

Aus der Klinik für Dermatologie,
Venerologie und Allergologie
der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

Dissertation

Entwicklung eines IP-10 Bioassays zur Bestimmung der Interferon-Sensitivität

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
Universitätsmedizin Berlin

von

Stefanie Beier
aus Berlin

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. W. Sterry
2. Prof. Dr. med. H. Taupe
3. Priv.-Doz.Dr. med. S. Gellrich

Datum der Promotion: 17. Dezember 2007

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Interferone	5
1.1.1	Produzierende Zellen, Struktur und biologische Bedeutung	5
1.1.2	IFN und Psoriasis	8
1.1.3	Interferon-Sensitivität als möglicher modulierender Faktor für die Ausprägung und den Verlauf einer Psoriasis	10
1.2	IFN γ -inducible-Protein-10 (IP-10)	11
1.2.1	Produzierende Zellen, Struktur und biologische Bedeutung	11
1.2.2	IP-10 und Psoriasis	13
2	Fragestellung	14
3	Material und Methoden	15
3.1	Probanden	15
3.2	Gewinnung der PBMC	15
3.3	Chemikalien und Reagenzien	15
3.3.1	Verwendete Reagenzien	15
3.3.2	Zusammensetzung selbst hergestellter Lösungen	17
3.4	Verbrauchsmaterialien und Geräte	17
3.5	Methode des IP-10 ELISPOT	17
3.5.1	1.Tag	17
3.5.2	2.Tag	18
3.5.3	3.Tag	20
3.6	Intrazellulären IP-10 FACS-Messung	20
3.6.1	1.Tag	20
3.6.2	2.Tag	21
3.7	Methode des IP-10 ELISA	22
3.7.1	1.Tag	22
3.7.2	2.Tag	23
4	Ergebnisse	25
4.1	Pilotexperimente	25
4.2	IP-10 ELISPOT	25
4.2.1	Etablierung und Optimierung des IP-10 ELISPOT-Assays	26
4.2.2	funktionelle Ergebnisse	27
4.2.3	Gesamtauswertung	29
4.3	Intrazelluläre IP-10 FACS-Färbung	31
4.3.1	Etablierung des intrazellulären IP-10 FACS	31
4.3.2	Funktionelle Ergebnisse	32
4.4	IP-10 ELISA	34
4.4.1	Wechselwirkungen von IFN α und IFN γ	34

4.4.2	Relative IFN α - und IFN γ -Sensitivität bei gesunden Probanden	35
5	Diskussion	43
6	Zusammenfassung	48
	Schriftenverzeichnis	48
	Abkürzungsverzeichnis	55
	Abbildungsverzeichnis	57
	Tabellenverzeichnis	57
	Danksagungen	59
	Curriculum Vitae	60
	Eidesstattliche Erklärung	61

1 Einleitung

1.1 Interferone

1.1.1 Produzierende Zellen, Struktur und biologische Bedeutung

Interferone (IFN) sind Proteine, die von zahlreichen verschiedenen Zellen auf antigene oder mitogene Stimuli hin gebildet werden. Es werden zwei verschiedene Typen unterschieden: Typ I IFN, deren wichtigste Vertreter $\text{IFN}\alpha$ und $\text{IFN}\beta$ sind, und Typ II IFN, gleichbedeutend mit $\text{IFN}\gamma$.

Zu den Typ I IFN zählen verschiedene säurestabile Proteine ($\text{IFN}\alpha$ Subtypen, $\text{IFN}\beta$, $\text{IFN}\epsilon$, $\text{IFN}\kappa$, $\text{IFN}\omega$, $\text{IFN}\delta$, $\text{IFN}\tau$), die teilweise nur in tierischen Organismen vorkommen; andere sind im menschlichen Körper spezifisch für bestimmte Organe z.B. das $\text{IFN}\epsilon$ für die Plazenta [1]. Die wichtigsten Vertreter der Typ I IFN sind die über 20 verschiedenen $\text{IFN}\alpha$ Subtypen, bestehend aus 150-172 AS und $\text{IFN}\beta$ (166 AS). $\text{IFN}\alpha$ wird von allen somatischen Zellen synthetisiert, die auch alle den $\text{IFN}\alpha$ Rezeptor (IFNAR) tragen. Die wichtigsten Produzenten sind aber die Zellen des unspezifischen Immunsystems wie NKZ, Mastzellen, myelodendritische Zellen (mDC) und vor allem plasmazytoide dendritische Zellen (pDC) [2],[3],[1].

Nach Aktivierung eines TLR auf ihrer Zellmembran durch bakterielle, protozoische oder mykoplasmatistische LPS oder durch Stimulierung eines TLR auf ihrer endosomalen Membran durch bakterielle oder virale Nukleinsäuren werden - neben einer Vielzahl anderer Proteine - große Mengen an $\text{IFN}\alpha/\beta$ gebildet [4],[1],[5], die eine Immunantwort generieren oder modifizieren. Dem $\text{IFN}\alpha$ und $\text{IFN}\beta$ ist gemein, dass sie an den gleichen Heterodimer-Rezeptorkomplex auf der Zelloberfläche binden. Zielzellen des $\text{IFN}\alpha/\beta$ sind nahezu alle Körperzellen, die den Rezeptor in meist geringer Anzahl auf ihrer Zelloberfläche tragen (200-6000/ Zelle), und für $\text{IFN}\alpha/\beta$ hoch affin sind. Der Rezeptorkomplex auf der Zielzelle besteht aus zwei transmembranalen Molekülen - IFNAR1 und IFNAR2 -, die nach Bindung des $\text{IFN}\alpha/\beta$ an den IFNAR2 ein Dimer bilden. Hierdurch werden die an die Rezeptormoleküle assoziierte Janus-Protein-Tyrosin-Kinasen durch Phosphorylierung aktiviert: Tyk2 am IFNAR1 und Jak1 am IFNAR2. Am IFNAR1 befindet sich die Bindungsstelle für die STAT Moleküle, deren Phosphorylierung durch Jak1 und Tyk2 zur Dimerbildung der STAT Moleküle führt. Als Dimer stellen STAT Moleküle einen Transkriptionsfaktor dar: AAF (Homodimer aus STAT1) und ISGF3 (Dimer aus STAT1 und STAT2 plus IRF-9). Durch Bindung an die DNA im Zellkern (AAF an GAS, ISGF3 an ISRE) bewirken sie sowohl die Transkription von Effektorproteinen wie IP-10, OAS, PKR, IRF und anderen, sowie die Replikation von

1 Einleitung

IFN α/β selbst [6],[7],[1]. Unter den genannten Effektorproteinen verdient die IRF Familie besondere Erwähnung, da sie - zum größten Teil induziert durch IFN selbst - regulierenden Einfluss auf die IFN Expression auf Transkriptionsebene nehmen. Dies gilt sowohl für die Typ I wie auch die Typ II IFN. Bisher sind neun verschiedene IRF bekannt, deren Bedeutung vor allem durch Knockout-Versuche deutlich wird. Im Allgemeinen zeigen diese Knockout-Mäuse Defizite in der Leukozytenentwicklung, da die zur Entwicklung benötigten Zytokinmuster nicht oder nur unzureichend generiert werden können. Im Speziellen zeigen IRF1-/- Knockout-Mäuse schwere Defizite in der T-Zell- und NKZ-Entwicklung, da u.a. IFN α induziertes IL15 fehlt. Durch ein Defizit an IL12 ist die Th1-Antwort gemindert. Bei diesen Mäusen sind die Symptome von Th1 dominierten (autoimmunen) Erkrankungen milder. Besonderes Aufsehen hat die Entwicklung einer psoriasisartigen Hauterkrankung bei IRF2-/- Knockout-Mäusen erregt (s.u.) [8]. IRF2 wird als Antagonist zur IRF1 Funktion betrachtet, und somit als einer der wichtigsten Inhibitoren des IFN α/β -Signals. IRF3 und IRF7 regulieren die IFN α/β Synthetisierung in einem positiven Feedback-Mechanismus [9]. Schließlich fehlen IRF8-/- Mäusen pDC in ihren lymphatischen Geweben, die Aktivierung der CD8+ T-Zellen über DC und die Makrophagenfunktion ist defizitär. IRF8 wird hauptsächlich von IFN γ induziert [6],[1].

IFN α wird als das Schlüsselzytokin des unspezifischen Immunsystems betrachtet und spielt somit eine wichtige Rolle bei (viralen) Infektionen und immunologischen Erkrankungen. Seine Rolle bei bakteriellen Infektionen ist noch unklar. So induziert LPS kaum IFN α [1],[5]. Nach TCR-Stimulierung wird es in großen Mengen gebildet, und induziert in den Zielzellen eine Virusresistenz, inhibiert die Zellproliferation infizierter Zellen und induziert in diesen die Apoptose [9].

Die Zellen des unspezifischen Immunsystems werden von IFN α aktiviert. IFN α - aber nicht IFN γ - induziert in Monozyten die Differenzierung zu reifen DC, gleichbedeutend mit einer erhöhten MHC I Expression auf der Zelloberfläche. Die Zellproliferation von NKZ, Makrophagen und Gedächtnis-T-Zellen wird induziert. Gleichwohl hat IFN α aber auch eine wichtige Rolle im spezifischen Immunsystem: Es verzögert die Apoptose von aktivierten, spezifischen T-Zellen und fördert die CD4+ T-Zell-Differenzierung [10] entweder direkt oder via IL15 Induktion in APC [1].

Neben diesen aktivierenden Effekten des IFN α/β sind auch antiproliferative und proapoptische Effekte auf Progenitorzellen des Granulozyten-Makrophagen Systems, des erythrozytären Systems einschließlich der Megakaryozyten und auch auf T-Zellen bekannt [1]. Dies geht mit der Induktion von Zyklinkinase-Inhibitoren und proapoptischen Molekülen wie Fas/FasL einher. Die Apoptosesignale scheinen aber nur in der Frühphase einer Immunreaktion gegeben zu werden. Zusammenfassend spielen Typ I IFN eine pleiotope, zentrale Rolle vor allem in der unspezifischen, frühen Immunantwort auf pathologische Agenzien. Es induziert in einem Großteil der somatischen Zellen die Synthese antiviraler und antimikrobieller Proteine und die Expression von HLA I Molekülen und β 2 Mikroglobulinen, was zu einer De-

1 Einleitung

tektion der infizierten Zelle führt [10],[1]. Ebenso kann es aber auch antiproliferative Signale setzen und Apoptose von Zellen des spezifischen Immunsystems induzieren oder inhibieren. Da $\text{IFN}\alpha$ in erhöhten Spiegeln in der Haut von Psoriasispatienten, im Serum und im Pankreas von Patienten mit insulinabhängigem Diabetes mellitus, in der Synoviaflüssigkeit bei rheumatoider Arthritis und im Serum von Patienten mit systemischem Lupus erythematoses gefunden wird, ist seine bedeutende Rolle bei autoimmunen Erkrankungen unumstritten [2],[1].

$\text{IFN}\gamma$ ist ein säurelabiles Glykoprotein, bestehend aus 146 AS. In aktivierter Form liegt es als Dimer vor. Produzierende Zellen des $\text{IFN}\gamma$ sind aktivierte NKZ, aktivierte T-Lymphozyten, Makrophagen und - in Gegenwart von IL12 und IL18 oder IL23 - aktivierte DC und B-Lymphozyten [11],[12],[13]. IL12 und IL18 können in Co-Stimulation in T-Lymphozyten die $\text{IFN}\gamma$ Synthese induzieren, ohne dabei den TCR zu stimulieren [11].

$\text{IFN}\gamma$ induziert in Th0 Zellen eine Th1 Differenzierung und gehört anschließend auch zum Th1 Zytokinmuster [7]. Effektorzellen des $\text{IFN}\gamma$ sind Zellen des hämatopoetischen Systems, Epithel- und Endothelzellen sowie verschiedene Tumorzellen. Ebenso wie $\text{IFN}\alpha$ führt auch $\text{IFN}\gamma$ zu einer gesteigerten Expression von HLA I Molekülen auf der Zelloberfläche. Die Signaltransduktion der $\text{IFN}\gamma$ -Bindung an IFNGR verläuft über ähnliche molekulare Mechanismen wie die des IFNAR, obgleich sich die biologischen Effekte des $\text{IFN}\gamma$ von denen des $\text{IFN}\alpha$ unterscheiden. Der Rezeptor besteht ebenfalls aus zwei transmembranalen Molekülen: IFNGR1 und IFNGR2 und den Kinasen Jak1 und Jak2. Die Bindung von $\text{IFN}\gamma$ an IFNGR2 führt zur Phosphorylierung von Jak und zur Bindung von STAT1. In Gegenwart von phosphoryliertem Y701 werden STAT1 Homodimere gebildet, welche im Zellkern an die Promotorregion (GAS) binden [7],[14].

$\text{IFN}\gamma$ ist ein starker Induktor des IRF1, und regt somit eine Th1 Immunreaktion an [15],[16]. Die biologische Aktivität des $\text{IFN}\gamma$ liegt in der Aktivierung und der Induktion von Wachstum und Differenzierung von T- und B-Lymphozyten, Makrophagen, NKZ und Endothelzellen, des Weiteren in der Induktion von Zytokinen wie IP-10, MIG und I-TAC, Expression von HLA I/II und der Beeinflussung der Expression tumorassoziierter Antigene. Es ruft also eine Immunaktivierung und -modulation hervor, und spielt somit - im Gegensatz zum $\text{IFN}\alpha$ - eine Rolle im spezifischen Immunsystem [17],[18]. Es gilt als eines der potentesten unter den bekannten antiproliferativen Zytokinen, und spielt somit eine Rolle bei der Kontrolle des Zellwachstums. Die Apoptosesignale des $\text{IFN}\gamma$ werden über eine IRF1 induzierte Fas/FasL-Expression auf der Zelloberfläche der Zielzelle vermittelt [14]. Fehlt der IFNG2 auf der Zelloberfläche wie dies beispielsweise bei malignen T-Zellen der Fall ist, die diesen IFNR-Anteil endozytieren, werden sie resistent gegen $\text{IFN}\gamma$ -(Apoptose-)Signale [14]. Andererseits erhöht das $\text{IFN}\gamma$ die Resistenz von Zellen - so der Keratinozyten - auf Apoptosesignale [19]. (s. auch 1.1.2.)

1 Einleitung

Ein linearer, kinetischer Zusammenhang zwischen der Expression von $\text{IFN}\alpha$ und $\text{IFN}\gamma$ ist nicht bekannt. Die maximale Sezernierung der beiden Interferone treten während einer Infektion unabhängig voneinander auf. Allerdings beeinflussen sie sich gegenseitig. Dies geschieht über das STAT1 Molekül: Auch außerhalb eines immunologischen Prozesses wird ständig $\text{IFN}\alpha$ in geringen Mengen produziert [8],[6]. Dies führt zu einer stetigen Aktivierung von STAT1-Molekülen, die dann bei IFNAR2 - oder IFNGR -Stimulierung schnell zur Rekrutierung zur Verfügung stehen. Diese basale $\text{IFN}\alpha$ -Sezernierung scheint für die $\text{IFN}\gamma$ -Signaltransduktion erforderlich zu sein, denn fehlt der IFNAR oder wird $\text{IFN}\alpha$ durch AK blockiert, so ist auch die $\text{IFN}\gamma$ -Signaltransduktion ineffizient [17],[6],[1]. Dies ließe sich zum einen über eine unzureichende STAT1-Phosphorylierung und -Dimerbildung im Moment der $\text{IFN}\gamma$ -Bindung an den IFNGR erklären. Zum andern vermutet man, dass IFNAR1 und IFNGR2 physische Verbindungen eingehen [20]. Die sonst schwache $\text{IFN}\gamma$ Signaltransduktion ist so um etwa das zehnfache gesteigert [17],[6],[1]. Schließlich ist die Induktion von $\text{IFN}\gamma$ selbst auf TCR-Stimulation hin $\text{IFN}\alpha$ abhängig [17]. In T-Zellen und NKZ induziert und inhibiert $\text{IFN}\alpha$ die $\text{IFN}\gamma$ -Induktion über STAT1 dosisabhängig: Ist der $\text{IFN}\alpha$ -Spiegel niedrig, wird $\text{IFN}\gamma$ hauptsächlich auf einen IL12 Stimulus hin gebildet. Steigt der $\text{IFN}\alpha$ -Spiegel wird das Signal der IL12 Stimulation unterdrückt. Fehlt das STAT1 Molekül, lässt sich eine $\text{IFN}\gamma$ Produktion direkt durch $\text{IFN}\alpha$ -Stimulation hervorrufen. Dies führt in den STAT1-/- Mäusen zu exzessiver Expression von $\text{IFN}\gamma$ [17]. Diese Negativregulation der $\text{IFN}\gamma$ -Expression durch $\text{IFN}\alpha$ über das STAT1 Molekül spielt vor allem in der Anfangsphase einer viralen Infektion eine Rolle. Dies verhindert Effekte des $\text{IFN}\gamma$ wie eine überschießende und potentiell schädliche NKZ- und T-Zell-Rekrutierung und eine frühzeitige Induktion der Apoptose in für die Verteidigung des Organismus wichtigen Zellen. In späteren Phasen tritt die Bedeutung der Induktion des $\text{IFN}\gamma$ durch $\text{IFN}\alpha$ in den Hintergrund und die direkte Induktion von $\text{IFN}\gamma$ über STAT4, IL 12, andere Zytokine und den TCR gewinnen an Bedeutung. Die genauen Mechanismen der beschriebenen Negativregulation der $\text{IFN}\gamma$ Induktion durch $\text{IFN}\alpha$ über das STAT1 Molekül sind allerdings noch weitgehend unbekannt. Betrachtet man den umgekehrten Fall - die Beeinflussung der $\text{IFN}\alpha$ Signaltransduktion durch $\text{IFN}\gamma$ - so wurden positiv-regulatorische Effekte nachgewiesen. Dies geschieht über STAT1 und die Tyrosine Kinase Syk [21].

1.1.2 IFN und Psoriasis

Bei immunologischen Erkrankungen wie der Psoriasis ist Typ I IFN als pathogenetischer Faktor bekannt. So können Schübe dieser chronischen Erkrankung bei Psoriatikern durch iatrogen zugefügtes $\text{IFN}\alpha$ ausgelöst werden, welches z.B. zur Therapie der Hepatitis C [22], anderen viralen Entzündungen sowie bei Multipler Sklerose ($\text{IFN}\beta$) eingesetzt wird. Exazerbationen einer Psoriasis können auch durch Infektionen - also hohe Serum- $\text{IFN}\alpha$ -Konzentrationen - ausgelöst sein. Gleiches gilt für exogen zugeführtes $\text{IFN}\gamma$, welches in die

1 Einleitung

Haut von Psoriatikern injiziert wird [19].

In akuten Psoriasisplaques sind CD4+CLA+ (skin homing) Lymphozyten in großer Menge in der Dermis präsent. IFN α ist ein wichtiges Zytokin in der Regulation der CD4+ T-Zell Funktionen: Induktion von IL2, TNF α und IFN γ , welches dann wiederum zur Aktivierung von (CD8+) T-Zellen führt und die Makrophagen Aktivität stimuliert. Neben der Synthese und Involvierung des IFN α im T-Zellsystem wird es auch von anderen in den Psoriasisplaques präsenten Zellen gebildet, besonders den plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDC) [23],[13]. Diese pDC haben die einzigartige Eigenschaft sehr hohe IFN α -Titer zu synthetisieren [24]. Die pDC Population im Blut und in den sekundären lymphatischen Organen ist gering. In gesunder Haut oder in der Haut von Patienten mit atopischer Dermatitis werden sie nicht beobachtet. Sie werden aber in läsionsfreier Haut von Psoriatikern und in erstaunlich hoher Anzahl in Psoriasisplaques gefunden. In den aktiven Plaques zeigen sie starke IFN α -Produktion und exprimieren CD80+/ CD83+/ CD86+ als Zeichen ihrer Aktivität auf ihrer Zelloberfläche [24]. Hier erscheinen sie in der Frühphase einer Plaqueentwicklung, produzieren IFN α , was zur pathologischen Aktivierung und Expansion von Th1 Zellen führt [2],[24]. Allerdings wird das MxA-Protein, ein Marker für die IFN α Aktivität, nur in den ersten zwei Wochen einer Plaqueentwicklung gefunden. Später nimmt seine Konzentration kontinuierlich ab [2],[24]. IFN α trägt also zur Amplifikation und Unterhaltung des Entzündungsprozesses in Psoriasisplaques in der Früh- und Akutphase bei. Später tritt seine Bedeutung hinter der anderer Zytokine wie dem IFN γ zurück. Die Behandlung mit neutralisierendem IFN α/β -Rezeptor-AK führte im Mausversuch zu einer vollständigen Unterdrückung der T-Zell-Aktivierung und -Expansion und somit der Entwicklung einer psoriasisartigen Hauterkrankung [24].

