

**Aus der Orthopädischen Universitätsklinik Tübingen  
Abteilung Technische Orthopädie mit Biomechanik  
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. N. Wülker**

**Vergleichende Untersuchungen zur Aktivierung der  
Interleukin 16-Expression in T-Lymphozyten**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Corinna Yvonne Volk**

**aus**

**Stuttgart**

**2008**

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. W. Aicher

2. Berichterstatter:

Frau Professor Dr. R. Klein

**gewidmet  
meinen Eltern**

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Rheumatoide Arthritis .....	1
1.1.1	Epidemiologie und Ätiologie .....	1
1.1.2	Pathogenese .....	2
1.1.3	Klinik und Diagnosestellung .....	3
1.1.4	Extraartikuläre Manifestationen .....	5
1.2	Zytokine .....	5
1.2.1	Interleukin-16 .....	7
1.2.2	Interleukin-16 bei rheumatoider Arthritis .....	8
1.2.3	IL-16-Transkription in Fibroblasten von RA-Patienten .....	10
1.3	Fragestellung und Zielsetzung .....	11
1.4	T-Lymphozytenkultur .....	12
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>13</b>
2.1	Material .....	13
2.1.1	Apparate und Instrumente des Labors .....	13
2.1.2	Chemikalien .....	15
2.1.3	Primer-Sequenzen .....	18
2.1.4	Antikörper .....	19
2.1.5	Humane PBMC aus Vollblut .....	19
2.2	Methoden .....	20
2.2.1	Studienaufbau .....	20
2.2.2	Zellkultur .....	21
2.2.3	Kryokonservierung .....	24
2.2.4	Bestimmung der Zellzahl .....	25
2.2.5	Inkubation der T-Zellen mit Pharmaka/ biogenen Aminen .....	25
2.2.6	Zellernte .....	27
2.2.7	Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	28
2.2.8	LightCycler-RT-PCR .....	33
2.2.9	Durchflusszytometrie .....	37

2.2.10	IL-16 Sandwich-ELISA .....	40
2.2.11	Auswertung und statistische Beurteilung.....	43
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>44</b>
3.1	Zellkultur und Zellwachstum .....	44
3.2	Immunphänotypisierung .....	45
3.3	Polymerasekettenreaktion .....	48
3.4	Inkubationsversuche über 24 h.....	49
3.4.1	Zeitkinetik Staurosporin.....	49
3.4.2	Zeitkinetik Forskolin .....	51
3.4.3	Zeitkinetik Histamin .....	52
3.4.4	Zeitkinetik Serotonin.....	53
3.5	Titration mit Pharmaka/ biogenen Aminen.....	55
3.5.1	Titration mit Staurosporin.....	55
3.5.2	Titration mit Forskolin.....	57
3.5.3	Titration mit Histamin .....	58
3.5.4	Titration mit Serotonin.....	59
3.6	Induktion der IL-16-Expression.....	60
3.6.1	Inkubation mit Staurosporin, 10 nM, 30 nM.....	61
3.6.2	Inkubation mit Histamin, 30 nM, 300 nM.....	63
3.7	IL-16 ELISA .....	65
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>68</b>
4.1	Zellkultur und Zellwachstum .....	68
4.2	Immunphänotypisierung .....	69
4.3	Polymerasekettenreaktion .....	70
4.3.1	LightCycler-RT-PCR .....	71
4.4	Inkubation der T-Zellen mit Pharmaka/ biogenen Aminen.....	72
4.4.1	Inkubation mit Staurosporin .....	72
4.4.2	Inkubation mit Forskolin .....	73
4.4.3	Inkubation mit Histamin.....	75
4.4.4	Inkubation mit Serotonin .....	76

4.5	IL-16-Expression .....	77
4.5.1	Untersuchung der T-Lymphozyten von Rheumapatienten .....	77
4.5.2	Untersuchung der T-Lymphozyten gesunder Spender .....	78
4.6	IL-16-Sekretion .....	78
4.6.1	Spontane IL-16-Sekretion .....	79
4.6.2	Stimulationsversuch durch Staurosporin.....	79
4.6.3	Stimulationsversuch durch Histamin .....	80
4.7	Conclusio.....	81
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>83</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>85</b>
<b>7</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>92</b>
<b>8</b>	<b>Curriculum vitae .....</b>	<b>93</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Diagramm Studienaufbau .....	20
Abbildung 2: PBMC.....	22
Abbildung 3: Schematische Darstellung des PCR-Zyklus.....	29
Abbildung 4: Prinzip des Sandwich ELISA.....	41
Abbildung 5: Herstellung der IL-16 Konzentrationsreihe.....	42
Abbildung 6: PBMC, 1d Proliferation, 10x,	
Abbildung 7: PBMC, 4d Proliferation; 10x.....	44
Abbildung 8: PBMC, 6d Proliferation, 10x,	
Abbildung 9: PBMC, 8d Proliferation, 20x.....	44
Abbildung 10: CD3 <sup>+</sup> Zellen in der Ausgangspopulation .....	46
Abbildung 11: CD3 <sup>+</sup> Zellen nach 8d Expansion.....	46
Abbildung 12: CD4 <sup>+</sup> Zellen in der Ausgangspopulation .....	46
Abbildung 13: CD8 <sup>+</sup> Zellen in der Ausgangspopulation .....	47
Abbildung 14: CD4 <sup>+</sup> Zellen nach 8d Expansion .....	47
Abbildung 15: CD8 <sup>+</sup> Zellen nach 8d Expansion .....	47
Abbildung 16: Interleukine PCR.....	48
Abbildung 17: GAPDH PCR.....	48
Abbildung 18: IL-16/GAPDH-Ratio nach Inkubation mit Staurosporin .....	50
Abbildung 19: IL-16/GAPDH-Ratio nach Inkubation mit Forskolin .....	51
Abbildung 20: IL-16/GAPDH-Ratio nach Inkubation mit Histamin.....	52
Abbildung 21: IL-16/GAPDH-Ratio nach Inkubation mit Serotonin .....	54
Abbildung 22: IL-16-Induktionsindices bei Titration mit Staurosporin.....	56
Abbildung 23: IL-16-Induktionsindices bei Titration mit Forskolin .....	57
Abbildung 24: IL-16-Induktionsindices bei Titration mit Histamin .....	59
Abbildung 25: IL-16-Induktionsindices bei Titration mit Serotonin .....	60
Abbildung 26: Induktion der IL-16-Expression durch Staurosporin .....	62
Abbildung 27: Induktion der IL-16-Expression durch Histamin .....	64
Abbildung 28: Eichkurve IL-16 .....	65
Abbildung 29: IL-16 Konzentration im Überstand .....	67

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Inkubationsansätze .....	26
Tabelle 2: PCR-Protokoll .....	32
Tabelle 3: FITC konjugierte Antikörper .....	38
Tabelle 4: PE konjugierte Antikörper.....	38
Tabelle 5: PerCP konjugierte Antikörper.....	38
Tabelle 6: Oberflächenantigene .....	45
Tabelle 7: Kopienzahl/ $\mu$ l nach Inkubation mit Staurosporin .....	49
Tabelle 8: IL-16 Induktionsindices nach Inkubation mit Staurosporin .....	50
Tabelle 9: Kopienzahl/ $\mu$ l nach Inkubation mit Forskolin .....	51
Tabelle 10: IL-16 Induktionsindices nach Inkubation mit Forskolin .....	52
Tabelle 11: Kopienzahl/ $\mu$ l nach Inkubation mit Histamin.....	52
Tabelle 12: IL-16 Induktionsindices nach Inkubation mit Histamin.....	53
Tabelle 13: Kopienzahl/ $\mu$ l nach Inkubation mit Serotonin .....	53
Tabelle 14: IL-16 Induktionsindices nach Inkubation mit Serotonin .....	54
Tabelle 15: Titration mit Staurosporin .....	56
Tabelle 16: Titration mit Forskolin.....	57
Tabelle 17: Titration mit Histamin.....	58
Tabelle 18: Titration mit Serotonin .....	59
Tabelle 19: Induktion der IL-16-Expression durch Staurosporin .....	62
Tabelle 20: Induktion der IL-16-Expression durch Histamin.....	64
Tabelle 21: Extinktionswerte der IL-16 Konzentrationsreihe .....	65
Tabelle 22: IL-16-Konzentration [pg/ml] im Überstand.....	66
Tabelle 23: IL-16-ELISA: Mittelwerte, Standardabweichungen, T-Test.....	67

## Abkürzungen

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
Bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
BSG	Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD(n)	cluster of differentiation, aus n Immunglobulindomänen
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CRP	C-reaktives-Protein
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleintriphosphat
DPBS	Dulbecco`s Phosphat gepufferte Saline
E	Extinktion
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
Et al.	et alteri, und andere
FACS	fluorescence activated cell sorting
FBS	Fetale Bovine Serum
FCS	fetales Kälberserum
fors	Forskolin
FSC	forward scatter
g, mg, µg, ng, pg	Gramm, Milli-,Mikro-,Nano-,Pikogramm

G	gesunde Person
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
G-Protein	guanylnukleotidbindendes Protein
h, min, s	Stunde(n), Minute(n), Sekunde(n)
his	Histamin
HLA	humanes Lymphozytenantigen
HIV	humanes Immunschwäche-Virus
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
IFN	Interferon
IGF	insulin-like growth factor
IL-x	Interleukin-(Nummer)x
l, ml, µl	Liter, Milliliter, Mikroliter
LCF	lymphocyte chemoattractant factor
M, mM, µM, nM	Mol, molar, Milli-, Mikro-, Nanomolar
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
mRNA	messenger RNA
mV	Millivolt
nm	Nanometer
OA	Osteoarthritis
PBMC	peripheral blood monocytes
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	Potentia hydrogenii
PK	Proteinkinase(n)
PMA	Phorbolester
RA	Rheumatoide Arthritis
RF	Rheumafaktor
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	rounds per minute
RT	reverse Transkriptase
s	Sekunde

ser	Serotonin
SSC	side scatter
stauro	Staurosporin
TBE	Tris-Borsäure EDTA Lsg.
TNF	Tumornekrosefaktor
U	Unit
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett

# 1 Einleitung

## 1.1 Rheumatoide Arthritis

Die rheumatoide Arthritis (RA), auch chronische Polyarthritis genannt, ist eine Systemerkrankung des Bindegewebes unbekannter Ätiologie. Typisch ist die Synovialitis kleiner Gelenke mit auffallend symmetrischem Befallsmuster. Im Krankheitsverlauf kommt es zu Bewegungseinschränkungen, Fehlstellungen und Ankylosen. Auch extraartikuläre Manifestationen werden beobachtet, wie z.B. eine Tenosynovitis, das Auftreten von Rheumaknoten, digitale Infarkte, eine Lungenfibrose, Skleritis oder eine Keratokonjunktivitis sicca.

### 1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

In Deutschland liegt die Prävalenz der RA bei 0,5% [73]. Frauen sind ungefähr dreimal häufiger betroffen als Männer. Es können zwei Erkrankungsgipfel beobachtet werden, einmal zwischen dem 20. und 30. Lebensjahr und zwischen dem 50. und 65. Lebensjahr.

Da genetische, immunologische, hormonelle, sowie Umweltfaktoren die Entwicklung der Krankheit begünstigen, gilt die Ätiologie der RA als multifaktoriell [66, 11].

Die RA tritt familiär gehäuft auf. Zwillingsstudien [2, 58] zeigten bei monozygoten Zwillingen eine Konkordanzrate von 12-15%. Bei dizygoten Zwillingen hingegen betrug die Konkordanzrate nur ca. 4%.

Es besteht eine Assoziation mit dem Histokompatibilitätskomplex HLA-DR4. Dieser wird bei nahezu 70% der Patienten mit RA, jedoch nur zu 28% in der gesunden Kontrollgruppe gefunden [61]. Auch unterschiedliche Krankheitsverläufe zeigen einen Bezug zu bestimmten HLA-Typen. So sind frühe erosive Verläufe und das Auftreten von extraartikulären Symptomen häufiger mit DR B 1\*0401 oder DR B 1\*0404 assoziiert [63].

Auch hormonelle Faktoren scheinen eine Rolle zu spielen. Unter Östrogenanwendung (Kontrazeption) werden weniger schwere Krankheitsverläufe der rheumatoiden Arthritis beobachtet. Orale Kontrazeptiva

schützen zwar nicht vor einer RA, aber beeinflussen den Krankheitsverlauf positiv [60]. Dieser wird ebenso durch eine Schwangerschaft positiv beeinflusst; es kommt v.a. im 2. und 3. Trimenon oft zu einer spontanen Krankheitsremission, postpartal jedoch wieder zu einer Verschlechterung [24, 57].

### **1.1.2 Pathogenese**

Kennzeichnend für die RA sind die synoviale Hyperplasie, pathologische Immunphänomene sowie die progredient und destruierend verlaufende Arthritis [57].

Die entzündlichen Infiltrate beherbergen synoviale Fibroblasten, Makrophagen, sowie Lymphozyten. Bei diesen handelt es sich vor allem um CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

Beteiligt an der Pathologie der rheumatoiden Arthritis ist ein autoimmuner Angriff durch T-Zellen und eine fehlerhafte homöostatische Kontrolle des Immunsystems durch regulierende T-Zellen.

Es wird davon ausgegangen, dass ein exogenes Agens bei einem genetisch empfindlichen bzw. passenden Individuum zu einer antigenabhängigen Stimulation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen führt. Bei diesem Agens handelt es sich wahrscheinlich um ein aus Kreuzreaktionen hervorgegangenes Autoantigen oder ein Neoantigen, welches durch ein posttranslationelles Ereignis entstanden ist [29].

Nach der Initialreaktion kommt es durch von der T-Zelle freigesetzte Zytokine und via Oberflächenmoleküle zur B-Zell-Proliferation, Antikörperbildung und Aktivierung von Monozyten und Makrophagen. Dies hat wiederum die Sekretion weiterer Zytokine wie Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und Interleukin-1 (IL-1) zur Folge, sowie die Rekrutierung von Entzündungszellen ins Gelenkkompartiment, die Aktivierung von ortsständigen Zellen und schließlich die Destruktion der Gelenke [28, 67, 1].

Aufrechterhalten wird die lokale Entzündungsreaktion durch ein proinflammatorisches Zytokinmilieu. Hierbei kommt TNF- $\alpha$  eine zentrale Rolle

zu, da es die Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 und IL-6 steuert [57].

Bei der rheumatoiden Arthritis finden sich in der Synovialflüssigkeit und im synovialen Gewebe v.a. die proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-16, IL-18, IFN- $\alpha$  und TNF- $\alpha$ , die hauptsächlich von synovialen Fibroblasten und Makrophagen produziert werden. Zusätzlich herrscht ein Ungleichgewicht zwischen Th1- (IL-2, IFN- $\gamma$ ) und Th2-Zytokinen (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13) mit Dominanz der Th1-Zytokine. IFN- $\gamma$  wird v.a. von CD8<sup>+</sup> T-Zellen produziert, deren Rolle in der lokalen Zytokinproduktion deswegen nicht unterschätzt werden darf [12].

Im Rahmen der chronischen Entzündung kommt es nun in der Synovialmembran zur Verdickung der oberflächlichen Zellschichten, zur Ausbildung eines sogenannten Pannus, bei dem es sich um ein von Makrophagen und Fibroblasten dominiertes Gewebe handelt. Der Pannus zeichnet sich durch eine hohe metabolische Aktivität und ein invasiv-destruktives Verhalten aus. Die Sekretion großer Mengen kataboler Enzyme wie Matrixmetalloproteinasen und Kathepsine führt zur Zerstörung des Gelenkknorpels. Ein weiteres Charakteristikum ist die Autonomie der auch als Pannozyten bezeichneten Zellen der Synovialis und somit der Kontrollverlust durch das Immunsystem [28, 59].

Als Ursache für die Chronifizierung wird die Persistenz des Antigens in der Synovialis angenommen. Das erklärt auch die hohe Zahl an T-Lymphozyten in der Synovialmembran, die vermehrte HLA-DR-Expression und die B-Lymphozyten-Aktivierung mit Produktion autoreaktiver Antikörper [28].

### **1.1.3 Klinik und Diagnosestellung**

Kennzeichnend für die RA ist der schleichende Krankheitsbeginn mit zunächst unspezifischen Symptomen. Erst später zeigt sich der bevorzugt symmetrische Befall von Hand-, Fingergrund-, Fingermittel- und Zehengrundgelenken mit typischerweise morgendlichen Schmerzen und Steifigkeit.

Zur Klassifikation der RA hat die American Rheumatism Association 1987 folgende Kriterien festgelegt [5]:

1. Morgendliche Gelenksteifigkeit von mindestens einer Stunde Dauer
2. Arthritis an 3 oder mehr Gelenkregionen
3. Befall mindestens eines Hand-, MCP, oder PIP-Gelenks
4. Symmetrischer Gelenkbefall
5. Rheumaknoten
6. Nachweis von Rheumafaktoren im Serum
7. Radiologische Veränderungen an Hand- oder Fingergelenken wie Erosionen oder Osteopenie

Die Diagnose RA wird gestellt, wenn vier der oben genannten Kriterien erfüllt sind, wobei die Kriterien 1 bis 4 über einen Zeitraum von 6 Wochen bestehen müssen.

Labordiagnostisch sind im Rahmen der chronischen Entzündung bei RA eine „Infektanämie“ und eine Thrombozytose zu beobachten. Auch unspezifische Entzündungszeichen wie die Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit (BSG) und das C-reaktive Protein (CRP) sind erhöht.

Der unter Punkt 5 genannte Nachweis von Rheumafaktoren (RF) gilt zwar als diagnostisches Kriterium, ist jedoch aufgrund der mangelnden Spezifität nicht beweisend für eine RA. Bei den Rheumafaktoren handelt es sich um Autoantikörper verschiedener Ig-Klassen, die von B-Lymphozyten produziert werden. Der IgM-RF richtet sich als Autoantikörper gegen das Fc-Fragment von IgG-Antikörpern. Er kommt bei rund 70% der Patienten mit RA vor, lässt sich aber auch bei 5% der gesunden Bevölkerung nachweisen. Größere Bedeutung kommt den RF bei der Prognose der Erkrankung zu [62]. Bei Patienten mit hohen Konzentrationen von RF gilt die Prognose als eher ungünstig, da sie meist zu schwereren Verläufen mit rheumatoider Vaskulitis neigen.

Ursächlich für eine Vaskulitis ist hier die Selbstassoziiierung der Rheumafaktoren zu Immunkomplexen und in der Folge die Ablagerung in Blutgefäßen mit Aktivierung des Komplementsystems [35].

#### **1.1.4 Extraartikuläre Manifestationen**

Bis zu 10% der Patienten mit RA entwickeln bereits im frühen Krankheitsstadium extraartikuläre Manifestationen wie Lymphknotenschwellung, Hepatosplenomegalie, Serositis, Rheumaknoten oder eine Vaskulitis der Haut.

Am einfachsten zu diagnostizieren sind die Rheumaknoten, die meist an den Streckseiten der Fingergelenke und Ellbogengelenke und der Achillessehne, seltener über dem Os sacrum auftreten. Die Ursache für die Knotenbildung sind wahrscheinlich vaskulitische Prozesse an druckbelasteten Sehnen.

Am Herz kann es durch den chronischen Entzündungsprozess der RA zur Vaskulitis, Amyloidose, Serositis und Fibrose kommen. Am häufigsten jedoch werden Perikarditiden beobachtet.

Teilweise schon vor dem Gelenkbefall können intrapulmonale Knoten auftreten. Ebenso kann sich eine interstitielle Lungenfibrose entwickeln [31] oder eine Pleuritis, die bei der Hälfte der untersuchten RA-Patienten autoptisch nachgewiesen wurde.

Eine gelenknahe Osteoporose ist bei nahezu allen Patienten radiologisch schon frühzeitig nachweisbar. Verantwortlich scheint auf der einen Seite die Ruhigstellung bzw. Fehlbelastung und verstärkte Durchblutung des entzündeten Gelenks, aber auch zahlreiche lokale Mediatoren, deren Expression mit der vorhandenen Synovialitis zusammenhängt [57].

## **1.2 Zytokine**

Zytokine sind Peptide und Proteine, die der Signalübermittlung dienen. Sie werden vor allem von Zellen des Immunsystems, aber auch von anderen Zelltypen synthetisiert. Im Allgemeinen kontrollieren Zytokine das Wachstum, die Differenzierung und das Überleben von Zellen.

Eine bedeutende Rolle spielen sie in der Homöostase des Immunsystems. Sowohl die spezifische zelluläre als auch die unspezifische humorale

Immunantwort werden durch Zytokine geregelt. Proinflammatorische Wirkung zeigen Zytokine bei der Lokalisation von entzündlichem Gewebe und dem chemotaktischen Anlocken von Entzündungszellen. Sind Gewebeschäden vorhanden, werden Reparaturmechanismen ebenfalls durch Zytokine initiiert. Der Begriff Zytokin beschreibt eine Vielzahl von Stoffen. Zu nennen sind die Interleukine, Lymphokine, Monokine, Chemokine, Interferone und die Kolonie-stimulierenden-Faktoren.

In dieser Arbeit stehen die Interleukine im Mittelpunkt.

Interleukine (IL) werden von unterschiedlichen Zellen synthetisiert und ausgeschüttet. Synthese und Sekretion erfolgen keineswegs konstant, sondern werden durch verschiedene Stimuli geregelt. Diese Stimuli können die Zelle parakrin, endokrin, aber auch autokrin erreichen. Die Wirkung der Interleukine erfolgt durch Bindung an spezifische Rezeptoren. Dadurch sind sie bei der Aktivierung, Differenzierung und Proliferation von Zellen involviert, sowie bei zellulären Interaktionen.

Verschiedene Interleukine weisen unterschiedliche, sich teilweise überlappende Wirkungen auf. So spielen Interleukin-1 (IL-1), IL-4, IL-6 und IL-14 eine bedeutende Rolle in der humoralen Immunantwort. Als wichtige Wachstums- und Differenzierungsfaktoren für Lymphozyten gelten IL-2 und IL-4. IL-3, IL-7 und IL-11 sind wichtige Faktoren der Hämatopoese. Pyrogene Wirkung zeigen IL-1 und IL-6 [41]. IL-8 fördert die Angiogenese und Chemotaxis, und spielt somit eine Rolle bei der Wundheilung, dem Tumorwachstum und auch bei Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis. Auch IL-6 ist in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis in großen Mengen auffindbar und scheint somit ebenfalls an der Pathogenese beteiligt zu sein. IL-18 zeigt seine proinflammatorische Wirkung [33] bei chronischen Entzündungen, wie z.B. der rheumatoiden Arthritis oder des Morbus Crohn.

### 1.2.1 Interleukin-16

Interleukin-16 (IL-16) wurde 1982 erstmals als Zytokin beschrieben, das spezifisch auf T-Lymphozyten chemotaktisch wirkt. Aufgrund dieser Eigenschaft wurde es als „lymphocyte chemoattractant factor (LCF)“ bezeichnet [16, 20]. Verglichen mit anderen Interleukinen bzw. Zytokinen fallen keinerlei Ähnlichkeiten auf.

IL-16 weist in seiner biologisch wirksamen Form eine Tetramer-Struktur auf, bestehend aus 14-17 Kilo Dalton (kDa) großen Monomeren [16]. IL-16 wird zunächst als biologisch inaktives Vorläufermolekül von 67 kDa translatiert [8] und anschließend durch das Enzym Kaspase-3 modifiziert [72, 54]. In T-Zellen, Mastzellen, Fibroblasten, Eosinophilen und Dendritischen Zellen, sowie in Monozyten zeigt sich eine konstitutive Expression des IL-16-Vorläufermoleküls im Zytoplasma. Werden diese Zellen apoptotisch, so wird aufgrund der die Apoptose auslösenden Kaspase-3-Aktivierung IL-16 ausgeschüttet [26].

Das Vorläufermolekül Pro-IL-16 wird sowohl im Kern als auch im Zytoplasma gefunden. Vermindertes nukleäres Pro-IL-16 korreliert mit verminderter p27(Kip1)-Expression und einer damit verbundenen gesteigerten Zellzyklusrate und Proliferation. Die konstitutive Pro-IL-16-Expression hingegen hat den Übergang in die G0-Phase zur Folge. So wirkt nukleäres Pro-IL-16 in T-Lymphozyten bei der Zellzyklusregulation mit [68, 53].

Nachgewiesen wurde IL-16 v. a. in lymphatischem Gewebe [8], aber auch in eosinophilen Zellen, Epithelien der Atemwege [10], Pankreas, Magen, Kleinhirn und Knochenmark [16].

CD8<sup>+</sup> T-Zellen synthetisieren und speichern IL-16. Die Sekretion erfolgt nach Stimulation mit Antigenen, Mitogenen, Histamin oder Serotonin [16, 44, 43]. CD4<sup>+</sup> T-Zellen hingegen synthetisieren IL-16 nur nach Stimulation mit Antigenen und Mitogenen. Gespeichert wird IL-16 in seiner aktiven Form von CD4<sup>+</sup> T-Zellen nicht. Die Ursache hierfür ist das Fehlen von aktiver Kaspase-3 in ruhenden CD4<sup>+</sup> T-Zellen, welches hingegen in unstimulierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen präsent und für das Prozessieren des Vorläufermoleküls unabdingbar ist [69].

IL-16 bindet als Ligand an CD4-Moleküle [19]. CD4-Rezeptoren findet man z.B. auf der Oberfläche von T-Helfer-Zellen. Auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen wirkt IL-16

chemotaktisch, ebenso auf Monozyten, Eosinophile und Makrophagen [18, 52]. Bei letzteren wird zudem die Expression von MHC-II-Molekülen induziert. Durch Induktion der Expression von IL-2-Rezeptoren auf der Zellmembran und durch Induktion des Übergangs von der G<sub>0</sub>-Phase in die G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus trägt IL-16 zur Proliferation der CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei [15].

Während IL-16 mit CD4 interagiert und so zur Proliferation, Zytokinsekretion oder Chemotaxis anregt, verhalten sich diese CD4<sup>+</sup> T-Zellen refraktär gegenüber anderen Stimuli wie z.B. Antigen via CD3. Diese Aktivierung der T-Zellen hängt von der entsprechenden Ko-Stimulation ab und zeigt einen proinflammatorischen Effekt des IL-16, wobei die Differenzierung der T-Zellen zu immunkompetenten Effektorzellen gehemmt wird [21].

Auch im Zusammenhang mit HIV hat IL-16 große Bedeutung. 1986 wurde von Walker et al. ein Faktor entdeckt, der von CD8<sup>+</sup> T-Zellen produziert wird und die Replikation des Humanen Immunschwäche Virus 1 (HIV-1) unterdrückt [64]. 1995 konnte von Baier et al. nachgewiesen werden, dass es sich um IL-16 handelt [7]. IL-16 inhibiert die Transkription von HIV-1 über CD4-Interaktion und anschließende Induktion eines viralen Repressors. Hohe IL-16-Titer bewirken allerdings eine Antigen-unabhängige Proliferation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen und korrelieren so mit der Progression der Erkrankung [4].

Auch beim Asthma bronchiale spielen erhöhte IL-16-Titer eine bedeutende Rolle [45, 46]. Die IL-16-Expression wird hier Histamin-vermittelt über H(4)-Rezeptoren reguliert, die in verschiedensten Zellen der Atemwege exprimiert werden [32].

### **1.2.2 Interleukin-16 bei rheumatoider Arthritis**

Bei Patienten mit rheumatoider Arthritis ist die Synovialmembran der befallenen Gelenke massiv infiltriert. Man findet dort neben aktivierten synovialen Fibroblasten auch Makrophagen und Lymphozyten. Dabei handelt es sich größtenteils um CD4<sup>+</sup> T-Zellen, in geringerem Maße CD8<sup>+</sup> T-Zellen und wenige B-Zellen [67]. Aufgrund der chemotaktischen Wirkung des IL-16 auf CD4<sup>+</sup> T-

Zellen, kommt diesem Zytokin in der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis eine bedeutsame Rolle zu [30].

