

Medizinische Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin  
Campus Benjamin Franklin  
aus der Medizinischen Klinik I, Institut für Gastroenterologie  
Direktor/Abteilungsleiter: Prof. Dr. Martin Zeitz

**Untersuchungen zur Bedeutung des  
kostimulatorischen Moleküls CD2  
bei Colitis im Tiermodell**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades  
Doctor rerum medicarum  
der Charité – Universitätsmedizin Berlin  
Campus Benjamin Franklin

vorgelegt von  
Nina Pawlowski  
aus Krefeld

Referent: PD Dr. Jörg C. Hoffmann

Korreferent: Prof. Dr. med. T. Weinke

Gedruckt mit Genehmigung der Charité - Universitätsmedizin Berlin  
Campus Benjamin Franklin

Promoviert am: 17.03.2006

## Zusammenfassung

Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED) gehören zu den am häufigsten auftretenden chronisch rezidivierenden Entzündungen. Obwohl in den letzten Jahren viele neue Erkenntnisse zu ihrer Pathogenese gesammelt wurden, sind bislang noch immer viele Aspekte der Entstehung ungeklärt. Daher gibt es bislang keine Therapie, die an den Ursachen ansetzt. Diese Arbeit liefert einen möglichen neuen Ansatzpunkt für die Behandlung chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen, da im Verlauf dieser Arbeit zum ersten Mal gezeigt werden konnte, dass durch die Modulation von CD2 der Verlauf experimenteller Colitis positiv beeinflusst werden kann.

Durch die Behandlung von Mäusen mit dem anti-CD2 mAk 12-15 konnte eine Verbesserung (Transfer ConA-aktivierter T-Zellblasten) bzw. Verzögerung (Transfer von CD45RB<sup>high</sup> T-Zellen) einer, durch adoptiven Transfer CD4 positiver T-Zellen induzierten, Colitis erreicht werden. Bei etablierter Transfercolitis führte die Therapie mit diesem anti-CD2 mAk zu einer Abschwächung der Entzündung. Untersuchungen des Zytokinprofils und der Proliferation von Lymphozyten dieser anti-CD2 mAk behandelten Transfercolitis-Mäuse zeigten sowohl eine signifikant geringere IL-2 Produktion als auch eine gehemmte T-Zellproliferation. Die am Beispiel einer Infektion mit *Toxoplasma gondii* untersuchte Infektabwehr wurde durch die anti-CD2 mAk Behandlung nicht beeinflusst. CD2 defiziente Mäuse wiesen in diesem Modell sogar signifikant weniger *T. gondii* Vakuolen im Darm auf als ebenfalls infizierte Kontrollmäuse.

Auf Grund ihrer Immunpathologie wird die Toxoplasmen-Infektion auch als Crohn-Modell genutzt. Bei Untersuchung dieses Th<sub>1</sub>-vermittelten Aspekts einer *T. gondii*-Infektion zeigte sich ein nicht signifikanter Trend für ein verlängertes Überleben nach anti-CD2 mAk Behandlung. CD2 defiziente Mäuse allerdings überlebten signifikant länger, und wiesen einen niedrigeren histologischen Score sowie eine geringere Produktion von IL-6 und IFN- $\gamma$  auf.

Schließlich konnten durch *in vitro*-Untersuchungen an verschiedenen Populationen humaner Lymphozyten sowie human CD2 transgener Splenozyten 5 humane anti-CD2 mAk identifiziert werden, die sowohl die Proliferation als auch die IFN- $\gamma$  Synthese stimulierter Lymphozyten inhibieren. Damit könnten diese anti-CD2 mAk potentielle Kandidaten für eine CD2 gerichtete Colitis-Immuntherapie beim Menschen sein.