Aktivierte Th1- und Tc1-Lymphozyten (CLA+, CD103+ als spezifischer Homing Marker für die Epidermis) [13] ebenso wie die Keratinozyten in den Psoriasisplaques produzieren IFN γ , welches in psoriatischen Läsionen in erhöhten Spiegeln gefunden wird. Die durch IFN γ -Stimulation induzierten Adhäsionsmoleküle (CXC Proteine, E-selectin, I-CAM, V-CAM) führen zu einer Chemotaxis von T-Lymphozyten in die Epidermis [19],[25],[23],[26],[13],[27]. Extradermal findet man im Serum von Psoriasispatienten eine signifikant erhöhte IFN γ -Expression in den CD4+ Lymphozyten (wohingegen die IFN γ -Expression in CD8+ keine signifikanten Unterschiede zwischen Psoriatikern und Normalpersonen zeigt) [28]. IFN γ injiziert in läsionsfreie, psoriatische Haut provoziert psoriatische Plaques [27]. Die (Keratinozyten-) Proliferation in den Psoriasisplaques scheint paradox, denn IFN γ gilt einerseits als eines der stärksten unter den bekannten anti-proliferativen Zytokinen. Andererseits ist bekannt, dass IFN γ die Apoptose hinauszögern kann, so dass nicht eine Hyperproliferation sondern eine ungenügende Apoptose für das typische histologische Bild der Psoriasis verantwortlich sein könnte [19]. Außerdem ist IFN γ Induktor für IL6, IL8, IL12, IL18, IP-10,

I-TAC und MIG, die in Psoriasisläsionen ebenfalls erhöhte Titer zeigen [25],[23]. Diese Interleukine und Zytokine wirken chemotaktisch auf T-Lymphozyten und Neutrophile. IL8 führt seinerseits ebenso zu einer Keratinozyten-Proliferation. IL12 und IL23 sind wichtige Interleukine in der Entwicklung einer Th1-Antwort und wiederum der IFN γ -Induktion in DC. Der lokale Entzündungsprozess einer Psoriasisläsion wird unterhalten [25],[13]. Die für die Psoriasisläsion typische Dilatation des oberflächlichen Gefäßplexus ist vermutlich auf die erhöhte Aktivität von iNOS zurückzuführen, deren Genom durch IFN γ und IRF1 induziert wird [23].

IFN α - und IFN γ -Signale werden durch den Transkriptionsfaktor IRF2 gehemmt, dessen Genom in unmittelbarer Nachbarschaft zu einem Gen liegt, zu dem in einigen Psoriasis-Familien eine Assoziation gefunden werden konnte (Chromosom 4q25). Mäuse, die bezüglich dieses Transkriptionsfaktors doppelt negativ sind, entwickeln spontan eine psoriasisartige Hauterkrankung. In der Haut zwei Monate alter, noch gesunder IRF2 $^{-/-}$ Mäuse wurden CXCR3+ T-Lymphozyten nachgewiesen. Dieser IP-10-Rezeptor findet sich auf aktivierten T-Lymphozyten. Bei den IRF2 $^{-/-}$ Mäusen sind die CXCR3+ T-Lymphozyten nur selektiv in der Haut erhöht [8]. IRF2 $^{-/-}$ Mäuse zeigen also einen Defekt in der Entwicklung der T-Lymphozyten, genauer einen Defekt der Th1-Zell-Entwicklung [8],[17].

Die Psoriasis ist als eine Th1-lymphozytäre Erkrankung der Haut definiert, bei der es zu einem Ungleichgewicht zwischen den Th1- und Th2-Lymphozytenfunktionen gekommen ist. Eine Ausheilung oder zumindest eine Besserung der Klinik findet statt, wenn es zum so genannten „Cytokin Switch“ kommt, bei dem das Gleichgewicht zwischen Th1- und Th2-Funktionen in der Epidermis wieder hergestellt wird. In gesunden Zellen inhibiert IRF2 die ISGF3-vermittelte IRSE-Aktivierung teilweise, ohne diese jedoch vollständig zu unterdrücken [8],[6]. IRF2 $^{-/-}$ und IFNAR1 $^{-/-}$ bzw. IRF9 $^{-/-}$ doppelt negative Mäuse entwickeln keine psoriatische Hauterkrankung, was darauf hinweist, dass das IFN-System (besonders das IFN α) eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der Psoriasis einnimmt [8]. Unterschiede in der Gesamt-mRNA-Expression von IRF1 und IRF2 in der Epidermis bei gesunden Probanden und Psoriatikern konnten nicht gefunden werden. Jedoch ist die IRF2-Expression in der Epidermis normaler Haut auf die basalen Keratinozyten beschränkt, wohingegen in der psoriatischen Epidermis nahezu alle Keratinozyten IRF2 zeigen. Die Angaben zu einer gestörten IRF1 Expression sind unterschiedlich [15].

1.1.3 Interferon-Sensitivität als möglicher modulierender Faktor für die Ausprägung und den Verlauf einer Psoriasis

Wie beschrieben spielen Interferone eine entscheidende Rolle in verschiedensten Immunprozessen. Die Modulationsmechanismen sind vielfältig und können je nach Rezeptorkonstellation den Immunprozess fördern oder unterdrücken. Da iatrogen appliziertes IFN bei empfänglichen Personen eine Psoriasis hervorrufen kann und die Versuche an den IRF2 $^{-/-}$ -Mäusen

darauf hinweisen, dass eine gesteigerte Sensitivität auf IFN eine psoriasiforme Hauterkrankung hervorruft, postulieren wir eine veränderte Sensitivität der Zellen gegenüber IFN bei Psoriatikern. Angesichts der beschriebenen Vielfalt der molekularen Mechanismen und der daraus resultierenden Proteinwirkungen bietet sich zur Testung der IFN-Sensitivität ein Bioassay an, der ein Zielgen erfasst, bei dem alle möglichen Effekte zusammenfließen. Die Entwicklung eines solchen Assays ist Ziel dieser Arbeit.

1.2 IFN γ -inducible-Protein-10 (IP-10)

1.2.1 Produzierende Zellen, Struktur und biologische Bedeutung

IP-10 ist ein Protein der CXC-Familie, einer Untergruppe der Chemokine, zu der auch MIG und I-TAC gehören. Chemokine sind Proteine mit einem niedrigen Molekulargewicht - für das IP-10 sind es 10kDa -, die vor allem dadurch charakterisiert sind, dass sie spezifisch auf Leukozytenuntergruppen chemotaktisch wirken, und somit den Immunprozess modellieren. Die Chemokine der CXC-Gruppe gleichen sich strukturell und funktionell [29],[30]. IP-10 wird nach IFN α/β -, IFN γ - oder TLR-Stimulus in vielen verschiedenen Zellarten gebildet: Monozyten/ Makrophagen/ Mikroglia, DC, Endothelzellen, Keratinozyten, Fibroblasten, neutrophile und eosinophile Granulozyten, Osteoblasten, Thymus-Epithelzellen und Mesothelzellen des Peritoneums [29],[31],[32],[5]. Die IP-10 DNA-Induktion verläuft über die oben beschriebenen Prozesse der STAT1 gekoppelten Rezeptoren (1.1.1. und 1.1.2.). CXCR-tragende Zellen sind vor allem Th1 Lymphozyten. Der Rezeptor ist auf 20-40% der zirkulierenden Th1-Lymphozyten vorhanden [31]. Eine effiziente Aktivierung naiver CD8+T-Lymphozyten ist IP-10 abhängig [33]. Des Weiteren wurde er auf pDC und mDC, B-Zell-Lymphomzellen, Eosinophilen, sich teilenden mikrovaskulären Endothelzellen und Thymozytenuntergruppen nachgewiesen [30],[34],[5]. Die Effekte der CXC-Liganten werden über eine Reihe G-Proteingekoppelter Rezeptoren vermittelt, den CXC-Rezeptoren (CXCR1-4). Allerdings ist in der Gruppe der CXC-Rezeptoren bisher nur der CXCR3 als Rezeptor für IP-10/ MIG/ I-TAC sicher nachgewiesen worden [29],[31].

Hohe Konzentrationen von IP-10 werden in Infektionsherden gefunden, so bei Krankheitsbildern wie der viralen Meningitis, Multipler Sklerose, pulmonalen Formen der Sarkoidose, chronisch aktiver Hepatitis B und in Psoriasisplaques. Dies ist dadurch begründet, dass IP-10 von im Entzündungsherd präsenten Zellen wie DC, neutrophilen Granulozyten oder Makrophagen gebildet wird, welches dann chemotaktisch auf die Th1-Lymphozyten und NKZ wirkt. Letztere bilden wiederum in großen Mengen IFN γ , welches in den präsenten Zellen die IP-10 Produktion stimuliert. IP-10 führt zu einer Th1-Polarisierung, da der CXCR nur auf Th1-Lymphozyten vorhanden ist. Die Th2-Lymphozyten tragen einen CCR. In IP-10 Neutralisationsversuchen wurde ein antagonistischer Effekt von IP-10 am CCR auf

1 Einleitung

Th2 Lymphozyten nachgewiesen [5].

In Versuchen mit IP-10 defizitären Mäusen stellte sich heraus, dass diese unfähig waren, sich gegen eine induzierte MHV Infektion zur Wehr zu setzen. Der $\text{IFN}\gamma$ -Spiegel sowie die Spiegel der beiden anderen CXC-Chemokine MIG und I-TAC war im Plasma dieser Mäuse erniedrigt. Ist kein IP-10 vorhanden, so werden die Th1-Lymphozyten nicht effektiv rekrutiert, was zu dem beobachteten niedrigen $\text{IFN}\gamma$ -Spiegel führt, weshalb auch der vom $\text{IFN}\gamma$ abhängige Stimulus zur Induktion von MIG und I-TAC in den Effektorzellen erniedrigt ist [30].

Die Rolle des IP-10 in der Kontrolle malignen Zellwachstums wird ebenfalls in IP-10-Depletionsversuchen deutlich: Werden Mäusen IP-10-Ag in der Frühphase einer Tumorentwicklung verabreicht, so entwickeln sich keine tumorspezifischen Th1-CD8+ T-Zellen. Dies wurde bei Versuchen mit Mäusen zur IL12-Tumorthérapie beobachtet. Wurde den IL12 behandelten Mäusen ein IP-10 AK verabreicht, so traten erneut Lebermetastasen eines Neuroblastoms auf [35]. Injektionen von IP-10 in Herde benigner und maligner Tumoren führten im Mausmodell zu einer Verringerung der Wachstumsgeschwindigkeit [8],[17],[31]. Es führt - wie MIG auch - zu einer Unterdrückung der Neovaskularisation und hat somit einen anti-neoplastischen Effekt [31],[35].

In Knockout-Maus Versuchen zur Colitis ulcerosa stellte sich heraus, dass die Blockierung des IP-10 in IL10-/- Mäusen die Entwicklung einer Colitis-ulcerosa-artigen Darmerkrankung verhindert, was die immunmodulatorischen Effekte des IP-10 bei der Th1 Rekrutierung deutlich macht [36].

In Anbetracht der Involvierung des IP-10 in den T-Zell-Zyklus ist es nicht verwunderlich, dass dem IP-10 auch eine Rolle im Epidermotrophismus beim kutanen T-Zell Lymphom zukommt. Es konnten keinerlei Effekte des IP-10 auf Monozyten und Neutrophile beobachtet werden [34]. Die Interaktion mit FGF, LPS, $\text{TNF}\alpha$ oder $\text{TGF}\beta$ führt zu einer Modulation der IP-10 Induktion durch $\text{IFN}\gamma$: Eine Co-Stimulation mit LPS/ $\text{TNF}\alpha$ führt beispielsweise zu einer geringeren IP-10 Produktion durch PBMC. IL10 und in geringerem Ausmaß IL4 unterdrücken die IP-10 (und MIG/ I-TAC) Produktion. Durch Chemotaxis von Th1-Zellen führt IP-10 zu einer Reduktion der Zellvermehrung.

Es ist nicht bekannt, ob die IP-10 Produktion verschiedener Zellen die gleiche Sensitivität gegenüber IFN aufweist, bzw. ob die Sensitivität gegenüber $\text{IFN}\alpha$ und $\text{IFN}\gamma$ gleich ist. Darüber hinaus fehlen Studien, die darüber Auskunft geben, ob die verschiedenen genannten Zellpopulationen alle mit der gleichen IP-10 Produktion auf die Stimulation reagieren oder ob Unterschiede beispielsweise bei den Monozyten-Subpopulationen (CD14-low/ CD14-high) bestehen. In der vorliegenden Arbeit werden daher einige IP-10 produzierende Zelltypen hinsichtlich ihrer IP-10 Produktion nach verschiedenen Stimuli getestet.

1.2.2 IP-10 und Psoriasis

IP-10 wirkt chemotaktisch auf aktivierte Th1- und Tc-Zellen [8],[29],[5], denen eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der Psoriasis zukommt. Es ist bemerkenswert, dass die IP-10-induzierenden Zytokine ubiquitär auftreten, das IP-10 jedoch vorwiegend in der Haut nachweisbar ist. Da in der Epidermis von Psoriasis Patienten diese erhöhte Expression von IP-10 (und anderen IFN-induzierten Proteinen) festzustellen ist, wird eine mögliche pathogenetische Rolle in der Entwicklung und Unterhaltung einer Psoriasis diskutiert. Dabei spielen die oben genannten entzündungserhaltenden Prozesse eine Rolle (Chemotaxis und Diapedese von Th1 Zellen und CD8+ Zellen, Unterhaltung des Entzündungsprozesses). Darauf, dass das IP-10 eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung und Unterhaltung einer psoriatischen Hauterkrankung einnimmt, weisen die Ergebnisse der Versuche mit transgene IRF2-/- Mäuse hin, welche eine psoriatische Hauterkrankung entwickelten. Bei diesen Versuchen konnte festgestellt werden, dass nicht IFN-Gene, sondern die ISGF3 Gene selbst, also auch IP-10 vermehrt exprimiert werden. Dies führt zu der erhöhten IP-10 Expression in der Epidermis der Mäuse, welches chemotaktisch auf die in Psoriasisplaques gefundenen Th1 und CD8+ Lymphozyten wirkt [8].

2 Fragestellung

Eine gesteigerte Produktion von Typ I und Typ II IFN stellt eine pathogenethisch wichtige Komponente der Schuppenflechte (Psoriasis) dar. Eines der durch IFN induzierten Zielgene ist das Chemokin IP-10, welches auch in psoriatischen Plaques überexprimiert ist. Hintergrund dieser Arbeit ist die Frage, ob und - wenn ja - wie die IFN-induzierte IP-10 Sezernierung für eine Testung der IFN-Hypersensitivität bei Psoriasis eingesetzt werden kann. Um einen Screeningtest einsetzen zu können, muss eine zuverlässige und leicht durchführbare Testmethode zur Verfügung gestellt werden. Die Entwicklung dieser Testmethode ist Gegenstand dieser Arbeit.

Es ergeben sich folgende Einzelfragen, die den experimentellen Ansatz leiten:

- Sind Zellen des peripheren Blutes (PBMC) für die Assay-Entwicklung geeignet?
- Welche Zellpopulation des Blutes ist Hauptquelle der IP-10 Sezernierung?
- Welche Zellpopulationen reagieren wie auf Stimulation mit IFN α bzw. IFN γ ?
- Lässt sich ein co-stimulatorischer Effekt zwischen IFN α und IFN γ feststellen?
- Ist IP-10 ein geeignetes Effektorprotein (read-out) zur Testung der IFN Sensitivität?
- Ist die IP-10 Produktion ein stabiles, individuelles und reproduzierbares Merkmal oder variiert sie intraindividuell?

3 Material und Methoden

3.1 Probanden

Bei der Methode des ELISPOT wurde Blut von sechs Probanden eingesetzt, von denen fünf an Psoriasis erkrankt waren (m:w = 3:3, Alter 24-71 Jahre, 48,3 +/- Stabw.). Für die weiteren Versuche wurden gesunde Probanden ohne bekannte systemische Entzündungserkrankungen gewählt (Intrazelluläres IP-10 FACS: 3 Probanden, m:w = 0:3, Alter 24-25 Jahre, 24,7 +/- Stabw; IP-10 ELISA: 10 Probanden, m:w = 4:6, Alter 24-36 Jahre, 28,3 +/- Stabw.). Eine schriftliche Einverständniserklärung aller Probanden lag vor Beginn der Versuchsreihen vor.

3.2 Gewinnung der PBMC

Den Probanden wurde 30ml Blut venös in Heparin-Monovetten entnommen. Nach Zugabe der gleichen Menge PBS wurde die Suspension auf angewärmtes Ficoll (s.u.) zur Trennung von Erythrozyten, Leukozyten und Serum langsam aufgeschichtet und bei 2200 rpm 20min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde zunächst 6ml der überstehenden Serum-PBS-Suspension entnommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C zur späteren Parameterbestimmung aufbewahrt. Anschließend wurde die Interphase (= sog. „buffy-coat“) abgesaugt und in drei Waschschritten mit jeweils 50ml PBS vollständig von Serumrückständen, Blutplättchen und Ficoll gereinigt. Zur Zellzählung wurden die Zellen in 10ml RPMI-Medium aufgenommen.

3.3 Chemikalien und Reagenzien

3.3.1 Verwendete Reagenzien

Reagenz	Hersteller
Cytofix/Cytoperm TM	PharMingen/BD, 125ml of a 1 x solution, Lot M0655885
Perm/Wash TM	PharMingen/BD, 100 ml of a 10 x solution, Lot M071881
pNPP	Alkaline Phosphate Yellow(pNPP) Liquid, Substrate System for Elisa, Sigma Germany, 100ml, Lot M071881
Streptavidin-PerCP-CY5.5	PharMingen/BD, Batch 00000 32049, 0,2 mg/ml
purified anti-human CD32	PharMingen/BD, 0,5 mg/ml, Lot M063060

3 Material und Methoden

Reagenz	Hersteller
CD 14 FITC	Mouse anti human CD14:FITC, Serotec U.K., 100 Tests, Batch 0700
CD19 PE	anti-human CD19, PharMingen/BD, Lot M075492
CD3-perCP-Cy5.5	perCP-CY5.5 labeled anti-human CD3,PharMingen/BD, 0,2 mg/ml, Lot M071406
APC-anti-human HLA-DR	PharMingen/BD, 100 Tests, Batch 0000032639,
biot.anti-human CD 54 (ICAM)	PharMingen/BD, 100 Tests, Batch M075487
PE lab. anti-human CD 58 (LFA-3)	PharMingen/BD, 100 Tests, M076141
RPMI 1640 Medium with Glutamax-L-Alanyl-L-Glutamin	Gibco U.K., 500ml, Lot 3072009
PBS Dulbecco's	Gibco BRC, Scotland, Phosphate buffered saline w/o sodium Bicarbonate, Lot 3053415
BSA	Albumin, bovine, Fraction V, Minimum 96%, Sigma, Germany, Lot 120K1218
anti-FITC micro beads	Miltenyi Biotec GmbH, Germany, Lot 5020201004
anti-PE micro beads	Miltenyi Biotec GmbH, Germany, Lot 5020617003
Golgi-Stop TM	PharMingen/BD, 0,7 ml, Lot M069001
Trypsin-EDTA(1x)	Gibco BRC, Scotland,HBSS w/o Ca&Mg w/EDTA 4Na, 100ml, Lot 3053394
recombinant-h-IFN α	PeproTech EC LTD, U.K./U.S.A., 100 μ g, Lot CL02829
recombinant-h-IFN γ	PeproTech EC LTD, U.K./U.S.A., Lot 016CY2701
anti-h-IFN α	rabbit polyclon. AB against human IFN α , PBC Biomedical Laboratories, U.S.A., 1x10 ⁵ units, 1,0mg/ml
anti-h-IFN γ	anti-h-IFN γ Antibodys, R&D Systems, U.S.A., 100 μ g, LotZW02
Ficoll-Plaque TM Plus	Amersham Biosciences, Sweden, 500ml, Lot 294622
PE labeled mouse anti-h-IP-10	PharMingen/BD, 0,2 mg/ml, Batch 0000039813
PE-mouse IgG 2a	κ isotype controle Immunoglobulin, PharMingen/BD, 0,2 mg/ml, Lot M069058
rh Annexin V PE	Bender Med Systems, 0,1 ml, Lot 30605-L1PEIA
Caspase-3-Inhibitor	Cell-permeable, in solution, Calbiochem, Lot B 40736
BCIP/NBT	Alkaline Phosphate substrate/Membrane, Moss Inc., 100ml, Lot 10278011
recombinant human IP-10	peproTech Inc, U.S.A., Lot 676391

Tabelle 3.1: verwendete Reagenzien

3.3.2 Zusammensetzung selbst hergestellter Lösungen

Lösung	Zusammensetzung
FCS-10	FCS + 10%DMSO
FACS-Puffer	500ml PBS + 2,5ml 10% Na-acid in Aqua dest. + 12,5ml 4% BSA in PBS + 5ml 0,005M Na-EDTA
TRIS Waschpuffer	1M TRIS Puffer (pH8) + Aqua dest., 1:20, pH 7,4
4%BSA in PBS	4g BSA in 100ml PBS

Tabelle 3.2: Zusammensetzung selbst hergestellter Lösungen

3.4 Verbrauchsmaterialien und Geräte

Material/Gerät	Hersteller
Zählkammer	Neubauer improved, 0,1 nm Tiefe, 0,0025 mm ²
Trennsäule(LS)	MACS Separation Columns, Milteny Biotec GmbH, Germany
Magnet	Midi MACS, Milteny Biotec GmbH, Germany
Mikroskop	Zeiss Germany, Stemi 2000 und Axiovert 25
pH Meter	WTW, Microprocessor pH Meter
Inkubator	Juan, France, Incubateur G 150 AND 220V

Tabelle 3.3: Verbrauchsmaterialien und Geräte

3.5 Methode des IP-10 ELISPOT

Die für den ELISPOT gewonnenen PBMC wurden nach der Zellzählung in FCS + 10% DMSO Einfriermedium aufgenommen, und anschließend nach langsamem Herunterkühlen bei -140°C bis zur Versuchsdurchführung aufbewahrt. Die Versuchsdurchführung erstreckte sich über drei Tage, wobei die ersten beiden Tage unter keimarmen Bedingungen durchgeführt werden mussten:

3.5.1 1.Tag

Zellaufbereitung

Die Proben wurden nach dem Auftauen sofort in RPMI übertragen. Die Menge an RPMI entspricht einem Vielfachen der Menge der zum Einfrieren genutzten FCS + 10% Lösung, um weitere Schädigung der Zellwände durch das Einfriermedium zu vermeiden. In RPMI-Medium auf einer 6-Well-Boden-Platte ausplattiert wurden die Zellen über Nacht im Inkubatorschrank zur Akklimatisation belassen.

