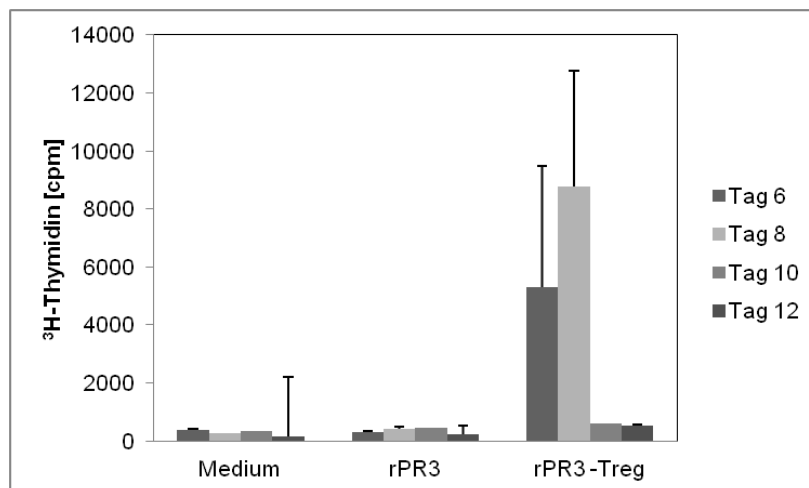


Abb. 14: Proliferation von PBMZ eines gesunden Spenders nach Stimulation mit PR3 in An- und Abwesenheit von Treg. Es wurden 1×10^5 PBMZ pro Vertiefung mit oder ohne Treg für 12 Tage in X-Vivo-Medium wie angegeben stimuliert. An den Tagen 6, 8, 10 und 12 wurde der Einbau von ^3H -Thymidin in die Zellen als Maß für die Proliferation gemessen. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert aus Triplikaten einer Stimulation mit dazugehöriger Standardabweichung.

Es wird deutlich, dass die PBMZ nach Treg-Depletion stärker proliferieren, als in Anwesenheit der Treg. Es konnte daher davon ausgegangen werden, dass durch die PR3-Stimulation von PBMZ gesunder Spender nach Treg-Depletion die Generierung einer PR3-reaktiven T-Zelllinie möglich ist.

Für die Aktivierung von PR3-spezifischen T-Zellen wurden PBMZ eines Spenders nach Treg-Depletion mit den verschiedenen PR3 mit und ohne Zusatz von IL-2 kultiviert. Nach Ablauf von 14 Tagen wurden die Zellen erneut im autologen System mit dem gleichen Antigen, z.B. rPR3, stimuliert. Dafür wurden kryokonservierte PBMZ desselben Spenders aufgetaut und 3 Stunden mit der entsprechenden PR3 inkubiert. Anschließend wurden diese PBMZ mit 40 Gray bestrahlt und als antigenpräsentierende Zellen zu den T-Zelllinien gegeben. Die Zellen wurden erneut so lange im Brutschrank inkubiert, bis sie sich nicht mehr geteilt haben. Diese autologe Restimulation wurde für 3 - 5 Zyklen wiederholt. Im Folgenden sind die weiterführenden Experimente zur Generierung einer PR3-spezifischen T-Zelllinie anhand von zwei Linien eines gesunden Spenders beispielhaft dargestellt.

Während der oben beschriebenen Restimulationszyklen wurden Phänotypisierungen der T-Zelllinien mit CD4- und CD8-Antikörpern durchgeführt, ein Beispiel dafür zeigt die Abb. 15.

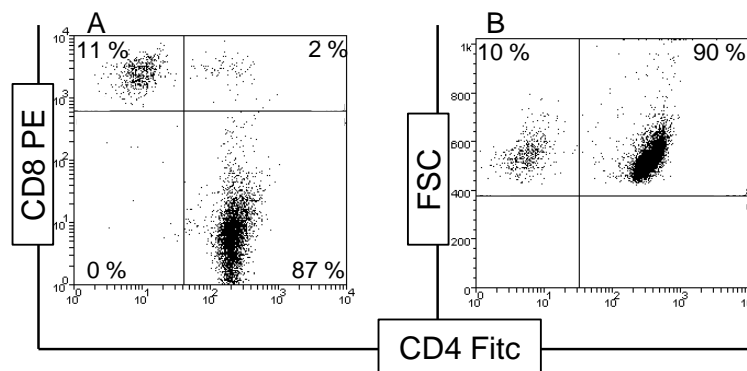


Abb. 15: Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenexpression der Korezeptoren CD4 und CD8 auf einer potentiell PR3-spezifischen T-Zelllinie. Es wurden zu verschiedenen Zeitpunkten der Generierung potentiell PR3-spezifischer T-Zellen Kontrollen mit monoklonalen CD4 und CD8 Antikörpern durchgeführt. (A) Markierung mit CD4 FITC und CD8 PE nach der Primärstimulation und (B) Markierung mit CD4 FITC nach Restimulation.

Hier wurde eine T-Zelllinie nach der Primärstimulation (A) mit CD4- und CD8-Antikörpern und zu einem späteren Zeitpunkt nach der Restimulation (B) nur mit einem CD4-Antikörper markiert und im Durchflusszytometer analysiert. Es ist zu erkennen, dass die dargestellte Zelllinie zu Beginn noch mehr als 10 % CD8⁺ T-Zellen enthielt (Abb. 15 A) und später fast ausschließlich aus CD4⁺ T-Zellen bestand (Abb. 15 B).

Nach 3 - 5 Zyklen autologer Restimulation wurden die T-Zelllinien mit Hilfe von allogenen Fütterzellen weiter expandiert. Sobald eine ausreichend große Anzahl Zellen einer Linie vorhanden war, wurde bei dieser erneut die Antigenspezifität überprüft. Hierfür wurden die Proliferation, Zytokinproduktion und die Expression von Oberflächenmolekülen nach Aktivierung, also als Antwort auf die Stimulation mit dem potentiellen Antigen PR3 in Anwesenheit autologer, bestrahlter PBMZ, untersucht.

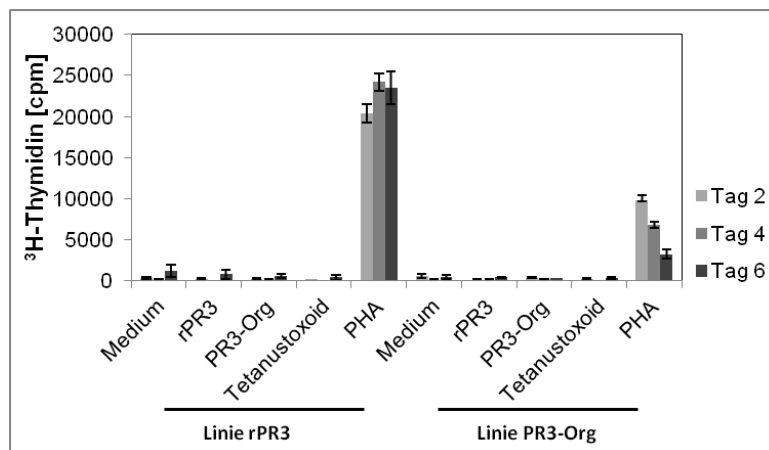


Abb. 16: Proliferationsanalyse von zwei potentiellen PR3-reaktiven T-Zelllinien nach Restimulation. Je 1×10^5 Linienzellen wurden mit 5×10^4 autologen bestrahlten PBMZ und den angegebenen Stimuli für 2 - 6 Tage inkubiert und die ³H-Thymidininkorporation an jedem zweiten Tag untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus je drei Parallelansätzen.

In Abb. 16 ist die Proliferation von zwei T-Zelllinien eines gesunden Spenders nach Stimulation gezeigt. Die Linie rPR3 wurde durch initiale Stimulation mit rekombinanter PR3 generiert, die Linie PR3-Org durch Stimulation mit der kommerziell erhältlichen PR3 der Firma Orgentec. Es wurden je 1×10^5 Linienzellen mit 5×10^4 autologen bestrahlten PBMZ für 2 - 6 Tage mit verschiedenen Stimuli inkubiert. Als Negativkontrolle dienten Zellen in Medium, als Positivkontrolle wurde mit PHA polyklonal stimuliert. Sowohl die mit rPR3 als auch die mit PR3-Org generierten Zellen wurden mit beiden Arten PR3 stimuliert. Um zu zeigen, dass nicht die gesamte T-Zellpopulation des Spenders expandiert wurde sondern eine Antigen-spezifische Selektion stattgefunden hat, wurde außerdem mit dem Antigen Tetanustoxoid (TT) stimuliert. Aus Abb. 16 wird deutlich, dass beide T-Zelllinien ausschließlich nach polyklonaler Stimulation mit PHA proliferieren. Eine Antigen-spezifische Antwort der Zellen auf PR3 konnte hier nicht nachgewiesen werden.

Nach antigenspezifischer Stimulation produzieren T-Zellen Zytokine. T-Zellen des Typs Th1 produzieren vor allem IFN- γ und Zellen des Typs Th2 überwiegend IL-4.

Die intrazelluläre Antikörpermarkierung von Zellen der beiden Linien rPR3 sowie PR3-Org mit anschließender durchflusszytometrischer Analyse (Abb. 17) hat gezeigt, dass nur 0,37 bzw. 0,22 % der Linienzellen positiv für IFN- γ , aber 4,26 bzw. 2,94 % positiv für IL-4 waren. Weitere 0,43 bzw. 0,39 % waren IL-17 positiv.

Da sich die Linienzellen am Ende eines Restimulationszyklus befanden, waren insgesamt nicht mehr alle Zellen für eins der Zytokine positiv.

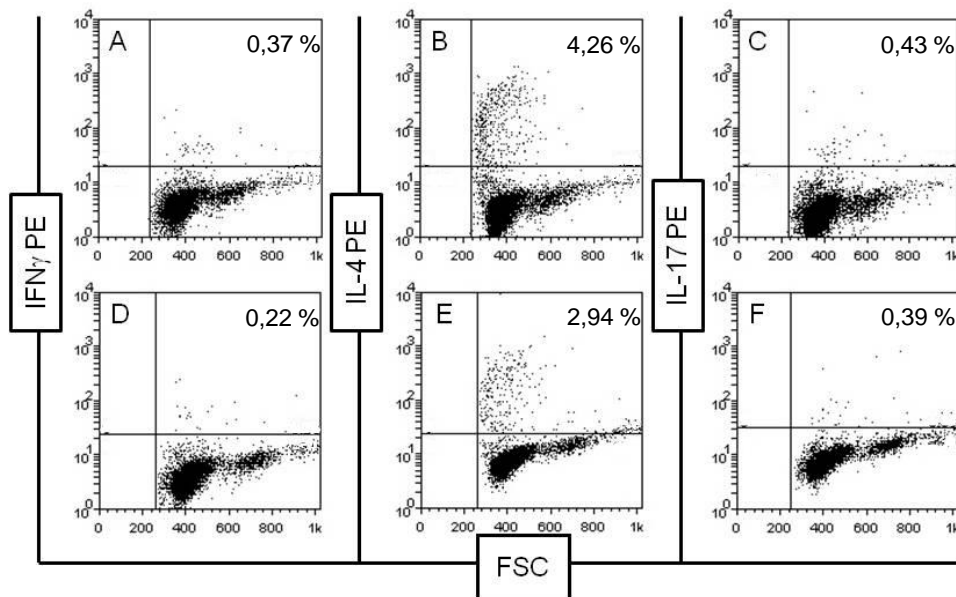


Abb. 17: Durchflusszytometrische Analyse intrazellulärer Zytokine in potentiellen PR3-spezifischen T-Zelllinien. Die intrazelluläre Färbung der Zytokine IFN γ , IL-4 und IL-17 mit den PE-markierten mAk erfolgte mit Zellen der Linien rPR3 (A-C) und PR3-Org (D-F) am Tag 17 nach allogener Restimulation.

Um das Zytokinmuster der potentiell PR3-reaktiven T-Zelllinien genauer festzustellen, wurden die beiden T-Zelllinien erneut autolog stimuliert und die Zellkulturüberstände in einem IFN- γ und einem IL-4 ELISA analysiert.

Aus Abb. 18 A wird deutlich, dass in Übereinstimmung mit dem Proliferationsergebnis keine der beiden T-Zelllinien als Antwort auf die Stimulation mit PR3 IFN- γ in das Medium abgab.

Die Linie rPR3 sezernierte nach Stimulation mit PHA mehr IFN- γ in das Medium als die Linie PR3-Org. Die IL-4-Produktion war bei der Linie rPR3 geringer als bei der Linie PR3-Org nach der Stimulation mit PHA. Nach der Stimulation mit PR3 sezernierte keine der beiden Linien IL-4 in das Medium (Abb. 18 B). Es konnte also davon ausgegangen werden, dass innerhalb der Linie rPR3 eher Th1 T-Zellen dominierten, bei der Linie PR3-Org eher Th2 T-Zellen. Eine Spezifität für das initiale Antigen PR3 konnte mit dieser Methode aber bei keiner der Linien nachgewiesen werden.

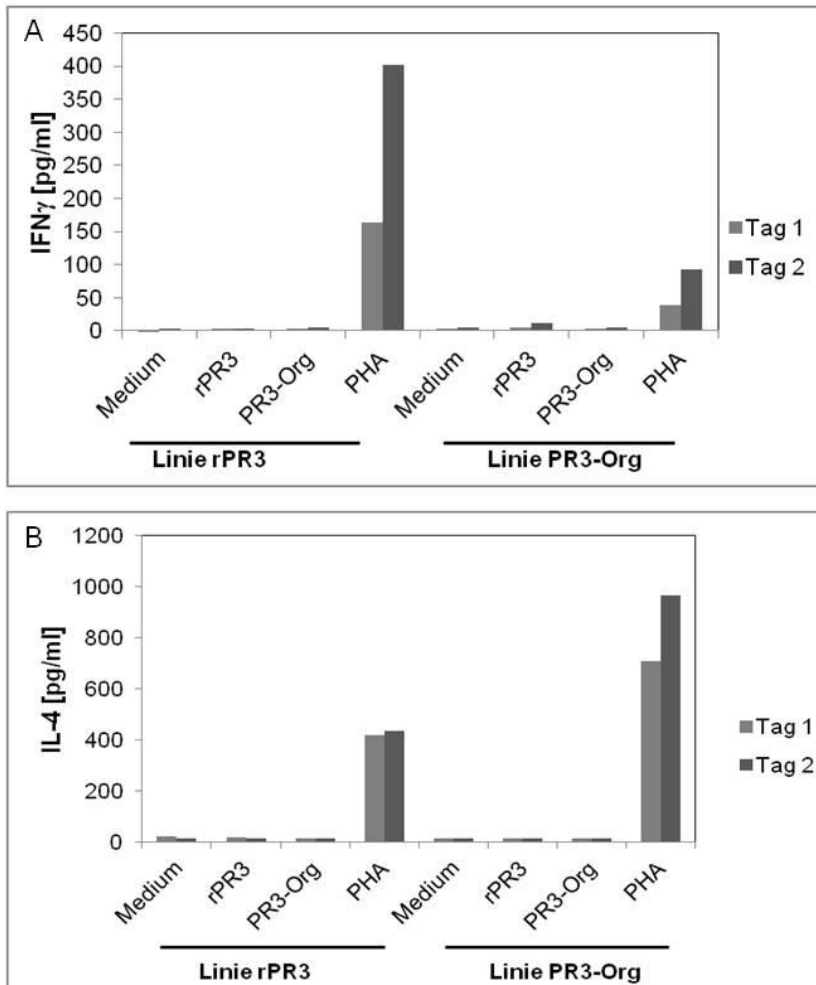


Abb. 18: IFN- γ (A) und IL-4 (B) ELISA von Zellkulturüberständen potentieller PR3-reaktiver T-Zelllinien nach autologer Restimulation. Die Zellen wurden wie unter Abb. 16 beschrieben für 2 Tage stimuliert und die Zellkulturüberstände der Tage 1 und 2 unverdünnt im ELISA eingesetzt.

Da ein Hochregulieren der Oberflächenexpression von CD25 und CD69 ebenfalls eine (frühe) Antwort von T-Zellen auf die Aktivierung durch ein Antigen darstellt, wurden diese Aktivierungsmarker auf den T-Zelllinien durchflusszytometrisch untersucht. Abb. 19 zeigt die Oberflächenexpression von CD25 (obere Reihe) und CD69 (untere Reihe) nach Stimulation in Medium, mit PR3-Org, rPR3 und PHA an den Tagen 0 - 2 beispielhaft auf der Linie PR3-Org. Eine erhöhte Expression der beiden Aktivierungsmarker konnte hier nur nach Stimulation mit PHA gezeigt werden. CD25 wurde an Tag 2 nach Restimulation mit PHA hochreguliert (graue Linie) und CD69 an Tag 1 nach Restimulation (dünne Linie). Ein vergleichbares Ergebnis wurde ebenso nach Restimulation der Linie rPR3 dieses gesunden Spenders erhalten. Mit keiner der oben beschriebenen Methoden konnte somit eine Antigen-spezifische Reaktion der Linien rPR3 und PR3-Org dieses Spenders auf PR3 nachgewiesen werden.

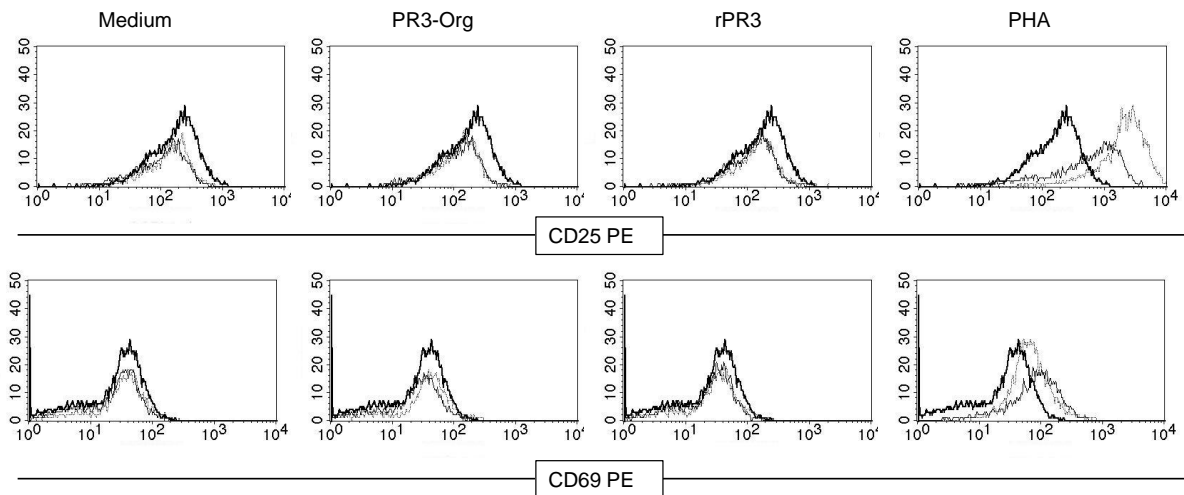


Abb. 19: Durchflusszytometrische Analyse von Aktivierungsmarkern nach autologer Restimulation der Linie PR3-Org. Die Zellen wurden nach 1 und 2 Tagen Restimulation, diese erfolgte wie zu Abb. 16 beschrieben, mit den monoklonalen, PE-konjugierten Antikörpern gegen CD25 bzw. CD69 gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Im Overlay dargestellt sind jeweils die Tage 0 (dicke Linie), 1 (dünne Linie) und 2 (graue Linie).

Die in diesem Kapitel beschriebene Methode zur Generierung PR3-spezifischer T-Zelllinien wurde in gleicher Weise noch mit den Zellen von 4 weiteren gesunden Spendern ebenfalls ohne Erfolg durchgeführt. Es war aufgrund der eingeschränkten Menge Blut, die von Patienten bezogen werden konnte, nur ein Versuch mit einem GPA-Patienten zur Expansion PR3-reaktiver T-Zellen über autologe Restimulation möglich. In diesem Experiment verstarben die Zellen ohne zuvor nennenswert proliferiert zu haben. Eine eingehendere Untersuchung war in diesem Fall nicht möglich (Daten nicht gezeigt). Zusammenfassend konnte also trotz der Anwendung von drei verschiedenen Methoden im Rahmen dieser Arbeit keine PR3-spezifische T-Zelllinie oder kein PR3-spezifischer T-Zellklon generiert werden.

