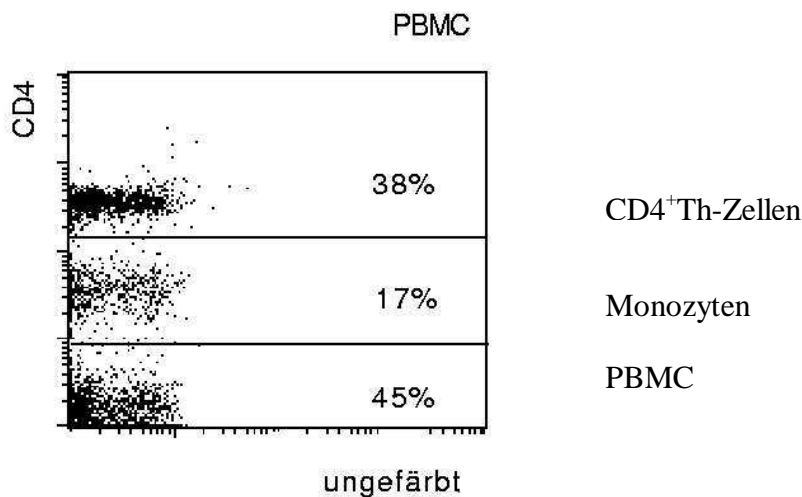


Kapitel 4

Ergebnisse

4.1 Isolierung humaner naiver Th-Zellen

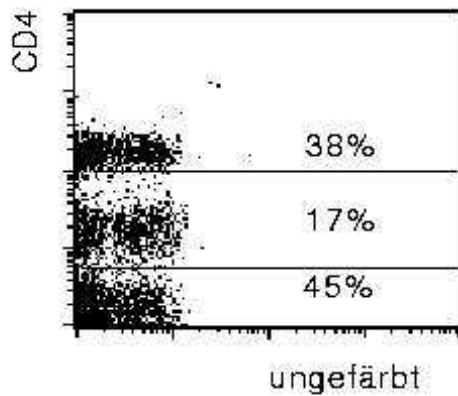
Humane Th-Zellen lassen sie sich gut von anderen funktionellen (zytotoxischen) T-Zellen unterscheiden, da sie das für sie charakteristische $CD4^+$ Molekül exprimieren. Menschliche Monozyten tragen ebenfalls diesen Rezeptor auf ihrer Oberfläche, jedoch mit einer geringeren Intensität. Daher mußten die Bedingungen für die Separation der Th-Zellen so gewählt werden, daß die Trennung der stark $CD4^+$ Th-Zellen von den schwach $CD4^+$ Monozyten mit hoher Reinheit der Th-Zellfraktion möglich wurde (Abb. 1).

**Abb. 1: Expression des CD4-Antigens auf PBMC**

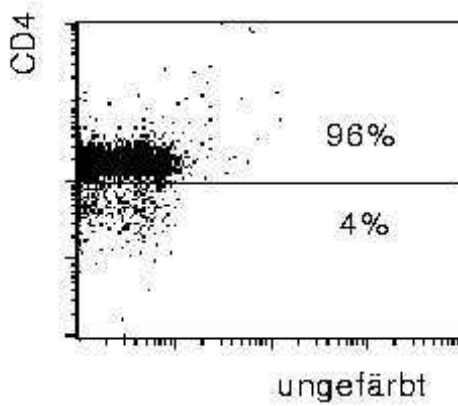
Aus dem Blut eines gesunden Spenders wurden PBMC isoliert und mit $\alpha CD4$ -Antikörper markiert. Th-Zellen prägen das CD4-Molekül mit großer Intensität aus. Eine geringere Intensität der Expression weisen die Monozyten auf, die aber gut von den CD4-negativen Zellen abzugrenzen sind.

4.1.1. CD4⁺-Separation

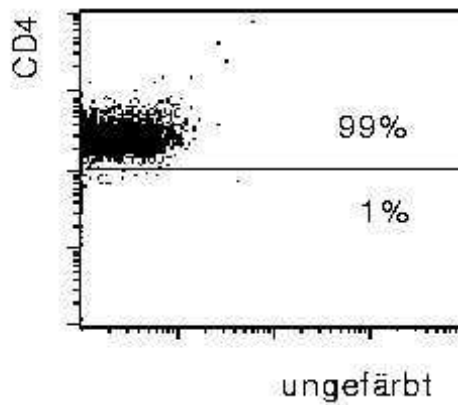
Wie Experimente der Arbeitsgruppe von Andreas Thiel gezeigt haben (Diplomarbeit S. Kimmig, 1999), wird eine größtmögliche Reinheit und gleichzeitig größtmögliche Ausbeute von humanen CD4⁺ Th-Zellen nur dann erreicht, wenn die magnetische Sortierung in zwei aufeinanderfolgenden Sortierungsschritten erfolgt. Die humanen PBMC wurden mit magnetischen Partikeln im Verhältnis 1:7 bei 4°C für 20 min inkubiert und dann über eine „Midi-Macs“ (VS+ Säulen) gegeben. Die so gewonnene CD4⁺-Fraktion wurde gewaschen und ein zweites Mal auf eine „Midi-Macs“ (VS+ Säule gegeben). Zellproben der unseparierten PBMC und der CD4⁺-Fraktion nach der ersten und zweiten Sortierung wurden mit α CD4 gefärbt und durchflußzytometrisch kontrolliert. Aus Abbildung 2 ist ersichtlich, daß erst nach dem zweiten Sortierungsschritt ein Reinheitsgrad von >99% erreicht wird und die CD4⁺ Monozyten nicht mehr nachweisbar sind.



PBMC



CD4⁺Th-Zellen nach der ersten Sortierung



CD4⁺Th-Zellen nach der zweiten Sortierung

Abb 2: CD4⁺ MACS-Sortierung

Die PBMC wurden mit α CD4 Beads gekoppelt und über eine VS+ Säule gegeben. Die positive Fraktion wurde aufgefangen und in einem zweiten Schritt über eine weitere Säule gegeben. So konnte die Reinheit von 96% auf über 99% gesteigert werden. Die Zellen wurden anschließend gegen CD4 gefärbt und durchflußzytometrisch kontrolliert.

4.1.2 Expression von CD45RA und CD45RO auf CD4⁺ TH-Zellen

Da naive CD4⁺ Th-Lymphozyten charakteristischerweise den CD45RA-Rezeptor auf ihrer Oberfläche ausprägen und Antigen-erfahrene CD4⁺ Effektorzellen den CD45RO Rezeptor exprimieren, können CD4⁺ Th-Zellen von gesunden Spendern mit fluoreszierenden Antikörpern, die spezifisch an CD45RA, CD45RO und CD4 binden, markiert und durchflußzytometrisch analysiert werden.

25-50% der CD4⁺ Th-Zellen des peripheren Blutes exprimieren ausschließlich CD45RA (CD45RA⁺ CD45RO⁻ Th-Zellen). 50-75% der CD4⁺ Th-Zellen prägen allein den CD45RO Rezeptor (CD45RO⁺ CD45RA⁻ Th-Zellen) auf ihrer Oberfläche aus. Ungefähr 20-30% der CD4⁺ Th-Zellen bilden eine Übergangsfraction und exprimieren gleichzeitig, aber deutlich schwächer beide, CD45-Isoformen auf ihrer Oberfläche (CD45RA^{low}/CD45RO^{low}) (Abb. 3).

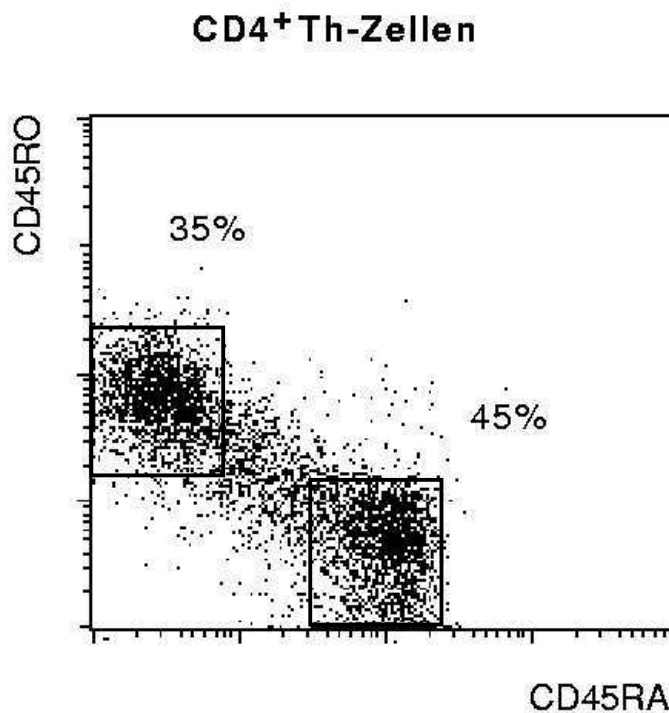


Abb. 3: Expression von CD45RA und CD45RO auf CD4⁺ Th-Zellen

CD4⁺ Th-Zellen wurden, wie beschrieben, mit Hilfe der MACS-Technik zu hoher Reinheit aus PBMC isoliert und oberflächlich gegen CD45RA und CD45RO gefärbt. Die FACS-Analyse zeigt die CD45RA⁺ und CD45RO⁺ Subpopulationen sowie die Übergangspopulation, die beide Isoformen exprimiert.

4.1.3 Experimentelles Sortierungssystem zur Isolierung von CD45RA⁺ CD45RO⁻ CD4⁺ Th-Zellen

Da das Ziel dieser Arbeit die Analyse der Zytokininduktionskinetik von naiven Th-Zellen nach Simulation in einer *in vitro*-Kultur war, mußten die naiven Th-Zellen von den antigenerfahrenen Effektor- oder Gedächtnis-Th-Zellen und den zytotoxischen Th-Zellen getrennt werden, um jeden Einfluß dieser Zellpopulationen auszuschließen.

Mit Hilfe der magnetischen Mehrparameter-Zellsortierung (MACS-MultiSort) konnten Zellen in mehreren aufeinanderfolgenden magnetischen Sortierungsschritten nach verschiedenen Oberflächenmarkern getrennt werden. Zur Trennung von antigenerfahrenen Th-Lymphozyten und Antigen-unerfahrenen Th-Lymphozyten werden zunächst die Oberflächenmoleküle CD45RA und CD45RO herangezogen.

Nachdem nach der ersten magnetischen Sortierung die CD4⁺ Th-Zellen mit über 98% Reinheit isoliert wurden, erfolgte die enzymatische Abspaltung der magnetischen Markierungsbeads. Eine erneute Markierung der CD4⁺ Th-Zellen mit α CD45RO-Mikrobesds wurde so möglich. In der dann folgenden magnetischen Sortierung wurden die CD45RO⁺ CD45RA⁺ CD4⁺ Th-Zellen depletiert und so die CD45RA⁺ CD45RO⁻ CD4⁺ Th-Zellen mit >99% Reinheit gewonnen (Abb. 4).

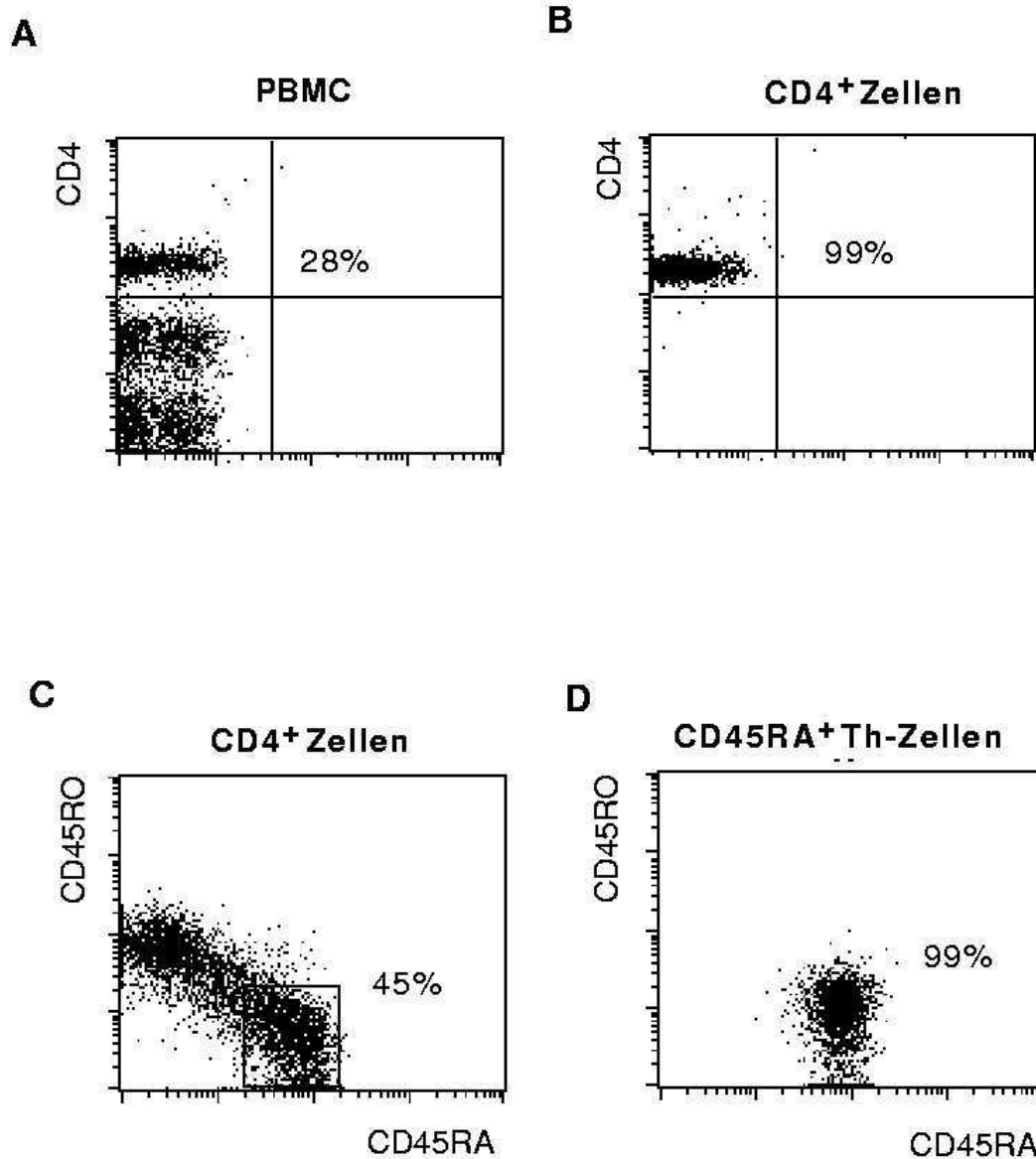


Abb. 4: Isolierung von CD45RA⁺ CD45RO⁻ CD4⁺ Th-Zellen

Aus PBMC (A) wurden im ersten magnetischen Sortierungsschritt CD4⁺ Th-Zellen angereichert (B). Nachdem die magnetischen Beads enzymatisch abgespalten worden waren, erfolgte in einer zweiten magnetischen Separation die Depletion der CD45RO⁺ CD4⁺ Th-Zellen. Die Originalfraktion wurde mit α CD4 markiert (A), die angereicherten CD4⁺ Th-Zellen sowie die depletierten CD45RA⁺ Th-Zellen wurden mit α CD4, α CD45RA und α CD45RO (B+C+D) gefärbt.

4.2 Analyse der Effektor-Zytokinproduktion der CD45RA⁺ CD45RO⁻ CD4⁺ Th-Zell-Subpopulationen nach α CD3/ α CD28 Stimulation und polyklonaler Restimulation

4.2.1 Einfluß der verschiedenen Konzentrationen der immobilisierten α CD3/ α CD28 Antikörper auf die Proliferation und Zytokinexpression der CD45RA⁺ CD45RO⁻ CD4⁺ Th-Zellen

Wie S. Kimmig (Arbeitsgruppe A. Thiel) in ihrer Diplomarbeit zeigen konnte, ist sowohl die Proliferation als auch die Zytokinproduktion nach Restimulation der CD45RA⁺ CD45RO⁻ CD4⁺ Th-Zellen unmittelbar abhängig von der Signalstärke der Antikörper α CD3 und α CD28. Als Ergebnis verschiedener Experimente stellte sich eine Konzentration von 1 μ g α CD3 und 5 μ g α CD28 in Bezug auf Proliferation und Zytokinproduktion als optimal heraus. Diese Stimulierungskonzentrationen wurden auch in allen folgenden Experimente verwendet und für die Kultivierung von CD31⁺ und CD31⁻ Th-Zellen überprüft (siehe unten).

4.2.2 Polarisierung von CD45RA⁺ CD45RO⁻ CD4⁺ Th-Zellen in proinflammatorische und antiinflammatorische Effektorzellen

In vielen Studien ist der Einfluß von verschiedenen Zytokinen auf die Th-Zelldifferenzierung in proinflammatorische und antiinflammatorische Effektorzellen beschrieben worden. IL-12 und IFN- γ werden allgemein als die Schlüsselzytokine der Th1-Differenzierung angesehen (Swain et al., 1990; Hsieh et al., 1993). Die Anwesenheit von IL-12 fördert die IFN- γ Produktion von Th-Lymphozyten (Seder et al., 1993), und IFN- γ verstärkt die Wirkung von IL-12 (Abbas et al., 1997). Die zusätzliche Gabe von α IL-4 verhindert eine Differenzierung in IL-4 produzierende antiinflammatorische Effektorzellen (Constant und Bottomly, 1997). IL-4 dagegen wird als das wichtigste Zytokin für die Differenzierung von naiver Th-Lymphozyten zu antiinflammatorischen Effektorzellen betrachtet.

Ergebnisse

Im nachfolgenden Experiment sollte überprüft werden, ob und inwieweit die einzelnen in der Literatur angegebenen Zytokine und Antikörper einen Effekt auf die Zytokinproduktion der Th-Zellen ausüben.

Die CD45RA⁺ CD45RO⁻ CD4⁺ Th-Zellen von drei gesunden Spendern wurden wie unter 4.1.3 beschrieben mittels MACS-MultiSort-Technik isoliert, je Spender drei Ansätze (5×10^5 Zellen/Ansatz) mit α CD3/ α CD28 stimuliert und eine Woche kultiviert. Alle Ansätze wurde mit IL-2 (100U/ml) versetzt, das ein zusätzliches unspezifisches Stimulationsignal liefert. Nach einer Woche wurden die Zellen mit PMA und Ca²⁺-Inophor Ionomycin für sechs Stunden restimuliert (unter Zusatz von Brefeldin A nach zwei Stunden) und fixiert. Anschließend wurde die intrazelluläre IL-4 und IFN- γ Produktion durchflußzytometrisch nachgewiesen.