Im Vergleich mit Osteoarthrosepatienten ist in der synovialen Flüssigkeit von Rheumapatienten der IL-16-Titer deutlich erhöht [14]. Als Hauptproduzenten von IL-16 gelten in der verdickten Synovialmembran die Fibroblasten, die nach Aktivierung dieses produzieren und sezernieren, was die massive Einwanderung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen zur Folge hat. So spielen sie eine Schlüsselrolle im Rekrutieren von CD4<sup>+</sup> T-Zellen zum Entzündungsort [54]. Vor allem in frühen Krankheitsstadien scheint die erhöhte IL-16-Produktion maßgeblich am Entstehen und „in Gang bringen“ des Entzündungsprozesses beteiligt zu sein [30], wobei IL-16 eher eine regulatorische als eine proinflammatorische Funktion zugeschrieben wird [14, 22].

Die Aktivierung der synovialen Fibroblasten bzw. die Stimulation zur IL-16-Expression kann z.B. durch Antikörper (AK) von den RA-Patienten selbst hervorgerufen werden. 2004 beschrieben Pritchard et al. eine Induktion der IL-16-Expression durch RA-IgG-AK unter Miteinbeziehung des Insulin-Growth-Factor-1-Rezeptors (IGF-1-R) [51, 50].

Mitverantwortlich für den erhöhten IL-16-Titer können ebenso IL-1 $\beta$  produzierende synoviale Makrophagen sein, da sich IL-16 durch proinflammatorische Zytokine wie IL-1 $\beta$  induzieren lässt. 2004 demonstrierten Weis-Klemm et al., dass IL-1 $\beta$  in synovialen Fibroblasten die Sekretion des reifen IL-16 Zytokins induziert, auf Genebene durch IL-1 $\beta$  jedoch keine Induktion erfolgt [65]. Die Transkription des IL-16-Moleküls erfolgt vielmehr konstitutiv [54].

Von Klimiuk et al. wird IL-16 als ein antiinflammatorisches Zytokin beschrieben, das zu einer verminderten Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  führt [39]. Somit gehen sie davon aus, dass die als Hauptproduzenten des IL-16 geltenden CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei Patienten mit rheumatoider Arthritis antiinflammatorisch wirken. Auch Davila et al. konnten eine Inhibition der Produktion von IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und anderen Chemokinen unter dem Einfluss von CD8<sup>+</sup> T-Zellen bestätigen; des Weiteren eine verringerte Expression kostimulierender Moleküle wie CD80 und CD86 auf

synovialen Fibroblasten [23]. Dies birgt die Möglichkeit der Unterdrückung der rheumatoiden Synovitis durch eine zell-basierte Immuntherapie.

### **1.2.3 IL-16-Transkription in Fibroblasten von RA-Patienten**

Synoviale Fibroblasten exprimieren in vitro spontan IL-16-mRNA. Sowohl die IL-16-Transkription als auch die IL-16-Sekretion können durch verschiedene Pharmaka beeinflusst werden, die in verschiedene klassische Signaltransduktionswege eingreifen. Dabei gibt es Unterschiede in der Reaktion synovialer Fibroblasten von Rheumapatienten und Fibroblasten von Arthrosepatienten.

#### **1.2.3.1 Regulationsmechanismen der IL-16-Transkription**

Die IL-16-Transkription kann durch Pharmaka beeinflusst werden, die in cAMP vermittelte Signaltransduktionswege eingreifen (Forskolin), die Aktivität von Proteinkinasen, insbesondere der Proteinkinase C (PKC), regulieren (Staurosporin, PMA) oder Proteinphosphatasen hemmen (Ocadaic Acid).

Aufgrund des unterschiedlichen Reaktionsmusters der Fibroblasten von Rheumapatienten und Arthrosepatienten, werden Unterschiede in der Signaltransduktion angenommen.

2004 konnte von Weis-Klemm et al. gezeigt werden, dass sich die Regulation der IL-16-Transkription in synovialen Fibroblasten von RA-Patienten (RA-F) von der in Fibroblasten von Patienten mit Osteoarthrose (OA-F) wie folgt unterscheidet. Eine Stimulation cAMP vermittelter Signaltransduktionswege durch Forskolin führt zur Verstärkung des IL-16 PCR-Signals in OA-F. In RA-F hingegen erhöht Staurosporin als Inhibitor der Proteinkinasen signifikant das IL-16-Signal. Eine Aktivierung der PKC durch Phorbolester (PMA) induziert ebenso eine signifikant erhöhte IL-16-mRNA-Synthese in RA-F [65].

### **1.3 Fragestellung und Zielsetzung**

In Vorarbeiten wurden die unter 1.2.3.1 aufgeführten Unterschiede bezüglich der Regulationsmechanismen der IL-16-Transkription aufgedeckt. Als mögliche Ursache für diesen Unterschied in der IL-16-Expression gibt es verschiedene Denkansätze. Möglich wäre eine Induktion der IL-16-Expression in synovialen Fibroblasten von Rheumapatienten durch die Arthritis. Ebenso könnte zwischen Zellen von Patienten mit rheumatoider Arthritis und Patienten mit Osteoarthritis ein genetischer Unterschied ausschlaggebend sein. Schon bei einigen an der Zelldifferenzierung und –proliferation beteiligten Genen sind Differenzen in der Expression in RA-F verglichen mit OA-F bekannt [48].

Ziel dieser wissenschaftlichen Arbeit war es nun, Regulationsmechanismen der IL-16-Expression in T-Lymphozyten von RA-Patienten und gesunden Spendern näher zu untersuchen und zugleich die Übertragbarkeit der bei synovialen Fibroblasten beobachteten Reaktionsmuster auf T-Lymphozyten zu prüfen. Klinische Relevanz zeigt dies in der Abklärung neuer Therapiekonzepte bei der Behandlung der rheumatoiden Arthritis. Der Schwerpunkt liegt hierbei auf den Steuerungsmöglichkeiten der IL-16-Transkription. Durch das Eingreifen bzw. die gezielte Modulation verschiedener klassischer Signaltransduktionswege mit Hilfe von Pharmaka ist es möglich, die Steuerung der IL-16-Transkription genauer zu untersuchen.

Zunächst wurden die Untersuchungen zur Aktivierung der IL-16-Expression an T-Lymphozytenkulturen gesunder Spender durchgeführt. Ebenso wie die Fibroblasten in den Vorarbeiten wurden die T-Lymphozyten mit verschiedenen Pharmaka sowie Hormonen behandelt und hinsichtlich der IL-16-Expression untersucht. Nach Etablierung der Methodik wurden diese Untersuchungen dann vergleichend an T-Lymphozytenkulturen von Patienten mit rheumatoider Arthritis und T-Lymphozytenkulturen gesunder Spender durchgeführt, um die Reaktionsmuster mit denen der Fibroblasten zu vergleichen. Stimmen diese überein, lässt dies auf einen genetischen Zusammenhang schließen.

## **1.4 T-Lymphozytenkultur**

Die medizinische Forschung nutzt unterschiedliche Möglichkeiten, Vorgänge im menschlichen Organismus zu untersuchen. Neben klinischen Studien und Tierversuchen wird insbesondere im Rahmen der Grundlagenforschung mit Zellkulturen gearbeitet. Als Ausgangsmaterial für die Zellkulturen wird menschliches Gewebe verwendet, dessen Entfernung medizinisch indiziert ist, bzw. menschliches Blut. Nach dem Isolieren der Zellen werden diese in einem Nährmedium kultiviert, welches alle für das Wachstum der betreffenden Zellen nötigen Komponenten enthält. In vivo hätten die Zellen diese Komponenten dem Blut entnommen. Selbstverständlich entspricht die in-vitro-Situation nicht exakt den organismusgetreuen Umweltbedingungen. Dennoch ist die Aussagekraft der Ergebnisse der Zellkulturuntersuchungen recht hoch.

In dieser Arbeit wurden Zellkulturen von T-Lymphozyten gezüchtet, die zuvor aus dem Blut isoliert wurden. Alle Versuche wurden unter standardisierten Bedingungen durchgeführt und so eine einheitliche Ausgangssituation geschaffen. Durch die Veränderung eines einzelnen Parameters, konnte dann dessen Auswirkung auf die Kultur untersucht werden.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Apparate und Instrumente des Labors**

##### **Absaugpumpe**

Suc-O-Mat; Bachofer, Reutlingen/D

##### **Bechergläser**

Verschiedene Größen; Fa. Schott, D

##### **Brutschrank**

CO<sup>2</sup> Auto Zero Inkubator; Heraeus, Hanau/D

##### **Deckgläser**

24x32mm; Langenbrick, Emmendingen/D

##### **Durchflusszytometer**

FACS; Becton Dickinson; Heidelberg/D

##### **Eppendorf-Cups**

0,5ml, 1ml; Eppendorf, Hamburg/D

##### **Erlenmeyerkolben**

Verschiedene Größen; Fa. Schott, D

##### **Feinwaage**

Mettler P1210; Mettler Toledo, Giessen/D

##### **FACS-Röhrchen**

5ml; Falcon

##### **Fotoapparat**

Vario-Orthomat;Leitz; Wetzlar/D

Canon PowerShot S45; Tokio/Japan

##### **Gefrierschrank**

Bosch, Stuttgart/D

##### **Gelkammer**

DNA Pocket-Block UV; Biozym, Hess. Oldendorf/D

**Gewebekulturplatte**

96-Well; 24-Well; Greiner GmbH, Nürtingen/D

**Glasflaschen**

Verschiedene Größen; Fa. Schott, D

**Insulinspritzen**

1ml; Braun Medical AG, Melsungen/D

**Kanülen**

Sterican 0.9x70mm; Braun Medical AG, Melsungen/D

**Kühlschrank**

Bosch, Stuttgart/D

**Lichtmikroskop**

Flouvert FS Mikroskop; Leitz, Wetzlar/D

**Light Cycler**

Fa. Roche, Heidelberg/D

**Light Cycler Capillaries**

Fa. Roche, Heidelberg/D

**Magnetrührer**

Ikamag RCT; Ika-Labortechnik, Staufen i.Br./D

**Mikrowelle**

Bosch, Stuttgart/D

**Objektträger**

Super Frost plus, 25x75x1,0mm; Langenbrinck, Emmendingen/D

**PCR-Block**

Thermocycler UNO II; Biometra, Göttingen/D

**Perfusorspritzen**

50ml; Braun Medical AG, Melsungen/D

**Pinzetten**

Fa. Aesculap, Tuttlingen/D

**Pipetten**

EpT.I.P.S.; Eppendorf, Hamburg/D

Serological Pipet, 1, 2, 5, 10, 25ml; Becton Dickinson, Franklin Lakes/USA

Combitips Biopur; Eppendorf, Hamburg/D

**Pipettierhilfen**

Accu-jet; Fa. Brand

**Power Pack 25 (Gelelektrophorese)**

Biometra; Göttingen/D

**Schüttler**

Ika MTS 4; Bachofer, Reutlingen/D

**Spectrophotometer**

Jasco V530; Jasco, Groß Umstadt/D

**Sterilarbeitsbank**

Gelaire Laminar Air Flow; BDK, Sonnenbühl/D

**Sterilfilter**

Millex GV 0,22µm; Millipore, Molsheim/F

**Stickstofftank**

Taylor Wharton Cryogenetics; Bachofer, Reutlingen/D

**Test-Röhrchen**

PP Test tubes 50ml; Greiner, Nürtingen/D

**Wasserbad**

Memmert GmbH, Schwabach/D

Daglef Patz, Wankendorf/D

**Zentrifuge**

Centrifuge 5804 R; Eppendorf, Hamburg/D

Zentrifuge 5412; Eppendorf, Hamburg/D

**2.1.2 Chemikalien**

**Agarose**

SeaKem LE Agarose; Biowhittaker Molecular Applications, Rockland/USA

**Beta-Mercaptoethanol**

Sigma Aldrich, St. Louis/USA

**Borsäure**

Merck, Darmstadt/D

**Bovines Serumalbumin**

Albumine, bovine, Fraction V; Sigma Aldrich, St. Louis/USA

**cDNA-Synthese-Kit**

Advantage RT-for-PCR Kit; Clontech, Palo Alto/USA

**Desinfektionslösung**

Antifect Liquid; Schülke & Mayr, Norderstedt/D

**Dimethylsulfoxid (DMSO)**

Fa. Merck, Darmstadt/D

**DNA-Eichmarker**

100bp DNA-Ladder; Gibco/Invitrogen Corporation, Rockville/USA

**Essigsäure**

Merck, Darmstadt/D

**Ethanol**

Ethanol p.a., absolut; Merck, Darmstadt/D

**Ethidiumbromid**

Sigma Aldrich, St. Louis/USA

**FicoLite-H**

Separation Medium; Linaris

**Fötales Kälberserum (FCS)**

Seromed/Biochrom KG, Berlin/D

**Forskolin**

Fa. Calbiochem

**Hank´s Buffered Salt Solution (HBSS)**

Invitrogen, Karlsruhe

**Heparin-Na<sup>+</sup>**

Liquemin N5000; Fa. Roche, Mannheim/D

**Histamin**

Sigma Aldrich, St. Louis/USA

**H<sub>2</sub>O dest.**

Universitätsapotheke Tübingen

**Human IL-16 Immunoassay, Quantikine**

R&D Systems, Minneapolis/USA

**Interleukin-2**

Proleukin; Chiron Behring, Marburg/D

**IT-Box-341**

Immunotools; Friesoythe/D

**LightCycler Fast Start DNA Master SybrGreen I Kit**

Fa. Roche, Mannheim/D

**LightCycler Primer Sets**

Human IL-16, Human GAPDH; Fa. Search LC, Heidelberg/D

**Methanol**

Methanol p.a., absolut; Merck, Darmstadt/D

**PBS-Puffer**

Dulbecco's Phosphate buffered saline 0,0095 M; Cambrex Bio Science, Verviers/B

**PCR-Kit**

Taq-DNA-Polymerase; Fa. Roche, Heidelberg/D

**Phytohemagglutinin**

Life Technologies, Eggenstein/D

**Polyglobin**

Bayer, Leverkusen

**RNase Free DNase Set**

Fa. Quiagen, Maryland/USA

**RNA-Extraktionskit**

RNeasy Minikit (250); Quiagen, Maryland/USA

**RPMI 1640 Medium**

Life Technologies, Eggenstein/D

**Serotonin**

Sigma Aldrich, St. Louis/USA

**Staurosporin**

Fa. Calbiochem

**Trypanblau 0.4%**

Sigma Aldrich, St. Louis/USA

**Wasserdesinfektion**

Acryl AquaClean; WAK-Chemie Medical GmbH, Bad Soden/D

**X-vivo 15**

Biowhittaker, Verviers/Belgien

**2.1.3 Primer-Sequenzen**

IL-1 $\beta$ up	5' GAG CTC GCC AGT GAA ATG ATG GC 3'
IL -1 $\beta$ low	5' GCC CTG AGT GTC GTT TTT TCG AAC 3'
IL -2 up	5' ATG TAC AGG ATG CAA CTC CTG TCT T 3'
IL -2 low	5' GTT AGT GTT GAG ATG ATG CTT TGA C 3'
IL -6 up	5' ATG AAC TCC TTC TCC ACA AGC GC 3'
IL -6 low	5' GAA GAG CCC TCA GGC TGG ACT G 3'
IL -8 up	5' ATG ACT TCC AAG CTG GCC GTG GCT 3'
IL -8 low	5' TCT CAG CCC TCT TCA AAA ACT TCT C 3'
IL -16 forward	5' ATG CCC GAC CTC AAC TCC TC 3'
IL -16 reverse	5' CTC CTG ATG ACA ATC GTG AC 3'
IL -18 forward	5' GCT TGA ATC TAA ATT ATC AGT C 3'
IL -18 reverse	5' GAA GAT TCA AAT TGC ATC TTA T 3'
GAPDH up	5' TGA AGG TCG GAG TCA ACG GAT TTG GT 3'
GAPDH low	5' CAT GTG GGC CAT GAG GTC CAC CAC 3'

### 2.1.4 Antikörper

CD3-FITC	Leu-4	Becton Dickinson, Heidelberg
CD3-PE	SK7	Becton Dickinson, Heidelberg
CD4-FITC	SK3	Becton Dickinson, Heidelberg
CD4-PerCP	SK3	Becton Dickinson, Heidelberg
CD8-FITC	SK1	Becton Dickinson, Heidelberg
CD8-PerCP	SK1	Becton Dickinson, Heidelberg
CD14-PE	MEM-18	Immunotools, Friesoythe
CD16-PE	LNK16	Immunotools, Friesoythe
CD19-PE	LT19	Immunotools, Friesoythe
IgG1-FITC		Becton Dickinson, Heidelberg
IgG1-PE		Becton Dickinson, Heidelberg
IgG1-PerCP		Becton Dickinson, Heidelberg

### 2.1.5 Humane PBMC aus Vollblut

PBMC sind mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut. Sie wurden alle aus Vollblut isoliert. Dieses stammte für die Vorversuche zur Etablierung der Methodik von vier gesunden freiwilligen Spendern. Für die weiteren Experimente stand als Untersuchungsmaterial Vollblut von vier Patienten mit der Diagnose rheumatoide Arthritis zur Verfügung, nachdem diese ihr schriftliches Einverständnis abgegeben hatten und das Projekt von der Ethikkommission bewilligt wurde. Das Durchschnittsalter der Patienten lag bei 48 Jahren. Da von rheumatoider Arthritis weitaus mehr Frauen als Männer betroffen sind, handelte es sich hier ausschließlich um weibliche RA-Patienten. Zum Vergleich mit den Rheumapatienten wurden drei gesunde Kontrollen hinzugezogen, die im Rahmen einer Blutspende bei der Blutbank Tübingen in eine kleine zusätzliche Blutentnahme einwilligten. Es handelte sich hier um zwei weibliche und einen männlichen Spender, deren Durchschnittsalter bei 44 Jahren lag.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Studienaufbau

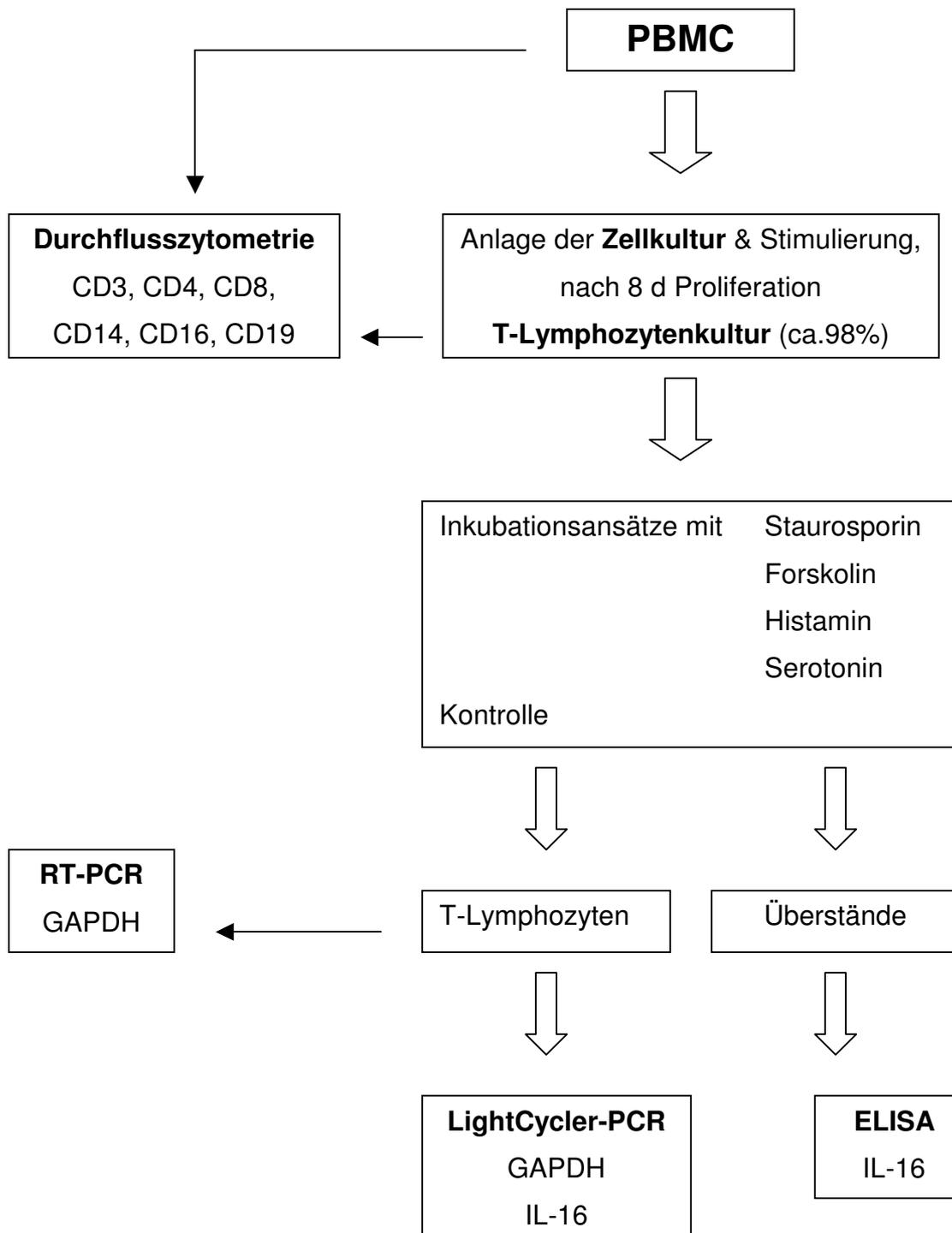


Abbildung 1: Diagramm Studienaufbau

## **2.2.2 Zellkultur**

### **2.2.2.1 Sterile Arbeitsbedingungen**

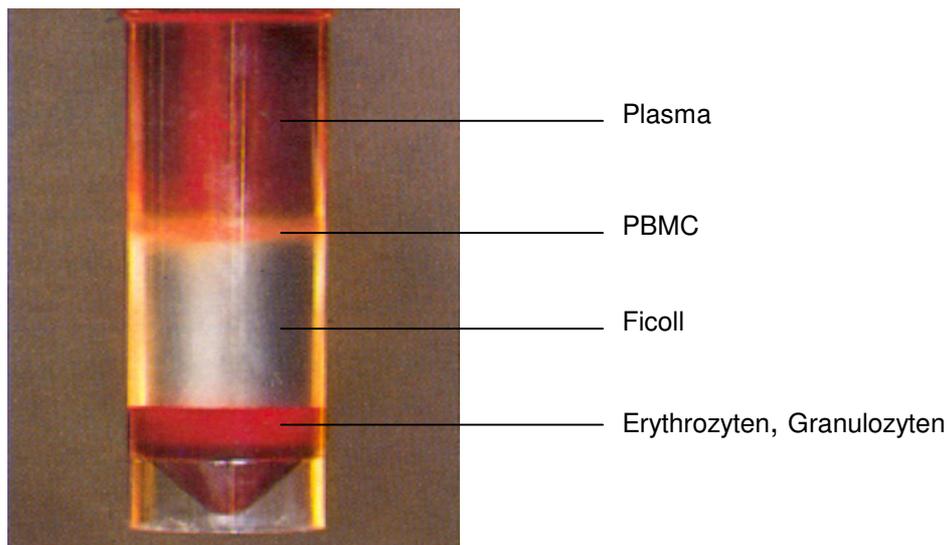
Alle Arbeitsschritte bezüglich der Zellkultur wurden unter sterilen Arbeitsbedingungen durchgeführt. Ziel war es, eine Kontamination der Zellen mit Mikroorganismen zu verhindern. Gearbeitet wurde unter einer Sterilbank, die vor Beginn der Arbeit mit Antifect liquid desinfiziert und 10 min mit UV-Licht bestrahlt wurde. Dies diente der Keimzahlminimierung. Ein laminarer Luftstrom von 4 m/s hielt während des Arbeitens die Verunreinigung der Luft durch Staubpartikel o.ä. gering. Es wurde stets mit desinfizierten Einmalhandschuhen und sterilen Instrumenten gearbeitet. Für die Arbeit mit der Zellkultur benötigte Flüssigkeiten wurden erst unter der Sterilbank geöffnet und gegebenenfalls auch sterilfiltriert.

### **2.2.2.2 Isolieren von humanen PBMC aus Vollblut**

Für das Isolieren der PBMC wurde heparinisieretes Blut verwendet. Zur Verhinderung der Blutgerinnung wurden 50 units Heparin pro ml Blut benötigt. Zunächst ließ man das Blut auf Zimmertemperatur abkühlen. Dann wurde das Blut 1:1 mit HBSS verdünnt und mit Hilfe eines Lymphozytenseparationsmediums (Ficoll,  $\rho=1,077$  g/ml) in seine Bestandteile aufgetrennt. Dabei wurden in 50 ml Röhrchen je 15 ml Ficoll vorgelegt, mit jeweils 35 ml des Blut-HBSS-Gemisches vorsichtig überschichtet und ohne Bremse 25 min bei 900g und 23°C zentrifugiert. Durch die Zentrifugation erhält man eine Interphase, welche die PBMC enthält (siehe Abbildung 2).

Die Isolierung beruht auf einer Dichtentrennung. Die Dichte der Granulozyten und Erythrozyten liegt mit 1,09-1,1 g/ml über der von Ficoll und sorgt so für ein Absinken dieser Zellen auf den Boden des Röhrchens, während die PBMC mit einer Dichte von 1,06-1,07 g/ml eine weiße Schicht zwischen Plasma und Separationsmedium bilden.

Aus dieser Interphasenschicht wurden die PBMC abpipettiert, mit HBSS gewaschen und mit Bremse 10 min bei 300g und 23°C zentrifugiert.



**Abbildung 2: PBMC**

Nach einem weiteren Waschschrift wurde die Zellzahl bestimmt, dementsprechend die gewünschte Zellmenge entnommen und schließlich noch einmal unter oben genannten Bedingungen zentrifugiert. Nun konnten die Zellen entweder sofort für die Zellkultur verwendet oder für den späteren Gebrauch eingefroren und im Flüssigstickstofftank gelagert werden.

### **2.2.2.3 Anlage von T-Lymphozytenkulturen aus PBMC**

PBMC enthalten 70-80% T-Lymphozyten. Zur Anlage einer Zellkultur wurden entweder frisch isolierte oder eingefrorene PBMC verwendet. War letzteres der Fall, wurden die Proben wie unter 2.2.3.2. beschrieben zunächst aufgetaut.

Nachdem die Zellzahl bestimmt worden war, wurden die Zellen nochmals zentrifugiert und der Überstand entfernt. Pro  $10^6$  Zellen wurde 1 ml X-Vivo zugegeben. Es handelt sich hierbei um ein speziell auf die Bedürfnisse von T-Lymphozyten ausgerichtetes Nährmedium. Dieser Selektionsvorteil gegenüber den restlichen in der Probe vorhandenen mononukleären Zellen, wie Monozyten, Makrophagen, NK-Zellen und B-Zellen ist für die Proliferation der T-Lymphozyten von großer Bedeutung. Die in Nährmedium gelösten Zellen wurden auf 24-Well-Platten in einer Konzentration von  $10^6$  Zellen/ Well ausgesät.

Eine weitere wichtige Voraussetzung für die T-Zell-Proliferation ist die Stimulierung dieser Zellen durch Antigene [37]. Die Stimulierung kann z.B. mit Hilfe von PBMC eines allogenen Spenders erfolgen. Um eine Proliferation allogener PBMC zu verhindern, wurden diese vorher mit 30 Gy bestrahlt. Die Verteilung dieser Zellen erfolgte ebenfalls in einer Konzentration von  $10^6$  Zellen/ Well.