5.2 Regulatorische T-Zellen bei GPA

Es ist beschrieben worden, dass Patienten mit GPA eine erhöhte Anzahl regulatorischer T-Zellen (Treg) im Blut aufweisen, die ihre suppressive Aktivität gegenüber autoreaktiven T-Zellen vermutlich aber nicht wahrnehmen [74, 75]. Um eine Einschätzung der möglichen Fehlfunktion von Tregs bei GPA-Patienten vornehmen zu können, wurde im Folgenden zunächst deren Suppressivität gegenüber Antigen-spezifischen T-Zellen untersucht. Hierfür wurden T-Zellen mit dem Antigen Tetanustoxoid (TT) stimuliert, indem PBMZ oder Treg-depletierte PBMZ mit diesem inkubiert wurden und die Proliferation mit Hilfe von ^3H -Thymidininkorporation analysiert wurde. Es wurde hier davon ausgegangen, dass sowohl in gesunden Spendern als auch in GPA-Patienten aufgrund von Immunisierungen gegen Tetanus TT-reaktive T-Zellen im Blut vorliegen. Anschließend wurde insbesondere die Suppressivität der Treg gegenüber den PR3-reaktiven T-Zellen untersucht. Abb. 20 zeigt die relative Proliferation (Δcpm) von PBMZ aus 3 GPA-Patienten vor und nach Depletion

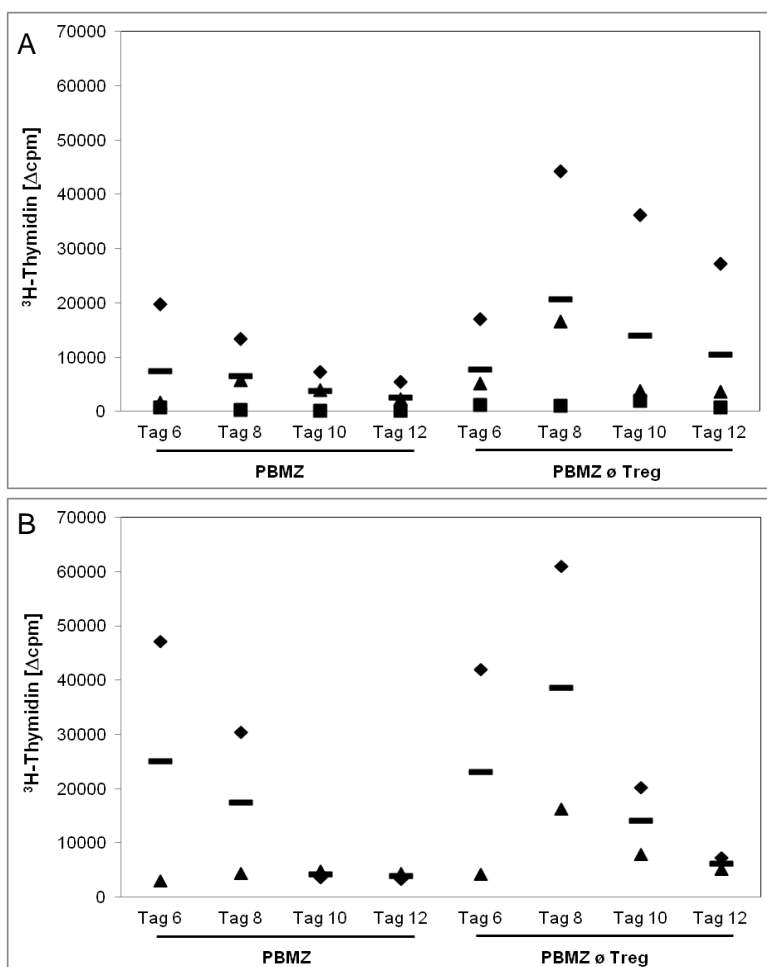
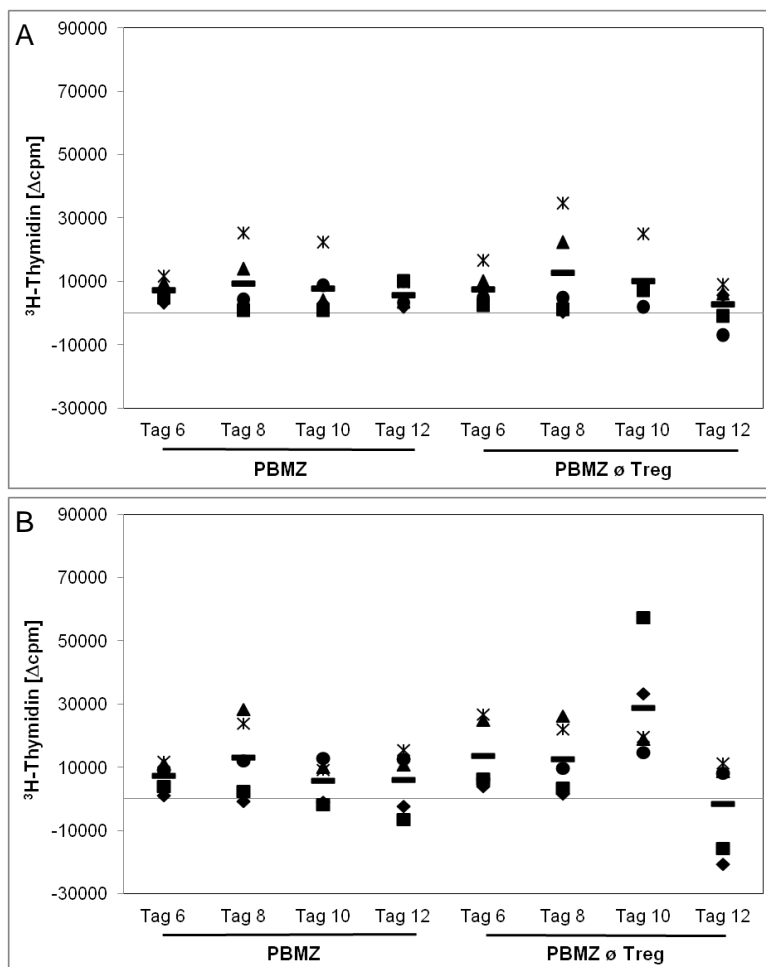


Abb. 20: Proliferation von PBMZ und Treg-depletierten PBMZ aus GPA-Patienten nach Stimulation mit Tetanustoxoid (TT). Es wurden 1×10^5 PBMZ pro Vertiefung mit und ohne Treg für 12 Tage mit TT stimuliert in An- und Abwesenheit von IL-2. (A) Stimulation ohne IL-2, (B) Stimulation mit IL-2. An den Tagen 6, 8, 10 und 12 wurde der Einbau von ^3H -Thymidin in die Zellen als Maß für die Proliferation gemessen. Die verschiedenen Symbole stehen für jeweils einen Spender, die Balken stellen den Mittelwert dar. Das gilt so auch für alle nachfolgenden Darstellungen dieser Art, bedeutet aber nicht, dass das gleiche Symbol in allen Experimenten immer für denselben Spender steht. In dieser Abbildung stellt ein Symbol denselben Spender in A und B dar. Es ist die relative Proliferation (Δcpm) nach TT-Stimulation abzüglich der dazugehörigen Mediumkontrolle gezeigt. A: n=3, B: n=2

regulatorischer T-Zellen. Relative Proliferation bedeutet in diesem Fall, dass der Einbau von ^3H -Thymidin nach Inkubation in Medium von der ^3H -Thymidininkorporation der TT-Stimulation subtrahiert wurde. Es wurden je 1×10^5 Zellen pro Vertiefung für 12 Tage mit Tetanustoxoid in X-Vivo15-Medium stimuliert. Der Einbau von ^3H -Thymidin als Maß für die Proliferation erfolgte an den Tagen 6, 8, 10 und 12 für jeweils 16 Stunden.

Es wird deutlich, dass die PBMZ nach Depletion der Treg stärker nach Stimulation mit Tetanustoxoid proliferieren (Abb. 20 A). Dieser Effekt wird durch die Anwesenheit von 50 U/ml IL-2 noch verstärkt (Abb. 20 B). Außerdem ist zu sehen, dass der Höhepunkt der Proliferation innerhalb der PBMZ an Tag 6 deutlich früher lag, als in den Treg-depletierten PBMZ. Diese proliferierten am stärksten an Tag 8.

Bei GPA-Patienten führte die Depletion von Treg sowohl in An- als auch Abwesenheit von IL-2 zu einem Anstieg der Proliferation nach Tetanustoxoid-Stimulation. Nur an Tag 6 proliferierten PBMZ und PBMZ ohne Treg nahezu gleich stark. Betrachtet man nur die Proliferation an Tag 6, so ergibt sich kein Unterschied zwischen der Zellteilung in An- und Abwesenheit von regulatorischen T-Zellen.



In Abb. 21 ist die Stimulation von PBMZ in An- und Abwesenheit von Treg mit Tetanustoxoid aus 5 gesunden Spendern gezeigt. Die Stimulation mit Tetanustoxoid bewirkte in gesunden Spendern eine maximale Proliferation an Tag 8 in An- und Abwesenheit von Treg, allerdings war die Proliferation nach der Treg-Depletion deutlich erhöht. Die Zugabe von exogenem IL-2 bewirkte an allen betrachteten Tagen sowohl in An- als auch in Abwesenheit von Treg eine verstärkte Proliferation (Abb. 21 B). Das Proliferationsmaximum der Treg-depletierten PBMZ lag nach der Stimulation mit Tetanustoxoid in Anwesenheit von exogenem IL-2 an Tag 10. In gesunden Spendern war die Proliferation in An- und Abwesenheit von Treg an Tag 6 und 8 nahezu gleich, an Tag 10 nach der Treg-Depletion erhöht. Die negativen Werte bei einigen Spendern an Tag 12 sind durch eine starke Proliferation der Mediumkontrollen zu erklären. Wurden die Treg aus den PBMZ entfernt, konnte es offensichtlich innerhalb der PBMZ einiger Spender auch ohne einen Antigen-Stimulus zur Proliferation kommen. Dadurch waren die cpm der Mediumkontrollen sehr hoch und lagen besonders an Tag 12 der Messung über den Werten der TT-Stimulation. Die Proliferation nach TT-Stimulation war zu diesem späten Zeitpunkt bereits rückläufig. Die Proliferation der Mediumkontrollen wurde auch durch die Anwesenheit von exogenem IL-2 begünstigt. Es wurde insgesamt deutlich, dass der Effekt der Treg-Depletion auf die Proliferation Antigen-spezifischer T-Zellen je nach betrachtetem Zeitpunkt variierte.

5.2.1 Einfluss von regulatorischen T-Zellen auf die Proliferation PR3-spezifischer Zellen

Die Titration der rekombinanten und der nativen, kommerziell erworbenen PR3 (hier nicht dargestellt) hatte ergeben, dass sowohl PBMZ aus gesunden Spendern als auch aus GPA-Patienten am stärksten nach Stimulation mit 0,1 µg/ml des Antigens proliferieren. Aus diesem Grund wurde diese Konzentration bei beiden PR3 in den folgenden Experimenten weiter verwendet.

In Abb. 22 sind Versuche zur Proliferation von PBMZ und Treg-depletierten PBMZ aus drei GPA-Patienten (Abb. 22 A und B) und fünf gesunden Spendern (Abb. 22 C und D) nach Stimulation mit PR3 gezeigt. Die Proliferation wurde an den Tagen 6, 8, 10 und 12 über ³H-Thymidineinbau überprüft. In Abb. 22 sind die Tage 6 (A+C) und 10 (B+D) der Analyse dargestellt. Die stärkste Proliferation von PBMZ aus Patienten mit GPA nach rPR3-Stimulation und nach Treg-Depletion wurde an Tag 10 festgestellt. An Tag 6 konnte weder in An- noch in Abwesenheit von Treg bei GPA-Patienten Proliferation nach PR3-Stimulation gemessen werden. Wurden aus PBMZ von gesunden Spendern die Treg entfernt, so zeigte sich an beiden Tagen bereits in Medium Proliferation ohne weiteren Stimulus. Die

Stimulation mit rPR3 hatte weder an Tag 6 noch an Tag 10 einen Effekt. Nach PR3-Organ-Stimulation proliferierten an Tag 6 die gesamten PBMZ der gesunden Spender minimal stärker als nach Treg-Depletion. Im Vergleich zu den Mediumkontrollen war die Proliferation insgesamt sehr gering in gesunden Spendern.

Bei diesem Ergebnis wird erneut die zeitliche Abhängigkeit deutlich: betrachtet man nur die früheren Zeitpunkte, so proliferierten häufig die PBMZ stärker als die Treg-depletierten Zellen, besonders nach Stimulation mit PR3-Organ. Ein Grund dafür könnte der Einfluss des Depletionsvorgangs der Treg auf die Zellen sein.

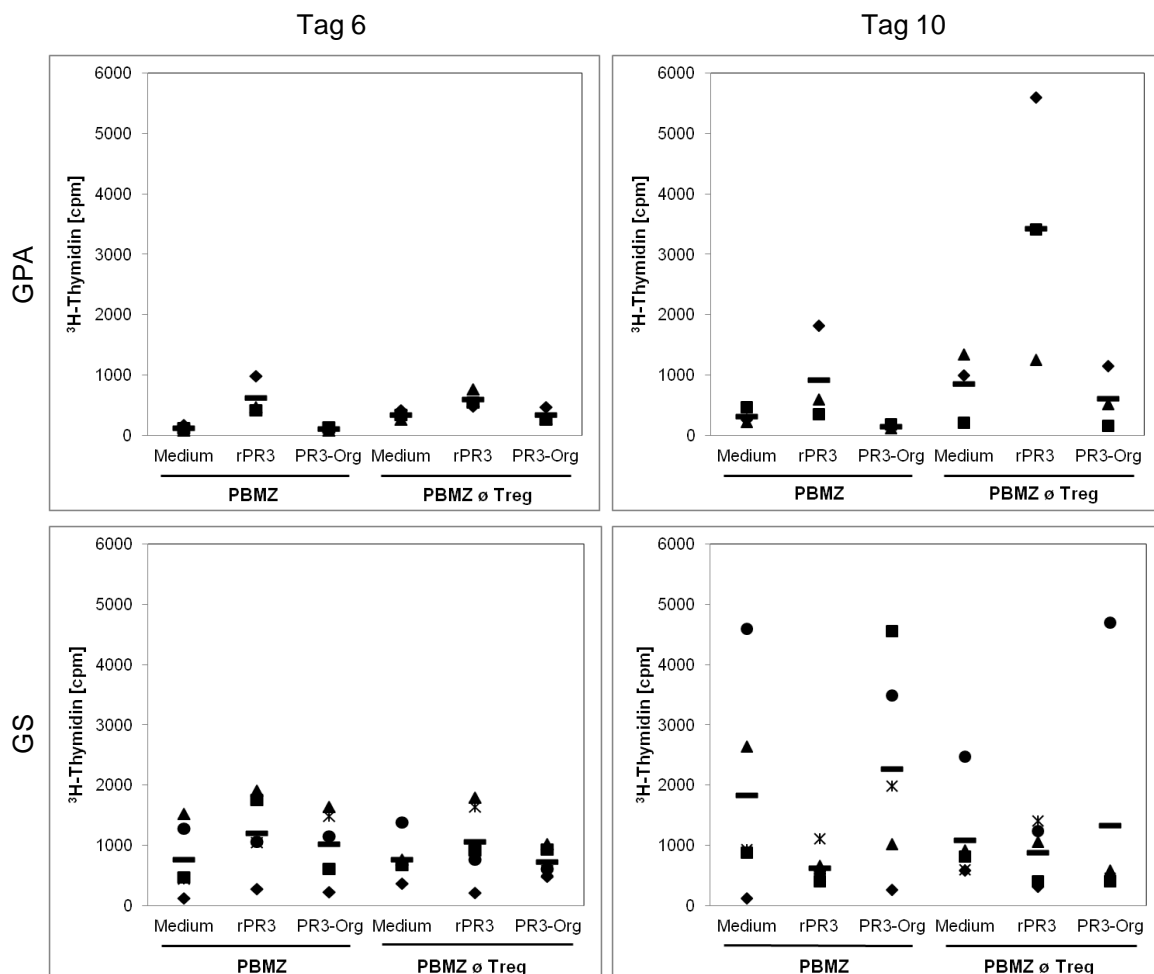


Abb. 22: Proliferation von PBMZ aus GPA-Patienten (A+B) und gesunden Spendern ((GS) in C+D) mit und ohne Treg nach Stimulation mit PR3 an den Tagen 6 (A+C) und 10 (B+D). Je 1×10^5 PBMZ oder Treg-depletierte PBMZ wurden für bis zu 12 Tage wie in den Diagrammen angegeben in X-Vivo15-Medium stimuliert. An den Tagen 6, 8, 10 und 12 erfolgte jeweils der Einbau von ^3H -Thymidin für 16 h. Hier dargestellt sind nur jeweils die Tage 6 (A+C) und 10 (B+D). GPA: n=3, GS: n=5

Um den Einfluss der regulatorischen T-Zellen auf die Proliferation einzelner Zellpopulationen genauer analysieren zu können, wurden die sich verändernden Zellzahlen mit Hilfe der sogenannten SCDA-Methode untersucht. Hiermit konnten die Absolutzellzahlen von drei verschiedenen Zellpopulationen innerhalb einer Mikrokultur bestimmt werden, $CD4^+$, $CD8^+$ und $CD4/CD8$ doppelt negative Zellen. Es wurde auch im Folgenden die Proliferation vor und nach der Depletion von Treg in An- und Abwesenheit von rekombinanter bzw. nativer PR3 an den Tagen 6, 8, 10 und 12 untersucht. Nachfolgend sind nur die Tage 6 und 10 ausführlicher dargestellt, die Daten zu den Tagen 8 und 12 werden nicht gezeigt.

In Abb. 23 sind die Absolutzellzahlen verschiedener Zellpopulationen von gesunden Spendern (Abb. 23 A, C und E) im Vergleich zu GPA-Patienten (Abb. 23 B, D und E) an Tag 6 dargestellt. Die Absolutzellzahlen der $CD4^+$ T-Zellen veränderten sich weder durch die Depletion von Treg noch durch Stimulation mit PR3 nennenswert, wobei sich kein Unterschied zwischen PBMZ aus gesunden Spendern (Abb. 23 A) oder aus GPA-Patienten (Abb. 23 B) zeigte. Dieses Ergebnis wurde so auch an Tag 10 der Analyse festgestellt (Abb. 24 A und B). Auch innerhalb der $CD8^+$ T-Zellen zeigte sich kein deutlicher Effekt der Treg-Depletion an Tag 6. Weder bei GPA-Patienten (Abb. 23 D) noch in PBMZ aus gesunden Spendern (C) ließ sich eine deutliche Veränderung der Absolutzellzahlen der $CD8^+$ T-Zellen an Tag 6 nachweisen. $CD8^+$ T-Zellen wiesen erhöhte Absolutzellzahlen nach der Depletion von Treg an Tag 10 auf, diese waren durch PR3-Stimulation im gesunden Spender noch leicht gesteigert (Abb. 24 C und D).

Die Population der $CD4$ und $CD8$ doppelt negativen Zellen zeigte die größten Schwankungen der Absolutzellzahlen. Diese gingen nach der Depletion der Treg an Tag 6 im gesunden Spender leicht zurück (Abb. 23 E). Dieser Effekt war so auch in den Absolutzellzahlen der $CD4^+CD8^-$ Zellen der GPA-Patienten zu sehen. Die Stimulation mit PR3 zeigte keinen Einfluss auf die $CD4^+CD8^-$ Zellen an Tag 6 (Abb. 23 F). Die Verminderung der $CD4$ und $CD8$ doppelt negativen Zellpopulation nach Treg-Depletion ließen sich sowohl in PBMZ aus gesunden Spendern, als auch aus GPA-Patienten ebenfalls an Tag 10 nachweisen (Abb. 24 E und F).

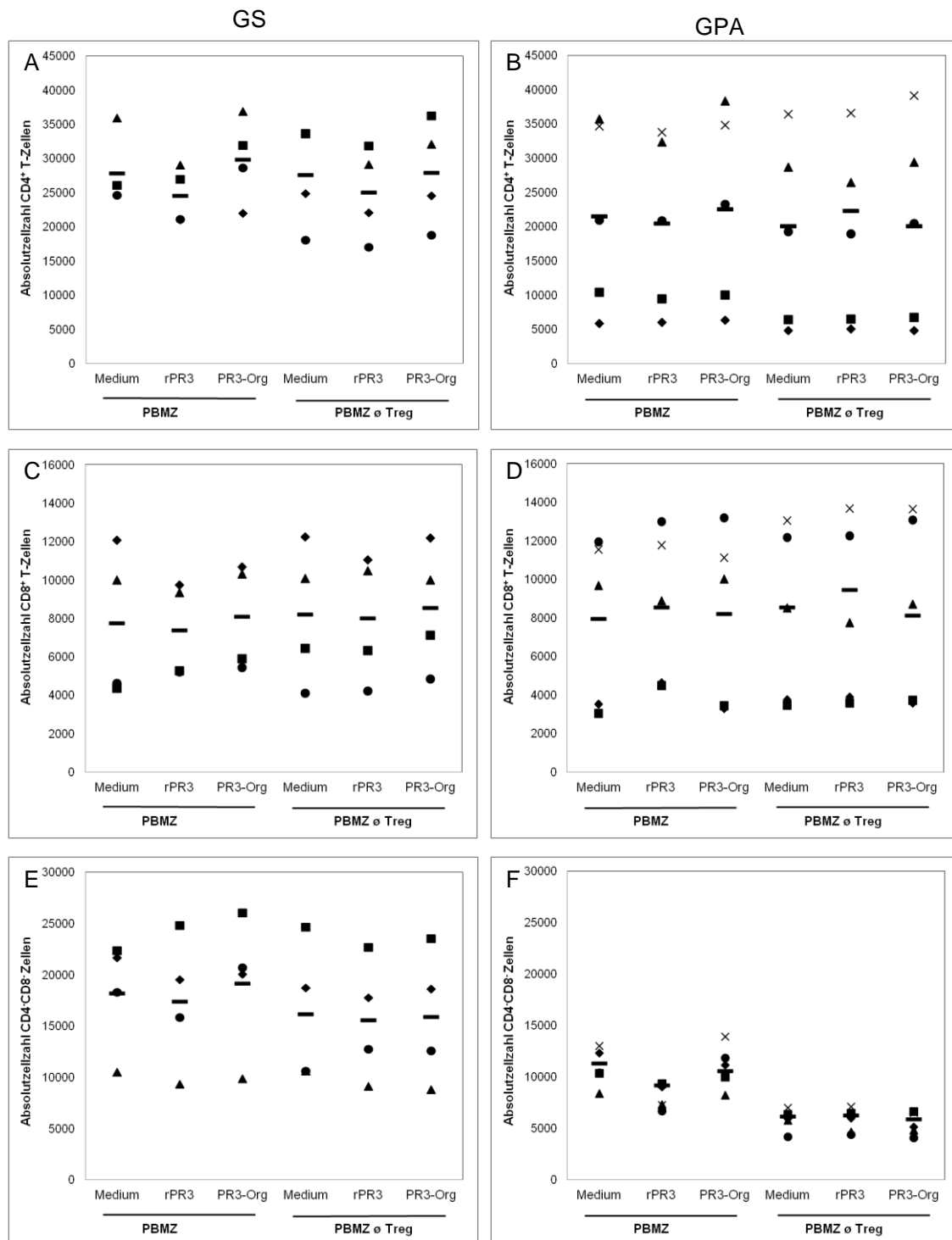


Abb. 23: Proliferation von PBMZ aus gesunden Spendern (n=4) in A,C und E und GPA-Patienten (n=5) in B, D und F mit und ohne Treg nach Stimulation mit PR3 an Tag 6. Je 1×10^5 PBMZ oder Treg-depletierte PBMZ wurden für bis zu 12 Tage wie in den Diagrammen angegeben in X-Vivo15-Medium stimuliert. An den Tagen 6, 8, 10 und 12 wurde die Absolutzellzahl der CD4⁺ (A+B), der CD8⁺ (C+D) und der CD4⁺CD8⁺ Zellen über durchflusszytometrische Analyse mit SCD4 bestimmt.