Ansätze:

1. Keine Zugabe von polarisierenden Zytokinen
2. Zugabe von rekombinanten IL-12 (1ng/ml)
3. Zugabe von rekombinanten IL-12 (1ng/ml) + α IL-4 (10 μ g/ml)
4. Zugabe von IL-4 (100ng/ml)
5. Zugabe von IL-4 (100ng/ml) + α IFN- γ (2 μ l/ml)

Abb. 5 zeigt beispielhaft die IFN- γ Expression eines gesunden repräsentativen Spenders. Im Vergleich mit den restimulierten unpolarisierten CD45RA⁺ CD45RO⁻ CD4⁺ Th-Zellen, die nur zwischen 3-5% IFN- γ produzierende Zellen aufwiesen, steigerte die Zugabe von IL-12 den Anteil bereits auf 7-9% und die zusätzliche Gabe von α IL-4 auf 12-15%. Wie erwartet wirkte sich die Anwesenheit der zur Th2-Differenzierung polarisierenden Zytokine/ Antikörper IL-4 und α IFN- γ negativ auf den Anteil der IFN- γ produzierenden Zellen aus. Der Anteil der IFN- γ produzierenden Zellen fiel auf unter 4% ab. Die Zugabe von IL-4 und α IFN- γ bewirkt eine leichte Frequenzsteigerung der IL-4 positiven Zellen von <0.5% auf 1-2% (nicht dargestellt).

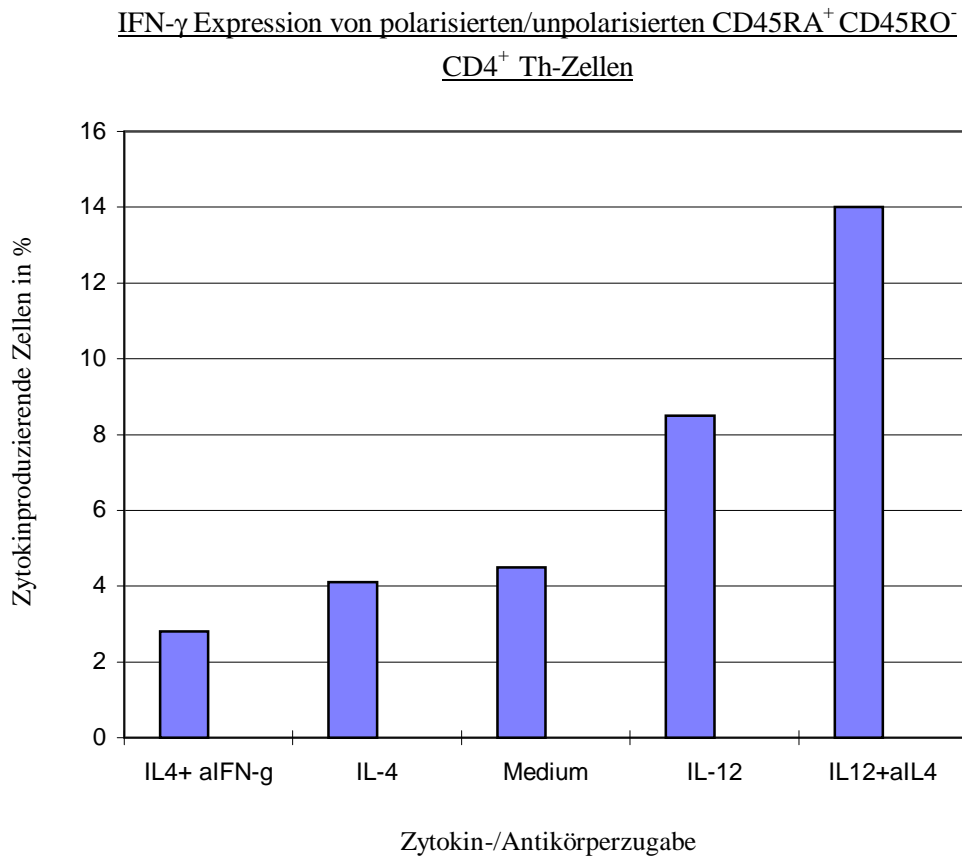


Abb. 5: Expression von IFN- γ von restimulierten CD45RA⁺ CD45RO⁻ CD4⁺ Th-Zellen

Isolierte CD45RA⁺ Zellen wurden in Anwesenheit von verschiedenen Th1- und Th2-polarisierenden Zytokinen und IL-2, bzw. unter nicht polarisierten Bedingungen (nur Zugabe von IL-2) mit α CD3/ α CD28 stimuliert und nach einer Woche mit PMA/Ionomycin restimuliert und intrazellulär gegen IFN- γ und IL-4 (nicht dargestellt) gefärbt. Dargestellt ist beispielhaft die Expression von IFN- γ eines gesunden Spenders.

4.2.3 Einfluß der α CD3/ α CD28 Stimulationszeit auf die Zytokinfrequenz von polarisierten CD45RA⁺ CD45RO⁻ CD4⁺ Th-Zellen

In der Literatur wird beschrieben, CD45RA⁺ CD45RO⁻ CD4⁺ Th-Zellen für 48 Stunden mit den immobilisierten Antikörpern α CD3 und α CD28 zu stimulieren, da sonst, in Folge einer Überstimulation, eine Abnahme der zytokinproduzierenden Effektorzellen zu beobachten sei. Im folgenden Versuch sollte die Richtigkeit dieser Annahme überprüft werden.

CD45RA⁺ CD45RO⁻ CD4⁺ Th-Zellen von sechs gesunden Spendern wurden wie unter 4.1.3 beschrieben isoliert. Je 5×10^5 Zellen/Ansatz wurden

1. nur in Anwesenheit von IL-2
2. unter Th1-polarisierenden Bedingungen (IL-12, α IL-4 und IL-2)
3. unter Th2-polarisierenden Bedingungen (IL-4 , α IFN- γ und IL-2)

parallel für 48 Stunden, bzw. für sieben Tage mit α CD3 und α CD28 stimuliert und alle Ansätze nach einer Woche mit PMA/Ionomycin restimuliert und nach Permeabilisierung der Zellmembranen intrazellulär gegen IL-4 und IFN- γ gefärbt.

Unerwarteterweise konnte in allen Ansätzen der sechs Spender ein deutlicher Anstieg der zytokinproduzierenden Zellen nachgewiesen werden, auch wenn die Zellen statt 48h die gesamte Kulturzeit dem Einfluß von α CD3 und α CD28 ausgesetzt waren. Ein Absterben der Zellen in Folge von Überstimulation konnte nicht beobachtet werden. In der für 48h stimulierten Kultur waren im Mittel 4% der Effektorzellen IFN- γ Produzenten, während man in der Langzeitstimulation einen mittleren Anstieg auf 11,9% nachweisen konnte. Ähnlich verhielt es sich in der Th1-polarisierten Kultur (mittlerer Anstieg von 14,7% auf 36%). Erwartungsgemäß lag der Anteil der IFN- γ Produzenten in der Th2-Kultur deutlich unter den Werten der Th1-Kultur mit im Mittel 3% in der 48h-Stimulation und 4% in der 7-tägigen Stimulation.

Die Analyse der IL-4 Produzenten zeigte ähnliche Effekte. In der unpolarisierten Kultur stieg der mittlere Anteil der IL-4 produzierenden Zellen von 1,2% auf 2,2% und in der Th1-polarisierten Kultur von 0,5% auf 1,6%. Ein deutlicher Effekt ließ sich in der Th2-Kultur nachweisen, in der sich der mittlere Anteil der IL-4 positiven Zellen von 5,3% auf 9,8% steigern ließ. Da die Analyse klar für eine längere Stimulationszeit sprach, wurde in den anschließenden Versuchen von der 48h Stimulation Abstand genommen.

Ergebnisse

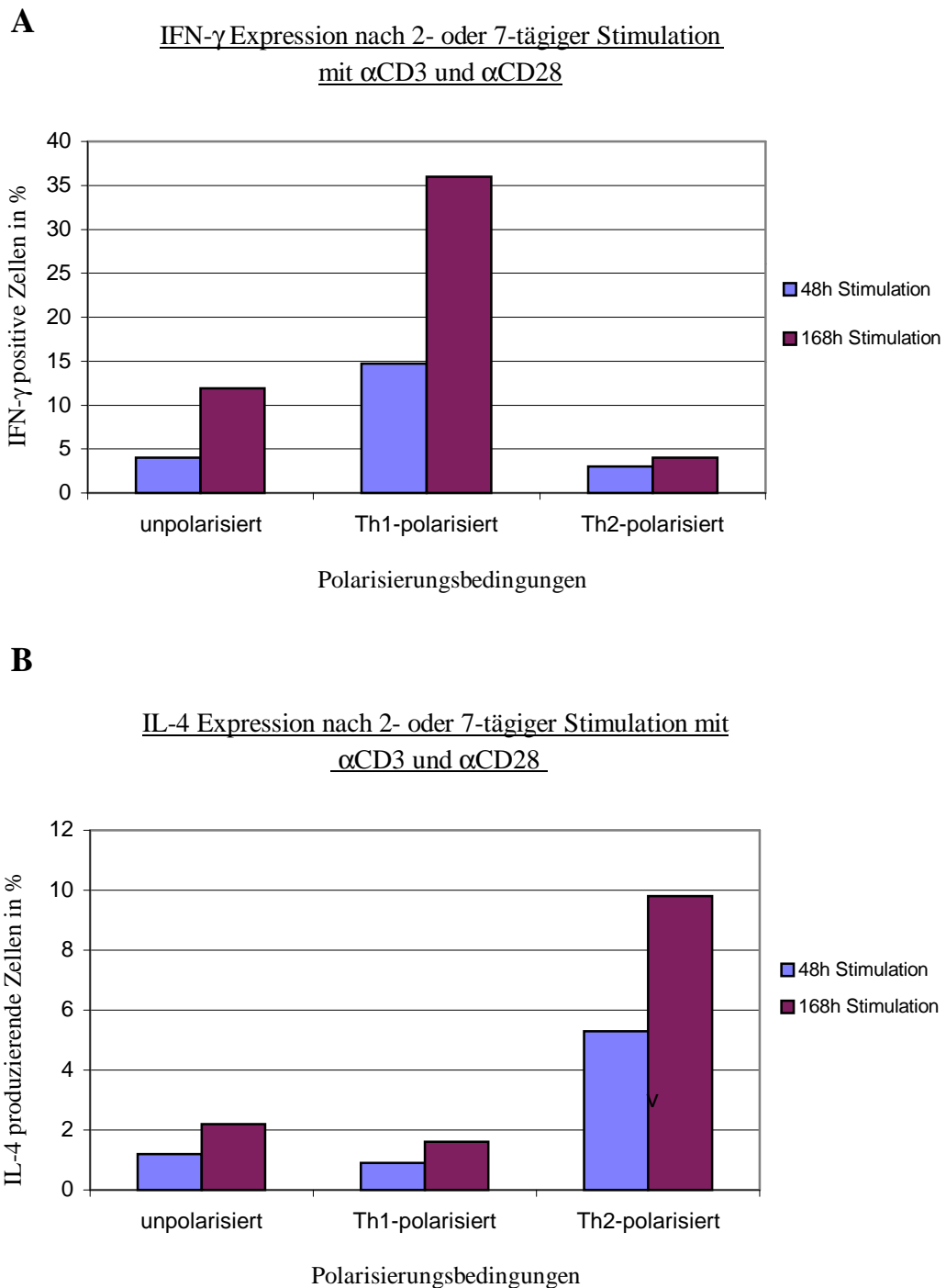


Abb. 6: Zytokinexpression von CD45RA⁺CD45RO⁻CD4⁺ Th-Zellen nach zwei und sieben Tagen Stimulation mit α CD3/ α CD28

Isolierte CD45RA⁺ CD45RO⁻ CD4⁺ Th-Zellen wurden unter unpolarisierten Bedingungen (IL-2 Zugabe), unter Th1-polarisierenden Bedingungen (IL-12 und α IL-4) (A) sowie unter Th2-polarisierenden Bedingungen (IL-4 und α IFN- γ) (B) für 48 und 168h mit α CD3/ α CD28 stimuliert und nach sieben Kulturtagen mit PMA/Ionomycin restimuliert, fixiert und intrazellulär gegen IL-4 und IFN- γ gefärbt. Dargestellt ist beispielhaft ein repräsentativer Spender.

4.2.4 Einfluß der Kulturdauer auf die Zytokinproduktion von Th1-polarisierten CD45RA⁺ CD45RO⁻ CD4⁺ Th-Zellen

Im vorangegangenen Versuch konnte zwar gezeigt werden, daß CD45RA⁺ CD45RO⁻ CD4⁺ Th-Zellen eine höhere Zytokinfrequenz aufweisen, wenn sie während des gesamten Kulturzeitraums dem Einfluß von α CD3/ α CD28 ausgesetzt sind, unklar ist jedoch, ob die Restimulation der Zellen nach vollen sieben Tagen in Kultur zum Zeitpunkt der maximalen Zytokinexpression erfolgt.

CD45RA⁺ CD45RO⁻ CD4⁺ Th-Zellen von zwei gesunden Spendern wurden, wie unter 4.1.3 beschrieben, mit großer Reinheit isoliert und in Th1-Richtung polarisiert (IL-12 + α IL-4 + IL-2). Dabei wurden erstmals nur 5×10^4 Zellen pro Ansatz verwendet und parallel nach fünf und sieben Tagen mit PMA/Ionomycin restimuliert sowie intrazellulär gegen IFN- γ gefärbt. In den jeweiligen Kulturüberständen wurde die IFN- γ Konzentration mittels eines Bead-ELISA quantifiziert.

Die durchflußzytometrische Analyse der restimulierten Zellen zeigte bei beiden Spendern eine höhere Frequenz der IFN- γ positiven Zellen nach fünf Kulturtagen (30%, 38%) gegenüber 12% und 20% nach sieben Kulturtagen. Erwartungsgemäß wiesen die 7-Tageskulturen mehr IFN- γ im Überstand auf (9,9ng/ml, 12,3ng/ml) als die 5-Tageskulturen (7,2ng/ml und 9,8ng/ml).

In allen nachfolgenden Versuchen wurden jeweils 5×10^4 Zellen pro Ansatz für fünf Tage in Anwesenheit von α CD3/ α CD28 kultiviert.

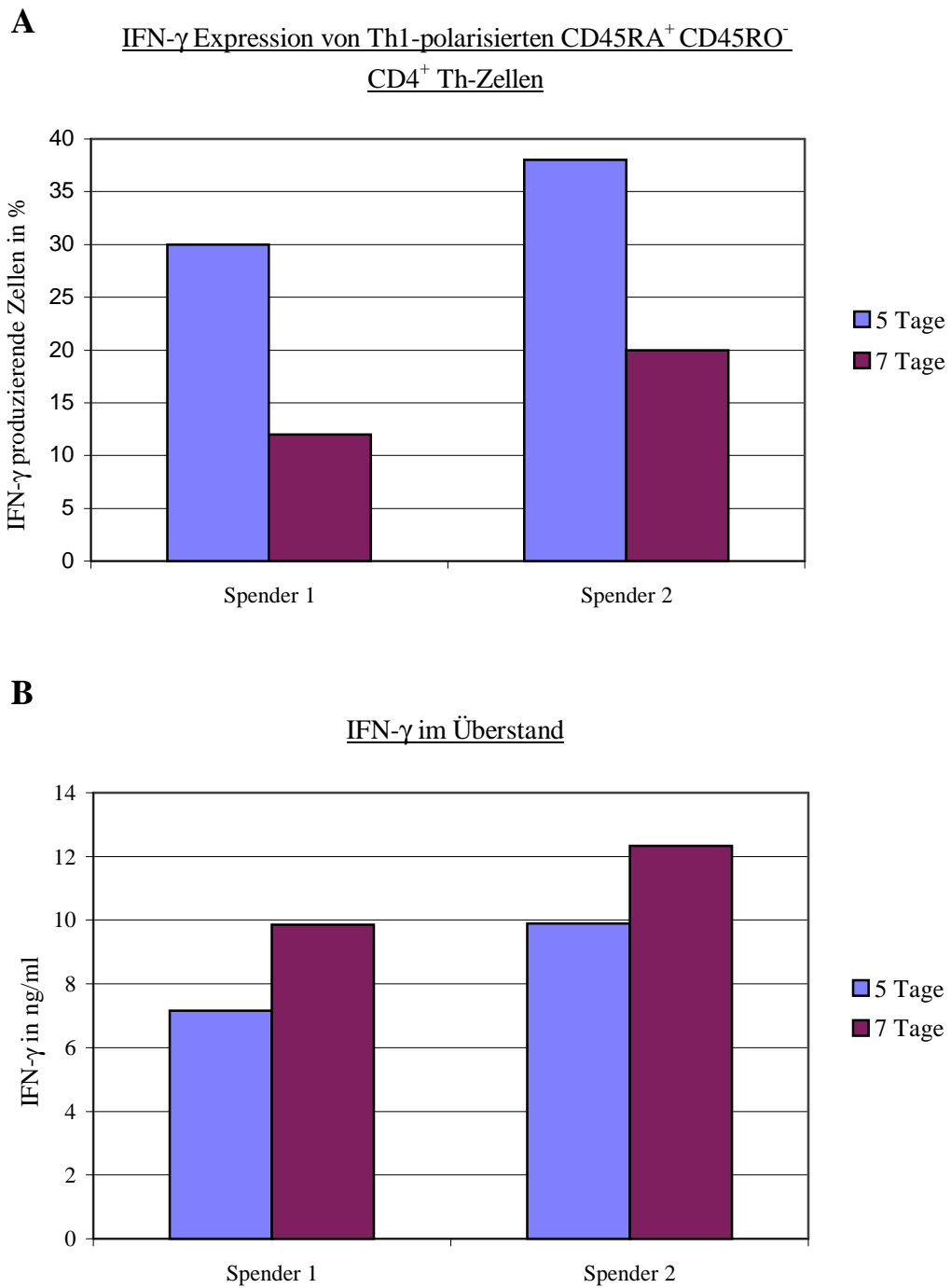


Abb. 7: IFN- γ Expression und IFN- γ im Überstand nach fünf und sieben Kulturtagen

Isolierte CD45RA⁺ Th-Zellen von zwei gesunden Spendern wurden in Th1-Richtung polarisiert und in Anwesenheit von α CD3/ α CD28 kultiviert. Nach fünf und sieben Tagen wurde jeweils der Überstand entnommen, die Zellen mit PMA/Ionomycin restimuliert und durchflußzytometrisch auf die IFN- γ Expression analysiert (A). Im Überstand wurde die Konzentration von IFN- γ bestimmt (B).

