

Zytokin-vermittelte Induktion der Interferon gamma-Synthese in humanen T-Helfer-Zellen

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Arne Sattler

aus Essen

im September 2006

1. Gutachter: Prof. Dr. Andreas Radbruch

2. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel

Disputation am 29.01.2007

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
1 Einleitung	4
1.1 Grundzüge des Immunsystems	4
1.1.1 Angeborene und adaptive Immunantwort.....	4
1.2 Die Immunologie der T-Zellen	5
1.2.1 Grundlagen der T-Zell Immunologie.....	5
1.2.2 Zentrale und periphere T-Zell Toleranz.....	5
1.2.3 CD25 ⁺ regulatorische T-Zellen (Tregs).....	6
1.2.4 Die Aktivierung von naiven Th Zellen durch Antigen.....	7
1.2.5 Klassifizierung von Th Zellen anhand sezernierter Zytokine: Das Th1/Th2-Konzept	8
1.2.6 Molekulare Ereignisse bei der Th1-Differenzierung	10
1.2.7 Transkriptionale Kontrolle der IFN γ -Produktion.....	11
1.2.8 Die Rolle anderer Zytokine bei der IFN γ -Induktion.....	11
1.2.9 Th1 Effektor- und Gedächtniszellen – zwei Schicksale nach primärer Aktivierung	11
1.2.10 Zentrale und Effektor-Gedächtniszellen	12
1.3 Die Rheumatoide Arthritis – eine Autoimmunerkrankung mit ungeklärter Pathogenese	13
1.3.1 Grundlagen der Rheumatoiden Arthritis.....	13
1.3.2 Die Rolle der T-Zellen bei der RA.....	13
1.3.3 Autoantigen-spezifische T-Zell Antworten bei der RA.....	14
1.3.4 Akkumulation von Th1-ähnlichen CD4 Zellen in Gelenken von RA-Patienten.....	15
1.3.5 Th1-Zellen als Mediatoren innerhalb eines Zytokinnetzwerkes ?	16
1.4 Ziele dieser Arbeit	20
2 Material und Methoden.....	22
2.1 Puffer und Lösungen	22
2.2 Geräte	22
2.3 Zellkulturmedien und Kulturbedingungen	23
2.4 Präparation humaner mononukleärer Zellen	23
2.4.1 Blutspender und Patienten	23
2.4.2 Isolierung humaner mononukleärer Zellen aus peripherem Blut.....	24
2.4.3 Aufarbeitung von Synovialpunktaten von RA-Patienten.....	24
2.4.4 Bestimmung der Zellzahl	24
2.5 Durchflusszytometrie.....	25
2.5.1 Immunfluoreszenzfärbung	26
2.5.1.1 Färbung von Zelloberflächenmolekülen	26
2.5.1.2 Kombinierte intrazelluläre Zytokin- und Oberflächenfärbung.....	27
2.5.1.3 CFDA-Färbung zur einheitlichen Markierung von Zellen	27
2.5.1.4 Antikörper	28
2.6 Zellsortierung.....	29
2.6.1 Magnetische Zellsortierung (MACS).....	29
2.6.1.1 Isolierung von CD4 ⁺ Th-Zellen	30
2.6.1.2 Isolierung von naiven (CD45RA ⁺) und Antigen-erfahrenen (CD45RO ⁺) Th-Zellen.....	31
2.6.1.3 Isolierung von CD14 ⁺ Monozyten.....	31
2.6.1.4 Isolierung bzw. Analyse von lebenden Zellen anhand von Zytokinsekretion.....	31
2.6.1.5 MACS Beads	32
2.6.2 Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS).....	33
2.6.2.1 Anreicherung von Zellpopulationen mittels FACS.....	34
2.7 Stimulation von Th Zellen.....	34

