

**IN-VITRO- UND IN-VIVO-STUDIEN ZU  
IL-12-DEFIZIENTEN DENDRITISCHEN ZELLEN  
VON PRIMATEN**

**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

**EDITH JASNY**

aus Ratibor

Berlin, Mai 2007

1. Gutacher: PD Dr. Ralf Ignatius
2. Gutacher: Prof. Dr. Volker Haucke

Disputation am 20.09.2007

*Meinen Eltern in tiefster Dankbarkeit*

## **DANKSAGUNG**

Die vorliegende Arbeit wurde an der Charité-Universitätsmedizin Berlin am Institut für Infektionsmedizin in der Abteilung Mikrobiologie und Infektionsimmunologie unter der Anleitung von PD Dr. Ralf Ignatius angefertigt.

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen Personen bedanken, die mich auf unterschiedliche Weise unterstützt und zu dieser Dissertation beigetragen haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt PD Dr. Ralf Ignatius für die exzellente Betreuung meiner Arbeit, stete Unterstützung, ständige Diskussionsbereitschaft und kreativen Anregungen, wertvollen Ratschläge aus dem Forschungsalltag, sowie inspirierenden und motivierenden Einfluss, von dem ich immens viel habe lernen können.

Herrn Prof. Dr. Volker Haucke danke ich für die Übernahme des mit Sicherheit zeitaufwendigen Zweitgutachtens.

Danke sagen möchte ich auch meinen Kollegen im Labor, die mir immer hilfreich zur Seite standen. Dr. Martin Eisenblätter möchte ich für die kollegiale Arbeitsatmosphäre, tatkräftige Hilfe bei theoretischen und praktischen Fragen, Einarbeitung in immunologische und zellbiologische Techniken, hilfreichen Diskussionen und wertvollen Anregungen danken. Mein Dank gilt auch Pablo Renner-Viveros, Ursula Rüschen-dorf und Petra Huck für ihre immer freundliche Unterstützung, ein hervorragendes Arbeitsklima und kompetente technische Assistenz.

Dr. Kerstin Mätz-Rensing und Dr. Christiane Stahl-Hennig vom Deutschen Primaten Zentrum in Göttingen danke ich für die gute und zuverlässige Kooperation.

Bei Dr. Klara Tenner-Racz und Prof. Dr. Paul Racz, sowie Gudrun Großschupff vom Bernhard-Nocht-Institut in Hamburg möchte ich mich für die großartige Immunhistologie der Lymphknoten bedanken.

Diese Arbeit wurde finanziell von der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Klinische Forschergruppe 104 unterstützt.

Nicht zuletzt bin ich meinen Eltern, meiner Familie und Freunden für die Unterstützung in allen Lebenslagen und moralische Stärkung dankbar.

# INHALTSVERZEICHNIS

	<i>Seite</i>
<b>1. EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1 T-zellvermittelte Immunantworten.....	1
1.2 IL-12-Familie von heterodimeren Zytokinen.....	2
1.2.1 Struktur von IL-12 und IL-23.....	2
1.2.2 Regulation der IL-12- und IL-23-Produktion.....	4
1.2.3 Biologische Funktion von IL-12 und IL-23.....	7
1.3 Dendritische Zellen.....	8
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	14
<b>2. MATERIAL und METHODEN.....</b>	<b>16</b>
2.1 Material.....	16
2.1.1 Verwendete Chemikalien.....	16
2.1.2 Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	17
2.1.3 Verwendete Puffer und Zellkulturmedien.....	17
2.1.4 Verwendete Geräte.....	19
2.2 Methoden.....	20
2.2.1 Zellbiologische Methoden.....	20
2.2.1.1 Isolierung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut .....	20
2.2.1.2 Isolierung von Monozyten und Differenzierung zu DCs.....	21
2.2.1.3 Stimulierung von DCs.....	22
2.2.1.4 GM-CSF-Neutralisationsassay.....	23
2.2.1.5 Isolierung von T-Zellen.....	23
2.2.1.6 Isolierung naiver CD4 <sup>+</sup> T-Zellen.....	24