Beschichtung

Um das später von den Zellen produzierte IP-10 auf der ELISPOT-Platte binden zu können, mussten pro Well je 50 μ l anti-IP-10 capturing Ab (Stammlsg.: 2,5 g/ ml, Verdünnung 1:200) auf eine 96 Well ELISPOT-Platte aufgebracht werden.

3.5.2 2.Tag

Ansetzen der IFN Stimulationsreihen

Die IFN Stimulationsreihen wurden in ihrer höchsten Konzentration so gewählt, dass eine Sättigung der IP-10 Stimulation eintrat. Anschließend wurden die weiteren Stimulationskonzentrationen durch Serienverdünnung wie folgt hergestellt (Tab.3.4,Tab.3.5):

IFN α : Stammlösung: 10g/ml

Zellart	IFN α (ng/ml)							
T-Lymphozyten	12,5	6,25	3,125	1,56	0,78	0,39	0,195	0
Monozyten	25	12,5	6,25	3,125	1,56	0,78	0,39	0

Tabelle 3.4: IFN α -Stimulationsreihen im ELISPOT

IFN γ : Stammlösung: 20g/ml

	Konzentration (ng/ml)							
IFN γ (ng/ml)	10	3	1	0,3	0,1	0,03	0,01	0

Tabelle 3.5: IFN γ -Stimulationsreihe im ELISPOT

IFN γ +IFN α Co-Stimulation

Die IFN γ Stimulationsreihe wurde hierbei mit einer Basis-IFN α -Konzentration co-stimuliert. Hierzu wurde zunächst eine 0,78 ng/ml IFN α Verdünnung in RPMI hergestellt, die dann als Grundlage zur Herstellung der IFN γ Stimulationsreihe diente. Es wurden die gleichen Konzentrationen des IFN γ eingesetzt wie in der Stimulationsreihe des IFN γ ohne die Zugabe von IFN α (s.o.).

Bearbeitung der Zellen

Die Zellen wurden in frisches RPMI-Medium aufgenommen, gezählt, und dann ein 50 μ l Aliquot wie folgt zur FACS-basierten Charakterisierung gefärbt (Tab.3.6):

Zellsuspension 1	Zellsuspension 2
CD14-FITC	CD14-FITC
CD19-PE	CD58-PE(=LFA-3)
CD3-PerCP-Cy 5.5	CD54-biot.-SA-PerCP-Cy5.5(=I-CAM)
HLA DR-APC	HLA DR-APC

Tabelle 3.6: FACS-Farbstoffe im ELISPOT

Mittels dieser Farbkombination ließen sich sowohl Aussagen über die Anteile der verschiedenen Subpopulationen an den bearbeiteten PBMC als auch über ihren Aktivierungsgrad machen.

Anschließend wurde die Zellsuspension in 100 μ l RPMI mit je 4 μ l anti-human-CD14-FITC und anti-human-CD3-PE für 10min bei 4°C inkubiert. Nach einem Waschschrift folgte die Inkubation mit 30 μ l anti-FITC-micro-beads über 15min. Der nicht gebundene AK wurde wiederum abgewaschen, das Zellpellet in 1 ml RPMI aufgenommen und auf eine equilibrierte LS Trennsäule in einem Magnetfeld adsorbiert.

In der Trennsäule fand so eine Selektion durch die Magnetwirkung statt. Die Zellen, die zuvor mit spezifische Zellmarker gekoppelte micro-beads markiert worden waren, wurden in der Säule gebunden. Alle Zellen, die diesen spezifischen Marker nicht besaßen, wurden mit dem Medium durch die Säule hindurch gespült. Um die Zellausbeute der Zellen und die Sauberkeit der Trennung zu erhöhen, musste mit mehreren Millilitern RPMI nachgewaschen werden, dabei einmal revers.

Der entstehende Überstand wurde abgenommen und zu der CD14- Fraktion hinzugefügt. Die gesamte hier gewonnene CD14- Zellfraktion wurde getrennt von der - nach Entnahme aus dem Magneten - durch abermaliges Waschen gewonnene CD14+ Zellfraktion weiterverarbeitet: Nach 15min Inkubation der CD14- Zellen mit 30 μ l anti-PE-micro-beads wurde das gewaschene Zellpellet ebenfalls in 1ml Medium aufgenommen, und der Vorgang der Zelltrennung wiederholt.

Die hierbei getrennten Zellfraktionen bestanden aus CD14-+CD3- Zellen bzw. CD3+ Zellen. Die so erreichte Herauslösung von CD14+ und CD3+ aus den PBMC bot nun die Möglichkeit, die zelltypspezifische IP-10 Produktion nach IFN-Stimulation zu messen. Die Bestimmung der Reinheit der gewonnen Zellfraktionen erfolgte durch FACS Messung, was eine Beurteilung der Ergebnisse bezogen auf die für die Subpopulation spezifische IP-10 Sezernierung zuließ. Der im FACS ermittelte prozentuale Reinheitsgrad wurde als Korrekturfaktor bei der Auswertung eingesetzt.

Bearbeitung der gecoateten ELISPOT-Platte

Der nicht an die Plattenoberfläche gebundene Anteil des Capturing-AK wurde durch Absaugen und einmaliges Waschen mit PBS von der ELISPOT-Platte entfernt. Anschließend

wurden jeweils 100 μ l Zellverdünnung (final: 3×10^4 Zellen/ Well) und 100 μ l Interferonverdünnung aufgetragen. Die Inkubation erfolgte über 22h bei 37°C.

3.5.3 3.Tag

Die Zellsuspension wurde nach 22h Stimulation durch IFN α / IFN γ / IFN γ +IFN α durch dreimaliges Abwaschen mit PBS von der Platte entfernt. Um nun die produzierte Menge an IP-10 zu erfassen, wurde ein AK-Fluoreszenz-System angewendet: An das auf der Platte gebundene IP-10 band einen - im Überschuss aufgetragener - biotinierter anti-IP-10-AK während 1h30. Anschließend wurde über 30min der biotinierte Anteil dem Enzym SA-AP - wieder im Überschuss aufgetragen - zur Bindung angeboten. Die Alkalische Phosphatase (=AP) wiederum setzte den Farbstoff BCIP/NBT chemiekaalisch so um, dass anhand des gebundenen Farbstoffes die von den PBMC durch IFN-Stimulation hervorgerufene Menge an IP-10 quantifiziert werden konnte. Die Bindungsorte von IP-10 auf der ELISPOT-Platte wurden so als 0,01-0.1mm große Punkte (= Spots) sichtbar gemacht. Diese wurden unter dem Mikroskop ausgezählt.

3.6 Intrazellulären IP-10 FACS-Messung

Für diese Versuchsreihe mussten die PBMC direkt nach der Gewinnung weiterverarbeitet werden. Die Versuchsdurchführung erstreckte sich auf zwei Tage, wobei der erste unter keimarmen Bedingungen durchgeführt wurde:

3.6.1 1.Tag

Ansetzen der Interferon-Verdünnungsreihen

Auch bei der Methode der intrazellulären Messung des IP-10 wurde eine Konzentration des Interferons gewählt, die zu einer maximal möglichen Stimulation der Zellen führte. Die IFN Konzentrationen zur Stimulation wählten wir wie folgt (Tab.3.7):

IFN α : Stammlösung: 10g/ml

IFN γ : Stammlösung: 25g/ml

IFN	Konzentration (ng/ml)							
IFN α	50	25	12,5	6,85	3,145	1,56	0,78	0
IFN γ	30	10	3	1	0,3	0,1	0,01	0

Tabelle 3.7: IFN α -/IFN γ -Stimulationsreihe des intrazellulären IP-10 FACS

Die IFN-Konzentrationsstufen wurden durch Verdünnung der höchsten Konzentrationsstufe gewonnen.

Bearbeitung der Zellen

Die präparierten PBMC wurden bei diesem Versuch direkt weiterverarbeitet, um eventuelle Schädigungen der Zellwand durch den Einfriervorgang und die Lagerung bei -140°C zu vermeiden. Nach der Präparation, die nach Kap.3.2. erfolgte, wurden 3×10^5 Zellen in $10\mu\text{l}$ RPMI pro Well vorgelegt, und mit den oben angegebenen Konzentrationsstufen von IFN stimuliert. Da bei diesem Versuch die produzierte Menge IP-10 intrazellulär gemessen werden sollte, musste seine Exozytose mittels Monesin (= Golgi-Stop) unterdrückt werden. Mit einer Latenzzeit von 8h nach Stimulationsbeginn wurden aus einer Verdünnung Monesin : RPMI = 1:1500 $20\mu\text{l}$ / Well aufgetragen und die Zellen anschließend weitere 14h im Inkubatorschrank belassen.

3.6.2 2.Tag

Nach der Zentrifugation der Flachbodenplatte wurde das überstehende Nährmedium mit einer Mehrkanalpipette abgenommen und die Zellen nach einem Waschschrift mit PBS mit Trypsin-EDTA vom Boden der Mikrotiterplatte gelöst, um anschließend auf eine Rundbodenplatte übertragen zu werden. Auf dieser ließ sich eine verbesserte Konzentration der Zellen am Well-Boden erreichen, so dass die Markierung der Zellen zum anschließenden FACS mittels CD14-FICS, CD3-PerCP und CD19-PE (wie oben beschrieben) zuverlässiger stattfinden konnte. Für 3×10^5 Zellen wurden $1\mu\text{l}$ pro AK eingesetzt. Die Inkubation erfolgte bei 4°C über 18min. Die nicht gebundenen AK wurden mit FACS-Puffer entfernt. Zur Markierung des intrazellulären IP-10 musste zunächst die Zellwand mit $70\mu\text{l}$ / Well Cytifix/ Cytoperm permeiert werden, um nach einem Waschschrift mit Perm/ Wash den PE markierten IP-10-AK einbringen zu können. Als Negativkontrolle wurde ein unspezifisch bindender Isotyp-AK mitgeführt. Die für die IP-10-AK bzw. für die Isotyp-Kontrolle geeignete Konzentration lag bei $0,6\mu\text{l}$ (je $0,2\text{mg/ml}$) für 3×10^6 Zellen. Nach 30min Inkubationszeit des AK bzw. der Isotyp-Kontrolle und zweimaligem Auswaschen nicht gebundener AK aus den Zellen, wurde die CD-Färbung im FACS gemessen.

Antikörper und Kompensationseinstellungen

Die Markierung von CD3, CD14 und CD19 diente der Identifizierung der IP-10 produzierenden Zellen als Monozyten, T- oder B- Lymphozyten. Über die Besetzung einer Zelloberfläche mit HLA lassen sich Aussagen über den Aktivierungsgrad der Zelle treffen. Der vierte FACS Kanal war mit dem Farbstoff PE belegt, der als Indikator für das IP-10 diente (Tab.3.8). Als Negativkontrolle wurde ein unspezifisch bindender Isotyp eingesetzt.

AK/ Farbstoff	Menge	Inkubationszeit
anti-CD14-FITC	$1\mu\text{l}$ / 3×10^5 Zellen	15min
anti-CD3-PerCP-Cy 5.5	$1\mu\text{l}$ / 3×10^5 Zellen	15min

AK/ Farbstoff	Menge	Inkubationszeit
anti-HLA DR-APC	1 μ l/ 3×10^5 Zellen	15min
anti-IP-10-PE	0,6 μ l/ 3×10^5 Zellen	30min
Isotyp Control-PE	0,6 μ l/ 3×10^5 Zellen	30min

Tabelle 3.8: Farbsubstrate der FACS Färbung

Auswertung

Die Messung erfolgt im Vierkanal-FACS. Anschließend erfolgt die Zuordnung des IP-10 Fluoreszenz zu den unterschiedlichen Zellpopulationen der PBMC. Ausdruck der IP-10 Produktion ist hierbei die mediane Fluoreszenz.

3.7 Methode des IP-10 ELISA

In dieser Versuchsreihe wurden PBMC verwendet, die nach 2.2. aufbereitet, und sofort im Versuch eingesetzt wurden. Die Versuchsdurchführung erstreckte sich auf zwei Tage, wobei der erste unter keimarmen Bedingungen durchgeführt werden musste:

3.7.1 1.Tag

Ansetzen der Interferon-Verdünnungsreihen

IFN α : Stammlösung: 10g/ml

IFN γ : Stammlösung: 20g/ml

Als weitere Konzentrationsstufen wurden gewählt:

IFN	Konzentration (ng/ml)							
IFN α	300	100	30	10	3	1	0,3	0
IFN γ	1000	300	100	30	10	3	1	0

Tabelle 3.9: IFN α -/IFN γ -Stimulationsreihe im ELISA

Bearbeitung der Zellen

Nach der Präparation der PBMC nach Kap.3.2. wurden aus 10ml Zellsuspension in RPMI pro Proband 50 μ l entnommen und zur Typisierung der enthaltenen Zellen für das FACS mittels fluorochrom-markierter Ak wie folgt gefärbt: CD14-FITC, CD19-PE, CD3-PerCP, HLA-DR-APC. Für 50 μ l Zellsuspension wurden von jeder AK-Farbstoff-Kombination 2 μ l benötigt. Die Zellen wurden parallel mit allen AK 10min bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation und Entfernung der nicht gebundenen AK, wurde im FACS die prozentuale Zusammensetzung der PBMC aus den einzelnen Zellsubtypen bestimmt. Die verbliebenen Zellen

wurden ausgezählt, auf 5×10^5 Zellen/ 100 μ l verdünnt und anschließend aufgeteilt:

- Fraktion 1: 2 μ l anti-IFN α / ml Zellsuspension und daraus 100 μ l/ Well zur Zellsuspension der IFN γ Stimulationsreihe
- Fraktion 2: 2 μ l anti-IFN γ / ml Zellsuspension und daraus 100 μ l/Well auf die Zellsuspension IFN α Stimulationsreihe

Die Stimulation der Zellen erfolgte über 22h im Inkubatorschrank.

Beschichtung der ELISA-Platte

Auf einer ELISA-Platte wurde die benötigte Anzahl an Wells mit 50 μ l/ Well Mouse Anti-human-IP-10 beschichtet (Konz. IP-10 = 0,9 mg/ ml in einer Verdünnung von 1:200 in PBS). Dieser AK wurde über Nacht zur Bindung auf dem Plattenboden belassen.

3.7.2 2.Tag

Ansetzen der IP-10 Standard-Verdünnungsreihe

Die von den Zellen produzierte IP-10 Menge wurde anhand einer Eichkurve bestimmt, die durch eine Verdünnungsreihe mit bekannten IP-10 Konzentrationen ermittelt wurde. Zur Herstellung dieser Verdünnungsreihe wurde ähnlich vorgegangen wie bei den IFN-Verdünnungsreihen (Tab.3.10):

Stammlösung: 25g/ml

Aus der Verdünnung der Stammlösung im Verhältnis 1:250 mit PSA/PBS wurden durch Reihenverdünnung folgende Konzentrationsstufen hergestellt:

	Konzentration (ng/ml)							
IP-10	100	70	30	10	5	1	0,1	0

Tabelle 3.10: Konzentrationen der IP-10 Standard-Verdünnungsreihe im ELISA

Diese Verdünnungsreihe wurde in ausreichender Menge hergestellt, so dass während der gesamten Versuchsreihe mit derselben Standardreihe gearbeitet und der systemische Fehler dadurch gering gehalten werden konnte. Bis zu ihrer Verwendung wurden die angesetzten Standard-Verdünnungsreihen in einzelnen Aliquots schockgefroren und bei -70°C gelagert.

Bearbeitung der gecoateten ELISA-Platte

Von der am Vortag mit IP-10-AK becoateten ELISA-Platte wurde zunächst der nicht am Boden der Platte gebundene AK mit PBS abgewaschen. Nun wurden dem Überstand der

3 Material und Methoden

Zellsuspension jeweils $50\mu\text{l}$ / Well entnommen und diese auf ELISA Platte übertragen. In den Well-Reihen der beiden höchsten IFN-Stimulationen musste der Überstand im Verhältnis Zellüberstand : RPMI = 2:1 verdünnt werden, da die enthaltenen IP-10 Konzentrationen durch eine zu starke Färbung sonst nicht mehr zuverlässig im ELISA-Gerät gemessen werden konnten. Vor der Übertragung wurden deshalb $20\mu\text{l}$ RPMI/ Well vorgelegt und schließlich $30\mu\text{l}$ / Well des jeweiligen Zellüberstandes hinzugefügt. Der Verdünnungsfaktor wurde bei der späteren Berechnung der IP-10 Absolutwerte beachtet. Auf jede ELISA-Platte wurde neben die Reihen der durch die Zellen produzierten IP-10 Konzentrationen eine Doppelreihe der Standard-IP-10-Verdünnung aufgetragen. Außerdem wurde das entsprechende Probandenserum aufgetaut und auf die ELISA-Platte gebracht, um so die IP-10-Produktion der Zellen *in vivo* zu bestimmen, und eine Abschätzung des Aktivierungsgrades vorzunehmen.

Nach einer Inkubationszeit von 2h30 bei Raumtemperatur wurde die Flüssigkeit von der ELISA-Platte entfernt, gründlich mit Waschpuffer abgespült und nachfolgend wurden $50\mu\text{l}$ / Well eines biotinierten IP-10 AK aufgebracht. Dessen nicht an IP-10 gebundener Anteil wurde nach einer Inkubation von 1h30 bei Raumtemperatur abermals mit Waschpuffer gründlich entfernt. Mittels in Folge aufgetragenem AP-SA, welches 30min belassen und danach ebenfalls entfernt wurde, wurde bei dem Farbstoff pNPP ($50\mu\text{l}$ / Well) nach 60min Inkubation bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss ein Farbumschlag hervorgerufen, der im ELISA-Gerät quantifiziert wurde.