4.2.5 Proliferationstest (generelle Kontrolle der Aktivierung)

Im zirkulierenden Blut befinden sich die Lymphozyten als ruhende Zellen in der G₀-Phase des Zellzyklus. Nach der polyklonalen Stimulation treten sie in die G₁-Phase ein und durchlaufen anschließend den Zellzyklus.

Abhängig vom Zelltypus beginnen stimulierte T-Zellen *in vitro* nach ca. einer Stunde (antigenerfahrene Th-Zellen), bzw. nach ca. 20 Stunden (naive Th-Zellen) zu proliferieren (Iezzi et al., 1998) und sich in große aktivierte Blasten umzuwandeln.

Um die Aktivierung von Th-Zellen durch α CD3/ α CD28 Antikörper zu überprüfen, wurden verschiedene Arten der Kontrolle durchgeführt.

4.2.5.1 Beobachtung von Zellkulturen im Lichtmikroskop

Die aktivierte Zelle läßt sich optisch deutlich von den kleinen runden ruhenden Zellen abgrenzen. Blasten sind wesentlich größer und formvariabler als nicht stimulierte Zellen. Zusätzlich zeigen sie eine Tendenz zur Zusammenlagerung (sie bilden Zellhaufen, sogenannte Cluster).

4.2.5.2 Kontrolle der Blastenbildung durch die FACS-Parameter Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht

Als weitere schnelle Proliferationsüberprüfung eignet sich die durchflußzytometrische Analyse der lebenden Zellen. Der entsprechenden Zellkultur wird ein Aliquot entnommen, und die toten Zellen werden durch die Zugabe von PJ markiert. Anschließend wird die Probe im FACS gemessen. Da das Vorwärtsstreulicht vorwiegend mit der Zellgröße korreliert, läßt sich eine Transformation von kleinen ruhenden T-Zellen in große aktivierte Zellblasten erkennen. Durch den Anteil der Blasten an der gesamten Lymphozytenpopulation und ihrer Größe läßt sich eine Aussage über den Proliferationszustand und die Aktivierung einer Zelle treffen.

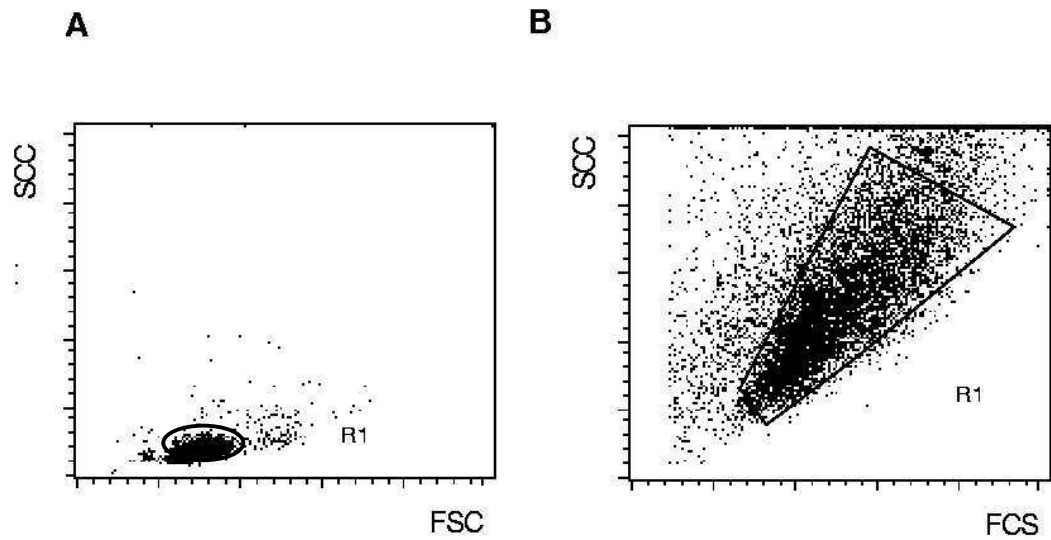


Abb. 8: FACS-Analyse von $CD45RA^+ CD45RO^- CD4^+$ Th-Zellen in Bezug auf ihre Streulichteigenschaft

(A) unstimuliert $CD45RA^+ CD45RO^- CD4^+$ Th-Zellen direkt nach der Isolierung aus dem Blut.

(B) Blastenbildung von $\alpha CD3/\alpha CD28$ stimulierten $CD45RA^+ CD45RO^- CD4^+$ Th-Zellen nach fünf Tagen.

4.3. CD31⁺ und CD31⁻ CD45RA⁺ CD45RO⁻ CD4⁺ Th-Zell-Subpopulationen

4.3.1 Detektion von antigenerfahrenen Th-Zellen innerhalb der CD45RA⁺ CD45RO⁻ CD4⁺ Th-Zell-Subpopulation

Wie bereits erwähnt, handelt es sich bei der CD45RA⁺ CD45RO⁻ CD4⁺ Th-Zell-Subpopulation nicht um eine homogene Population. CD27⁻ Th-Zellen können typischerweise nach wiederholter Antigenstimulation in antigenerfahrenen CD45RO⁺ Th-Zellen nachgewiesen werden (van Lier et al., 1987; de Jong 1992). Dieses Oberflächenmerkmal ist auch auf einem Teil der als naiv angesehenen CD45RA⁺ Zellen zu finden. Auf Grund dieser Beobachtung ist anzunehmen, daß ein Teil der CD45RA⁺ Th-Zellen nicht naiv, sondern bereits antigenerfahren ist. Als weiteren Marker für die naiven und die antigenerfahrenen Th-Zellen innerhalb der CD45RA⁺ Subpopulation wird das Oberflächenmolekül CD31 angesehen. CD27⁻ CD45RA⁺ Th-Zellen sind ausschließlich in der CD31⁻ Subpopulation der CD45RA⁺ Zellen nachzuweisen, die somit die "antigenerfahrene Zellpopulation" bildet. Da das Ziel dieser Arbeit die Etablierung eines Systems zur Analyse der Th1-Zytokininduktion von naiven Th-Zellen ist, wäre es nicht sinnvoll, dies auf der Ebene der CD45RA⁺ Zellen zu tun, da die CD31⁻ Subpopulation innerhalb der CD45RA⁺ Lymphozyten bis jetzt nicht vollständig charakterisiert ist.

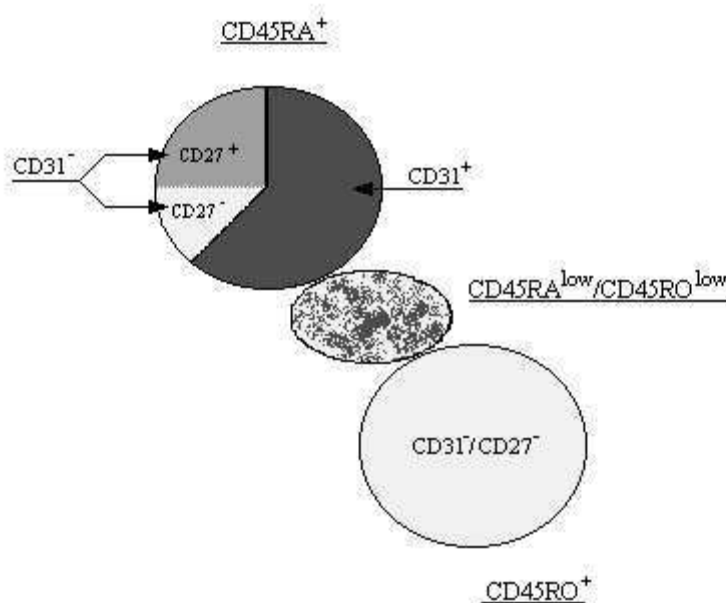


Bild 3: CD4⁺ Subpopulationen

4.3.2 Experimentelles Sortierungssystem zur Isolierung von CD31⁺ und CD31⁻ CD45RA⁺ CD45RO⁻ CD4⁺ Th-Zellen

Auf Grund der unter 4.3.1 beschriebenen Beobachtungen ist es erforderlich, eine Isolierungsmethode zu etablieren, die eine maximale Anreicherung der CD31⁺ Zellsubpopulation gewährleistet, aber auch die CD31⁻ Zellen möglichst rein isoliert, um eventuelle Unterschiede zwischen den Populationen aufzudecken. Prinzipiell standen für diese Arbeit zwei Sortierungssysteme zur Verfügung, die auch beide zeitweise angewandt wurden. Die Anreicherung der gewünschten Zellfraktionen mittels FACS-Sorter wurde unter 4.3.6 beschrieben.

Mit Hilfe der unter 4.1.4 beschriebenen magnetischen Mehrparameter-Zellsortierung wurden CD4⁺ Th-Zellen angereichert, die CD45RO⁺ Zellen depletiert und so die CD45RA⁺ CD45RO⁻ CD4⁺ Th-Zellen isoliert. In einem dritten Separationsschritt erfolgt die Trennung von CD31⁺ und CD31⁻ Th-Zellen. Dazu werden die CD45RA⁺ CD45RO⁻ CD4⁺ Th-Zellen mit FITC gekoppeltem α CD31 gefärbt und anschließend mit anti-FITC-Beads inkubiert. Die somit indirekt mit den Mikrobeads markierten CD45RA⁺ Lymphozyten wurden in zwei aufeinander folgenden Schritten über einer VS+ Säule magnetisch getrennt. Die Anreicherung in zwei Schritten ist nötig, um die erforderliche Reinheit der CD31⁺ Subpopulation zu gewährleisten (>97%). Die Isolierung der CD31⁻ Fraktion fiel deutlich schlechter aus, erlaubt aber dennoch Aussagen über diese Subpopulation zu treffen. Zellproben der unseparierten Ausgangsfraktion sowie Proben nach dem ersten und zweiten Sortierungsschritt wurden entnommen, mit α CD31-PE gefärbt und durchflußzytometrisch kontrolliert. Durch diese Isolierungsmethode wird ein Auftreten von CD45RO⁺ Effektorzellen nahezu vollständig ausgeschlossen.

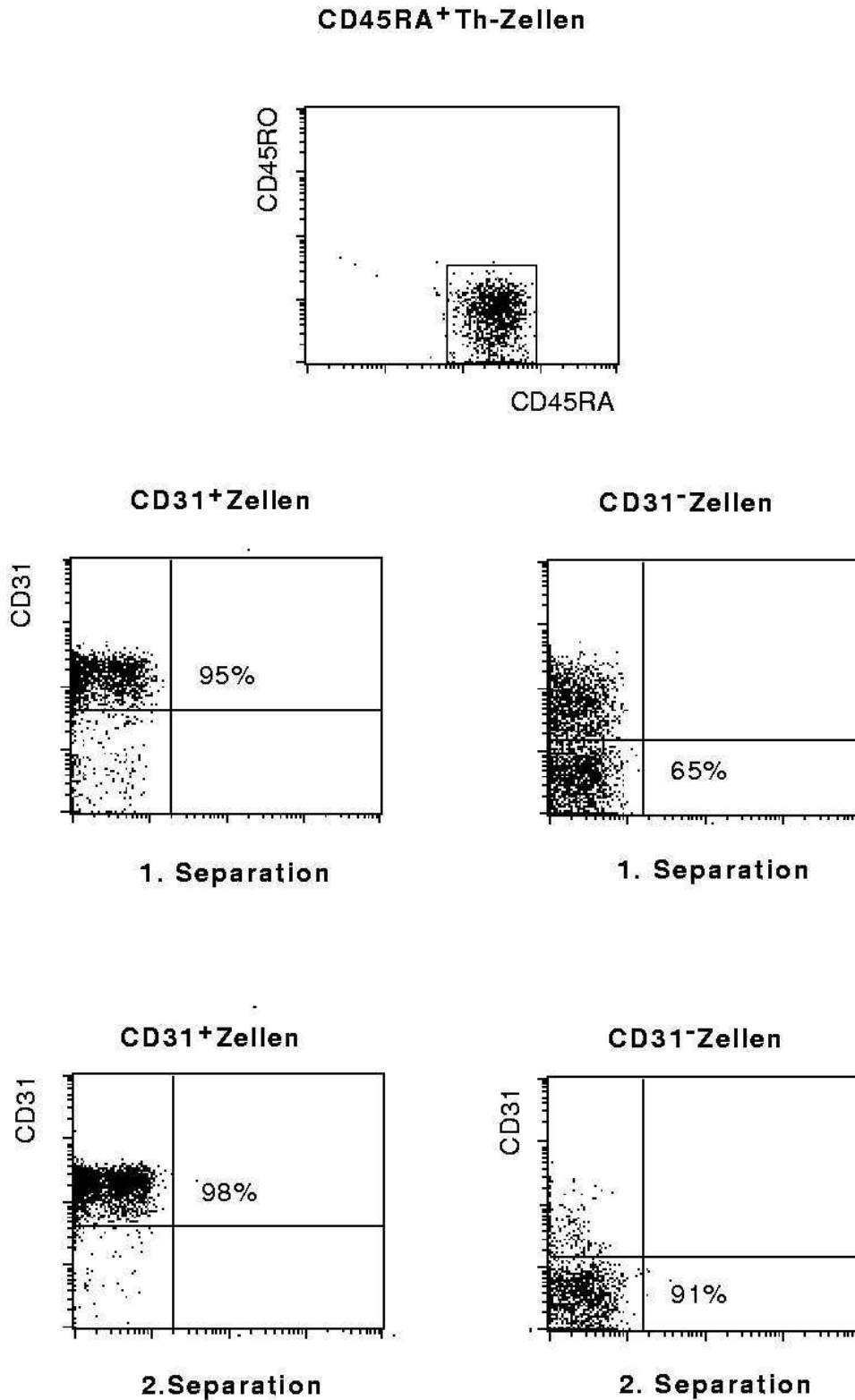


Abb. 9: Isolierung von CD31⁺ und CD31⁻ CD45RA⁺ CD45RO⁻ CD4⁺ Th-Zellen

CD45RA⁺ CD45RO⁻ CD4⁺ Th-Zellen wurden wie unter 4.1.4 beschrieben isoliert und mit α CD45RA und α CD45RO markiert (A). Durch den dritten Isolierungsschritt mittels MACS-Technik wurden CD31⁺ und CD31⁻ CD45RA⁺ CD45RO⁻ CD4⁺ Th-Zellen angereichert (B+C). Dieser Schritt mußte zweimal durchgeführt werden, um die erforderliche Reinheit zu erhalten (D+E). Die erhaltenen Fraktionen wurden mit α CD31-PE markiert.

4.3.3 Titration von α CD3 auf unpolarisierten $CD31^+$ und $CD31^- CD45RA^+ CD45RO^- CD4^+$ Th-Zellen

Wie unter 4.2.1 beschrieben, wurden für die Vorversuche die von S. Kimmig als optimal angesehenen Konzentrationen für die immobilisierten Antikörper α CD3/ α CD28 verwendet. Um zu überprüfen, ob diese Konzentrationen auch für die $CD31^+$ und $CD31^-$ Subpopulation optimal in Bezug auf Proliferation und Zytokinproduktion sind, wurde die Titration von α CD3 wiederholt.

$CD31^+$ und $CD31^- CD45RA^+ CD45RO^- CD4^+$ Th-Zellen wurden mittels magnetischer Mehrparametersortierung aus den PBMC von zwei gesunden Spendern gewonnen. Auf mit unterschiedlichen α CD3-Konzentrationen beschichteten Platten wurden $CD31^+$ und $CD31^-$ Zellen in Anwesenheit von IL-2 kultiviert. Die Konzentration von α CD28 wurde nicht variiert. Nach 5-tägiger Kultur wurden die Zellen restimuliert, fixiert und intrazellulär gegen IL-2, TNF- α und IFN- γ gefärbt. Die Antikörper wurden in folgende Konzentrationen eingesetzt:

α CD3 (UCTH1): 0 μ g/ml, 0.05 μ g/ml, 0.2 μ g/ml, 1 μ g/ml, 2 μ g/ml

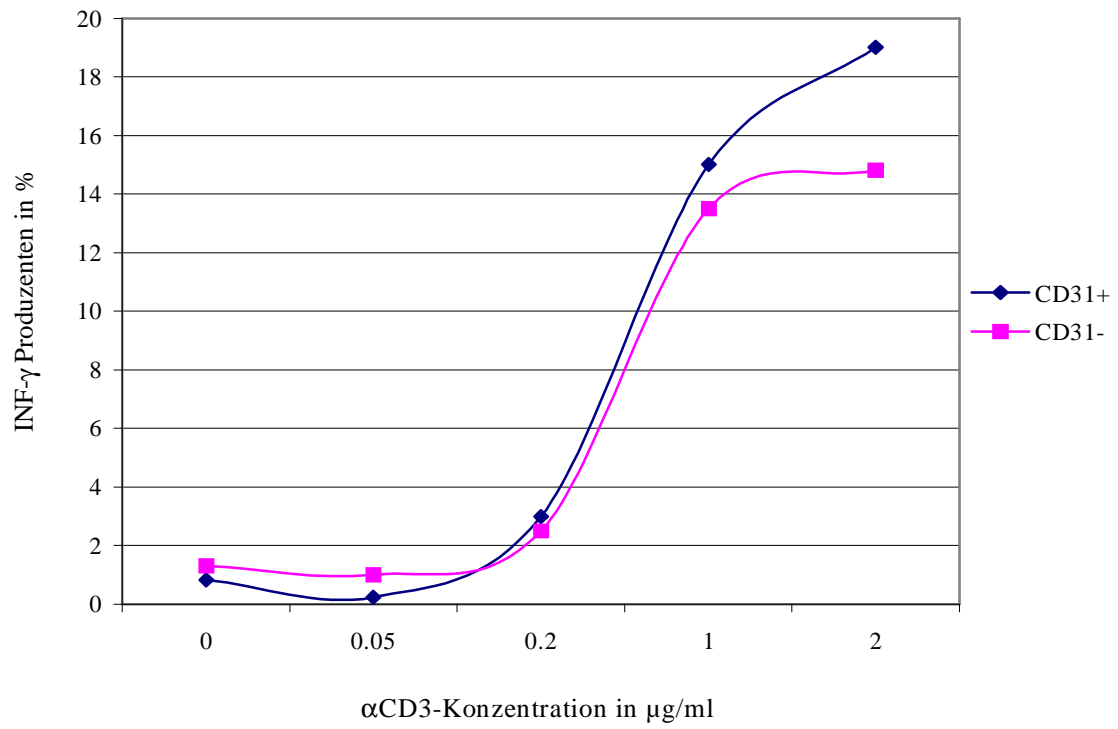
α CD28: 5 μ g/ml

Abbildung 10 zeigt die Mittelwerte der beiden Spender.

