

Aus der Medizinischen Klinik I für Gastroenterologie, Infektiologie,
Rheumatologie, Campus Benjamin Franklin
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Untersuchungen zum Aktivierungszustand peripherer Lymphozyten
bei Patienten mit Morbus Crohn**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

Anja-Nikola Weiss-Breckwoldt
aus Freiburg i. Br.

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. med. M. Zeitz
 2. Prof. Dr. med. habil. J. Emmrich
 3. Prof. Dr. med. R. Duchmann

Datum der Promotion: 05.06.2011

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Fragestellung	Seite
1.1 Morbus Crohn (MC)	1
1.1.1 Immunpathologie des Morbus Crohn	2
1.1.1.1 Das gastrointestinale Immunsystem	2
1.1.1.2 Immunpathologie des MC und pathogenetische Hypothesen	6
1.1.2. Aktivitätsbeurteilung des Morbus Crohn	11
1.2 Lymphozytäre Entzündungsmerkmale im peripheren Blut	13
1.3 Fragestellungen der Arbeit	18
2. Patienten und Methoden	
2.1 Patienten und Kontrollpersonen	19
2.2 Experimentelles Vorgehen	20
2.2.1 Probengewinnung, PBL-Isolierung und Aufbewahrung	20
2.2.2 ELISA des plasmatisch gelösten Interleukin-2-Rezeptors	21
2.2.3 Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen und Zytofluorometrie	23
2.2.4 Zellkulturen und Proliferationsassays	27
2.3. Statistische Methoden	28
3. Ergebnisse	
3.1 Der im Plasma gelöste Interleukin-2-Rezeptor bei MC-Patienten	29
3.1.1 Plasma sIL-2R-Konzentration in Abhängigkeit von Krankheitsausprägung und Therapie	30
3.1.2 Korrelation der sIL-2R Plasmakonzentration mit konventionellen laborchemischen Entzündungsparametern und mit dem CDAI	31
3.2 Expression von T-Zell-Subpopulationsmarkern und von aktivierungsabhängigen Oberflächenmolekülen auf PBL von MC-Patienten	32
3.3 Aktivierungsmarker-Expression auf CD4+ und CD8+ T-Zell-Subpopulationen bei MC-Patienten	33
3.4. Proliferation der PBL von MC-Patienten unter mitogener, antigener und lymphokiner Stimulation	34

3.5 Korrelation der Plasma sIL-2R Konzentration mit der CD25-Expression und dem IL-2 induzierten Wachstum der PBL	35
4. Diskussion	36
5. Zusammenfassung	44
6. Literatur	46

Lebenslauf

Selbstständigkeitserklärung

Danksagungen

Akronyme und Abkürzungen

Ag	Antigen
Ak	Antikörper
ALG	Anti-Lymphozyten- Globulin
α -TNF	Tumor-Nekrose-Faktor α
AP	Alkalische Phosphatase
APC	antigenpräsentierende Zellen
BSA	Bovines Serum Albumin
BSG	Blut-Senkungs-Geschwindigkeit
CARD	Caspase activation recruitment domain
CD	Clusters of Differentiation
CDAI	Crohn's Disease Activity Index
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankungen
ConA	Concanavalin A
CRP	C-reaktives Protein
CU	Colitis Ulcerosa
Da	Dalton
DC	dendritische Zelle
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIM	extraintestinale Manifestationen
FACS	Fluorescent-activated cell-sorter
FITC	Fluorescein
FKS	fetales Kälber Serum
FoxP3	Transkriptionsfaktor FoxP3
GALT	gut associated lymphoid tissue
G-CSF	granulocyte colony stimulating factor
GIS	gastrointestinales Immunsystem
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony stimulating faktor
^3H	Tritium
Hb	Hämoglobinkonzentration
HBSS	Hank's balanced salt solution

IBD	inflammatory bowel disease
IEL	intraepitheliale Lymphozyten
IFN γ	Interferon γ
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-2R	Interleukin-2-Rezeptor
sIL-2R	im Serum gelöster Interleukin-2-Rezeptor
IS	Immunsystem
K-W-T	Kruskal-Wallis-Test
LP	Lamina Propria
LPL	Lamina Propria Lymphozyten
LK	Lymphknoten
LPS	Lipopolysaccharide
M-Zellen	„microfold“ Epithelzellen
MC	Morbus Crohn
MALT	mucosa associated lymphoid tissue
MDP	Muramyl-Dipeptid
MHC	major histocompatibility complex
MWU	Mann-Whitney-U-Test
MS	Multiple Sklerose
NF κ B	nuclearer Faktor κ -B
NOD	nuclear oligomerization domain
NSAID	non-steroidal antiinflammatory drugs
PBL	peripheral blood lymphocytes
PBS	phosphate buffered saline solution
PE	Phycoerythrin
PHA	Phytohämagglutinin
PP	Peyer Patches
PRR	pattern recognition receptors
PWM	Pokeweed Mitogen
RA	rheumatoide Arthritis
RPMI	Zellkulturmedium
sIgA	sekretorisches Immunglobulin A
StD	Standardabweichung

TCR	T-Zell-Rezeptor
TLR	toll like receptors
TR1	Population regulatorischer T-Zellen
Treg	regulatorische T-Zellen
U	Units

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Kapitel 1

Bild 1.1 Intestinale Antigenaufnahme

Bild 1.2 Einflussfaktoren der Immundysregulation bei MC

Bild 1.3 Inflammatorischer circulus vitiosus bei MC

Tabelle 1.1 Kriterien des CDAI nach Best

Bild 1.4 Verschiedene Ansatzpunkte der T-Zell Stimulation

Kapitel 2

Tabelle 2.1 Patientenübersicht

Bild 2.1 Probenverarbeitung

Bild 2.2 sIL-2R-ELISA

Bild 2.3 Indirekte und direkte Fluoreszenzfärbung

Tabelle 2.2 Schema der Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen

Bild 2.4 FACS-Analyzer

Kapitel 3

Bild 3.1 Die sIL-2R-Plasmakonzentration bei MC-Patienten und Kontrollpersonen

Bild 3.2 sIL-2R Plasmakonzentration von MC Patienten mit aktiver und inaktiver Erkrankung, aufgegliedert nach dem Vorhandensein von EIM und Fisteln, nach dem Befallsmuster sowie der Applikation antiinflammatorischer Therapie

Bild 3.3 sIL-2R Plasmakonzentration von MC-Patienten in Abhängigkeit von CDAI und unspezifischen laborchemischen Entzündungsparametern

Bild 3.4 Expression der T-Zell-Subpopulationsmarker CD4 und CD8 und der T-Zell-Aktivierungsmarker CD25, CD71, CD49a und CD103 auf PBL von MC-Patienten

Bild 3.5 Expression der Aktivierungsmarker auf den CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-Subpopulationen

Bild 3.6 Proliferative Antworten auf antigene, mitogene und lymphokine Stimulation

Bild 3.7 Korrelation der sIL-2R Plasmakonzentration mit der CD25-Expression sowie dem rIL-2 induzierten Wachstum der PBL von MC-Patienten