4 Ergebnisse

4.1 Pilotexperimente

In Vorversuchen wurde zunächst die IP-10 Sezernierung der einzelnen Zellpopulationen in peripheren mononukleären Zellen (PBMC) charakterisiert. Es zeigte sich, dass im ELISPOT Assay die spontane IP-10 Sezernierung der unfractionierten PBMC zu einer starken Hintergrundfärbung führte, die eine genaue Auszählung der Punkte unmöglich machte. Wurden die T- und B-Lymphozyten allerdings mittels magnetaktivierter Zellsortierung (MACS) von der Monozytenfraktion getrennt, so entstand nach Stimulation keine Hintergrundfärbung, so dass eine genaue Auszählung der Punkte auf der ELISPOT Platte möglich war. Bei der Monozytenfraktion trat allerdings weiterhin eine Hintergrundfärbung auf, die mit steigender IFN-Konzentration an Intensität zunahm. Die Zellfraktionierung zeigte, dass sowohl T-Lymphozyten, als auch Monozyten spontan IP-10 sezernieren. Hingegen produzierten B-Lymphozyten spontan kein IP-10 und auf die IFN-Stimulation hin weniger IP-10 als T-Lymphozyten oder Monozyten. Aus diesen Gründen wurden B-Lymphozyten in den nachfolgenden Versuchen nicht eingesetzt. Ein weiteres, wesentliches Ergebnis der Vorversuche zur Etablierung des IP-10 ELISPOT war, dass sich die PBMC, die zuvor bei -70°C gelagert waren, nach dem Auftauen gar nicht oder nur in geringem Maß zur IP-10 Sezernierung stimulieren ließen. Diese Beobachtung wurde auch durch Vorversuche zum IP-10 Elisa bestätigt: Schon nach 4h Lagerung der frisch präparierten PBMC auf Eis sezernierten die Zellen nach Stimulation kein IP-10 mehr. Dieser Befund war von erheblicher Konsequenz für die geplante Anwendung des Assays als Screening Methode für die IFN-Sensitivität, da entsprechend Probandenmaterial nicht im Vorhinein für eine spätere Durchführung des Assays asserviert werden kann.

4.2 IP-10 ELISPOT

Da bisher keine Daten über eine etwaige inhomogene IP-10 Sezernierung in Monozyten-Subpopulationen bzw. T- oder B-Lymphozyten vorliegen, wurde zunächst der ELISPOT Assay ausgewählt, da - im Gegensatz zum ELISA - hier die Anzahl und somit die Frequenz der produzierenden Zellen gemessen werden kann. Im Folgenden werden die Versuchsbedingungen dargestellt, bei denen IP-10, sezerniert von den verschiedenen Subpopulationen der PBMC, als Spot auf einer ELISPOT Platte sichtbar wurde und eine optimale Auswertung

möglich war. Des Weiteren werden die funktionellen Ergebnisse der Versuchsreihe des IP-10 ELISPOT an Psoriasispatienten dargestellt.

4.2.1 Etablierung und Optimierung des IP-10 ELISPOT-Assays

Immunmagnetische Zellfraktionierung

Die PBMC wurden zunächst mittels MACS (s. 3.5.2) in ihre Subpopulationen getrennt. Zur Beurteilung der Reinheit dieser Trennung in die einzelnen Zellfraktionen erfolgte eine Färbung mit Markern, die eine anschließende Identifizierung der einzelnen Zellen im FACS ermöglichte.

Antikörper und Farbsubstrate

Im Versuchsablauf wurden die Zellen zu mehreren Zeitpunkten mit Ak markiert. Die folgenden Ak-Mengen und Inkubationszeiten zur Ak-Bindung wurden als optimal ermittelt (Tab.4.1):

	Menge	Inkubationszeit
FACS Detektion	2 μ l/ 50 μ l	10min
MACS Separation		
FITC/PE-AK	4 μ l/ 100 μ l	10min
anti-FITC/PE-micro beads	30 μ l/ 100 μ l	15min

Tabelle 4.1: AK der FACS Färbung im ELISPOT. Zu den im Einzelnen verwendeten Fluoreszenz-markierten Primärantikörper s. Methoden (Abschnitt 3.5.2)

IFN Konzentrationen

Für die ELISPOT Versuche wurden die fraktionierten Monozyten sowie die T-Lymphozyten eingesetzt. Eine Konzentration von jeweils 3×10^4 Zellen/ Well stellte sich im ELISPOT als ideal heraus. Zur Stimulation der PBMC-Subpopulationen wurde als höchste Konzentration die Menge an IFN gewählt, die eindeutig zu einer Sättigung der IP-10 Produktion führte. Dies war bei der Stimulation mit IFN α bei 25ng/ml der Fall. Bei IFN γ trat die Sättigung bei 10ng/ml auf (Abb.4.1).

Zur weiteren Charakterisierung der IP-10 Produktion wurden IFN Konzentrationen eingesetzt, die den Bereich einer sigmoiden Dosis-Wirkungskurve der IP-10 Sezernierung unter IFN-Stimulation optimal abdeckten. Da die T-Lymphozyten schon bei IFN α 12,5ng/ml eine Sättigungskinetik zeigten, wurde diese Konzentration als höchste zur Stimulation der T-Lymphozyten verwendet und eine weitere Stimulationsstufe von 0,195ng/ml im unteren Bereich hinzugefügt. Es zeigte sich, dass eine basale Stimulation von IFN α 0,78ng/ml einen co-stimulatorischen Effekt auf PBMC hat, die durch IFN γ in den oben angegebenen Konzentrationen stimuliert wurden.

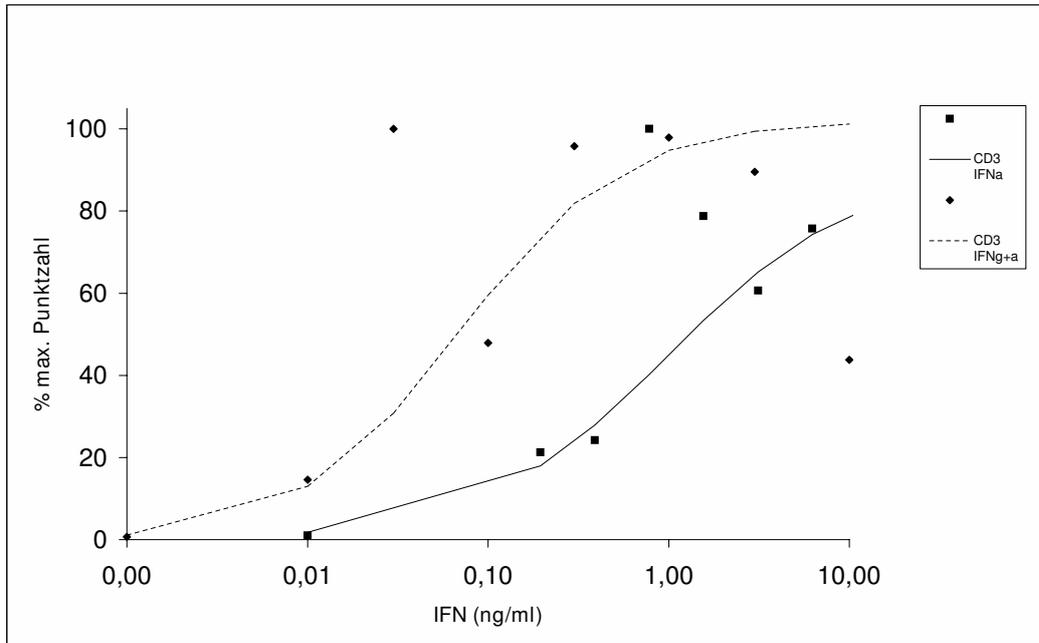


Abbildung 4.1: Dosis-Wirkungskurve der durch IFN induzierten Punktzahlen auf der ELISPOT Platte. Beispielhaft dargestellt ist die Reaktion der CD3+ T-Lymphozyten eines Probanden auf die Stimulation mit IFN α bzw. IFN γ + 0,78ng IFN α /ml in den acht verschiedenen Konzentrationenstufen. Die Punkte sind als Prozent der maximalen Punktzahl angegeben.

4.2.2 funktionelle Ergebnisse

IFN α und IFN γ stimulierten die IP-10 Sezernierung der Monozyten (CD14+), T-Lymphozyten (CD3+) und B-Lymphozyten (CD19+). Die Subpopulationen reagierten dabei mit einer unterschiedlich hohen Punktzahl auf die Stimulation durch IFN. Während die Reaktion der CD19+ B-Zellen so schwach war, dass kaum Punkte auf der Platte gezählt werden konnten, sezernierten die CD14+ Monozyten und die CD3+ T-Lymphozyten stärker das Effektorprotein IP-10. Allgemein konnte festgestellt werden, dass bei allen Subpopulationen die IP-10 Sezernierung nach IFN γ Stimulus stärker ist als nach IFN α Stimulation. Die Punktzahl auf der ELISPOT Platte war dementsprechend höher (Abb.4.2).

Die CD3+ T-Lymphozyten zeigten weniger Punkte auf der ELISPOT Platte als die der CD14+ Monozyten (Abb.4.2). Vergleicht man weiterhin die T-Lymphozyten mit den Monozyten, so zeigt sich bei den T-Lymphozyten eine 2,4 fach geringere Anzahl an Punkten auf der ELISPOT Platte pro $\times 10^4$ eingesetzter Zellen unter IFN α und IFN γ Stimulation als bei den Monozyten (Abb.4.3).

Co-Stimulation der IFN γ -Stimulationsreihe mit IFN α

IFN α kann die Freisetzung von IFN γ und die IP-10 Sezernierung bei PBMC beeinflussen. Um diesen autokrinen Effekt durch IFN α genauer zu definieren, wurde eine Versuchsreihe durchgeführt, bei der zu der IFN γ -Stimulationsreihe basal soviel IFN α hinzugefügt wurde, dass die eigentliche, biologische autokrine IFN α Stimulation nicht mehr ins Gewicht fiel.

4 Ergebnisse

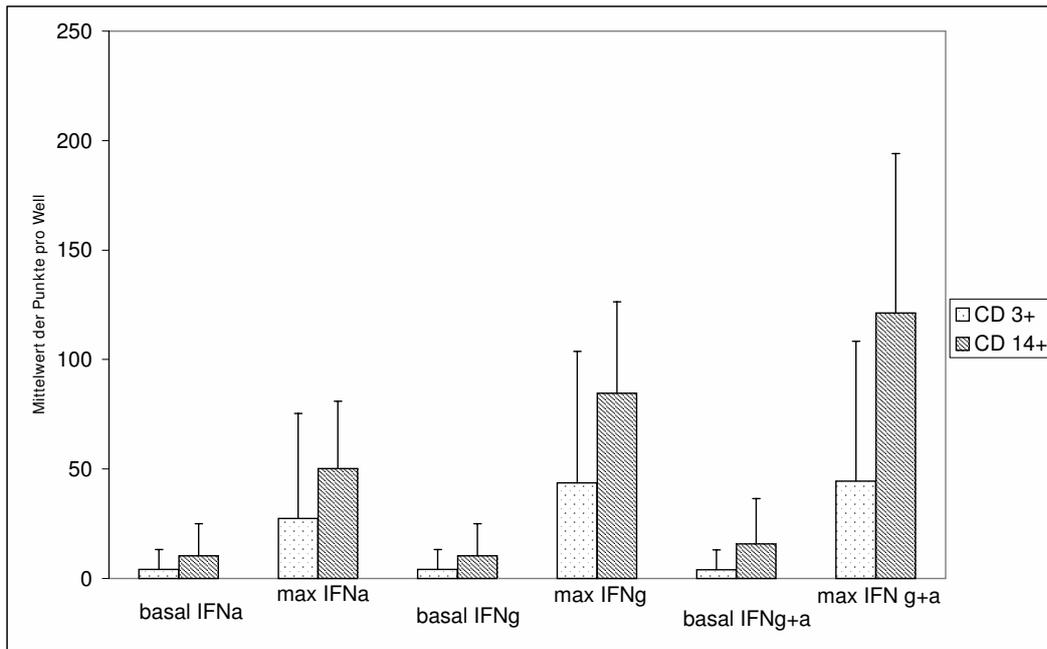


Abbildung 4.2: Anzahl der IP-10 Punkte durch Stimulation mit IFN bei CD3+ T-Lymphozyten und CD14+ Monozyten. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert und Standardabweichung der gezählten Punkte pro Well von 6 Probanden.

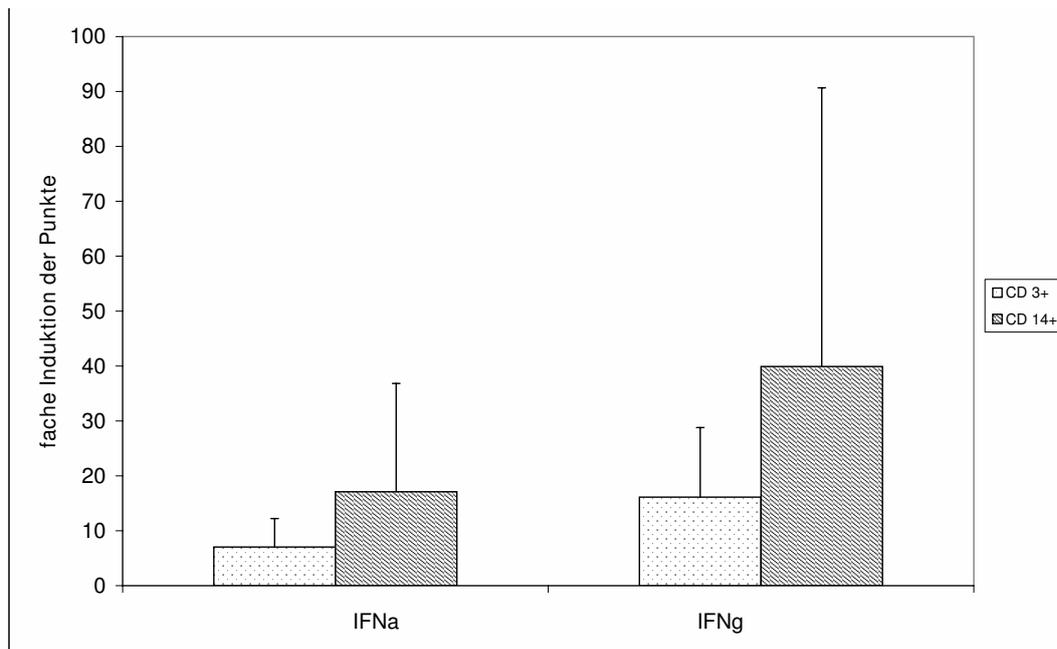


Abbildung 4.3: Steigerung der Punkt-Zahl pro Well in CD3+ T-Lymphozyten und CD 14+ Monozyten durch Stimulation mit IFN α und IFN γ (Mittelwert von 6 Probanden).

Anschließend wurden die Ergebnisse dieser co-stimulierten Zellen mit den Ergebnissen der mit monostimulierten Zellreihen verglichen. So konnte der Effekt unter reproduzierbaren Versuchsbedingungen beobachtet werden. Starke Unterschiede waren in der Reaktion der CD14+ Monozyten auf die Co-Stimulation zu beobachten (Abb. 4.4.): Die Punktzahlen steigerten sich bei Co-Stimulation um 50%, obgleich diese Steigerung formal statistisch nicht

4 Ergebnisse

signifikant war. Bei den T-Lymphozyten war hingegen kein Effekt durch die Co-Stimulation zu beobachten.

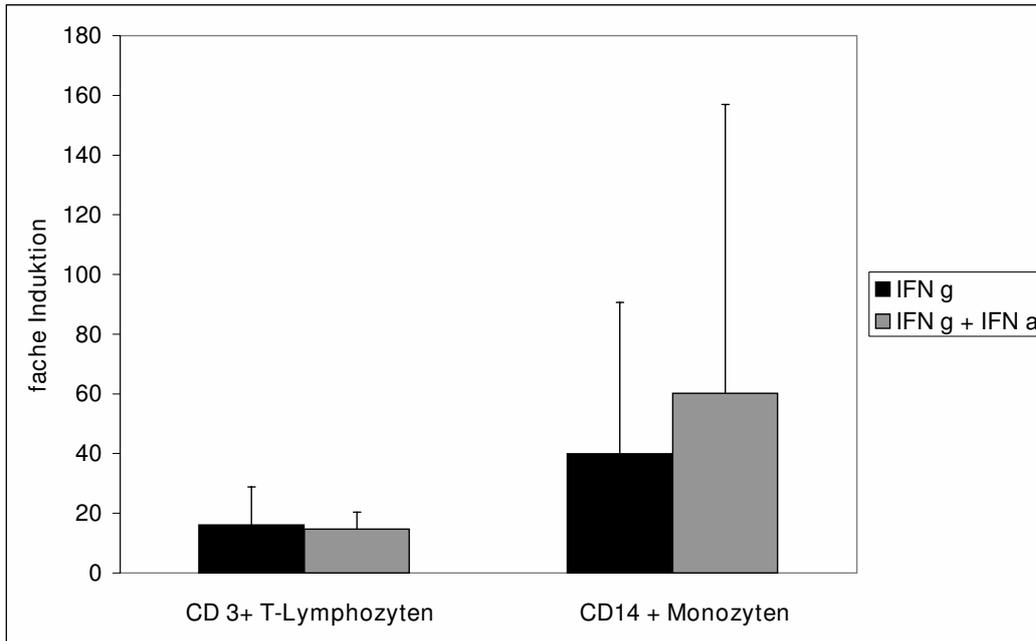


Abbildung 4.4: Vervielfachung der basalen Anzahl der Punkte auf der ELISPOT Platte nach $\text{IFN}\gamma$ und nach $\text{IFN}\gamma + \text{IFN}\alpha$ Stimulation. Das Diagramm zeigt die gemittelte Vervielfachung der IFN induzierten IP-10 Sezernierung von 6 Probanden (bzw. 3 Probanden bei der Stimulation der CD14+ Monozyten durch $\text{IFN}\gamma + \text{IFN}\alpha$).

4.2.3 Gesamtauswertung

In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse der IFN -Stimulation bei den einzelnen Probanden im ELISPOT Assay zusammengefasst (Tab 4.2):

4 Ergebnisse

Proband	CD 3+ Zellen				CD 14+ Zellen			
	basal	max	fache Ind*	EC50	basal	max	fache Ind*	EC50
	IFNα (Punkte/10⁴ Zellen)							
RESW	1,8	5	2,7	0,9	10,1	27	2,7	0,5
DOMR	1	12	12	0,3	8	38	4,8	0,7
STKE	0	9	n.d.	3,3	0	53	n.d.	2
HODW	22,5	125	5,5	1,2	39,2	109	2,8	0,2
CHPZ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1	26	n.d.	7
ANKZ	0	13	n.d.	1,3	3,6	48	13,3	2
mean	5,1	32,8	6,7	1,4	10,3	50,2	5,9	2,1
SD %	9,8	51,6	4,8	1,1	14,7	30,8	5	2,5
	IFNγ (Punkte/10⁴ Zellen)							
RESW	1,8	19	10,5	0,01	10,1	28	2,8	0,03
DOMR	1	22	22	0,06	8	74	9,3	0,02
STKE	0	13	n.d.	0,04	0	93	n.d.	0,11
HODW	22,5	164	7,3	0,01	39,2	143	3,6	0,01
CHPZ	0	5	n.d.	0,06	1	116	116	0,28
ANKZ	0	39	n.d.	0,24	3,6	54	14,8	0,11
mean	4,2	43,7	13,3	0,07	10,3	84,7	29,3	0,09
SD %	9	60	7,7	0,09	14,7	41,8	48,7	0,1
	IFNγ+IFNα (Punkte/10⁴ Zellen)							
RESW	1,8	28	15,3	0,02	-	-	-	-
DOMR	0	23	23	0,02	8	38	4,7	0,03
STKE	0	13	13	0,02	0	172	n.d.	0,12
HODW	22,5	174	7,7	0,03	39,2	154	3,9	0,01
CHPZ	0	10	n.d.	0,11	-	-	-	-
ANKZ	0	19	n.d.	0,07	-	-	-	-
mean	4,1	44,5	14,8	0,05	15,7	121,3	4,3	0,05
SD %	9,1	63,8	6,4	0,04	20,7	72,7	0,6	0,06

Tabelle 4.2: Gesamtauswertung der Ergebnisse des ELISPOT Versuches. Die Daten der einzelnen Probanden entsprechen den Mittelwerten von drei unabhängigen Versuchen an unterschiedlichen Tagen. (-) = es waren nicht ausreichend Zellen zur Versuchsdurchführung vorhanden, n.d. = nicht detektiert = keine Punkte auf der ELISPOT Platte, *= nur Werte gemittelt bei Probanden mit basal detektierter Aktivität.