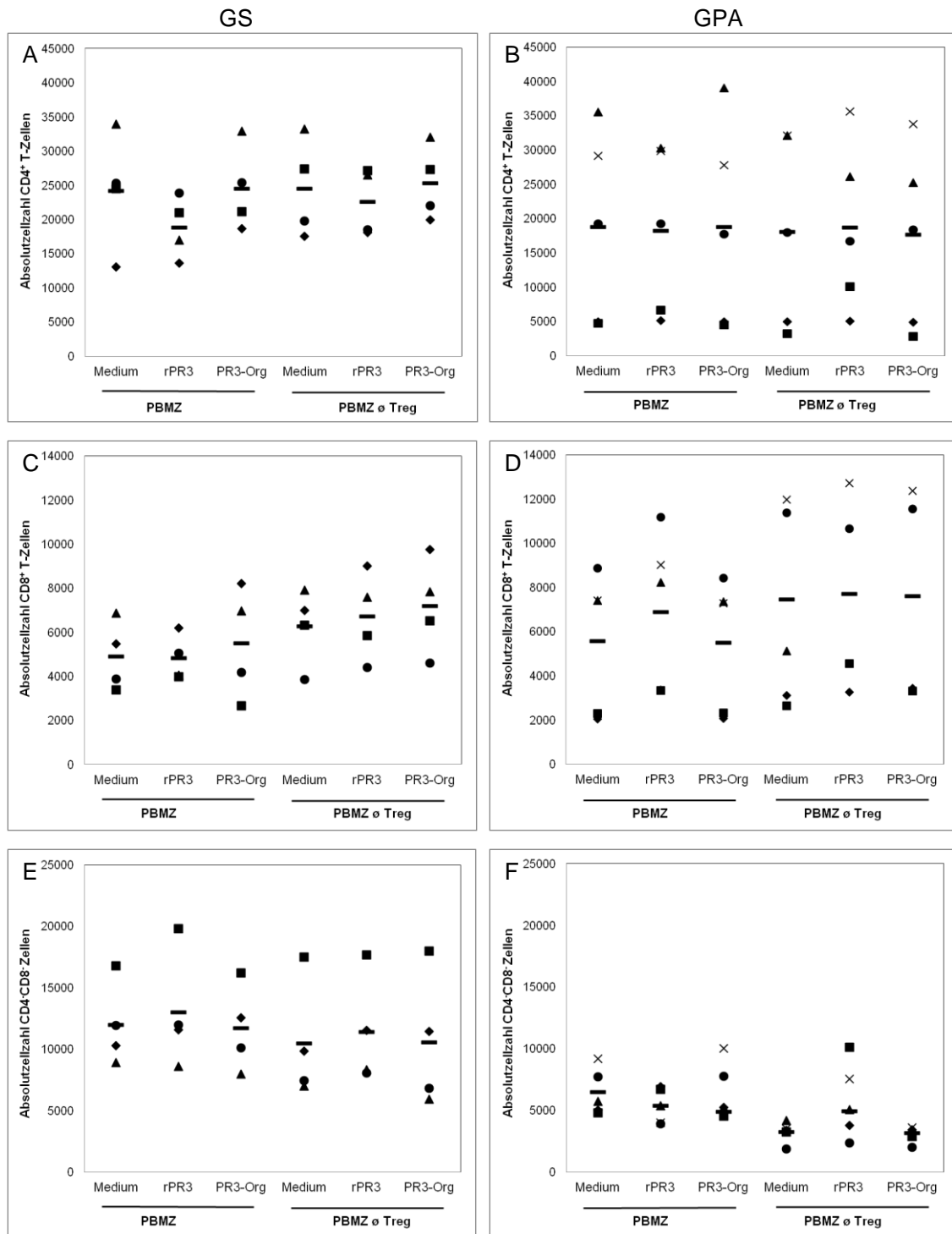


Abb. 24: Proliferation von PBZM aus gesunden Spendern (n=4) in A,C und E und GPA-Patienten (n=5) in B, D und F mit und ohne Treg nach Stimulation mit PR3 an Tag 10. Je 1×10^5 PBZM oder Treg-depletierte PBZM wurden für 12 Tage wie angegeben in X-Vivo15-Medium stimuliert. An den Tagen 6,8,10 und 12 wurde die Absolutzellzahl der CD4⁺ (A+B), der CD8⁺ (C+D) und der CD4⁺CD8⁻ Zellen über durchflusszytometrische Analyse mit SCDA bestimmt.

Die in Abb. 22 bis Abb. 24 dargestellten Experimente zur Funktionalität von Treg bei GPA und gesunden Kontrollen wurden in identischer Form auch mit dem Zusatz von exogenem IL-2 durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Auch in diesen Experimenten konnte weder ein Unterschied zwischen PBMZ mit und ohne Treg nach PR3-Stimulation gezeigt werden, noch ergaben sich Unterschiede zwischen gesunden Spendern und GPA-Patienten in Anwesenheit von IL-2. Die mit Hilfe des ^3H -Thymidineinbaus gezeigten schwachen Effekte konnten auf der Ebene der Quantifizierung absoluter Zellzahlen einzelner Zellpopulationen nach 6 bis 10 Tagen Kulturdauer nicht genauer verifiziert und somit keinem Zelltyp zugeordnet werden. Mit Hilfe der SCDA-Methode wird das Gesamtergebnis einer Stimulation innerhalb eines Zellgemischs analysiert. Es werden dabei auch die Veränderungen der Zellzahlen durch das Absterben von Zellen berücksichtigt und nicht nur die reine Teilung, wie bei der Proliferationsanalyse durch ^3H -Thymidininkorporation.

Eine fehlerhafte Funktion der Treg bei GPA-Patienten konnte hier weder gegenüber PR3-spezifischen T-Zellen noch gegenüber anderen Antigen-spezifischen T-Zellen, z.B. nach Tetanustoxoid-Stimulation, gezeigt werden. Es konnte aber eine zeitliche Abhängigkeit der Ergebnisse festgehalten werden.

5.3 $\gamma\delta$ T-Zellen bei GPA

$\gamma\delta$ T-Zellen könnten aufgrund ihrer vielfältigen Funktionen in mehreren Aspekten der GPA eine bedeutende Rolle spielen. Als Zellen der angeborenen Immunantwort könnten sie an der Abwehr der mutmaßlichen *S.aureus* Besiedelung beteiligt sein, oder durch ihre regulatorische Funktion in Zusammenhang mit der Entwicklung der GPA stehen [101 96]. Aus diesem Grund waren die $\gamma\delta$ T-Zellen ebenfalls von besonderem Interesse bei der Betrachtung von T-Zellen im Zusammenhang mit GPA und wurden im dritten Teil dieser Arbeit genauer untersucht.

Bei gesunden Erwachsenen beträgt der Anteil $V\delta 2^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen im Blut 50 - 90 % der $\gamma\delta$ T-Zellen insgesamt, weniger häufig überwiegen die $V\delta 1^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen. Berechnet man das Verhältnis der beiden Subpopulationen durch die Bildung des Quotienten aus $V\delta 1:V\delta 2$, so wird dieses größer je weniger $V\delta 2^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen vorhanden sind. Die Verhältnisse der $\gamma\delta$ -T-Zell-Subpopulationen bei GPA-Patienten, gesunden Spendern (GS), CSS-Patienten und Patienten mit chronischer Sinusitis (CS) ist in Abb. 25 zu sehen. Es wird deutlich, dass die Verteilung der $V\delta 1$ - und $V\delta 2$ -Subpopulationen bei GPA-Patienten verändert und das Verhältnis der beiden Populationen zueinander signifikant größer war (Median: 0,98), als das in gesunden Kontrollen (Median: 0,31). Die $\gamma\delta$ T-Zellen aus Patienten mit chronischer Sinusitis, einer lokal begrenzten Entzündung der Nasennebenhöhlen, zeigten ein normales

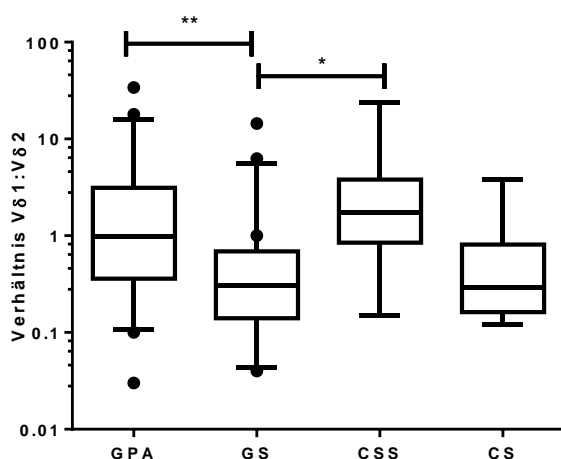


Abb. 25: Verhältnisse von $\gamma\delta$ -T-Zell-Subpopulationen in GPA-Patienten, Gesunden (GS), CSS-Patienten und Patienten mit chronischer Sinusitis (CS). Die $\gamma\delta$ T-Zellen wurden innerhalb der PBMZ mit den mAk anti-CD3 PE, pan- $\gamma\delta$ -TZR APC, $V\delta 1$ -TZR FITC und $V\delta 2$ -TZR PerCP gefärbt und anschließend am FACSCalibur analysiert. Aus den erhaltenen Prozenten der Subpopulationen $V\delta 1$ und $V\delta 2$ wurden deren Verhältnisse zueinander ermittelt. Dargestellt sind die Mediane mit den dazugehörigen Standardabweichungen bei einer logarithmischen Skalierung, einzelne Punkte bedeuten Ausreißer. Die statistische Analyse erfolgte mit dem Kruskal-Wallis-Test gefolgt von *Dunn's Multiple Comparison Test*. GPA: n=42, GS: n=43, CSS: n=10 und chron. Sinusitis: n=10.

Verhältnis von $V\delta 1^+$ und $V\delta 2^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen im Blut (Median: 0,29), während CSS-Patienten ein mit den GPA-Patienten vergleichbares Bild aufwiesen und im Vergleich mit den Gesundkontrollen ein ebenfalls signifikant erhöhtes Verhältnis (Median: 1,55) von $V\delta 1^+$ zu $V\delta 2^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen hatten.

Die oben beschriebene Auffälligkeit des veränderten Verhältnisses von $V\delta 1^+$ und $V\delta 2^+$ $\gamma\delta$ - T-Zellen bei GPA-Patienten wurde im Folgenden eingehender untersucht. In Abb. 26 wurden die Absolutzellzahlen der $\gamma\delta$ T-Zellen pro μl Blut insgesamt sowie die der Subpopulationen $V\delta 1$ und $V\delta 2$ aus GPA-Patienten im Vergleich zu den Absolutzellzahlen gesunder Spender analysiert.

Die Untersuchung erfolgte mit Hilfe der Durchflusszytometrie. Hierfür wurden die PBMZ aus gesunden Spendern und GPA-Patienten mit mAk gegen Gesamt- $\gamma\delta$ T-Zellen (pan $\gamma\delta$ APC) und gegen die beiden Subpopulationen ($V\delta 1$ FITC und $V\delta 2$ PerCP) markiert und im FACSCalibur gemessen. Die so ermittelten Prozentsätze von $\gamma\delta$ T-Zellen und deren Subpopulationen wurden mit den Lymphozyten pro μl Blut verrechnet, um die Absolutzellzahlen zu erhalten. Die Anzahl der Lymphozyten/ μl Blut wurde im Fall der

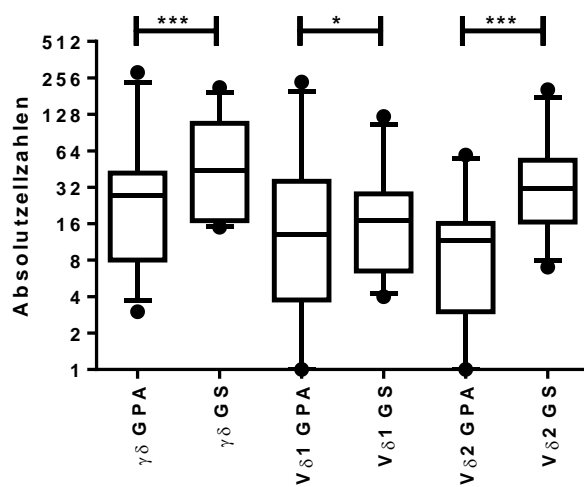


Abb. 26: Absolutzellzahlen von $\gamma\delta$ T-Zellen aus GPA-Patienten und gesunden Kontrollen. Die im Durchflusszytometer erfassten Prozentsätze von $V\delta 1$ und $V\delta 2$ -positiven $\gamma\delta$ T-Zellen wurde mit den Zellzahlen der Lymphozyten/ μl Blut in Absolutzellzahlen umgerechnet. Die Markierung der PBMZ erfolgte mit den mAk gegen pan- $\gamma\delta$ -TZR APC, $V\delta 1$ -TZR Fitc und $V\delta 2$ -TZR PerCP. Die statistische Analyse wurde mit dem *Mann Whitney Test* durchgeführt und die Darstellung erfolgte mit einer logarithmischen Skalierung. GPA n=42; GS n=17.

Patienten aus den differentiellen Blutbildern entnommen. Im Fall der gesunden Spender wurde diese selbst über das Trucount™ System von BD nach Angaben des Herstellers ermittelt. Die Messungen hierfür erfolgten an einem FACSCanto.

Aus Abb. 26 wird deutlich, dass die Absolutzellzahlen der $\gamma\delta$ T-Zellen von GPA-Patienten signifikant vermindert waren (Median: 17/ μl Blut), verglichen mit den gesunden Kontrollen (Median: 39/ μl Blut). Während die Mediane der Absolutzellzahlen der $V\delta 1^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen mit 14 Zellen/ μl Blut in GPA-Patienten und 19 Zellen/ μl Blut in gesunden Spendern weitgehend

ähnlich waren, unterschieden sich die Absolutzellzahlen der $V\delta 2^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen von gesunden Spendern (Median: 42/ μ l Blut) und GPA-Patienten (Median: 12/ μ l Blut) signifikant.

Die Zusammensetzung der $\gamma\delta$ T-Zellen im Blut verändert sich altersabhängig [82]. Die Anzahl der $V\delta 2^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen geht mit zunehmendem Alter zurück. Um zu überprüfen, ob ein Zusammenhang zwischen dem Rückgang der $V\delta 2^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen bei GPA-Patienten mit deren Alter besteht, wurden in Abb. 27 die Absolutzellzahlen der $V\delta 2^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen dem Alter in Jahren gegenübergestellt. Es konnte mit Hilfe der Spearman-Rang-Analyse keine Korrelation zwischen den oben genannten Parametern festgestellt werden.

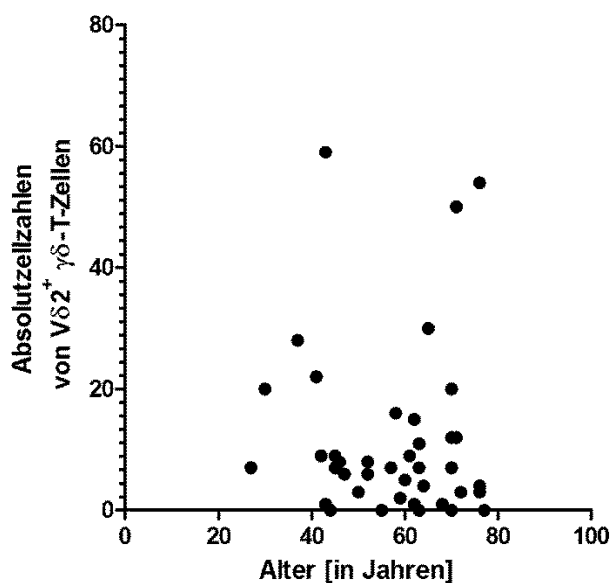


Abb. 27: Korrelation von $V\delta 2^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen mit dem Alter von GPA-Patienten. Es wurden jeweils die Absolutzellzahlen der $V\delta 2^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen dem Alter des entsprechenden Patienten in Jahren gegenübergestellt. Eine Spearman rank Korrelation erbrachte keinen signifikanten Zusammenhang zwischen den beiden Parametern ($p=0,263$). $n=42$

Auch Korrelationen zwischen dem Alter der Patienten und $V\delta 1^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen bzw. Gesamt- $\gamma\delta$ T-Zellen ergaben keine Zusammenhänge (hier nicht gezeigt).

Die Analyse der Zusammenhänge zwischen den Absolutzellzahlen der $\gamma\delta$ T-Zellen und deren Subpopulationen mit Hilfe der Spearman-Rang-Korrelation ergab, dass die Absolutzellzahlen der $V\delta 2^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen mit den Absolutzellzahlen der $CD 4^+$ T-Zellen in Verbindung stehen.

Es wurde deutlich, dass eine verminderte Anzahl von $CD 4^+$ T-Zellen mit einer verminderten Anzahl von $V\delta 2^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen korreliert (Abb. 28). Die Korrelation dieser beiden Parameter lag bei $r=0,55$ mit einer Signifikanz von $p=0,00014$.

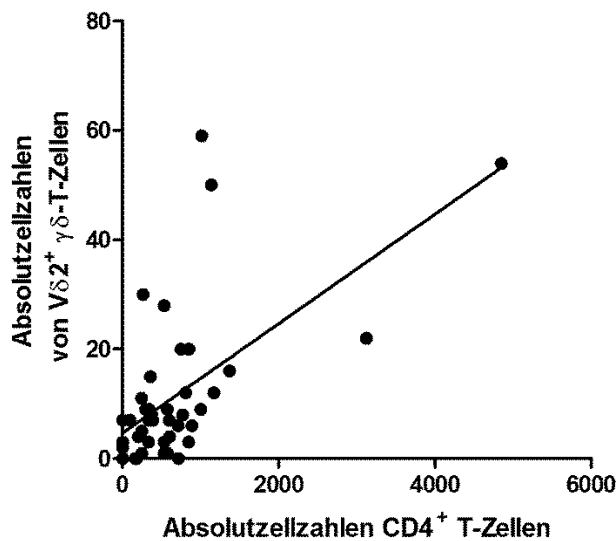


Abb. 28: Korrelation der Absolutzellzahlen von CD4⁺ T-Zellen mit den Absolutzellzahlen von Vδ2⁺ γδ T-Zellen in GPA-Patienten. Die beiden Zellpopulationen wurden durchflusszytometrisch nach Markierung mit mAk ermittelt. Nach Verrechnung der Prozentzahlen mit den Lymphozyten/μl Blut wurden die Absolutzellzahlen von CD4⁺ T-Zellen den Absolutzellzahlen der Vδ2⁺ γδ T-Zellen gegenübergestellt. Die Korrelation der beiden Populationen wurde mit der Spearman rank Analyse überprüft und erwies sich mit p=0,00014 als höchst signifikant. n=42

Vδ2⁺ γδ T-Zellen benötigen den Wachstumsfaktor IL-2 um proliferieren zu können und sind daher darauf angewiesen, dass CD4⁺ T-Zellen ausreichend IL-2 zur Verfügung stellen [92]. Es ist daher in diesem Zusammenhang von besonderer Bedeutung, ob die bei GPA-Patienten stark dezimierten CD4⁺ T-Zellen in der Lage sind, im normalen Umfang IL-2 zu produzieren [50]. Um dieser Frage nachzugehen, wurden CD4⁺ T-Zellen mit Hilfe von MACS-Sortierung positiv aus den PBMZ von GPA-Patienten und gesunden Spendern isoliert und, wie in Abb. 29 zu sehen, in Medium bei 4 °C und 37 °C oder mit PMA und Ionomycin bei 37 °C für 3 bzw. 6 Stunden stimuliert.

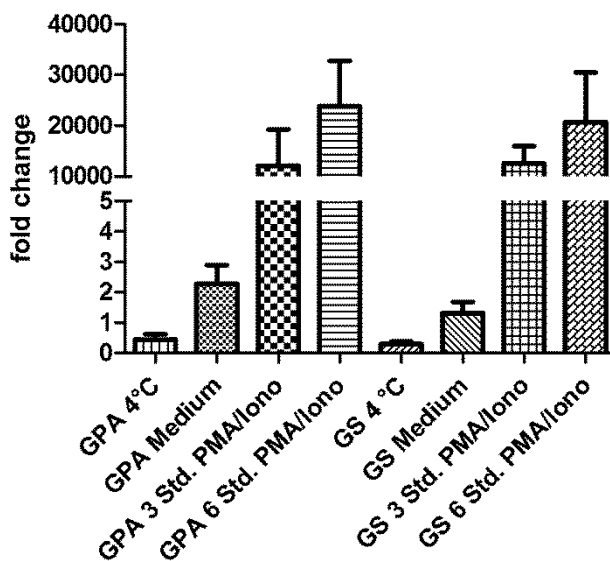


Abb. 29: qRT-PCR-Analyse der mRNA-Menge von IL-2 in CD4⁺ T-Zellen bei GPA-Patienten und gesunden Kontrollen. 1x10⁶ CD4⁺ T-Zellen/ml wurden in Medium (X-Vivo15 ohne zusätzliches Serum) bei 4°C, in Medium bei 37 °C oder für 3 bzw. 6 Stunden mit PMA/Ionomycin bei 37 °C inkubiert. Aus der gewonnenen RNA der Zellen wurde cDNA hergestellt, welche über qRT-PCR auf die Menge an IL-2 hin untersucht wurde. Dargestellt sind Mittelwerte und die dazugehörigen Standardfehler. Der Stichprobenumfang für GPA-Patienten war n = 7 und für GS n = 8.