Weitere Stimulationsfaktoren waren IL-2 und Phytohemagglutinin (PHA). Bei IL-2 handelt es sich um einen Antigen-unspezifischen Proliferationsfaktor für T-Zellen, der in ruhenden Zellen für die Induktion des Zellzyklus sorgt. IL-2 wurde in einer Konzentration von 20 u/ml dem Zellgemisch zugefügt. Um die IL-2-Konzentration relativ konstant zu halten, wurde es bei jedem Mediumwechsel oder Splittvorgang neu hinzugefügt, so dass wieder eine Endkonzentration von 20 u/ml in jedem Well erreicht wurde. PHA ist ein Mitogen, das den raschen Übertritt von in der  $G_0$ -Phase des Zellzyklus ruhenden Zellen in die  $G_1$ -Phase induziert. PHA wurde nur einmalig zugegeben. Die Endkonzentration betrug 0,1%. Die Zugabe von PHA machte die Restimulierung der Zellen erst nach 10 Tagen Proliferation nötig.

Die 24-Well-Platten wurden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre inkubiert. Die meist geringe Ausgangszellzahl erforderte eine Proliferationsdauer von 8 bis 9 Tagen.

### **2.2.2.4 Subkultivierung und Mediumwechsel**

Der erste Mediumwechsel erfolgte erst nach 4 Tagen Inkubation, um den Zellen Zeit zu geben, sich zu sammeln und zu proliferieren. Meist mussten die Zellproben zu diesem Zeitpunkt bereits subkultiviert werden. Die Teilung der Kultur wurde vorgenommen, sobald die Zellen eine kritische Dichte erreicht hatten. Das ist nötig, um die Teilungsaktivität der Zellen zu erhalten und so ein optimales Wachstum der Kultur zu ermöglichen.

Da sich die Zellen mit der Zeit am Boden der Wells ablagern, wurden sie durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gelöst und im Medium verteilt. 1 ml des Zellgemisches pro Well wurde abgenommen und in ein anderes leeres Well

verlagert, welches anschließend mit 1 ml frischem Medium und einem IL-2-Zusatz von 20 u/ml aufgefüllt wurde.

Im weiteren Verlauf der Zellkultur wurde das Medium alle 3 Tage gewechselt, um das Nährstoffangebot relativ konstant zu halten. Dies geschah durch oberflächliches Absaugen von 1 ml Altmedium je Well und darauffolgender Zugabe von 1ml frischem Medium mit IL-2-Zusatz in oben genannter Konzentration. Dem Medium war ein Farbindikator beigemischt, so dass es durch den Verbrauch vieler Nährstoffe und somit sinkendem pH-Wert eine gelbliche Farbe annahm. Zeigte sich eine derartige Verfärbung des Mediums, wurde dieses umgehend gewechselt.

### **2.2.3 Kryokonservierung**

#### **2.2.3.1 Einfrieren der Zellen**

Zur Vorbereitung der Kryokonservierung wurden die Zellen 5 min lang bei 300g und 23°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das abgelagerte Zellpellet wurde daraufhin in frischem RPMI-Medium mit einem Zusatz von 20% FCS und 10% DMSO resuspendiert und in Kryoröhrchen zunächst bei -70°C eingefroren. Nach einem Tag wurden die Proben in den Flüssigstickstofftank verlagert.

#### **2.2.3.2 Auftauen der Zellen**

Zur Rekultivierung der Zellen wurden die Proben im 37°C warmen Wasserbad unvollständig aufgetaut und steril mit 10 ml RPMI versetzt. Da DMSO bei Raumtemperatur zytotoxisch wirkt, musste die Verdünnung schnell erfolgen. Nach Zentrifugation der Zellen wurde der Überstand entfernt, resuspendiert und nochmals mit RPMI gewaschen und abzentrifugiert. Für die Kultivierung wurden die Zellen nun in X-Vivo gelöst (1 ml X-Vivo pro  $10^6$  Zellen), auf 24-Well-Platten verteilt und nach erfolgter Stimulierung im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre inkubiert.

#### **2.2.4 Bestimmung der Zellzahl**

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop. Zuerst wurden die Zellen mit Trypanblau im Verhältnis Zellsuspension : Trypanblau = 1 : 1 gefärbt. Trypanblau kann durch defekte Zellmembranen ungehindert eindringen und so stellen sich bei dieser Färbung tote Zellen dunkelblau dar.

Nun wurde auf die Neubauer-Zählkammer ein leicht befeuchtetes Deckglas aufgebracht, dessen richtige Lage sich durch das Erscheinen der sogenannten Newton-Ringe bestätigte.

Vor der Probenentnahme zur Zellzahlbestimmung sorgte vorsichtiges Auf- und Abpipettieren für eine gleichmäßige Verteilung und Mischung der Zellen. Die Probe wurde mit einer Glaskapillare entnommen, an beide Enden des Deckglases der Neubauer-Zählkammer pipettiert und durch dort herrschende Kapillarkräfte in die Zählkammer gesogen.

Die Zellzahl pro ml wurde schließlich durch Auszählen der vier großen Eckquadrate und das Einsetzen des Ergebnisses  $n$  in folgende Formel

$$Z = (n * 2 * 10^4) / 4 = n * 5000 \text{ Zellen / ml} \quad \text{ermittelt.}$$

#### **2.2.5 Inkubation der T-Zellen mit Pharmaka/ biogenen Aminen**

Um die natürliche Regulation von IL-16 durch die T-Lymphozyten selbst zu manipulieren, wurden dem Vollmedium der Zellen verschiedene Substanzen zugesetzt. Diese waren Pharmaka, die klassische Signaltransduktionswege modulieren, oder biogene Amine. Durch den Einsatz dieser Substanzen wurden also veränderte Umweltbedingungen simuliert. Da es sich um zellmembranpermeable Pharmaka handelte, musste eine Inkubationsdauer gewählt werden, die für die transmembranale Einschleusung und die Aktivierung des IL-16 Genes ausreichte. Um den etwaigen optimalen Zeitpunkt maximaler IL-16 Transkription zu erhalten, wurden Kinetiken über 24 h durchgeführt. Nach Zugabe der Wirkstoffe wurden die T-Lymphozyten bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre inkubiert, nach 1 h, 2 h, 4 h, 8 h und 24 h die mRNA

isoliert und hinsichtlich des IL-16 Gens untersucht. Den Ergebnissen entsprechend wurde für die weiteren Induktionsversuche eine Inkubationsdauer von 8 h gewählt.

### 2.2.5.1 Wirkmechanismen und eingesetzte Konzentrationen

In zahlreichen Vorversuchen wurden die letztendlich eingesetzten Konzentrationen der Pharmaka bzw. der biogenen Amine ermittelt. Zusätzlich dienten Referenzangaben aus der Literatur, Ergebnisse aus Vorarbeiten und Herstellerangaben zur Orientierung.

Verwendete Substanzen, eingesetzte Konzentrationen und Informationen zu den Vorversuchen können der folgenden Tabelle entnommen werden.

Substanz	Charakteristika	eingesetzte Endkonzentrationen	Titration Vorversuche
<b>Staurosporin</b>	Breitspektrum-Inhibitor von Proteinkinasen (PKA, PKC, PKG)	10 nM 30 nM	3-300 nM
<b>Forskolin</b>	Stimulator der PKA und Adenylatzyklase, Erhöhung des cAMP-Spiegels		2-15 µM
<b>Histamin</b>	biogenes Amin, Neurotransmitter, Trigger der IL-16 Sekretion von CD8 <sup>+</sup> -Zellen	30 nM 300 nM	30 nM–3 µM
<b>Serotonin</b>	vasoaktives Amin, Neurotransmitter, Immunmodulator, Induktion der IL-16 Sekretion in CD8 <sup>+</sup> -Zellen		10 nM-1 µM

**Tabelle 1: Inkubationsansätze**

### 2.2.5.2 Durchführung der Induktion

Die Induktion wurde nach 8 bis 9 Tagen Proliferation vorgenommen, da die Zellen nach dieser Zeit genügend gereift waren und auch in ausreichender Anzahl für die verschiedenen Induktionsansätze zur Verfügung standen. Um

eine Verfälschung der Ergebnisse durch während der Proliferationsphase entstandene Subpopulationen zu vermeiden, wurden die Zellen zunächst aus den Wells abgeerntet und gepoolt. Nachdem die Zellzahl bestimmt worden war, wurden sie auf 14 ml Röhrchen verteilt, wobei je Induktionsansatz im Idealfall  $4 \times 10^6$  Zellen verwendet wurden. Bei Raumtemperatur und 300g wurden die Zellen 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. So wurden Zelltrümmer, das dem Medium hinzugefügte IL-2 und PHA sowie andere Störfaktoren beseitigt. Die Zellen wurden resuspendiert und in 4 ml frischem Medium gelöst, dem die jeweilige Induktionssubstanz zugefügt worden war. Als Kontrolle wurde einem Ansatz ausschließlich reines Medium zugefügt. Anschließend wurden die Zellen der einzelnen Ansätze auf je 2 Wells verteilt und bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre 8 h inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen wie unter 2.2.6 beschrieben geerntet und für die folgende mRNA-Extraktion vorbehandelt.

### **2.2.6 Zellernte**

Damit die RNA aus den T-Lymphozyten extrahiert werden konnte, mussten diese aus den 24-Well-Platten abgeerntet werden. Die Zellernte erfolgte nach 8 bis 9 Tagen Proliferation und anschließender 8stündiger Inkubation in Normalmedium nach Zusatz der Pharmaka.

Für die Zellernte musste zunächst dafür gesorgt werden, dass sich die am Boden der Wells abgelagerten Zellen in Suspension begeben. Dies geschah durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren. Die so erhaltene Zellsuspension wurde nun jeweils in 14 ml Röhrchen überführt und 5 min bei 300g und 4 °C zentrifugiert. Nach Entnahme von 1 ml Überstand für weitere Experimente und Absaugen des restlichen Überstandes wurde das Zellpellet in 3 ml PBS resuspendiert, nochmals zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die darauffolgende Resuspension erfolgte in 1 ml PBS. Es schloss sich ein weiterer letzter Zentrifugationsschritt an, nach welchem die Zellen für die RNA-Extraktion verwendet werden konnten.

## **2.2.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)**

### **2.2.7.1 Allgemeines und Prinzip**

Die Polymerasekettenreaktion (engl. polymerase chain reaction) ist ein Verfahren zur selektiven Vervielfältigung spezifischer DNA-Sequenzen. Spezifische Transkriptionsprodukte (mRNA einer Zelle) können so amplifiziert werden, dass ein Nachweis mittels Gelelektrophorese ermöglicht wird. Hierfür muss die mRNA aus den Zellen isoliert und in cDNA umgeschrieben werden. Um den gewünschten Genbereich einzugrenzen, werden zwei zur cDNA komplementäre Primer verwendet. Die Amplifikation wird mit Hilfe einer Taq-Polymerase (DNA-Polymerase) des Bakteriums *Thermophilus aquaticus* durchgeführt. Dieses Enzym ist hitzestabil und denaturiert somit auch bei den für die PCR benötigten höheren Temperaturen nicht.

Der PCR-Prozess besteht in der Regel aus 30 bis 35 Zyklen, welche in einem Thermocycler durchgeführt werden, der die präzise Einstellung unterschiedlicher Temperaturen ermöglicht. Jeder dieser Zyklen besteht aus drei Schritten:

1. Denaturierung: Durch Erhitzen der doppelsträngigen DNA auf 94°C werden deren Stränge getrennt.
2. Hybridisierung: Abkühlen auf die für den Primer optimale Bindungstemperatur (annealing temperature), meist zwischen 50 und 70°C.
3. Elongation: Erhitzen auf 72°C, das Temperaturoptimum der Taq-Polymerase. Die Polymerase füllt nun die fehlenden Stränge mit freien Nukleotiden auf, wobei sie am 3'-Ende des angelagerten Primers beginnt und dem DNA-Strang folgt.

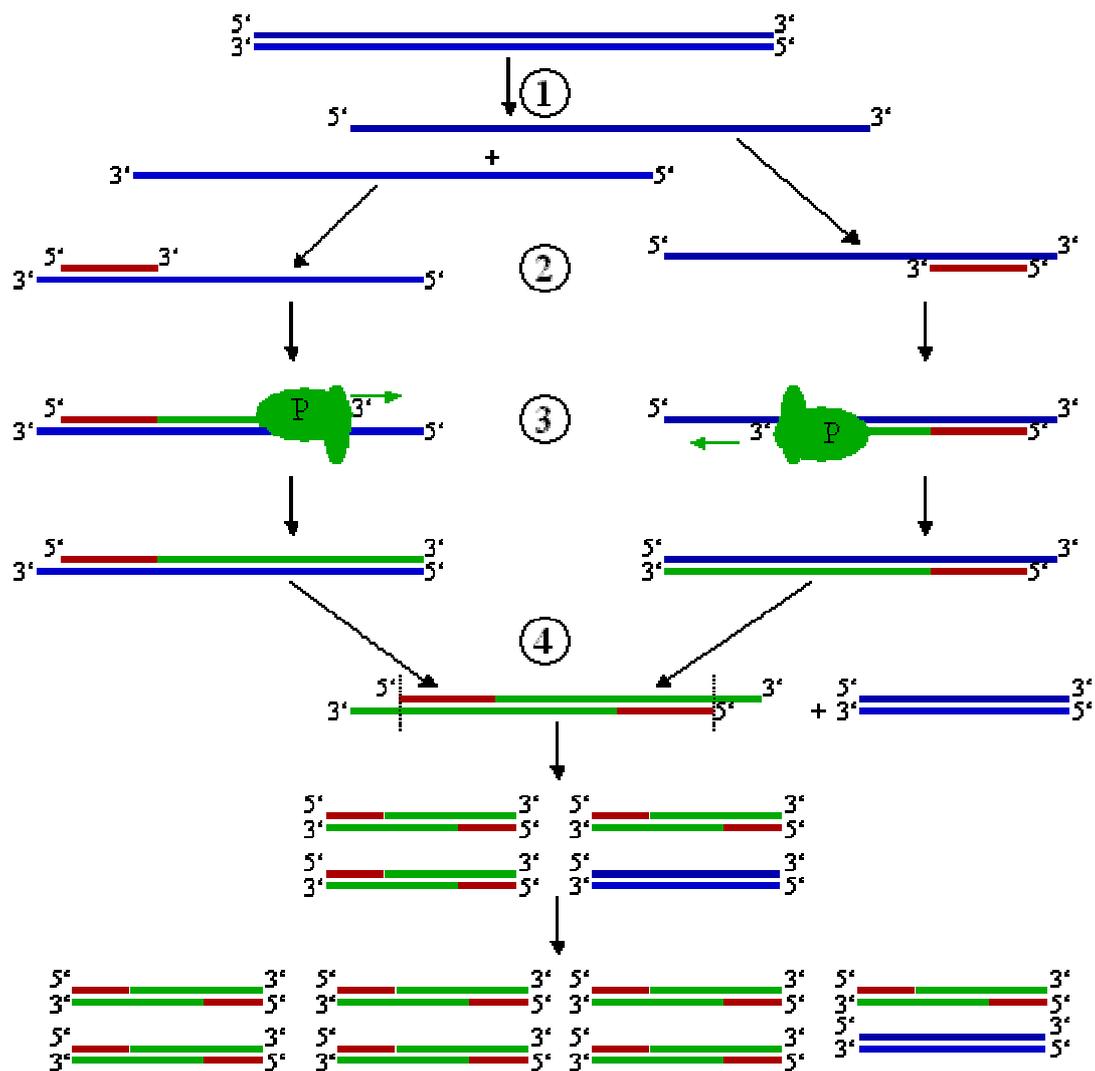


Abbildung 3: Schematische Darstellung des PCR-Zyklus.

(1) Denaturierung, (2) Hybridisierung, (3) Elongation, (4) erster Zyklus beendet.

Durch mehrfache Wiederholung des PCR-Zyklus wird das gewünschte DNA-Fragment exponentiell amplifiziert.

### 2.2.7.2 RNA-Extraktion

Um die in der PCR zu amplifizierende cDNA zu erhalten, musste aus den T-Lymphozyten zuerst die mRNA extrahiert werden. Die Extraktion erfolgte mit Hilfe eines RNeasy-Minikits der Firma Qiagen. Vor Extraktionsbeginn wurde

der RPE-Puffer mit 100%igem Ethanol verdünnt und 1 ml des im Kit enthaltenen RLT-Puffers mit 10 µl Mercaptoethanol versetzt.

Für die RNA-Extraktion wurden die Zellen wie unter 2.2.6 beschrieben geerntet und vorbereitet. Nach der letzten Zentrifugation und dem Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen im ersten Schritt durch Zugabe von je 350 µl RLT-Pufferlösung und 70%igem Ethanol lysiert. Die Homogenisierung der Suspension wurde mit einer Insulinspritze vorgenommen, bis keine Zellklümpchen mehr zu sehen waren. Jetzt wurde das gesamte Volumen auf eine Säule (SpinColumn) des Minikits übertragen und bei Raumtemperatur und 10000 U/min 15 s lang zentrifugiert. Aufgrund von Ionenaustauschereffekten bindet diese Säule die RNA. Anschließend wurde die Säule durch Auftragen von 350 µl RW1-Puffer und wiederholter Zentrifugation unter oben genannten Bedingungen gewaschen und das Eluat verworfen. Auf die Säulenmitte wurden nun 10 µl DNase I Stocksolution und 70 µl RDD-Puffer aufgetragen und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dadurch wurde die nicht erwünschte DNA zerkleinert. Die folgenden Waschschriffe wurden einmal mit 350 µl RW1-Puffer und dann zweimal mit je 500 µl RPE-Puffer durchgeführt, wobei die Zentrifugation beim dritten Waschschriff 2 min lang bei 20000 U/min erfolgte. Zum Trocknen der Säule und zur Entfernung der Ethanolrückstände wurde nach Verwerfen des Eluats nochmals 15 s bei 20000 U/min zentrifugiert. Die RNA konnte nun eluiert werden. Um die RNA aufzufangen, musste die Säule vorab in ein Eppendorf-Cup eingesetzt werden. Es wurden 40 µl RNase-freies ddH<sub>2</sub>O auf die Säule aufgetragen. Nach 1 min Zentrifugation bei 10000 U/min konnte die RNA-H<sub>2</sub>O-Suspension im Eppendorf-Cup vorgefunden werden. Die Proben wurden sofort auf Eis gestellt.

Ein Teil der Suspension wurde für die RNA-Quantifizierung entnommen. Die Instabilität der RNA und das ubiquitäre Vorkommen von RNase erforderten ein schnelles Umschreiben in cDNA.

### 2.2.7.3 Quantifizierung der RNA

Die RNA-Quantifizierung wurde mit Hilfe eines Photometers vorgenommen. 2 µl RNA-H<sub>2</sub>O-Suspension wurden hierfür mit 98 µl Ampuwa-Wasser versetzt (Verdünnung 1:50) und die Extinktion bei 260 nm und 280 nm gegen reines Ampuwa-Wasser gemessen. Da die Extinktion die Absorption des Lichts durch die RNA beschreibt, ist sie proportional zur RNA-Menge. Für die Quantifizierung war die Lichtabsorption bei einer Wellenlänge von 260 nm ausschlaggebend, da RNA bei 260 nm ein Extinktionsmaximum hat. Das bedeutet, dass Licht dieser Wellenlänge bevorzugt von RNA und nur in geringerem Maße von anderen Substanzen absorbiert wird.

Der Quotient  $E_{260\text{nm}}/E_{280\text{nm}}$  gibt die Reinheit der RNA an und sollte immer zwischen 1,5 und 2,0 liegen.

Die RNA-Menge wurde durch Einsetzen der Extinktion  $E_{260\text{nm}}$  in folgende Formel berechnet:

$$[\text{RNA in ng}/\mu\text{l}] = E_{260} * 40 \text{ (Extinktionskoeffizient)} * 50 \text{ (Verdünnung)}$$

### 2.2.7.4 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese beinhaltet die Übersetzung der Einzelstrang-RNA in eine komplementäre Doppelstrang-DNA. Erst diese kann für die PCR genutzt werden. Für die Umschreibung benötigte Reagenzien wurden dem RT-for-PCR-Kit der Firma Clontech entnommen, welches stets bei -20°C gelagert wurde. Vor Gebrauch wurden die Reagenzien schonend auf Eis aufgetaut.

In einem Eppendorf-Cup wurde im ersten Schritt 1 µg RNA mit 1 µl Oligo(dT)primer versetzt. Um die RNA zu strecken und so die Anlagerung des Poly-A-Schwanzes zu ermöglichen, wurde dieses Gemisch 2 min bei 72°C inkubiert. Durch anschließendes sofortiges Kühlen auf Eis konnte verhindert werden, dass sich die RNA wieder zusammenzieht.

Die eigentliche Komplementierung erforderte stabile pH-Verhältnisse, einen Lieferanten komplementärer Basen, den Schutz der RNA und einen Katalysator für den Umschreibprozess. Diese Bedingungen wurden durch Zufügen von 4 µl eines 5xReaktionspuffers, 1 µl dNTP-Mix, 5 µl rekombinanter RNase-Inhibitor

und 1 µl MMLV-Reverse-Transkriptase erfüllt. Die Mischung wurde nun 1 h bei 42 °C inkubiert. Die abschließende vierminütige Phase bei 94 °C veranlasste den Synthesestopp. Die gewonnene cDNA wurde bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C gelagert.

### 2.2.7.5 Amplifikation der cDNA

Für die Amplifikation der cDNA wurden PCR-Reagenzien der Firma Roche verwendet. Diese wurden stets bei -20 °C gelagert und erst unmittelbar vor Gebrauch schonend auf Eis aufgetaut.

In einem sterilen 0,5 ml Eppendorf-Cup wurde zunächst ein für die PCR spezielles Reaktionsgemisch hergestellt. Das Reaktionsgemisch setzte sich zusammen aus 13 µl RNase freiem Wasser, 2,5 µl 10xPCR-Puffer zur pH-Stabilisation, 4,5 µl (25 mM) MgCl<sub>2</sub> zur Stabilisation der Taq-Polymerase, 0,5 µl (10mM) dNTP-Mix als Taq-Polymerase-Substrat und je 0,5 µl Upper- und Lower-Primer zum Eingrenzen des zu amplifizierenden Genbereichs. Dem Gemisch wurde 1 µl Taq-Polymerase hinzugefügt. Zuletzt wurden 2,5 µl der cDNA beigemischt. Der mit der Reaktionslösung gefüllte Eppendorf-Cup wurde nun in einen vorgewärmten PCR-Block überführt (Warmstart) und das Programm gestartet.

Gen	Länge	Denaturierung	Annealing	Extension	Zyklen
GAPDH	983bp	94 °C/1 min	60 °C/1 min	72 °C/10 min	35
IL-1β	802bp	94 °C/45 s	60 °C/45 s	72 °C/90 s	35
IL-2	458bp	94 °C/45 s	60 °C/45 s	72 °C/90 s	35
IL-6	628bp	94 °C/45 s	60 °C/45 s	72 °C/90 s	35
IL-8	289bp	94 °C/45 s	60 °C/45 s	72 °C/90 s	35
IL-16	347bp	94 °C/45 s	60 °C/45 s	72 °C/90 s	35
IL-18	341bp	94 °C/45 s	60 °C/45 s	72 °C/90 s	35

**Tabelle 2: PCR-Protokoll**

### **2.2.7.6 Gelelektrophorese**

Zur Herstellung des Agarosegels wurden 6 g Agarose in 400 ml 10xTBE-Puffer gelöst. Nachdem der Lösung noch ein Magnettisch hinzugefügt worden war, wurde sie in der Mikrowelle 10 min bei 600 W aufgekocht. Anschließend wurden 10 µl Ethidiumbromid hinzugegeben und das Gel unter stetigem Rühren mit Hilfe eines Magnetrührers bis auf 60°C abgekühlt. 150 ml des abgekühlten Gels wurden in die Gelkammer gegossen. Sobald das Gel ausgehärtet war, wurde die Gelkammer mit TBE-Puffer geflutet, um ein Austrocknen des Gels zu verhindern.

Nun konnte mit der eigentlichen Gelelektrophorese begonnen werden. Je 20 µl eines PCR-Produktes wurden mit 5 µl Ladepuffer gemischt. Von dieser Mischung wurden 20 µl in eine Geltasche pipettiert. Um die Basenpaarlänge der einzelnen PCR-Produkte ermitteln zu können, wurden 10 µl eines Eichmarkers in eine der Geltaschen gefüllt. Die Gelelektrophorese wurde bei einer Spannung von 60 mV und einer Stromstärke von 40-60 mA durchgeführt. Im elektrischen Feld wandert die negativ geladene DNA in Richtung Plus-Pol. Die zurückgelegte Strecke im Gel richtet sich nach der Basenpaarlänge der einzelnen Fragmente. So wandern kleinere Fragmente schneller als größere durch das Agarosegel. DNA-Fragmente gleicher Basenpaarlänge bilden Banden im Agarosegel. Die einzelnen Banden konnten mit Hilfe von Ethidiumbromid sichtbar gemacht und fotografiert werden, da dieses an DNA bindet und im UV-Licht fluoresziert. Die Bandendicke lässt Rückschlüsse auf die Genmenge zu, die Auswertung ist jedoch nur als semiquantitativ zu betrachten.

### **2.2.8 LightCycler-RT-PCR**

#### **2.2.8.1 Allgemeines und Prinzip**

Im Gegensatz zur herkömmlichen RT-PCR ist es mit der LightCycler-RT-PCR möglich, die erhaltenen Genprodukte zu quantifizieren. Das spezifische Produkt

wird mit einem internen Standard (hier: GAPDH) verglichen und das Verhältnis gebildet. Ein weiterer Vorteil ist die sehr viel schnellere Amplifikation.

Der LightCycler besteht aus zwei Einheiten. Die obere enthält die Heizspirale, die untere die Temperaturkammer, in welcher das Probenkarussell, das Fluorimeter, die Motoren, sowie die Energieversorgung untergebracht sind.

Während das Grundprinzip der DNA-Amplifikation beim LightCycler und der herkömmlichen PCR dasselbe ist, unterscheidet sich das Arbeitsprinzip des LightCyclers in einigen Punkten.

Die Temperatur wird über eine Heizspirale geregelt, die warme Luft erzeugt, welche durch einen Ventilator gleichmäßig in der Kammer verteilt wird. So ist eine homogene Temperaturverteilung gewährleistet. Abkühlung wird durch Zufuhr von Raumluft erreicht. Da die Proben für die LightCycler-PCR in spezielle kleine Glaskapillaren pipettiert werden, ist das erforderliche Reaktionsvolumen minimal. Sowohl die Wärmeregulation durch Luft als auch das optimale Oberflächen-Volumen-Verhältnis der Kapillaren machen schnelle Temperaturänderungen möglich.

Durch eine Lichtquelle in der PCR-Kammer werden die Proben mit einer Emissionswellenlänge von 470 nm angeregt. Die Messung der Fluoreszenz erfolgt je nach Fluoreszenzträger der PCR-Reagenzien durch einen der drei Photodetektoren bei 530 nm, 640 nm oder 710 nm. Wird SYBR Green I verwendet, wird bei 530 nm gemessen. Bei SYBR Green I handelt es sich um einen Fluoreszenz-Farbstoff, der spezifisch doppelsträngige DNA bindet. Dies geschieht bei jedem Amplifikationsschritt und macht so die Detektion mittels Fluoreszenz und die Quantifizierung möglich.