Deutlich ist, dass die Sensitivität gegenüber $\text{IFN}\gamma$ sowohl bei Monozyten, als auch bei den T-Lymphozyten ca. 20fach höher ist als gegenüber $\text{IFN}\alpha$, wobei beide Zelltypen eine vergleichbare Sensitivität gegenüber beiden IFN aufweisen. Weiterhin fällt eine hohe interindividuelle Variabilität der basalen Sezernierungsrate auf. Schließlich ist die Anzahl der IP-10 produzierenden Zellen etwa 2-3fach höher bei Monozyten als bei den T-Lymphozyten. Interessanterweise beträgt die Frequenz der IP-10 produzierenden Zellen, bezogen auf die ausplattierten Zellen, weniger als 2%.

4.3 Intrazelluläre IP-10 FACS-Färbung

Die semiquantitative Messung der IP-10 Produktion durch PBMC im ELISPOT stellte sich bezüglich der Messung des produzierten IP-10 als Effektorprotein als zu ungenau heraus. Dies war zum einen auf die manuelle Auszählung der Spots mit den Schwierigkeiten der Hintergrundfärbung, zum anderen auf die im Versuchsablauf notwendige starke mechanische Belastung der Zellen bei der Sortierung und beim Versuchseinsatz zurück zu führen. Aus Gründen der exakten, reproduzierbaren Auswertung und der Vielfalt der aus einer FACS-Auswertung zu ziehenden Ergebnisse, bot sich alternativ die intrazelluläre Messung des IP-10 im FACS an. Hierbei wurde die Zellwand zunächst permeabilisiert und durch Einbringen eines markierten IP-10 AK die intrazellulär produzierte Menge von IP-10 im FACS gemessen. Gleichzeitig konnte durch CD3, CD14, CD19 Färbung in paralleler Messung der Einzelpopulationen eine Zuordnung des produzierten IP-10 zu den Zellgruppen erfolgen. Eine Fraktionierung der Zellpopulationen war also nicht mehr nötig. Des Weiteren konnten durch entsprechende Färbung der Aktivierungsstatus auch eventuell IP-10 sezernierenden Subpopulationen erfasst werden.

4.3.1 Etablierung des intrazellulären IP-10 FACS

Zellen und Zelldichte

Zur intrazellulären Messung des IP-10 im FACS wurden PBMC eingesetzt, die direkt vor Versuchsbeginn aus Vollblut gewonnen wurden. Nach der Präparation wurden 3×10^5 Zellen/ Well vorgelegt und mit IFN in den verschiedenen Konzentrationsstufen stimuliert. Eine FACS-Markierung der CD14+ Monozyten, der CD3+ T-Lymphozyten und der CD19+ B-Lymphozyten ermöglichte die Zuordnung des IP-10 zu den einzelnen Subpopulationen der PBMC. Es wurden wie beim ELISPOT die Konzentrationen an IFN gewählt, die eine komplette Bestimmung der konzentrationsabhängigen IFN-induzierten IP-10 Produktion ermöglichten. Die optimierten IFN-Konzentrationen und intrazellulären FACS Bedingungen sind im Methodenteil zusammengefasst (s.Kap.3.6.1). Das Vorhandensein von IP-10 drückte sich in diesem Versuch durch die Fluoreszenz in der FACS Messung aus. Die Menge des produzierten IP-10 wurde durch die Intensität der Fluoreszenz quantifiziert. Jedes markierte

IP-10 Molekül wurde im FACS als ein fluoreszierender Punkt identifiziert. Diese Methode war also in der Auswertung wesentlich genauer als der ELISPOT. Dies galt insbesondere unter starker IFN-Stimulation, bei der viel IP-10 produziert wurde. Im ELISPOT wurden nicht alle IP-10 Moleküle als einzelne Punkte erkannt. Deshalb konnte der falsche Eindruck entstehen, dass die maximale IP-10 Produktion schon unter einer geringeren IFN-Stimulation erreicht war. Diesbezüglich stellte sich im zuletzt durchgeführten ELISA heraus (Kap.3.7.1), dass hier die benötigte IFN-Stimulation zur maximalen IP-10 Produktion nochmals höher lag, was für die höhere Sensitivität dieses Testes spricht.

4.3.2 Funktionelle Ergebnisse

Die CD14+ Monozyten reagieren sensibler auf IFN γ - als auf IFN α -Stimulation. Dies zeigt sich zum einen in dem höheren maximal erreichten IP-10 Spiegel und zum anderen in der niedrigeren EC50 unter IFN γ Stimulation, die bei einer etwa 60-mal geringeren Konzentration des IFN γ erreicht wird als unter der Stimulation mit IFN α (Abb.4.5). Diese Ergebnisse entsprechen im Prinzip denen des ELISPOT, bei dem der Stimulus durch IFN γ ebenfalls stärkere Effekte auf die IP-10 Sezernierung hervorrief als der IFN α Stimulus (s. auch Abb. 4.2). Dieser Unterschied in der Reaktion auf IFN γ und IFN α Stimulation ist im intrazellulären IP-10 FACS noch deutlicher zu erkennen als im ELISPOT.

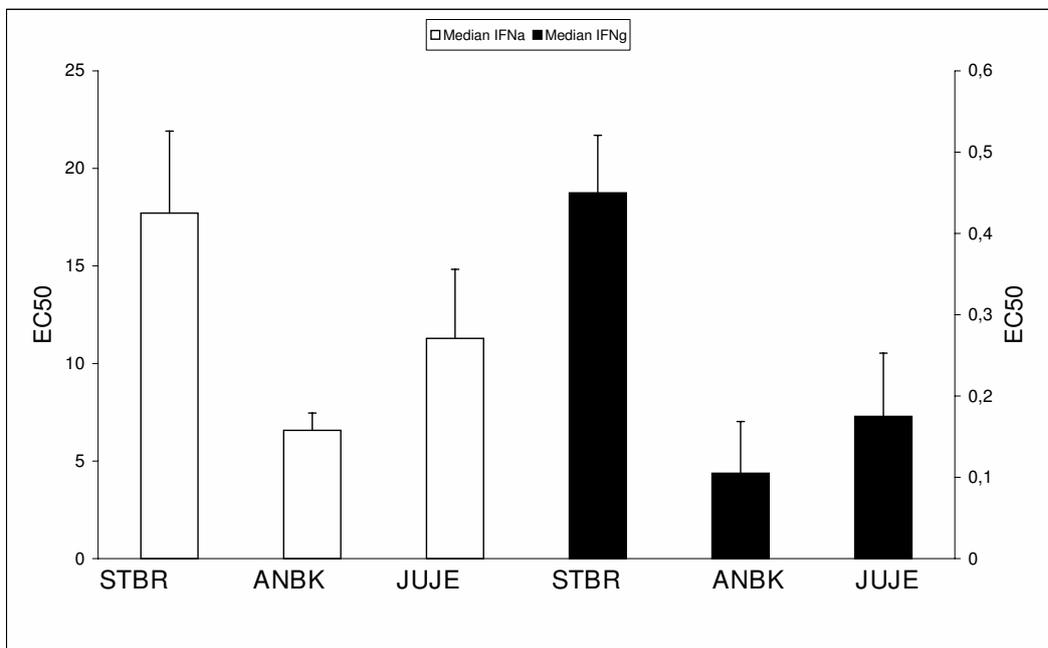


Abbildung 4.5: EC50 der IFN Konzentration als Mediane Fluoreszenz bei Stimulation von CD14+ Monozyten von drei gesunden Probanden (STBR, ANBK und JUJE) unter IFN α - und IFN γ -Stimulation. Der unterschiedliche Maßstab der beiden y-Achsen ist zu beachten. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von jeweils drei unterschiedlichen Messungen.

Nur maximal 0,6% aller CD3+ Zellen sezernieren IP-10. Die durch IFN-Stimulation der PBMC hervorgerufene IP-10 Sezernierung ist also fast ausschließlich auf CD14+ Monozy-

4 Ergebnisse

ten zurückzuführen. Wie schon im ELISPOT festzustellen, produzierten die CD14+ Zellen auch ohne Stimulation durch IFN IP-10. Die Steigerung, hervorgerufen durch die IFN α -/ γ -Stimulation, war bei den CD14+ am deutlichsten. Schon nach 10 ng/ml IFN γ produzierten nahezu 100% dieser Zellen IP-10. Dabei war kein Unterschied zwischen CD14+ Subpopulationen festzustellen, die sich in unterschiedlichen Aktivierungsstadien befanden: CD14 $_{low}$ und CD14 $_{high}$ produzierten in etwa gleich viel IP-10 (Abb 4.6).

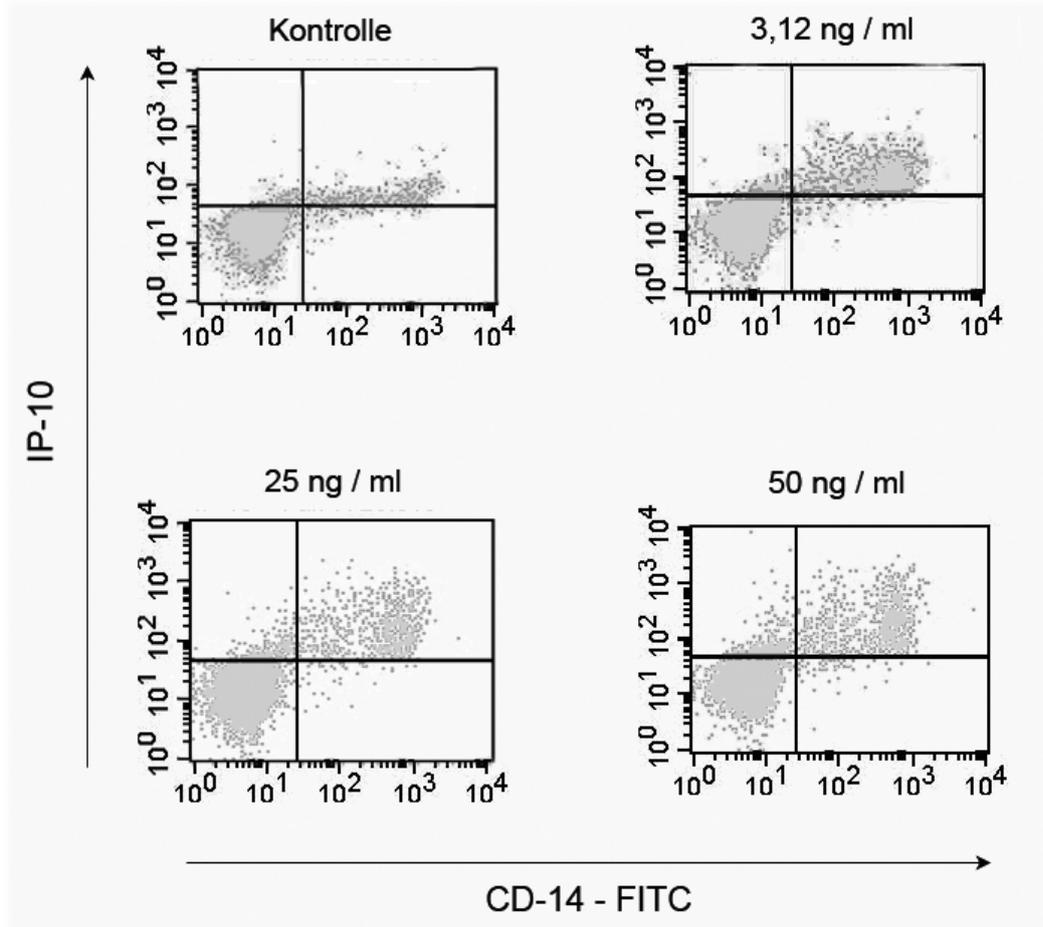


Abbildung 4.6: repräsentatives FACS Bilder hier der IFN α Stimulation (von oben links nach unten rechts IFN α Stimulation wie folgt: 0/ 3,125/ 25/ 50 ng/ml) mit gegateten Untergruppen. Gemessen wurde jeweils die Fluorescens der CD14-FITC Färbung, die mit der IP-10-PE Färbung in Beziehung gesetzt wurde.

Wie erwartet führte die IFN γ , jedoch nicht die IFN α Stimulation bei den Monozyten zu einer Induktion von MHC II (= HLA-DR; nicht dargestellt). MHC II zeigt den Aktivierungszustand der Zellen an. Zusammengenommen stehen die Ergebnisse des intrazellulären FACS Versuches im Einklang mit denen aus dem ELISPOT Versuch. Der ELISPOT ist insgesamt zur Messung der Interferonsensitivität weniger geeignet, da eventuelle Fehlerquellen zu zahlreich sind. Da wir im intrazellulären FACS Versuch feststellen konnten, dass alle Monozyten vergleichbar viel IP-10 produzieren und keine hoch produzierenden Untergruppen existieren, lässt sich entsprechend die IP-10 Sezernierung auch einfacher summarisch per ELISA messen.

4.4 IP-10 ELISA

Die Ergebnisse der intrazellulären Färbung zeigten, dass es keine Subpopulation von IP-10-produzierenden Zellen gibt, die stark oder weniger stark IP-10 sezernieren, weshalb ein ELISA, der die IP-10 Sezernierung summarisch erfasst, eingesetzt werden konnte. Zudem zeigten die Ergebnisse des ELISPOT und vor allem des intrazellulären IP-10 FACS, dass die IP-10 Sezernierung von Monozyten die von T- und B-Lymphozyten so stark übertrifft, dass die IP-10 Sezernierung in unfraktionierten PBMC durchgeführt werden kann und dann, nach vorheriger Quantifizierung der verwendeten Zellpopulation per FACS, die Menge an sezerniertem IP-10 pro Monozyt ermittelt werden kann. Der ELISA ist zudem einfach durchzuführen. In entsprechenden Vorversuchen stellte sich heraus, dass im Unterschied zum ELISPOT Assay im ELISA die IFN Konzentrationen zur maximalen Stimulation der Zellen bezüglich der IP-10 Produktion wesentlich höher lagen. Die optimierten Konzentrationen sind im Methodenteil aufgeführt (Kap.3.7.1.).

4.4.1 Wechselwirkungen von $IFN\alpha$ und $IFN\gamma$

Da die IP-10 Produktion sowohl durch $IFN\alpha$ und $IFN\gamma$ induziert werden kann, wurde mittels des ELISA zunächst systematisch untersucht, ob eine etwaige endogene Produktion von $IFN\gamma$ (z.B. durch T-Lymphozyten) bzw. $IFN\alpha$ die beobachteten EC_{50} Werte für die IFN-induzierte IP-10 Sezernierung beeinflusst. Zu diesem Zweck wurde eine Versuchsreihe mit neutralisierenden Antikörpern durchgeführt. Hierzu wurden pro $50\mu l$ Zellsuspension jeweils $2\mu l$ Antikörper gegen das nicht zur Stimulation verwendete IFN hinzugefügt.

Wurden während der $IFN\alpha$ Stimulation Antikörper gegen $IFN\gamma$ zu der Suspension hinzugefügt, dann ließ sich tatsächlich eine Parallelverschiebung der sigmoiden Kurve nach rechts gegenüber der Kurve feststellen, die sich durch alleinige $IFN\alpha$ Stimulation ergab (Abb. 4.7).

Aus dieser Parallelverschiebung der sigmoiden Kurve der $IFN\alpha$ Stimulation unter Zugabe von $IFN\gamma$ -AK nach rechts folgte, dass die EC_{50} der IP-10 Produktion unter $IFN\alpha$ Stimulation ohne $IFN\gamma$ -AK schneller erreicht wurde. Ein autokriner, positiver co-stimulatorischer Effekt durch $IFN\gamma$ während der $IFN\alpha$ Stimulation kann somit angenommen werden.

Im Gegensatz zu diesem Resultat verschob sich die Dosis-Wirkungs-Kurve der $IFN\gamma$ Stimulation unter Zugabe von $IFN\alpha$ -AK zur Zellsuspension nach links (Abb. 4.8). Die EC_{50} der IP-10 Produktion wurde unter $IFN\gamma$ Stimulation ohne $IFN\alpha$ -AK also schneller erreicht. Dies deutet auf das Vorhandensein eines negativen co-stimulatorischen (oder limitierenden) Effektes durch $IFN\alpha$ während der $IFN\gamma$ Stimulation hin.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass für die Bestimmung einer selektiven $IFN\alpha$ - oder $IFN\gamma$ -abhängigen IP-10 Sezernierung in PBMC der Einfluss des jeweils nicht betrachteten IFNs durch neutralisierende Antikörper eliminiert werden kann. Deshalb erfolgten alle ELISA Versuche unter Zugabe eines neutralisierenden Antikörpers gegen das jeweils nicht betrachtete IFN.

4 Ergebnisse

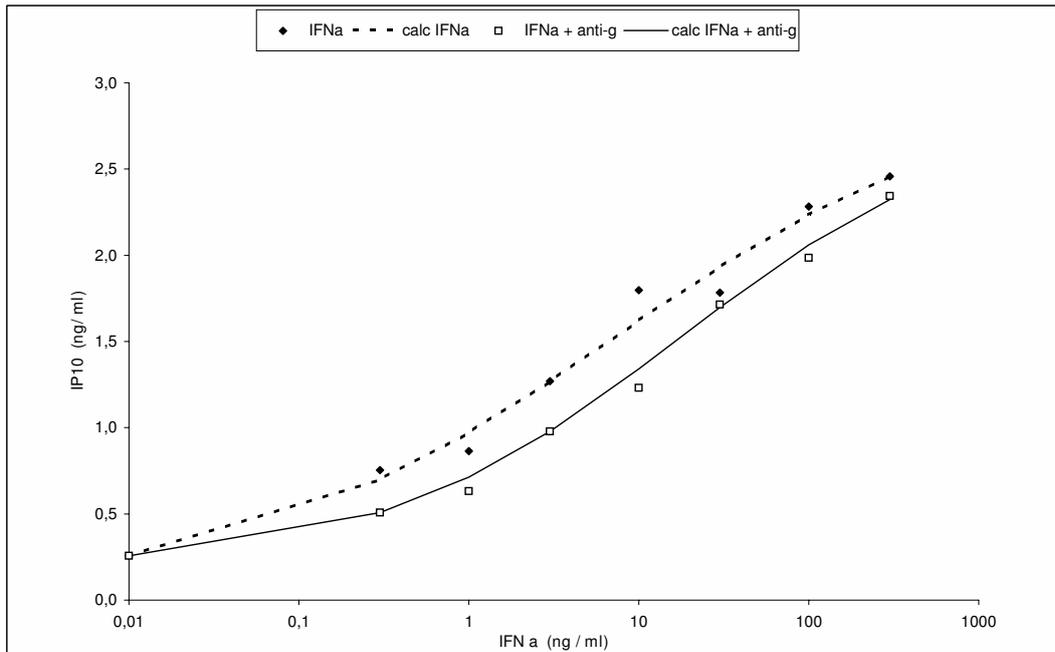


Abbildung 4.7: Repräsentative Darstellung der ELISA-Ergebnisse eines Probanden aus den Versuchen mit neutralisierenden Ak. Zu sehen ist die sigmoide Kurve der IFN α Stimulation (schwarze Raute und unterbrochene Linie) und die Kurve der IFN α Stimulation unter Zugabe IFN γ Ak (weißes Quadrat und durchgezogene Linie).