Ergebnisse

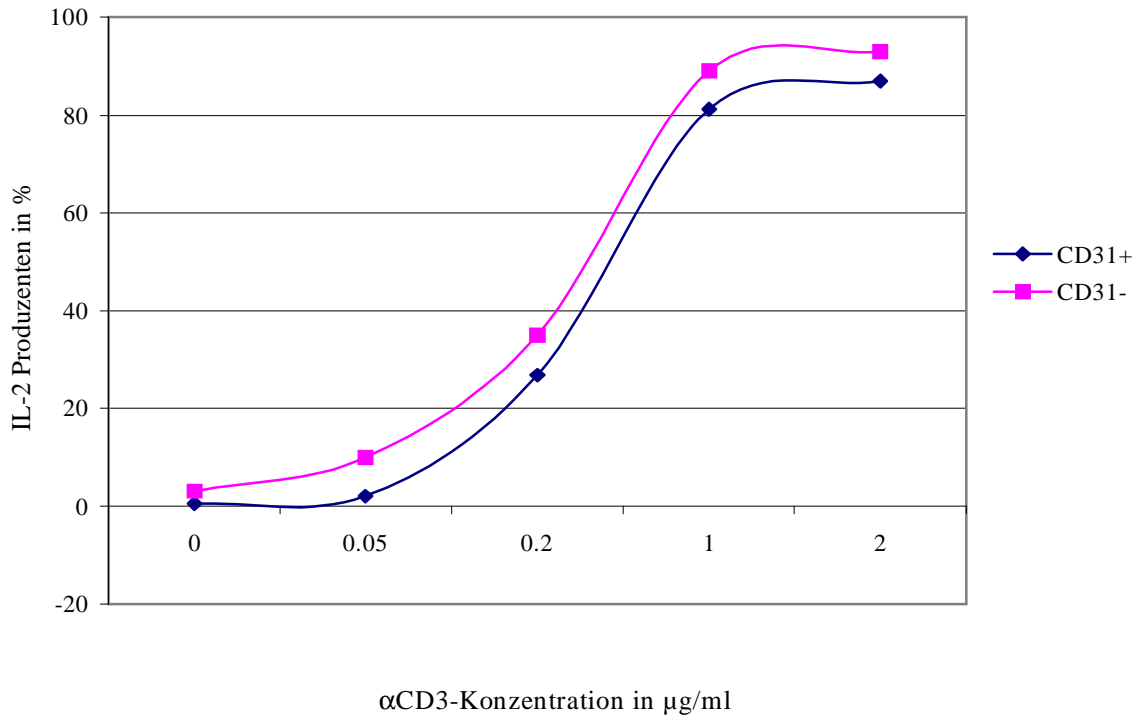
A

IFN- γ Produktion von CD31⁺/CD31⁻ Th-Zellen



B

IL-2 Produktion von CD31⁺/CD31⁻ Th-Zellen



C

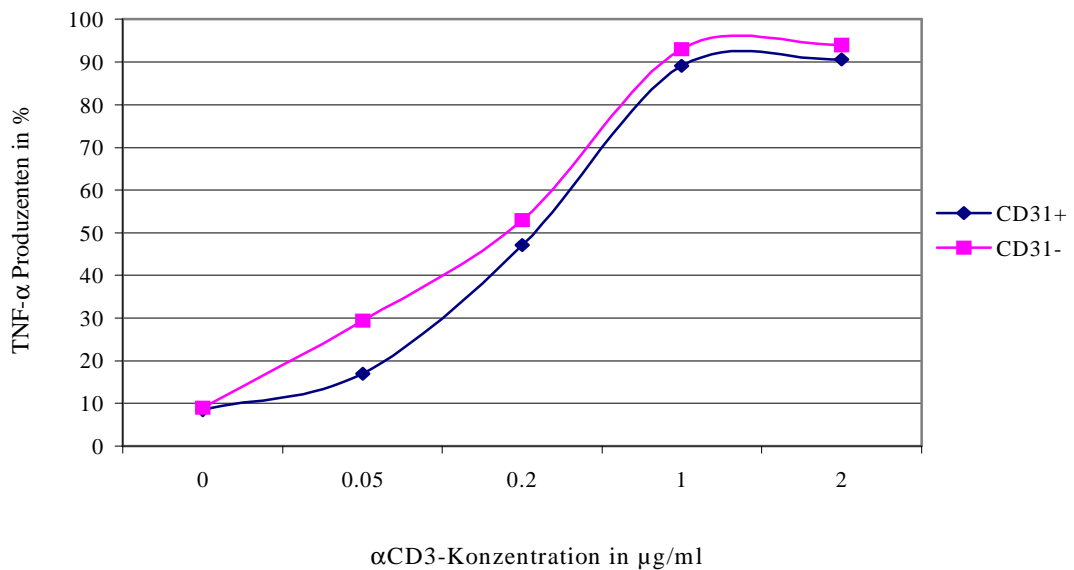
TNF- α Produktion von CD31⁺/CD31⁻ Th-Zellen

Abb. 10: Zytokinexpression von CD31⁺ und CD31⁻ Th-Zellen in Abhängigkeit der α CD3-Konzentration

CD31⁺ und CD31⁻ Th-Zellen wurden mittels der magnetischen Säulensortierung isoliert und anschließend wie beschrieben mit verschiedenen Konzentrationen α CD3 stimuliert, nach fünf Tagen mit PMA/Ionomycin restimuliert, fixiert und intrazellulär gegen IFN- γ , IL-2 und TNF- α gefärbt.

(A) IFN- γ Expression von unpolarisierten CD31⁺/CD31⁻ CD45RA⁺ CD45RO⁻ CD4⁺ Th-Zellen

(B) IL-2 Expression von unpolarisierten CD31⁺/CD31⁻ CD45RA⁺ CD45RO⁻ CD4⁺ Th-Zellen

(C) TNF- α Expression von unpolarisierten CD31⁺/CD31⁻ CD45RA⁺ CD45RO⁻ CD4⁺ Th-Zellen

Die Expression des Th1-Zytokins IFN- γ steigt erst bei Konzentrationen von über 0,2 μg α CD3 signifikant an und steigert sich bei beiden Spendern für die CD31⁺ Th-Zellen von unter 4% (0,2 μg) auf 12,5% - 18 % bei einer Stimulationskonzentration von 1 μg . Bei Verwendung von 2 μg α CD3 erfolgt ein etwas geringerer Anstieg der zytokinproduzierenden Zellen auf 16% - 21%.

Der Anteil der IL-2 Produzenten lässt sich bereits in den niedrigen Titrationsstufen deutlich steigern, wobei der steilste Anstieg zwischen 0,05 μg -1 μg α CD3 zu finden ist (7% auf 90%). Die Zugabe von 2 μg α CD3 bewirkt dagegen nur noch einen

geringen Anstieg auf 95%. Die Analyse der TNF- α Produzenten zeigte ein ähnliches Bild, wie die IL-2 positiven Zellen. Auch hier fällt der steile Anstieg der Produzenten in den niedrigen Konzentrationsbereichen auf, der sich ebenfalls bei einer Steigerung der IL-12 Konzentration von 1 μ g auf 2 μ g deutlich abflachte. Das Verhalten der CD31⁺ und CD31⁻ Th-Zellen zeigte bei diesem Versuch keine großen Unterschiede.

Auf Grund dieser Beobachtungen wurden die Konzentrationen der immobilisierten Antikörper α CD3/ α CD28 wie bisher eingesetzt, da bei allen Zytokinen die größte Steigerung zwischen den Titrationsstufen 0,2 μ g und 1 μ g zu beobachten war, wohingegen der Anstieg der Zytokinfrequenz der letzten Titrationsstufe vergleichsweise gering erschien. Das völlige Fehlen des α CD3 Stimulationssignals führt nicht zum vollständigem Sterben der Zellen.

4.3.4 IL-12 Titration auf CD31⁺ und CD31⁻ CD45RA⁺ CD45RO⁻ CD4⁺ Th-Zellen

Um potentielle Unterschiede in Induktion und Stärke der Zytokinexpression naiver Th-Zellen zwischen rheumatisch erkrankten Personen und Gesunden zu entdecken, wurde das Zytokinpotential von CD31⁺ und CD31⁻ CD45RA⁺ CD45RO⁻ CD4⁺ Th-Zellen gesunder Spender nach α CD3/ α CD28 Stimulation in Anwesenheit unterschiedlicher IL-12 Konzentrationen analysiert. Durch diesen Versuch sollte zum einen festgestellt werden, welche IL-12 Konzentration ausreichend ist, um in naiven CD31⁺/CD31⁻ CD45RA⁺ CD45RO⁻ CD4⁺ Th-Zellen eine Differenzierung zu Th1-Effektorzellen zu induzieren, zum anderen, ob eine schrittweise Steigerung der IL-12 Konzentration auch eine stetige Zunahme der IFN- γ produzierenden Zellen zur Folge hat. Im Hinblick auf nachfolgende Versuche sollte ein Titrationsbereich festgelegt werden, der geeignet ist, Unterschiede zwischen erkrankten Personen und gesunden Spendern in Bezug auf Stärke und Kinetik der induzierten Zytokine aufzudecken.

Wie in 4.3.2 beschrieben wurden CD31⁺ und CD31⁻ CD45RA⁺ CD45RO⁻ CD4⁺ Th-Zellen mit Hilfe der MACS-Technik zu größtmöglicher Reinheit isoliert und fünf Tage in Anwesenheit von α IL-4 und IL-2 mit unterschiedlichen IL-12 Konzentrationen

(0,1ng, 0,1ng, 1ng, 5ng, 10ng) kultiviert. Zur Kontrolle lief parallel ein Ansatz nur mit α IL-4 und IL-2 ohne IL-12 Zugabe mit. Nach fünf Tagen wurden die Zellen restimuliert und fixiert und die Prozentzahl der intrazellulär IFN- γ positiven Zellen durchflußzytometrisch bestimmt. Abbildung 11 zeigt beispielhaft einen repräsentativen Titrationskurvenverlauf eines gesunden Spenders.

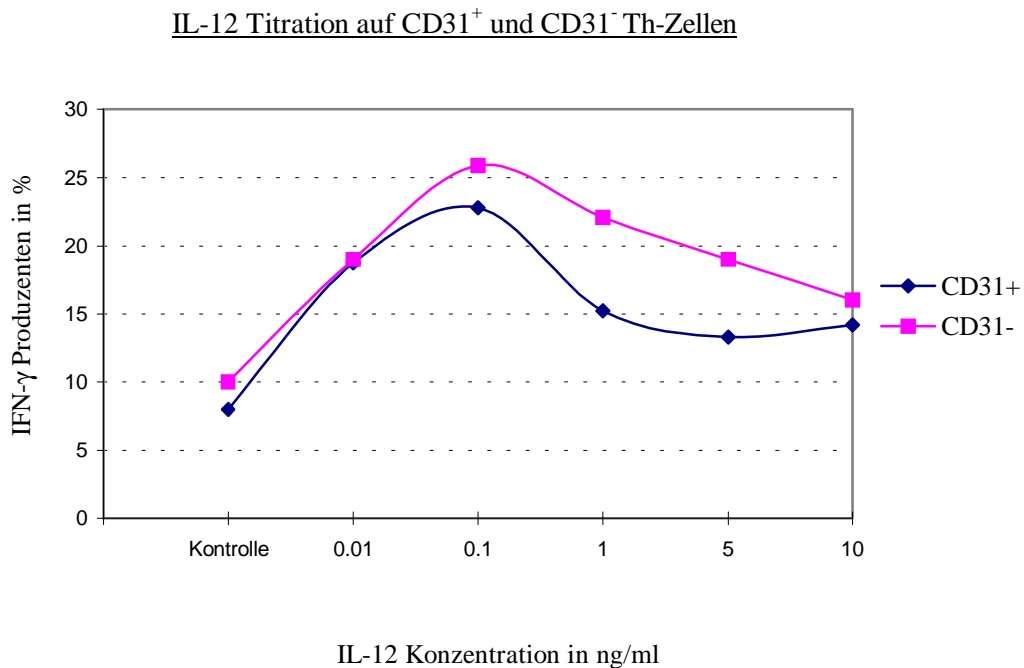


Abb. 11: IFN- γ Expression von CD31⁺ und CD31⁻ CD45RA⁺ CD45RO⁻ CD4⁺ Th-Zellen nach α CD3/ α CD28-Stimulation in Anwesenheit von unterschiedlichen IL-12 Konzentrationen

CD31⁺ und CD31⁻ CD45RA⁺CD45RO⁻CD4⁺ Th-Zellen von gesunden Spendern wurden aus PBMC isoliert, mit α CD3/ α CD28 stimuliert und nach fünf Tagen in Kultur restimuliert, fixiert und intrazellulär mit α IFN- γ gegengefärbt.

Wie die Titrationskurve der CD31⁺ Th-Zellen dieses Spenders beispielhaft zeigt, läßt schon die Zugabe von 0,01ng/ml IL-12 den Prozentsatz der IFN- γ produzierenden Zellen von ca. 10% des Kontrollansatzes auf 18% ansteigen. Die weitere Zugabe von IL-12 (0,1ng/ml) bewirkt einen Anstieg auf 26%. Jede weitere Steigerung der IL-12 Konzentration führt nicht zu einer Zunahme der INF- γ positiven Zellen. Es kam im Gegenteil bei allen Spendern zu einem Abfall der Zellfrequenzen, so daß 0,1ng/ml IL-12 als die ideale Konzentration in Bezug auf eine maximale Zytokinexpression

Ergebnisse

angesehen wurde. Die Titrationskurven der CD31⁻ Th-Zellen zeigten einen ähnlichen Verlauf, der sich quantitativ von dem der CD31⁺ Th-Zellen unterschied.

4.4 CD31⁺ und CD31⁻ Th-Zellisolierung mittels FACS-Sorter

4.4.1 Etablierung eines experimentellen Sortierungssystems zur Isolierung von CD31⁺ und CD31⁻ CD45RA⁺ CD45RO⁻ CD4⁺ Th-Zellen

Mit der fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung (FACS) steht eine weitere Methode zur Zelltrennung zur Verfügung, die in dieser Arbeit etabliert wurde und die dem MACS-Multisort in einigen Punkten deutlich überlegen ist.

Die Verwendung der MACS-Multisort-Technik ist mit einem erheblichen Zeitaufwand (8-10 h) verbunden. In drei aufeinander folgenden Arbeitsschritten werden CD31⁺/CD31⁻ Th-Zellen isoliert. Dabei können zwar hohe Reinheiten der gewünschten Zellfraktionen erzielt werden, allerdings müssen auch große Zellzahlverluste während der Sortierung hingenommen werden. Der entscheidende Schwachpunkt dieser sehr zuverlässigen Trennungsmethode ist jedoch, daß es schwierig ist, die Zellzahlen genau zu bestimmen. Die Sortierung der CD31⁺ und CD31⁻ CD45RA⁺ CD45RO⁻ CD4⁺ Th-Zell-Subpopulationen mit Hilfe des FACS-Sorter ermöglicht mit deutlich geringerem Zeitaufwand klar definierte Zellzahlen aus der Fraktion der CD4⁺ Th-Zellen zu isolieren.

Aus den PBMC von gesunden Spendern wurden die CD4⁺ Th-Zellen mit Hilfe der MACS-MultiSort-Technik mit >99% Reinheit isoliert, anschließend oberflächlich mit den fluoreszierenden Antikörpern α CD45RA, α CD45RO und α CD31 markiert und die Färbung durchflußzytometrisch kontrolliert. Die Zellen wurden in einer Konzentration von $2-3 \times 10^6$ /ml in Puffer aufgenommen und die toten Zellen mit Probidium-Jodid angefärbt. Die Sortierungsfenster des FACS-Sorters wurden so gesetzt, daß eine klare Abgrenzung der CD31⁺ Zellfraktion von der CD31⁻ möglich wird. Bei der Sortierung der CD31⁺ Th-Zellen wurden nur die Zellen vom Gerät akzeptiert, die sowohl in Gate 1, 2 als auch 3 lagen (siehe unten), entsprechend für die CD31⁻ Th-Zellen die Gates 1, 2 und 4. Jeweils 5×10^4 Zellen/Ansatz konnten direkt in eine Kulturplatte gezählt werden, in der sie mit α CD3/ α CD28 stimuliert für fünf Tage in Kultur verblieben.

Ergebnisse

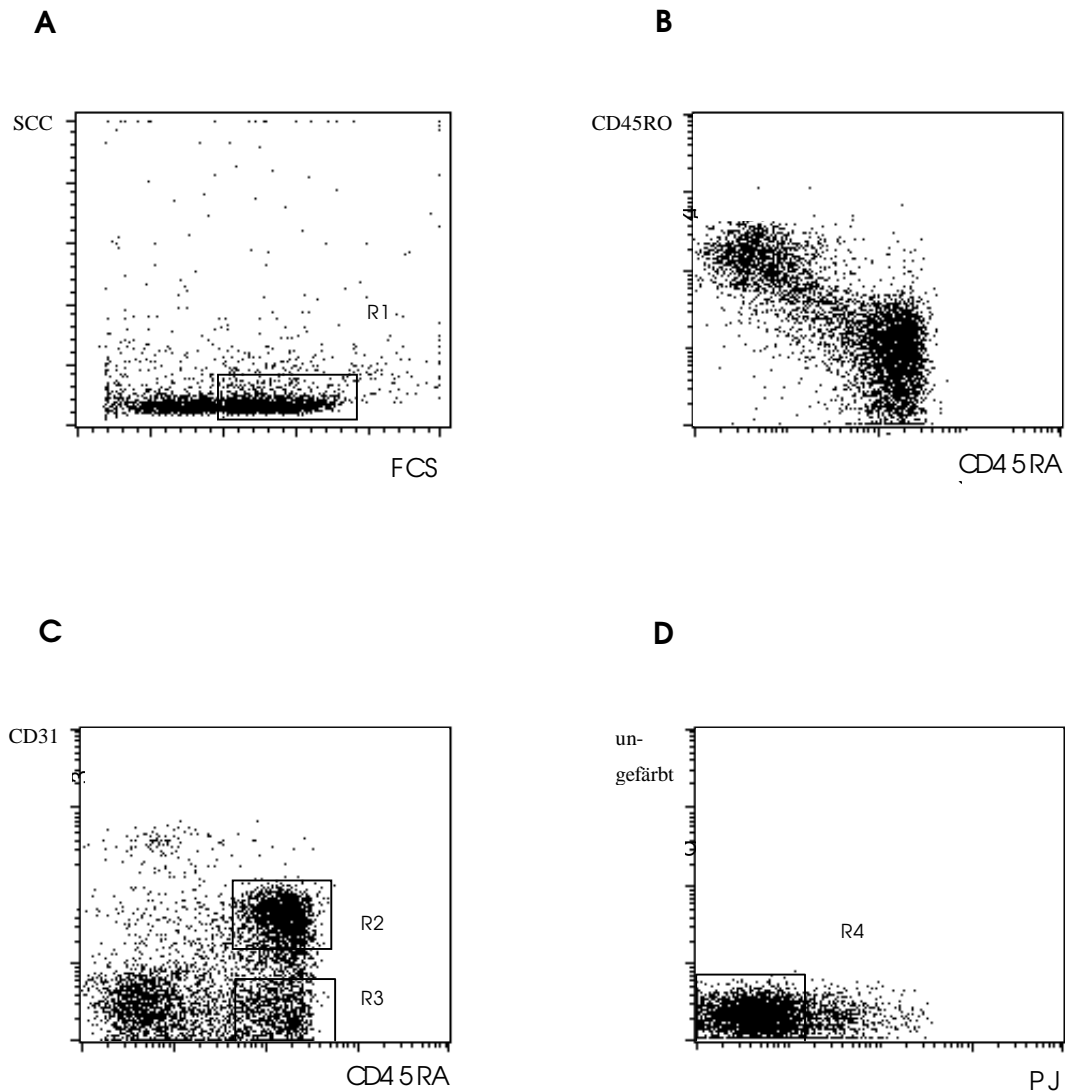


Abb. 12: Isolierung der $CD31^+$ und $CD31^-$ Th-Zellsubpopulationen durch eine Anreicherung mittels FACS-Sorter

Aus den PBMC gesunder Spender wurden $CD4^+$ Th-Zellen mit Hilfe der MACS-MultiSort Technik isoliert und mit $\alpha CD45RA-FITC$, $\alpha CD45RO-Cy5$ und $\alpha CD31-PE$ gefärbt, die zur Sortierung notwendigen Gates gesetzt und mit einander verknüpft.