Die Qualität des PCR-Produktes kann nach Abschluss der Amplifikation anhand der erstellten Schmelzkurve beurteilt werden. Ein sauberes PCR-Produkt erzeugt in der graphischen Darstellung der Schmelzkurve einen einzigen schmalen Peak, der dem Schmelzpunkt entspricht. Grund dafür ist ein rasches und vollständiges Schmelzen bei einer produktspezifischen Temperatur. Dadurch können spezifische von unspezifischen Produkten getrennt werden.

Im Anschluss an die Amplifikation wird die Kopienanzahl des spezifischen Produktes einer Probe durch die LightCycler-Software ermittelt. Von jeder Probe wird als interner Standard zusätzlich ein Gen amplifiziert, das in jeder Zelle vorhanden ist, wie z.B. GAPDH. Aus beiden Kopienzahlen wird das Verhältnis bzw. die Ratio gebildet. Dadurch werden etwaige Unterschiede in der cDNA-Menge einzelner Proben weitgehend ausgeglichen und ein quantitativer Vergleich der Proben untereinander ermöglicht.

### **2.2.8.2 Durchführung der LightCycler-PCR**

Für die LightCycler-PCR wurde ein FastStart DNA Master SYBR Green I Kit der Firma Roche verwendet. In diesem Kit sind eine speziell für den LightCycler geeignete FastStart Taq DNA Polymerase und der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I enthalten. Die Taq-Polymerase ist chemisch modifiziert, d.h. sie ist an einigen Aminoenden durch hitzeempfindliche Gruppen blockiert, so dass das Enzym bei Raumtemperatur in inaktiver Form vorliegt. Dies ist für die Durchführung der Pipettierschritte bei Raumtemperatur von großer Bedeutung. Werden die Proben im LightCycler bei 95°C denaturiert, wird durch diese Temperaturerhöhung auch die Taq Polymerase aktiviert. Die Amplifikation unspezifischer Primerbindungen wird dadurch ebenfalls weitestgehend verhindert.

Zur Qualitätskontrolle der PCR wurde eine Standard-Verdünnungsreihe mit einem dsDNA-Molekül bekannter Konzentration in vier Verdünnungen amplifiziert. Die Quantifizierung der Produkte gilt als exakt, wenn alle drei Werte auf einer anhand der Standardwerte ermittelten Regressionsgeraden liegen. Als Standard wurde z.B. HPRT eingesetzt.

Um die Standard-Verdünnungen herzustellen, wurden zunächst 2 µl Standard zu 18 µl Standard-Stabilisator-Lösung zupipettiert, durch gründliches Vortexen vermischt und abzentrifugiert. Dieses Gemisch wurde erneut 1:10 verdünnt und dieser Vorgang noch zweimal wiederholt, so dass letztendlich 4 Verdünnungen vorlagen (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000).

Der Standard-Primer-Mix wurde aus 30  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  für PCR, 10  $\mu\text{l}$  HPRT-Primer und 10  $\mu\text{l}$  SybrGreen hergestellt.

Nun wurden je 10  $\mu\text{l}$  Primer-Mix und Standard-cDNA in die Kapillaren pipettiert. Der Proben-Mix setzte sich aus 14  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$ , 2  $\mu\text{l}$  Primer (hier: IL-16) und 2  $\mu\text{l}$  SybrGreen zusammen. Dieser Mix wurde entsprechend der Probenanzahl vervielfacht und jeweils 18  $\mu\text{l}$  zusammen mit 2  $\mu\text{l}$  cDNA in die Kapillaren pipettiert. Während des Pipettierens sorgte ein spezieller vorgekühlter Zentrifugen-Adapter für eine ausreichend kalte Umgebungstemperatur. Nach Abschluss der Pipettiervorgänge wurden die Proben in diesem Adapter 1 min bei 1200 U/min zentrifugiert. Schließlich erfolgte die Überführung in das LightCycler-Karussell und das Starten der PCR.

### **2.2.8.3 Quantifizierung im LightCycler**

Zur Quantifizierung der einzelnen Proben wurde die „Fit-Point“-Methode gewählt, da hier die „Crossing Line“ (CL) selbst gewählt werden kann. Das hat den Vorteil, dass auch bei minimalen Kopienzahlen die Messungen quantifizierbar sind. Die Einstellung der CL wurde so vorgenommen, dass der errechnete Fehlerwert minimal und der Korrelationskoeffizient  $r$  annähernd 1 ist. Zudem sollte die Kopienzahl der mitgeführten externen Standards möglichst exakt bei den vorgegebenen Werten liegen.

Das Prinzip der Methode ist folgendes. Für jede einzelne Probe wird eine log-lineare Fluoreszenzkurve mit Hilfe von zwei im Bereich des linearen Anstiegs der Fluoreszenz liegenden Messpunkten ermittelt. Der Schnittpunkt dieser Kurve mit der CL wird „Crossing Point“ (CP) genannt. Dieser wird als Zykluszahl angegeben. Die CPs der drei Standards dienen der Ermittlung einer Standardkurve. Dies geschieht durch Eintragung dieser CPs in ein Achsenkreuz, in welchem in logarithmischer Form die Zykluszahl gegen die Kopienzahl aufgetragen wird. Die Standardkurve ermöglicht nun die Bestimmung der Kopienzahlen entsprechend der einzelnen CPs der Proben. Aus diesen Kopienzahlen wurden die IL-16/GAPDH-Ratios gebildet, die dann die Ausgangsdaten für die statistische Beurteilung darstellten.

## **2.2.9 Durchflusszytometrie**

### **2.2.9.1 Allgemeines und Prinzip**

Die Durchflusszytometrie, auch FACS (fluorescence activated cell sorting) genannt, bezeichnet ein Verfahren, mit welchem unterschiedliche Zellpopulationen aufgrund ihrer Größe, Granularität und ihrer Oberflächenmerkmale analysiert werden können. So ist es z.B. möglich, Lymphozytenpopulationen innerhalb einer PBMC-Kultur zu betrachten.

Das Prinzip der Untersuchung beruht auf Streuung oder Emission von Licht durch die Zelle im Laserstrahl. Dafür werden die sich in einer Lösung befindenden Zellen durch eine Kapillare angesaugt, so dass sie einzeln im Sensormodul den Laserstrahl passieren können. Dabei erzeugt die Zelle Streulicht bzw. Fluoreszenzimpulse, wenn sie mit einem Farbstoff entsprechend markiert wurde. Daraus lassen sich unterschiedliche Eigenschaften der Zelle ableiten. Das Streulicht wird durch die Zellgröße, die Struktur der Zellwand sowie auch durch intrazelluläre Bestandteile beeinflusst. Die Zellen können so in unterschiedliche Fraktionen sortiert und gezählt werden.

Bezüglich des Streulichts sind zwei Parameter ausschlaggebend. Das Vorwärtsstreulicht FSC (forward scatter) dient als Maß für die Zellgröße, das Seitwärtsstreulicht SSC (side scatter) hingegen als Maß für die Granularität, also die Größe und Struktur des Zellkerns etc. Wird eine Sortierung nach bestimmten Oberflächenmerkmalen (z.B. CD) gewünscht, muss die Probe vorher mit entsprechenden Antikörpern inkubiert werden, die an verschiedene fluoreszierende Farbstoffe gebunden sind. Durch den Einsatz verschiedenfarbiger Laser kann die Anzahl der einsetzbaren Farbstoffe und damit die Informationsdichte erhöht werden.

### **2.2.9.2 Durchführung der Durchflusszytometrie**

Der Nachweis des Zelltyps der Zellkulturen erfolgte mittels Durchflusszytometrie.

Zunächst wurde ein FACS-Waschpuffer aus 500 ml DPBS, 500 mg BSA und 325 mg Natriumazid hergestellt.

Pro Ansatz wurden  $5 \times 10^4$  Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden einmal mit DPBS gewaschen und 5 min bei Raumtemperatur und 300g zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die pelletierten Zellen in FACS-Waschpuffer (FWP) aufgenommen und auf Wells einer 96-Well-Platte verteilt. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen der verschiedenen Rezeptoren der Zellen wurde die Zellsuspension 10 min auf Eis mit 1% Polyglobin inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 200  $\mu$ l FWP pro Well gewaschen und 3 min bei 10°C und 1200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen resuspendiert. Dieser Waschvorgang wurde noch zweimal wiederholt.

Nun wurden die Zellen mit den fluoreszenzmarkierten Antikörpern bzw Isotypkontrollen gefärbt. Die eingesetzten Mengen der Antikörperlösungen, die in mehreren Vorversuchen austitriert worden waren, sind in den nachfolgenden Tabellen aufgelistet.

<b>FITC-Ak</b>	IgG1-FITC	CD3-FITC	CD4-FITC	CD8-FITC
<b>Menge</b>	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l

**Tabelle 3: FITC konjugierte Antikörper**

<b>PE-Ak</b>	IgG1-PE	CD3-PE	CD14-PE	CD16-PE	CD19-PE
<b>Menge</b>	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l

**Tabelle 4: PE konjugierte Antikörper**

<b>PerCP-Ak</b>	IgG1-PerCP	CD4-PerCP	CD8-PerCP
<b>Menge</b>	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l

**Tabelle 5: PerCP konjugierte Antikörper**

Zum Färben der Zellen wurden jene mit der jeweiligen Antikörperlösung 15 min auf Eis lichtgeschützt inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen dreimal mit FWP gewaschen und zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen

in 200 µl FWP resuspendiert und nach sorgfältigem Durchmischen in die FACS-Röhrchen geschossen, in welchen dann die Messung am FACS erfolgte. Die Messung erfolgte mit einem Durchflusszytometer der Firma Becton Dickinson. Zur Anregung von Fluorochromen wurde hier ein Argonlaser mit einer Wellenlänge von 488 nm verwendet.

Prinzipiell gestaltete sich die Messung folgendermaßen. Um unspezifische Bindungen auszuschließen und eine genaue Messeinstellung zu gewährleisten, waren zusätzlich zu den Antikörperfärbungen die jeweiligen Isotypkontrollfärbungen angefertigt worden. Zu Beginn mussten die Verstärkerspannungen für FSC und SSC so eingestellt werden, dass das übliche Scatter zur Darstellung kam. Anhand des FSC und SSC Scatter wurde um die Zielpopulation (hier: PBMC) ein sogenanntes Gate gesetzt, also ein Messbereich definiert. Dadurch wurde die Darstellung von in diesem Gate liegenden Messergebnissen (vitale PBMC) in einem neuen Achsenkreuz im Hinblick auf deren Fluoreszenz ermöglicht. Mit Hilfe der Kontrollfärbung wurden auch die Verstärkerspannungen von FL1, FL2 und FL3 auf die Zielpopulation ausgerichtet. Schließlich konnten die Proben gemessen werden. Dabei wurden stets Aliquots von 10000 gefärbten Zellen analysiert.

### **2.2.9.3 Auswertung der gemessenen Proben**

Bei der Auswertung wurde mit der Software CellQuest™ gearbeitet. Aus den Messdaten wurde ein Punktdiagramm (Dot Plot) erstellt, wobei ein Messergebnis bezüglich zweier Parameter in ein Achsenkreuz eingetragen wurde. Zunächst wurde die Zielpopulation in der Darstellung FSC/SSC gegatet. In den weiteren Schaubildern wurden die in diesem Gate liegenden Messergebnisse (PBMC) hinsichtlich ihrer Fluoreszenz und Zellgröße (FL1/2/3 auf der Ordinate und FSC auf der Abszisse) dargestellt. Zur statistischen Auswertung wurde in die Schaubilder ein Quadrant gesetzt. Häufigkeiten für jeden Quadranten konnten so durch die Software berechnet werden.

Eine weitere Möglichkeit der Auswertung ist die Histogrammdarstellung und Histogrammstatistik. Im Histogramm wird die Signalstärke pro Zelle (Abszisse)

gegen die Zellzahl (Ordinate) aufgetragen. Man erhält eine Häufigkeitsverteilung, welche die Verteilung eines Messparameters (hier: Fluoreszenzintensität) in einer Population beschreibt. Zur Erfassung der Signalintensität konnten die statistischen Optionen „Peak“, „Mean“ und „Median“ herangezogen werden. Bei einer Idealverteilung nach Gauß ergibt sich für diese Parameter derselbe Wert.

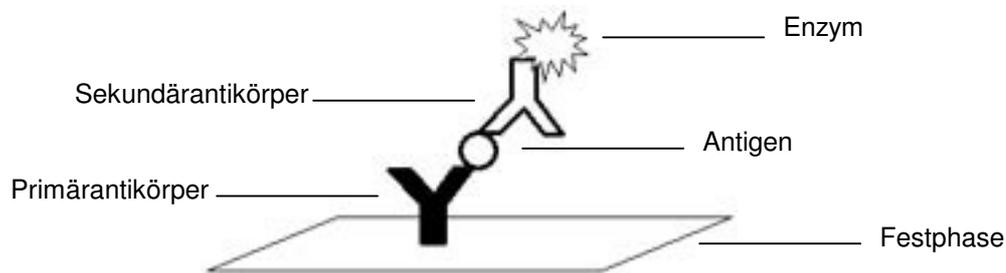
### **2.2.10 IL-16 Sandwich-ELISA**

#### **2.2.10.1 Allgemeines und Prinzip**

Der ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) ist ein sehr sensitives Verfahren zum quantitativen Nachweis eines bestimmten Antigens in einer Probe. Dieses Verfahren basiert auf dem Prinzip der spezifischen Antigen-Antikörper-Bindung.

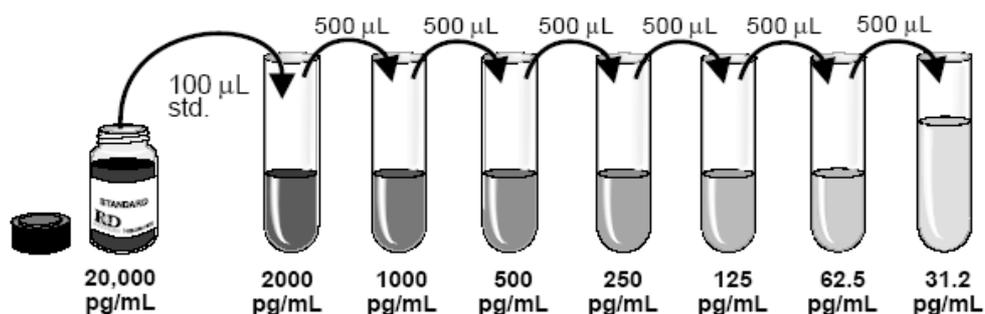
Beim Sandwich-ELISA ist ein monoklonaler Antikörper, der für das nachzuweisende Antigen spezifisch ist, an eine Festphase gebunden (gecoateter Antikörper). Wird nun die Probe zugegeben, binden alle in dieser Probe enthaltenen spezifischen Antigene nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip an diesen immobilisierten Primärantikörper. Ein erster Waschschriff dient dazu, alle nicht gebundenen Substanzen zu entfernen. Es folgt die Zugabe eines monoklonalen Sekundärantikörpers, an den ein Enzym gebunden ist. Der Sekundärantikörper bindet ebenfalls spezifisch an das nachzuweisende Antigen, jedoch an ein anderes Epitop als der Primärantikörper. Durch einen zweiten Waschschriff werden nicht gebundene Sekundärantikörper entfernt. Schließlich wird ein Substrat hinzugefügt, welches durch das an den Sekundärantikörper gebundene Enzym in ein farbiges Produkt umgewandelt wird. Dieser Farbumschlag weist also auf die Anwesenheit des Antigens hin. Die Farbintensität kann photometrisch bestimmt werden und dient so der Quantifizierung.

Für die Durchführung des ELISA wurde ein IL-16 ELISA Kit der Firma R&D Systems verwendet.



**Abbildung 4: Prinzip des Sandwich ELISA**

Um später durch photometrische Messung der Farbintensität der einzelnen Konzentrationen eine Eichkurve erstellen zu können, wurde zunächst eine IL-16 Konzentrationsreihe mit vorgegebenen IL-16 Konzentrationen hergestellt. Dem im Kit enthaltenen IL-16 Standard wurde 1 ml Aqua dest. zugefügt und das Gemisch bis zur vollständigen Lösung des IL-16 Standards geschüttelt. Die Konzentration dieser Lösung betrug 20000 pg/ml. Nun wurde eine siebenteilige Verdünnungsreihe angesetzt. Dabei wurden in einem ersten Reagenzglas 100 µl der hergestellten Standardlösung mit 900 µl des ebenfalls im Kit enthaltenen Calibrator Diluent RD5R gemischt. Daraus ergab sich eine IL-16 Konzentration von 2000 pg/ml. In den restlichen sechs Reagenzgläsern wurden jeweils 500 µl Calibrator Diluent RD5R vorgelegt und in jedem weiteren Verdünnungsschritt je 500 µl der im vorherigen Schritt hergestellten Lösung hinzugefügt. Dadurch wurde in jedem Schritt eine Halbierung der IL-16 Konzentrationen erreicht.



**Abbildung 5: Herstellung der IL-16 Konzentrationsreihe**

Zu Beginn des eigentlichen ELISAs wurden 100 µl Assay Diluent RD1W in jedes Well der im Kit enthaltenen 96-Well-Platte gefüllt, die bereits den gecoateten Primärantikörper enthielt. Anschließend wurden je 100 µl der einzelnen Proben der Standardverdünnungsreihe und der Zellüberstände der verschiedenen Inkubationsansätze hinzugefügt. Die Zellüberstände waren nach 8 h Inkubation mit den unterschiedlichen Pharmaka bzw. Hormonen abgenommen und bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert worden. Die IL-16 Konzentrationen der einzelnen Proben wurden stets doppelt bestimmt, um durch die Ermittlung von Durchschnittswerten genauere Ergebnisse zu erzielen.

Die Platte wurde nun 2 h auf dem Schüttler bei 500 rpm und Raumtemperatur inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Überstände aus den Wells abgesaugt und diese viermal mit der im Kit enthaltenen Waschlösung gewaschen. Dabei wurden pro Waschvorgang je 400 µl Waschlösung in jedes Well pipettiert und anschließend wieder vollständig abgesaugt.

Nach dem Waschen wurden in jedes Well 200 µl des Sekundärantikörpers (IL-16 Conjugate) pipettiert. Dabei handelte es sich um einen polyklonalen an das Enzym Peroxidase gekoppelten IL-16 Antikörper.

Es folgte eine weitere zweistündige Inkubation auf dem Schüttler unter oben genannten Bedingungen. Danach wurden die Überstände abgesaugt und die einzelnen Wells wie schon beschrieben gewaschen.

Schließlich wurden 200 µl Substrate Solution in jedes Well gegeben und die Platte lichtgeschützt 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit konnte

das an den Sekundärantikörper gebundene Enzym mit dem zugefügten Substrat reagieren. Dies zeigte sich durch einen Farbumschlag. Die Reaktion wurde durch Zugabe von jeweils 50 µl Stop Solution beendet. In einem ELISA-Reader konnte nun in jedem Well die Extinktion bei einer Wellenlänge von 540 nm gemessen werden.

### **2.2.11 Auswertung und statistische Beurteilung**

Die Auswertung der Ergebnisse des IL-16-ELISAs wird im Ergebnisteil (siehe 3.7) genauer erläutert.

Für die Auswertung der Untersuchung im LightCycler wurden die IL-16/GAPDH-Ratios als Ausgangsdaten verwendet. Aus diesen Daten wurden für die statistische Beurteilung die entsprechenden Mittelwerte gebildet und die Standardabweichungen berechnet. Es wurde für jede Inkubationssubstanz der Vergleich mit der Kontrolle, d.h. den unbehandelten Zellen durchgeführt. Zur Prüfung auf Signifikanz der Ergebnisse wurde der T-Test verwendet. Das Signifikanzniveau wurde bei 5% festgelegt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Zellkultur und Zellwachstum

Alle T-Lymphozytenkulturen wuchsen aus PBMC heran, die mit allogenen nicht mehr teilungsfähigen PBMC, IL-2 und dem Mitogen PHA zur Proliferation angeregt wurden. Durch diese Stimulation lagerten sich die Zellen bereits nach einem Tag in regelrechten Zellklümpchen zusammen, die Proliferationszentren darstellten. Diese weiteten sich mit der Zeit immer mehr aus (Abbildung 6 – 9).

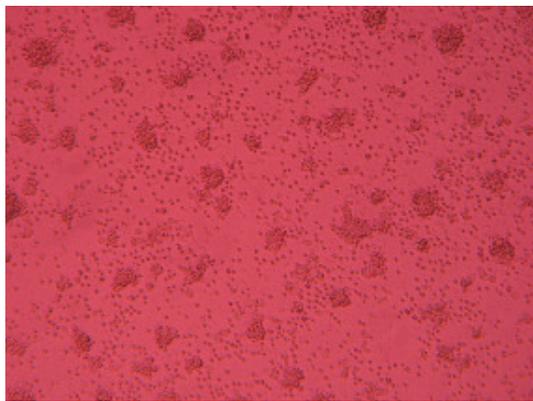


Abbildung 6: PBMC, 1d Proliferation, 10x

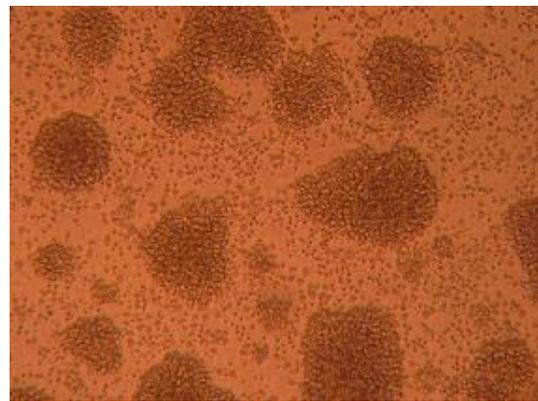


Abbildung 7: PBMC, 4d Proliferation; 10x



Abbildung 8: PBMC, 6d Proliferation, 10x

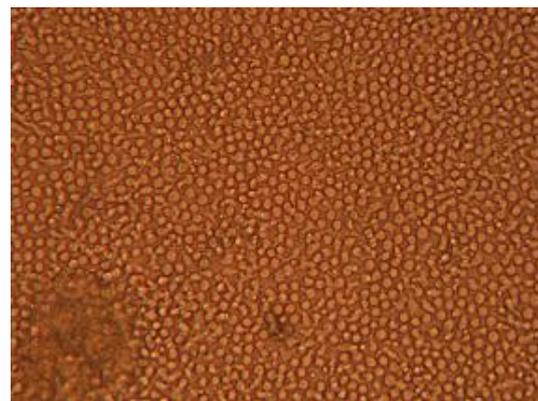


Abbildung 9: PBMC, 8d Proliferation, 20x

Wie Abbildung 9 zeigt, war der Stimulationsreiz nach 8d Proliferation bereits so abgeschwächt, dass die Zellklümpchen langsam wieder zerfielen.

Um eine annähernd reine T-Lymphozytenkultur zu erhalten, genügte eine Proliferationsdauer von 8 bis 9 Tagen (siehe 3.2 Immunphänotypisierung). Ebenso stand nach dieser Zeit eine ausreichende Anzahl von Zellen für die weiteren Versuche zur Verfügung, so dass nicht restimuliert werden musste.

### 3.2 Immunphänotypisierung

Um den Immunphänotyp der Ausgangszellpopulation (PBMC) mit dem der Zellen nach ex-vivo-Expansion (8d) vergleichen zu können, wurde eine FACS-Analyse durchgeführt. Dabei wurden die Zellen auf die Expression der Oberflächenantigene CD3, CD4, CD8, CD14, CD16 und CD19 untersucht. Die Vorkommen dieser Oberflächenantigene sind in Tabelle 6 kurz dargestellt.

Oberflächenantigen	Zelltyp
CD3	T-Zellen
CD4	T-(Helfer-)Zellen, Monocyten, Granulozyten
CD8	T-(Killer-, Suppressor-)Zellen, NK-Zellen
CD14	Monocyten, Makrophagen, Granulozyten
CD16	NK-Zellen, Monocyten, Makrophagen, Neutrophile
CD19	B-Zellen

**Tabelle 6: Oberflächenantigene**

Die Ausgangszellpopulation war zu 84% CD3 positiv, die expandierten Zellen hingegen stellten nahezu eine komplett CD3 positive Population dar (99% CD3 positiv). Dies wird in den Abbildungen 10 und 11 verdeutlicht.

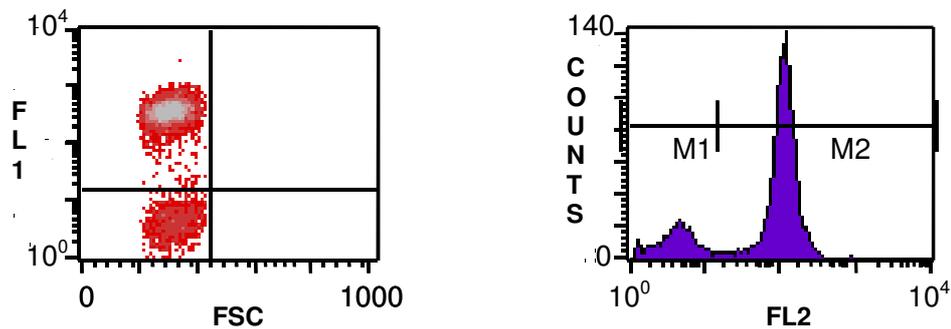


Abbildung 10: CD3<sup>+</sup> Zellen in der Ausgangspopulation

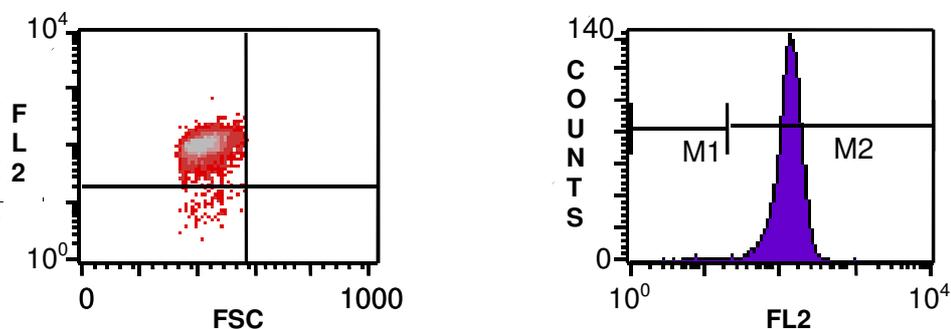


Abbildung 11: CD3<sup>+</sup> Zellen nach 8d Expansion

Betrachtet man die CD4 und CD8 positiven Zellen, so zeigte sich fast eine Umkehrung des Verhältnisses dieser zwei Populationen während der Expansion. In der Ausgangspopulation zeigten sich 52% der Zellen CD4 positiv (Abb. 12) und 28% CD8 positiv (Abb. 13). Das Verhältnis CD4<sup>+</sup> : CD8<sup>+</sup> war also 1,86 : 1. Nach 8d Proliferation waren CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen annähernd im Verhältnis 1 : 1,72 vorhanden (36% CD4<sup>+</sup>, 62% CD8<sup>+</sup>, Abb. 14, 15).