Es wird deutlich, dass sich weder die CD4⁺ T-Zellen direkt nach der Isolierung, d.h. die vorübergehend im Kühlschrank verwahrt wurden, noch die stimulierten Zellen von Patienten und Gesundkontrollen unterscheiden. Die IL-2-RNA wurde nach polyklonaler Stimulation der T-Zellen gesunder Spender quantitativ ähnlich induziert im Vergleich zu GPA-Patienten. Auch wenn die Spender nach den überwiegend in ihrem Blut vorkommenden Subpopulationen differenziert wurden, also in Spender mit mehr oder weniger Vδ2⁺ γδ T-Zellen, ergaben sich keine Unterschiede in der Fähigkeit der CD4⁺ T-Zellen nach polyklonaler Stimulation IL-2 zu produzieren (Daten nicht gezeigt).

Eine weitere Möglichkeit, wie es zum Verlust bzw. Rückgang der Vδ2⁺ γδ T-Zellen bei GPA-Patienten kommen könnte, besteht darin, dass die Zellen vermehrt aktiviert werden, sich spezialisieren, also ausdifferenzieren, ihre Effektorfunktionen ausüben und anschließend sterben. Diese Fragestellung kann man überprüfen mit Hilfe der Differenzierungsmarker CD45RA und CD27. Naive T-Zellen (T_{naiv}) exprimieren beide Marker auf ihrer Zelloberfläche, zentrale Memory T-Zellen (T_{CM}) regulieren CD45RA herunter, behalten aber CD27, Effektor Memory T-Zellen (T_{EM}) sind für beide Marker negativ und terminal differenzierte T-Zellen (T_{EMRA}) regulieren den Marker CD45RA wieder hoch, bleiben aber negativ für CD27. Abb. 30 A und B zeigt die Verteilung dieser verschiedenen Differenzierungsstadien innerhalb von Vδ2⁻ T-Zellen (A) und in Vδ2⁺ T-Zellen am Beispiel eines repräsentativen Patienten.

In Abb. 30 C und D ist die Differenzierung der γδ T-Zellen von 21 gesunden Spendern verglichen mit 7 GPA-Patienten gezeigt. Betrachtet man nur die Vδ1⁺ γδ T-Zellen (Abb. 30 (C)) sind nahezu gleiche Verteilungen in den Differenzierungsstufen der Zellen von gesunden Spendern und GPA-Patienten zu finden, außer einem minimal erhöhten Anteil von T_{EMRA}. Innerhalb der Vδ2⁺ γδ T-Zellen (Abb. 30 (D)) gibt es minimal weniger naive und terminal differenzierte Zellen bei GPA-Patienten, aber auch hier zeigen sich keine signifikanten Unterschiede.

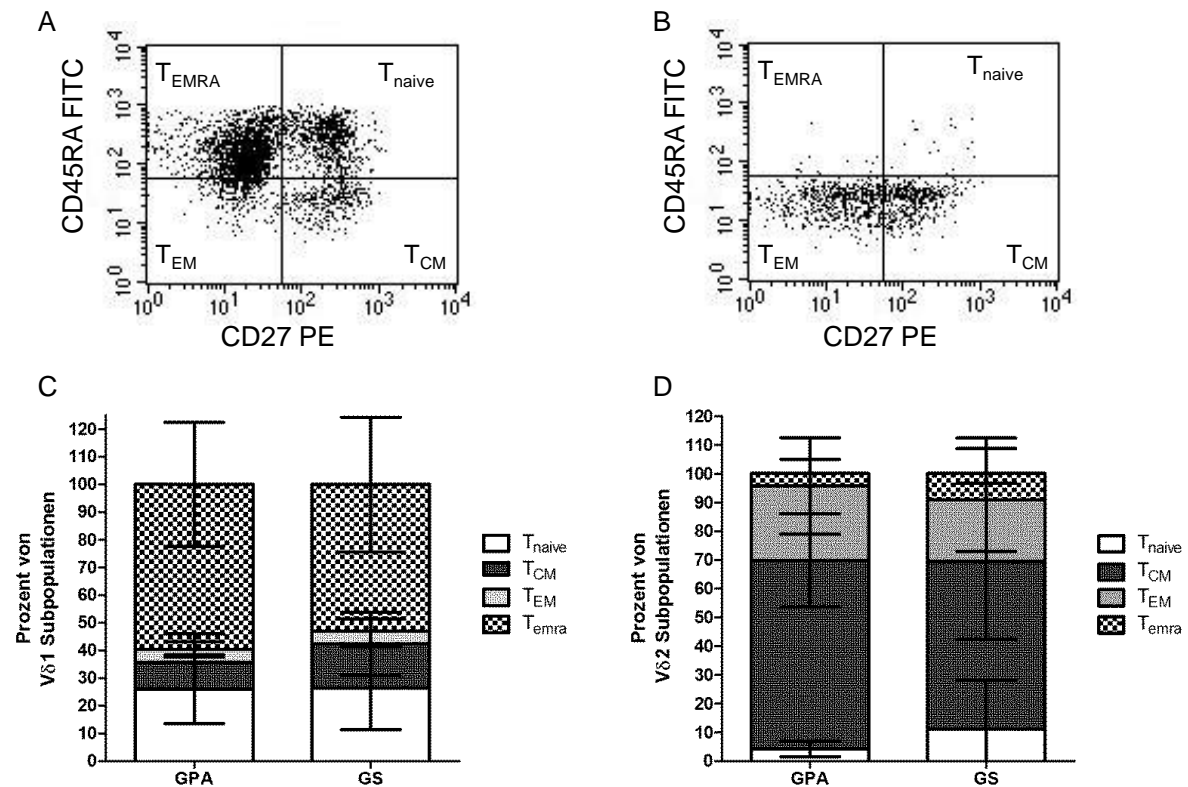


Abb. 30: Durchflusszytometrische Analyse der $\gamma\delta$ T-Zellen von GPA-Patienten und gesunden Spendern nach den Markern CD45RA und CD27. Es wurde unterschieden zwischen $CD45RA^+CD27^+$ T_{naive} , $CD45RA^-CD27^+$ T_{CM} , $CD45RA^-CD27^-$ T_{EM} und $CD45RA^+CD27^-$ T_{EMRA} . Die Analyse der Zellen erfolgte innerhalb der $\gamma\delta^+$ aber $V\delta 2^-$ T-Zellen (A+C) und innerhalb der $V\delta 2^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen (B+D). A und B zeigen die Analyse eines repräsentativen Patienten, in C und D ist die Verteilung innerhalb von 7 GPA-Patienten und 21 GS gezeigt. Dargestellt sind die Mediane mit den dazugehörigen Standardabweichungen. Die statistischen Analysen mit Hilfe einer beidseitig gerichteten ANOVA ergab keine signifikanten Unterschiede.

$V\delta 2^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen lassen sich selektiv und TZR-abhängig durch Phosphoantigene oder Aminobisphosphonate aktivieren und können daraufhin ihre Effektorfunktionen, wie z.B. die Sekretion von Zytokinen, ausüben und in Anwesenheit von IL-2 proliferieren. Um die Funktionsfähigkeit der verbliebenen $V\delta 2^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen von GPA-Patienten zu überprüfen, wurden diese innerhalb der PBMZ mit dem Phosphoantigen BrHPP oder dem Aminobisphosphonat Zoledronat stimuliert. Die Messung der Proliferation erfolgte mit der SCDA-Methode an den Tagen 5, 7 und 9. In Abb. 31 ist die Zellexpansion an Tag 7 gezeigt.

Es ist zu sehen, dass die Zellen in Medium oder mit dem Antigen-Stimulus in Abwesenheit von IL-2 nicht proliferieren. Erst durch die Zugabe von IL-2 können die Zellen zur Zellteilung angeregt werden. Zwei der untersuchten Spender (als Raute und Dreieck im Diagramm dargestellt) zeigten keine messbare Proliferation nach der $V\delta 2$ -spezifischen Stimulation durch BrHPP und Zoledronat. Bei diesen beiden Spendern handelte es sich um Patienten mit nur noch 0,21 bzw. 0,15 % $V\delta 2^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen im Blut.

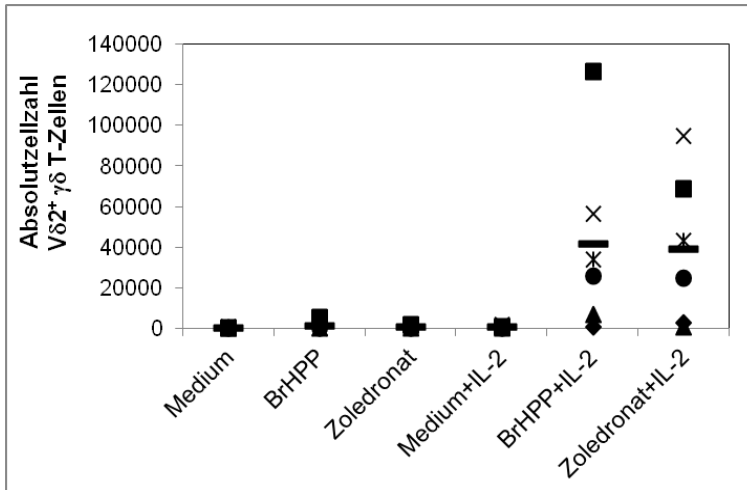


Abb. 31: Stimulation von PBMZ aus 6 GPA-Patienten mit Antigenen für $\gamma\delta$ T-Zellen. Es wurden jeweils 1×10^5 PBMZ mit den o.g. Stimuli für 9 Tage in X-Vivo15-Medium bei 37 °C inkubiert. Die Analyse der Proliferation erfolgte an den Tagen 5, 7 und 9 mit Hilfe der SCDA-Methode. Gezeigt ist Tag 7.

Weiterhin wurde die Fähigkeit der Zytokinfreisetzung von $\gamma\delta$ T-Zellen aus GPA-Patienten untersucht. In Abb. 32 ist die Untersuchung der TNF- α - (A) und IFN- γ -Sekretion (B) von $\gamma\delta$ T-Zellen nach Stimulation mit BrHPP und Zoledronat innerhalb der PBMZ zu sehen.

Es ist im Vergleich der Mittelwert aus 5 GPA-Patienten gegenüber einer gleichbehandelten Gesundkontrolle gezeigt. Es wird deutlich, dass in den $\gamma\delta$ T-Zellen aus GPA-Patienten

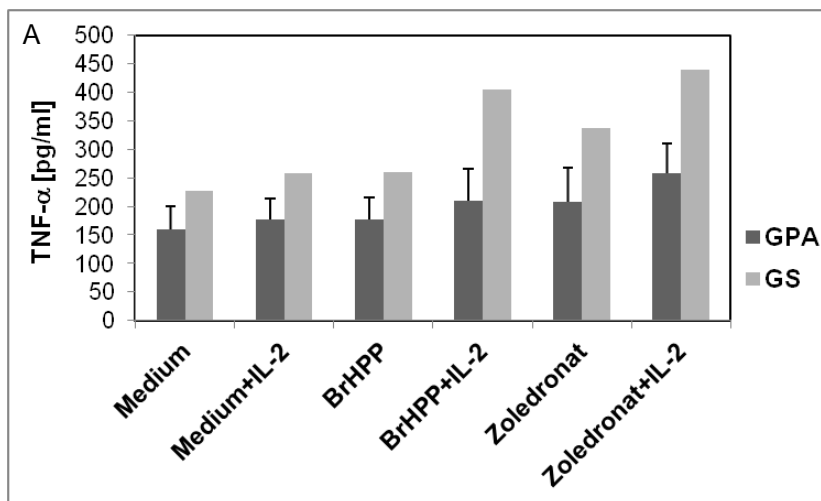
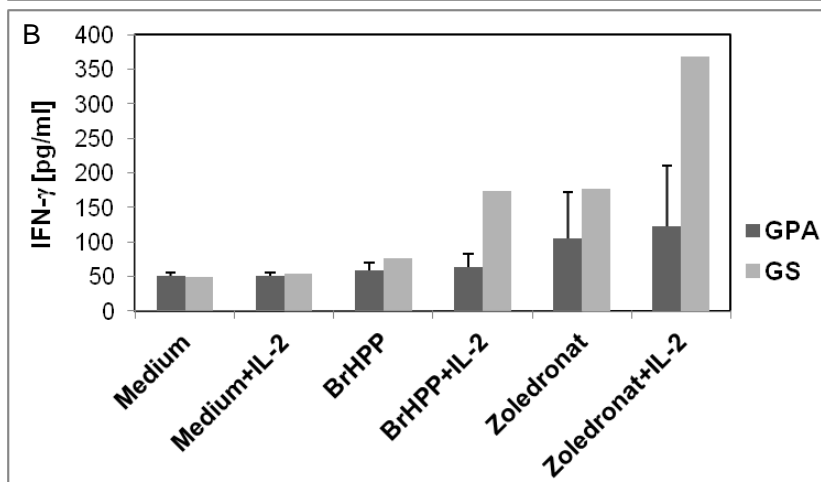


Abb. 32: TNF- α - (A) und IFN- γ -ELISA (B) nach Stimulation von $\gamma\delta$ T-Zellen. Es wurden jeweils 1×10^5 PBMZ wie angegeben in X-Vivo15-Medium für 24 Stunden inkubiert. Gezeigt ist die mittlere Menge der Zytokine aus den Analysen von 5 GPA-Patienten gegenüber der Analyse eines gesunden Spenders.



nahezu keine Induktion von TNF- α -Freisetzung durch BrHPP-Stimulation möglich ist, und auch nach Zoledronat-Stimulation produzieren die Zellen vergleichsweise wenig TNF- α . Auch die Produktion von IFN- γ nach Stimulation mit BrHPP und Zoledronat ist deutlich vermindert im Vergleich zu der gesunden Kontrolle. In der gesunden Kontrolle konnten 1,46 % V δ 2⁺ $\gamma\delta$ T-Zellen durchflusszytometrisch nachgewiesen werden, in den GPA-Patienten im Mittel nur 0,5 %. Der GPA-Patient mit den meisten $\gamma\delta$ T-Zellen innerhalb der hier untersuchten Patienten hatte 1,32 % V δ 2⁺ $\gamma\delta$ T-Zellen. Da auch die Standardabweichungen der Patienten niedriger liegen als die ermittelte Menge von freigesetztem Zytokin des gesunden Spenders, bleibt die Möglichkeit bestehen, dass die $\gamma\delta$ T-Zellen der Patienten nur noch eingeschränkt fähig sind IFN- γ und TNF- α zu produzieren.

Um der Frage nachzugehen, ob $\gamma\delta$ T-Zellen auch innerhalb der Granulome von GPA-Patienten nachweisbar sind, wurden in Kooperation mit Frau Dr. Müller (Abt. Rheumatologie, UKSH, Campus Lübeck) immunhistologische Untersuchungen durchgeführt.

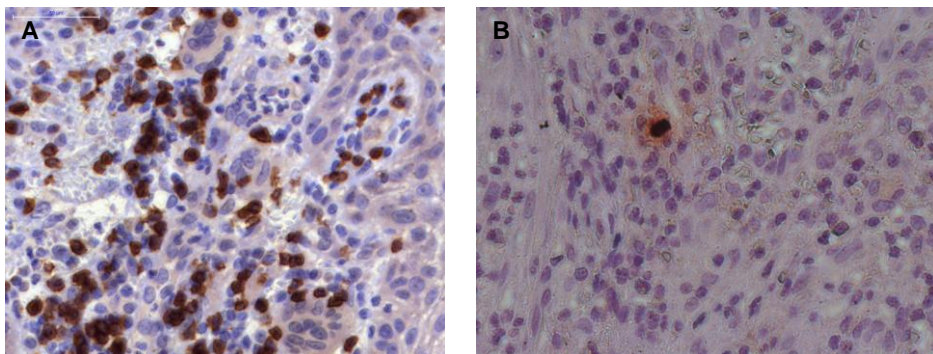


Abb. 33: Färbung von Granulomgewebe aus einem GPA-Patienten mit anti-CD3 (A) und dem pan- $\gamma\delta$ -TZR Antikörper C γ M1 (B). Untersucht wurden verschiedene, nicht serielle Paraffinschnitte aus der Präparation eines Granuloms von einem GPA-Patienten.

Die Paraffinschnitte wurden mit einem anti-CD3 mAk (A) bzw. dem primären Antikörper C γ M1 gegen $\gamma\delta$ T-Zellen insgesamt (B) und dem sekundären Z α M-POX gefärbt (Abb. 33). In Abb. 33 A sind die CD3⁺ T-Zellen deutlich zu erkennen, während in B nur eine der Zellen durch den anti-pan- $\gamma\delta$ mAk angefärbt wurde. Die Frequenz, mit welcher $\gamma\delta$ T-Zellen in dem Granulomgewebe nachgewiesen werden konnte, ist zu gering, um den Rückgang der $\gamma\delta$ T-Zellen im Blut der GPA-Patienten zu erklären. Insgesamt konnten von Frau Dr. Müller bei 3 von 5 GPA-Patienten in den granulomatösen Läsionen $\gamma\delta$ T-Zellen nachgewiesen werden. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass V δ 2⁺ $\gamma\delta$ T-Zellen im Blut von GPA-Patienten gegenüber gesunden Kontrollen reduziert sind, die Ursache hierfür konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden.

6 Diskussion

6.1 Generierung (und Charakterisierung) Proteinase 3 – spezifischer Effektor Memory T-Zellen (T_{EM})

Die T-Zellantwort und das Auftreten verschiedener T-Zellpopulationen wurden bei GPA-Patienten zum Teil bereits intensiv untersucht. So wurden z.B. schon T-Zellen in den granulomatösen Läsionen von GPA-Patienten nachgewiesen und auch die Expansion von $CD4^+$ Effektor Memory T-Zellen wurde bei GPA-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen bereits gezeigt [47, 52]. Popa et al. konnten die Proliferation von $CD4^+$ T-Zellen nach PR3-Stimulation in gesunden Spendern und GPA-Patienten nachweisen [48]. T-Zellen, die spezifisch auf das Autoantigen PR3 reagieren, entziehen sich aber bis heute durch ihre sehr niedrige Frequenz im Blut von GPA-Patienten einer intensiveren Charakterisierung [49]. Aus diesem Grund sollten im Rahmen dieser Arbeit PR3-reaktive T-Zelllinien oder T-Zellklone *in vitro* generiert und anschließend charakterisiert werden. Die Versuche zur Generierung einer PR3-spezifischen T-Zelllinie gestalteten sich in vielfacher Hinsicht als schwierig. Die erste angewendete Methode war die der Transfektion von DCs mit PR3-cDNA oder -RNA, die PR3-spezifische T-Zellen aktivieren sollten. Das Problem des erschwerten Nachweises der PR3 im Westernblot wurde über die Klonierung eines Flag-Epitops an das Protein behoben. Die Transfektion der DCs gestaltete sich als schwierig und wenig effizient. Es wurden hierfür viele verschiedene Transfektionsmethoden erprobt, wie z.B. Elektroporation oder verschiedenste Transfektionsreagenzien. Dabei wurde sowohl Plasmid-DNA als auch *in vitro* transkribierte RNA der PR3 in verschiedenen Methoden zur Transfektion eingesetzt (Daten nicht gezeigt).

Die Transfektion von DCs mit Antigen-mRNA wurde bereits von Heiser et al. erfolgreich für die Stimulation von T-Zellen im autologen System eingesetzt [109], allerdings handelte es sich bei Heiser et al. um RNA des Prostataspezifischen Antigens und nicht um RNA der PR3. Bei der Arbeit von Heiser et al. wurden die DCs nur in Anwesenheit der RNA, ohne weitere Hilfsmittel wie Elektroporation oder Transfektionsreagenzien, über Nacht mit dieser inkubiert.

Die *in vitro* Transkription von PR3-RNA wurde in dieser Arbeit, im Gegensatz zu der von Heiser et al., noch um ein *polyA-Tailing* erweitert, um die RNA zu stabilisieren. Das bedeutet, dass ein Schwanz aus zahlreichen Adenin-Nukleotiden an die RNA geknüpft wurde, um den

Abbau durch RNasen zu verhindern. Weder nach der Transfektion der stabilisierten PR3-RNA noch der PR3-RNA ohne PolyA-Schwanz konnte eine Expression von PR3 in DCs im Westernblot nachgewiesen werden. Der Nachweis wurde mit Hilfe von anti-PR3 und anti-Flag mAk durchgeführt, da es sich bei dem *in vitro* transkribierten Konstrukt ebenfalls um eine mature PR3 mit einem angefügten Flag-Epitop handelte. Es handelte sich hier also nicht um ein Problem beim Nachweis der Expression sondern die RNA wurde entweder nicht transfiziert oder nicht exprimiert. Die Transfektion der RNA in DCs wurde über Elektroporation und den Einsatz verschiedener Reagenzien versucht, blieb aber auch mit der RNA eines GFP-Konstrukts erfolglos. Auch die Transfektion von GFP-Plasmid-DNA über Elektroporation oder verschiedene Reagenzien blieb wenig effizient. Einzig nach der Transfektion von pcDNA3-FlagPR3_m in mDCs über Amaxa-Nukleofektion konnte eine Expression der PR3 im Westernblot gezeigt werden. Möglicherweise wurden die DCs durch die Elektroporation, oder die Anwesenheit von Transfektionsreagenzien in den hier durchgeführten Versuchen zu sehr gestresst, um das Konstrukt später noch exprimieren zu können. DCs können zum einen in der immaturren Reifungsphase und zum anderen als ausgereifte mDCs transfiziert werden. Es konnte bereits mit mRNA aus Tumor-Zelllinien gezeigt werden, dass sowohl die Transfektion von iDCs als auch von mDCs zu einer Stimulation von T-Zellen mit den Antigenen führt [110]. Für die hier vorliegende Arbeit wurden ebenfalls Transfektionen über Elektroporation mit DCs in beiden Reifungsstadien durchgeführt, aber ohne Erfolg. Für die Methode der Amaxa-Nukleofektion wurde eine große Menge DCs benötigt, die Transfektion war für die Zellen eine stressige Prozedur und ein relativ großer Anteil der Zellen verstarb. Die Effizienz war vergleichsweise gering, die Expression eines Kontrollproteins, welches ebenfalls ein Flag-Epitop enthielt, war deutlich stärker. Der Grund dafür könnte sein, dass es sich bei dem zu exprimierenden Protein um eine aktive Protease handelte, die die Zellen möglicherweise selbst schädigen konnte. Da es im Prinzip möglich war die PR3 in mDCs zu exprimieren (Abb. 8), kann es sich nicht um ein fehlerhaftes Konstrukt gehandelt haben, welches verwendet wurde. Fujiwara et al. konnten die Serinproteasen PR3, Elastase und Cathepsin G erfolgreich in B-Zelllinien transfizieren und mit diesen T-Zellantworten gegen die transfizierten Antigene induzieren [111]. Die Transfektion von EBV-Linienzellen, die im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls getestet wurde, war mit Hilfe der Amaxa-Nukleofektion durchaus möglich, wenn auch wenig effizient. Die Herstellung einer autologen EBV-Zelllinie für jeden Patienten konnte aufgrund von Materialmangel nicht weiter verfolgt werden.

