

Aus der Klinik für Infektiologie,
Gastroenterologie und Rheumatologie des
Universitätsklinikum Benjamin-Franklin
der Freien Universität Berlin

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Martin Zeitz

**Analysen zur IFN- γ Induktionskinetik
von humanen naiven Th-Zellen**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Humanmedizin der Freien

Universität Berlin

vorgelegt

von

Annette Hering
aus Berlin

Referent: Prof. Dr. Jürgen Braun
Koreferent: Prof. Dr. Jochen Sieper

**Gedruckt mit Genehmigung des
Fachbereiches Humanmedizin der Freien
Universität Berlin**

Promoviert am : 13.09.2002

Vorwort

Diese Arbeit entstand von Oktober 1998 bis Juni 1999 am Deutschen Rheumaforschungszentrum (Prof. Dr. A. Radbruch) in Kooperation mit dem Universitätsklinikum Benjamin Franklin der Freien Universität Berlin. Der experimentelle Teil der Arbeit wurde im wesentlichen von Dr. Andreas Thiel betreut, während die klinische Betreuung durch Prof. Dr. Jürgen Braun erfolgte, aus dessen Abteilung die Patientenproben stammten. Viele Experimente bauten auf den Ergebnissen auf, die Sonja Kimmig im Rahmen ihrer biologischen Diplomarbeit in dieser Arbeitsgruppe gewonnen hat und auf die an verschiedenen Stellen im Text verwiesen wird.

Die Arbeit gliedert sich in sechs Kapitel und einen Anhangsteil. In der Einleitung wird eine kurze Einführung in das Krankheitsbild der Rheumatoiden Arthritis (RA) gegeben und das Ziel dieser Arbeit definiert. Im zweiten Kapitel werden die immunologischen Grundlagen in kurzer Form erläutert, sowie die bisherigen Erkenntnisse zur Pathogenese der RA zusammengefaßt. Die verwendeten Materialien und Methoden werden in Kapitel drei dargestellt. In Kapitel vier, dem Kernteil der Arbeit, werden die Versuche beschrieben und einige Ergebnisse in graphischer Form veranschaulicht. Im fünf Kapitel werden die erhobenen Ergebnisse diskutiert und mit Literaturangaben verglichen. Kapitel sechs faßt die Ergebnisse der Arbeit kurz zusammen. Im Anhang befindet sich das Literatur- und Abkürzungsverzeichnis.

Inhaltsverzeichnis:

1. Einleitung	1
2. Immunologische Grundlagen.....	3
2.1 Rheumatoide Arthritis	3
2.2 Funktion des Immunsystems	4
2.3 T-Helferzellen.....	5
2.4 Naive und antigenerfahrene Th-Zellen.....	7
2.5 Die zentrale Rolle der CD4 ⁺ Th-Zellen in der Pathogenese der RA	9
2.5.1 Erworben oder angeboren ?	10
2.5.2 Die "Th-1 Shift These"	10
3. Material und Methoden.....	13
3.1 Zellkulturmedien und -bedingungen	13
3.2 Methoden der Zelltrennung.....	13
3.2.1 Isolierung humaner mononuklearer Zellen aus peripherem Blut	13
3.2.3 Magnetische Zellsortierung	15
3.2.4 Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung.....	16
3.3 Antikörper.....	19
3.3.1 Monoklonale Antikörper gegen humane Zytokine	19
3.3.2 Monoklonale Antikörper gegen humane Zelloberflächenmoleküle ..	20
3.3.3 Antikörper für IFN- γ Quantifizierung durch fluoreszente Beads	20
3.3.4 Sekundärantikörper	21
3.4 Kopplung von Haptenen und Fluorochromen an Antikörper.....	21
3.4.1 Kopplung von Succinimidestern.....	22
3.4.2 Kopplung von Phycoerythrin (PE)	22
3.5 Polyklonale <i>in vitro</i> Th-Zell-Stimulation	23
3.6 Coaten von Zellkulturplatten mit immobilisierten α CD3(UCTH1) und α CD28(CD28.2)Antikörper.....	24
3.7 Immunfluoreszenzfärbungen	24
3.7.1 Fixierung von Zellen in Suspension	24