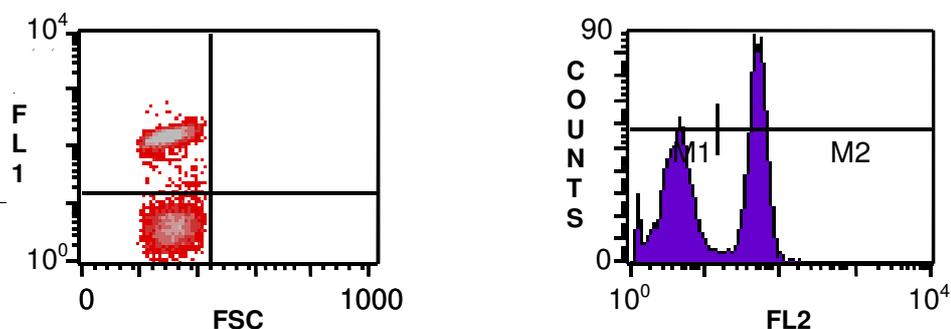


Abbildung 12: CD4<sup>+</sup> Zellen in der Ausgangspopulation

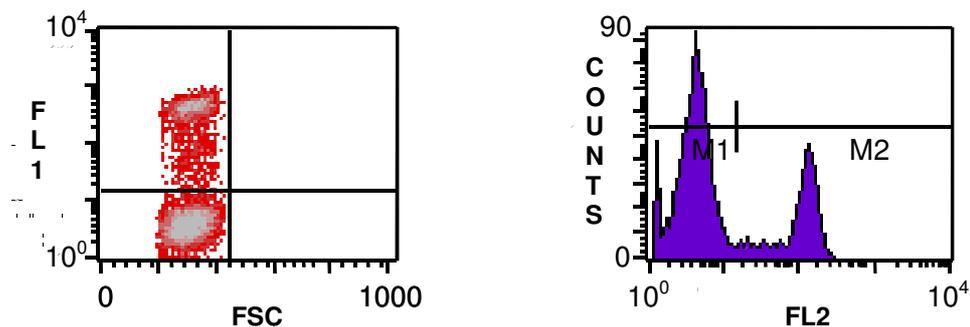


Abbildung 13: CD8<sup>+</sup> Zellen in der Ausgangspopulation

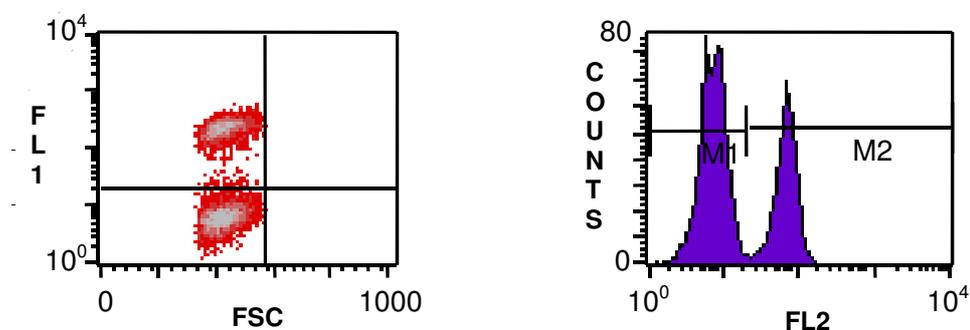


Abbildung 14: CD4<sup>+</sup> Zellen nach 8d Expansion

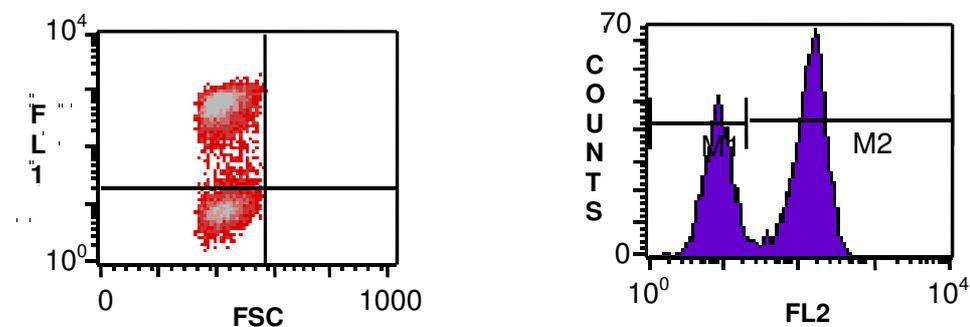


Abbildung 15: CD8<sup>+</sup> Zellen nach 8d Expansion

Die Zellpopulation wurde nach achttägiger Proliferation zusätzlich auf die Oberflächenantigene CD14, CD16 und CD19 untersucht. Alle drei Oberflächenantigene waren nur in äußerst geringfügiger Menge vertreten (1,1% CD14 positiv, 0,5% CD16 positiv, 0,6% CD19 positiv, nicht abgebildet), sodass nach der gewählten Proliferationsdauer von einer reinen T-Lymphozytenpopulation ausgegangen werden konnte.

### 3.3 Polymerasekettenreaktion

T-Lymphozyten wurden hinsichtlich der Transkription verschiedener Interleukine untersucht. Diese waren IL-1 $\beta$  (802bp), IL-2 (458bp), IL-6 (628bp), IL-8 (200bp), IL-16 (347bp) und IL-18 (341bp).

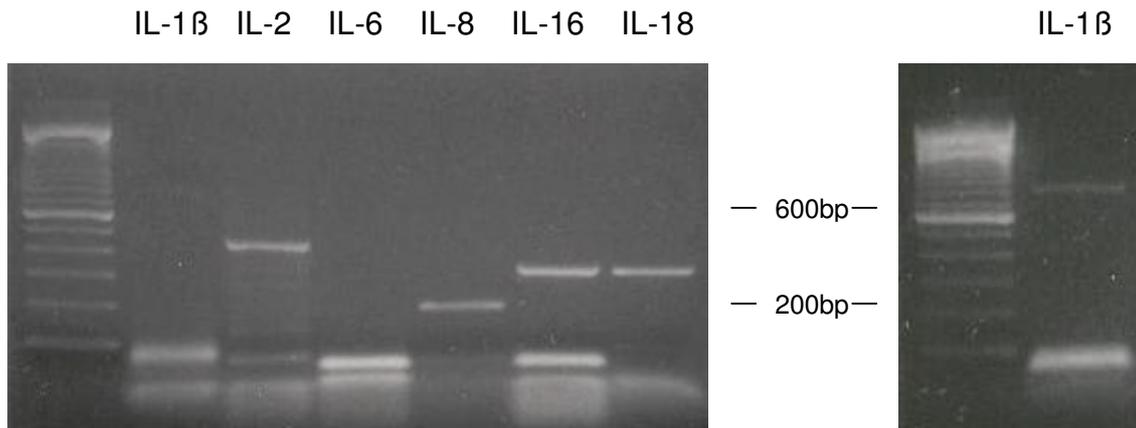


Abbildung 16: Interleukine PCR

Es zeigte sich eine spontane Transkription von IL-2, IL-8, IL-16 und IL-18. Sehr schwach war auch ein IL-1 $\beta$ -Signal vorhanden. Die spontane Transkription von IL-6 konnte nicht nachgewiesen werden.

Nach jeder mRNA-Isolation und anschließender cDNA-Synthese wurde vor der Quantifizierung im LightCycler das Vorhandensein von DNA mit der herkömmlichen RT-PCR bestätigt. Da das Gen GAPDH in jeder Zelle vorhanden ist, eignete es sich sehr gut für diese Untersuchung. Gleichmäßige GAPDH-Banden sprachen für eine gleichmäßige cDNA-Menge.

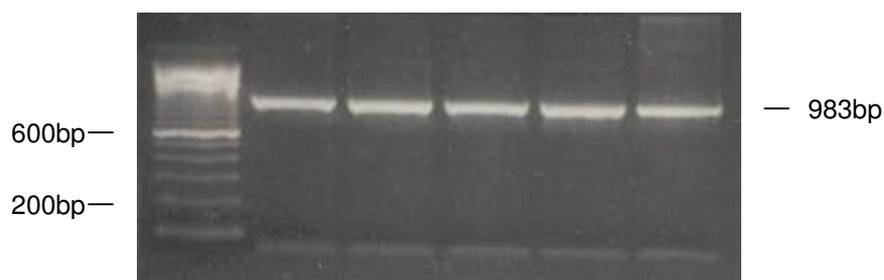


Abbildung 17: GAPDH PCR

### 3.4 Inkubationsversuche über 24 h

Um den Zeitpunkt der maximalen IL-16-Expression bei Behandlung mit Staurosporin, Forskolin, Histamin oder Serotonin zu finden, wurden T-Zellen von einem gesunden Spender über verschiedene Zeiträume, von 1h bis zu 24h mit der jeweiligen Substanz inkubiert. Eine RNA-Isolierung und nachfolgende Untersuchung der IL-16-Expression erfolgte jeweils nach einer Stunde, nach zwei, vier, acht und 24 Stunden. Die Auswahl der eingesetzten Konzentrationen stützte sich auf Ergebnisse aus Vorarbeiten und Referenzangaben aus der Literatur [44, 43, 65]. Zur späteren Beurteilung der Induktion der IL-16-Expression durch eine der Substanzen wurde jeweils eine Kontrolle (unbehandelte Zellen) mitgeführt.

Für jeden Inkubationsversuch wurden T-Lymphozyten aus Zellkulturen mit einer Proliferationsdauer von 8 Tagen nach Stimulation eingesetzt. Die Zellzahl je Probe betrug  $4 \times 10^6$ .

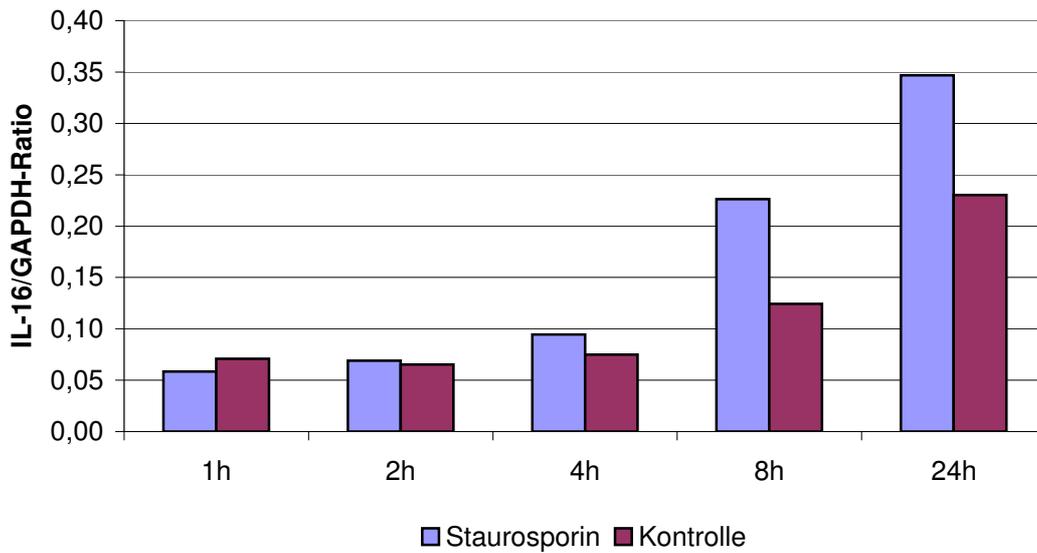
#### 3.4.1 Zeitkinetik Staurosporin

Staurosporin wurde in einer Konzentration von 10 nM eingesetzt. Die folgende Tabelle zeigt die Ergebnisse der Quantifizierung mit der LightCycler RT-PCR.

	1h		2h		4h		8h		24h	
	Stauro	Kontr.								
<b>GAPDH</b>	166200	143400	154600	154900	153800	148100	149100	139800	96130	91750
<b>IL-16</b>	9719	10140	10690	10110	14510	11080	33740	17370	33330	21140

**Tabelle 7: Kopienzahl/ $\mu$ l nach Inkubation mit Staurosporin**

Um etwaige Unterschiede in der untersuchten cDNA-Menge auszugleichen und so einen Vergleich der Ergebnisse der verschiedenen Ansätze zu ermöglichen, wurde jeweils die IL-16/GAPDH-Ratio gebildet. Sie ist in folgendem Diagramm dargestellt.



**Abbildung 18: IL-16/GAPDH-Ratio nach Inkubation mit Staurosporin**

Mit zunehmender Inkubationsdauer konnte man sowohl für die mit Staurosporin behandelten T-Lymphozyten als auch für die unbehandelte Kontrolle einen Anstieg des IL-16-Signals beobachten. Beim Vergleich mit der Kontrolle war dieser Anstieg des IL-16-Signals bei mit Staurosporin behandelten Zellen deutlich nach einer Inkubationsdauer von 8 h vorhanden. Der Induktionsindex lag hier bei 1,82, d.h. es lag eine Steigerung der IL-16-Expression um 82% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle vor. Bei länger andauernder Inkubation mit Staurosporin stieg die IL-16-Konzentration zwar weiterhin an, beim Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle war jedoch nur noch eine geringere Induktion des IL-16-Signals zu beobachten (Induktionsindex 1,50). Die Induktionsindices können Tabelle 8 entnommen werden.

Inkubationszeit	1h	2h	4h	8h	24h
Induktionsindex	0,83	1,06	1,26	1,82	1,50

**Tabelle 8: IL-16 Induktionsindices nach Inkubation mit Staurosporin**

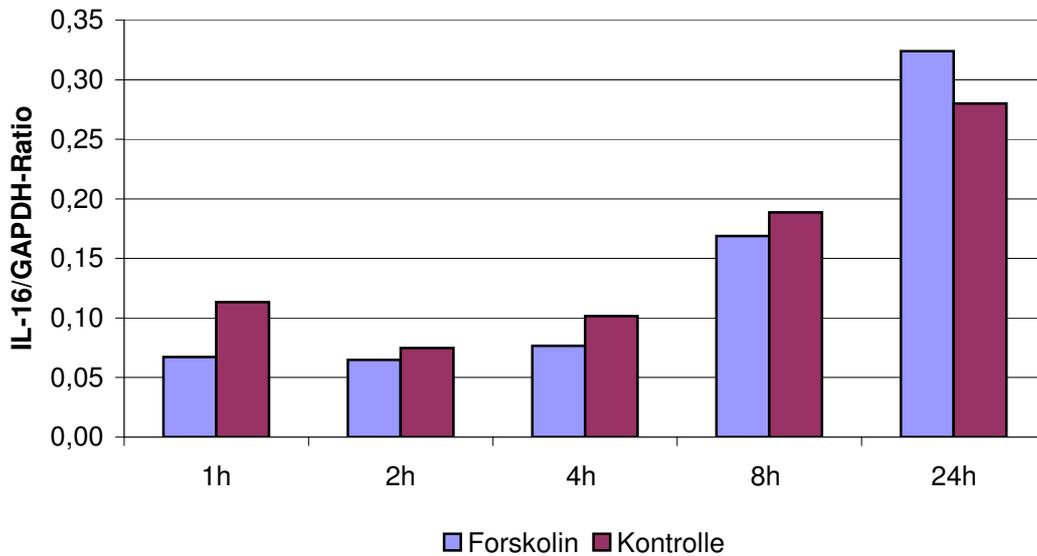
### 3.4.2 Zeitkinetik Forskolin

Die Konzentration von Forskolin in den einzelnen Proben betrug 5  $\mu$ M. Die Quantifizierung mit der LightCycler RT-PCR ergab die in Tabelle 9 aufgeführten Ergebnisse.

	1h		2h		4h		8h		24h	
	Fors	Kontr.								
<b>GAPDH</b>	3996000	2756000	3920000	4203000	3680000	3757000	3337000	3538000	2218000	2442000
<b>IL-16</b>	268700	312700	254000	314800	281800	381100	563600	667600	718800	683900

**Tabelle 9: Kopienzahl/ $\mu$ l nach Inkubation mit Forskolin**

In Diagramm 19 ist für jeden Ansatz die IL-16/GAPDH-Ratio dargestellt.



**Abbildung 19: IL-16/GAPDH-Ratio nach Inkubation mit Forskolin**

Ein Anstieg des IL-16-Signals innerhalb von 24 h war auch hier bei den mit Forskolin behandelten und bei den unbehandelten Zellen vorhanden. Bis zu einer Inkubationsdauer von 8h exprimierten die unbehandelten Zellen mehr IL-16 als die mit Forskolin behandelten. Forskolin schien hier die IL-16-Exprimierung eher zu unterdrücken. Nach 24 h Inkubation mit Forskolin stieg das IL-16-Signal im Vergleich zur Kontrolle jedoch an. Da dieser Anstieg jedoch

sehr gering war, kann nicht von einer Induktion der IL-16-Expression durch Forskolin gesprochen werden (siehe auch Tabelle 10).

Inkubationszeit	1h	2h	4h	8h	24h
Induktionsindex	0,59	0,87	0,75	0,90	1,16

Tabelle 10: IL-16 Induktionsindices nach Inkubation mit Forskolin

### 3.4.3 Zeitkinetik Histamin

Für die Inkubation mit Histamin wurde eine Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  gewählt. In Tabelle 11 sind die Ergebnisse der Quantifizierung mit der LightCycler RT-PCR dargestellt.

	1h		2h		4h		8h		24h	
	His	Kontr.								
GAPDH	241100	236300	197900	207300	253000	207100	230700	240600	154300	156300
IL-16	11150	11820	8905	11340	15750	12370	25930	21370	23310	25280

Tabelle 11: Kopienzahl/ $\mu\text{l}$  nach Inkubation mit Histamin

Diagramm 20 zeigt die IL-16/GAPDH-Ratio der einzelnen Proben.

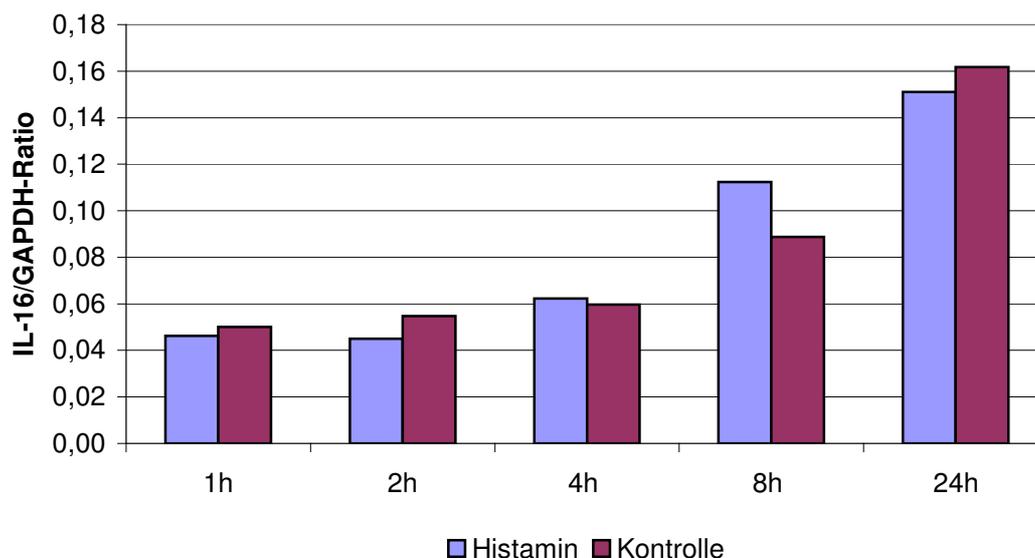


Abbildung 20: IL-16/GAPDH-Ratio nach Inkubation mit Histamin

Wie bei den schon erwähnten Zeitversuchen war auch bei diesem bereits bei den unbehandelten Zellen ein Anstieg des IL-16-Signals im Verlauf der 24stündigen Inkubation zu beobachten. Die IL-16-Expression der mit Histamin behandelten Zellen war zunächst geringer als die der unbehandelten Kontrolle, stieg aber nach 4 h Inkubation verstärkt an, so dass sie die IL-16-Expression der unbehandelten Zellen übertraf. Zum Zeitpunkt von 8h war schließlich eine sehr geringe Induktion der IL-16-Expression durch Histamin zu beobachten. Nach 24 h Inkubation kam es wieder zu einer Abschwächung des IL-16-Signals durch Histamin (siehe auch Tabelle 12).

Inkubationszeit	1h	2h	4h	8h	24h
Induktionsindex	0,92	0,82	1,04	1,27	0,93

**Tabelle 12: IL-16 Induktionsindices nach Inkubation mit Histamin**

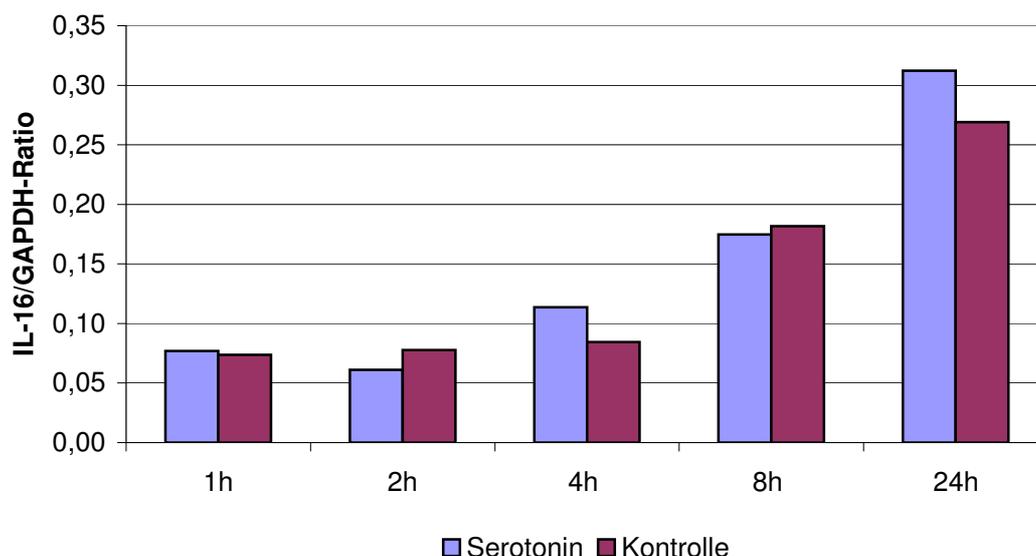
### 3.4.4 Zeitkinetik Serotonin

Serotonin wurde in einer Konzentration von 0,1  $\mu$ M eingesetzt. Tabelle 13 zeigt die Ergebnisse der Quantifizierung mit der LightCycler RT-PCR.

	1h		2h		4h		8h		24h	
	Ser	Kontr.								
GAPDH	250000	254700	251800	263200	198700	246500	277400	222600	146300	150500
IL-16	19260	18800	15400	20480	22570	20820	48470	40460	45690	40500

**Tabelle 13: Kopienzahl/ $\mu$ l nach Inkubation mit Serotonin**

Diagramm 21 zeigt die IL-16/GAPDH-Ratios.



**Abbildung 21: IL-16/GAPDH-Ratio nach Inkubation mit Serotonin**

Auch hier war ein Anstieg des IL-16-Signals während 24 h Inkubation schon bei den unbehandelten T-Lymphozyten vorhanden. Die mit Serotonin behandelten Zellen zeigten ebenso einen Anstieg des IL-16-Signals. Im Vergleich zur Kontrolle war dieser sehr unregelmäßig. Wie auch in Tabelle 14 zu sehen, schwankte der Induktionsindex innerhalb der 24stündigen Inkubation um den Wert 1,0. Daher kann weder von einer Induktion der IL-16-Expression durch Serotonin noch von einer Inhibition gesprochen werden.

Inkubationszeit	1h	2h	4h	8h	24h
Induktionsindex	1,04	0,79	1,34	0,96	1,16

**Tabelle 14: IL-16 Induktionsindices nach Inkubation mit Serotonin**

Da bei der Inkubation der T-Lymphozyten mit Serotonin wie auch bei der Inkubation mit Forskolin kein optimaler Zeitpunkt für die mRNA-Extraktion bestimmt werden konnte, richtete sich die Inkubationsdauer für die weiteren Versuche nach den Ergebnissen der 24 h Inkubation mit Staurosporin und Histamin. Für alle nachfolgenden Untersuchungen wurde deswegen eine Inkubationsdauer von 8 h gewählt.

### **3.5 Titration mit Pharmaka/ biogenen Aminen**

Nachdem nun eine Inkubationsdauer von 8 h festgelegt worden war, musste die für jede Substanz optimale Arbeitskonzentration bestimmt werden. Dies sollte diejenige Konzentration sein, bei der die maximale Wirkung auf die IL-16-Expression ohne Vitalitätsverlust der Zellen zu beobachten ist. Zur Vitalitätsprüfung wurden die Zellen vor der Isolation der mRNA unter dem Mikroskop betrachtet.

Jeder Versuch wurde mit T-Lymphozyten aus mehreren Zellkulturen mit einer Proliferationsdauer von 8 Tagen nach Stimulation durchgeführt.

Bei allen untersuchten Zellkulturen zeigte sich in der LightCycler RT-PCR ein spontanes IL-16-mRNA-Signal (siehe unbehandelte Kontrolle). Dieses IL-16-Signal wurde bei der Auswertung ins Verhältnis zum GAPDH-Signal gesetzt und als 100 Prozent gewertet bzw. mit dem Induktionsindex 1 beschrieben. Zu diesem Wert wurden die Veränderungen des IL-16-Transkriptes durch die Inkubation mit den einzelnen Substanzen in Relation gesetzt.

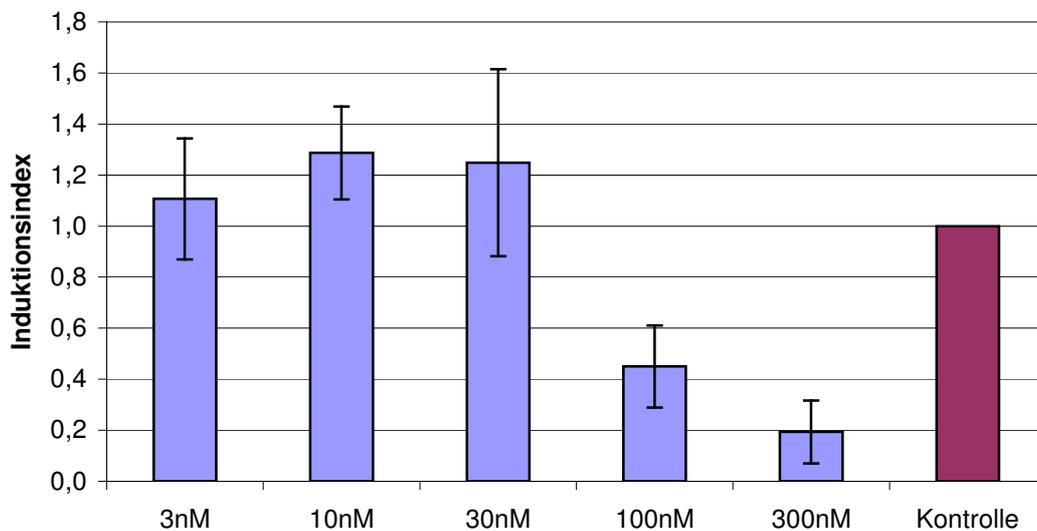
#### **3.5.1 Titration mit Staurosporin**

T-Lymphozyten wurden 8h mit Staurosporin in den Konzentrationen 3 nM, 10 nM, 30 nM, 100 nM und 300 nM inkubiert. Zusätzlich wurde eine unbehandelte Kontrolle mitgeführt. Der Vergleich der mit Staurosporin behandelten Zellen mit der unbehandelten Kontrolle diente zur Berechnung des Induktionsindex. Die LightCycler RT-PCR führte zu den Ergebnissen in Tabelle 15. Aufgeführt sind die Mittelwerte der IL-16/GAPDH-Ratios bezogen auf die Kontrolle (unbehandelte Zellen), die Standardabweichung und der T-Test für jede eingesetzte Konzentration.

Staurosporin	3nM	10nM	30nM	100nM	300nM	Kontrolle
MW	1,1067	1,2867	1,2483	0,4500	0,1933	1,0000
SA	0,2369	0,1823	0,3667	0,1609	0,1234	
T-Test	0,2724117	0,00423943	0,12817685	4,1386E-05	5,316E-07	

**Tabelle 15: Titration mit Staurosporin**

Diagramm 22 zeigt die IL-16/GAPDH-Ratio bezogen auf die Kontrolle (unbehandelte Zellen).