Um T-Zellen autolog, also mit DCs desselben Spenders, stimulieren zu können, mussten die T-Zellen während der Reifungsphase der DCs vorübergehend eingefroren werden. Bei

dieser Prozedur kam es zu einem hohen Verlust an Zellmaterial. Die Stimulation der T-Zellen eines Spenders mit transfizierten DCs desselben Spenders ergab keine PR3-spezifische Reaktion in Form von Proliferation (Abb. 9). Ein Grund dafür könnte sein, dass die DCs nach der Transfektion zu geschädigt waren, um noch effektiv Antigen präsentieren zu können bzw. durch die proteolytische Aktivität der PR3 beeinträchtigt wurden. Die Methode der Stimulation von T-Zellen mit transfizierten DCs wurde mit Material von gesunden Spendern erprobt und entwickelt. Aufgrund der großen Menge erforderlichen Zellmaterials war eine Umsetzung mit Material aus GPA-Patienten in dieser Form nicht möglich. Es wurde daraufhin auf die Methode der Transfektion von DCs verzichtet und stattdessen eine Stimulation von Zellen mit dem Antigen in Form von Protein eingesetzt. Hierfür wurde die PR3 zunächst als rekombinantes Protein hergestellt. Der Vorteil der Stimulation mit dem Protein war zum einen, dass die Zellen weniger Stress ausgesetzt wurden und zum anderen, dass keine DCs mehr generiert werden mussten, sondern innerhalb der PBMZ gearbeitet werden konnte.

Nach der Herstellung rekombinanter PR3 wurde diese in zwei unterschiedlichen Versuchsaufbauten als Stimulus für die Generierung PR3-spezifischer T-Zellen verwendet. Im Verlauf der ersten Versuchsreihe sollten PR3-spezifische T-Zellen direkt *ex vivo* aus dem Blut von Patienten bzw. vorbereitend aus gesunden Kontrollen mit Hilfe des IFN- γ *Secretion assay* der Firma Miltenyi isoliert werden. Diese Methode wurde mit mehreren gesunden Spendern erprobt, konnte aber aufgrund der geringen verfügbaren Materialmengen nur mit einem GPA-Patienten durchgeführt werden. Die stimulierten PBMZ wurden in diesem Versuch nach der Sekretion des von CD4⁺ Th1-Zellen produzierten Zytokins IFN- γ hin sortiert. Es ist bekannt, dass mit PR3 beladene DCs besonders CD4⁺ T-Zellen des Typs Th1 aktivieren [45]. Ein weiterer Grund für die Sortierung gerade dieser Zellen war, dass besonders CD4⁺ T_{EM} bei GPA-Patienten expandiert sind, was möglicherweise durch eine persistierende Stimulation durch das Autoantigen PR3 begründet ist [52].

Die Frequenz von PR3-spezifischen CD4⁺ T-Zellen ist im gesunden Spender mit 0,4 % und bei GPA-Patienten mit 0,64 % der T-Lymphozyten sehr gering [49]. Nach der im *Secretion assay* vorgesehenen 16 stündigen Stimulation der PBMZ mit dem Autoantigen PR3 konnten in den Sortierungen daher dementsprechend wenige Zellen als IFN- γ positiv ausgewählt werden. Bereits an diesem Punkt wäre es möglich, dass „falsch positive“ Zellen sortiert wurden. Die Zellen wurden direkt nach der Sortierung mit Fütterzellen kultiviert und in Anwesenheit von exogenem IL-2 expandiert. An diesem Punkt könnten die vorher aktivierten möglicherweise PR3-spezifischen T-Zellen durch Aktivierungs-induzierten Zelltod verloren gegangen sein. Es konnten mit dieser Methode keine PR3-spezifischen T-Zellen generiert werden, weder als Zelllinie, noch als einzelne T-Zellklone. Prinzipiell ist es aber möglich,

nach einmaliger Stimulation mit dem spezifischen Antigen T-Zelllinien zu generieren und auch als Einzelzellklone auszusortieren, wie es z.B. Li et al. für T-Zellen spezifisch gegen die G1-Domäne von Aggrecan gezeigt haben [112]. Da die Stimulation der Antigen-spezifischen T-Zellen sowohl mit der rekombinant hergestellten als auch mit einer nativen PR3 durchgeführt worden war, kann die Erfolglosigkeit dieser Methode nicht auf die Art des Antigens zurückgeführt werden.

In einem weiteren Ansatz sollten PR3-spezifische T-Zellen durch wiederholte autologe Restimulation nach und nach angereichert werden. Hierfür wurden die Treg aus den PBMZ depletiert und anschließend die verbliebenen Zellen repetitiv mit demselben Antigen stimuliert und expandiert. Die auf das verwendete Antigen reagierenden T-Zellen der ersten Stimulation wurden für 3 - 5 Zyklen im autologen System, also mit autologen APZ in Anwesenheit von PR3 und exogenem IL-2, weiterhin stimuliert mit dem Ziel der selektiven Expansion. Die Anzahl der autologen Restimulationszyklen war abhängig vom verfügbaren Zellmaterial. Im Fall der gesunden Spender wurden ähnliche Zellzahlen verwendet, wie auch von GPA-Patienten zur Verfügung gestanden hätten, um eine realistische und anwendbare Methode zu entwickeln. Um ausreichende Zellzahlen für eine intensive Analyse der potentiell PR3-spezifischen Zellen zu erhalten, wurden anschließend an die autologe Restimulation noch einige Zyklen der allogenen, polyklonalen Restimulation angeschlossen. Während dieser Phase starben bereits einige der T-Zelllinien ab. Nachdem von weiteren Zelllinien ausreichend große Zellzahlen zur Verfügung standen, sollten diese erneut autolog in Anwesenheit von PR3 stimuliert werden. Um eventuell noch aktivierte Zellen nicht durch einen erneuten Stimulus zu töten, wurden die Zellen zuvor auf die Expression der Aktivierungsmarker CD69 und CD25 hin untersucht. Die Zellen regulierten zwar CD69 etwas herunter, blieben aber auch am Ende eines Proliferationszyklus weiterhin stark positiv für CD25 (Daten nicht gezeigt), möglicherweise bedingt durch die Anwesenheit von exogenem IL-2 im Kulturmedium der Zellen. Als Nachweis für die PR3-spezifische Aktivierung der Zellen dienten die Analyse der erneuten schnellen Hochregulation der Aktivierungsmarker CD69 und CD25. Aus Abb. 19 wird deutlich, dass nach einer erneuten Aktivierung, z.B. mit PHA, CD25 auf der Zelloberfläche noch wesentlich stärker exprimiert werden kann, auch wenn das Molekül schon vorher auf der Zelloberfläche vertreten war. Außerdem wurden die Sekretion von Zytokinen (IFN- γ und IL-4) und die Proliferation der Zellen nach erneuter Stimulation mit PR3 untersucht. Mit keiner dieser Methoden konnte in den hergestellten T-Zelllinien eine PR3-spezifische Immunantwort nachgewiesen werden. Die Stimulation der Zelllinien mit PHA bewirkte in allen Nachweismethoden eine deutliche Reaktion, die Zellen waren also prinzipiell aktivierbar aber offensichtlich nicht PR3-spezifisch.

Da die initiale Stimulation innerhalb der Treg-depletierten PBMZ begonnen wurde, waren zu Beginn noch andere T-Zellen vorhanden, welche vielleicht schon vor Versuchsbeginn aktiviert worden waren und durch das exogene IL-2 überleben konnten. Wie auch in späteren Experimenten zur Depletion von Treg deutlich wurde (Kapitel 5.2), proliferierten die T-Zellen innerhalb der PBMZ in Abwesenheit von Treg auch ohne einen Antigen-Stimulus. Dieser Effekt war besonders deutlich in Anwesenheit von exogenem IL-2 zu sehen. Es könnte also im Verlauf der repetitiven PR3-Stimulationen durch die Abwesenheit von Treg und in Anwesenheit von exogenem IL-2 im Kulturmedium auch eine Antigen-unabhängige und daher nicht PR3-spezifische Expansion der T-Zellen stattgefunden haben.

Durch den allogenen, polyklonalen Stimulus der Fütterzellen mit PHA wurden anschließend dann auch alle unspezifisch expandierten T-Zellen weiter vermehrt. Auch in diesem System wäre an diesem Punkt ein Absterben durch Aktivierungs-induzierten Zelltod bei den PR3-spezifischen T-Zellen möglich.

Piesche et al. konnten mit Hilfe von überlappenden PR3-Peptiden PR3-reaktive T-Zellen erzeugen, auch mit Zellen aus gesunden Spendern. Hier erkannte nur ein T-Zellklon, welcher spezifisch auf ein Peptid reagierte, auch das Gesamtprotein der PR3 [113]. Ausgerechnet T-Zellen mit dieser Spezifität können im Menschen aber eigentlich nicht induziert werden, da diese reaktiv gegen einen Teil des Propeptids der PR3 wären. Das Propeptid des Proteins wird im Normalfall bereits während der Prozessierung des Proteins entfernt und nicht aus den Granula der Neutrophilen entlassen [114]. Im Verlauf dieser Arbeit wurden die Stimulationen von autoreaktiven T-Zellen ausschließlich mit der reifen Form des Autoantigens PR3 durchgeführt.

Zusammenfassend war es im Rahmen der hier vorliegenden Dissertation trotz der Verwendung von drei verschiedenen Methoden nicht möglich eine PR3-spezifische T-Zelllinie oder einen einzelnen T-Zellklon zu generieren.

6.2 Regulatorische T-Zellen bei GPA

Regulatorische T-Zellen (Treg) sind dafür verantwortlich, dass Immunantworten gedämpft oder unterbunden werden und spielen daher eine wesentliche Rolle in der peripheren Toleranz des Immunsystems. Bei einer Autoimmunerkrankung wie der GPA liegt es nahe, dass die Treg möglicherweise einen Defekt in ihrer immunsupprimierenden Funktion aufweisen könnten und dadurch zelluläre Autoimmunreaktionen ermöglicht werden. Fehlfunktionen der Tregs konnten bereits bei verschiedenen anderen autoimmunen

Erkrankungen wie z.B. MS oder Rheumatoider Arthritis gezeigt werden [71, 72]. In der hier vorliegenden Arbeit wurde zunächst die allgemeine Funktionalität von Treg aus GPA-Patienten und gesunden Kontrollen untersucht, indem deren regulatorische Aktivität gegenüber Antigen-spezifischen T-Zellen nach Tetanustoxoid-Stimulation analysiert wurde. In den hier durchgeführten Experimenten konnten keine Unterschiede bezüglich der Funktionalität von Treg aus gesunden Spendern und GPA-Patienten gefunden werden.

Die proliferative Antwort auf die Stimulationen von PBMZ mit PR3 erwies sich sowohl bei gesunden Spendern, als auch bei GPA-Patienten insgesamt als schwach. Es wurde aber in beiden Analysemethoden (³H-Thymidininkorporation und Bestimmung der zellulären Expansion mit SCDA) deutlich, dass die Zeitkinetik eine wichtige Rolle spielt. Um also ein Gesamtbild des Einflusses von regulatorischen T-Zellen bei GPA zu erhalten, war es immer notwendig die Proliferation zu verschiedenen Zeitpunkten zu betrachten, da die Aussage des Ergebnisses je nach Zeitpunkt variierte. Während diese Ergebnisse im Rahmen der vorliegenden Arbeit entstanden wurde von Morgan et al. publiziert, dass Treg aus GPA-Patienten nicht voll funktionsfähig sind, da sie nicht mehr dazu in der Lage waren, die Proliferation von T-Zellen nach PR3-Stimulation zu supprimieren [75]. Die in der Veröffentlichung gezeigten Ergebnisse wurden an Tag 11 nach der Stimulation gemessen. Betrachtet man die Zeitreihe der Proliferation von Tag 6 bis Tag 12 in der vorliegenden Arbeit (Abb. 20 und Abb. 21), so wird deutlich, dass die nicht Treg-depletierten PBMZ viel früher ihr Proliferationsmaximum erreichen als PBMZ nach der Depletion von Treg. Diese Beobachtung könnte darauf zurückzuführen sein, dass sich die Zellen nach dem Depletionsvorgang erst erholen müssen. Dagegen spricht, dass die parallele Behandlung der PBMZ während der Treg-Depletion (also Durchführung derselben Arbeitsschritte ohne Zugabe eines Antikörpers) in einem hier nicht dargestellten Experiment keinen Einfluss auf die Proliferation hatte. Es scheint also nicht die Depletion die Ursache für die verzögerte Proliferation nach der Treg-Depletion zu sein. Zeigt man nur einen ausgewählten Ausschnitt der Kinetik, so ergibt sich möglicherweise eine Aussage über die Funktion der Treg, die eigentlich nicht zutreffend ist. In der Arbeit von Morgan et al. wurde außerdem das Medium RPMI mit einem Zusatz von 10 % FKS verwendet, in der hier vorliegenden Arbeit wurden die Stimulationen ausschließlich in serumfreiem Medium (X-Vivo15) durchgeführt. Die Bestandteile des FKS aus dem Medium könnten von APZ aufgenommen und den T-Zellen präsentiert worden sein, die Proliferation könnte also nicht mehr allein auf die Aktivierung der T-Zellen mit PR3 zurückzuführen sein.

Mit der Methode des SCDA ist es möglich die Absolutzellzahlen von Zellpopulationen in einem heterogenen Zellgemisch zu bestimmen. Es wurde in diesen Versuchen nicht die

Proliferation der gesamten Zellen, sondern das Ergebnis der Stimulation auf der Ebene einzelner Zellpopulationen nach einer bestimmten Zeit analysiert. Betrachtet man mit Hilfe der SCDA-Methode die Effekte von Treg-Depletion und PR3-Stimulation (Abb. 23 und Abb. 24), so findet man nur eine sehr geringfügige Veränderung der Absolutzellzahlen von CD8⁺ T-Zellen an Tag 10 der Stimulation, im Gegensatz zu den Veränderungen bei CD4⁺ T-Zellen nach Treg-Depletion, die Morgan et al. in Patienten gezeigt haben.

Die verminderte Suppression durch die Treg konnte aber auch in deren Arbeit nur in Patienten mit ANCA im Serum nachgewiesen werden. In der hier vorliegenden Arbeit konnte auch kein Unterschied in der Suppressivität der Treg zwischen ANCA positiven und ANCA negativen Patienten festgestellt werden. Abdulahad et al. konnten ebenfalls eine fehlerhafte Suppression von Tregs bei GPA-Patienten in Remission zeigen [73]. Aber weder bei der Betrachtung der in dieser Arbeit eingesetzten GPA-Patienten in Remission, noch bei den Patienten in anderen Krankheitsstadien konnten hier Einschränkungen in der Suppression gezeigt werden. In den hier durchgeführten Experimenten wurde als Effektorfunktion der T-Zellen nach Stimulation mit PR3 nur die Proliferation gemessen. Weder in den Versuchen mit ³H-Thymidineinbau, noch in solchen mit Absolutzellzahlbestimmung konnte aber eine wirkliche Proliferation nach Stimulation mit PR3 gemessen werden, obwohl sowohl eine rekombinante als auch eine native PR3 verwendet wurden. Möglicherweise hätten Unterschiede in anderen T-Zellfunktionen wie z.B. der Zytokinproduktion in An- und Abwesenheit von Treg festgestellt werden können. Aus den Versuchen zur generellen Funktionsfähigkeit der Treg aus GPA-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen (Abb. 20 und Abb. 21) am Beispiel einer Immunantwort auf Tetanustoxoid geht hervor, dass die Treg bei GPA-Patienten noch dazu in der Lage sind, die Proliferation Antigen-spezifischer T-Zellen zu supprimieren. Insgesamt war kein Unterschied zwischen GPA-Patienten und gesunden Spendern bezüglich einer verminderten Treg-Funktion nachweisbar. Klapa et al. konnten ebenso wie Morgan et al. und Abdulahad et al. eine verminderte Suppression von T-Zellen nach Stimulation mit PR3 bei GPA-Patienten in Remission zeigen, allerdings in Anwesenheit von exogen zugegebenem IFN- α , da von diesem Zytokin angenommen wird, dass es Autoimmunität begünstigt [74]. Ein direkter Vergleich der hier erhaltenen Ergebnisse mit denen von Klapa et al. ist daher nicht möglich.

Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Ergebnissen von z.B. Morgan et al. fanden Chavele et al. heraus, dass die Immunantwort von T-Zellen, die spezifisch auf MPO reagieren, nicht über CD4⁺CD25⁺ Treg reguliert werden, da sie keine Unterschied in der Frequenz der Zellen vor und nach Treg-Depletion fanden. Außerdem konnte diese Gruppe zeigen, dass die aus AAV-Patienten isolierten Treg ebenso fähig waren T-Zell-Effektorfunktionen zu unterdrücken, wie die aus gesunden Kontrollen [115]. Da auch in der

hier vorliegenden Arbeit kaum eine Reaktion durch die Depletion von Treg in gesunden Kontrollen und GPA-Patienten hervorgerufen wurde, bleibt die Frage offen, ob auch die Immunantwort auf PR3 hier möglicherweise noch anderen Kontrollmechanismen unterliegt, wie z.B. der Regulation durch $\gamma\delta$ T-Zellen.

6.3 $\gamma\delta$ T-Zellen bei GPA

Die im peripheren Blut nur in geringerer Frequenz vorhandenen $\gamma\delta$ T-Zellen wurden im Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen bisher hauptsächlich im Hinblick auf ihre Fähigkeit zur IL-17-Produktion beachtet. Es konnte gezeigt werden, dass murine $\gamma\delta$ T-Zellen TZR-unabhängig über die Zytokine IL-1 β und IL-23 zur IL-17-Produktion angeregt werden können. In den Gehirnen von Mäusen mit Experimenteller Autoimmun-Enzephalomyelitis (EAE), dem Mausmodell der MS, wurden die IL-17 produzierenden $\gamma\delta$ T-Zellen in erhöhter Frequenz vorgefunden [95]. Genauere Kenntnisse über eine mögliche Funktion oder einen Zusammenhang von $\gamma\delta$ T-Zellen mit AAV liegen bis heute nicht vor. $\gamma\delta$ T-Zellen konnten im Zusammenhang mit GPA bisher nur in den Kapillaren der Niere nachgewiesen werden [107]. Die $\gamma\delta$ T-Zellen sind nicht nur aufgrund ihrer regulatorischen Fähigkeiten im Zusammenhang mit GPA von besonderem Interesse, sondern könnten auch durch eine andere ihrer vielfältigen Funktionen durchaus eine Rolle spielen in der Frühpathogenese der GPA [116].

Bei der Mehrzahl gesunder Erwachsenen setzt sich die Population der $\gamma\delta$ T-Zellen im peripheren Blut zu 50 - 90 % aus V δ 2⁺ $\gamma\delta$ T-Zellen und nur einem deutlich niedrigeren Prozentsatz an V δ 1⁺ $\gamma\delta$ T-Zellen zusammen [83]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Verhältnis der $\gamma\delta$ -T-Zell-Subpopulationen in Patienten mit GPA auffallend verändert ist. Während bei gesunden Kontrollen meist ein Verhältnis von V δ 1⁺ zu V δ 2⁺ $\gamma\delta$ T-Zellen von unter 1 vorlag (d.h. erwartungsgemäß V δ 2⁺ $\gamma\delta$ T-Zellen dominierten) war dieses bei GPA-Patienten signifikant erhöht. Ein ähnliches Bild fand sich in CSS-Patienten, aber nicht in Patienten mit chronischer Sinusitis. Das Verhältnis der V δ 1⁺ und V δ 2⁺ $\gamma\delta$ T-Zellen war in den CSS-Patienten ebenfalls signifikant erhöht. GPA und CSS gehören beide zur Gruppe der AAV. Während bei GPA-Patienten meist PR3-ANCA gebildet werden, weisen CSS-Patienten häufiger ANCA gegen MPO auf. Es kommt in beiden Erkrankungen zur Vaskulitis der kleineren Gefäße innerhalb eines autoimmunen Geschehens. Weder für das CSS noch für die GPA konnte bisher eine Ursache der Erkrankung festgestellt werden, klar ist aber,

dass beide Krankheiten sich sehr ähnlich sind und als systemische Erkrankungen den gesamten Organismus betreffen können [11]. Die chronische Sinusitis hingegen betrifft ausschließlich die Nasennebenhöhlen und ist daher eine rein lokal auftretende Entzündung. Hier konnte keine veränderte Verteilung von $V\delta 1^+$ und $V\delta 2^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen im Blut festgestellt werden, sondern das Bild entsprach in etwa dem der gesunden Kontrollen. Man könnte also vermuten, dass sich nur in systemischen Erkrankungen die Verteilung der $\gamma\delta$ -T-Zell-Subpopulationen im Blut verändern und nicht in allen entzündlichen Erkrankungen.