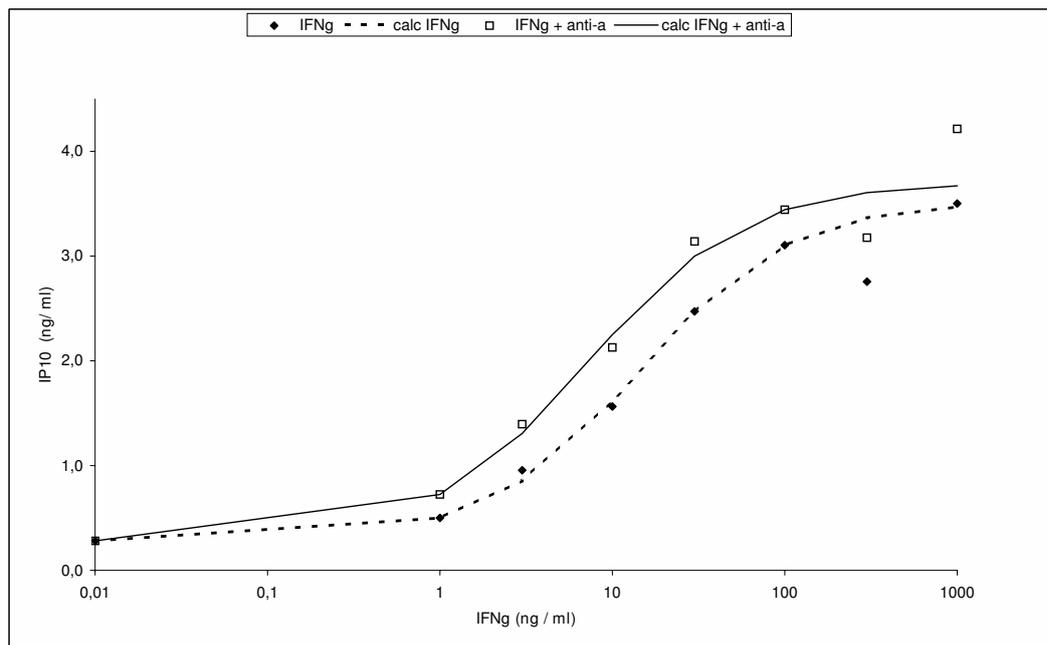


Abbildung 4.8: Repräsentative Darstellung der Ergebnisse eines Probanden aus den Versuchen mit neutralisierenden Ak. Dargestellt ist die sigmoide Kurve der IFN γ Stimulation (schwarze Raute und unterbrochene Linie) und die Kurve der IFN γ Stimulation unter Zugabe IFN α -Ak (weißes Quadrat und durchgezogene Linie).

4.4.2 Relative IFN α - und IFN γ -Sensitivität bei gesunden Probanden

Wie im Versuch der intrazellulären IP-10 FACS Messung festgestellt, war die IP-10 Produktion fast ausschließlich auf die Monozyten einer PBMC Population zurückzuführen. Die hier

4 Ergebnisse

dargestellten Ergebnisse des IP-10 ELISA beziehen sich also auf eine Summe einer IP-10 Sezernierung durch die PBMC, die aber fast ausschließlich auf die Monozyten zurückzuführen ist. Im Folgenden wird also die gesamte Zellpopulation der PBMC nominativ auf „Monozyten“ reduziert.

Wie auch schon in den vorherigen Versuchen geht auch beim ELISA der stärkere Stimulus zur IP-10 Produktion vom $\text{IFN}\gamma$ aus, so dass unter maximaler IFN-Stimulation mehr IP-10 sezerniert wird (Abb. 4.9).

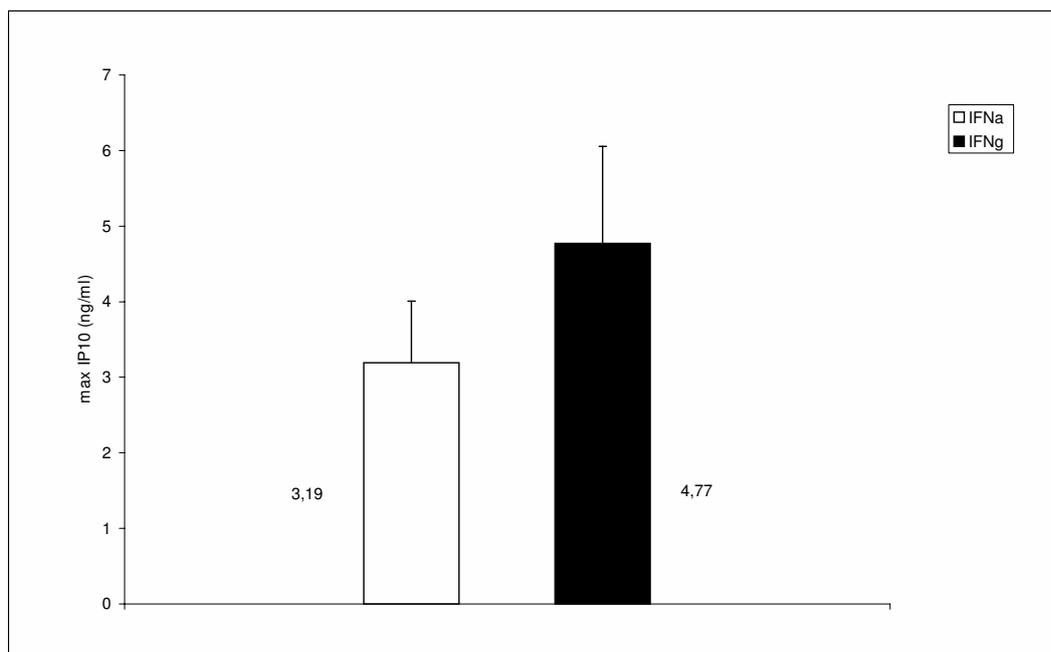


Abbildung 4.9: IP-10 Produktion in ng/ml unter Stimulation mit $\text{IFN}\alpha$ bzw. $\text{IFN}\gamma$. Dargestellt ist der Mittelwert der maximal erreichten IP-10 Produktion durch Monozyten von 10 gesunden Probanden an vier verschiedenen Versuchstagen.

Allerdings liegen die EC_{25} , EC_{50} und EC_{75} Werte nach $\text{IFN}\alpha$ Stimulation bei allen Probanden wesentlich niedriger als nach $\text{IFN}\gamma$ Stimulation, d.h. die Sensitivität der Monozyten gegenüber $\text{IFN}\alpha$ ist höher als gegenüber $\text{IFN}\gamma$ (Abb.4.10).

Intraindividuelle Variabilität der IFN-induzierten IP-10 Sezernierung

Schließlich wurde systematisch untersucht, inwieweit die IFN-induzierte IP-10 Sezernierung in Monozyten intraindividuellen Schwankungen unterliegt. Hierzu wurden Zellen von Probanden an unterschiedlichen Tagen stimuliert und die Ergebnisse miteinander verglichen (Abb.4.11, Abb.4.12).

4 Ergebnisse

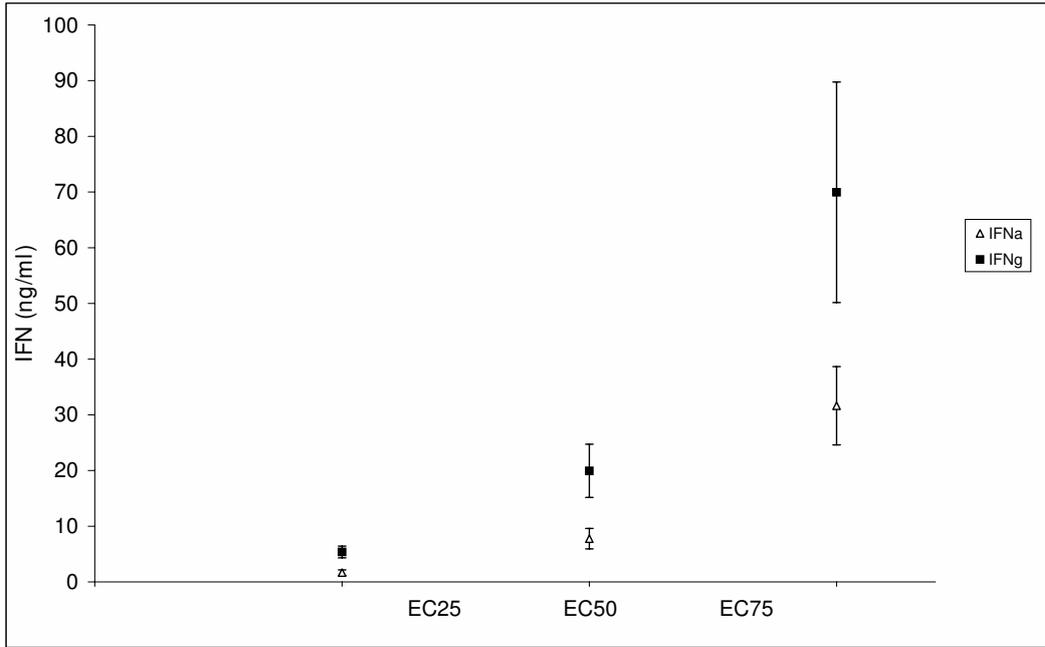


Abbildung 4.10: Mittelwerte und Standardabweichungen der EC25, EC50 und EC75 unter IFN α und IFN γ Stimulation von 10 gesunden Probanden an jeweils vier verschiedenen Versuchstagen.

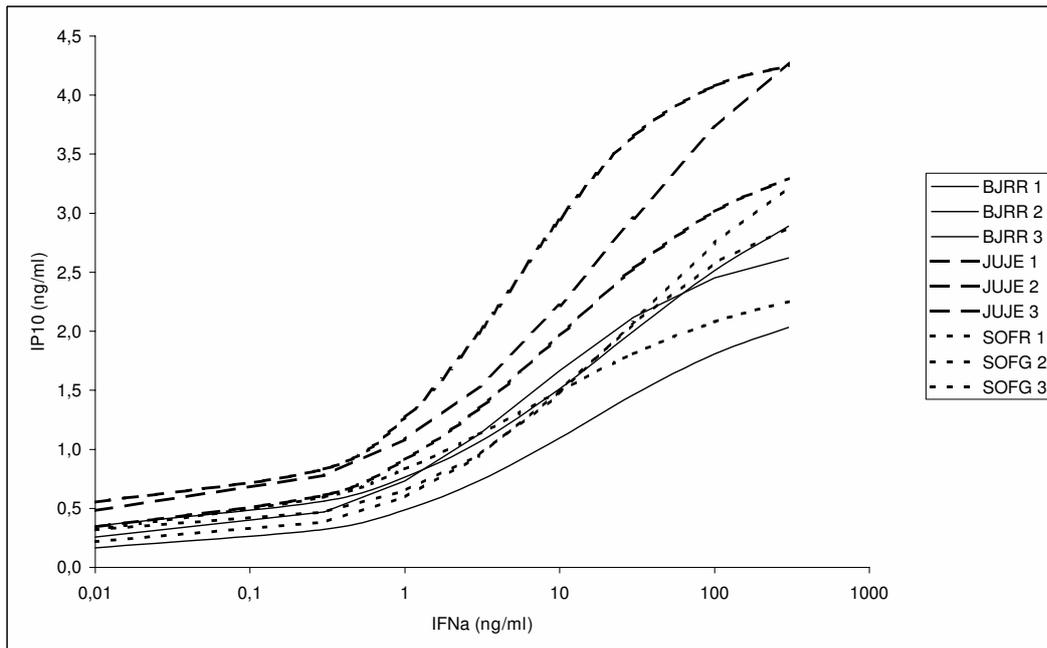


Abbildung 4.11: Darstellung der kalkulierten Sezernierungskurven von 3 Probanden an jeweils drei verschiedenen Versuchstagen unter IFN α Stimulation.

Zunächst wurden wiederum die EC50 Werte bestimmt (Tab.4.3). Die EC50 der IP-10 Sezernierung zeigten eine deutliche intraindividuelle Variabilität. Jedoch schwankten die mittleren Sensitivitäten gegenüber IFN α - bzw. IFN γ -Stimulation sowie die relative Sensitivität gegenüber beiden IFN zwischen den einzelnen Probanden lediglich um ca. 25% (Tab.4.3, „%CV“).

4 Ergebnisse

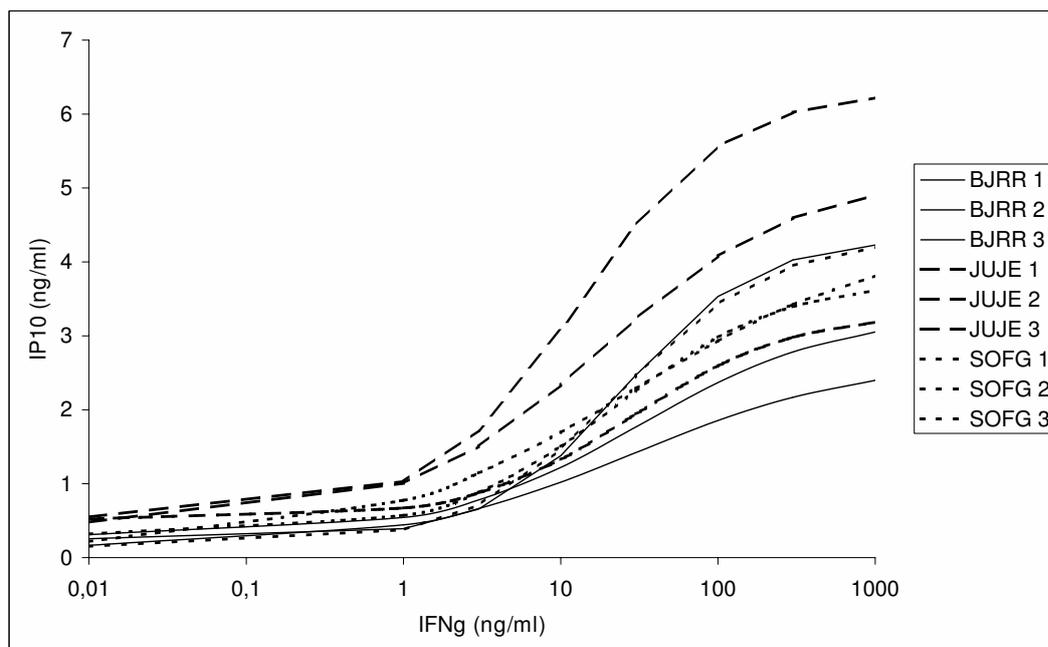


Abbildung 4.12: Darstellung der kalkulierten Sezernierungskurven von 3 Probanden an jeweils drei verschiedenen Versuchstagen unter $\text{IFN}\gamma$ Stimulation.

Proband	EC50 $\text{IFN}\alpha$	EC50 $\text{IFN}\gamma$	EC50 $\text{IFN}\alpha/\gamma$
ANBK	6,4±1,9	12,3±6,2	2,0±1,0
BJRR	9,8±2,8	20±7,3	2,24±1,26
JOFR	4,3±2,5	13,7±4,0	4,19±2,68
JUJE	8,6±3,2	17,2±5,9	2,18±0,97
KISR	8,5±1,8	27,6±10,3	3,22±0,93
MJHN	8,8±4,4	29,4±18,7	3,25±1,16
SOFG	10,4±5,2	16,7±7,1	1,94±1,43
STTT	6,9±3,2	21,1±8,5	3,91±3,15
ULFZ	7,2±2,9	21,1±15,1	2,87±1,81
WAKN	7,3±1,9	23,7±20,4	3,34±2,76
Gesamt	7,8±1,8	20,3±5,6	2,9±0,8
%CV	22,9	27,6	27,5

Tabelle 4.3: EC50 (IFN in ng/ml) der IP-10 Sezernierung unter $\text{IFN}\alpha$ bzw. unter $\text{IFN}\gamma$ Stimulation von $n = 10$ gesunden Probanden. Die dargestellten Werte entsprechen Mittelwert \pm Standardabweichung von 4 unabhängigen Experimenten an unterschiedlichen Versuchstagen pro Proband.

4 Ergebnisse

Weil die EC50 weiterhin rechnerisch erheblich von der individuellen basalen IP-10 Sezernierung abhängt, wurde diese ebenfalls an unterschiedlichen Tagen näher betrachtet (Tab.4.4):

Proband	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Mittelwert ± s.d.	%CV
ANBK	0,333	0,211	0,411	0,334	0,32±0,08	25,7
BJRR	0,317	0,326	0,389	0,446	0,37±0,06	16,3
JOFR	0,420	0,502	0,659	1,240	0,71±0,37	52,5
JUJE	0,730	0,966	1,014	1,357	1,02±0,26	25,4
KISR	0,724	0,833	0,822	0,594	0,74±0,11	14,9
MJHN	0,384	0,440	0,482	0,394	0,43±0,05	10,6
SOFG	1,824	1,586	1,071	1,453	1,48±0,31	21,2
STTT	0,866	1,589	1,110	1,093	1,16±0,3	26,1
ULFZ	0,329	0,376	0,314	0,298	0,33±0,03	10,2
WAKN	0,244	0,373	0,275	0,304	0,3±0,06	18,4

Tabelle 4.4: Rohwerte der basalen IP-10 Sezernierung (in ng/ml) im Serum bei 10 Probanden an 4 verschiedenen Versuchstagen. Die Probandenseren wurden an den Tagen der verschiedenen PBMC Isolationen abgenommen, bevor eine Stimulation mit IFN stattfand.

Die intraindividuelle Schwankungen der basalen IP-10 Sezernierung waren ebenfalls deutlich zu erkennen (Tab.4.4, rechte Spalte). Zwischen den einzelnen Probanden, also interindividuell, traten starke Unterschiede hinsichtlich der Konzentration des IP-10 im Serum auf. Die Standardabweichung des Mittelwertes aller Probanden betrug 60,6%. Diese Ergebnisse deuten auf eine stark schwankende (Monozyten-) Aktivierungen zum Zeitpunkt der Blutentnahme hin. Daraufhin wurde systematisch untersucht, ob eine Auswertung der Daten unter Umgehung der bereits in vivo erfolgten Präaktivierung eine geringere intraindividuelle Schwankung ergibt. Hierzu wurde der Quotient aus der durch 10ng/ml und 1ng/ml IFN-induzierten IP-10-Sezernierung bestimmt. Diese Konzentrationen wurden gewählt, weil zum einen bei dieser Konzentration die IP-10 Sezernierung für beide Interferone deutlich über dem Basalwert lag (welcher ggf. der endogenen variablen Präaktivierung unterliegt) und zum anderen sie nach den gemessenen Daten noch im linearen Bereich der sigmoiden Konzentrations-Wirkungs-Kurve lag. Die Auswertung ergab, dass tatsächlich die intraindividuelle Schwankung mit dieser Auswertungsmethode deutlich geringer war (Tab.4.5):

4 Ergebnisse

	IFNα (ng/ml)	s.d.	%CV	IFNγ (ng/ml)	s.d.	%CV
ANBK						
EC50	6,37	1,87	29,4	12,27	6,16	50,3
y10/y1	2,44	0,52	21,4	3,51	0,71	20,1
BJRR						
EC50	8,73	2,27	26,1	18,11	7,76	42,9
y10/y1	2,08	0,10	4,7	3,48	0,92	26,4
JOFR						
EC50	4,28	2,47	57,8	13,68	3,98	29,1
y10/y1	2,79	0,69	24,6	3,86	0,34	8,7
JUJE						
EC50	8,64	3,22	37,3	17,23	5,94	34,5
y10/y1	2,01	0,35	17,6	2,77	1,10	39,6
KISR						
EC50	8,01	1,90	23,7	24,97	10,85	43,4
y10/y1	1,76	0,26	15,0	2,34	0,53	22,7
MJHN						
EC50	9,09	5,35	58,9	27,31	22,34	81,8
y10/y1	2,80	0,80	28,7	2,50	0,98	39,2
SOFG						
EC50	11,15	6,16	55,3	20,12	1,99	9,9
y10/y1	1,88	0,32	16,8	3,44	0,93	26,9
STTT						
EC50	6,86	3,20	46,7	21,05	8,44	40,1
y10/y1	2,44	0,35	14,6	3,67	0,29	7,8
ULFZ						
EC50	7,22	2,86	39,6	21,04	15,10	71,8
y10/y1	2,53	0,68	26,9	4,29	2,27	53,1
WAKN						
EC50	7,28	1,90	26,1	23,70	20,43	86,2
y10/y1	1,94	0,45	23,4	2,73	0,87	32,0
alle Pati-						
enten						
EC50	7,76	1,84	23,68	19,95	4,77	23,93
y10/y1	2,27	0,38	16,71	3,26	0,64	19,55

Tabelle 4.5: Mittelwerte (IFN α und IFN γ), Standardabweichung (sd) und der Koeffizienten der Variabilität (%CV) der EC50 bzw. der Y10/Y1 von 10 verschiedenen Probanden an 4 verschiedenen Versuchstagen.

Der Koeffizient der Variabilität ist unter Umgehung der in vivo Präaktivierung deutlich geringer. Die durchschnittlich beobachtete intraindividuelle Schwankung dieses Wertes ist im Vergleich zur Schwankung anderer Parameter in der folgenden Abbildung graphisch veranschaulicht (Abb.4.13):

Der Quotient y10/y1 zeigt den geringsten Variabilitätskoeffizienten, ist also verglichen mit den anderen in der Graphik dargestellten Parametern an den verschiedenen Versuchstagen am besten reproduzierbar und vergleichbar. Außerdem zeigt sich, dass die relative Sensitivität gegenüber IFN α und IFN γ zueinander ein sehr konstanter Wert ist (Abb.4.14).