	<i>Seite</i>
2.2.1.7	Endozytoseassay..... 24
2.2.1.8	Antigenspezifischer Proliferationsassay..... 25
2.2.1.9	Allogene gemischte Leukozytenreaktion..... 26
2.2.1.10	ELISPOT-Assay..... 26
2.2.1.11	Stimulierung von T-Zellen durch antigenbeladene DCs..... 27
2.2.1.12	Priming und Polarisierung naiver T-Zellen..... 28
2.2.1.13	Gewinnung KLH-spezifischer T-Zelllinien..... 28
2.2.1.14	Behandlung von Rhesusaffen mit GM-CSF und G-CSF..... 29
2.2.1.15	Reinjektion fluorochrommarkierter oder antigenbeladener DCs.... 29
2.2.1.16	Immunhistochemische Färbung von Lymphknoten..... 30
2.2.1.17	Durchflusszytometrie..... 31
2.2.1.18	Bestimmung der Zytokinproduktion..... 34
2.2.1.19	Isolierung mukosaler Leukozyten aus Biopтатаen oder Resektaten von Rhesusaffen..... 34
2.2.2	Proteinbiochemische Methoden..... 37
2.2.2.1	Analyse der p38 MAP-Kinase-Aktivierung..... 37
2.2.2.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese..... 37
2.2.2.3	Western-Blotting und Detektion..... 38
2.2.2.4	Nachweis von anti-GM-CSF-Antikörpern bei GM-CSF- behandelten Rhesusaffen..... 39
2.2.3	Statistische Auswertungen..... 39
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE..... 41</b>
3.1	Methodische Vorarbeiten..... 41
3.1.1	Isolierung mukosaler Leukozyten..... 41

	<i>Seite</i>
3.1.2 Behandlung von Rhesusaffen mit GM-CSF oder G-CSF zur In-Vivo-Mobilisierung von DC-Vorläuferzellen.....	45
3.2 In-Vitro-Gewinnung und Charakterisierung reifer IL-12-defizienter DCs von Mensch und Rhesusaffe.....	47
3.2.1 Einfluss von Glatirameracetat auf die Aktivierung von DCs.....	47
3.2.2 cAMP-Enhancer als DC-Aktivierungsstimuli.....	49
3.2.3 GA und d-cAMP aktivieren Rhesusaffen-DCs.....	51
3.2.4 Reduzierte Antigenaufnahme durch GA/d-cAMP-aktivierte DCs.....	53
3.2.5 Die p38-MAP-Kinase ist bei GA/d-cAMP-Stimulierung von DCs inaktiv.....	55
3.2.6 GA/d-cAMP-aktivierte DCs zeigen eine reduzierte IL-12-Sekretion.....	56
3.2.7 Induktion antigenunspezifischer T-Zellproliferation durch GA/d-cAMP-aktivierte DCs in xenogenen MLRs.....	56
3.2.8 Antigen spezifische Aktivierung peripherer T-Zellen durch GA/d-cAMP-stimulierte DCs.....	57
3.2.9 Th-Polarisierung naiver T-Zellen durch GA/d-cAMP-aktivierte DCs.....	59
3.3 In-Vivo-Untersuchung GA/d-cAMP-stimulierter DCs.....	60
3.3.1 In-Vivo-Migration GA/d-cAMP-stimulierter DCs.....	60
3.3.2 Periphere Immunantworten nach Applikation antigenbeladener GA/d-cAMP-aktiverter DCs.....	65
3.3.2.1 Frequenz CD4 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup> peripherer regulatorischer T-Zellen.....	66
3.3.2.2 Antigen spezifische T-Zellproliferation und Zytokinsekretion.....	67
3.3.2.3 Zytokinproduktion KLH-spezifischer T-Zelllinien.....	69
3.3.2.4 GA/d-cAMP-stimulierte DCs sezernieren IL-12p40 und IL-23 nach Restimulierung mit CD40-Ligand.....	70

	<i>Seite</i>
3.3.2.5 IL-17-Sekretion in den Zellkulturüberständen KLH-spezifischer T-Zelllinien.....	72
<b>4. DISKUSSION.....</b>	<b>73</b>
4.1 Gewinnung und In-Vitro-Untersuchungen IL-12-defizienter humaner und Rhesusaffen-DCs.....	73
4.2 In-Vivo-Charakterisierung IL-12-defizienter DCs.....	77
4.2.1 Behandlung der Rhesusaffen mit rekombinanten Zytokinen zwecks Steigerung der Monozytenzahlen.....	77
4.2.2 In-Vivo-Migrationskapazität GA/d-cAMP-aktivierter DCs.....	79
4.2.3 Immunologische Eigenschaften GA/d-cAMP-aktivierter DCs in vivo....	81
<b>5. AUSBLICK.....</b>	<b>88</b>
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>89</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>92</b>
<b>7. LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>94</b>
<b>8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>113</b>
<b>9. Lebenslauf.....</b>	<b>116</b>