Eine systemische Erkrankung, von der ebenfalls eine Verschiebung des Verhältnisses von $V\delta 1^+$ zu $V\delta 2^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen bekannt ist, ist HIV [117]. Bei Takayasu's Arteriitis, einer Vaskulitis der großen Blutgefäße, wurde eine Expansion von $V\delta 1^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen festgestellt [106].

Es konnte bei der Analyse der gesammelten Daten keine eindeutige Korrelation der Veränderung der $\gamma\delta$ T-Zellen im Blut mit der Krankheitsdauer, dem Alter der Patienten, der Dauer der immunsupprimierenden Medikation oder dem Status der Erkrankung, d.h. ob diese sich gerade in einer aktiven oder einer Remissionsphase befanden, festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Es konnte auch kein klarer Zusammenhang zwischen dem Krankheitsstadium und der $\gamma\delta$ -T-Zell-Verteilung detektiert werden, da sowohl im lokalisierten, als auch im generalisierten Stadium der Erkrankung Patienten mit dem veränderten Verhältnis von $V\delta 1^+$ und $V\delta 2^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen gefunden wurden, allerdings konnte insgesamt nur Material von drei Patienten im lokalisierten Stadium untersucht werden.

Aus der Analyse der Absolutzellzahlen von $\gamma\delta$ T-Zellen und deren Subpopulationen bei GPA-Patienten und gesunden Kontrollen konnte eindeutig festgestellt werden, dass die Veränderung des Verhältnisses der beiden Subpopulationen im Blut der Patienten hauptsächlich auf eine Reduktion der $V\delta 2^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen zurückzuführen ist (Abb. 26).

Das Verhältnis der beiden $\gamma\delta$ -T-Zell-Subpopulationen verändert sich auch in gesunden Erwachsenen mit dem Alter insofern, als dass die Anzahl der $V\delta 2^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen im Laufe der Zeit zurückgeht und die $V\delta 1^+$ dadurch im prozentualen Verhältnis vermehrt auftreten [82]. Im Verlauf dieser Arbeit konnte eindeutig gezeigt werden, dass es sich bei der bei GPA-Patienten auftretenden Veränderung nicht um einen Effekt des Alters handelt (Abb. 27). Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde nach der Ursache für den Verlust der $V\delta 2^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen gesucht.

Vor allem $CD4^+$ T-Zellen sezernieren den T-Zell-Wachstumsfaktor IL-2 ohne welchen $\gamma\delta$ T-Zellen nicht proliferieren können. $\gamma\delta$ T-Zellen dagegen sind nicht in der Lage dieses Zytokin selbst herzustellen und daher auf die $CD4^+$ T-Zellen angewiesen [92]. In dieser Arbeit konnte

gezeigt werden, dass die reduzierte Anzahl der $V\delta 2^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen bei GPA-Patienten signifikant mit einer verminderten Anzahl von $CD4^+$ T-Zellen korrelierte (Abb. 28). Die verbliebenen $CD4^+$ T-Zellen waren aber nach Stimulation mit PMA/Ionomycin noch immer dazu in der Lage IL-2-Mengen zu produzieren, die mit denen von gesunden Spendern vergleichbar waren (Abb. 29). Es wäre aber möglich, dass die Anzahl der $CD4^+$ T-Zellen nicht mehr ausreicht, um genügend IL-2 zu sezernieren um alle $\gamma\delta$ T-Zellen mit der benötigten Menge zu versorgen. Außerdem wäre es denkbar, dass die $CD4^+$ T-Zellen nicht ausreichend aktiviert werden. PMA/Ionomycin ist ein polyklonaler Stimulus, der alle vorhandenen $CD4^+$ T-Zellen zur IL-2-Produktion anregt, so aber *in vivo* nicht vorkommt. Wesch et al. konnten zeigen, dass z. B. in HIV-Patienten eine Aktivierung Antigen-spezifischer $CD4^+$ T-Zellen fehlerhaft ist und diese daher kein IL-2 zur Verfügung stellen, welches $\gamma\delta$ T-Zellen für die Proliferation benötigen [118]. Es wäre also möglich, dass die PR3-spezifischen T-Zellen bei GPA-Patienten nicht ausreichend aktiviert werden und daher kein IL-2 produzieren, wodurch die $\gamma\delta$ T-Zellen nicht proliferieren können.

$V\delta 2^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen können von Phosphoantigenen und Aminobisphosphonaten aktiviert und zur Erfüllung ihrer Effektorfunktionen angeregt werden, wie z.B. der Sekretion von Zytokinen. In dieser Arbeit wurden die $V\delta 2^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen von sechs verschiedenen GPA-Patienten mit den Phosphoantigenen oder Aminobisphosphonat stimuliert und ihre Reaktionsfähigkeit untersucht. Es wurde zum einen die Fähigkeit der $\gamma\delta$ T-Zellen zur Zytokinproduktion analysiert und außerdem untersucht, ob die Zellen nach Aktivierung noch proliferieren können (Abb. 31 und Abb. 32). Für die durchgeführten Experimente zur Funktionalität wurden die $\gamma\delta$ T-Zellen innerhalb der PBMZ stimuliert und nicht zuvor einzelne Zellpopulationen isoliert. Im Hinblick auf die Zytokinproduktion bedeutet das, dass keine Quantifizierung der Zytokinproduktion pro $\gamma\delta$ -T-Zelle möglich war. Es konnte nur eine Aussage darüber gemacht werden, ob die Zellen nach der Stimulation mit Aminobisphosphonaten und Phosphoantigenen die Zytokine $TNF-\alpha$ und $IFN-\gamma$ produzierten. Eine quantitative Beurteilung konnte nicht erfolgen. Es hat sich gezeigt, dass die Zellen der GPA-Patienten mit verbliebenen $V\delta 2^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen nach Stimulation mit den spezifischen Antigenen dieser Zellen sowohl proliferieren, als auch in geringem Umfang die Zytokine $IFN-\gamma$ und $TNF-\alpha$ produzieren. Nur zwei Spender, in welchen durchflusszytometrisch fast keine $V\delta 2^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen mehr nachgewiesen werden konnten, zeigten keine $V\delta 2$ -Expansion nach der Stimulation. Aufgrund der fehlenden quantitativen Beurteilung der Zytokinsekretion bleibt noch offen, ob die produzierten Zytokinmengen denen von gesunden Spendern

entsprechen. Eine vollständige Funktionsfähigkeit der $\gamma\delta$ T-Zellen aus GPA-Patienten kann also noch nicht sicher festgestellt werden.

$\gamma\delta$ T-Zellen sind als Bestandteil des angeborenen Immunsystems innerhalb kurzer Zeit dazu in der Lage auf eine bakterielle Infektion zu reagieren. Ausgehend von der Hypothese von Lamprecht et al. zu der Frühpathogenese der GPA wäre es denkbar, dass die $\gamma\delta$ T-Zellen an der ersten Immunabwehr einer möglichen Infektion mit *S.aureus* beteiligt sind [108]. Handelt es sich dann tatsächlich um eine chronische Besiedelung, wie bisher angenommen, dann wären die $\gamma\delta$ T-Zellen einer andauernden Stimulation durch bakterielle Antigene ausgesetzt. Diese persistierende Aktivierung könnte zu einer Veränderung des Differenzierungsstadiums oder sogar zu der Deletion aufgrund andauernder Antigen-Stimulation der $\gamma\delta$ T-Zellen führen [119].

Die Analyse der Expression der Differenzierungsmarker CD45RA und CD27 ermöglicht die Unterteilung von $\gamma\delta$ T-Zellen in vier verschiedene Subpopulationen. Naive T-Zellen (T_{naiv}) exprimieren CD45RA und CD27 auf ihrer Zelloberfläche, zentrale Memory T-Zellen (T_{CM}) regulieren CD45RA herunter, bleiben aber positiv für CD27, Effektor Memory T-Zellen (T_{EM}) sind für beide Marker negativ und terminal differenzierte T-Zellen (T_{EMRA}) regulieren den Marker CD45RA wieder hoch, bleiben aber negativ für CD27 [120]. Naive T-Zellen sind besonders in den Lymphknoten vertreten und hatten noch keinen Antigenkontakt. Werden diese Zellen z.B. über Phosphoantigene wie IPP aktiviert, so regulieren sie das Molekül CD45RA herunter und entwickeln einen Phänotyp ähnlich dem der $CD4^+$ Gedächtniszellen. Diese T_{CM} findet man vor allem im Blut, wo sie nach erneutem Antigen-Kontakt sofort ihre Effektorfunktionen ausüben können. $\gamma\delta$ - T_{naiv} und T_{CM} haben beide noch keine zytotoxischen Effektorfunktionen. T_{EM} und T_{EMRA} hingegen besitzen diese Effektorfunktionen und exprimieren die Rezeptoren CCR2, CCR5, CCR6 und CXCR3 zur Wahrnehmung inflammatorischer Chemokine. Besonders die terminal differenzierten $\gamma\delta$ T-Zellen befinden sich als zytotoxisch aktive Zellen in entzündeten Geweben [121]. Die Analyse der oben beschriebenen $\gamma\delta$ T-Zell-Subpopulationen im Blut von GPA-Patienten verglichen mit gesunden Kontrollen hat keine Unterschiede in der Verteilung der Zellen ergeben (Abb. 30). Die Verteilung von Subpopulationen aufgrund von CD45RA und CD27 innerhalb der verbliebenen $V\delta 2^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen im Blut der GPA-Patienten sind nicht mehr oder weniger differenziert als die im Blut der hier untersuchten gesunden Menschen. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass es nicht, wie zunächst vermutet, zu einer anhaltenden Aktivierung, darauffolgenden Differenzierung und anschließendem Absterben der terminal differenzierten

$\gamma\delta$ T-Zellen in den Patienten kommt. Diese Entwicklung kann also vermutlich nicht der Grund für den Rückgang der $V\delta 2^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen im Blut der GPA-Patienten sein.

Eine weitere Möglichkeit für die Reduktion der $V\delta 2^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen im Blut wäre die, dass die Zellen in die entzündeten Gewebe abwandern. Mit Hilfe von Frau Dr. Müller konnte gezeigt werden, dass sich in den granulomatösen Läsionen von GPA-Patienten $\gamma\delta$ T-Zellen nachweisen lassen. Bisher konnte aber noch nicht identifiziert werden, ob es sich bei diesen Zellen um $V\delta 1^+$ oder $V\delta 2^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen handelt. Da die Frequenz der $\gamma\delta$ T-Zellen in den Granulomen sehr gering war, scheint auch die Abwanderung dieser Zellen aus dem Blut in die entzündeten Gewebe nicht die Ursache für den Verlust der $V\delta 2^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen im Blut zu sein. Möglich wäre aber, dass die $\gamma\delta$ T-Zellen besonders zu Beginn einer Granulombildung in diesen Geweben vorliegen und zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme bereits weitgehend zurückgegangen waren.

Eine weitere Möglichkeit, wie es zu der Abnahme der $V\delta 2^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen kommen könnte, ist ein Effekt des Autoantigens in der GPA, der PR3. Erste vorläufige Ergebnisse nach Abschluss des experimentellen Teils der vorliegenden Arbeit haben in diesem Zusammenhang gezeigt, dass die enzymatisch aktive PR3 möglicherweise die Aktivierung von $\gamma\delta$ T-Zellen hat inhibiert (Daten nicht gezeigt). In weiteren Experimenten sollte daher eine genaue Analyse des Einflusses von PR3 auf $\gamma\delta$ T-Zellen erfolgen.

Unabhängig von der Reduktion der $V\delta 2^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen im Blut ist es von besonderem Interesse, dass $\gamma\delta$ T-Zellen in den granulomatösen Läsionen von GPA-Patienten nachgewiesen werden konnten (Abb. 33).

Es gibt viele mögliche Funktionen und Effekte, die in diesen Bereichen von den $\gamma\delta$ T-Zellen ausgeübt oder hervorgerufen werden könnten. In der bisherigen Hypothese zu der Frühpathogenese der GPA wird davon ausgegangen, dass es zu Beginn einer Erkrankung zu einer chronischen Besiedelung mit dem Erreger *S. aureus* kommt [108]. $\gamma\delta$ T-Zellen sind zum einen über ihre TLR dazu in der Lage auf bakterielle Infektionen zu reagieren und können außerdem durch Phosphoantigene wie IPP aktiviert werden [122, 85, 87]. Es wäre also denkbar, dass $\gamma\delta$ T-Zellen gleich zu Beginn an der Bekämpfung einer *S. aureus*-Besiedelung beteiligt sind. Anschließend wären die durch z.B. *S. aureus* aktivierten $\gamma\delta$ T-Zellen als erste Zellen dazu in der Lage Zytokine, wie z.B. $\text{TNF-}\alpha$, am Entzündungsort freizusetzen und könnten so zur Aktivierung von Neutrophilen führen. Weiterhin könnten $\gamma\delta$ T-Zellen durch ihre Fähigkeit zur Produktion des proinflammatorischen Zytokins IL-17 zu der

Entwicklung einer Entzündung beitragen [95]. Sie wären damit sozusagen Initiatoren der Entzündung und der daraus resultierenden Granulombildung und wären daher maßgeblich an der Frühpathogenese der GPA beteiligt (Abb. 34).

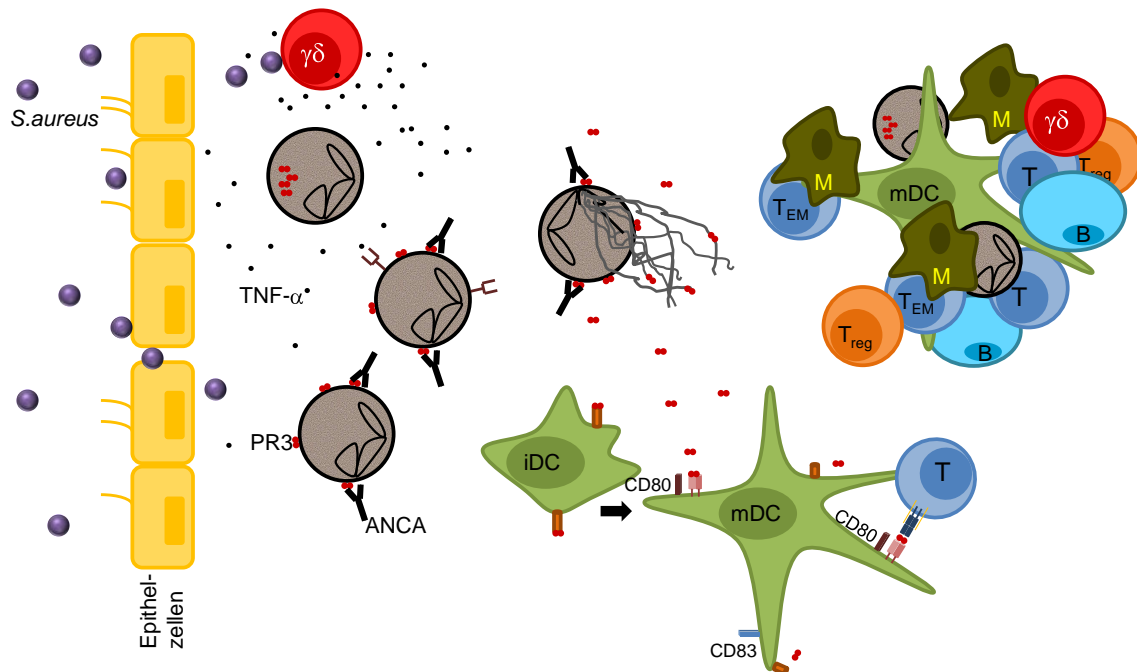


Abb. 34: Hypothese zur Frühpathogenese der GPA unter Einbezug von $\gamma\delta$ T-Zellen. Durch eine Barriestörung des respiratorischen Epithels kann es zu einer chronischen Besiedelung mit bakteriellen Erregern, wie z.B. *S. aureus*, kommen. Diese Infektion kann über die Aktivierung von $\gamma\delta$ T-Zellen zu einer Rekrutierung neutrophiler Granulozyten führen, welche nach Aktivierung den Inhalt ihrer Granula, u.a. PR3, freisetzen. Die PR3 induziert über den Rezeptor PAR-2 auf dendritischen Zellen deren Reifung. Die mDC können die PR3 dann als Antigen den T-Zellen präsentieren und damit eine Expansion von T_{EM} herbeiführen. Aus dieser ersten Ansammlung von Immunzellen entwickeln sich durch die Rekrutierung weiterer $\alpha\beta$ - und $\gamma\delta$ T-Zellen sowie B-Zellen, welche zur Produktion von ANCA angeregt werden, sog. ektopische lymphatische Strukturen – das Granulom.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass $NKG2D^+ CD4^+$ T-Zellen in GPA-Patienten mit einer generalisierten Erkrankung erhöht und durch die Anwesenheit von IL-15 zur Lyse von Endothelzellen fähig sind [123]. $V\delta 1^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen können ebenfalls die stressinduzierten Moleküle, wie z.B. MIC A/B, erkennen und dadurch aktiviert werden [84]. In den granulomatösen Läsionen von GPA-Patienten konnten Zellen nachgewiesen werden, die $NKG2D$ -Liganden exprimieren und dadurch auch $V\delta 1^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen aktivieren könnten [12]. Bei einer Vaskulitis werden die Endothelzellen der Gefäßwände massivem Stress ausgesetzt und würden dadurch für $\gamma\delta$ T-Zellen angreifbar. Es wäre also auch vorstellbar, dass die $\gamma\delta$ T-Zellen am Fortschreiten einer GPA-Erkrankung wesentlich beteiligt sind.

Im Rahmen der hier vorliegenden Dissertation war es trotz intensiver Bemühungen mit unterschiedlichen experimentellen Ansätzen nicht möglich PR3-spezifische T-Zelllinien oder PR3-reaktive T-Zellklone zu isolieren und zu analysieren. Der von anderen beschriebene Defekt regulatorischer T-Zellen bei GPA konnte ebenfalls nicht bestätigt werden. Es wurde aber erstmals eine Veränderung bei GPA-Patienten im Zusammenhang mit den bisher wenig untersuchten $\gamma\delta$ T-Zellen gefunden.

Da sich diese Zellen sowohl in den granulomatösen Geweben nachweisen lassen, als auch im Blut bei Patienten mit dieser systemischen Erkrankung auffällig verändert sind, scheint hier ein neuer, möglicherweise wichtiger Aspekt in Erscheinung getreten zu sein, der eventuell auch im Zusammenhang mit der Frühpathogenese der GPA von Bedeutung sein könnte.

7 Zusammenfassung

Die Autoimmunerkrankung Granulomatose mit Polyangiitis (GPA), früher bekannt als Wegener'sche Granulomatose, beginnt in den meisten Fällen mit Granulombildungen im oberen Respirationstrakt und führt im weiteren Verlauf zu einer Vaskulitis der kleineren Gefäße. Es kommt häufig zur Bildung von antineutrophilen zytoplasmatischen Autoantikörpern (ANCA) gegen das Autoantigen PR3. Da der Ursprung der Erkrankung bis heute nicht geklärt werden konnte, lag der Fokus dieser Arbeit auf der T-Zell-Dynamik im Zusammenhang mit der frühen Pathogenese der Krankheit.

Von anderen Gruppen wurden bereits PR3-reaktive T-Zellen beschrieben, deren intensive Charakterisierung bisher aufgrund ihrer geringen Frequenz nicht möglich war. Um PR3-reaktive T-Zellen näher charakterisieren zu können wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene Methoden zur Generierung dieser Autoantigen-spezifischen T-Zellen angewendet. Eine erfolgreiche Etablierung einer solchen T-Zelllinie war aber trotz intensiver Bemühungen nicht möglich.

Untersuchungen zu regulatorischen T-Zellen im Zusammenhang mit GPA ergaben im Unterschied zu publizierten Ergebnissen keine funktionellen Defizite dieser Zellen. Auch gegenüber den Autoantigen-spezifischen T-Zellen, sowohl bei GPA-Patienten als auch in gesunden Kontrollen, konnte keine gestörte oder verminderte Suppressivität der Treg auf die Proliferation von PR3-reaktiven T-Zellen festgestellt werden.

Weder zu den PR3-spezifischen noch zu den regulatorischen T-Zellen konnte im Rahmen dieser Arbeit eine Auffälligkeit gezeigt werden. Im Gegensatz dazu wurden erhebliche Unterschiede zwischen GPA-Patienten und Kontrollen im Hinblick auf $\gamma\delta$ T-Zellen festgestellt. Innerhalb der $\gamma\delta$ T-Zellen im peripheren Blut konnte ein signifikant verändertes Verhältnis der Untergruppen V δ 1 und V δ 2 bei GPA-Patienten gezeigt werden, beruhend auf einer signifikanten Abnahme der V δ 2⁺ $\gamma\delta$ T-Zellen bei GPA-Patienten. Dabei korrelierten die reduzierten V δ 2 Zellzahlen mit einer Abnahme der CD4⁺ T-Zellen. Die Ursache für den Verlust der V δ 2⁺ $\gamma\delta$ T-Zellen konnte aber nicht abschließend geklärt werden. Der Nachweis von $\gamma\delta$ T-Zellen in den granulomatösen Geweben von GPA-Patienten könnte einen Hinweis auf deren Beteiligung an der Frühpathogenese der GPA mit Granulombildung sein.