**Abbildung 22: IL-16-Induktionsindizes bei Titration mit Staurosporin**

Bei den unbehandelten T-Lymphozyten war nach 8 h Inkubation ein spontanes IL-16-Signal vorhanden. Durch dem Medium zugefügtes Staurosporin in einer Konzentration von 3 nM, 10 nM und 30 nM konnte die IL-16-Expression im Vergleich zur Kontrolle gesteigert werden (129%). Das Signifikanzniveau wurde allerdings aufgrund der teilweise entgegengesetzten Effekte der unterschiedlichen Zellkulturen nur bei einer Staurosporin-Konzentration von 10 nM erreicht. Bei einer Konzentration von 100 nM und 300 nM führte Staurosporin hingegen zu einer starken Abschwächung des IL-16-Signals. Auch die Menge der isolierten Gesamt-RNA war bei einer Staurosporin-Konzentration von 300 nM deutlich reduziert. Es muss hier erwähnt werden,

dass die apoptotische Wirkung von Staurosporin bei solch hohen Konzentrationen sicher nicht außer Acht gelassen werden darf.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde bei den folgenden Experimenten mit einer Staurosporin-Konzentration von 10 nM bzw. 30 nM gearbeitet.

### 3.5.2 Titration mit Forskolin

Für Forskolin wurden die Konzentrationen 2  $\mu$ M, 5  $\mu$ M und 15  $\mu$ M ausgetestet. Eine unbehandelte Kontrolle zum Vergleich wurde mitgeführt. Tabelle 16 zeigt die Ergebnisse der LightCycler RT-PCR. Dargestellt sind die Mittelwerte der IL-16/GAPDH-Ratios bezogen auf die Kontrolle (unbehandelte Zellen), die Standardabweichung und der T-Test für jede eingesetzte Konzentration.

Forskolin	2 $\mu$ M	5 $\mu$ M	15 $\mu$ M	Kontrolle
MW	1,0200	1,1733	1,0600	1,0000
SA	0,2433	0,0764	0,2594	
T-Test	0,89366827	0,01709106	0,70919349	

Tabelle 16: Titration mit Forskolin

Diagramm 23 zeigt die IL-16/GAPDH-Ratio bezogen auf die Kontrolle (unbehandelte Zellen).

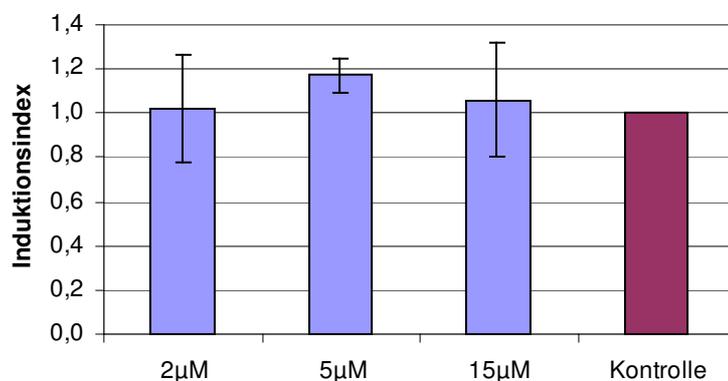


Abbildung 23: IL-16-Induktionsindices bei Titration mit Forskolin

Forskolin führte in einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  im Medium zu einer zwar statistisch signifikanten, vom Betrag her jedoch sehr geringen Erhöhung des IL-16-Signals (117%). In den Konzentrationen von 2  $\mu\text{M}$  und 15  $\mu\text{M}$  rief Forskolin bei verschiedenen Zellkulturen entgegengesetzte Effekte hervor. Insgesamt kann nicht von einem Einfluss von Forskolin auf die IL-16-Expression gesprochen werden. Deswegen wurde Forskolin bei den folgenden Induktionsversuchen nicht mehr eingesetzt.

### 3.5.3 Titration mit Histamin

Bei der Inkubation mit Histamin wurde dieses in den Konzentrationen 30 nM, 100 nM, 300 nM, 1  $\mu\text{M}$  und 3  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Ebenso wurde zum Vergleich wieder eine unbehandelte Kontrolle mitgeführt. Die Ergebnisse der LightCycler RT-PCR sind in Tabelle 17 dargestellt. Aufgeführt sind die Mittelwerte der IL-16/GAPDH-Ratios bezogen auf die Kontrolle (unbehandelte Zellen), die Standardabweichung und der T-Test für jede eingesetzte Konzentration.

Histamin	30nM	100nM	300nM	1 $\mu\text{M}$	3 $\mu\text{M}$	Kontrolle
MW	1,1933	0,9567	1,1267	1,1133	1,0433	1,0000
SA	0,3089	0,1457	0,2825	0,2318	0,1415	
T-Test	0,14173553	0,45720722	0,29787331	0,23686539	0,44458967	

**Tabelle 17: Titration mit Histamin**

Das Zufügen von Histamin zum Medium führte insgesamt bei allen eingesetzten Konzentrationen außer 100 nM zu einer minimalen bis geringen Steigerung der IL-16-Expression, die um so größer war je geringer die Histamin-Konzentration. Die Ergebnisse der einzelnen Zellkulturen schwankten allerdings so stark um den Wert 1, dass bei keiner der eingesetzten Konzentrationen das Signifikanzniveau erreicht wurde. Da jedoch eine Histamin-Konzentration von 30 nM und 300 nM in Einzelfällen zu einer deutlicheren Steigerung der IL-16-Exprimierung führte (60%), kamen in den folgenden Versuchen diese beiden Konzentrationen zum Einsatz.

Diagramm 24 zeigt die IL-16/GAPDH-Ratio bezogen auf die Kontrolle (unbehandelte Zellen).

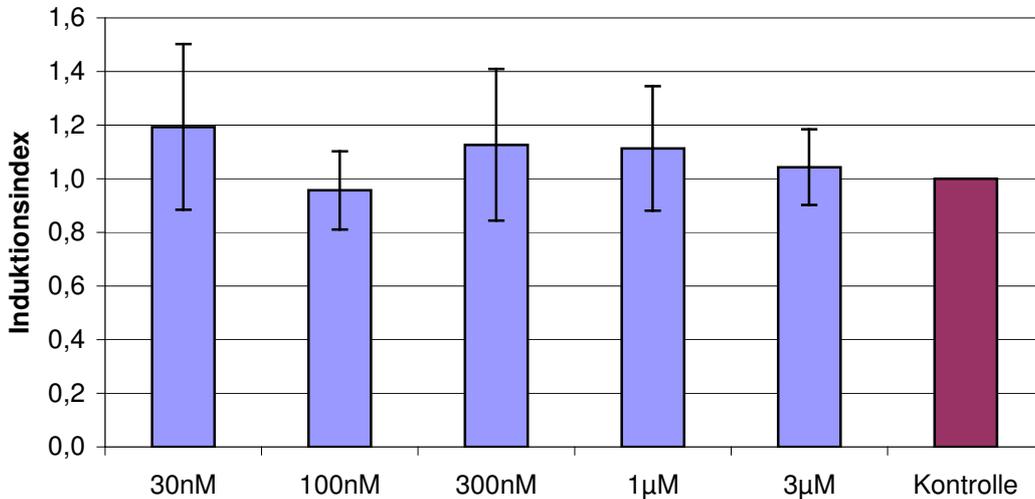


Abbildung 24: IL-16-Induktionsindizes bei Titration mit Histamin

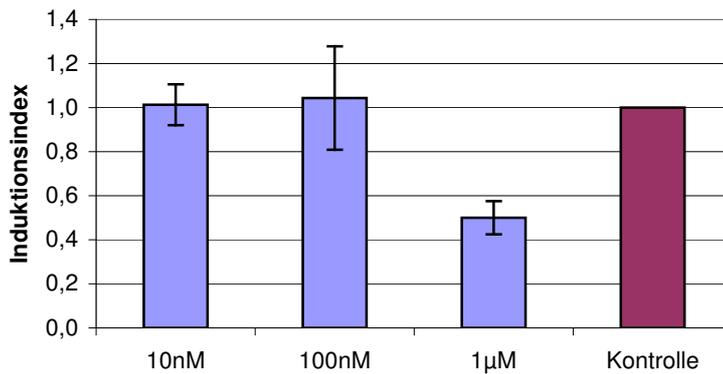
### 3.5.4 Titration mit Serotonin

Getestet wurden Serotonin-Konzentrationen von 10 nM, 100 nM und 1 µM im Medium. Zum Vergleich dienten wie in den anderen Versuchen unbehandelte Zellen (Kontrolle). Tabelle 18 enthält die Ergebnisse der LightCycler RT-PCR. Gezeigt sind die Mittelwerte der IL-16/GAPDH-Ratios bezogen auf die Kontrolle (unbehandelte Zellen), die Standardabweichung und der T-Test für jede eingesetzte Konzentration.

Serotonin	10nM	100nM	1µM	Kontrolle
MW	1,0133	1,0433	0,5000	1,0000
SA	0,0929	0,2344	0,0755	
T-Test	0,81594991	0,7648227	0,00032968	

Tabelle 18: Titration mit Serotonin

Diagramm 25 zeigt die IL-16/GAPDH-Ratio bezogen auf die Kontrolle (unbehandelte Zellen).



**Abbildung 25: IL-16-Induktionsindices bei Titration mit Serotonin**

Serotonin verursachte in den Konzentrationen 10 nM und 100 nM bei den unterschiedlichen Zellkulturen völlig entgegengesetzte Effekte. Dies ist an der Schwankung um den Wert 1 zu sehen. Eine starke Abschwächung des IL-16-Signals war bei einer Serotonin-Konzentration von 1 µM vorhanden (50%). Eine Reduktion der isolierten Gesamt-RNA wie bei Staurosporin konnte nicht nachgewiesen werden. Trotzdem könnte der Grund dafür eine apoptotische Wirkung von Serotonin in dieser Konzentration sein.

Aufgrund dieser Ergebnisse kam Serotonin bei den folgenden Induktionsversuchen nicht mehr zum Einsatz.

### 3.6 Induktion der IL-16-Expression

In den folgenden Experimenten wurden T-Lymphozyten von 4 Patienten mit rheumatoider Arthritis und von 3 gesunden Personen untersucht. Die T-Lymphozyten wurden mit Staurosporin bzw. Histamin behandelt (8 h Inkubation) und anschließend auf eine Änderung der IL-16-Transkription geprüft. Die Proliferationsdauer aller T-Lymphozytenkulturen zum Zeitpunkt der Behandlung betrug 8 bis 9 Tage nach Stimulation.

Wie bei den Titrationsexperimenten war in der LightCycler RT-PCR ein spontanes IL-16-mRNA-Signal detektierbar (siehe unbehandelte Kontrolle).

Dieses IL-16-Signal wurde bei der Auswertung ins Verhältnis zum GAPDH-Signal gesetzt und als 100 Prozent gewertet bzw. mit dem Induktionsindex 1 beschrieben. Zu diesem Wert wurden die Veränderungen des IL-16-Transkriptes durch die Inkubation mit Staurosporin bzw. Histamin in Relation gesetzt.

### **3.6.1 Inkubation mit Staurosporin, 10 nM, 30 nM**

Bei einer Staurosporin-Konzentration von 10 nM im Medium reagierten die T-Lymphozyten von 2 RA-Patienten und einer gesunden Person mit einer Steigerung der IL-16-Transkription. Bei Patient RA2 ließ sich das IL-16-Signal im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle um 79%, bei Patient RA3 um 53% und beim Gesunden G6 um 39% steigern. Bei den anderen Patienten bzw. Gesunden hatte die Inkubation mit Staurosporin in der Konzentration 10 nM keine Auswirkung auf die IL-16-Transkription.

In einer Konzentration von 30 nM führte die Inkubation mit Staurosporin bei allen untersuchten T-Lymphozytenkulturen zu einer erhöhten IL-16-Transkriptmenge im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (s.a. Tabelle 19). Bei RA-Patienten wurde im Mittel eine Erhöhung auf das 1,74-fache, bei Gesunden nur auf das 1,58-fache beobachtet. Die stärkste Erhöhung, genauer eine Verdopplung des IL-16-Signals durch Staurosporin wurde jedoch bei einem einzelnen Gesunden erreicht.

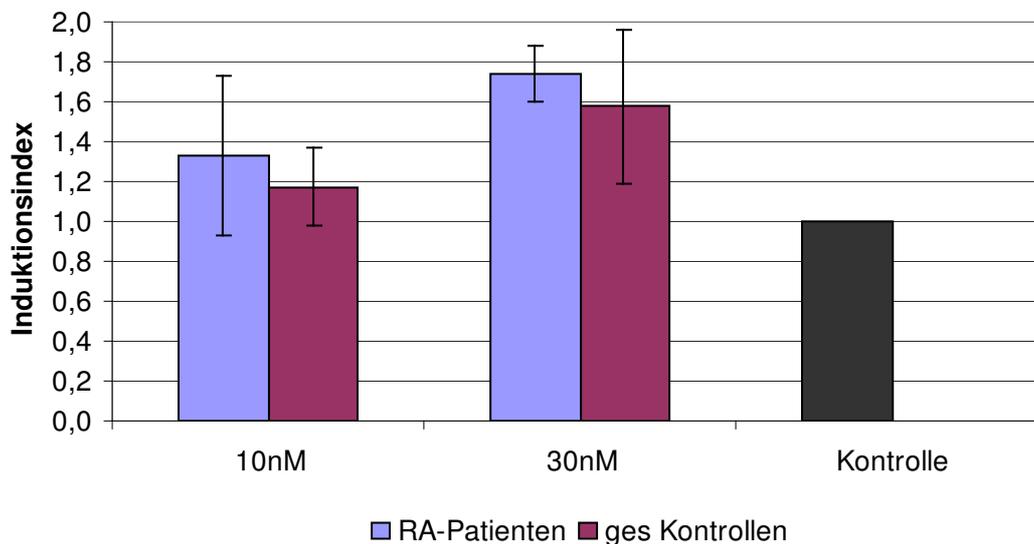
In der folgenden Tabelle sind die IL-16/GAPDH-Ratios bezogen auf die unbehandelte Kontrolle für alle Proben dargestellt, die Mittelwerte der Patientengruppe und der Vergleichsgruppe (gesund) und die Standardabweichungen. Mit dem T-Test wurden die Ergebnisse auf Signifikanz untersucht. Es wurden jeweils die Ergebnisse der Staurosporin-Inkubation mit der unbehandelten Kontrolle verglichen (T-Test\_RA bzw. T-Test\_G), und der Vergleich von RA-Patienten mit Gesunden durchgeführt (T-Test\_RA-G).

Statistisch signifikant zeigte sich die Steigerung der IL-16-Transkription durch Staurosporin bei den RA-Patienten. In der Gruppe der Gesunden wurde das Signifikanzniveau nicht erreicht.

Staurosporin	10nM	30nM	Kontrolle
RA1	0,9136	1,5394	1,0000
RA2	1,7853	1,8407	1,0000
RA3	1,5324	1,8475	1,0000
RA4	1,0785	1,7345	1,0000
G5	1,1059	1,5053	1,0000
G6	1,3896	1,9951	1,0000
G7	1,0164	1,2273	1,0000
MW_RA	1,3275	1,7405	1,0000
MW_G	1,1706	1,5759	1,0000
SA_RA	0,4020	0,1437	
SA_G	0,1948	0,3887	
T-Test_RA	0,154437719	4,87851E-05	
T-Test_G	0,203896159	0,062243993	
T-Test_RA-G	0,566638112	0,460733264	

**Tabelle 19: Induktion der IL-16-Expression durch Staurosporin**

Diagramm 26 zeigt die IL-16/GAPDH-Ratio bezogen auf die jeweilige unbehandelte Kontrolle.



**Abbildung 26: Induktion der IL-16-Expression durch Staurosporin**

### **3.6.2 Inkubation mit Histamin, 30 nM, 300 nM**

Die Inkubation mit Histamin in einer Konzentration von 30 nM im Medium führte zu einer uneinheitlichen Veränderung. Sie reduzierte bei drei von vier RA-Patienten die IL-16-Transkriptmenge. Während es sich bei zweien um eine sehr geringe Reduktion auf ca. 90% handelte, wurde die Transkriptmenge bei Patient RA4 auf 76% reduziert. Bei Patient RA2 war dagegen eine kleine Erhöhung der des IL-16-Signals um 18% zu beobachten. In einer Konzentration von 300 nM hatte Histamin abgesehen von einem Patienten keine Auswirkung auf die IL-16-Transkription. Bei diesem Patienten ließ sich die Menge an IL-16-mRNA im Vergleich zum spontan vorhandenen IL-16-Signal auf 85% reduzieren. Aufgrund der uneinheitlichen Effekte handelte es sich in keinem Fall um eine statistisch signifikante Auswirkung.

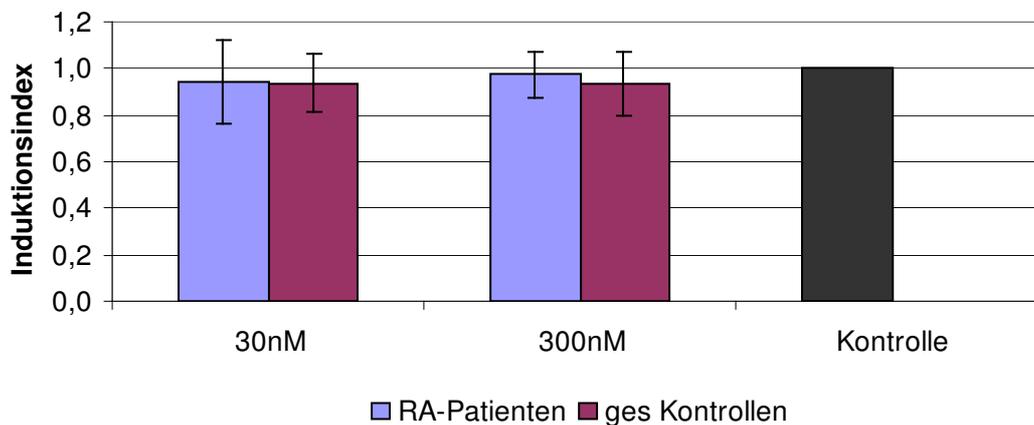
Bei Gesunden wurde in zwei von drei Fällen eine Reduktion IL-16-mRNA-Menge durch Histamin in den Konzentrationen 30 nM und 300 nM erreicht. Die reduzierte IL-16-mRNA-Menge betrug 79-87% der spontan bei unbehandelten Zellen vorhandenen. Diese Reduzierung war jedoch statistisch nicht signifikant. In einem Fall hatte die Inkubation mit Histamin keinerlei Auswirkung auf die IL-16-Transkription.

In Tabelle 20 sind die IL-16/GAPDH-Ratios bezogen auf die unbehandelte Kontrolle dargestellt, die Mittelwerte der Patientengruppe und der Vergleichsgruppe (gesund) und die Standardabweichungen. Mit dem T-Test wurden jeweils die Ergebnisse der Histamin-Inkubation mit der unbehandelten Kontrolle verglichen (T-Test\_RA, T-Test\_G), und der Vergleich von RA-Patienten mit Gesunden durchgeführt.

Histamin	30nM	300nM	Kontrolle
RA1	0,9273	0,8545	1,0000
RA2	1,1815	1,0851	1,0000
RA3	0,9080	0,9454	1,0000
RA4	0,7554	1,0112	1,0000
G5	0,8626	0,9519	1,0000
G6	1,0776	1,0663	1,0000
G7	0,8696	0,7864	1,0000
MW_RA	0,9431	0,9741	1,0000
MW_G	0,9366	0,9349	1,0000
SA_RA	0,1766	0,0980	
SA_G	0,1222	0,1407	
T-Test_RA	0,542779813	0,615488399	
T-Test_G	0,419515845	0,467667154	
T-Test_RA-G	0,959210053	0,679304032	

**Tabelle 20: Induktion der IL-16-Expression durch Histamin**

Diagramm 27 zeigt die IL-16/GAPDH-Ratio bezogen auf die jeweilige unbehandelte Kontrolle.



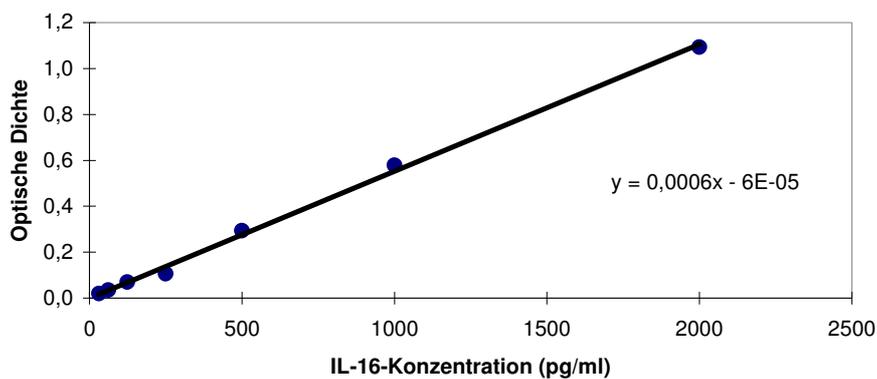
**Abbildung 27: Induktion der IL-16-Expression durch Histamin**

### 3.7 IL-16 ELISA

Die Messung der Extinktion bzw. der optischen Dichte (OD) der Proben der hergestellten IL-16 Konzentrationsreihe ermöglichte das Erstellen einer Eichkurve. Die Extinktionswerte sowohl der IL-16 Konzentrationsreihe als auch der restlichen Messungen wurden aus Doppelbestimmungen gemittelt.

IL-16 Konzentration [pg/ml]	0	31,2	62,5	125	250	500	1000	2000
OD	0	0,019	0,035	0,070	0,106	0,293	0,578	1,093

**Tabelle 21: Extinktionswerte der IL-16 Konzentrationsreihe**



**Abbildung 28: Eichkurve IL-16**

Bei dieser Eichkurve handelt es sich um eine Regressionsgerade, die den linearen Zusammenhang zwischen der IL-16-Konzentration und der gemessenen optischen Dichte darstellt. Mit Hilfe der ermittelten Regressionsgeradengleichung

$$y (\text{Extinktion}) = 0,0006x (\text{IL-16 Konzentration}) - 6E-05$$

konnte aus den gemessenen Extinktionswerten der einzelnen Proben die IL-16-Konzentration errechnet werden. Um eine Verfälschung der Ergebnisse durch unterschiedlich große Ausgangspopulationen zu verhindern, wurden die Konzentrationen auf eine Zellzahl von  $4 \times 10^6$  Zellen/Probe korrigiert. Die IL-16-Konzentrationen können nachfolgender Tabelle entnommen werden.

Probe	stauro 10nM	stauro 30nM	his 30nM	his 300nM	Kontrolle
RA1	95,8226	112,8426	92,9860	102,2051	98,6592
RA2	79,4168	133,5833	85,6668	102,3333	94,0000
RA3	50,2832	64,5682	85,9957	47,9025	47,9025
RA4	70,2000	86,8666	65,2000	58,5334	63,5334
G5	144,1776	209,8376	145,1576	134,3776	143,1976
G6	110,9333	135,9333	146,7667	109,2667	106,7667
G7	171,9944	224,4819	154,4985	130,8276	152,4401

**Tabelle 22: IL-16-Konzentration [pg/ml] im Überstand**

Bei drei von vier RA-Patienten und bei allen Gesunden führte die Inkubation mit Staurosporin in einer Konzentration von 30 nM im Vergleich zu den unbehandelten Zellen zu einer Erhöhung der IL-16-Menge im Überstand um 27-47%. In der Konzentration 10 nM hatte Staurosporin keine nennenswerten Auswirkungen. Die Inkubation mit Histamin zeigte beim Großteil der untersuchten Proben keine Effekte. Bei Patient RA3 konnte jedoch eine Steigerung der spontan vorhandenen IL-16-Menge um 80% beobachtet werden, beim Gesunden G6 ebenfalls eine Steigerung um 37%. Aufgrund der Uneinheitlichkeit dieser Ergebnisse wurde das Signifikanzniveau in keinem der Fälle erreicht.

Beim Vergleich zwischen RA-Patienten und gesunden Kontrollen hingegen zeigte sich die IL-16-Konzentration bei RA-Patienten im Allgemeinen signifikant erniedrigt (s.a. Tabelle 23). Genauer gesagt, wurden bei Inkubation mit Staurosporin und auch mit Histamin, ebenso bei unbehandelten Zellen in der Gruppe der RA-Patienten niedrigere IL-16-Konzentrationen vorgefunden als bei der gesunden Vergleichsgruppe.

		stauro 10nM	stauro 30nM	his 30nM	his 300nM	Kontrolle
MW	RA	73,9306	99,4652	82,4621	77,7436	76,0238
	G	142,3684	190,0842	148,8076	124,8240	134,1348
SA	RA	18,9954	30,1083	11,9929	28,6504	24,3743
	G	30,5707	47,4643	4,9937	13,5894	24,1478
T-Test	RA	0,8967	0,2717	0,6522	0,9301	
	G	0,7329	0,1429	0,3610	0,5918	
	RA-G	0,0142	0,0262	0,0003	0,0488	0,0259

Tabelle 23: IL-16-ELISA: Mittelwerte, Standardabweichungen, T-Test

Abbildung 29 zeigt die IL-16-Konzentrationen in Überständen unterschiedlicher Inkubationsansätze bei RA-Patienten/ gesunden Kontrollen.

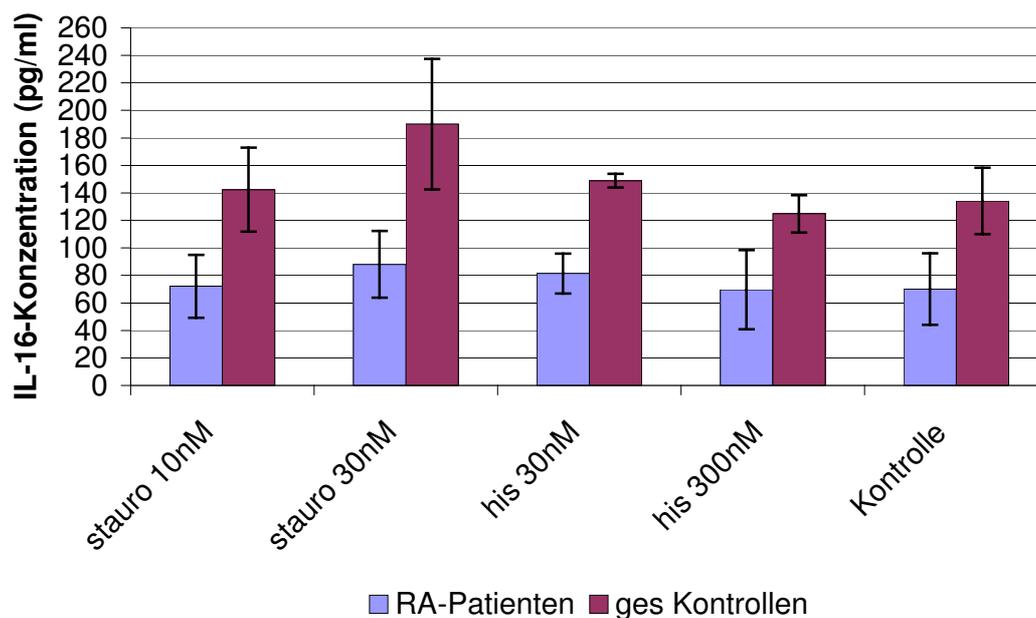


Abbildung 29: IL-16 Konzentration im Überstand

## 4 Diskussion

### 4.1 Zellkultur und Zellwachstum

Für alle Experimente wurden T-Lymphozytenkulturen verwendet, die aus Vollblut isolierten PBMC heranwachsen. Um eine möglichst reine T-Lymphozytenkultur zu erhalten, wurden PBMC mit einem Nährmedium versetzt, das speziell auf die Bedürfnisse von T-Lymphozyten abgestimmt ist. So entstand ein Selektionsvorteil gegenüber den anderen enthaltenen mononukleären Zellen wie Monozyten, Makrophagen, NK-Zellen und B-Zellen. Zudem wuchsen z.B. Makrophagen i.G. zu T-Lymphozyten adhärent am Boden der Wells und blieben so beim Abernten der Zellen zurück.