4 Ergebnisse

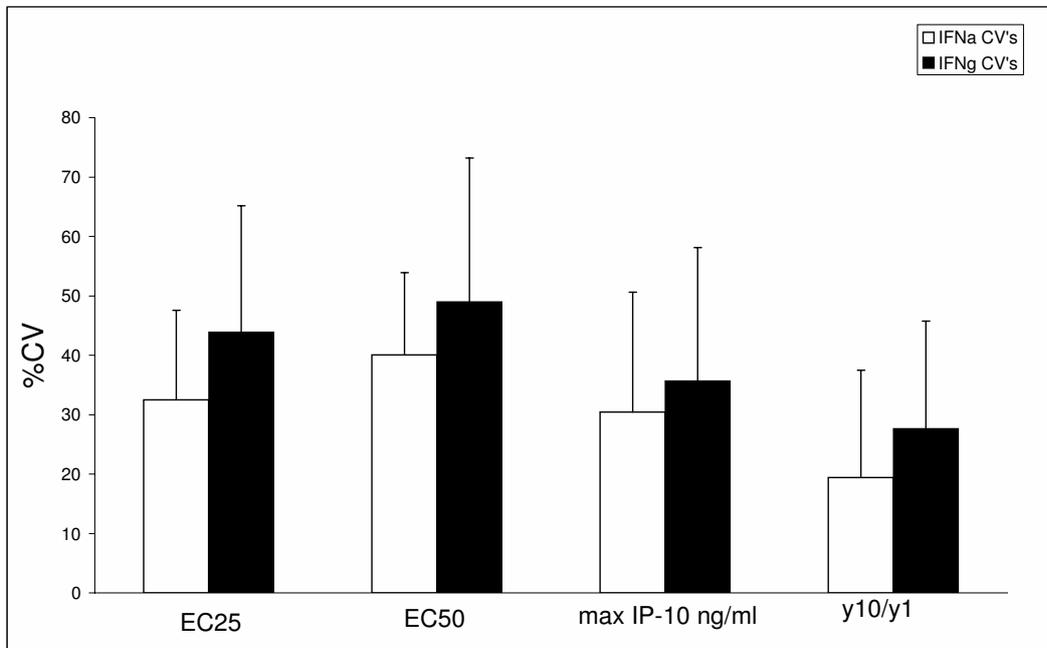


Abbildung 4.13: Intraindividuelle Variationsbreiten als %CV der EC25, EC50, max. IP-10 und y10/y1 im Vergleich

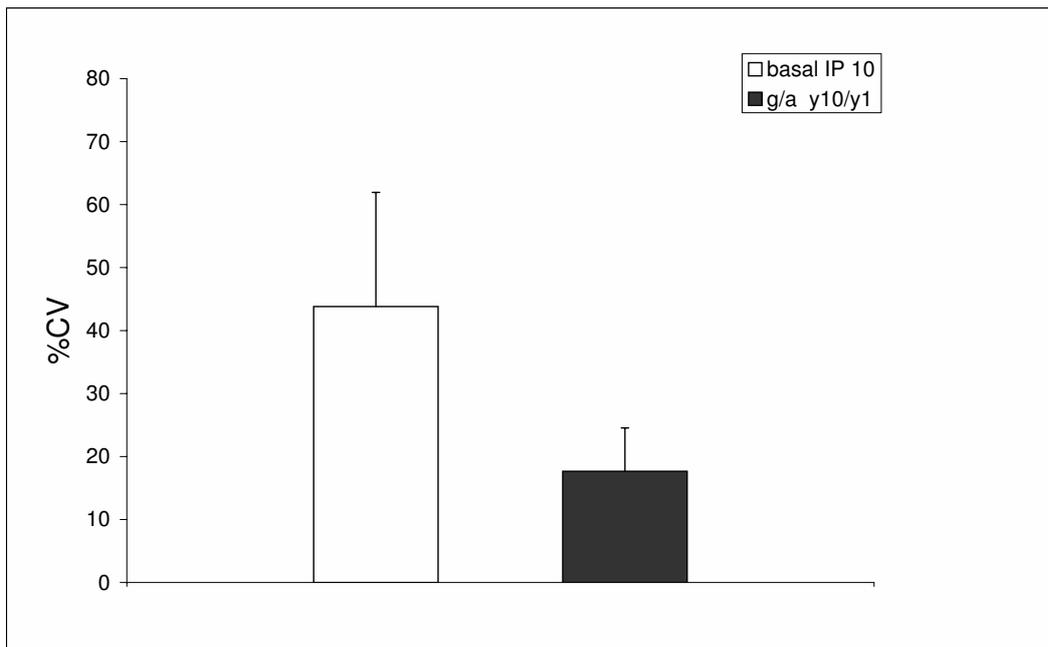


Abbildung 4.14: Schwankung der Standardabweichung der basalen IP-10 Produktion (links) und der relativen Sensitivität gegenüber IFN α und IFN γ zueinander (rechts)

Verglichen mit der - hier als Beispiel gewählten - hohen %CV der basalen IP-10 Sezernierung ist der Quotient aus der relative Sensitivität von IFN γ zu der relative Sensitivität von IFN α ein konstanter Wert, der zum intra- und interindividuellen Vergleich eingesetzt werden kann.

Insgesamt zeigen die hier erhobenen Daten, dass der ELISA die geeignete Methode zur Bestimmung der IFN-Sensitivität ist und die IFN-induzierte IP-10 Sezernierung einer in-

4 Ergebnisse

traindividuellen Schwankungsbreite von etwa 20% unterliegt. Der Test ist allerdings nur auswertbar, wenn die Einflüsse anderer IFN unterdrückt werden und die endogene Präaktivierung der Zellen durch Quotientenbildung nicht in die Auswertung einfließt.

5 Diskussion

Interferone spielen in der interzellulären Kommunikation eine tragende Rolle. Ihre Wirkungsmechanismen auf molekularer Ebene sind im letzten Jahrzehnt Objekt intensiver Forschungen gewesen. Typ I und II IFN, die in dieser Arbeit im Kontext der Psoriasis betrachtet werden, tragen wesentlich zur Genese und Unterhaltung dieser entzündlichen Hauterkrankung bei (s.Kap.1.1.2.) [1]. Die Psoriasis ist eine multifaktorielle Erkrankung, bei der eine genetische Komponente unstrittig ist, bei der man aber aufgrund einer hohen genetischen Heterogenität Schwierigkeiten hat, einen Gendefekt konkret zu lokalisieren. Suszeptibilitätsloci wurden definiert, so PSORS1 auf Chromosom 6 (6p21.3) in der HLA-C Region [37], [38], diese Loci werden aber nur bei einem Teil der Psoriatischer gefunden. Da Interferone, die zu therapeutischen Zwecken eingesetzt werden, bei empfänglichen Personen eine Psoriasis hervorrufen können [22] und eine Hypersensitivität gegenüber $\text{IFN}\alpha$ bei $\text{IRF2}^{-/-}$ Mäusen eine psoriatische Hauterkrankung hervorruft [8],[15], scheint die individuelle Sensitivität auf IFN eine Rolle bei der Pathogenese der Psoriasis zu spielen. Ziel dieser Arbeit war es, einen biologischen Test zu entwickeln, der es uns erlaubt, die IFN Sensitivität bei Psoriatikern zu testen, um zu erfahren, ob diese ein stabiles, reproduzierbares Merkmal ist oder intraindividuell variiert. Im ersten Fall ließe dies eventuell eine Identifizierung und Klassifizierung von Psoriasisuntergruppen zu, was wiederum die Eingrenzung eines Suszeptibilitätslocus erleichtern könnte. Im zweiten Fall der intraindividuellen Variabilität, z.B. aufgrund von unterschiedlicher entzündlicher Aktivität, könnte dieser Test als prognostischer Marker oder als Marker für den Therapieerfolg eingesetzt werden.

Aus verschiedenen Gründen ist es sinnvoll sich auf die Bestimmung des Effektorproteins wie IP-10 zu konzentrieren: Zunächst ist generell die Bestimmung eines Effektorproteins verlässlicher und reproduzierbarer als die Bestimmung von $\text{IFN}\alpha$ und $\text{IFN}\gamma$ selbst, da deren Plasmakonzentrationen im picomolaren Bereich liegen und ihre Plasma-Halbwertszeit kurz ist. Des Weiteren ist die Vielfalt der molekularen Mechanismen der Interferonwirkung groß (IFN im Serum, IFN Rezeptordichte, Jak/Tyk, STAT und IRF Aktivierung, Polymorphismus der DNA Promotorregionen), so dass sich ein Bioassay zur Testung der IFN-Sensitivität anbietet, bei dem möglichst viele molekulare Effekte in ihrem Summeneffekt erfasst werden. Wir haben uns für das IP-10 als Effektorprotein entschieden, da es auf die T-Lymphozyten, den Schlüsselzellen in der Psoriasis-Pathogenese, chemotaktisch wirkt und es in Psoriasisplaques stark überexprimiert ist. Darauf, dass dieses Chemokin eine Schlüsselrolle bei der

Entwicklung und Unterhaltung einer psoriasisähnlichen Hauterkrankung einnimmt, weisen auch die Ergebnisse der Versuche von Hida et al [8] hin, bei denen transgene, IRF 2-/- Mäuse eine psoriasisähnliche Hauterkrankung entwickelten. Bei diesen Versuchen konnte festgestellt werden, dass nicht IFN-Gene selbst, sondern die ISGF3 Gene vermehrt exprimiert werden. Dies führt u.a. zu der erhöhten IP-10 Expression in der Epidermis, so wie dies auch in Psoriasisplaques der Fall ist. In der Haut IRF 2-/- Mäuse werden erhöhte Spiegel schon nachgewiesen, bevor psoriasisähnliche Plaques auftreten [8].

Zur Bestimmung von Zytokinen und ihrer Effektorproteine stehen verschiedene Versuchsansätze zur Verfügung. So kann die Synthese selbst auf nukleärem Niveau mittels Nachweis der mRNA in vivo nachgewiesen werden. Diese Methoden lassen aber weder eine Quantifizierung des Zytokins zu (Ausnahme: cPCR), noch sind Rückschlüsse auf die Zytokinproduzierenden Zellen möglich [7]. Dies sind aber essentielle Fragen dieser Arbeit. Deshalb setzten wir zunächst einen von uns etablierten IP-10 ELISPOT Bioassay und eine intrazytoplasmatische IP-10 FACS Messung ein und konnten zeigen, dass die IP-10 Sezernierung in PBMC fast ausschließlich auf CD14+ Monozyten zurückzuführen ist, deren Subpopulationen das IP-10 homogen sezernieren. In dieser Zellpopulation sind auch die Vorläuferzellen der pDC zu finden, die - einmal in die Epidermis eingewandert - die potentesten Produzenten des IP-10 in der Epidermis darstellen [39],[40],[2],[23],[3],[24]. Im intrazellulären IP-10 FACS konnten wir beweisen, dass die IP-10 Produktion nicht vom Aktivierungsstadium der Monozyten abhängt. Wir konstatierten eine spontane IP-10 Sezernierung durch Monozyten und - wie schon von Taniguchi et al. beschrieben [9],[33] - ebenfalls durch T- Lymphozyten. Die CD19+ B-Lymphozyten produzieren spontan kein IP-10. Selbst nach Stimulation war die IP-10 Sezernierung so gering, dass sich die Auswertung ihrer Sezernierung im ELISPOT schwierig gestaltete. Da die B-Lymphozyten in der Pathophysiologie der Psoriasis nur eine geringe Rolle zu spielen scheinen, nur B-Lymphomzellen einen CXCR3 tragen [41] und ihre IP-10 Sezernierung selbst nach IFN-Stimulation gering ist, vernachlässigten wir diese PBMC-Subpopulation in den nachfolgenden Betrachtungen. Da die IP-10 Sezernierung also fast ausschließlich homogen durch die CD14+ Monozyten Population erfolgt, setzten wir im Folgenden einen ELISA ein mit dem sich die IP-10 Sezernierung direkt quantifizieren lässt. Ein ELISA hat den Vorteil, dass er eine hohe Sensitivität und Spezifität aufweist, leicht durchzuführen und gut reproduzierbar ist. Er erfüllt also die von uns gewünschten Eigenschaften eines Screeningtestes.

Ein weiteres wichtiges Ergebnis aus den Vorversuchen war, dass nur frisch präparierte Zellen in der Lage waren, IP-10 zu produzieren, was wiederum die avisierte Einsetzbarkeit als Screening-Test erschweren könnte, da Patientenproben direkt verarbeitet werden müssen. Schon nach 4h auf Eis war die IP-10 Sezernierung durch die PBMC erloschen. Dies führten wir auf eine gesteigerte Apoptoserate der PBMC bei Lagerung zurück, was durch eine Pro-

5 Diskussion

pidium Jodid Färbung im FACS bestätigt wurde (Ergebnisse nicht gezeigt). Als möglicher, auslösender Faktor der Apoptoseinduktion ist der Kältereiz in Betracht zu ziehen. Dies bedingt eine Permeabilitätssteigerung der Zellwand, wodurch IP-10 austritt, welches als diffuse Hintergrundfärbung sichtbar wird und die Auszählung der Punkte im ELISPOT behindert und die Bestimmung im ELISA verfälscht.

In Vorversuchen zum IP-10 ELISA stellten wir fest, dass die zur Stimulation eingesetzten IFN Konzentrationen bis zum Erreichen einer maximalen IP-10 Sezernierung wesentlich höher angesetzt werden mussten als im IP-10 ELISPOT oder im intrazellulären IP-10 FACS.

Versuchsansatz	IFN α (ng/ml)	IFN γ (ng/ml)
ELISPOT	CD14+ 25, CD3+ 12,5	10
Intrazelluläres IP-10 FACS	50	30
ELISA	300	1000

Tabelle 5.1: Konzentrationen der IFN (ng/ml), die zur Stimulation der maximalen IP-10 Sezernierung in den PBMC in den verschiedenen Versuchsansätzen notwendig waren.

Dies kann für die steigende Genauigkeit der einzelnen Versuchsansätze, besonders bei hohen IP-10 Konzentrationen, sprechen. So ist es wahrscheinlich, dass durch die manuelle Auszählung der Punkte auf der ELISPOT Platte mehrere IP-10 Punkte als ein einzelner erkannt und gezählt wurden; die Gesamtpunktzahl bildete die steigende IP-10 Sezernierung aufgrund von konfluierenden Punkten nicht korrekt ab. Unwahrscheinlicher ist hingegen die steigende Genauigkeit des ELISA gegenüber dem intrazellulären IP-10 FACS. Bei diesem Versuch wurde die Zellwandperforation zur Einbringung des IP-10 AK nach 8h Stimulation durch IFN vorgenommen. Im ELISPOT als auch im ELISA wurde die Bestimmung der IP-10 Sezernierung erst nach 22h durchgeführt. Eine höhere „Mean Fluorescens“ der IP-10 positiven Zellen als Ausdruck IP-10 Produktion im intrazellulären IP-10 FACS nach 22h Stimulation ist nicht auszuschließen. Da sich aber unsere Frage im intrazellulären IP-10 FACS auf die IP-10 produzierenden Subpopulationen der PBMC richtete, fällt die unterschiedliche Inkubationszeit der IFN nicht ins Gewicht.

In allen drei Versuchsansätzen zeigen die betrachteten Zellen (sowohl T-Lymphozyten als auch die Monozyten) eine stärkere maximale IP-10 Produktion nach IFN γ Stimulus. Die im IP-10 ELISA gefundenen niedrigeren EC50 der IP-10 Sezernierung in ng/ml unter IFN α Stimulation (Kap.4.4.2) stehen in scheinbarem Gegensatz zu denen aus den Versuchsreihen der Kap.4.2. und 4.3., bei denen die EC 25/50/75 unter IFN α Stimulation immer später erreicht wurde als unter IFN γ Stimulation. In der Versuchsreihe zum IP-10 ELISPOT wurde nicht direkt die produzierte Menge IP-10 gemessen, sondern das IP-10 pro eingesetzter Zellzahl ausgedrückt als Punktzahl auf der ELISPOT Platte. Im intrazellulären IP-10 FACS bezog sich die EC auf den Prozentsatz der aktivierten Zellen, zu denen dann das IP-10 in

Beziehung gesetzt wurde. Im IP-10 ELISA hingegen wurde ausschließlich die Menge IP-10 in ng/ml gemessen, die auf den Stimulus hin gebildet wurde. Zusammengenommen zeigt sich also, dass IFN α und IFN γ die IP-10 Sezernierung in Monozyten differenziell induzieren: Die Sensitivität gegenüber IFN α ist höher als gegenüber IFN γ . Die maximal erreichbare IP-10 Sezernierung wird jedoch nach IFN γ Stimulation erreicht. Dies steht auch in Einklang mit den biologischen Funktionen der IFN: IFN α ist Zytokin des unspezifischen Immunsystems und hat eine tragenden Rolle in der frühen, unspezifischen Immunantwort [1]. In Psoriasisplaques wird es in akut entzündlichen Läsionen gefunden [2],[24]. Später tritt seine Bedeutung hinter die des IFN γ zurück, welches in der T-Zell Biologie eine tragende Rolle spielt und als Zytokin des spezifischen Immunsystems betrachtet wird [17],[7],[18].

Durch Zugabe einer basalen IFN α Konzentration zur IFN γ Stimulationsreihe im ELISPOT Versuch und IFN Antikörper im ELISA konnten wir den Effekt des jeweils gegensätzlichen IFN auf die IP-10 Sezernierung beobachten. Die Interferone beeinflussen sich über das STAT1 Molekül gegenseitig. Dieses Molekül ist in den Induktionsketten beider Interferone wichtig: Nach Bindung an den IFNAR oder IFNGR wird es phosphoryliert und bildet ein STAT1-Dimer, welches Transkriptionsfaktor ist und zur Transkription von Effektorproteinen wie IP-10 führt [6],[7],[1]. Zur effizienten IFN γ Signaltransduktion ist scheinbar eine stetige STAT1 Phosphorylierung notwendig, die in vivo durch eine basale IFN α Produktion und Bindung an den IFNAR sichergestellt wird [8],[17],[6],[1]. Unsere Ergebnisse zur Co-Stimulation im IP-10 ELISPOT Versuch bestätigen diese Beobachtung. Im ELISPOT lässt der Zusatz von einer geringen Menge IFN α zur IFN γ -Stimulationsreihe die Punktzahlen - verglichen mit der reinen IFN γ -Stimulation - ansteigen. Die Zugabe von eines IFN α -AK zur IFN γ -Stimulationsreihe im IP-10 ELISA führte hingegen zu einer Steigerung der IP-10 Sezernierung, was auf einen negativ-regulatorischen Effekt des IFN α während der IFN γ Stimulation hinweist. Ein agonistischer Effekt des AK am IFNAR oder IFNGR ist denkbar. Die Negativregulation der IFN γ Sezernierung selbst (und nicht seines Effektorproteins IP-10) durch IFN α ist STAT1 abhängig und spielt in vivo vor allem in der frühen Entzündungsphase eine Rolle. In STAT1-/- Zellen erfolgt die IFN γ Induktion direkt durch IFN α , allerdings in überschießendem, unkontrolliertem Maß [17]. In STAT1 +/+ T-Lymphozyten und NKZ kann IFN α nicht nur die IFN γ Expression nicht direkt auslösen, sondern diese wird (durch Inhibition des IL12 Signals) von IFN α sogar unterdrückt [17]. Die Zugabe eines IFN γ -AK zu der IFN α Stimulationsreihe führt zu einer Verminderung der IP-10 Sezernierung, was auf einen positiv-co-stimulatorischen Effekt des IFN γ bei IFN α Stimulation hinweist. Dies ist in der von Tassiulas et al. beschrieben, und geschieht über STAT1 und Syk Induktion [21]. Anscheinend gibt es auch Personen, bei denen die co-stimulatorischen Effekte auf die IP-10 Produktion nicht ausgeprägt sind (Ergebnisse nicht gezeigt). Dies muss aber in späteren Versuchsansätzen noch genauer definiert werden. Zusammengenommen zeigen die Ergebnisse der Co-Stimulation, dass die Effekte weitläufig sind und dass der ELISA mit IFN-AK

durchgeführt werden muss, um die Reproduzierbarkeit zu gewährleisten.