8 Summary

In most cases the autoimmune disease GPA (previously termed Wegener's granulomatosis) starts within the upper respiratory tract where granuloma formation takes place. Disease progression includes the development of vasculitis in the small vessels and the accumulation of antineutrophil cytoplasmic autoantibodies (ANCA) against the autoantigen pr3. Because the etiology of GPA is unknown, the present work was performed concentrating on the dynamics of T cells in the early pathogenesis of the disease.

T cells which are specific for the autoantigen pr3 have been previously described. Because of their very low frequencies in the blood, different methods for the generation of pr3 specific T cell lines were tested to better characterize these cells. However, despite strong efforts a successful development of such T cell lines was not possible

No functional deficiencies were found during the analysis of regulatory T cells in GPA. A diminished suppression regarding the proliferation of pr3 specific T cells could not be shown.

Within the present work no abnormalities concerning pr3 specific or regulatory T cells were found. However, substantial differences could be shown for the $\gamma\delta$ T cells from GPA patients compared to healthy donors. Within this small population of T cells, significantly changed ratios of the subpopulations V δ 1 and V δ 2 were found, which was attributed to a reduction in the absolute cell number of V δ 2⁺ $\gamma\delta$ T cells. The reduced numbers of V δ 2⁺ $\gamma\delta$ T cells also correlated with a decrease in the absolute cell counts of CD4⁺ T cells. The reason for the loss of those cells could not be completely determined. The detection of $\gamma\delta$ T cells in the granulomatous tissues of GPA patients could give a hint on their participation in the early pathogenesis of the disease.

9 Literaturverzeichnis

- [1] D. Chaplin, „Overview of the Immune Response,“ *J Allergy Clin Immunol*, Nr. 125(2 Suppl 2), pp. S3-23, 2010.
- [2] H. Klinger, „Grenzformen der Periarteriitis Nodosa,“ *Frankf. Z. Path.*, pp. 455-480, 1931.
- [3] F. Wegener, „Über generalisierte septische Gefäßerkrankungen,“ *Verh Deut Pathol Ges*, Nr. 29, pp. 202-210, 1936.
- [4] F. Wegener, „Über eine eigenartige rhinogene Granulomatose mit besonderer Beteiligung des Arteriensystems und der Niere,“ *Beitr Pathol Anat*, Nr. 102, pp. 30-68, 1939.
- [5] G. Godman und J. Churg, „Wegener's granulomatosis: pathology and review of the literature,“ *AMA Arch Pathol*, Nr. 58, pp. 533-553, 1954.
- [6] R. Falk, W. Gross, L. Guillevin, G. Hoffman, D. Jayne, C. Jennette, C. Kallenberg, R. Luqmani, A. Mahr, E. Matteson, P. Merkel, U. Specks und R. Watts, „Granulomatosis with polyangiitis (Wegener's): an alternative name for Wegener's granulomatosis,“ *Ann Rheum Dis*, Nr. 70, p. 704, 2011.
- [7] C. Jennette, R. Falk, K. Andrassy, P. Bacon, J. Churg, W. Gross, C. Hagen, G. Hoffman, G. Hunder, C. Kallenberg, R. McKlusky, R. Sinico, A. Rees, L. van Es, R. Waldherr und A. Wiik, „Nomenclature of systemic vasculitides,“ *Arthritis Rheum.*, Nr. 37, pp. 187-192, 1994.
- [8] K. Herlyn, B. Hellmich, W. Gross und E. Reinhold-Keller, „Stable Incidence of Systemic Vasculitides in Schleswig-Holstein, Germany,“ *Dtsch Ärztebl Int*, Nr. 108, pp. 355-361, 2008.
- [9] A. Mohammad, L. Jacobson, K. Westmann, G. Sturfelt und M. Segelmark, „Incidence and survival rates in Wegener's granulomatosis, microscopic polyangiitis, Churg–Strauss syndrome and polyarteritis nodosa,“ *Rheumatology*, Nr. 48, pp. 1560-1565, 2009.

- [10] B. Hellmich, O. Flossmann, W. Gross, P. Bacon, W. Cohen-Terveart, L. Guillevin, D. Jayne, A. Mahr, P. Merkel, H. Raspe, D. Scott, J. Witter, H. Yazici und R. Luqmani, „EULAR recommendations for conducting clinical studies and/or clinical trials in systemic vasculitis: focus on anti-neutrophilcytoplasm antibody-associated vasculitis,“ *Ann Rheum Dis*, Nr. 66, pp. 605-617, 2007.
- [11] C. Franssen, C. Stegeman, C. Kallenberg, R. Gans, P. De Jong, S. Hoorntje und J. Tervaert, „Antiproteinase 3- and antimyeloperoxidase associated vasculitis,“ *Kidney Int*, Nr. 57, pp. 2195-2206, 2000.
- [12] D. Capraru, A. Müller, E. Csernok, W. Gross, K. Holl-Ulrich, J. Northfield, P. Klenerman, K. Herlyn, J. Holle, S. Gottschlich, J. Voswinkel, T. Spies, U. Fagin, W. Jabs und P. Lamprecht, „Expansion of circulating NKG2D+ effector memory T-cells and expression of NKG2D-ligand MIC in granulomatous lesions in Wegener's granulomatosis,“ *Clin Immunol*, Nr. 127, pp. 144-150, 2008.
- [13] A. Müller, K. Holl-Ulrich, P. Lamprecht und W. Gross, „Germinal centre-like structures in Wegener's granulomatosis: the morphological basis for autoimmunity?,“ *Rheumatology*, Nr. 47, pp. 1111-1113, 2008.
- [14] J. Stone, M. Talor, J. Stebbing, M. Uhlfelder, N. Rose, K. Carson, D. Hellmann und C. Burek, „Test characteristics of immunofluorescence and ELISA tests in 856 consecutive patients with possible ANCA-associated conditions.,“ *Arthritis Care Res.*, Nr. 13, pp. 424-434, 2000.
- [15] E. Walton, „Giant-Cell granuloma of the respiratory tract (Wegener's Granulomatosis),“ *Br Med J*, Nr. 2, pp. 265-270, 1958.
- [16] P. Lamprecht und W. Gross, „Wegener's Granulomatosis,“ *Herz*, Nr. 29, pp. 47-56, 2004.
- [17] X. Bosch, A. Guilabert und J. Font, „Antineutrophil cytoplasmic antibodies,“ *Lancet*, Nr. 368, pp. 404-418, 2006.
- [18] J. Tervaert, F. van der Woude, A. Fauci, J. Ambrus, J. Velosa, W. Keane, S. Meijer, M. van der Geissen, T. The, G. van der Hem und C. Kallenberg, „Association Between Active Wegener's Granulomatosis and Anticytoplasmic Antibodies,“ *Arch Intern Med.*, Nr. 149, pp. 2461-2465, 1989.
- [19] M. Boomsma, C. Stegeman, M. van der Leij, W. Oost, J. Hermans, C. Kallenberg, P.

- Limburg und J. Tervaert, „Prediction of relapses in Wegener’s Granulomatosis by measurement of antineutrophil cytoplasmic antibody levels,“ *Arthritis Rheum*, Nr. 43, pp. 2025-2033, 2000.
- [20] J. Finkelmann, P. Merkel, D. Schroeder, G. Hoffman, R. Spiera, J. Davis Jr., W. McCune, A. Lears, S. Ytterberg, A. Hummel, M. Viss, T. Peikert, J. Stone und U. Specks, „Antiproteinase 3 Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies and Disease Activity in Wegener’s Granulomatosis,“ *Ann Intern Med.*, Nr. 147, pp. 611-619, 2007.
- [21] C. Savage, L. Harper und D. Adu, „Primary systemic vasculitis,“ *The Lancet*, Nr. 349, pp. 553-558, 1997.
- [22] E. Hagen, M. Daha, J. Hermans, K. Andrassy, E. Csernok, G. Gaskin, P. Lesavre, J. Lüdeman, N. Rasmussen, R. Sinico, A. Wiik und F. van der Woude, „Diagnostic value of standardized assays for anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in idiopathic systemic vasculitis,“ *Kidney Int*, Nr. 53, pp. 743-753, 1998.
- [23] D. Jayne, „Update on the European Vasculitis Study Group trials,“ *Curr Opin Rheumatol*, Nr. 13, pp. 48-55, 2001.
- [24] M. Heckmann, J. Holle, L. Arning, S. Knaup, B. Hellmich, M. Nothnagel, P. Jagiello, W. Gross, J. Epplen und S. Wiczorek, „The Wegener's granulomatosis quantitative trait locus on chromosome 6p21.3 as characterised by tagSNP genotyping.,“ *Ann Rheum Dis*, Nr. 67, pp. 972-979, 2008.
- [25] P. Jagiello, P. Aries, L. Arning, S. Wagenleiter, E. Csernok, B. Hellmich, W. Gross und J. Epplen, „The PTPN22 620W Allele Is a Risk Factor for Wegener’s Granulomatosis,“ *Arthritis Rheum*, Nr. 52, pp. 4039-4043, 2005.
- [26] M. Fanciulli, P. Northworthy, E. Petretto, R. Dong, L. Harper und L. Kamesh, „FCGR3B copy number variation is associated with susceptibility to systemic, but not organ-specific, autoimmunity,“ *Nat Genet*, Nr. 39, pp. 721-723, 2007.
- [27] J. Niles, R. McCluskey, M. Ahmad und M. Arnaout, „Wegener's granulomatosis autoantigen is a novel neutrophil serine proteinase,“ *Blood*, Nr. 74, pp. 1888-1893, 1989.
- [28] Y. van der Geld, P. Limburg und C. Kallenberg, „Proteinase 3, Wegener’s autoantigen: from gene to antigen,“ *J Leukoc Biol*, Nr. 69, pp. 177-190, 2001.
- [29] D. Novick, M. Rubinstein, T. Azam, A. Rabinkov, C. Dinarello und S. Kim, „Proteinase 3

- is an IL-32 binding protein," *Proc Natl Acad Sci U S A*, Nr. 103, pp. 3316-3321, 2006.
- [30] S. Sugawara, „Immune functions of proteinase 3," *Crit Rev Immunol*, Nr. 25, pp. 343-360, 2005.
- [31] L. Halbwachs-Mecarelli, G. Bessou, P. Lesavre, S. Lopez und V. Witko-Sarsat, „Bimodal distribution of proteinase 3 (PR3) surface expression reflects a constitutive heterogeneity in the polymorphonuclear neutrophil pool," *FEBS Letters*, Nr. 374, pp. 29-33, 1995.
- [32] W. Mayet, E. Csernok, C. Szymkowiak, W. Gross und K. Meyer, „Human Endothelial cells Express Proteinase 3, the target Antigen of Anticytoplasmic Antibodies Wegener's Granulomatosis," *Blood*, Nr. 82, pp. 1221-1229, 1993.
- [33] C. Stegeman, J. Terveart, W. Sluiter, W. Manson, P. de Jong und C. Kallenberg, „Association of chronic nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and higher relaps rates in Wegener granulomatosis," *Ann Intern Med*, Nr. 120, pp. 12-17, 1994.
- [34] M. Laudien, S. Gadola, R. Podschun, J. Hedderich, J. Paulsen, E. Reinhold-Keller, E. Csernok, P. Ambrosch, B. Hellmich, F. Moosig, W. Gross, H. Sahly und P. Lamprecht, „Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and endonasal activity in Wegener s granulomatosis as compared to rheumatoid arthritis and chronic Rhinosinusitis with nasal polyps.," *Clin Exp Rheumatol*, Nr. 28(1 Suppl 57), pp. 51-55, 2010.
- [35] K. Zycinska, K. Wardyn, Z. Zycinski und R. Smolarczyk, „Correlation between *Helicobacter pylori* infection and pulmonary Wegener's granulomacytosis activity.," *J Physiol Pharmacol*, Nr. 59(Suppl 6), pp. 845-851, 2008.
- [36] C. Stegeman, J. Tervaert, P. de Jong und C. Kallenberg, „Trimethoprim-sulfamethoxazole (co-trimoxazole) for the prevention of relapses of Wegener's granulomatosis. Dutch Co-Trimoxazole Wegener Study Group.," *N Engl J Med*, Nr. 335, pp. 16-20, 1996.
- [37] K. Zycinska, K. Wardyn, T. Zielonka, R. Krupa und W. Lukas, „Co-trimoxazole and prevention of relapses of PR3-ANCA positive vasculitis with pulmonary involvement.," *Eur J Med Res*, Nr. 14(Suppl 4), pp. 265-267.
- [38] S. Ullrich, H. Gustek, P. Lamprecht, W. Gross, U. Schumacher, P. Ambrosch und M. Laudien, „Severe impaired respiratory ciliary function in Wegener granulomatosis.," *Ann Rheum Dis*, Nr. 68, pp. 1067-1071, 2009.

- [39] A. Rarok, P. Limburg und C. Kallenberg, „Neutrophil-activating potential of antineutrophil cytoplasm antibodies,“ *J Leukoc Biol*, Nr. 73, pp. 3-15, 2003.
- [40] A. Porges, P. Redecha, W. Kimberly, E. Csernok, W. Gross und R. Kimberly, „Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies engage and activate human neutrophils via Fc gamma RIla,“ *J Immunol*, Nr. 153, pp. 1271-1280, 1994.
- [41] V. Witko-Sarsat, P. Lesavre, S. Lopez, B. G., C. Hielbot und B. Prum, „A large subset of neutrophils expressing membrane proteinase 3 is a risk factor for vasculitis and rheumatoid arthritis,“ *J Am Soc Nephrol*, Nr. 10, pp. 1224-1233, 1999.
- [42] A. Rarok, C. Stegeman, P. Limburg und C. Kallenberg, „Neutrophil membrane expression of proteinase 3 (PR3) is related to relaps in PR3-ANCA associated vasculitis,“ *J Am Soc Nephrol*, Nr. 13, pp. 22320-22328, 2002.
- [43] K. Kessenbrock, M. Krumbholz, U. Schönermarck, W. Back, W. Gross, Z. Werb, H.-J. Gröne, V. Brinkmann und D. Jenne, „Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis,“ *Nat Med*, Nr. 15, pp. 623-625, 2009.
- [44] C. Savage, B. Pottinger, G. Gaskin, C. Pusey und J. Pearson, „Autoantibodies developing to MPO and PR3 in systemic vasculitis stimulate neutrophil cytotoxicity towards endothelial cells,“ *Am J Pathol*, Nr. 141, pp. 335-342, 1992.
- [45] E. Csernok, A. MaiXing, W. Gross, D. Wicklein, A. Petersen, B. Lindner, P. Lamprecht, J. Holle und B. Hellmich, „Wegener autoantigen induces maturation of dendritic cells and licenses them for Th1 priming via the protease-activated receptor-2 pathway,“ *Blood*, Nr. 107, pp. 4440-4448, 2006.
- [46] E. Hagen, R. de Keizer, K. Andrassy, W. van Boven, J. Bruijn, L. van Es und F. van der Woude, „Compassionate treatment of Wegener’s granulomatosis with rabbit anti-thymocyte globulin.,“ *Clin Nephrol*, Nr. 43, pp. 351-359, 1995.
- [47] G. Gephard, M. Ahmad und R. Tubbs, „Pulmonary vasculitis (Wegener’s granulomatosis). Immunohistochemical study of T and B cell markers,“ *Am J Med*, Nr. 74, pp. 700-704, 1983.
- [48] E. Popa, C. Franssen, P. Limburg, M. Huitema, C. Kallenberg und J. Tervaert, „In vitro cytokine production and proliferation of T cells from patients with anti-proteinase 3- and antimyeloperoxidase-associated vasculitis, in response to proteinase 3 and myeloperoxidase,“ *Arthritis Rheum*, Nr. 46, pp. 1894-1904, 2002.

- [49] J. Winek, A. Müller, E. Csernok, W. Gross und P. Lamprecht, „Frequency of proteinase 3 (PR3)-specific autoreactive T cells determined by cytokine flow cytometry in Wegener's granulomatosis,“ *J Autoimmun*, Nr. 22, pp. 79-85, 2004.
- [50] S. Marinaki, I. Neumann, A. Kalsch, P. Grimminger, A. Breedijk, R. Birck, W. Schmitt, R. Waldherr, B. Yard und F. Van der Woude, „Abnormalities of CD4+ T cell populations in ANCA-associated vasculitis,“ *Clin Exp Immunol*, Nr. 140, pp. 181-191, 2005.
- [51] C. Iking-Konert, T. Vogl, B. Prior, C. Wagner, O. Sander, E. Bleck, B. Ostendorf, M. Schneider, K. Andrassy und G. Hänsch, „T lymphocytes in patients with primary vasculitis: expansion of CD8+ T cells with the propensity to activate polymorphonuclear neutrophils,“ *Rheumatology*, Nr. 47, pp. 609-616, 2008.
- [52] W. Abdulahad, Y. van der Geld, C. Stegeman und C. Kallenberg, „Persistent expansion of CD4+ effector memory T cells in Wegener's granulomatosis,“ *Kidney Int*, Nr. 70, pp. 938-947, 2006.
- [53] A. Komosci, P. Lamprecht, E. Csernok, A. Müller, K. Holl-Ulrich, U. Seitzer, F. Moosig, S. A. und W. Gross, „Peripheral blood and granuloma CD4(+)CD28(-) T cells are a major source of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha in Wegener's granulomatosis.,“ *Am J Pathol*, Nr. 160, pp. 1717-1724, 2002.
- [54] V. Appay, „The physiological role of cytotoxic CD4(+) T-cells: the holy grail?,“ *Clin Exp Immunol*, Nr. 138, pp. 10-13, 2004.
- [55] S. Vogt, C. Iking-Konert, F. Hug, K. Andrassy und G. Hänsch, „Shortening of telomeres: Evidence for replicative senescence of T cells derived from patients with Wegener's granulomatosis.,“ *Kidney Int*, Nr. 63, pp. 2144-2151, 2003.
- [56] W. Abdulahad, C. Kallenberg, P. Limburg und C. Stegeman, „Urinary CD4+ effector memory T cells reflect disease activity in antineutrophil cytoplasmic antibody associated vasculitis,“ *Arthritis Rheum*, Nr. 60, pp. 2830-2838, 2009.
- [57] W. Abdulahad, P. Lamprecht und C. Kallenberg, „T-helper-cells as new players in ANCA-associated vasculitides,“ *Arthritis Res Ther*, Nr. 13, p. 236, 2011.
- [58] A. Kozłowska, P. Hrycaj, J. Lacki und P. Jagodziński, „Perforin level in CD4+ T cells from patients with systemic lupus erythematosus,“ *Rheumatol Int*, Nr. 30, pp. 1627-1633, 2010.
- [59] F. Moosig, E. Csernok, G. Wang und W. Gross, „Costimulatory molecules in Wegener's

- granulomatosis (WG): lack of expression of CD28 and preferential up-regulation of its ligands B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) on T cells.," *Clin Exp Immunol*, Nr. 114, pp. 113-118, 1998.
- [60] E. Csernok, A. Trabant, A. Müller, G. Wang, F. Moosig, J. Paulsen, A. Schnabel und W. Gross, „Cytokine profiles in Wegener's granulomatosis: predominance of type 1 (Th1) in the granulomatous inflammation.," *Arthritis Rheum*, Nr. 42, pp. 742-750, 1999.
- [61] W. Abdulahad, C. Stegeman und C. Kallenberg, „Review article: The role of CD4(+) T cells in ANCA-associated systemic vasculitis.," *Nephrology*, Nr. 14, pp. 26-32, 2009.
- [62] U. Schonermarck, E. Csernok, A. Trabant, H. Hansen und W. Gross, „Circulating cytokines and soluble CD23, CD26 and CD30 in ANCA-associated vasculitides.," *Clin Exp Rheumatol*, Nr. 18, pp. 457-463, 2000.
- [63] G. Wang, H. Hansen, E. Tatsis, E. Csernok, H. Lemke und W. Gross, „High plasma levels of the soluble form of CD30 activation molecule reflect disease activity in patients with Wegener's granulomatosis.," *Am J Med*, Nr. 102, pp. 517-523, 1997.
- [64] P. Lamprecht, H. Bruhl, A. Erdmann, K. Holl-Ulrich, E. Csernok, U. Seitzer, M. Mack, A. Feller, E. Reinhold-Keller, W. Gross und A. Müller, „Differences in CCR5 expression on peripheral blood CD4+CD28- T-cells and in granulomatous lesions between localized and generalized Wegener's granulomatosis.," *Clin Immunol*, Nr. 108, pp. 1-7, 2003.
- [65] J. Sanders, S. C.A. und C. Kallenberg, „The Th1 and Th2 paradigm in ANCA-associated vasculitis.," *Kidney Blood Press Res*, Nr. 26, pp. 215-220, 2003.
- [66] W. Abdulahad, C. Stegeman, P. Limburg und C. Kallenberg, „Skewed distribution of Th17 lymphocytes in patients with Wegener's granulomatosis in remission.," *Arthritis Rheum*, Nr. 58, pp. 2196-2205, 2008.
- [67] Z. Hruskova, Z. Rihova, H. Mareckova, E. Jancova, R. Rysava, J. Zavada, M. Merta, T. Löster und V. Tesar, „Intracellular cytokine production in ANCA-associated vasculitis: low levels of interleukin-10 in remission are associated with a higher relapse rate in the long-term follow-up.," *Arch Med Res*, Nr. 40, pp. 276-284, 2009.
- [68] S. Hori, T. Nomura und S. Sakagushi, „Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3.," *Science*, Nr. 299, pp. 1057-1061, 2003.
- [69] M. Curotto de Lafaille und J. Lafaille, „Natural and Adaptive Foxp3+ Regulatory T Cells: More of the Same or a Division of Labor?," *Immunity*, Nr. 30, pp. 626-635, 2009.

