

Immunmodulation der Th-Zellreaktion mittels DNA Koimmunisierung

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium

eingereicht am
Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Till Muzzolini
aus Berlin

Berlin, im November 2003

- 1. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel**
2. Gutachter: Prof. Dr. Andreas Radbruch

Tag der mündlichen Prüfung: 27.1.2004

Meiner Familie

1 EINLEITUNG	1
1.1 Immunität	1
1.1.1 Angeborene Immunität	2
1.1.2 Erworbene Immunität	3
1.1.3 Konsequenzen der erworbenen Immunität	3
1.2 Th-Zellen (CD4+ Zellen)	5
1.2.1 Entwicklung und Aktivierung von Th-Zellen	5
1.2.2 Polarisierung von Th-Zellen: Th1/Th2 Konzept	7
1.2.3 Th1/Th2: Bedeutung <i>in vivo</i>	8
1.2.4 Th1/Th2 und Autoimmunität	9
1.3 Behandlung von Autoimmunkrankheiten	10
1.4 DNA Immunisierung	12
1.4.1 Mechanismen der Antigenpräsentation	13
1.4.2 DNA Immunisierung und Th1/Th2 Polarisierung	14
1.4.2.1 CpG Motive	15
1.4.2.2 Route	15
1.4.3 Koimmunisierung als Mittel der Th1/Th2 Manipulation	16
1.4.4 Immunisierungsvektoren	17
1.5 Analyse der spezifischen Th-Zellantwort <i>ex vivo</i>	17
1.6 Ziele	18
2 MATERIAL&METHODEN	19
2.1 Medien und Antikörper	19
2.2 Molekularbiologische Arbeiten	20
2.3 Test der Immunisierungsvektoren	23
2.4 FACS Analyse	24
2.4.1 Oberflächenfärbung	24
2.4.2 Intrazelluläre Zytokinfärbung	25
2.5 Mäuse und Zellpräparation	25
2.5.1 Isolierung von Milz- und Lymphknotenzellen und Zelltransfer	25
2.5.2 Isolierung von Zellen aus Mausblut	26
2.5.3 Isolierung von dendritischen Zellen aus Lymphknoten	26
2.5.4 Isolation von CD62L und CD4 positiven Zellen	26
2.5.5 Isolation CD11c positiver Zellen und <i>in vitro</i> Stimulation	26
2.6 CFSE Färbung	27
2.6.1 Grundlagen	27
2.6.2 Protokoll	27
2.7 Th2 Kulturen und Restimulation <i>in vitro</i>	28

2.8 Endotoxinbestimmung	28
2.9 Immunisierungen	29
2.9.1 Konventionelle Immunisierung: CFA + Alum	29
2.9.2 DNA Immunisierungen	29
2.10 Serumantikörperbestimmung	30
2.11 Ovalbumin induzierte Arthritis	31
2.11.1 Herstellung des Antigens	31
2.11.2 Analyse	31
3 ERGEBNISSE	33
3.1 Analyse der spezifischen Th-Zellantwort <i>ex vivo</i>	33
3.1.1 Zelltransfer und <i>ex vivo</i> Analyse	33
3.1.2 Th-Zellantwort ist spezifisch	35
3.1.3 Analyse der Zytokinproduzenten nach Immunisierung	36
3.2 Etablierung der DNA Immunisierung	37
3.2.1 DNA Immunisierungsrouten	37
3.2.1.1 Th-Zellantwort nach GeneGun Immunisierung stärker als nach intramuskulärer Applikation	37
3.2.1.2 Sowohl Peptid- als auch Proteinvektor erzeugen eine gut reproduzierbare und spezifische Th-Zellantwort	40
3.2.2 Charakterisierung der Th-Zellantwort nach GeneGun Immunisierung	42
3.2.2.1 Isolation antigenunerfahrener Lymphozyten	42
3.2.2.2 Kinetik und Expression aktivierungsabhängiger Oberflächenmarker nach GeneGun Immunisierung	43
3.2.2.3 CD69 korreliert mit der Emigration der Th-Zellen aus dem Lymphknoten	44
3.2.2.4 GeneGun Immunisierung induziert Th1 und Th2 Zellen	45
3.2.2.5 GeneGun im Vergleich zu konventioneller Immunisierung	47
3.3 Manipulation der Immunantwort mittels DNA Koimmunisierung	48
3.3.1 Analyse der Effekte verschiedener Koimmunisierungen auf Th-Zellexpansion und -differenzierung	49
3.3.2 Effekte der Koimmunisierungen im Detail: Erwartungen nicht erfüllt	50
3.3.2.1 Einfluss membrangebundener Moleküle	51
3.3.2.2 Einfluss „immunsupprimierender“ Zytokine	51
3.3.2.3 Einfluss „Th2 polarisierender“ Zytokine	52
3.3.2.4 Einfluss „immunstimulierender“ Zytokine	52
3.3.2.5 Einfluss „Th1 polarisierender“ Zytokine	52
3.4 Untersuchung der pIL4 induzierten Th1 Verschiebung	53
3.4.1 Th1 Verschiebung nach pIL-4 Koimmunisierung ist nicht auf veränderte Kinetik zurückzuführen	55
3.4.2 Th1 Effekt von pIL4 und pIL12 auch sichtbar, wenn Zellen aus Th2 Kultur transferiert wurden.	56
3.4.3 Langzeiteffekte nach DNA Koimmunisierung	57
3.4.3.1 Antikörpertiter nach pIL4 Koimmunisierung	57
3.4.3.2 pIL12 und pIL4 verstärken antigeninduzierte Arthritis	59