Als Stimulationsreiz bzw. Antigen dienten allogene, nicht mehr teilungsfähige PBMC (s.a. 2.2.2.3). Die Zellen wurden auf 24-Well-Platten kultiviert. Sie bildeten Proliferationszentren, die sich mit der Zeit immer mehr ausweiteten und schließlich wieder weitgehend auflösten. An diesem Punkt wäre für ein weiteres Wachstum der Kultur eine Restimulierung notwendig. Da eine Restimulierung aber in Vorversuchen ein vermehrtes Absterben von Zellen mit sich brachte und außerdem die Gefahr von Selektion bestimmter Subpopulationen erhöht, wurden sämtliche PBMC-Kultur-Ansätze nur jeweils einmal stimuliert. Nach einer Proliferationsdauer von durchschnittlich 8,5 Tagen wurden die Zellen abgeerntet und gepoolt um eine Verfälschung der Ergebnisse durch eventuell entstandene Subpopulationen zu vermeiden.

Die gewählte Proliferationsdauer war ausreichend, um eine nahezu reine T-Lymphozytenkultur zu erhalten, was durch die Immunphänotypisierung bestätigt wurde (s.a. 4.2).

## 4.2 Immunphänotypisierung

Um mit Sicherheit sagen zu können, dass es sich bei den aus PBMC herangezogenen Kulturen um T-Lymphozytenkulturen handelte, wurde eine FACS-Analyse durchgeführt. Der Immunphänotyp der Ausgangszellpopulation (PBMC) sollte mit dem der Zellen nach 8tägiger ex-vivo-Expansion verglichen werden. Anhand der Oberflächenmoleküle CD3, CD4 und CD8 konnten T-Lymphozyten erkannt werden. Da das CD3-Epitop von allen T-Lymphozyten exprimiert wird, wäre eine Identifizierung der T-Lymphozyten in unserer Zellkultur auch durch alleinigen Nachweis dieses Epitops denkbar. Für die Experimente und Untersuchungen bezüglich der IL-16-Expression war es aber von großer Bedeutung, die T-Lymphozyten genauer zu charakterisieren, d.h. das Verhältnis von CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten zu CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten in der Kultur zu kennen. Monozyten tragen ebenfalls das CD4-Epitop auf ihrer Oberfläche, sowie NK-Zellen das CD8-Epitop. Dies verlangte zusätzlich die Untersuchung der Zellkultur auf das Vorkommen weiterer linientypischer Oberflächenantigene (CD14, CD 16), welche diese oben genannten Zellen charakterisieren, auf T-Lymphozyten hingegen nicht vorkommen. Zudem wurde die Zellkultur auf das Vorhandensein von CD19 und damit auf B-Zellen geprüft.

Eine andere Möglichkeit zur Identifizierung von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten besteht in der kombinierten Markierung der T-Lymphozyten; hier mit jeweils CD3-AK plus CD4-AK bzw. CD8-AK. So würde der bei der obigen Methode nötige Nachweis der Oberflächenantigene CD14, CD16 und CD19 an Bedeutung verlieren. Im Rahmen dieser Arbeit waren solche Doppelfärbungen technisch jedoch nicht möglich.

Um eine genaue Messeinstellung zu gewährleisten, müssen unspezifische Bindungen von Antikörpern, z.B. an kreuzreaktive Epitope auf Zellen, ausgeschlossen werden. Darum wurde zusätzlich zu den Antikörperfärbungen die jeweilige Isotypkontrollfärbung vorgenommen.

Bei der Messung wurde das FACS-Analyse-Gate mit Hilfe von ungefärbten Kontroll-PBMC festgelegt, was durch eine saubere Darstellung aller in der Probe vorhandenen Populationen möglich war.

Bereits die Ausgangszellpopulation bestand zu 84% aus T-Zellen. Nach 8tägiger Proliferation lag eine nahezu reine T-Lymphozytenkultur vor. Beim Vergleich beider Messzeitpunkte, ist v.a. das Verteilungsmuster von CD4 und CD8 positiven Zellen interessant. Nachdem in der Ausgangspopulation das Verhältnis  $CD4^+ : CD8^+$  1,86 : 1 betrug, hatte es sich im Laufe der Proliferation nahezu umgekehrt ( $CD4^+ : CD8^+ = 1 : 1,72$ ). Da bezüglich der IL-16-Expression den  $CD8^+$  T-Zellen die größere Bedeutung zukommt, war dies für die Untersuchungen von Vorteil.

Aufgrund des Nachweises der Oberflächenantigene CD14 und CD16 in nur verschwindend geringer Menge, wurden eventuell markierte Monozyten oder NK-Zellen bei der Auswertung der CD4- und CD8-Markierung nicht berücksichtigt.

Da die T-Lymphozytenkulturen alle unter den gleichen Bedingungen heranwuchsen und somit von einer gleichartigen Entwicklung ausgegangen werden kann, sowie es der vorgegebene zeitliche Rahmen nicht erlaubte, wurde auf eine Immunphänotypisierung jeder einzelnen Zellkultur vor dem Einsatz im Experiment verzichtet.

### **4.3 Polymerasekettenreaktion**

Bei der Durchführung der RT-PCR kam ein standardisiertes Verfahren zum Einsatz, um durch gleichbleibende Arbeitsbedingungen eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erzielen. Da es sich bei der üblichen Endpunkt-PCR um eine bestenfalls semiquantitative Methode handelt, können anhand solcher Untersuchungen nur Angaben darüber gemacht werden, ob mRNA nicht, schwach oder deutlich nachweisbar war. Für quantitative Aussagen sind andere Methoden wie z.B. die LightCycler-PCR erforderlich.

Vor der Amplifikation von Gensequenzen im LightCycler ist es allerdings sinnvoll, die Menge, Qualität und Amplifizierbarkeit der cDNA nochmals zu überprüfen. Als Kontrollsequenz wurde hierfür die GAPDH verwendet, da sie im

Transkriptom der meisten Zellen nachweisbar ist. Es wurde darauf geachtet, dass gleichmäßige GAPDH-Banden in der Gelelektrophorese zu sehen waren, was auf gleichmäßige cDNA-Mengen schließen lässt.

### **4.3.1 LightCycler-RT-PCR**

Wie oben bereits erwähnt, ist eine Quantifizierung der Transkripte einer Zellpopulation mit der RT-PCR im LightCycler möglich. Mit Hilfe der LightCycler-Software werden neben der Anzahl der Kopien des spezifischen Produkts (IL-16) auch die eines internen Standards ermittelt (GAPDH). Wie bei der herkömmlichen PCR können durch diesen internen Standard die Proben nochmals bezüglich dem Vorhandensein annähernd gleicher Mengen an cDNA kontrolliert werden. Hier ist das entweder durch den Vergleich der absoluten Kopienzahl oder der Crossing Points (CP) möglich (s.a.2.2.8.3). Bei den durchgeführten Experimenten hat sich gezeigt, dass die CPs für GAPDH jeweils innerhalb eines Versuchsansatzes nahe beieinander lagen. Zusätzlich wurde die Kopienanzahl von IL-16 (spezifisches Produkt) zur Kopienanzahl der GAPDH (interner Standard) ins Verhältnis gesetzt, um mögliche Unterschiede in der cDNA-Menge auszugleichen und so eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erzielen. Solche Unterschiede entstehen u.a. durch unterschiedlich effiziente Extraktionen von RNA aus Zellen oder Schwankungen im einzelnen Reaktionsansatz.

Bei jedem Lauf wurde zudem eine Standard-Verdünnungsreihe mit DNA bekannter Menge mitgeführt, um die Quantifizierung der Produkte auf Exaktheit zu prüfen.

Eine Untersuchung auf eine mögliche unspezifische Amplifikation konnte anhand der Schmelzkurve nach Amplifikation vorgenommen werden. Mit den Primern für IL-16 und auch GAPDH konnten immer saubere Produkte amplifiziert werden.

Um die Zuverlässigkeit beim Vergleich der verschiedenen Ansätze von Zellen eines Patienten bzw. Spenders zu erhöhen, wurde ein gemeinsamer Reagenzienansatz (=Mastermix) verwendet. Bei den im LightCycler

eingesetzten minimalen Volumina sind oft schon winzige Konzentrationsunterschiede ausschlaggebend für Ungenauigkeiten. Somit sollte das Pipettieren bei der LightCycler-PCR als mögliche Fehlerquelle nicht außer Acht gelassen werden.

### **4.4 Inkubation der T-Zellen mit Pharmaka/ biogenen Amin**

Zur Untersuchung der Regulationsmechanismen der IL-16-Expression in T-Lymphozyten wurden diese mit verschiedenen Substanzen behandelt, die in der Lage sind, in klassische Signaltransduktionswege einzugreifen bzw. diese zu modulieren. Auswirkungen auf die Steuerung der IL-16-Transkription haben im einfachsten Fall eine verminderte oder gesteigerte Transkriptionsrate von IL-16 zur Folge. Anhand des vorhandenen Genprodukts nach der Inkubation wurden diese Veränderungen gemessen. Da IL-16 von T-Lymphozyten auch konstitutiv exprimiert wird [26], wurde die nach Inkubation detektierte Genmenge mit der in unbehandelten Zellen gemessenen verglichen. Dies war durch ein jeweiliges Mitführen einer unbehandelten Kontrolle möglich.

#### **4.4.1 Inkubation mit Staurosporin**

Staurosporin ist ein Proteinkinase-Inhibitor mit breitem Wirkungsspektrum. Neben der Proteinkinase A (PKA) und der Proteinkinase G (PKG), wirkt Staurosporin v.a. auf die Proteinkinase C (PKC) inhibitorisch.

Staurosporin kann apoptotisch wirken. Von Lopez et al. wurde eine Induktion der Apoptose durch Staurosporin in einer Konzentration von 100nM beschrieben. Im Verlauf seiner Wirkung kommt es u.a. zu einer Aktivierung der Kaspase-2 und -3 [47]. Letztere spielt auch beim Prozessieren des IL-16-Vorläufermoleküls eine bedeutende Rolle [72, 54].

In den Versuchen kam Staurosporin in einer Konzentration von 3 - 300 nM zum Einsatz. Bei einer Konzentration von 10 nM zeigte sich in allen Kulturen gesunder Probanden ein positiver Effekt auf die IL-16-Transkription, wobei die

verschiedenen Kulturen in unterschiedlich starkem Ausmaß reagierten. Dies deutet darauf hin, dass in diesem Konzentrationsbereich die Hemmung der PKC oder PKG die IL-16-Transkription positiv beeinflusst. Am wahrscheinlichsten scheint hauptsächlich die PKC involviert in die Regulierung der IL-16-Transkription, da über eine Aktivierung der PKC durch PMA die IL-16-mRNA in anti-CD3-stimulierten T-Lymphozyten reduziert werden kann [17]. Die Hemmung der PKA scheint aufgrund der in der Literatur verzeichneten Ergebnisse eher nicht ausschlaggebend zu sein: Untersuchungen an Fibroblasten ergaben, dass nicht eine Inhibition, sondern eine cAMP-vermittelte Aktivierung der PKA zu einer verstärkten Transkription des IL-16 führt [65] (s.a.4.4.2).

Wurde die Konzentration erhöht (30 nM), reagierten einige Kulturen mit einer fortschreitenden Steigerung der IL-16-Transkription, andere hingegen zeigten eher eine verminderte Transkriptionsrate. Diese fiel mit weiter steigender Konzentration immens ab, was durch die einsetzende Apoptose erklärt werden kann. Die gegensätzlichen Reaktionen bei 30 nM sind auf die unterschiedliche Empfindlichkeit der einzelnen Zellen zurückzuführen. Aufgrund dessen wurde Staurosporin für die Untersuchung der T-Lymphozyten von Rheumapatienten in einer Konzentration von 30 nM sowie 10 nM eingesetzt.

### **4.4.2 Inkubation mit Forskolin**

Forskolin ist ein Diterpen aus der Wurzel der indianischen Pflanze *Coleus forskohlii*. Forskolin bewirkt einen raschen und reversiblen Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration über Aktivierung der membrangebundenen Adenylatzyklase (AC) [56]. Hierbei handelt es sich um eine direkte Aktivierung; denn im Gegensatz zu einer hormonell oder durch Neurotransmitter vermittelten Aktivierung der AC, ist bei Forskolin keine Interaktion mit Oberflächenrezeptoren nötig [55].

Eine Erhöhung des cAMP-Spiegels bewirkt die Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA), die durch Phosphorylierung die Aktivität verschiedenster Zielproteine reguliert. Auch der Transkriptionsfaktor CREB

(cAMP-response element binding protein) wird durch die PKA mittels Phosphorylierung aktiviert [13, 34]. Zusammen mit anderen Faktoren ist CREB an der Steuerung der Genexpression beteiligt und spielt auch eine wichtige Rolle bei der Regulierung bzw. Induktion des IL-16-Promotors in T-Lymphozyten [9].

In der Literatur wird für Forskolin eine  $EC_{50}$  (halb-maximale effektive Konzentration) von 5 – 10  $\mu\text{M}$  angegeben [56]. Für die Inkubationsversuche wurde Forskolin in unterschiedlichen Konzentrationen zwischen 2 und 15  $\mu\text{M}$  eingesetzt, so dass v. a. im höheren Konzentrationsbereich eine deutliche Steigerung der Enzymaktivität erwartet werden konnte.

Forskolin führte bei allen untersuchten Kulturen gesunder Probanden in einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  zu einer nur sehr geringen Steigerung (<25%) der IL-16-Transkription. Der Einsatz von Forskolin in höherer Konzentration (15  $\mu\text{M}$ ) rief bei unterschiedlichen Kulturen entgegengesetzte Effekte hervor. Auffallend war v.a. eine Verminderung der IL-16-Transkription um 23% in einer Lymphozytenkultur. Auch für Forskolin in geringer Konzentration (2  $\mu\text{M}$ ) wurden bei den verschiedenen Lymphozytenkulturen differente Reaktionsmuster beobachtet. Ein cAMP-abhängiger Mechanismus zur Steuerung der IL-16-Expression konnte somit nicht nachgewiesen werden.

Betrachtet man ausschließlich die Ergebnisse, die durch Forskolin in mittlerer Konzentration hervorgerufen wurden (s.o.), könnte die nur sehr geringe Transkriptionssteigerung eventuell mit einer zu kurzen Inkubationszeit erklärt werden. Aufgrund von Vorversuchen wurde für Forskolin wie auch für alle anderen Substanzen eine einheitliche Inkubationszeit von 8h gewählt. Schon in der Zeitkinetik zeigte sich bei einer Inkubation zwischen einer und acht Stunden hauptsächlich eine verminderte IL-16-Transkription (60-90%) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Da die Transkriptionsrate zwar vermindert war, jedoch mit der Zeit stetig anstieg und nach 24stündiger Inkubation bereits eine geringe Steigerung vorhanden war, hätte durch eine sehr viel längere Inkubationszeit eventuell eine Induktion der IL-16-Transkription hervorgerufen werden können.

#### 4.4.3 Inkubation mit Histamin

Histamin ist ein biogenes Amin, das als Mediator und Neurotransmitter eine wichtige Rolle spielt. Es ist u.a. an entzündlichen und allergischen Reaktionen beteiligt. In CD8<sup>+</sup> Zellen triggert Histamin bekanntermaßen die Produktion von IL-16 [43]. Für die Vermittlung der physiologischen Prozesse gibt es vier unterschiedliche Rezeptoren, H<sub>1</sub> – H<sub>4</sub>, die zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehören. H<sub>2</sub>-Rezeptoren z.B., sind involviert in die Regulation der Zytokin- und Chemokinproduktion und die Differenzierung und Reifung einer Vielzahl von Zellen in kardialem Gewebe, der glatten Muskulatur und des Immunsystems [25, 40, 38]. H<sub>4</sub>-Rezeptoren spielen für die Chemotaxis und die Mediator-Sekretion in Immunzellen eine bedeutende Rolle [71]. Auch in synovialen Zellen von RA-Patienten wurde die Expression von H<sub>4</sub>-Rezeptoren nachgewiesen [36]. Zusammen mit dem H<sub>2</sub>-Rezeptor ist H<sub>4</sub> involviert in die Kontrolle der Histamin-induzierten IL-16-Sekretion bei CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten [32]. Eine therapeutische Eingriffsmöglichkeit im Hinblick auf die Entzündung böte die Unterdrückung der Ausschüttung von IL-16 durch Histaminrezeptorantagonisten.

Von Gantner et al. wurde ein maximaler Effekt von Histamin auf die IL-16-Produktion von CD8<sup>+</sup> Zellen bei einer Konzentration von 1 µM und einer Inkubationsdauer von 24h beschrieben [32].

In den Experimenten wurde Histamin in Konzentrationen von 30 nM bis 3 µM eingesetzt. Eine Steigerung der IL-16-Transkription durch Histamin um bis zu 62% konnte in einer Konzentration von 300 nM erreicht werden. In höherer Konzentration war dieser Effekt nur noch in geringerem Ausmaß bis gar nicht mehr zu beobachten. Bei manchen Zellkulturen musste die Histaminkonzentration noch weiter erniedrigt werden (30 nM), um die IL-16-Transkription positiv beeinflussen zu können. Insgesamt zeigte der Stimulationsversuch durch Histamin also nur geringe bis gar keine Auswirkungen auf die IL-16-Transkription. Die Inkubationsdauer von 8h war hier ausreichend, da auf Transkriptebene gemessen wurde. Nach 24stündiger Inkubation war die Transkriptionsrate im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nicht mehr gesteigert.

Von Gantner et al. wurde nach Inkubation von CD8<sup>+</sup> Zellen mit Histamin eine 6fach gesteigerte Menge an IL-16 im Überstand gemessen [32]. Eine solche Induktion der IL-16-Produktion konnte hier nicht bestätigt werden, da durch die Stimulation von CD8<sup>+</sup> Zellen mit Histamin nicht nur neu synthetisiertes IL-16, sondern auch in wahrscheinlich viel größerem Ausmaß gespeichertes IL-16 ausgeschüttet wird. So steigt die Transkriptionsrate nicht in gleichem Ausmaß an wie die Sekretionsrate.

Ursachen für diese scheinbar widersprüchlichen Ergebnisse könnten in den verwendeten Methoden zur Kultivierung der Zellen liegen, denn T-Zellen reagieren z.B. sehr empfindlich auf verschiedenen Chargen von FCS. Eine systematische Untersuchung dieser Hypothese war aber im Rahmen dieser Dissertation nicht möglich.

#### **4.4.4 Inkubation mit Serotonin**

Serotonin ist ein Neurotransmitter, vasoaktives Amin, sowie ein Immunmodulator [49, 3, 6]. Gespeichert wird Serotonin u.a. von Mastzellen und Thrombozyten. Auch Lymphozyten und Monozyten sind in der Lage, nach Stimulation durch PHA oder IFN- $\gamma$  Serotonin zu produzieren [27]. In niedriger Konzentration stimuliert Serotonin die T-Zell-Proliferation und IL-2-Produktion [70], hochdosiert hingegen wirkt es supprimierend [42]. Aune et al. konnten zeigen, dass die T-Zell-Proliferation über den 5-HT-1a-Rezeptor vermittelt wird, welcher auf PHA-aktivierten T-Lymphozyten konstitutiv exprimiert wird, jedoch nicht auf ruhenden [6].

Desweiteren stimuliert Serotonin in CD8<sup>+</sup> T-Zellen die IL-16-Sekretion über Interaktion mit dem 5-HT-2-Rezeptor. Diese Stimulierung wurde von Laberge et al. ab einer Serotoninkonzentration von 100 nM nachgewiesen [44].

In den Inkubationsversuchen konnte die IL-16-Transkription durch Serotonin (100 nM) in einer Zellkultur geringfügig gesteigert werden (31%), bei den anderen war dies jedoch nicht möglich. Auch niedriger dosiert zeigte sich kein Effekt auf die IL-16-Transkription. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die in der Literatur beschriebene Steigerung der IL-16-Sekretion unter Serotonin

völlig unabhängig von der Transkription ist und nur auf intrazellulär gespeichertes Protein zurückgreift. Wurde Serotonin in höherer Konzentration eingesetzt (1  $\mu$ M) zeigte sich in allen Kulturen eine signifikant verminderte Menge an IL-16-mRNA. Da dies nach einer Inkubationszeit von nur 8h noch nicht auf eine durch Serotonin supprimierte T-Zell-Proliferation zurückgeführt werden kann, scheint sich Serotonin direkt auf die IL-16-Transkription supprimierend auszuwirken. Auch der Vergleich der isolierten mRNA-Mengen spricht nicht für eine durch verminderte Zellzahl bedingte Abnahme von IL-16-Transkript.

### **4.5 IL-16-Expression**

Nach den Untersuchungen zur IL-16-Transkription in T-Lymphozyten gesunder Probanden, stellte sich nun die Frage nach etwaigen Unterschieden in den Regulierungsmechanismen der T-Lymphozyten von Rheumapatienten im Vergleich zu gesunden Spendern. Auch interessierte der Vergleich mit den unter 1.2.3.1 aufgeführten Regulierungsmechanismen der IL-16-Expression von Fibroblasten, welche sich bekanntermaßen bei Rheumapatienten und Osteoarthrosepatienten unterscheiden [65].

Da in den vorangegangenen Versuchen mit Forskolin und auch Serotonin kein einheitlicher Effekt auf die IL-16-Transkription erzielt werden konnte, wurden in den weiteren Untersuchungen nur noch Staurosporin und Histamin eingesetzt.

#### **4.5.1 Untersuchung der T-Lymphozyten von Rheumapatienten**

Untersucht wurden T-Lymphozytenkulturen von 4 Rheumapatienten. In allen Kulturen ließ sich die IL-16-Transkription durch Staurosporin steigern, im Einzelfall um bis zu 85%. Diese statistisch signifikante Induktion der IL-16-Transkription über Inhibition der Proteinkinasen suggeriert die Beteiligung eines durch Staurosporin induzierbaren Signaltransduktionsweges bei der Steigerung der IL-16-Expression in T-Lymphozyten in vivo bei rheumatoider Arthritis.

Die Behandlung mit Histamin hatte keinen nennenswerten Einfluss auf die IL-16-Transkription. Es kann davon ausgegangen werden, dass die in der Literatur beschriebene unter Histamineinfluss gesteigerte IL-16-Sekretion nur durch Leerung der intrazellulären Speicher zustande kommt und von der Transkription unabhängig ist.

### **4.5.2 Untersuchung der T-Lymphozyten gesunder Spender**

Auch in T-Lymphozyten gesunder Spender (TL-G) ließ sich die IL-16-Transkription durch Staurosporin induzieren. Bei einer Kultur führte die Induktion zwar zu einer Verdopplung der Menge an IL-16-Transkript und übertraf somit das bei Rheumapatienten erzielte Ergebnis. Aber da die Kulturen in recht unterschiedlichem Ausmaß auf Staurosporin reagierten und im Mittel nur eine Steigerung der IL-16-Transkription um 58% möglich war, konnte das Signifikanzniveau hier nicht erreicht werden.

Bei T-Lymphozyten von RA-Patienten (TL-RA) ließ sich die IL-16-Transkription im Mittel um 74% steigern. Auch das Signifikanzniveau wurde i.G. zu TL-G erreicht, jedoch sind diese Unterschiede zu gering, um einen Unterschied in der Regulation der IL-16-Transkription in T-Lymphozyten bei Rheumapatienten und Gesunden zu vermuten.

Wie schon bei den Rheumapatienten beobachtet, hatte Histamin auch bei Gesunden keinen nennenswerten Einfluss auf die IL-16-Transkription.

## **4.6 IL-16-Sekretion**

Da die Translation einer mRNA nicht unbedingt die unmittelbare Sekretion des Produktes nach sich zieht, kann anhand der Ergebnisse zur Untersuchung der Expression der IL-16-mRNA keine sichere Aussage über die IL-16-Sekretion gemacht werden. Deswegen wurde das reife IL-16-Protein mittels ELISA Test im Zellüberstand nachgewiesen.

Bei dem verwendeten ELISA sind die Platten bereits mit humanem IL-16-AK beschichtet, was jedoch vor Versuchsbeginn nicht nachgewiesen werden kann. So wurde eine IL-16-Verdünnungsreihe als Positivkontrolle mitgeführt, anhand derer auch die Eichkurve zur Auswertung erstellt wurde. Um eine höhere Exaktheit der Ergebnisse durch weitgehenden Ausschluss systematischer Fehler zu erzielen, wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt.

Da die Ausgangspopulationen nicht genau gleich groß waren, wurden, um die Ergebnisse nicht zu verfälschen, die in den Überständen gemessenen IL-16-Konzentrationen auf eine einheitliche Ausgangszellzahl korrigiert.

### **4.6.1 Spontane IL-16-Sekretion**

IL-16 wird von T-Zellen in Form eines Vorläufermoleküls konstitutiv exprimiert [26]. Von CD8<sup>+</sup> T-Zellen wird es i.G. zu CD4<sup>+</sup> T-Zellen auch in seiner aktiven Form gespeichert [69]. Dies ist in CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch die Präsenz der Kaspase-3 möglich, die für das Prozessieren des Vorläufermoleküls verantwortlich ist. So sind CD8<sup>+</sup> T-Zellen i.G. zu CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Lage, IL-16 spontan zu sezernieren.

Eine spontane IL-16-Sekretion wurde sowohl bei T-Lymphozyten von Rheumapatienten (TL-RA), als auch T-Lymphozyten von Gesunden (TL-G) beobachtet. Auffallend war der große Unterschied in der sezernierten IL-16-Menge. Die von TL-RA sezernierte Menge an IL-16 betrug nur 57% der in Überständen von TL-G gemessenen.

### **4.6.2 Stimulationsversuch durch Staurosporin**

Bei einer Stimulation von T-Lymphozyten durch Staurosporin wurde bereits auf Transkriptebene eine Induktion der IL-16-Expression beobachtet (s.a. 4.5).

Bei allen Zellkulturen (TL-RA und TL-G) konnte eine Steigerung der IL-16-Sekretion beobachtet werden. In Überständen von TL-G war durchschnittlich ein Anstieg der Proteinmenge unter Staurosporin auf das 1,42fache messbar, TL-RA reagierten mit einer Steigerung der Proteinsekretion um 31%. Verglichen mit den Ergebnissen der Messungen auf Transkriptebene zeigte die

Induktion durch Staurosporin hier geringere Auswirkungen. Dennoch unterstützt sie die These einer Beteiligung eines durch Staurosporin induzierbaren Signaltransduktionsweges bei der Steigerung der IL-16-Expression in T-Lymphozyten in vivo bei rheumatoider Arthritis.

Mit einer verlängerten Inkubationszeit (>8h) wäre eine deutlichere Steigerung der IL-16-Sekretion denkbar.

### **4.6.3 Stimulationsversuch durch Histamin**

Die Untersuchungen zur IL-16-Expression auf Transkriptebene zeigten, dass Histamin auf die IL-16-Transkription keinen Einfluss nimmt. Von Gantner et al. wurde jedoch eine Induktion der IL-16-Sekretion durch Histamin in CD8<sup>+</sup> T-Zellen beschrieben [32].