A: Gate 1 auf lebende Lymphozyten im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht

B: Ausgangspopulation auf $CD45RA$ und $CD45RO$ gefärbt

C: Gate 2 auf $CD31^+ CD45RA^+ CD45RO^- CD4^+$ Lymphozyten

Gate 3 auf $CD31^- CD45RA^+ CD45RO^- CD4^+$ Lymphozyten

D: Gate 4 auf lebende Lymphozyten (PJ-Färbung)

4.4.2 Reanalyse

Um die Reinheit des Sorts zu überprüfen, wurde eine Reanalyse durchgeführt. $CD4^+$ Zellen wurden wie oben beschrieben gefärbt und 1×10^6 $CD31^+$ Zellen bzw. $CD31^-$ Th-Zellen in ein Eppendorfgefäß sortiert. Diese Zellen wurden anschließend mit dem FACS-Sorter analysiert, wobei die gesetzten Gates erhalten blieben. Wie Abbildung 13 zeigt, liegen 96% der Zellen innerhalb des Gates für $CD31^+$ Th-Zellen, so daß von einem hohen Grad der Anreicherung ausgegangen werden kann. Die Reanalyse der $CD31^-$ Zellen liegt mit ca. 86% deutlich schlechter, aber noch im ausreichenden Bereich.

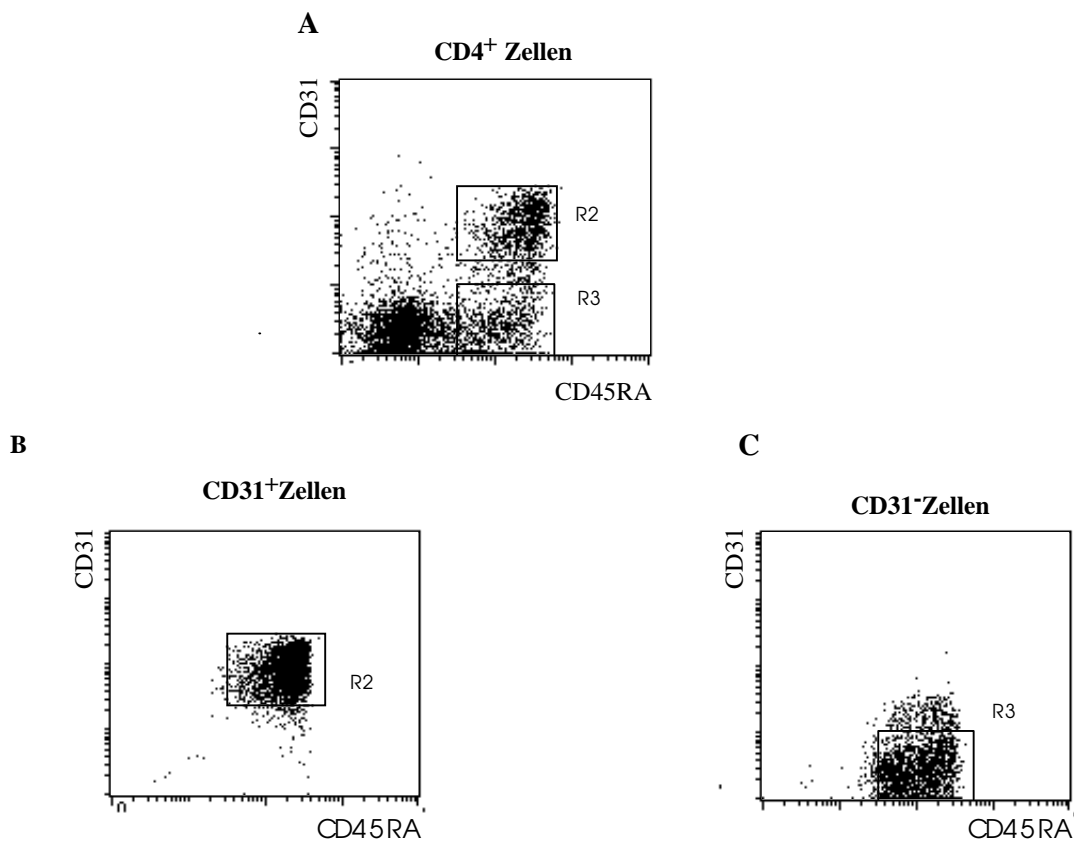


Abb. 13: Reanalyse von FACS sortierten $CD31^+$ Th-Zellen

$CD31^+$ Th-Zellen eines gesunden Spenders wurden wie oben geschrieben aus $CD4^+$ Lymphozyten isoliert und nach dem Sort in Bezug auf die Expression des CD31 Rezeptors überprüft

A: $CD4^+$ Zell-Ausgangspopulation

B: Reanalyse der zuvor gesorteten $CD31^+$ Th-Zellen

C: Reanalyse der zuvor gesorteten $CD31^-$ Th-Zellen

4.4.3 Vergleich der Zytokinexpression zwischen CD31⁺ Th-Zellen, CD31⁻ Th-Zellen und CD45RA⁺ CD45RO⁻ CD4⁺ Th-Zellen in Anwesenheit verschiedener IL-12 Konzentrationen

Da die Zellen während des Sortierungsprozesses großen mechanischen Belastungen ausgesetzt sind, mußte zunächst überprüft werden, ob sie nach der Sortierung ihre Fähigkeit zur Proliferation und Zytokinseznierung nicht verloren haben und eine INF- γ Induktion durch Th1-Polarisierung noch möglich ist.

Im folgenden Versuch wurden CD4⁺ Th-Zellen von einem gesunden Spender mit Hilfe der MACS-MultiSort-Technik angereichert, auf ihrer Oberfläche mit fluoreszierenden Antikörpern gegen CD45RA, CD45RO und CD31 gefärbt und folgende Subpopulationen isoliert:

1. Das Sortierungsfenster umfaßt die CD45RA⁺ CD45RO⁻ CD4⁺ Th-Zellpopulation ohne zwischen CD31⁺ und CD31⁻ zu unterscheiden
2. Das Sortierungsfenster wurde so gewählt, daß nur die CD31⁺ Th-Zellen eingegrenzt wurden.
3. Das Sortierungsfenster wurde so gewählt, daß nur die CD31⁻ Th-Zellen eingegrenzt wurden.

Für alle drei Zellpopulationen wurden je vier Ansätze (5×10^4 Zellen/Ansatz) isoliert, mit α CD3/ α CD28 stimuliert und in Anwesenheit von drei verschiedenen Konzentrationen IL-12, bzw. einem Kontrollansatz ohne IL-12 Zugabe, für fünf Tage in Kultur genommen. Die IL-12 Konzentrationen wurden mit 0,01ng/ml, 0,1ng/ml und 1ng/ml so gewählt, daß ein Vergleich mit der Titrationskurve der durch MACS-MultiSort-Technik isolierten CD31⁺ und CD31⁻ Th-Zellen möglich wurde (siehe 4.3.4). Nach fünf Tagen wurde der Kulturüberstand abgenommen und die Zellen restimuliert, fixiert und intrazellulär gegen IFN- γ gefärbt.

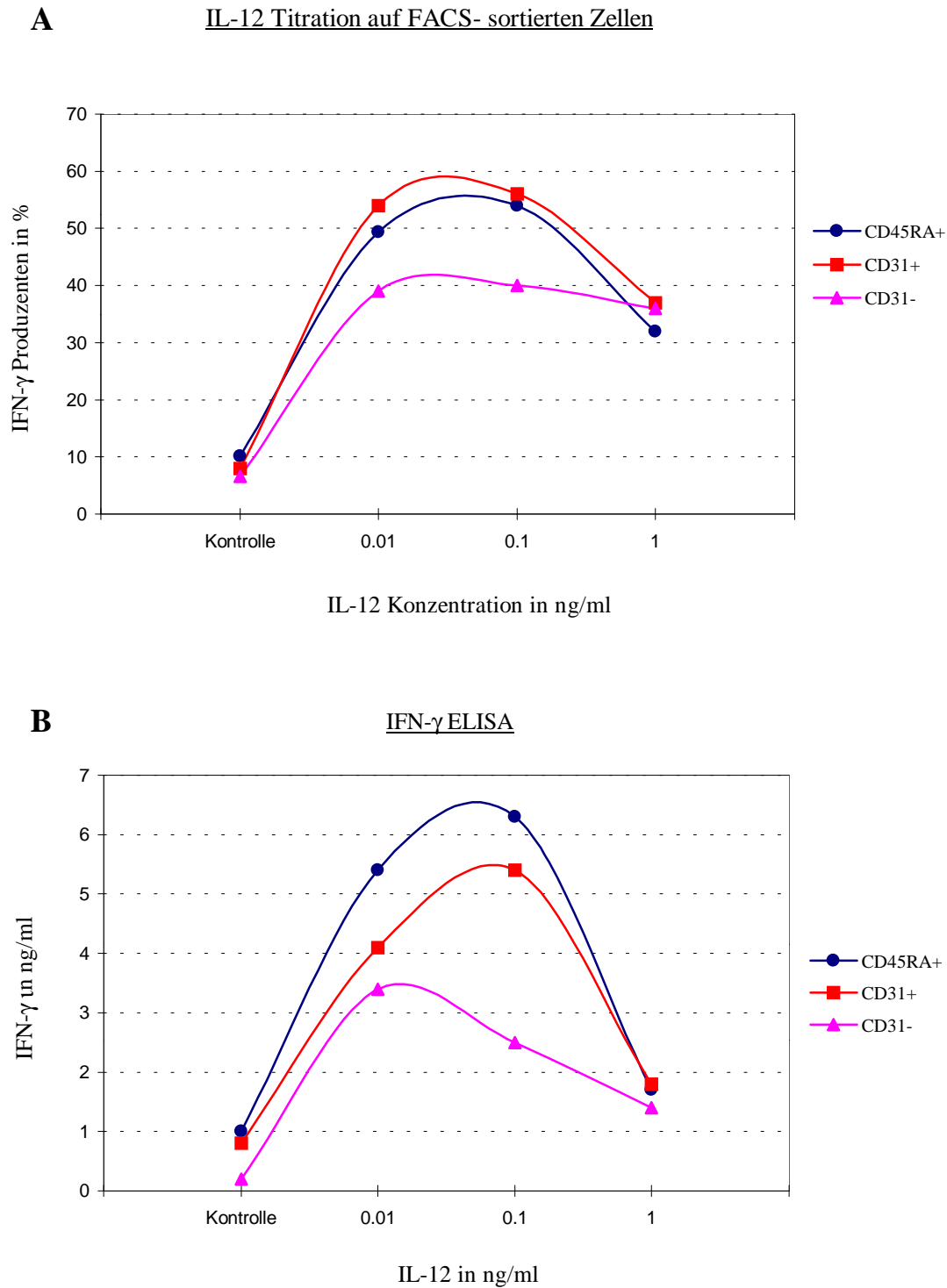


Abb. 14: IL-12 Titration auf FACS-sortierten CD45RA⁺, CD31⁺ und CD31⁻ Th- Zellen

CD4⁺ Th-Zellen eines gesunden Spenders wurden mittels MACS-Technik isoliert, die gewünschten Populationen mit dem FACS-Sorter sortiert und in Anwesenheit von αCD3/αCD28 mit drei IL-12 Konzentrationen titriert. Nach fünf Kulturtagen wurden die Überstände entnommen und die Zellen restimuliert, fixiert und gegen INF-γ gefärbt (A). Die Quantifizierung der IFN-γ Konzentration im Überstand erfolgte durch einen fluoreszierenden Bead-ELISA (B).

Wie die Diagramme deutlich zeigen, ist eine Th1-Polarisierung der FACS sortierten Zellen möglich. Die Titrationskurve zeigt einen vergleichbaren Verlauf wie die Kurven, die nach MACS-Sortierung und IL-12 Titration auf CD31⁺ und CD31⁻ Th-Zellen entstanden sind (siehe 4.3.4). Grafik A und B zeigen, daß die größte Steigerung des Anteils der IFN- γ produzierenden Zellen (bzw. IFN- γ im Überstand) bei allen Zellsubpopulationen bereits durch Zugabe von 0,01ng/ml IL-12 erfolgt. Die Steigerung der Produzentenzahl nach Zugabe von 0,1ng/ml IL-12 erscheint dagegen vergleichsweise gering (4-5%). Bei den CD31⁻ Th-Zellen dieses Spenders war keine weitere Induktion von IFN- γ produzierenden Zellen möglich. Auffällig ist, daß die Zugabe von 1ng/ml IL12 sich bei allen drei Populationen negativ auf die Zahl der Produzenten auswirkte, womit dieses bereits beobachtete Phänomen nochmals bestätigt wurde (siehe 4.3.4).

Deutlich quantitative Unterschiede zwischen den Populationen fanden sich bei diesem Spender nur zwischen den CD31⁺ und CD31⁻ Th-Zellen, die sich im Vergleich zu den CD45RA⁺ und den CD31⁺ Zellen etwas schlechter polarisieren ließen und schon bei 0,1ng/ml IL-12 einen Abfall der IFN- γ Konzentration im Überstand aufwiesen. Die IFN- γ Konzentration im Überstand korrelierte gut mit der intrazellulären Expression der IFN- γ Rezeptoren nach Restimulation und Fixierung.

Da die größte Steigerung des Anteils der IFN- γ Produzenten bereits bei 0,01ng/ml IL-12 erfolgte, wurde bei allen weiteren Versuchen eine geringere Konzentration von IL-12 eingeführt (0,001ng/ml) und höchste Konzentration (1ng/ml) weggelassen.

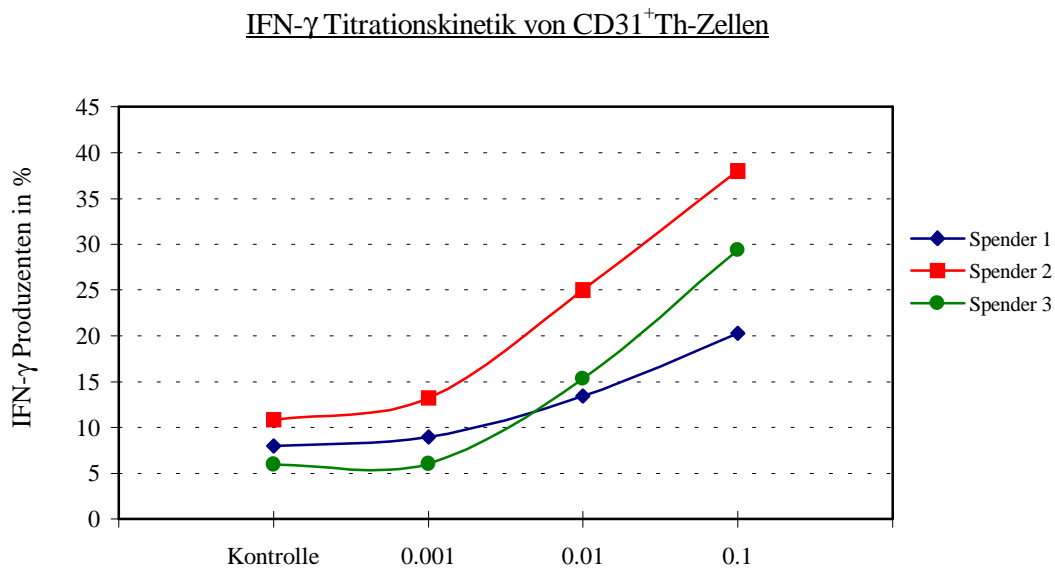
4.4.4 IFN- γ Induktionskinetik nach IL-12 Titration von gesunden Spendern

In den folgenden Versuchen sollte ein Referenzbereich für die IFN- γ Induktionskinetik von CD31⁺ und CD31⁻ Th-Zellen von gesunden Spendern festgelegt werden. Dafür wurden die CD4⁺ Th-Zellen aus den PBMC mit Hilfe der MACS-Sortierung wie unter 4.4.1 beschrieben isoliert und in Anwesenheit von 0,001ng/ml, 0,01ng/ml und 0,1ng/ml sowie einem Kontrollansatz ohne IL-12 mit α CD3/ α CD28 stimuliert. Nach fünf Tagen in Kultur wurden die Zellen restimuliert, fixiert und gegen IFN- γ , IL-2 und TNF- α gefärbt und durchflußzytometrisch analysiert.