2.7.1 Stimulation durch α CD28 und/oder α CD3.....	34
2.7.2 Antigen-spezifische Stimulation und Generierung Antigen-spezifischer Th-Zelllinien	35
2.7.2.1 Isolierung CMVpp65-spezifischer Th-Zellen	35
2.7.2.2 Expansion der CMVpp65-spezifischen Th Zellen	35
2.7.3 Stimulation durch Zytokine und Chemokine	36
2.7.4 Inhibitoren	36
2.7.5 Suppression von Zytokinproduktion in Th Zellen durch Kokultur mit CD25 ⁺ regulatorischen T-Zellen (Tregs).....	37
2.8 SDS-PAGE und Western Blot.....	37
2.9 Quantifizierung von Zytokinen in Zellkulturüberständen.....	38
2.10 Statistische Auswertung.....	39
3 Ergebnisse	40
3.1 Ex vivo Detektion von spontan IFNγ sezernierenden Th Zellen in Synovialflüssigkeit von RA-Patienten.....	40
3.2 Induktion von IFNγ-Sekretion durch Zytokine in Th Zellen gesunder Spender...42	42
3.2.1 Ruhende CD4 ⁺ Th Zellen sezernieren IFN γ nach <i>in vitro</i> Stimulation mit einem inflammatorischen Zytokin-Cocktail.....	42
3.2.2 IFN γ -Expressionskinetik in Zytokin- gegenüber TCR- stimulierten Th Zellen auf Einzelzellebene	43
3.2.3 Zytokin-induzierte IFN γ ⁺ Th Zellen koexprimieren kein TNF α	44
3.2.4 „IL-12 + IL-18 + γ_c - Zytokin“ ist die essentielle Kombination zur Induktion von IFN γ - Sekretion in einer Subpopulation ruhender Th Zellen	45
3.3 Charakterisierung der Zytokin-induzierten IFNγ⁺ Th Zellen.....47	47
3.3.1. Zytokin-induzierte IFN γ ⁺ Th Zellen sind vom Gedächtnis-Typ und exprimieren TCR α/β - Ketten	47
3.3.2 Zytokin-induzierte IFN γ -produzierende Th-Zellen finden sich vermehrt in der CCR7 ⁺ Effektor-Gedächtnis-Th Fraktion	48
3.3.3 <i>Ex vivo</i> IL-18R α -Expression ist Voraussetzung für Zytokin-induzierte IFN γ -Sekretion.....	49
3.3.4 <i>Ex vivo</i> isolierte IL-18R α ⁺ Th-Zellen koexprimieren funktionale IL-12R-Komplexe.....	51
3.3.5 CMVpp65-spezifische Th1-Zellen synthetisieren uniform IFN γ nach Zytokin-Stimulation ..	52
3.4 Signaltransduktion in Zytokin-induzierten IFNγ⁺ Th-Zellen	55
3.4.1 Zytokin-induzierte IFN γ -Produktion ist Cyclosporin-insensitiv	55
3.4.2 Janus Kinase3-Blockade inhibiert die Zytokin-induzierte IFN γ - Produktion	56
3.4.3 Der p38 MAPK-Signalweg ist essentiell für die Zytokin-induzierte IFN γ -Produktion.....	57
3.4.4 MAPKinaseKinase und Phosphatidylinositol-3-Kinase spielen keine Rolle bei der Zytokin-induzierten IFN γ -Produktion	59
3.5 Phänotypische Charakterisierung von TCR- gegenüber Zytokin-aktivierten IFNγ⁺ Th-Zellen	61
3.5.1 Das TNF α -Rezeptor-Superfamilien-Mitglied 4-1BB ist differenziell auf TCR- gegenüber Zytokin-induzierten IFN γ -Produzenten exprimiert	61
3.5.2 Kinetik der 4-1BB-Expression in Antigen- gegenüber Zytokin-induzierten IFN γ -Produzenten	63
3.5.3 CMVpp65-spezifische Th1-Zellen exprimieren 4-1BB nach TCR-, nicht aber nach Zytokin-Stimulation	64
3.6 Der Einfluß von CD25⁺ regulatorischen T-Zellen auf die Zytokin-induzierte IFNγ - Produktion	66
3.6.1 CD25 ⁺ regulatorische T-Zellen supprimieren die Zytokin-induzierte IFN γ -Produktion	66
3.7 Phänotypische Analyse von ex vivo isolierten Th-Zellen aus Synovialflüssigkeit von RA-Patienten	69
3.7.1 Induktion der IFN γ -Sekretion in <i>ex vivo</i> isolierten synovialen Th- Zellen von RA-Patienten durch proinflammatorische Zytokine	69

4 Diskussion	72
4.1 Spontane IFNγ -Sekretion durch Th-Zellen in den entzündeten Gelenken von RA-Patienten	72
4.1.1 Die Verschiebung der Th-Zell Balance bei der RA in Th1-Richtung	72
4.1.2 Die <i>ex vivo</i> Detektion von IFN γ ⁺ Th-Zellen bei der RA	73
4.2 IFNγ - Induktion durch Zytokine in humanen Th-Zellen	74
4.2.1 Zytokin-induzierte IFN γ -Sekretion in humanen Th-Zellen - eine TCR-unabhängige Effektorfunktion	74
4.2.2 Ruhende Th-Zellen mit einem Th1-ähnlichen Phänotyp	78
4.2.3 Die biologische Funktion von Zytokin-induzierter IFN γ -Synthese in Th-Zellen	80
4.3 Signaltransduktion in Zytokin-induzierten IFNγ-Produzenten	82
4.3.1 Zytokin-induzierte IFN γ -Sekretion ist NFAT-unabhängig	82
4.3.2 Inhibition der Zytokin-abhängigen IFN γ -Sekretion durch JAK3-Blockade	82
4.3.2 p38 als essentieller Mediator bei der Zytokin-induzierten IFN γ -Sekretion	84
4.3.3 Die Rolle von MEK/Erk und PI3-K bei der Zytokin-induzierten IFN γ -Synthese	85
4.3.4 JAK3 und STAT5	85
4.3.5 Verstärkung der Zytokin-abhängigen IFN γ -Produktion durch TNF α	86
4.4 Phänotypische Charakterisierung von Zytokin-induzierten IFNγ-Produzenten ...	86
4.5 Inhibition der Zytokin-induzierten IFNγ -Produktion durch CD25⁺ Tregs	88
4.6 Zytokin-abhängige IFNγ -Synthese in den entzündeten Gelenken von RA-Patienten	90
4.7 Die Rolle von IFNγ bei der Aufrechterhaltung von chronischer Entzündung	94
5 Zusammenfassung	98
6 Referenzen	100
7 Abkürzungsverzeichnis	123
8 Publikationen und Kongressbeiträge	125
8.1 Publikationen	125
8.2 Kongressbeiträge	125
9 Danksagungen	127
10 Erklärung	128
11 Summary	129