---

# Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS .....	I
ABKÜRZUNGEN.....	IV
<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1 GASTROINTESTINAL-TRAKT UND INTESTINALES IMMUNSYSTEM.....	1
1.1.1 Besonderheiten intestinaler T-Zellen.....	3
1.2 CHRONISCH-ENTZÜNDLICHE DARMERKRANKUNGEN .....	4
1.3 CED-TIERMODELLE .....	7
1.3.1 Transfercolitis.....	7
1.3.2 Orale Infektion der Maus mit <i>Toxoplasma gondii</i> .....	9
1.4 CD2 .....	10
1.4.1 Aufbau und Liganden von CD2 .....	11
1.4.2 Rolle von CD2 bei Entzündungen .....	13
<b>2. FRAGESTELLUNG &amp; ZIELSETZUNG .....</b>	<b>14</b>
<b>3. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>15</b>
3.1 MATERIAL.....	15
3.1.1 Geräte .....	15
3.1.2 Chemikalien und Reagenzien .....	16
3.1.3 Verbrauchsmaterialien .....	18
3.1.4 Antikörper und Hybridome.....	18
3.1.5 Antikörper für die Durchflusszytometrie.....	19
3.1.6 Reagenzien zur Zytokinmessung .....	20
3.1.7 Häufig verwendete Lösungen und Puffer .....	20
3.1.8 Medien .....	21
3.1.9 Mäuse .....	22
3.1.10 Zelllinien .....	23
3.2 METHODEN .....	24
3.2.1 Zellisolation .....	24
3.2.1.1 Splenozyten .....	24
3.2.1.2 Lymphozyten der mesenterialen Lymphknoten.....	24
3.2.1.3 Murine Lamina propria Lymphozyten .....	25
3.2.1.4 Humane Lymphozyten der Lamina propria .....	25
3.2.1.5 Periphere Blut-Lymphozyten.....	26
3.2.1.6 CD4 positive T-Zellen.....	26
3.2.2 Zellkultur und Antikörperaufreinigung.....	27
3.2.2.1 Zellkultur .....	27
3.2.2.1.1 Kultivierung und Stimulation von Zellen .....	27
3.2.2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	28
3.2.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl .....	28
3.2.2.1.4 Colonkultur.....	28
3.2.2.1.5 Mitomycin-Behandlung .....	29
3.2.2.2 Antikörperaufreinigung.....	29

3.2.3	Durchflusszytometrie .....	30
3.2.3.1	Fixieren von Zellen .....	30
3.2.3.2	Färbung von Oberflächenmolekülen .....	31
3.2.3.3	Intrazelluläre Färbung .....	31
3.2.4	Induktion von Transfercolitis .....	32
3.2.4.1	CD4-T-Zellblasten-Transfercolitis .....	32
3.2.4.2	CD45RB <sup>high</sup> -Transfercolitis .....	32
3.2.5	Behandlung mit dem anti-CD2 mAk 12-15 .....	33
3.2.6	Versuche zur Infektabwehr .....	34
3.2.6.1	Infektion mit <i>Toxoplasma gondii</i> nachfolgende anti-CD2 mAk Behandlung .....	34
3.2.6.2	Infektion CD2-defizienter Mäuse mit <i>Toxoplasma gondii</i> .....	34
3.2.7	Endoskopie .....	34
3.2.8	Depletionsversuche .....	35
3.2.9	Proliferationstest .....	35
3.2.9.1	<sup>3</sup> H-Thymidin-Test .....	35
3.2.9.2	CFSE-Markierung .....	36
3.2.10	Zytokinmessungen (ELISA) .....	37
3.2.11	Proteinbestimmung nach Bradford (modifiziert) .....	37
3.2.12	Histologische Untersuchungen & mikroskopisches Scoring .....	38
3.2.12.1	Hämatoxylin/Eosin-Färbung .....	38
3.2.12.2	Polyklonale Immunperoxidase-Färbung .....	38
3.2.12.3	Giemsa-Färbung von Blutaussstrichen .....	39
3.2.12.4	Mikroskopisches Scoring .....	39
3.2.12.5	Makroskopisches Scoring .....	40
3.2.12.6	Endoskopisches Scoring .....	40
3.2.13	Typisierung .....	41
3.2.13.1	Durchflusszytometrische Typisierung huCD2tg-Mäuse .....	41
3.2.13.2	Genotypisierung CD2 defizienter Mäuse .....	41
3.2.13	Statistische Auswertung .....	42
<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>43</b>
4.1	MURINE <i>IN VITRO</i> -VERSUCHE .....	43
4.1.1	Charakterisierung des anti-CD2 mAk 12-15 .....	43
4.1.1.1	Der anti-CD2 mAk 12-15 hemmt die Proliferation .....	43
4.1.1.2	Der anti-CD2 mAk 12-15 moduliert die Zytokinsekretion .....	44
4.1.1.3	Der anti-CD2 mAk 12-15 führt <i>in vivo</i> weder zur Depletion noch zur Induktion regulatorischer T-Zellen .....	45
4.2	<i>IN VIVO</i> -ERGEBNISSE .....	48
4.2.1	Adoptiver Transfer CD4 positiver ConA-Blasten .....	48
4.2.1.1	Die präventive Gabe des anti-CD2 mAk 12-15 schützt vor T-Zellblasten-Transfercolitis .....	48
4.2.1.2	Therapie etablierter T-Zellblasten-Transfercolitis mit dem anti-CD2 mAk 12-15 führt zu verlängertem Überleben .....	53
4.2.1.3	Behandlung mit dem anti-CD2 mAk 12-15 verringert die IL-2 Produktion in CD3/CD28 stimulierten Lymphozyten .....	55
4.2.1.4	Behandlung mit dem anti-CD2 mAk 12-15 senkt die Proliferation CD3/CD28 stimulierter Lymphozyten .....	57