Ergebnisse

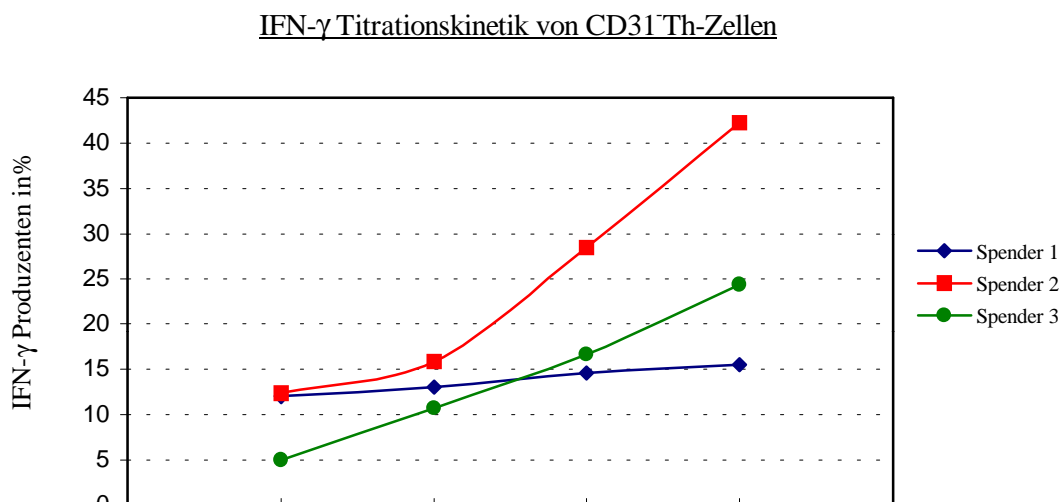
Abb. 15 zeigt die Kinetik von drei verschiedenen Spendern. Da sich bei der Analyse zeigte, daß der Anteil der TNF-a und IL-2 Produzenten zwischen den Spendern nicht wesentlich variierte, wurden in Abbildung 15 C/D der Median dargestellt.

A



IL-12 in ng/ml

B



Ergebnisse

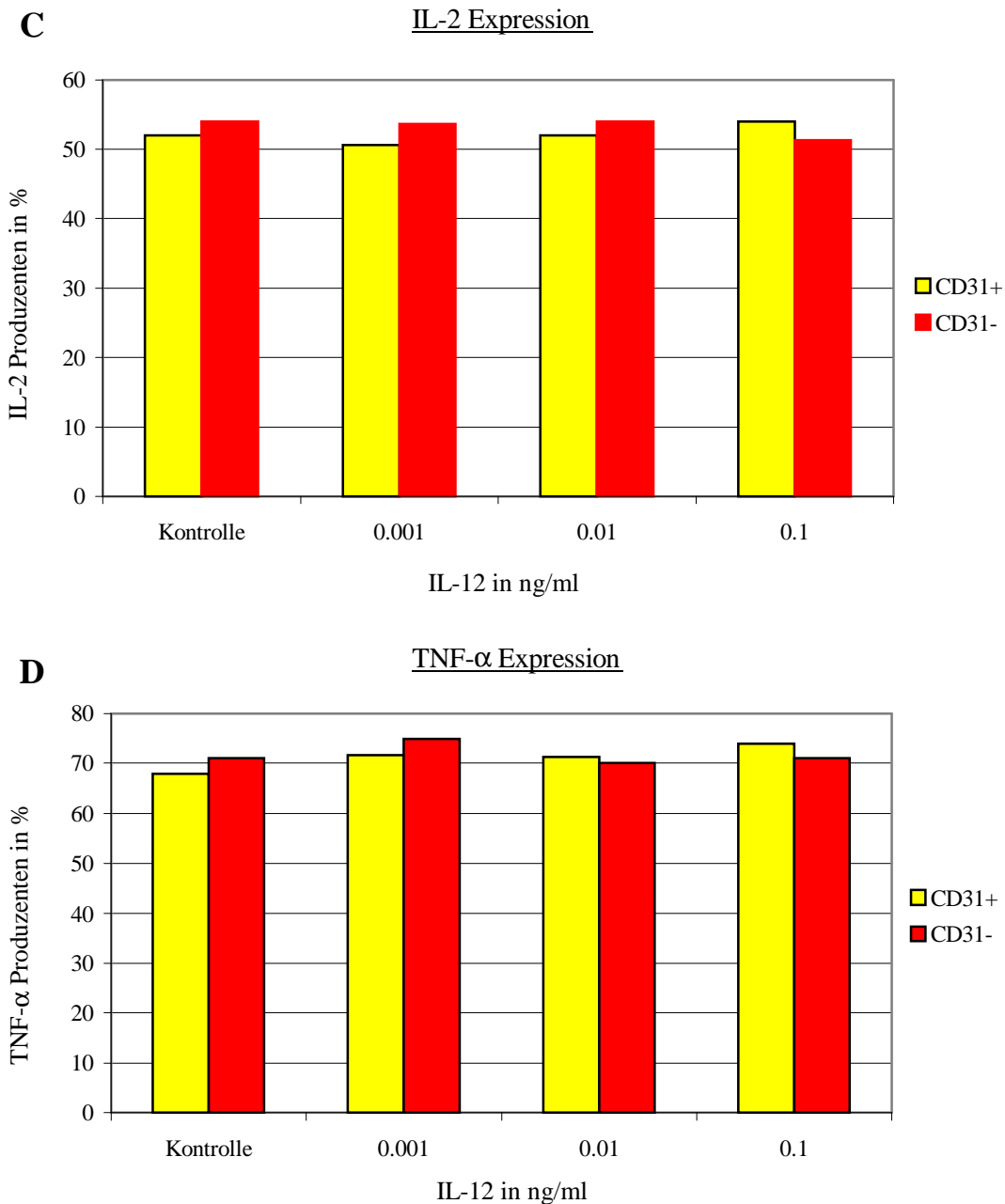


Abb. 15: IL-12 Titration auf FACS sortierten CD31⁺ und CD31⁻ Th-Zellen von drei gesunden Spendern

CD31⁺ und CD31⁻ Th-Zellen wurden mit dem FACS-Sorter isoliert und mit drei verschiedenen Konzentrationen IL-12 titriert. Nach fünf Tagen in Kultur erfolgte die Restimulation und Fixierung, sowie die durchflußzytometrische Analyse. Für die Darstellung der IL-2 und TNF- α Produzenten wurde der Median berechnet, da sich die Werte der einzelnen Spender kaum unterschieden.

A: IFN- γ Expression von CD31⁺ CD45RA⁺CD45RO⁻CD4⁺Th-Zellen

B: IFN- γ Expression von CD31⁻ CD45RA⁺CD45RO⁻CD4⁺Th-Zellen

C: IL-2 Expression von CD31⁺/CD31⁻ CD45RA⁺CD45RO⁻CD4⁺Th-Zellen

D: TNF- α Expression von CD31⁺/CD31⁻ CD45RA⁺CD45RO⁻CD4⁺Th-Zellen

Ergebnisse

Die IFN- γ produzierenden CD31⁺ Th-Zellen aller drei Spender zeigten ein ähnliches Induktionsverhalten, d.h. sie reagierten auf steigende IL-12 -Konzentrationen mit einer Steigerung des Anteils der IFN- γ produzierenden Zellen. Die Konzentration von 0,001ng/ml IL-12 übte offenbar nur einen sehr geringen Effekt aus, da bei allen Spendern bei dieser Konzentration der Anstieg der IFN- γ positiven Zellen sehr gering war (1-3%). Trotz eines ähnlichen Kurvenverlaufs waren jedoch ganz erhebliche quantitative Unterschiede zwischen den Spendern zu beobachten, die bei den Kontrollansätzen und der ersten Titrationsstufe noch relativ gering, sich aber besonders in der letzten Stufe verstärkt auswirkten (Spender 1: 20%, Spender 2: 38%). Dies spricht dafür, daß die individuelle Fähigkeit zur IFN- γ Expression sehr unterschiedlich ist. Die Analyse der CD31⁻ Th-Zellen zeigte eine noch größere quantitative Variabilität zwischen den Spendern im Bereich der letzten beiden Titrationsstufen (Spender 1: 16%, Spender 2: 43%).

Die Analyse der IL-2 und TNF- α Produzenten ließ bei beiden Zellpopulationen keinen Zusammenhang zwischen IL-12 Titration und Rezeptorexpression erkennen. Die Anzahl der Produzenten bleibt über alle Titrationsstufen ungefähr gleich.

Da sich jedoch im Laufe der Zeit immer stärker zeigte, daß die Zellen nach der Sortierung immer wieder kontaminiert waren und es nicht gelang, dieses Problem einzudämmen, mußte diese Trennungsmethode aufgegeben und zu der magnetischen Multisorttechnik zurückgekehrt werden.

4.5 IFN- γ Induktionskinetik von gesunden Spendern und Patienten

4.5.1 Zytokinexpression von direkt stimulierten CD4⁺ Th-Zellen des peripheren Blutes

Bereits bei den IL-12 Titrationsen der Vorversuche waren interindividuelle Unterschiede zwischen den einzelnen gesunden Spendern auffällig, besonders in Bezug auf die Fähigkeit, IFN- γ ohne den Stimulationsreiz IL-12 zu bilden. Deshalb sollte eine Aussage über die immunologische Ausgangssituation zum Zeitpunkt der Blutentnahme des jeweiligen Individuums getroffen werden. Ziel dieser Experimente war es, einen möglichen Zusammenhang zwischen einer guten oder schlechten Induktionsfähigkeit von IFN- γ und einer erhöhten IFN- γ Expression der CD4⁺ Th-Zellen im peripheren Blut nachzuweisen.

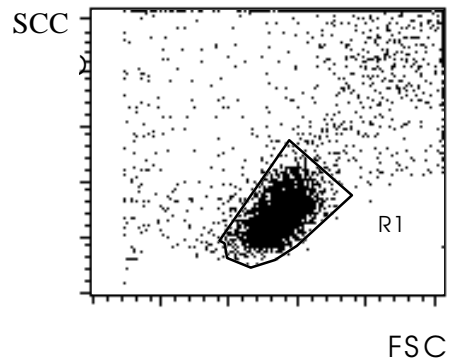
Daher wurde ein kleiner Teil der PBMC des jeweiligen Spenders (ca. 3×10^6 Zellen) direkt nach der Anreicherung aus dem Vollblut entnommen und bei 36°C für sechs Stunden mit PMA/Ionomycin inkubiert, die letzten zwei Stunden in Anwesenheit von Brefeldin A. Anschließend wurden die Zellen wie üblich fixiert und im ersten Schritt oberflächlich gegen den CD3- und CD8-Rezeptor gefärbt. Danach schloß sich eine intrazelluläre Färbung gegen IL-2 und IFN- γ an. Durch eine geeignete Wahl der Analysefenster konnten bei der durchflußzytometrischen Messung nur die CD4⁺ Th-Zellen auf ihre Zytokinexpression hin analysiert werden.

Die Analyse der CD4⁺ von zehn unterschiedlichen, gesunden Spendern zeigte erwartungsgemäß eine große Streubreite der Zytokinproduzenten. Zwischen 10%-33% der CD4⁺ Th-Zellen exprimierten IFN- γ und 9% bis 56% IL-2. Ein Zusammenhang zwischen der Zahl der Zytokinproduzenten und dem späteren Titrationsverlauf der kultivierten CD31⁺ und CD31⁻ Th-Zellen ließ sich jedoch nicht eindeutig nachweisen. Dennoch lieferten diese Zytokinanalysen Informationen über die immunologische Ausgangssituation des entsprechenden Spenders. Abb. 16 zeigt die Lage der Analysefenster und die Verteilung der Zytokinproduzenten.

Ergebnisse

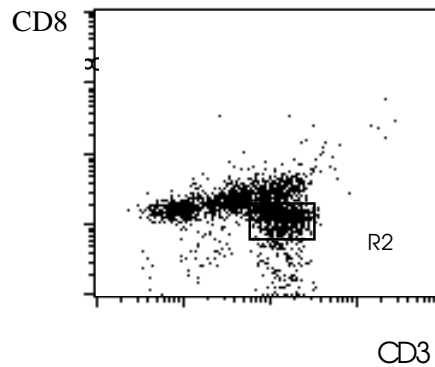
A

PBMC ungefärbt



B

Oberflächenfärbung



C

Zytokinfärbung

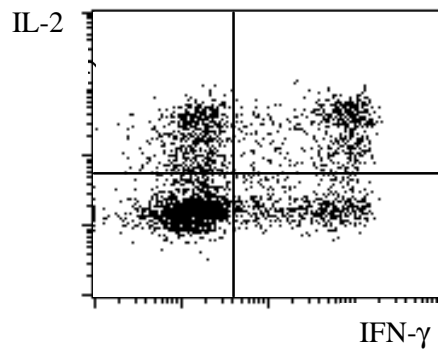


Abb. 16: Zytokinexpression von restimulierten CD4⁺ Th-Zellen

PBMC von gesunden Spendern wurden direkt nach der Isolierung aus dem Blut für 6h restimuliert und fixiert. Im ersten Färbeschritt wurde oberflächlich gegen CD3 und CD8 gefärbt und anschließend die intrazellulären Zytokine IL-2 und IFN- γ markiert.

A: Analysefenster umfaßt alle Lymphozyten

B: Analysefenster beinhaltet die CD3⁺CD8⁻CD4⁺ Th-Zellen

C: Zytokinexpression der CD4⁺ Th-Zellen

4.5.2 Ergebnisse der Einzeltitrationen eines gesunden Spenderkollektives

In den folgenden Versuchen wurden die $CD31^+$ und $CD31^-$ Th-Zellen wie beschrieben mit Hilfe der magnetischen Mehrparametersortierung isoliert, nachdem eine Probe PBMC direkt nach der Isolierung aus dem Blut restimuliert wurde (siehe 3.5.1). Jeweils 5×10^4 Zellen/Ansatz wurden nach der Säulensortierung auf eine mit $\alpha CD3/\alpha CD28$ beschichteten Kulturplatte gebracht und mit 0,001ng/ml, 0,01ng/ml und 0,1ng/ml IL-12 versetzt. Ein Ansatz wurde ohne IL-12 Zugabe als Kontrolle mitgeführt. Alle Ansätze erhielten wie auch in allen Vorversuchen IL-2 als unspezifisches Wachstumssignal. Als Aktivierungskonzentrationen wurde $1 \mu g$ $\alpha CD3$ und $5 \mu g$ $\alpha CD28$ pro ml gewählt, wie es unter 4.3.3 als ideale Konzentration ermittelt worden war. Da sich die IL-12 Titrationskonzentrationen bei den Zellen, die mit Hilfe des FACS-Sorters isoliert wurden, als günstig erwiesen hatten, wurden diese IL-12 Konzentrationen übernommen (siehe 4.4.3). Dieser Bereich registrierte auch Induktionseffekte durch sehr geringen IL-12 Zugaben.

Die Zellen wurden unter annähernd gleichen Bedingungen isoliert und für fünf Tage in Kultur belassen. Bei allen Spendern waren ab dem zweiten Kulturtag deutliche morphologische Veränderungen an den Zellen lichtmikroskopisch sichtbar, die auf Proliferations- und Mitosevorgänge schließen ließen. Vor der Restimulation wurden die Kulturüberstände abgenommen, um später für einen IFN- γ ELISA verwendet zu werden (siehe Seite 70). Anschließend wurden die Zellen mit PMA/Ionomycin restimuliert und danach fixiert. Nach der intrazellulären Färbung mit $\alpha IFN-\gamma$, $\alpha IL-2$ und $\alpha TNF-\alpha$ wurden die Zellen durchflußzytometrisch analysiert, wobei nur die Blasten in die Analyse mit einbezogen wurden.

Abb. 17 zeigt die durchflußzytometrischen Analysen der $CD31^+$ Th-Zellen nach Restimulation und Fixierung.

Ergebnisse

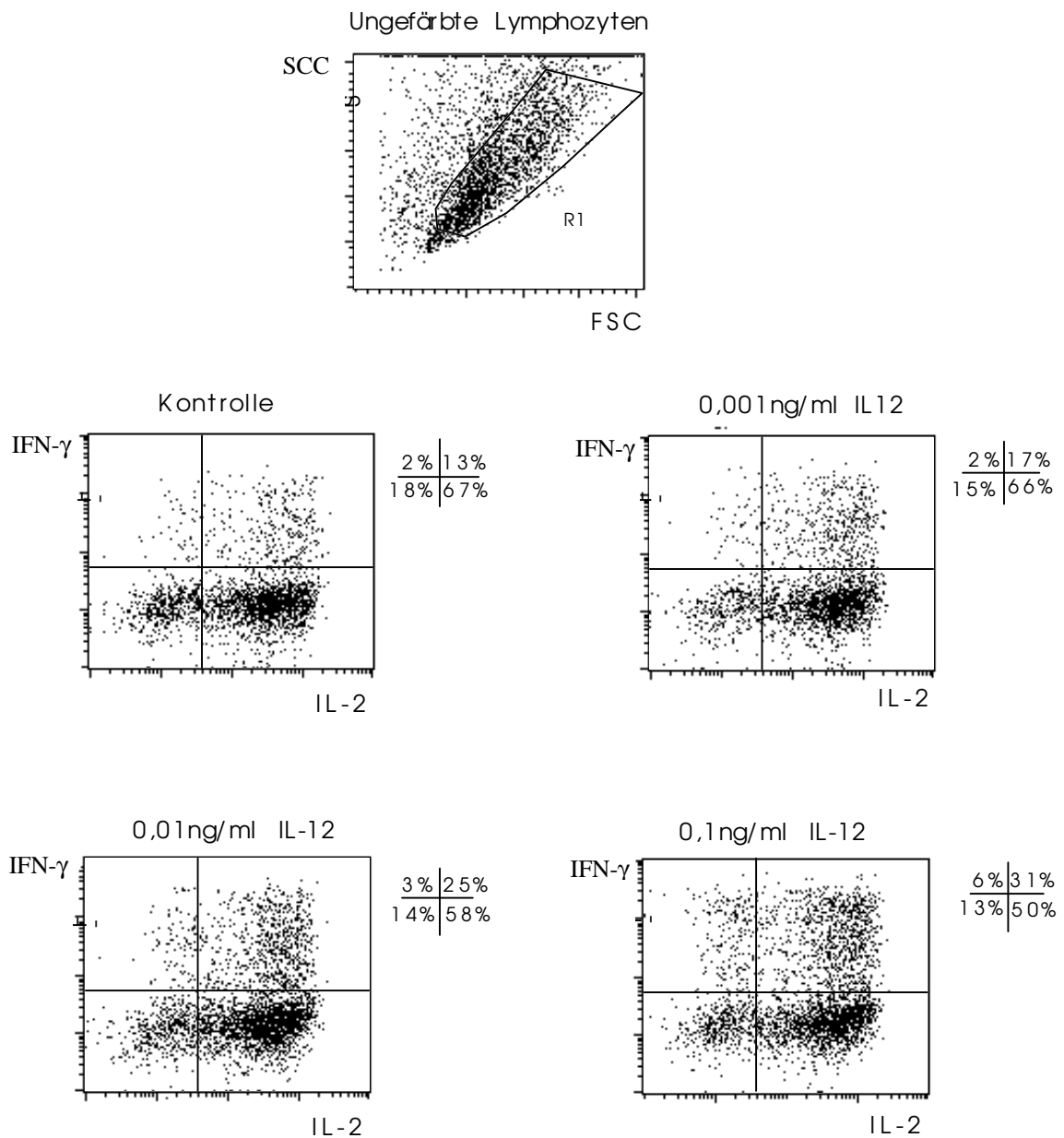


Abb. 17: Analyse der durchflußzytometrischen Messung restimulierter und fixierter CD31⁺ Th-Zellen nach IL-12 Titration