3.5 Aufklärung der Mechanismen der pIL-4 induzierten Th1 Polarisation	61
3.5.1 CpG Motive sind nicht für die pIL4 induzierte Th1 Verschiebung verantwortlich	62
3.5.2 IL-4 induziert IL-12 Produktion <i>in vitro</i>	63
3.5.3 Antigen- und Zytokinvektor müssen nicht in der selben Zelle vorliegen	64
3.5.4 Der Th1 polarisierende Effekt von pIL4 ist maximal bei gleichzeitiger Antigen Gabe, der von pIL12 maximal wenn Antigen 24h vorher appliziert	65
3.5.5 DC unterscheiden sich nach pIL12 und pIL4 Immunisierung	67
3.6 Charakterisierung der nach Gene Gun Immunisierung direkt transfizierten Zellen	69
3.6.1 Analysestrategie und Quantifizierung der direkt transfizierten DCs	69
3.6.2 Phänotyp direkt transfizierter DCs	71
3.6.3 Koimmunisierung führt zur Koexpression	72
4 DISKUSSION	74
4.1 Analyse der Th-Zelldifferenzierung <i>ex vivo</i>	74
4.2 GeneGun Immunisierung ist zuverlässiger als intramuskuläre Applikation	75
4.3 GeneGun induziert frühes Übergewicht an IFNγ produzierenden Th-Zellen	76
4.4 IL-4 und IL-12 DNA Koimmunisierung induzieren Th1 Verschiebung	78
4.4.1 Antikörperklassen und Th-Zelldifferenzierung nach Koimmunisierung	80
4.4.2 Sind die Diskrepanzen zur vorhandenen Literatur durch die unterschiedliche Analysemethoden erklärbar?	81
4.4.3 DCs vermitteln IL-4 induzierte Th1 Verschiebung	83
4.4.3.1 Keine direkte Wirkung von IL-4 auf Th-Zellen	83
4.4.3.2 DCs sind vermittelnder Zelltyp	83
4.4.3.3 Mechanismen der Induktion der IL-12 Produktion von DCs	83
4.4.3.4 CpG Motive sind nicht die Ursache der Th1 Polarisation	84
4.4.3.5 Veränderte Zytokinproduktion in DCs nach IL-4 Koimmunisierung	84
4.4.3.6 DCs sind dominant gegenüber frei vorliegendem Zytokin	85
4.5 Koimmunisierungen	86
4.5.1 Membrangebundene Moleküle: B7.1; B7.2; B7h; Serrate	86
4.5.2 „immunsupprimierende“ Zytokine: IL-10; vIL-10; TGF β	87
4.5.3 „Th2 polarisierende“ Zytokine: IL-4; IL-6	87
4.5.4 „Th1 polarisierende“ Zytokine: IL-12; IFN γ	88
4.5.4 „immunstimulierende“ Zytokine: IL-2, IL-15, IL-6	88
4.6 Zusammenfassung Koimmunisierungen	89
4.7 Exkurs: Ist CD69 an der Emigration aktivierter Th-Zellen aus dem Lymphknoten ursächlich beteiligt?	90
ZUSAMMENFASSUNG	93
LITERATURVERZEICHNIS	94