4.2.2	<i>In vivo</i> -Versuche mit dem anti-CD2 mAk 12-15 bei CD45RB <sup>high</sup> - Transfercolitis.....	58
4.2.2.1	Behandlung mit dem anti-CD2 mAk 12-15 beeinflusst Überleben und Gewichtsverlauf nach Transfer von CD45RB <sup>high</sup> -T-Zellen nicht .....	58
4.2.2.2	Der anti-CD2 mAk 12-15 verzögert den Verlauf einer klassischen CD45RB <sup>high</sup> -Transfercolitis .....	61
4.2.2.3	Behandlung mit dem anti-CD2 mAk 12-15 verringert die Produktion von Th <sub>1</sub> - und Th <sub>2</sub> -Zytokinen in stimulierten Lymphozyten .....	64
4.2.2.4	Behandlung mit dem anti-CD2 mAk 12-15 senkt die Proliferation stimulierter Splenozyten und LPL .....	66
4.2.2.5	Keine Induktion von regulatorischen T-Zellen durch Behandlung mit dem anti-CD2 mAk 12-15 .....	67
4.2.3	Einfluss von CD2 auf eine Infektion mit <i>T. gondii</i> .....	68
4.2.3.1	Die Modulation von CD2 hat keine immunsuppressiven Effekte auf die Kontrolle einer murinen <i>T. gondii</i> -Infektion .....	68
4.2.3.2	Eine CD2-Defizienz hat positive Effekte auf ein durch <i>T. gondii</i> induziertes Crohn-Modell .....	69
4.3	HUMANE <i>IN VITRO</i> -VERSUCHE .....	75
4.3.1	Hemmung der Proliferation über L-58-Zellen .....	76
4.3.2	Hemmung der Proliferation über anti-CD2 mAk .....	77
4.3.2.1	Untersuchungen an PBL .....	78
4.3.2.2	Untersuchungen an CD4 <sup>+</sup> peripheren T-Zellen .....	79
4.3.3	Hemmung der IFN- $\gamma$ Synthese durch anti-CD2 mAk .....	80
4.3.3.1	Untersuchungen an peripheren Lymphozyten .....	80
4.3.3.2	Untersuchungen an intestinalen Lymphozyten .....	81
4.3.4	Induktion regulatorischer T-Zellen .....	82
4.3.5	<i>In vitro</i> -Versuche an human CD2tg Lymphozyten .....	84
4.3.6	Zusammenfassung der humanen <i>in vitro</i> -Ergebnisse .....	86
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>87</b>
5.1	EINFLUSS DES MURINEN ANTI-CD2 MAk 12-15 AUF ADOPTIVE TRANSFERCOLITIS.....	87
5.2	EINFLUSS VON CD2 AUF DIE PERORALE INFektion MIT <i>T. GONDII</i> .....	95
5.2.1	CD2 und die Kontrolle einer <i>T. gondii</i> -Infektion .....	95
5.2.2	CD2 und <i>T. gondii</i> -induzierte Dünndarm-pathologie .....	97
5.3	<i>IN VITRO</i> -EFFEKTE HUMANER ANTI-CD2 MAk .....	99
5.4.	AUSBLICK.....	101
<b>6.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>102</b>
<b>7.</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>103</b>
7.1	LITERATURVERZEICHNIS .....	103
7.2	DANKSAGUNG.....	112
7.3	TABELLARISCHER LEBENS-LAUF .....	113
7.4	EIGENE PUBLIKATIONEN .....	114

# Tabellarischer Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name, Vorname	Pawlowski, Nina
Geburtsdatum, -ort	20.02.1976, Krefeld
Familienstand	ledig
Staatsbürgerschaft	deutsch
Eltern	Hans-Ulrich Pawlowski, geb. in Friedeberg Gisela Pawlowski, geb. Küsters, geb. in Moers
Geschwister	Viola Pawlowski, geb. in Krefeld

## Schulbildung, Studium und Beruf

- 1982-1986 Grundschule an der Landwehrstraße in Moers
- 1986-1995 Gymnasium Adolfinum in Moers, Abschluss Abitur
- 1995-2000 Studium der Biopharmakologie an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität in Greifswald, Abschluss Diplom
- 2000-2001 Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität in Greifswald
- 2001-2005 Doktorandin im Institut für Gastroenterologie der Medizinischen Klinik I, der Medizinischen Fakultät der Charité, Campus Benjamin Franklin