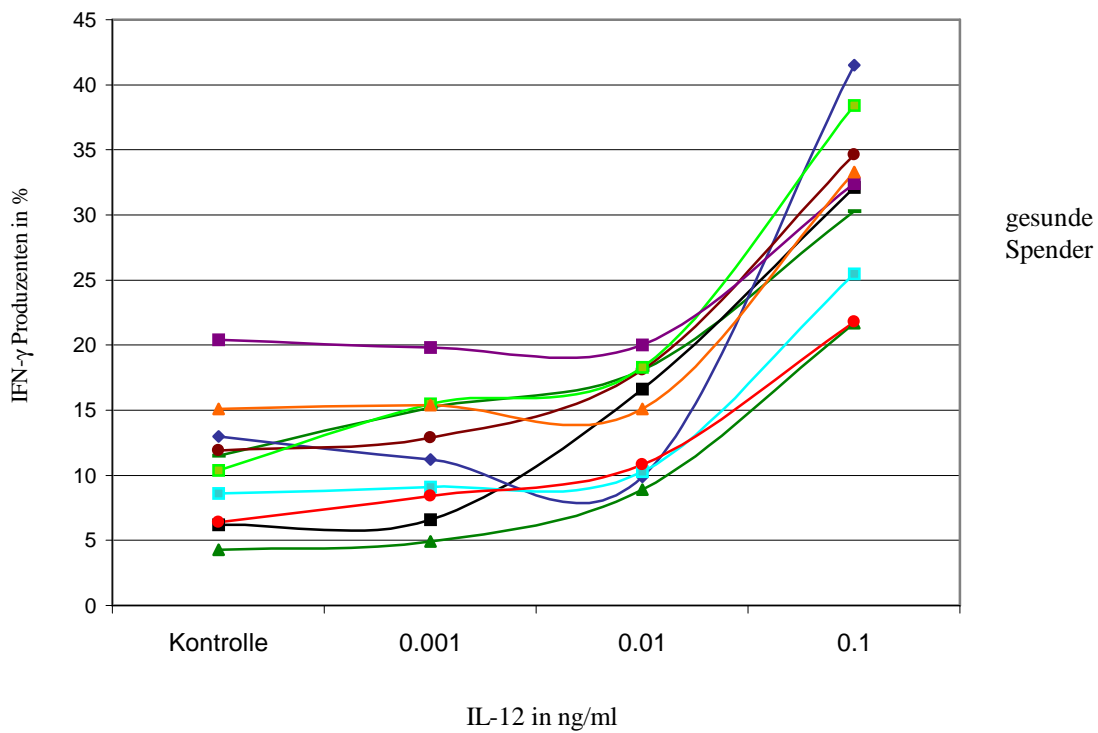
Nachdem die mittels magnetischer Mehrparametersortierung isolierten CD31⁺ Th-Zellen in Anwesenheit von unterschiedlichen IL-12 Konzentrationen für fünf Tage in Kultur belassen worden war, erfolgte ihre Restimulation und Fixierung. Dargestellt sind die IFN- γ und IL-2 produzierenden Zellen in allen vier Titrationsstufen. Die nebenstehenden Prozentangaben beziehen sich auf den Anteil der Zellen in den entsprechenden Quadranten.

4.5.2.1 Analyse der IFN- γ produzierenden CD31⁺ CD45RA⁺ CD45RO⁻ CD4⁺ Th-Zellen

Wie sich nach der Analyse der elf verschiedenen gesunden Spender herausstellte, zeigten alle Titrationskurven eine ansteigende Tendenz. Bei allen Spendern war es möglich, eine IFN- γ Induktion zu erzielen. Die Stärke dieser Induktion schien auch mit der Menge des zur Stimulation genutzten IL-12 zu korrelieren. Jedoch war der quantitative Anteil der IFN- γ produzierenden Zellen so unterschiedlich, daß es nicht sinnvoll erschien, einen Referenzbereich mit absoluten Zahlen aufzustellen.

A

IL-12 Titration auf CD31⁺Th-Zellen von 11 gesunden Spendern



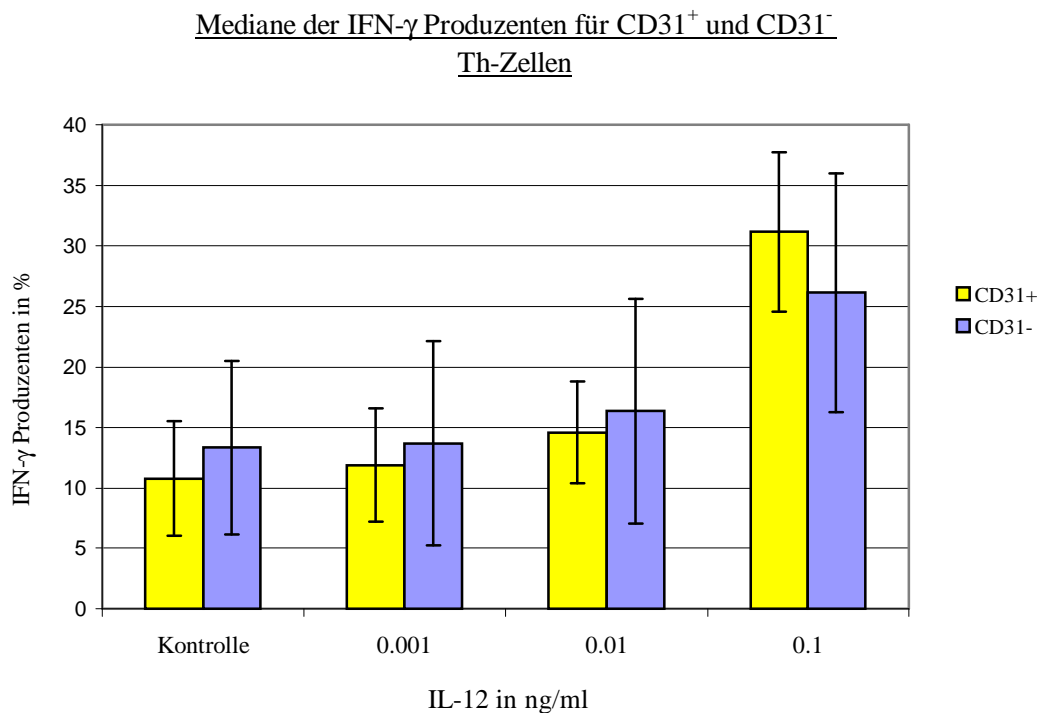
B

Abb. 18: IFN- γ Produktion der CD31⁺ Th-Zellen gesunder Spender

A: Dargestellt sind die Titrationskurven elf gesunder Spender, basierend auf den durchflußzytometrisch ermittelten Daten. Deutlich erkennbar ist einerseits das allgemeine Ansteigen des Produzentenanteils der IFN- γ positiven Zellen im Laufe der Titration, andererseits aber auch die große Streuung der Werte.


B: Das Säulendiagramm zeigt die Mediane des prozentualen Anteils der IFN- γ positiven Zellen der elf Spender in den einzelnen Titrationsstufen sowie die Standardabweichung für die CD31⁺ und CD31⁻ Th-Zellpopulation.

Wie Abb. 18 verdeutlicht, reagieren alle Spender auf steigende IL-12 Konzentrationen mit einer Steigerung des Anteils der IFN- γ positiven Zellen. Da der Anteil der IFN- γ positiven Zellen zwischen den Spenden deutlich variierte, wurden die prozentualen Steigerung des Anteils der IFN- γ positiven Zellen berechnet, wobei Anteil der IFN- γ Produzenten des Kontrollansatzes gleich 100% gesetzt wurde. Anschließend wurde mit Hilfe von statistischen Tests überprüft, ob sich die Titrationsstufen signifikant unterscheiden. Da bei der Streuung der Werte nicht von einer Normal-Verteilung auszugehen ist, wurden nichtparametrische Testverfahren angewendet. Im ersten Schritt wurde mit Hilfe des Friedman-Tests untersucht, ob

Ergebnisse

überhaupt signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Titrationsstufen auftreten.

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum	Mean Rank
Kontrolle	11	100	0	100	100	1,27
0,001	11	121	28,3	89,2	188,7	1,91
0,01	11	166	62,3	76,1	270,6	2,82
0,1	11	330	106,9	158,8	517,7	4

 asymp. Signifikanz (p): 0,000
 Chi-Square: 27,79
 df: 3

Da $p \leq 0,05$ ist, ist davon auszugehen, daß ein signifikanter Unterschied über allen Gruppen besteht. Um auszuschließen, daß der Unterschied nur durch eine Ausreißergruppe zustande kommt, mußten im anschließenden Schritt die unmittelbar benachbarten Paare auf signifikante Unterschiede getestet werden. Dazu bietet sich der 2-Related Sample Test nach Mann-Whitney, bzw. der Wilcoxon Signed Ranks Test an. Ein signifikanter Unterschied liegt dann vor, wenn die asymp. Signifikanz $p \leq 0,012$ ist.

Test Statistik

	Kontrolle - Stufe 1	Stufe 1 - Stufe 2	Stufe 2 - Stufe 3		Kontrolle - Stufe 2
Asymp. Sig. (p)	0,21	0,006	0,003		0,01

(Stufe 1 = 0,001ng/ml; Stufe 2 = 0,01ng/ml; Stufe 3 = 0,1ng/ml)

Wie aus der Tabelle ersichtlich, liegt für das Paar Kontrolle - Stufe 1 kein eindeutig signifikanter Unterschied vor, da $p = 0,21 \geq 0,012$ ist. Deshalb wurde zusätzlich das Paar Kontrolle - Stufe 2 getestet, das mit $p = 0,01$ dann signifikante Unterschiede aufwies.

Um die Streuung der Werte graphisch zu veranschaulichen, eignet sich die Darstellung als Boxplot, die in Abb. 19 erläutert wird.

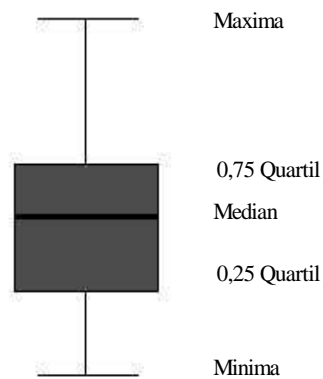


Abb. 19: Boxplot

Der waagrechte Strich in der Mitte der Box gibt die Lage des Medians an (50% der Werte sind größer als der Median und 50% sind kleiner). Das 0,75 Quartil an der oberen Boxkante zeigt den Wert an, der größer ist als 75% aller Werte, während das 0,25 Quartil den Wert bezeichnet, der kleiner ist als 75% aller Werte. Die von der Box ausgehenden Striche geben einen Beobachtungsraum an, innerhalb dessen 96% der gesamten Werte zu finden sind. Werte außerhalb dieses

Beobachtungsraumes wurden nicht dargestellt. Vorteile dieser Darstellungsform sind Angaben zur Spannweite (Bereich zwischen den Extremwerten) und zum Interquartilbereich (Streuungsmaß), der durch die Boxbreite dargestellt wird.

Steigerung des prozentualen Anteils der IFN- γ positiven CD31⁺ Th-Zellen

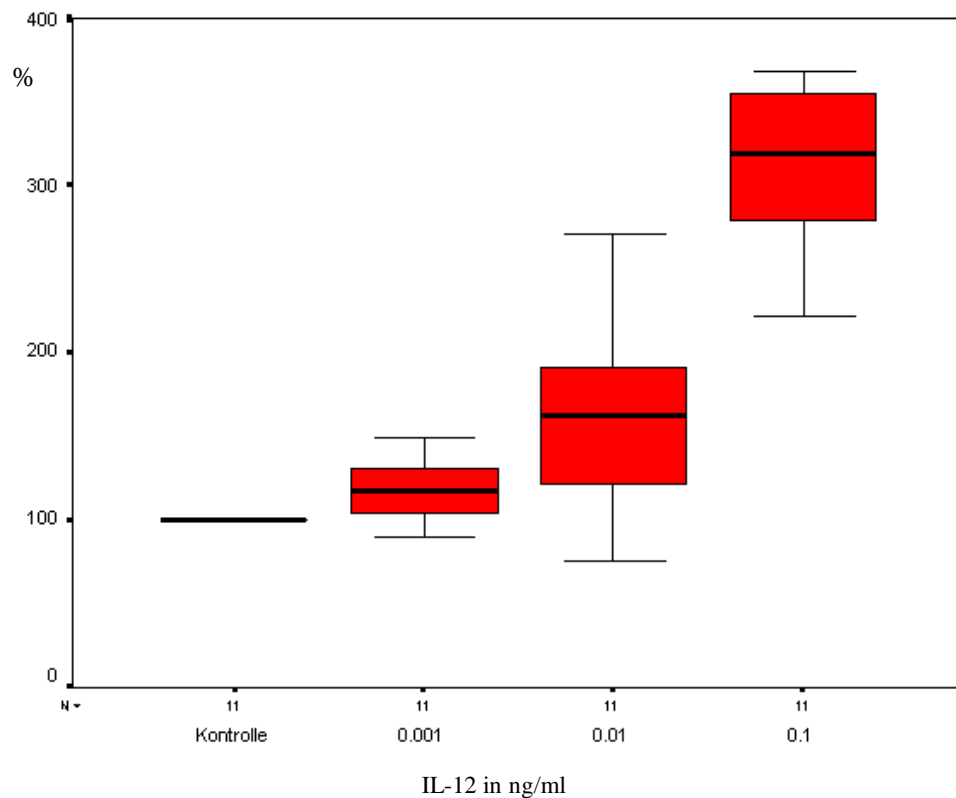


Abb. 20: Darstellung der IL-12 Titration auf CD31⁺ Th-Zellen als Boxplots

Von elf gesunden Spendern wurde die Steigerung des prozentualen Anteils der IFN- γ produzierenden CD31⁺ Th-Zellen berechnet und die Unterschiede zwischen den Titrationstufen mit Hilfe von statistischen Tests überprüft. Während sich die Lage des Medians in der zweiten Stufe auch optisch kaum von der ersten unterscheidet, ist bei den beiden folgenden Titrationstufen ein signifikanter Unterschied zu verzeichnen.

Ergebnisse

4.5.2.2 Analyse der IFN- γ produzierenden CD31⁻ CD45RA⁺ CD45RO⁻ CD4⁺ Th-Zellen

Für die CD31⁻ Th-Zellen wurde ebenfalls die prozentuale Steigerung des Anteils der IFN- γ positiven Zellen berechnet, wobei der Kontrollwert 100% entsprach. Der Friedmantest bestätigte einen Unterschied über allen Gruppen, da $p \leq 0,05$. Der Wilcoxon Signed Ranks Test zeigte jedoch weder einen signifikanten Unterschied zwischen der Kontrolle und der Stufe 1, noch einen Unterschied zwischen der Kontrolle und Stufe 2.

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum	Mean Rank
Kontrolle	10	100	0	100	100	1,27
0,001	10	95,62	11,7	78,4	113,76	1,6
0,01	10	127,3	28,8	78,4	177,8	2,8
0,1	10	285,5	204,12	95	829	3,7



asyp. Signifikanz (p): 0,01
 Chi-Square: 16,53
 df: 3

Test Statistik

	Kontrolle - Stufe 1	Stufe 1 - Stufe 2	Stufe 2 - Stufe 3		Kontrolle - Stufe 2
Asymp. Sig. (p)	0,208	0,007	0,009		0,017

(Stufe 1 = 0,001ng/ml; Stufe 2 = 0,01ng/ml; Stufe 3 = 0,1ng/ml)

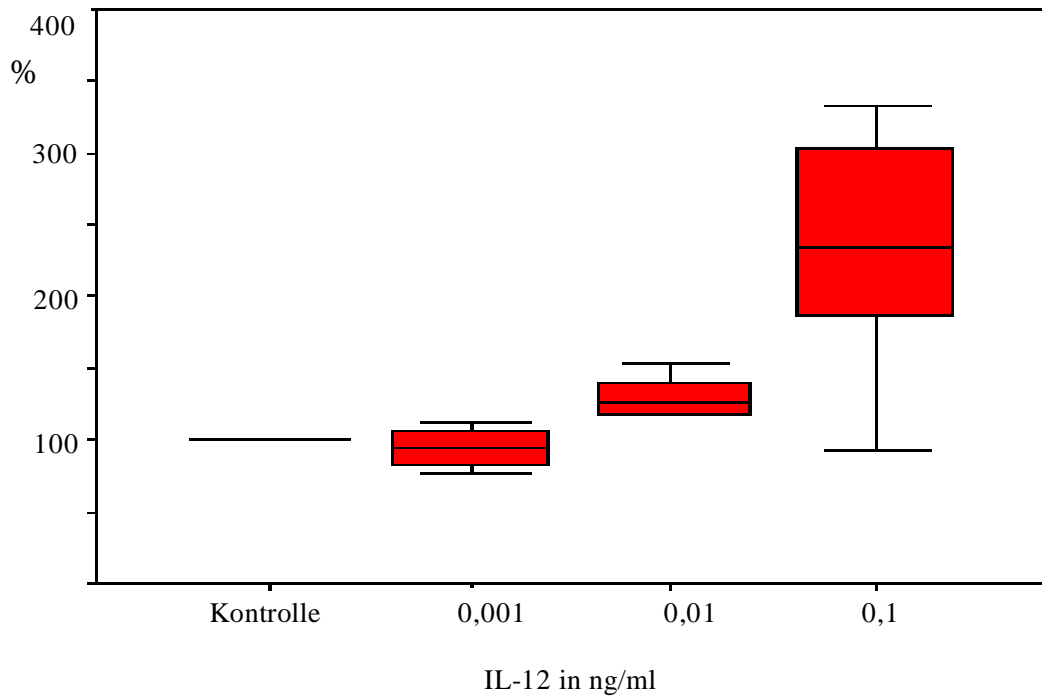
Steigerung des prozentualen Anteils der IFN- γ positiven CD31⁻ Zellen

Abb. 21: Darstellung der IL-12 Titration auf CD31⁻ Th-Zellen als Boxplots

Die Anteile der IFN- γ produzierenden CD31⁻ Th-Zellen wurden für die Kontrollansätze gleich 100% gesetzt. Anschließend wurde die prozentuale Steigerung ausgehend von der Kontrolle berechnet. Wie deutlich zu erkennen ist, lassen sich die negativen CD31⁻ Th-Zellen bei schwachen IL-12 Konzentrationen schlechter polarisieren als die CD31⁺ Th-Zellen. Die Lage des Medianwertes unterscheidet sich erst in der letzten Titrationsstufe deutlich von der Kontrolle.