Eine gesteigerte IL-16-Sekretion konnte nur bei zwei Zellkulturen beobachtet werden. Bei Patient RA3 war die IL-16-Menge um 80% gestiegen, beim Gesunden G6 um 37%. Bei allen weiteren Zellkulturen zeigte sich kein Effekt von Histamin auf die IL-16-Sekretion. Die in der Literatur beschriebene Induktion der IL-16-Sekretion durch Histamin konnte insgesamt nicht bestätigt werden. Als Erklärung wäre auf der einen Seite eine zu kurze Inkubationszeit denkbar. Da sich in Vorversuchen zur Zeitkinetik von Histamin gezeigt hatte, dass sich eine Inkubationszeit von über 8h eher negativ auf die IL-16-Transkription auswirkt, schien eine 8stündige Inkubation plausibel. Zu erwähnen bleibt außerdem, dass es sich bei den untersuchten Zellkulturen nicht ausschließlich um CD8<sup>+</sup> T-Zellen handelte. Etwa zwei Drittel der Zellen waren CD8<sup>+</sup> T-Zellen, der Rest CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Da eine unbehandelte Kontrolle mitgeführt wurde damit der Vergleich mit der spontanen IL-16-Sekretion möglich war und CD4<sup>+</sup> T-Zellen i.G. zu CD8<sup>+</sup> T-Zellen nicht in der Lage sind, IL-16 spontan zu sezernieren, konnte dies nicht ausschlaggebend sein.

Wie schon unter 4.6.1 erwähnt, sezernierten TL-RA spontan weniger IL-16 als TL-G. Auch bei den Stimulationsversuchen war in allen Versuchsansätzen die

Menge an detektiertem IL-16-Protein bei TL-RA im Vergleich zu TL-G signifikant vermindert.

Bisher ist in Publikationen keine verminderte IL-16-Sekretion in T-Lymphozyten von RA-Patienten i.V. zu T-Lymphozyten von Gesunden in vitro beschrieben worden, sodass dies als in-vitro-Artefakt betrachtet werden könnte. Untersuchungen der Transkriptionsmenge von IL-16 ergaben in TL-RA ebenso eine geringere spontane IL-16-Expression als in TL-G. Um eine exaktere statistische Aussage machen zu können, bedarf es der Untersuchung weiterer Kulturen, was im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich war, da innerhalb des vorgesehenen zeitlichen Rahmens nicht mehr Kulturen zur Verfügung standen.

### **4.7 Conclusio**

Die durchgeführten Experimente haben gezeigt, dass T-Lymphozyten von Patienten mit rheumatoider Arthritis bzw. gesunden Spendern spontan IL-16-mRNA transkribieren und auch spontan sezernieren. Der in vivo im Blut von RA-Patienten entdeckte Unterschied an IL-16 konnte durch unsere Arbeiten noch nicht geklärt werden.

Die IL-16-Transkription ließ sich durch Staurosporin regulieren, was für eine von der Aktivität der Proteinkinasen abhängige Regulierung spricht. Die Inhibition der Proteinkinasen durch Staurosporin führte in T-Lymphozyten zu einer gesteigerten IL-16-Transkription. Eine signifikante Steigerung konnte nur in T-Lymphozyten von Patienten mit rheumatoider Arthritis hervorgerufen werden. Auch auf Sekretionsebene induzierte Staurosporin die IL-16-Expression in T-Lymphozyten. Die durch Staurosporin gesteigerte IL-16-Transkription scheint also an die nachfolgende IL-16-Sekretion gekoppelt und resultiert so in einer Erhöhung des IL-16-Spiegels. T-Lymphozyten [39] werden neben Fibroblasten [30] bei der rheumatoiden Arthritis als wichtige IL-16-Produzenten angegeben. IL-16 zeigt neben seiner chemotaktischen Wirkung auf T-Helfer-Zellen [30] auch antiinflammatorische Wirkung [39]. Die

nachgewiesene Regulationsmöglichkeit kann zu einer gezielten Steuerung des IL-16-Titers beitragen und so in beiden Fällen zu einer Besserung der Beschwerden von Rheumapatienten führen.

Im Vergleich zu Fibroblasten zeigten T-Lymphozyten nicht die gleiche Reaktion auf die Pharmaka Staurosporin und Forskolin. Staurosporin führte in T-Lymphozyten zu einer geringeren Induktion der IL-16-Expression als in Fibroblasten. Zudem erschienen sie hinsichtlich Staurosporin-induzierter Apoptose weniger resistent als Fibroblasten. Die in Fibroblasten beobachtete Modulation der IL-16-Expression über einen cAMP-abhängigen Pfad (Forskolin) [65] war in T-Lymphozyten nicht möglich.

Synoviale Fibroblasten von Patienten mit rheumatoider Arthritis unterscheiden sich in der Regulierung der IL-16-Genaktivität von Osteoarthrose-Fibroblasten [65]. Auch bei einigen an der Zelldifferenzierung und –proliferation beteiligten Genen sind Differenzen in der Expression bei RA-Patienten und Osteoarthrose-Patienten bekannt [48]. Ein Unterschied in der Regulierung der IL-16-Expression in T-Lymphozyten konnte bei Rheumapatienten im Vergleich zu Gesunden nicht nachgewiesen werden. Eine bei rheumatoider Arthritis veränderte IL-16-Sekretion von T-Lymphozyten beruht darum eher nicht auf einem genetischen Unterschied, vielmehr scheint eine Stimulation der T-Lymphozyten durch z.B. Antigen oder inflammatorische Zytokine wahrscheinlich.

Eine Induktion der IL-16-Sekretion durch Histamin [43] oder Serotonin [44] konnte nicht nachgewiesen werden.

## 5 Zusammenfassung

Im Synovialgewebe von Patienten mit rheumatoider Arthritis wurde eine gesteigerte Expression von IL-16 nachgewiesen. Stimulierende Faktoren für die IL-16-mRNA-Induktion sind noch nicht bis ins Detail geklärt. Es hat sich jedoch gezeigt, dass nicht inflammatorische Zytokine die IL-16-Expression in Fibroblasten induzieren, sondern ein zellulärer Unterschied für die veränderte Genaktivität verantwortlich sein muss. So unterscheiden sich synoviale Fibroblasten von Rheumapatienten hinsichtlich der Regulierung der IL-16-Genaktivität von Osteoarthritispatienten. Als Hauptproduzenten des IL-16 gelten bei der rheumatoiden Arthritis neben Fibroblasten die T-Lymphozyten. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit die Regulationsmechanismen der IL-16-Expression in T-Lymphozyten untersucht. Im Hinblick auf die differente Genregulierung in Fibroblasten bei RA-Patienten, war vor allem der Vergleich von T-Lymphozyten von RA-Patienten und gesunder Kontrollen bezüglich der IL-16-Expression von großer Bedeutung.

Die Untersuchungen zur IL-16-Genregulation wurden zunächst an T-Lymphozyten gesunder Spender und später vergleichend an T-Lymphozyten von RA-Patienten und gesunden Kontrollen durchgeführt. Dabei wurde durch den Einsatz der Pharmaka Forskolin und Staurosporin in klassische Signaltransduktionswege eingegriffen. Auch Histamin und Serotonin wurden zur Induktion eingesetzt.

Eine spontane IL-16-Transkription sowie –Sekretion ließ sich in allen untersuchten T-Lymphozytenkulturen nachweisen. Mit Hilfe des PKC-Inhibitors Staurosporin ließ sich die IL-16-Expression sowohl auf Transkriptionsebene als auch auf Sekretionsebene steigern. Die Inkubation mit Forskolin, einem Aktivator der Adenylatzyklase, hatte keinen Einfluss auf die IL-16-Expression. Im Gegensatz zu Fibroblasten ließen sich bei T-Lymphozyten keine Differenzen in der Regulierung der Genaktivität des IL-16 bei RA-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern nachweisen. Für eine gesteigerte IL-16-Expression in T-Lymphozyten bei der rheumatoiden Arthritis sind demnach nicht zelluläre

Unterschiede verantwortlich, sondern eher die Stimulation von außen z.B. durch inflammatorische Zytokine oder Antigen ausschlaggebend.

Für den therapeutischen Einsatz geeignet sind Substanzen, die eine Manipulation des IL-16-Spiegels durch Eingreifen in Kinase- (v.a. PKC-) abhängige Signaltransduktionswege möglich machen.

Eine Induktion der IL-16-Expression in T-Lymphozyten durch Histamin oder Serotonin konnte auf Gen- & Proteinebene nicht nachgewiesen werden.

## 6 Literaturverzeichnis

1. **Aarvak T, Natvig JB:** Cell-cell interactions in synovitis: antigen presenting cells and T cell interaction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 2001, 3: 13-7
2. **Aho K, Koskenvuo M, Tuominen J, Kaprio J:** Occurrence of rheumatoid arthritis in a nationwide series of twins. *J Rheumatol* 1986, 13: 899-902
3. **Ameisen JC, Meade R, Askenase PW:** A new interpretation of the involvement of serotonin in delayed-type hypersensitivity. Serotonin-2 receptor antagonists inhibit contact sensitivity by an effect on T cells. *J Immunol* 1989, 142: 3171-9
4. **Amiel C, Darcissac E, Truong MJ, Dewulf J, Loyens M, Mouton Y, Capron A, Bahr GM:** Interleukin-16 (IL-16) inhibits human immunodeficiency virus replication in cells from infected subjects, and serum IL-16 levels drop with disease progression. *J Infect Dis* 1999, 179: 83-91
5. **Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS, et al.:** The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988, 31: 315-24
6. **Aune TM, McGrath KM, Sarr T, Bombara MP, Kelley KA:** Expression of 5HT1a receptors on activated human T cells. Regulation of cyclic AMP levels and T cell proliferation by 5-hydroxytryptamine. *J Immunol* 1993, 151: 1175-83
7. **Baier M, Werner A, Bannert N, Metzner K, Kurth R:** HIV suppression by interleukin-16. *Nature* 1995, 378: 563
8. **Baier M, Bannert N, Werner A, Lang K, Kurth R:** Molecular cloning, sequence, expression, and processing of the interleukin 16 precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, 94: 5273-7
9. **Bannert N, Avots A, Baier M, Serfling E, Kurth R:** GA-binding protein factors, in concert with the coactivator CREB binding protein/p300, control the induction of the interleukin 16 promoter in T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, 96: 1541-6
10. **Bellini A, Yoshimura H, Vittori E, Marini M, Mattoli S:** Bronchial epithelial cells of patients with asthma release chemoattractant factors for T lymphocytes. *J Allergy Clin Immunol* 1993, 92: 412-24

11. **Bendixen M, Frisch M:** [Risk factors of rheumatoid arthritis]. *Ugeskr Laeger* 2003, 165: 1020-3
12. **Berner B, Akca D, Jung T, Muller GA, Reuss-Borst MA:** Analysis of Th1 and Th2 cytokines expressing CD4+ and CD8+ T cells in rheumatoid arthritis by flow cytometry. *J Rheumatol* 2000, 27: 1128-35
13. **Bertherat J:** Nuclear effects of the cAMP pathway activation in somatotrophs. *Horm Res* 1997, 47: 245-50
14. **Blaschke S, Schulz H, Schwarz G, Blaschke V, Muller GA, Reuss-Borst M:** Interleukin 16 expression in relation to disease activity in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2001, 28: 12-21
15. **Center DM, Berman JS, Kornfeld H, Theodore AC, Cruikshank WW:** The lymphocyte chemoattractant factor. *J Lab Clin Med* 1995, 125: 167-72
16. **Center DM, Kornfeld H, Cruikshank WW:** Interleukin 16 and its function as a CD4 ligand. *Immunol Today* 1996, 17: 476-81
17. **Cristillo AD, Bierer BE:** Identification of novel targets of immunosuppressive agents by cDNA-based microarray analysis. *J Biol Chem* 2002, 277: 4465-76
18. **Cruikshank WW, Berman JS, Theodore AC, Bernardo J, Center DM:** Lymphokine activation of T4+ T lymphocytes and monocytes. *J Immunol* 1987, 138: 3817-23
19. **Cruikshank WW, Greenstein JL, Theodore AC, Center DM:** Lymphocyte chemoattractant factor induces CD4-dependent intracytoplasmic signaling in lymphocytes. *J Immunol* 1991, 146: 2928-34
20. **Cruikshank WW, Center DM, Nisar N, Wu M, Natke B, Theodore AC, Kornfeld H:** Molecular and functional analysis of a lymphocyte chemoattractant factor: association of biologic function with CD4 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, 91: 5109-13
21. **Cruikshank WW, Lim K, Theodore AC, Cook J, Fine G, Weller PF, Center DM:** IL-16 inhibition of CD3-dependent lymphocyte activation and proliferation. *J Immunol* 1996, 157: 5240-8
22. **Cruikshank WW, Kornfeld H, Center DM:** Interleukin-16. *J Leukoc Biol* 2000, 67: 757-66
23. **Davila E, Kang YM, Park YW, Sawai H, He X, Pryshchep S, Goronzy JJ, Weyand CM:** Cell-based immunotherapy with suppressor CD8+ T cells in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 2005, 174: 7292-301

24. **Drossaers-Bakker KW, Zwinderman AH, van Zeben D, Breedveld FC, Hazes JM:** Pregnancy and oral contraceptive use do not significantly influence outcome in long term rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2002, 61: 405-8
25. **Elenkov IJ, Webster E, Papanicolaou DA, Fleisher TA, Chrousos GP, Wilder RL:** Histamine potently suppresses human IL-12 and stimulates IL-10 production via H2 receptors. *J Immunol* 1998, 161: 2586-93
26. **Elssner A, Doseff AI, Duncan M, Kotur M, Wewers MD:** IL-16 is constitutively present in peripheral blood monocytes and spontaneously released during apoptosis. *J Immunol* 2004, 172: 7721-5
27. **Finocchiaro LM, Arzt ES, Fernandez-Castelo S, Criscuolo M, Finkielman S, Nahmod VE:** Serotonin and melatonin synthesis in peripheral blood mononuclear cells: stimulation by interferon-gamma as part of an immunomodulatory pathway. *J Interferon Res* 1988, 8: 705-16
28. **Forster A, Villiger PM:** Rheumatoide Arthritis. P. M. Villiger and M. Seitz. *Rheumatologie in Kürze. 2.* Stuttgart, New York: *Thieme* 2006: 57-73
29. **Fournier C:** Where do T cells stand in rheumatoid arthritis? *Joint Bone Spine* 2005, 72: 527-32
30. **Franz JK, Kolb SA, Hummel KM, Lahrtz F, Neidhart M, Aicher WK, Pap T, Gay RE, Fontana A, Gay S:** Interleukin-16, produced by synovial fibroblasts, mediates chemoattraction for CD4+ T lymphocytes in rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol* 1998, 28: 2661-71
31. **Fujii M, Adachi S, Shimizu T, Hirota S, Sako M, Kono M:** Interstitial lung disease in rheumatoid arthritis: assessment with high-resolution computed tomography. *J Thorac Imaging* 1993, 8: 54-62
32. **Gantner F, Sakai K, Tusche MW, Cruikshank WW, Center DM, Bacon KB:** Histamine h(4) and h(2) receptors control histamine-induced interleukin-16 release from human CD8(+) T cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2002, 303: 300-7
33. **Gracie JA, Forsey RJ, Chan WL, Gilmour A, Leung BP, Greer MR, Kennedy K, Carter R, Wei XQ, Xu D, Field M, Foulis A, Liew FY, McInnes IB:** A proinflammatory role for IL-18 in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 1999, 104: 1393-401
34. **Hagiwara M, Brindle P, Harootunian A, Armstrong R, Rivier J, Vale W, Tsien R, Montminy MR:** Coupling of hormonal stimulation and transcription via the cyclic AMP-responsive factor CREB is rate limited by nuclear entry of protein kinase A. *Mol Cell Biol* 1993, 13: 4852-9

35. **Hettenkofer H-J, Neudorf U, Hammer M:** Entzündliche rheumatische Erkrankungen, Rheumatoide Arthritis. H.-J. Hettenkofer. *Rheumatologie*. 5. Stuttgart, New York: *Thieme* 2003: 59-78
36. **Ikawa Y, Suzuki M, Shiono S, Ohki E, Moriya H, Negishi E, Ueno K:** Histamine H4 receptor expression in human synovial cells obtained from patients suffering from rheumatoid arthritis. *Biol Pharm Bull* 2005, 28: 2016-8
37. **Janeway C, Travers P, Walport M:** Immunobiology: the immune system in health and disease. 6. New York: *Garland Science* 2005
38. **Jutel M, Watanabe T, Klunker S, Akdis M, Thomet OA, Malolepszy J, Zak-Nejmark T, Koga R, Kobayashi T, Blaser K, Akdis CA:** Histamine regulates T-cell and antibody responses by differential expression of H1 and H2 receptors. *Nature* 2001, 413: 420-5
39. **Klimiuk PA, Goronzy JJ, Weyand CM:** IL-16 as an anti-inflammatory cytokine in rheumatoid synovitis. *J Immunol* 1999, 162: 4293-9
40. **Kohka H, Nishibori M, Iwagaki H, Nakaya N, Yoshino T, Kobashi K, Saeki K, Tanaka N, Akagi T:** Histamine is a potent inducer of IL-18 and IFN-gamma in human peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol* 2000, 164: 6640-6
41. **Koolman J, Röhm K-H:** Taschenatlas der Biochemie. 3. Stuttgart, New York: *Thieme* 2003
42. **Kut JL, Young MR, Crayton JW, Wright MA, Young ME:** Regulation of murine T-lymphocyte function by spleen cell-derived and exogenous serotonin. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1992, 14: 783-96
43. **Laberge S, Cruikshank WW, Kornfeld H, Center DM:** Histamine-induced secretion of lymphocyte chemoattractant factor from CD8+ T cells is independent of transcription and translation. Evidence for constitutive protein synthesis and storage. *J Immunol* 1995, 155: 2902-10
44. **Laberge S, Cruikshank WW, Beer DJ, Center DM:** Secretion of IL-16 (lymphocyte chemoattractant factor) from serotonin-stimulated CD8+ T cells in vitro. *J Immunol* 1996, 156: 310-5
45. **Laberge S, Ernst P, Ghaffar O, Cruikshank WW, Kornfeld H, Center DM, Hamid Q:** Increased expression of interleukin-16 in bronchial mucosa of subjects with atopic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997, 17: 193-202
46. **Little FF, de Bie J, van Oosterhout A, Kornfeld H, Center DM, Cruikshank WW:** Immunomodulatory effect of interleukin-16 on allergic airway inflammation. *Chest* 2003, 123: 431S-2S

47. **Lopez E, Ferrer I:** Staurosporine- and H-7-induced cell death in SH-SY5Y neuroblastoma cells is associated with caspase-2 and caspase-3 activation, but not with activation of the FAS/FAS-L-caspase-8 signaling pathway. *Brain Res Mol Brain Res* 2000, 85: 61-7
48. **Neumann E, Kullmann F, Judex M, Justen HP, Wessinghage D, Gay S, Scholmerich J, Muller-Ladner U:** Identification of differentially expressed genes in rheumatoid arthritis by a combination of complementary DNA array and RNA arbitrarily primed-polymerase chain reaction. *Arthritis Rheum* 2002, 46: 52-63
49. **Paegelow I, Werner H, Hagen M, Wartner U, Lange P:** Influence of serotonin on lymphokine secretion in vitro. *Int J Immunopharmacol* 1985, 7: 889-96
50. **Pritchard J, Han R, Horst N, Cruikshank WW, Smith TJ:** Immunoglobulin activation of T cell chemoattractant expression in fibroblasts from patients with Graves' disease is mediated through the insulin-like growth factor I receptor pathway. *J Immunol* 2003, 170: 6348-54
51. **Pritchard J, Tsui S, Horst N, Cruikshank WW, Smith TJ:** Synovial fibroblasts from patients with rheumatoid arthritis, like fibroblasts from Graves' disease, express high levels of IL-16 when treated with Igs against insulin-like growth factor-1 receptor. *J Immunol* 2004, 173: 3564-9
52. **Rand TH, Cruikshank WW, Center DM, Weller PF:** CD4-mediated stimulation of human eosinophils: lymphocyte chemoattractant factor and other CD4-binding ligands elicit eosinophil migration. *J Exp Med* 1991, 173: 1521-8
53. **Ren F, Zhan X, Martens G, Lee J, Center D, Hanson SK, Kornfeld H:** Pro-IL-16 regulation in activated murine CD4+ lymphocytes. *J Immunol* 2005, 174: 2738-45
54. **Sciaky D, Brazer W, Center DM, Cruikshank WW, Smith TJ:** Cultured human fibroblasts express constitutive IL-16 mRNA: cytokine induction of active IL-16 protein synthesis through a caspase-3-dependent mechanism. *J Immunol* 2000, 164: 3806-14
55. **Seamon KB, Daly JW:** Forskolin: a unique diterpene activator of cyclic AMP-generating systems. *J Cyclic Nucleotide Res* 1981, 7: 201-24
56. **Seamon KB, Padgett W, Daly JW:** Forskolin: unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981, 78: 3363-7
57. **Seidel W, Pierer M, Hantzschel H:** [Internist's therapy of rheumatoid arthritis]. *Internist (Berl)* 2004, 45: 693-705; quiz 706

58. **Silman AJ, MacGregor AJ, Thomson W, Holligan S, Carthy D, Farhan A, Ollier WE:** Twin concordance rates for rheumatoid arthritis: results from a nationwide study. *Br J Rheumatol* 1993, 32: 903-7
59. **Sorsa T, Konttinen YT, Lindy O, Ritchlin C, Saari H, Suomalainen K, Eklund KK, Santavirta S:** Collagenase in synovitis of rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum* 1992, 22: 44-53
60. **Spector TD, Hochberg MC:** The protective effect of the oral contraceptive pill on rheumatoid arthritis: an overview of the analytic epidemiological studies using meta-analysis. *J Clin Epidemiol* 1990, 43: 1221-30
61. **Stastny P:** Association of the B-cell alloantigen DRw4 with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 1978, 298: 869-71
62. **van Zeben D, Hazes JM, Zwinderman AH, Cats A, van der Voort EA, Breedveld FC:** Clinical significance of rheumatoid factors in early rheumatoid arthritis: results of a follow up study. *Ann Rheum Dis* 1992, 51: 1029-35
63. **Wagner U, Kaltenhauser S, Sauer H, Arnold S, Seidel W, Hantzschel H, Kalden JR, Wassmuth R:** HLA markers and prediction of clinical course and outcome in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1997, 40: 341-51
64. **Walker CM, Moody DJ, Stites DP, Levy JA:** CD8+ lymphocytes can control HIV infection in vitro by suppressing virus replication. *Science* 1986, 234: 1563-6
65. **Weis-Klemm M, Alexander D, Pap T, Schutzle H, Reyer D, Franz JK, Aicher WK:** Synovial fibroblasts from rheumatoid arthritis patients differ in their regulation of IL-16 gene activity in comparison to osteoarthritis fibroblasts. *Cell Physiol Biochem* 2004, 14: 293-300
66. **Weyand CM, Goronzy JJ:** Inherited and noninherited risk factors in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 1995, 7: 206-13
67. **Weyand CM, Goronzy JJ:** Pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Med Clin North Am* 1997, 81: 29-55
68. **Wilson KC, Cattel DJ, Wan Z, Rahangdale S, Ren F, Kornfeld H, Sullivan BA, Cruikshank WW, Center DM:** Regulation of nuclear Pinterleukin-16 and p27(Kip1) in primary human T lymphocytes. *Cell Immunol* 2005, 237: 17-27
69. **Wu DM, Zhang Y, Parada NA, Kornfeld H, Nicoll J, Center DM, Cruikshank WW:** Processing and release of IL-16 from CD4+ but not CD8+ T cells is activation dependent. *J Immunol* 1999, 162: 1287-93

70. **Young MR, Kut JL, Coogan MP, Wright MA, Young ME, Matthews J:** Stimulation of splenic T-lymphocyte function by endogenous serotonin and by low-dose exogenous serotonin. *Immunology* 1993, 80: 395-400
71. **Zhang M, Venable JD, Thurmond RL:** The histamine H4 receptor in autoimmune disease. *Expert Opin Investig Drugs* 2006, 15: 1443-52
72. **Zhang Y, Center DM, Wu DM, Cruikshank WW, Yuan J, Andrews DW, Kornfeld H:** Processing and activation of pro-interleukin-16 by caspase-3. *J Biol Chem* 1998, 273: 1144-9
73. **Zink A, Mau W, Schneider M:** [Epidemiological and public health aspects of inflammatory rheumatic systemic diseases]. *Internist (Berl)* 2001, 42: 211-6, 219-22

## 7 Danksagung

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Wilhelm K. Aicher, unter dessen Leitung diese Arbeit entstand und der mir mit seiner großen Erfahrung und Kompetenz stets zur Seite stand und immer ein offenes Ohr hatte. Neben der umfassenden Betreuung möchte ich mich auch für die Stellung des Themas, seine Geduld und die freundliche Aufnahme in sein Team bedanken.

Ebenso möchte ich mich bedanken bei:

Frau Anita Hack für die ausgezeichnete Unterstützung sowohl bei der Planung der Experimente als auch bei der technischen Durchführung; außerdem für ihre Geduld und große Hilfsbereitschaft im Laboralltag.

Frau Dr. Dorothea Alexander und Frau Tanja Abruzzese für wertvolle Tipps, ihre Hilfsbereitschaft und auch mentale Unterstützung.

Herrn Sven Koch und Frau Marion Faigle für die großartige Unterstützung am FACS.

Der AG Pawelek, insbesondere Frau Dr. Ludmila Müller und Herrn Ashley Knights, für ihre Hilfe und wertvollen Ratschläge bezüglich der Zellkultur.

Frau PD Dr. Ina Kötter und den Kollegen vom Rheumazentrum Württemberg, sowie der Blutbank Tübingen unter der Leitung von Prof. Dr. Hinnak Northoff für die respektiven T-Zellproben.

Meinen Freunden für die Blutspende und somit die Bereitstellung von Zellmaterial zur Etablierung der Methodik.

Meiner Familie, Nico und meinen Freunden für die mentale Unterstützung.

## 8 Curriculum vitae

### Persönliche Daten

Name	Corinna Yvonne Volk
Geburtsdatum	27.07.1981
Geburtsort	Stuttgart
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig
Eltern	Günther Volk Gerlinde Volk
Geschwister	Verena Volk

### Schulbildung

1988 – 1992	Pestalozzi-Grundschule Gerlingen
1992 – 2001	Gymnasium Gerlingen
	Abitur Juni 2001

### Studium

Ab Oktober 2001	Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
September 2003	Ärztliche Vorprüfung
30. Mai 2008	Ärztliche Prüfung

### Famulaturen

März 2004	Innere Medizin, Klinik Schillerhöhe, Gerlingen
August 2005	Hand-, Plastische- und Verbrennungschirurgie, BG Unfallklinik, Tübingen
September 2005	Universitätsfrauenklinik Tübingen
Oktober 2005	Hautarztpraxis Dr. Datz, Tübingen
April 2006	Anästhesiologie, Klinikum am Steinenberg, Reutlingen

**Praktisches Jahr**

Ab August 2006	Chirurgie, Kreiskrankenhaus Böblingen
Ab Januar 2007	Gynäkologie, Spital Limmattal, Schlieren, Schweiz
Ab April 2007	Innere Medizin, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris, Frankreich
Ab Juni 2007	Innere Medizin, Klinikum Sindelfingen-Böblingen

**Promotion**

Oktober 2004	Beginn der Experimente im Orthopädischen Labor der Universitätsklinik Tübingen
August 2005	Abschluss der Experimente
Dezember 2007	Einreichen der Doktorarbeit
August 2008	Abschluss des Promotionsverfahrens/ Druckfreigabe