3.7.2 Intrazelluläre Färbung von Zytokinen	24
3.7.3 Färbung von Zelloberflächenmolekülen.....	25
3.8 Durchflußzytometrie	25
3.9 Quantifizierung der IFN- γ Konzentration in Zellkulturüberständen durch fluoreszente Beads.....	26
4 . Ergebnisse	27
4.1 Isolierung humaner naiver Th-Zellen	27
4.1.1 CD4 ⁺ -Separation.....	28
4.1.2 Expression von CD45RA und CD45RO auf CD4 ⁺ Th-Zellen	30
4.1.3 Experimentelles Sortierungssystem zur Isolierung von CD45RA ⁺ CD45RO ⁻ CD4 ⁺ Th-Zellen.....	31
4.2 Analyse der Effektor-Zytokinproduktion der CD45RA ⁺ Th-Zellen nach α CD3/ α CD28 Stimulation und polyklonaler Restimulation.....	33
4.2.1 Einfluß der immobilisierten α CD3/ α CD28 Antikörper auf Proliferation und Zytokinexpression der CD45RA ⁺ Th-Zellen	33
4.2.2 Polarisierung von CD45RA ⁺ Th-Zellen in pro- und antiinflammatorische Richtung	33
4.2.3 Einfluß der α CD3/ α CD28 Stimulationszeit auf die Zytokinfrequenz von polarisierten CD45RA ⁺ CD45RO ⁻ CD4 ⁺ Th-Zellen.....	35
4.2.4 Einfluß der Kulturdauer auf die Zytokinproduktion von Th-1 polarisierten CD45RA ⁺ CD45RO ⁻ CD4 ⁺ Th-Zellen.....	38
4.2.5 Proliferationstest	40
4.3 CD31 ⁺ und CD31 ⁻ CD45RA ⁺ CD45RO ⁻ CD4 ⁺ Th-Zell-	
Subpopulationen	42
4.3.1 Detektion von antigenerfahrenen Th-Zellen innerhalb der CD45RA ⁺ CD45RO ⁻ CD4 ⁺ Th-Zell-Subpopulationen.....	42
4.3.2 Experimentelles Sortierungssystem zur Isolierung von CD31 ⁺ /CD31 ⁻ Th-Zellen.....	43
4.3.3 Titration von α CD3 auf unpolarisierten CD31 ⁺ /CD31 ⁻ CD45RA ⁺ CD45RO ⁻ CD4 ⁺ Th-Zellen	45

4.3.4 IL-12 Titration auf CD31 ⁺ /CD31 ⁻ Th-Zellen.....	48
4.4 CD31 ⁺ und CD31 ⁻ Th-Zellisolierung mittels FACS-Sorter.....	51
4.4.1 Etablierung eines experimentellen Sortierungssystems.....	51
4.4.2 Reanalyse	53
4.4.3 Vergleich der Zytokinexpression von CD31 ⁺ /CD31 ⁻ Th-Zellen und CD45RA ⁺ CD45RO ⁻ CD4 ⁺ Th-Zellen in Anwesenheit verschiedener IL-12 Konzentrationen.....	54
4.4.4 IFN- γ Induktionskinetik nach IL-12 Titration von gesunden Spendern.....	56
4.5 IFN- γ Induktionskinetik von gesunden Spendern und Patienten	60
4.5.1 Zytokinexpression von direkt stimulierten CD4 ⁺ Th-Zellen des peripheren Blutes	60
4.5.2 Ergebnisse der Einzeltitrationen eines gesunden Spenderkollektives	62
4.5.3 Vergleich von gesunden Spendern und Patienten.....	73
5. Diskussion.....	75
5.1 Die magnetische Mehrparameter Zellsortierung als Methode zur Isolierung von CD45RA ⁺ CD45RO ⁻ CD4 ⁺ Th-Zellen aus dem adulten Blut.....	75
5.2 CD45RA ⁺ CD45RO ⁻ CD4 ⁺ Th-Zellkulturen	76
5.2.1 <i>In vitro</i> Aktivierung durch immobilisierte α CD3/ α CD28 Antikörper	76
5.2.2 <i>In vitro</i> Polarisierung	77
5.3 CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD45RO ⁻ Th-Zellen: Eine homogene Population?.....	78
5.4 CD31 ⁺ und CD31 ⁻ Th-Zellen	80
5.4.1 Isolierung der CD31 ⁺ /CD31 ⁻ Populationen mit Hilfe der magnetischen Mehrparametersortierung	80
5.4.2 Aktivierung und Kultivierung der CD31 ⁺ und CD31 ⁻ Th Zellkulturen	80
5.4.3 IL-12 Titration	81

5.5 Analyse des Zytokinmusters von Th-1 polarisierten CD31 ⁺ und CD31 ⁻ Th-Zellen gesunder Spender	82
5.5.1 IFN- γ Induktionskinetik.....	82
5.5.2 Expression von TNF- α und IL-2	83
5.6 Analyse der Patienten.....	84
5.7 MACS- und FACS-Sortierung im Vergleich.....	85
5.8 Weiterführende Experimente	87
6. Zusammenfassung.....	89
<u>Anhang</u>	
Literaturverzeichnis.....	91
Abkürzungsverzeichnis.....	101
Danksagung	103