Wie aus den Abbildungen und den Teststatistiken ersichtlich, unterscheiden sich die CD31⁺ Th-Zellen in ihrem Induktionsverhalten deutlich von den CD31⁻ Th-Zellen. Für die positive Population lassen sich lediglich zwischen der Kontrollgruppe und der ersten Titrationsstufe keine signifikanten Unterschiede feststellen. Dagegen unterscheiden sich bei den CD31⁻ Th-Zellen sowohl die Kontrollgruppe von der ersten als auch von der zweiten Titrationsstufe kaum, so daß nur von einem signifikanten Unterschied zwischen der Kontrolle, bzw. Titrationsstufe 1, und der Titrationsstufe 3 ausgegangen werden kann. Im Schnitt lassen sich die CD31⁺ Th-Zellen besser polarisieren, wie an den in allen drei Titrationsstufen höheren Medianwerten erkennbar. Bei Verwendung der Standardabweichung als Maß für die Streuung der Werte um den Mittelwert wird diese bei höheren IL-12 Konzentrationen immer größer. Die Individuen reagieren demnach sehr unterschiedlich auf den IL-12 Stimulus.

Ergebnisse

Ein Vergleich der beiden Zellpopulationen zeigt, daß die Standardabweichung für die CD31⁻ Th-Zellfraktion in der letzten Titrationsstufe annähernd doppelt so hoch ist wie die der CD31⁺ Zellen. Die negative Zellpopulation scheint schlechter auf geringe IL-12 Stimuli zu reagieren, bei höheren Konzentrationen jedoch einen noch größere Variabilität der IFN- γ Antwort zu zeigen.

4.5.2.3 Bestimmung von IFN- γ im Kulturüberstand

Von allen Spendern wurden die Überstände der Zellen vor der Restimulation nach fünf Tagen abgenommen. Mit Hilfe eines Bead-ELISAS wurde die Konzentration von IFN- γ , das über den Kulturzeitraum von den Zellen sezerniert wurde, bestimmt.

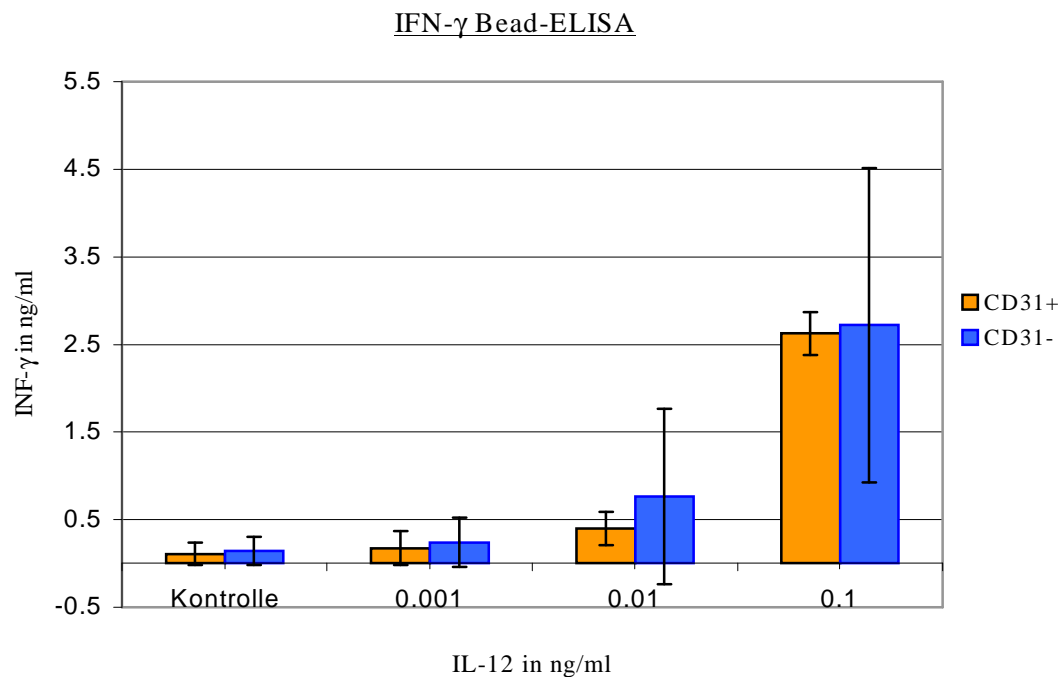


Abb. 22: Bestimmung der IFN- γ Konzentration im Kulturüberstand

Nach fünf Kulturtagen wurden die Überstände der Zellkulturen abgenommen und die Konzentration des IFN- γ im Überstand mit Hilfe eines Bead-ELISAS bestimmt. Das Säulendiagramm zeigt die Mediane der elf gesunden Spender sowie die Standardabweichung.

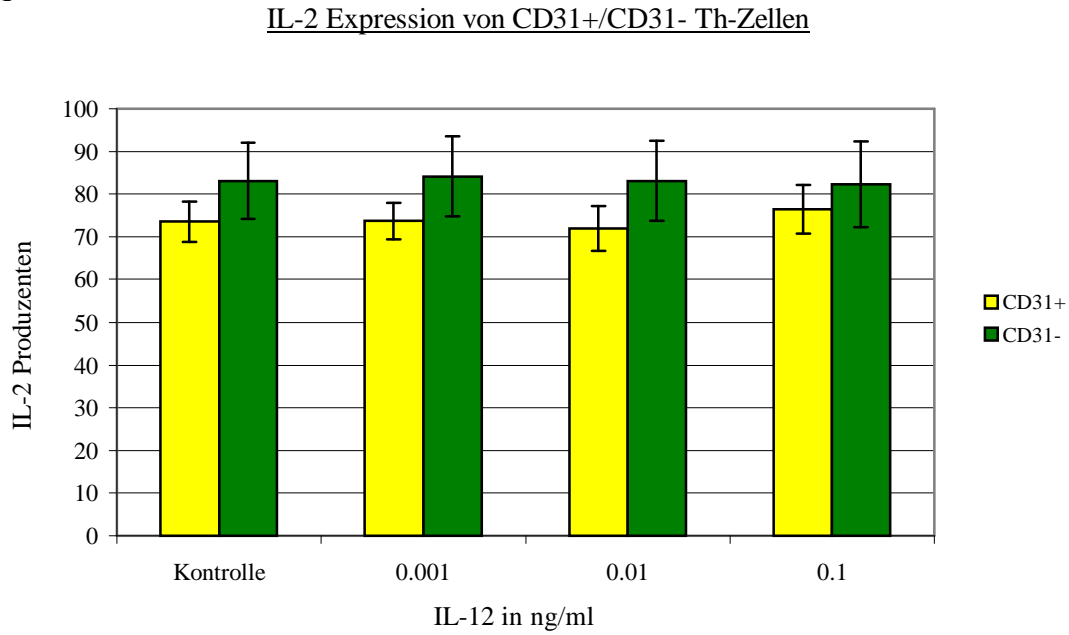
Wie aus der Abbildung hervorgeht, weisen die Kontrollansätze und die erste Titrationsstufe eine zu vernachlässigende Konzentration an IFN- γ auf. Ein deutlicher Anstieg ist erst in der letzten Stufe zu verzeichnen. Auffällig sind die recht homogenen Werte für die CD31⁺ Th-Zellen. Im Gegensatz dazu zeigen die CD31⁻ Th-Zellen große Unterschiede in ihrer Fähigkeit, IFN- γ zu sezernieren.

4.5.2.4 Analyse der TNF- α und IL-2 Produzenten

Nachdem die Zellen mit IL-12 titriert und fünf Tage in Kultur waren, wurden sie neben IFN- γ auch auf TNF- α und IL-2 gefärbt und durchflußzytometrisch analysiert. Wie aus Abbildung 21 hervorgeht und auch schon bei den Titrationsversuchen mit FACS-Sorter isolierten Zellen beobachtet wurde, ist kein Zusammenhang zwischen den IL-12 Titrationsstufen und der Expression der beiden Zytokine zu erkennen. Der Anteil der Zytokinproduzenten bleibt über alle Titrationsstufen auf einem annähernd gleich hohen Niveau. Dieses hohe Niveau kommt dadurch zustande, weil bei der Analyse nur Blasten untersucht wurden. Die Variabilität der IL-2 und TNF- α Zytokinexpression ist zwischen den einzelnen Individuen wesentlich geringer als bei den IFN- γ Produzenten. Im Säulendiagramm wurden die Mediane der elf Spender abgebildet und die Standardabweichung dargestellt. Die Standardabweichung ist sowohl bei den TNF- α als auch den IL-2 Produzenten in der CD31⁻ Th-Zell Subpopulation deutlich höher als in der CD31⁺ Th-Zellpopulation. Die Zellen reagieren auf die allgemeine Stimulation nicht ganz so homogen wie die positive Fraktion.

Ergebnisse

A



B

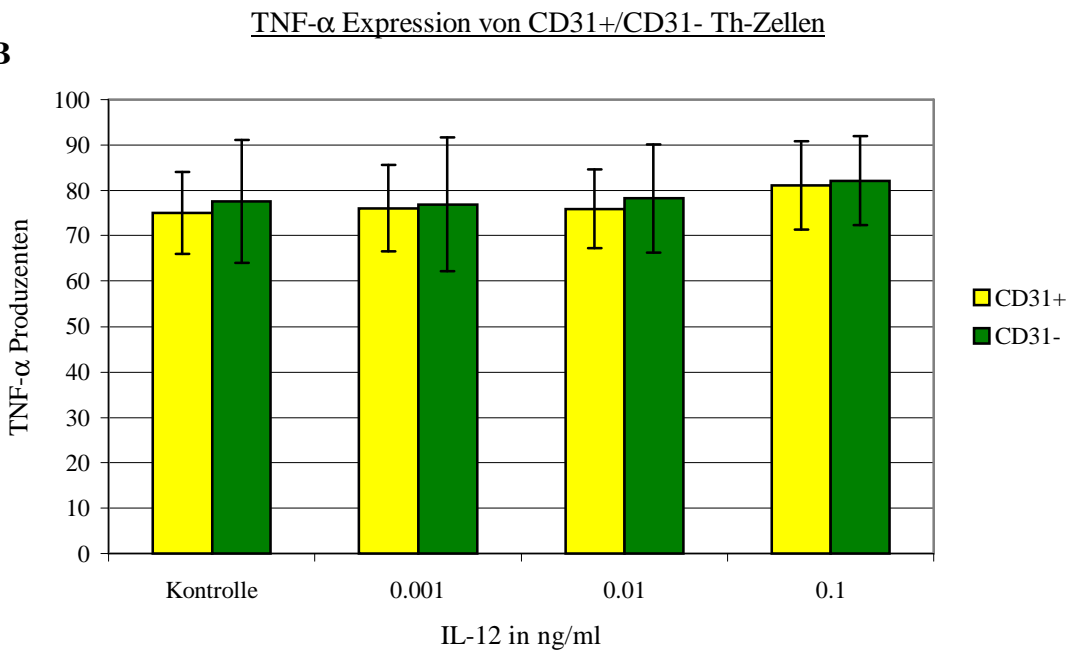


Abb. 23: Zytokinexpression der CD31⁺ und CD31⁻ Th-Zellen

Die mit IL-12 titrierten CD31⁺ und CD31⁻ Th-Zellen von elf gesunden Spendern wurden nach der Restimulation und Fixierung gefärbt und durchflußzytometrisch analysiert. In dem Säulendiagrammen sind für die CD31⁺ Th-Zellen und die CD31⁻ Th-Zellen jeweils die Mediane für IL-2 Produzenten (A) und TNF- α , Produzenten (B) sowie die Standardabweichung für alle Titrationsstufen dargestellt.

4.5.3. Patienten im Vergleich mit gesunden Spendern

Der zeitliche Rahmen ließ die Analyse eines ausreichend aussagekräftigen Patientenkollektivs nicht zu, dennoch gelang es, einige Informationen zu sammeln.

Nachdem ein Referenzbereich für das Induktionsverhalten von CD31⁺ Th-Zellen von gesunden Spendern ermittelt worden war (siehe 4.5.2), folgte nun die Analyse der Titrationskinetik für CD31⁺ Th-Zellen von RA-Patienten. Aus 50-100 ml Vollblut wurden die PBMC aufgearbeitet und mit Hilfe der magnetischen MACS-Multisortsäulen in drei Sortierungsschritten bis auf die Ebene der CD31⁺ und CD31⁻ Th-Zellfraktionen angereichert. Nach fünf Tagen in Kultur erfolgte die Restimulation und Fixierung. Abbildung 24 zeigt die durchflußzytometrisch ermittelten Anteile der IFN- γ positiven Zellen, wobei das Analysefenster nur Blasten einschloß. Für Patient 1 war der Meßwert für die Titrationsstufe 1 (0,001ng/ml IL-12) nicht auswertbar, und der Kontrollwert wurde in der Graphik mit dem Wert der Titrationsstufe 2 verbunden ohne genaue Kenntnis des Kurvenverlaufs.

Zwei der drei Patienten zeigten eindeutig ein Induktionsverhalten, das sich von dem der gesunden Spender unterschied und von deutlich erhöhten Kontrollwerten aus auf erhöhtem Niveau verläuft. Alle drei Patienten reagierten auf niedrige IL-12 Konzentrationen mit einem deutlichen Anstieg der IFN- γ Produzenten. Die gesunden Spender zeigten in diesem Bereich keinen signifikanten Unterschied zwischen den Kontrollwerten und der Titrationsstufe 1. Der Kurvenverlauf von Patient 3 scheint sich oberflächlich betrachtet nicht von dem der gesunden Spender zu unterscheiden. Geht man aber von dem Kontrollwert (2% IFN- γ positive Zellen) aus, so läßt sich im Laufe der Titration eine Steigerung um über 1400% (28% positive Zellen) erzielen. Dies zeigt, daß auch bei diesem Patienten eine IFN- γ Induktion in größeren Maße möglich ist, als es bei gesunden Individuen der Fall ist.

Die Analse der IL-2 Produzenten und der TNF- α Produzenten zeigte keine signifikanten Unterschiede zu den Gesunden. Der Anteil der Zytokinproduzenten blieb in allen Titrationsstufen konstant zwischen 65-80%. Eine interindividuelle Varianz betrug $\pm 10\%$ für beide Effektorzytokine und entsprach damit der Varianz, die für gesunde Spender gemessen worden war.

Ergebnisse

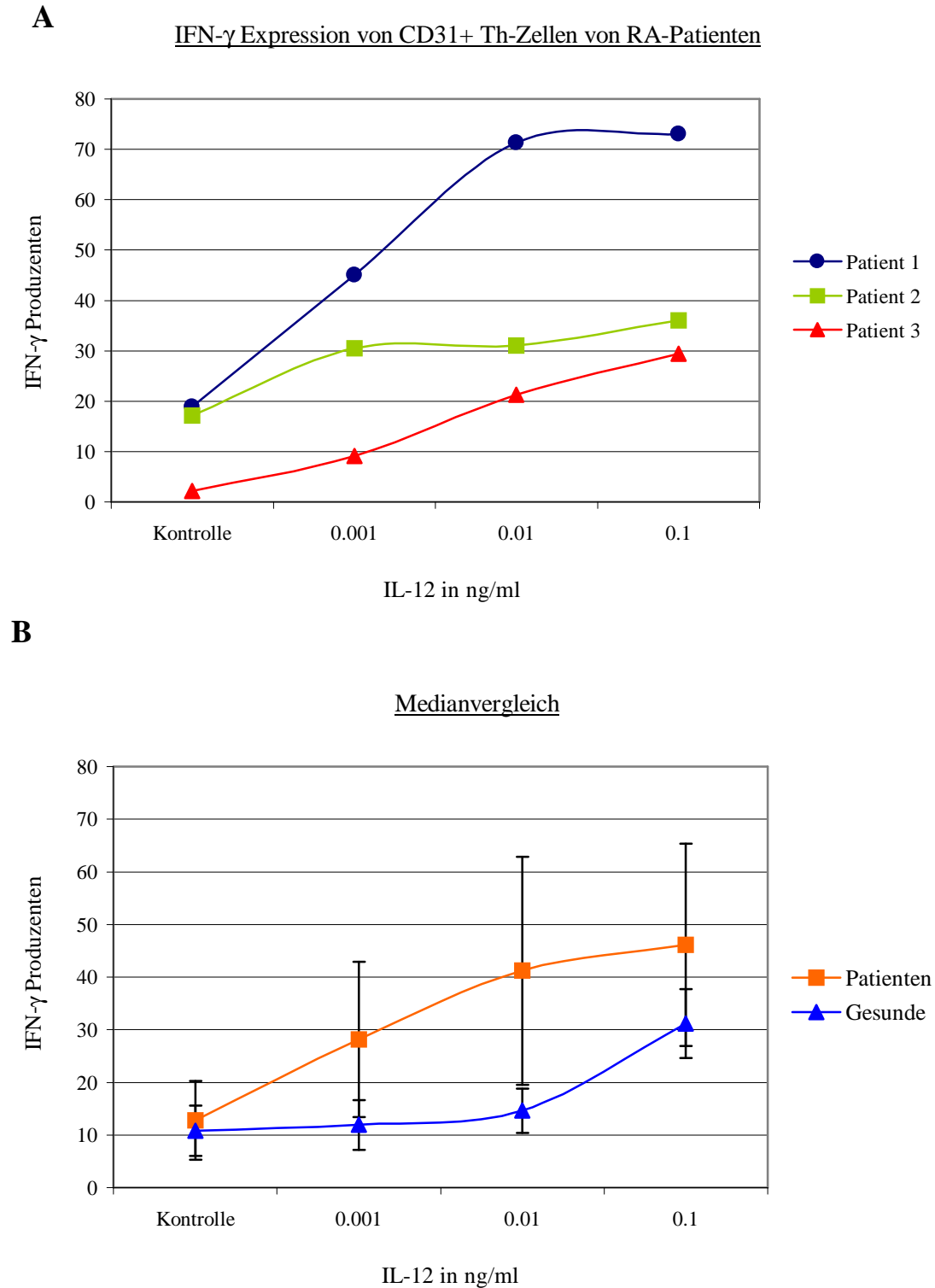


Abb. 24: IFN- γ Induktionskinetik der CD31⁺ Th-Zellen von drei Patienten

Die CD31⁺ Th-Zellen der Patienten wurden, wie die der gesunden Spender aufgearbeitet und mit IL-12 titriert. Nach fünf Tagen erfolgte die Restimulation und Fixierung. Die Grafik A zeigt die drei Titrationskurven der Patienten, Grafik B stellt die Mediane und die Standardabweichung der drei Titrationskurven und zum Vergleich die Mediane und die Standardabweichung der elf gesunden Spender dar.