- [70] J. Wang, A. Ioan-Facsinay, E. van der Voort, T. Huizinga und R. Toes, „Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells.“ *Eur J Immunol*, Nr. 37, pp. 129-138, 2007.
- [71] V. Vigliette, C. Baecher-Allan, H. Weiner und D. Hafler, „Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis.“ *J Exp Med*, Nr. 199, pp. 971-979, 2004.
- [72] M. Ehrenstein, J. Evans, A. Singh, S. Moore, G. Warnes, D. Isenberg und C. Mauri, „Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy.“ *J Exp Med*, Nr. 200, pp. 277-285, 2004.
- [73] W. Abdulahad, C. Stegeman, Y. van der Geld, B. Doornbos-van der Meer, P. Limburg und C. Kallenberg, „Functional defect of circulating regulatory CD4+ T cells in patients with Wegener's granulomatosis in remission.“ *Arthritis Rheum*, Nr. 56, pp. 2080-2091, 2007.
- [74] S. Klapa, A. Müller, E. Csernok, U. Fagin, P. Klenerman, K. Holl-Ulrich, W. Gross und P. Lamprecht, „Lower numbers of FoxP3 and CCR4 co-expressing cells in an elevated subpopulation of CD4+CD25high regulatory T cells from Wegener's granulomatosis.“ *Clin Exp Rheumatol*, Nr. 28(1 Suppl 57), pp. 72-80, 2010.
- [75] M. Morgan, C. Day, K. Piper, N. Khan, L. Harper, P. Moss und C. Savage, „Patients with Wegener's granulomatosis demonstrate a relative deficiency and functional impairment of T-regulatory cells.“ *Immunology*, Nr. 130, pp. 64-73, 2010.
- [76] E. Nogueira, S. Hamour, D. Sawant, S. Henderson, N. Mansfield, K. Chavele, C. Pusey und A. Salama, „Serum IL-17 and IL-23 levels and autoantigen-specific Th17 cells are elevated in patients with ANCA-associated vasculitis.“ *Nephrol Dial Transplant*, Nr. 25, pp. 2209-2217, 2010.
- [77] A. Hayday, „[gamma][delta] cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection.“ *Annu Rev Immunol*, Nr. 18, pp. 975-1026, 2000.
- [78] D. Kabelitz, L. Marischen, H. Oberg, W. Holtmeier und D. Wesch, „Epithelial defence by gammadelta T cells.“ *Int Arch Allergy Immunol*, Nr. 137, pp. 73-81, 2005.
- [79] S. Schondelmeier, D. Wesch, K. Pechhold und D. Kabelitz, „Vgamma gene usage in peripheral blood gammadelta T cells.“ *Immunol Lett*, Nr. 38, pp. 121-126, 1993.
- [80] T. Hinz, D. Wesch, F. Halary, S. Marx, A. CHoudhary, B. Arden, O. Janssen, M.

- Bonneville und D. Kabelitz, „Identification of the complete expressed human TCR Vgamma repertoire by flow cytometry,“ *Intern Immunol*, Nr. 9, pp. 1065-1072, 1997.
- [81] C. Parker, V. Groh, H. Band, S. Porcelli, C. Motita, M. Fabbi, D. Glass, J. Strominger und M. Brenner, „Evidence for extrathymic changes in the T cell receptor gamma/delta repertoire,“ *J Exp Med*, Nr. 171, pp. 1597-1612, 1990.
- [82] N. Caccamo, F. Dieli, D. Wesch, H. Jomaa und M. Eberl, „Sex-specific phenotypical and functional differences in peripheral human Vgamma9/Vdelta2 T cells,“ *J Leukoc Biol*, Nr. 79, pp. 663-666, 2006.
- [83] S. Chiplunkar, S. Dhar, D. Wesch und D. Kabelitz, „Gammadelta T cells in immunotherapy: current status and future prospects,“ *Immunotherapy*, Nr. 1, pp. 663-678, 2009.
- [84] V. Groh, A. Steinle, S. Bauer und T. Spies, „Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal gammadelta T cells,“ *Science*, Nr. 279, pp. 1737-1740, 1998.
- [85] P. Constant, F. Davodeau, M. Peyrat, Y. Poquet, G. Puzo, M. Bonneville und J. Furnié, „Stimulation of human gamma delta T cells by nonpeptidic mycobacterial ligands,“ *Science*, Nr. 264, pp. 267-270, 1994.
- [86] V. Kunzmann, E. Bauer, J. Feurle, F. Weißinger, H. Tony und M. Wilhelm, „Stimulation of gammadelta T cells by aminobisphosphonates and induction of antiplasma cell activity in multiple myeloma,“ *Blood*, Nr. 96, pp. 384-392.
- [87] Y. Tanaka, S. Sano, E. Nieves, G. De Libero, D. Rosa, R. Modlin, M. Brenner, B. Bloom und C. Morita, „Nonpeptide ligands for human gammadelta T cells,“ *PNAS*, Nr. USA 91, pp. 8175-8179, 1994.
- [88] W. Hunter, „The non-mevalonate pathway of isoprenoid precursor biosynthesis,“ *J Biol Chem*, Nr. 282, pp. 21573-21577, 2007.
- [89] D. Kabelitz, „Small molecules for the activation of human gammadelta T cell responses against infection,“ *Recent Pat Antiinfect Drug Discov.*, Nr. 3, pp. 1-9, 2008.
- [90] H. Grober, M. Kistowska, L. Angman, P. Jenö, L. Mori und G. De Libero, „Human T cell receptor gammadelta cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells,“ *J Exp Med*, Nr. 197, pp. 163-168, 2003.
- [91] E. Espinosa, C. Belmants, F. Pont, B. Luciani, R. Poupot, F. Romagné, H. Brailly, M.

- Bonneville und J. Fournie, „Chemical Synthesis and Biological Activity of Bromohydrin Pyrophosphate, a Potent Stimulator of Human $\gamma\delta$ T Cells,“ *J Biol Chem*, Nr. 276, pp. 18337-18344, 2001.
- [92] D. Wesch, S. Marx und D. Kabelitz, „Comparative analysis of alpha beta and gamma delta T cell activation by Mycobacterium tuberculosis and isopentenyl pyrophosphate,“ *Eur J Immunol*, Nr. 27, pp. 952-956, 1997.
- [93] D. Wesch, A. Glatzel und D. Kabelitz, „Differentiation of resting human peripheral blood gammadelta T cells toward Th1- or Th2-phenotype,“ *Cell Immunol*, Nr. 212, pp. 110-117, 2001.
- [94] B. Martin, K. Hirota, D. Cua, B. Stockinger und M. Veldhoen, „Interleukin-17-producing gammadelta T cells selectively expand in response to pathogen products and environmental signals,“ *Immunity*, Nr. 31, pp. 321-30, 2009.
- [95] C. Sutton, S. Lalor, C. Sweeney, C. Brereton, E. Lavelle und K. Mills, „Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity,“ *Immunity*, Nr. 31, pp. 331-41, 2009.
- [96] R. Casetti, C. Agrati, M. Wallace, A. Sacchi, F. Martini, A. Martino, A. Rinaldi und M. Malkovski, „Cutting edge: TGF-beta1 and IL-15 Induce FOXP3+ gammadelta regulatory T cells in the presence of antigen stimulation,“ *J Immunol*, Nr. 183, p. 3574–3577, 2009.
- [97] M. Traxlmayr, D. Wesch, A. Dohnal, P. Funovics, M. Fischer, D. Kabelitz und T. Felzmann, „Immune suppression by gammadelta T-cells as a potential regulatory mechanism after cancer vaccination with IL-12 secreting dendritic cells,“ *J Immunother*, Nr. 33, pp. 40-52, 2010.
- [98] X. Li, N. Kang, X. Zhang, X. Dong, W. Wei, L. Cui, D. Ba und W. He, „Generation of human regulatory gammadelta T cells by TCRgammadelta stimulation in the presence of TGFbeta and their involvement in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus,“ *J Immunol*, Nr. 186, pp. 6693-6700, 2011.
- [99] J. Oliaro, S. Dudal, J. Liautard, J. Andrault und V. Lafont, „Vgamma9Vdelta2 T cells use a combination of mechanisms to limit the spread of the pathogenic bacteria Brucella,“ *J Leukoc Biol.*, Nr. 77, pp. 652-60, 2005.
- [100] P. Wrobel, H. Shojaei, B. Schitteck, F. Gieseler, B. Wollenberg, H. Kalthoff, D. Kabelitz

- und D. Wesch, „Lysis of a broad range of epithelial tumour cells by human gamma delta T cells: involvement of NKG2D ligands and T-cell receptor- versus NKG2D-dependent recognition.“ *Scand. J. Immunol*, Nr. 66, pp. 320-328, 2007.
- [101] D. Wesch, S. Beetz, H. Oberg, M. Marget, K. Krengel und D. Kabelitz, „Direct costimulatory effect of TLR3 ligand poly(I:C) on human gamma delta T lymphocytes.“ *J Immunol*, Nr. 176, pp. 1348-54, 2006.
- [102] M. Brandes, K. Willimann und B. Moser, „Professional antigen-presentation function by human gammadelta T Cells.“ *Science*, Nr. 309, pp. 264-268, 2005.
- [103] N. Yamashita, H. Kaneoka, S. Kaneko, M. Takeno, K. Oneda, H. Koizumi, M. Koquire, G. Inaba und T. Sakane, „Role of gammadelta T lymphocytes in the development of Behçet's disease.“ *Clin Exp Immunol*, Nr. 107, pp. 241-247, 1997.
- [104] A. Accardo-Palumbo, A. Ferrante, M. Cadelo, F. Ciccia, G. Parrinello, L. Lipari, A. Gardina, M. Riili, E. Gardina, F. Dieli und G. Triolo, „The level of soluble Granzyme A is elevated in the plasma and in the Vgamma9/Vdelta2 T cell culture supernatants of patients with active Behçet's disease.“ *Clin Exp Rheumatol*, Nr. 22(Suppl. 34), pp. S45-49, 2004.
- [105] H. Yasuoka, Y. Yamaguchi, N. Mizuki, T. Nishida, Y. Kawakami und M. Kuwana, „Preferential activation of circulating CD8+ gammadelta T cells in patients with Behçet's disease and HLA-B51.“ *Clin Exp Rheumatol*, Nr. 26 (Suppl. 50), pp. S59-63, 2008.
- [106] S. Chauhan, N. Tripathy, N. Sinha und S. Nityanand, „T cell receptor repertoire of circulating gammadelta T-cells in Takayasu's arteritis.“ *Clin Immunol*, Nr. 118, pp. 243-249, 2006.
- [107] C. Holmen, E. Elsheikh, M. Christensson, J. Liu, A. Johansson, A. Qureshi, S. Jalkanen und S. Sumitran-Holgersson, „Anti endothelial cell autoantibodies selectively activate SAPK/JNK signalling in Wegener's granulomatosis.“ *J AmSoc Nephrol*, Nr. 18, pp. 2497-2508, 2007.
- [108] P. Lamprecht, E. Csernok und W. Gross, „Effector memory T cells as driving force of granuloma formation and autoimmunity in Wegener's granulomatosis.“ *J Int Med*, Nr. 260, pp. 187-191, 2006.
- [109] A. Heiser, P. Dahm, D. Yancey, M. Maurice, D. Boczkowski, S. Nair, E. Gilboa und J.

- Vieweg, „Human Dendritic Cells Transfected with RNA Encoding Prostate-Specific Antigen Stimulate Prostate-Specific CTL Responses In Vitro,“ *J Immunol*, Nr. 164, pp. 5508-5514, 2000.
- [110] S. Jarnjak-Jankovic, S. Sæbøe-Larsen, G. Kvalheim und G. Gaudernack, „mRNA transfection of DC in the immature or mature state: comparable in vitro priming of Th and cytotoxic T lymphocytes against DC electroporated with tumor cell line-derived mRNA,“ *Cytotherapy*, Nr. 9, pp. 587-592, 2007.
- [111] H. Fujiwara, J. Melenhorst, F. EL Ouriaghli, S. Kajigaya, M. Grube, G. Sconocchia, K. Rezvani, D. Price, N. Hensel, D. Douek und A. Barrett, „In vitro Induction of Myeloid Leukemia -Specific CD4 and CD8 TCells by CD40 Ligand-Activated B Cells GeneModified to Express Primary Granule Proteins,“ *Clin Cancer Res*, Nr. 11, pp. 4495-4503, 2005.
- [112] L. Li, D. Zhang, K. Zhou, A. Cartman, J. Leroux, A. Poole und Y. Zhang, „Isolation and characteristics of autoreactive T cells specific to aggrecan G1 domain from rheumatoid arthritis patients,“ *Cell Research*, Nr. 10, pp. 39-49, 2000.
- [113] M. Piesche, Y. Hildebrandt, B. Chapuy, G. Wulf, L. Trümper und R. Schroers, „Characterization of HLA-DR-restricted T-cell epitopes derived from human proteinase 3,“ *Vaccine*, Nr. 27, pp. 4718-4723, 2009.
- [114] B. Korkmaz, T. Moreau und F. Gauthier, „Neutrophil elastase, proteinase 3 and cathepsin G: Physiochemical properties, activity and physiological functions,“ *Biochimie*, Nr. 90, pp. 227-242, 2008.
- [115] K. Chavele, D. Shukla, T. Ketepe-Arachi, J. Seidel, D. Fuchs, C. Pusey und A. Salama, „Regulation of Myeloperoxidase-Specific T Cell Responses During Disease Remission in Antineutrophil Cytoplasmic Antibody-Associated Vasculitis,“ *Arthritis Rheum*, Nr. 62, pp. 1539-1548, 2010.
- [116] „ D. Kabelitz, J. Fazio, S. Adam-Klages, M. Marget, H. Oberg, D. Wesch und P. Lamprecht, „Gammadelta T-cells: Basic features and potential role in vasculitis,“ *Clin Exp Rheum*, Nr. 28 (Suppl. 57), pp. S104-S109, 2010.
- [117] F. Pocchia, S. Boullier, H. Lecoeur, M. Cochet, Y. Poquet, V. Colizzi, J. Fournie und M. Gougeon, „Peripheral V γ 9/V δ 2 T Cell Deletion and Anergy to Non-peptidic Mycobacterial Antigens in Asymptomatic HIV-1 -Infected Persons,“ *J Immunol*, Nr. 157, pp. 449-461, 1996.

- [118] D. Wesch, D. Kabelitz, K. Friese und K. Pechhold, „Mycobacteria-reactive gammadelta T cells in HIV-infected individuals: lack of Vgamma9 cell responsiveness is due to deficiency of antigen-specific CD4 T helper type 1 cells,“ *Eur J Immunol*, Nr. 26, pp. 557-562, 1996.
- [119] O. Janssen, S. Wesselborg, B. Heckl-Östreicher, K. Pechhold, A. Bender, S. Schondelmaier, G. Moldenhauer und D. Kabelitz, „T cell receptor/CD3-signaling induces death by apoptosis in human T cell receptor gamma delta + T cells,“ *J Immunol*, Nr. 146, pp. 35-39, 1991.
- [120] F. Dieli, F. Poccia, M. Lipp, G. Sireci, N. Caccamo, C. Di Sano und A. Salerno, „Differentiation of Effector/Memory Vdelta2 T Cells and Migratory Routes in Lymph Nodes or Inflammatory Sites,“ *J Exp Med*, Nr. 198, pp. 391-397, 2003.
- [121] L. Battistini, N. Caccamo, G. Borsellino, S. Meraviglia, D. Angelini, F. Dieli, M. Cencioni und A. Salerno, „Homing and memory patterns of human gammadelta T cells in physiological situations,“ *Microbes and Infection*, Nr. 7, pp. 510-517, 2005.
- [122] D. Wesch, C. Peters, H. Oberg, K. Pietschmann und D. Kabelitz, „Modulation of gammadelta T cell responses by TLR ligands,“ *Cell Mol Life Sci*, Nr. 68, pp. 2357-2370, 2011.
- [123] M. de Menthon, M. Lambert, E. Guiard, S. Tognarelli, B. Bienvenu, A. Karras, L. Guillevin und S. Caillat-Zucman, *Arthritis Rheum*, Nr. 63, pp. 2116-2126, 2011.

10 Anhang

10.1 Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Professor Dr. Dieter Kabelitz für die Möglichkeit bedanken, die vorliegende Arbeit am Institut für Immunologie durchzuführen, sowie für die hervorragende Betreuung. Ganz besonders dankbar bin ich Herrn Professor Kabelitz für den Rückhalt und die Sicherheit, die mir stets vermittelt wurden.

Ich bedanke mich besonders bei Herrn Professor Dr. Dr. Thomas Bosch für die freundliche Übernahme der Betreuung und des Referates meiner Arbeit vor der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel und den damit verbundenen Mühen.

Den Mitgliedern der KFO 170, insbesondere Herrn Professor Dr. Peter Lamprecht, Frau Dr. Elena Csernok und Frau Dr. Antje Müller, möchte ich herzlich für die gute Zusammenarbeit danken.

Frau Professor Dr. Sabine Adam und Frau Privatdozentin Dr. Daniela Wesch danke ich vielmals für die großartige Betreuung meiner Doktorarbeit und dem hilfreichen Beistand in allen Lebenslagen.

Frau Dr. Shirin Kalyan danke ich für die Hilfe mit der Statistik.

Ina, Hoa, Sandra, Moni, Parvin und Gudrun möchte ich für die Unterstützung, Hilfsbereitschaft und Freundlichkeit danken, die meine Arbeit hier so erleichtert und bereichert haben.

Vielen lieben Dank an meine aktuellen und ehemaligen Doktorandenkollegen Pit, Tim, Lothar, Maren, Anja, Susann, Jette, und Bärbel für die Hilfsbereitschaft, für anregende Diskussionen und eine sehr schöne Zeit. Alyn und Melanie danke ich nicht nur für die andauernde Unterstützung und den technischen Beistand während der Erstellung dieser Arbeit, sondern besonders für die entstandene Freundschaft.

Ich möchte mich bei allen Mitgliedern des Instituts für Immunologie, einschließlich der hier nicht genannten, für die stete Unterstützung und Fürsorge bedanken. Mein herzlicher Dank gilt auch besonders Heike, Iwi, Birgit und Susanne, die mir während besonders schwerer Zeiten immer tatkräftig unter die Arme gegriffen haben.

Meiner Familie und meinen Freunden möchte ich ganz herzlich dafür danken, dass sie mich auch in trostlosen und frustrierenden Phasen nicht allein gelassen haben, sondern mich immer und in allen Belangen aufopferungsvoll unterstützt haben.

10.2 Curriculum vitae

Name: Juliane Fazio
Anschrift: Beselerallee 37
24105 Kiel
Geburtsdatum: 04.06.1982
Geburtsort: Bad Oeynhausen
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Ausbildung

08/1992 bis 06/2002 Städtisches Gymnasium Löhne
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

10/2002 bis 03/2008 Studium der Biologie, Universität Bielefeld
Schwerpunkte: Zell- und Entwicklungsbiologie,
Genetik und Tierphysiologie

12/2006 bis 01/2008 Diplomarbeit an der Universität Bielefeld in der
Arbeitsgruppe Biochemische Zellbiologie bei
Herrn Prof. Dr. Horst Hinssen zum Thema
„Identifizierung und Charakterisierung von Vinculin und
Vinculin-verwandten Proteinen aus Invertebraten und
niederen Vertebraten.“

seit 05/2008 Erstellung einer Doktorarbeit am
Institut für Immunologie, Universitätsklinikum Schleswig-
Holstein, Campus Kiel

Publikationsliste

Fagin U, Csernok E, Müller A, Pitann S, **Fazio J**, Krause K, Bremer P, Wipfler-Freissmuth E, Moosig F, Gross WL, Lamprecht P. "Distinct proteinase 3-induced cytokine patterns in Wegener's granulomatosis, Churg-Strauss syndrome, and healthy controls." Clin Exp Rheumatol. 2011 Jan-Feb; 29(1 Suppl 64):S57-62.

Ussat S, Scherer G, **Fazio J**, Beetz S, Kabelitz D, Adam-Klages S. "Human NK cells require caspases for activation-induced proliferation and cytokine release but not for cytotoxicity." Scand J Immunol. 2010 Nov; 72(5):388-95

Kabelitz D, **Fazio J**, Adam-Klages S, Marget M, Oberg HH, Wesch D, Lamprecht P. "gammadelta T-cells: basic features and potential role in vasculitis." Clin Exp Rheumatol. 2010 Jan-Feb; 28 (Suppl 57):104-9.

Fazio J, Quabius E.S, Müller A, Kalyan A, Adam-Klages S, Wesch D, Lamprecht P, Kabelitz D "V δ 2 T cell deficiency in granulomatosis with polyangiitis (Wegener's granulomatosis)." in Vorbereitung

Kongressbeiträge

Fazio J, Adam-Klages S, Wesch D, Müller A, Lamprecht P, Kabelitz D. „Gammadelta T cells in Granulomatosis with Polyangiitis“
5th International Gammadelta T cell conference, Freiburg 2012

Fazio J, Adam-Klages S, Wesch D, Lamprecht P, Kabelitz D. „Characterization of various T cell subsets in Wegener's Granulomatosis“
2011 Joint Annual Meeting SIICA – DGfI, Riccione 2011

Fazio J, Adam-Klages S, Wesch D, Peters C, Kabelitz D. "Characterization of T cell subsets potentially contributing to the development of Wegener's Granulomatosis"
33rd symposium of the North-German Immunologists, Borstel 2010

Fazio J, Adam-Klages S, Wesch D, Kabelitz D. "Generation and Characterization of PR3-specific CD4+ T cells", 6th Spring School on immunology, Ettal 2010

10.3 Erklärung

Hiermit erkläre ich gemäß § 9 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, dass ich die vorliegende Arbeit unter der wissenschaftlichen Leitung von Prof. Dr. Dieter Kabelitz selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Weiterhin habe ich keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den verwendeten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht. Die vorliegende Arbeit entstand unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Ein Teil dieser Dissertation wurde bei einer Fachzeitschrift zur Veröffentlichung eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher keiner anderen Universität zur Begutachtung vorgelegt.

Kiel, den

Juliane Fazio