Ziel dieser Arbeit war es, einen Test zu entwickeln, der es uns erlaubt, Aussagen über die intraindividuelle Variabilität der IFN Sensitivität zu treffen. Wir konnten mit dem IP-10 ELISA feststellen, dass zwischen den einzelnen Probanden starke Unterschiede hinsichtlich der Konzentration des IP-10 im Serum auftreten. Die Standardabweichung beträgt 60,6% des Mittelwertes aller Probanden. Die individuelle Reproduzierbarkeit der basalen IP-10 Sezernierung ist mit durchschnittlich 21,4% gut. Allerdings ist die Menge des IP-10 im Serum stark vom Aktivierungsgrad des immunologischen Systems abhängig, der die Sensitivität der PBMC auf eine IFN-Stimulation beeinflusst (Aktivierung des IFNAR, IFNGR, Zytokinmilieu). Dieser Aktivierungsgrad lässt sich aber nur schwer erfassen und als Faktor der IP-10 Sezernierung korrekt abbilden. Zur Umgehung dieser Präaktivierung kalkulierten wir die relative IFN Sensitivität (y_{10}/y_1), die als Quotient aus der IP-10 Sezernierung nach Stimulation mit 10ng/ml IFN und mit 1ng/ml definiert ist. Diese scheint ein intraindividuell stabiler Wert zu sein. Gleiches gilt für den Quotienten aus den relativen Sensitivitäten der beiden IFN. Insgesamt zeigen die erhobenen Daten, dass die IFN-induzierte IP-10 Sezernierung in Monozyten einer intraindividuellen Schwankungsbreite von ca. 20% unterliegt, wenn die Auswertung (a) die Einflüsse anderer IFN sowie (b) die endogene Präaktivierung der Zellen minimiert werden. Unter diesen Voraussetzungen erscheint demnach die Bestimmung der IFN α - bzw. IFN γ -induzierten IP-10-Sezernierung mittels ELISA als geeignete Methode zur Bestimmung der individuellen Sensitivität gegenüber beiden IFN.

6 Zusammenfassung

Die Schuppenflechte (Psoriasis vulgaris) zeichnet sich unter anderem durch eine Aktivierung des Interferonsystems aus. Es existieren Hinweise, dass bei Patienten mit Psoriasis eine gesteigerte zelluläre Sensitivität gegenüber der Wirkung von Interferon besteht. Um diese Hypothese zu überprüfen, ist ein geeigneter Bioassay erforderlich, mit dessen Hilfe die Sensitivität gegenüber Interferon quantitativ erfasst werden kann. Die Etablierung eines solchen Assays ist das Thema der vorliegenden Arbeit.

Die Sezernierung des Interferon-induzierten Proteins 10 (IP-10) wurde als Maß der Interferon-Stimulation verwendet. Es wurden verschiedene Assay-Plattformen zur Messung (ELISPOT, FACS, ELISA) evaluiert. Weiterhin wurde eine standardisierte Isolierung und in vitro-Prästimulation gereinigter Monozyten-Populationen aus peripheren Blutzellen (PBMC) etabliert. Der optimierte IP-10 ELISA lässt sich zur Testung der IFN-Sensitivität einsetzen, da er die co-stimulatorischen Effekte zwischen TypI und TypII IFN einbezieht und der in vivo Präaktivierung der Zellen in der Auswertung Rechnung getragen wird. Die ELISA gestützte Bestimmung der IFN induzierten IP-10 Sezernierung in PBMC ist schnell und liefert quantifizierte Aussagen zur IFN Sensitivität.

Wir konnten feststellen, dass die gemessene individuelle IFN Sensitivität eines Probanden unabhängig vom Anteil der CD14+ in den PBMC, dem Serum IP-10 Spiegel und der maximalen IP-10 Sezernierung ist. Allerdings variieren die EC50 Werte der IFN induzierten IP-10 Sezernierung aufgrund einer schwankenden Präaktivierung der PBMC in vivo intra-individuell stark. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die relative Sensitivität gegenüber TypI und TypII IFN sowohl intra- als auch interindividuell nur geringen intraindividuellen Schwankungen unterliegt, mithin einen stabilen individuell reproduzierbaren Interferon-Sensitivitätsindex darstellt. Diese Vermutung muss allerdings durch Messung weiterer Probanden überprüft werden. Anschließend kann der IP-10 ELISA eingesetzt werden, um die IFN-Sensitivität der PBMC von Psoriasispatienten mit denen von Normalpersonen zu vergleichen. Schließlich wäre eine Veränderung der IFN-Sensitivität im Therapieverlauf denkbar und mithilfe des hier entwickelten IP-10 ELISA zu testen.

Literaturverzeichnis

- [1] Theofilopoulos AN, Baccala R, and Beutler B et al. Type 1 interferons (α/β) in immunity and autoimmunity. *Annu.Rev.Immunol.*, (23:307-336), 2005.
- [2] Nestle FO, Conrad C, Tun-Kyi A, and et al. Plasmacytoid predendric cells initiate psoriasis through interferon- α production. *The J Of Experimental Medicine*, (Vol.202, 1:135-143), 2005.
- [3] Farkas L, Beiske K, and Lund-Johansen F et al. Plasmacytoid dendric cells (natural interferon α/β -producing cells) accumulate in cutaneous lupus erythematosus lesions. *Am J Pathol*, (2001, 159:237-243), 2001.
- [4] Siegal FP, Kadowaki N, and Shodell M et al. The nature of principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science*, (1999, 284:1835-1837), 1999.
- [5] Qian C, An H, and Liu S et al. Tlr agonists induce regulatory dendritic cells to recruit th1 cells via preferential ip-10 secretion and inhibit th1 proliferation. *Blood*, (109,8:3308-3315), 2007.
- [6] Taniguchi T and Takaoka. A weak signal for strong responses: Interferon- α/β revisited. *Nature Reviews*, (May 2001, Vol 2), 2001.
- [7] Asadullah K, Sterry W, and Volk HD. Analysis of cytokine expression in dermatology. *Arch Dermatol*, (2002,138:1189-1196), 2002.
- [8] Hida S, Ogasawara K, and Sato K et al. Cd8+ t cell-mediated skin diseas in mice lacking irf-2, the transcriptional attenuator of interferon- α/β signaling. *Imunnity*, (13:643-655), 2000.
- [9] Taniguchi T and Takaoka A. The interferon- α/β system in anitviral responses: a multimodal machinery of gene regulation by the irf family of transcriptionfactors. *Current Opinion in Immunology*, (14:111-116), 2002.
- [10] Paquette R, Hsu NC, and Kiertscher SM et al. Interferon- α and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor differentiate peripheral blood monocytes into potent antigen-presenting cells. *J of Leukocyte Biology*, (64:358-367), 1998.

- [11] Yoshimoto T, Takeda K, Tanaka T, and et al. Il-12 up-regulates il-18 receptor expression on t cells, th1 cells, and b cells: Synergism with il-18 for ifn- γ production. *The Journal of Immunology*, (1998,161:3400-3407), 1998.
- [12] Fantuzzi G, Reed DA, and Dinarello CA. Il-12-induced ifn- γ is dependent on caspase-1 processing of the il-18 precursor. *J. Clin. Invest.*, (1999,104:761-767), 1999.
- [13] Lew W, Bowcock AM, and Krueger JG. Psoriasis vulgaris: cutaneous lymphoid tissue supports t-cell activation and type 1 inflammatory gene expression. *TRENDS in Immunology*, (2004,26,6:295-305), 2004.
- [14] Conti L, Regis G, and Longo A et al. In the absence of igf-1 signaling,ifn- γ supresses human malignant t-cell groth. *Blood*, (109,6,2496-2504), 2007.
- [15] van der Fits L, van der Wel L, Laman JD, and et al. Psoriatic lesional skin exhibits an aberrant expression pattern of interferon regulatory factor-2 (irf-2). *J of Pathology*, (2003,199:107-114), 2003.
- [16] Radaeva S, Jaruga B, and Kim WH et al. Interferon- γ inhibits interferon- α signalling in hepatic cells: evidence for zhe involvement of stat1 induction and hyperexpression of stat1 in chronic hepatitis c. *Biochem J*, (379:199-208), 2004.
- [17] Nguyen KB, Cousens LP, and Doughty LA et al. Interferon α/β -mediated inhibition and promotion of interferon γ : Stat1 resolves a paradox. *Nature Immunology*, (1:70-76), 2000.
- [18] Decker T, Stockinger S, and Karaghiosoff M et al. Ifns and stats in inniate immunity to microorganisms. *J of Clinical Investigation*, (109,10:1271-1277), 2002.
- [19] Nickoloff BJ. The immunologic and genetic basis of psoriasis. *Arch Dermatol*, (135:1104-1110), 1999.
- [20] Takoaka A, Mitani Y, and Suemori H et al. Cross-talk beween interferon- γ and α/β signaling components in caveolar membrane domains. *Science*, (288:2357-2360), 2000.
- [21] Satoshi I, Ansari P, and Sakatusme M et al. Interleukin-10 inhibits expression of both interferon- α and interferon- γ -induced genes by supressing tyrosine phosphorylation of stat1. *Blood*, (93:1456-1463), 1999.
- [22] Downs AMR and Dunnill MGS. Exacerbation of psoriasis by interferon- α therapy for hepatitis c. *Clinical and Exerimental Dermatology*, (25:351-352), 2000.
- [23] Chamian F and Krueger JG. Psoriasis vulgaris: an interplay of t lymphocytes, dendritic cells, and inflammatory cytokines in pathogenesis. *Current opinion in Rheumatology*, (2004,16:331-337), 2004.

- [24] Nestle FO, Conrad C, and Tun-Kyi A et al. Plasmacytoid dendritic cells initiate psoriasis through interferon- α production. *J Experimental Medicine*, (2005,202:135-143), 2005.
- [25] Arican O, Aral M, and Samaz S et al. Serum levels of $\text{tnf}\alpha$, $\text{ifn}\gamma$, il-6, il-8, il-12, il-17 and il-18 in patients with active psoriasis and correlation with disease severity. *Mediators of Inflammation*, (2005;5:273-279), 2005.
- [26] Gaspari AA. Innate and adaptive immunity and the pathophysiology of psoriasis. *J Am Acad Dermatol*, (2006,54:67-80), 2006.
- [27] Griffiths CEM. The immunological basics of psoriasis. *JEADV*, (17(suppl.2):1-5), 2003.
- [28] Szegei A, Aleksza M, Gonda A, and et al. Elevated rate of helper (th1) lymphocytes and serum $\text{ifn-}\gamma$ levels in psoriatic patients. *Immunology letters*, (2003,86:277-280), 2003.
- [29] Cassatella MA, Gasperini S, and Calzetti F et al. Regulated production of the interferon- γ -inducible protein-10 (ip10) chemokine by human neutrophils. *Euro. J. Immunol*, (27:111-115), 1997.
- [30] Dufour JH, Dziejman M, and Liu MT et al. $\text{Ifn-}\gamma$ -inducible protein 10 (ip-10, cxcl10)-deficient mice reveal a role for ip-10 in effector t cell generation and trafficking. *J of Immunologists*, (168:3195-3204), 2002.
- [31] Gasperini S, Marchi M, and Calzetti F et al. Gene expression and production of the monokine induced by $\text{ifn}\gamma$, ifn -inducible t cell α chemoattractant (i-tac), and $\text{ifn}\gamma$ inducible protein-10 (ip10) chemokines by human neutrophils. *The American Association of Immunologists*, (99:4929-4937), 1999.
- [32] Majumder S, Zhou L, and Chaturvedi P et al. p48/stat-1 α -containing complexes play a predominant role in induction of $\text{ifn}\gamma$ -inducible protein 10kda (ip10) by $\text{ifn}\gamma$ alone or in synergy with $\text{tnf-}\alpha$. *The American Association of Immunologists*, (98:4736-4744), 1998.
- [33] Weng Y et al Ogasawara K, Hida S. Requirement of the $\text{ifn-}\alpha/\beta$ -induced cxcr3 chemokine signalling for cd8^+ t cell activation. *Genes to Cells*, (7:309-320), 2002.
- [34] Jinquan T, Jing C, and Jacobi HH et al. Cxcr3 expression and activation of eosinophils: Role of $\text{ifn-}\gamma$ -inducible protein-10 and monokine induced by $\text{ifn-}\gamma$. *J of Immunology*, (165:1548-1556), 2000.
- [35] Pertl U, Luster AD, and Varki NM et al. $\text{Ifn-}\gamma$ -inducible protein-10 is essential for the generation of a protective tumor-specific cd8 t cell response induced by single-chain il-12 gene therapy. *J of Immunology*, (2001,166:6944-6951), 2001.

- [36] Singh UP, Singh S, and Taub DD et al. Inhibition of ifn- γ -inducible protein-10 abrogates colitis in il-10-/- mice. *J of Immunology*, (2003, 171:1-6), 2003.
- [37] Nair RP, Stuart P, and Henseler T. Localisation of psoriasis-susceptibility locus psors1 to 60kb interval telomeric to hla-c. *Am J Hum Genet*, (66:1833-1844,2000), 2000.
- [38] Elder JT, Nair RP, and Henseler T et al. The genetics of psoriasis 2001. *Arch Dermatol*, (137:1447-1454), 2001.
- [39] Grage-Griebenow E, Flad HD, and Ernst M. Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets. *Journal of Leucocyte Biology*, (69:11-20), 2001.
- [40] McRae BL, Nagai T, and Semnani RT et al. Interferon- α and β inhibit the in vitro differentiation of immunocompetent human dendritic cells from cd14+ precursor. *Blood*, (96-1:210-215), 2000.
- [41] Trentin L, Agostini C, and Facco M et al. The chemokine receptor cxcr3 is expressed on malignant b cells and mediates chemotaxis. *The Journal of Clinical Investigation*, (104-1:115-121), 1999.
- [42] Barker JNWN. Genetic aspects of psoriasis. *Clinical and Experimental Dermatologie*, (26:321-325), 2001.
- [43] Allen M, Ishida-Yamamoto A, and McGrath J et al. Corneodesmosin expression in psoriasis differs from normal skin and other inflammatory skin disorders. *Laboratory Investigation*, (81-7:969-975), 2001.
- [44] Valdimarsson H, Baker B, and Ingileif J et al. Psoriasis: a disease of abnormal keratinocyte proliferation by t lymphocytes. *Immunology Today*, (7-9:256-259), 1986.
- [45] Nguyen KB, Watford WT, and Salomon R et al. Critical role for stat4 activation by type 1 interferons in the interferon- γ response to viral infection. *Science*, (297:2063-2066), 2002.
- [46] Mitra RS, Judge TA, and Nestle FO et al. Psoriatic skin-driven dendritic cell function is inhibited by exogenous il-10. *The American Association of Immunologists*, (95:2668-2677), 1995.
- [47] Radvanyi LG, Banerjee A, and Weir M et al. Low levels of interferon- α induce cd86 (b7.2) expression and accelerates dendritic cells maturation from human peripheral blood mononuclear cells. *Scand J Immunol*, (50:499-509,1999), 1999.
- [48] Asadullah K, Sterry W, and Trefzer. Cytokine therapy in dermatology. *Experimental Dermatology*, (11:97-106), 2002.

- [49] Ortonne JP. Recent developments in the understanding of the pathogenesis of psoriasis. *British J of Dermatology*, (140:1-7), 1999.
- [50] Asadullah K, Volk HD, and Sterry W. Novel immunotherapies for psoriasis. *TRENDS in immunology*, (1:47-53), 2002.
- [51] Gudjonsson JE, Johnston, Sigmundsdottier H, and Valdimarsson H. Immunopathogenic mechanisms in psoriasis. *Clin Exp Immunol*, (2004,135:1-8), 2004.
- [52] Gottlieb AB. Psoriasis: Emerging therapeutic strategies. *Nature*, (2005,4:19-34), 2005.
- [53] Blanco P, Palucka Ak, and Gill M et al. Induction of dendric cell differentiation by ifn- α in systemic lupus erythematosus. *Science*, (2001,294:1540-1543), 2001.
- [54] Kupper TS and Fuhlbrigge RC. Immune surveillance in the skin: Mechanisms and clinical consequences. *Nature Review*, (2004,4:211-222), 2004.
- [55] Jackson M, Howie SEM, and Weller R et al. Psoriatic keratinocytes show reduced irf-1 and stat-1 α activation in response to γ ifn. *The FASEB Journal*, (13,495-502(1999)), 1999.
- [56] Shuai K and Liu B. Regulation of gene-activation pathways by pi3k proteins in the immune system. *Nature Reviews*, (2005,5:593-605), 2005.
- [57] Sharrocks AD. Pi3k proteins and transcriptional regulation - more than just sumo e3 ligases? *Genes & Development*, (20:754-758), 2006.
- [58] Soejima K and Rollins BJ. A functional ifn- γ -inducible protein-10/cxcl10-specific receptor expressed ba epithelial cells that is neither cxcr3 nor glycosaminoglycan. *The J of Immunology*, (167:6576-6582), 2001.
- [59] Yoneyama H, Narumi S, and Zhang Y et al. Pivotal role of dendritic cell-derived cxcl10 in the retention of helper t cell 1 lymphocytes in secondary lymph nodes. *J Exp Med*, (195,10:1257-1266), 2002.
- [60] Clark-Lewis I, Mattioli I, and Gong JH et al. Structure-function relationship between the human chemokine receptor cxcr3 and its ligands. *J Biological Chemistry*, (278,1:289-295), 2003.
- [61] Regis G, Bosticardo M, and Conti L et al. Iron regulates t-lymphocyte sensitivity to the ifn- γ /stat1 signaling pathway in vitro and in vivo. *Blood*, (105:3214-3221), 2005.
- [62] Sato T, Selleri C, and Young NS. Inhibition of interferon regulatory factor-1 expression results in predominance of cell growth stimulatory effects of interferon- γ due to phosphorylation of stat1 and stat3. *Blood*, (90:4749-4758), 1997.

Literaturverzeichnis

- [63] Chen CW, Chang YH, and Tsi CJ et al. Inhibition of ifn- γ -mediated inducible nitric oxide synthase induction by the peroxisome proliferator-activated receptor γ agonist, 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin₂, involves inhibition of the upstream janus kinase/stat1 signaling pathway. *J of Immunology*, (171:979-988), 2003.
- [64] Shuai K and Liu B. Regulation of jak-stat signalling in the immune system. *Nature*, (3:900-911), 2003.
- [65] Burmester GR and Pezzutto A. *Taschenatlas der Immunologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1998.
- [66] Christophers E, Mrowietz U, and Sterry W. *Psoriasis*. Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin, Wien, 2002.
- [67] Fritsch PO. *Dermatologie, Venerologie*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 2.aufgabe edition, 2004.

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
AAF	Interferon γ activating factor
Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
AK / Ab	Antikörper /(=) Antibody
AP	alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure
BSA	Bovines Serum Albumin
CC	Cytokingruppe, beschrieben durch die Position des Cystins im Molekül
CCR	CXC-Rezeptor
CD	Cluster of Differentiation
CLA	Cutaneous lymphocyte associated antigen
cPCR	competitive Polymerase Chain Reaction
CTLA	cytotoxic T-lymphocyte associated antigen
%CV	Coefficient of Variability (Koeffizient der Variabilität) = $\text{stabwe}/\text{MiW} \times 100$
CXC	Cytokingruppe, beschrieben durch die Position des Cystins im Molekül
CXCR	CXC-Rezeptor
DC	Dendritische Zelle
EC	Ejection Curve
Elisa	Enzym-linked immunosorbant assay
ELISPOT	Enzyme Linked Immuno Spot Technique
FACS	Fluorescence activated cell sorting
Fas/ FasL	Oberflächenprotein und sein Ligand
FGF	Fibroblast growth factor
FITC	Fluorescein-Iso-Thio-Cyanid
GAF	γ activated Factor
GAS	γ activated side
HLA	Human Leukocyte Antigene (Humane Leukozytenantigene)
HSA	Humanes Serum Albumin
ICAM	intracellular adhesion molecule
IFN	Interferon
IFNAR	IFN γ Rezeptor
IFNGR	IFN γ Rezeptor
iNOS	Nitrit Oxid Synthetase
IP-10	IFN γ inducible Protein 10kDa
IRF	Interferon regulatory Factor
IRSE	IFN stimulated response element
ISGF3	IFN stimulated gene-factor 3 = p48 + STAT1 α Homodimer

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
I-TAC	IFN inducibel T Cell α chemotactant
Jak	Janus Kinase
Kap.	Kapitel
LFA	Lymphocyte function associated antigen
LPS	Lipopolisaccharid
Lsg./ -lsg.	Lösung
MACS	Magnetaktivierte Zellsortierung
mDC	myelozytoide Dendritische Zelle
MHC	Major Histocompatibility Complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MHV	encephalo-myositis Virus
MIG	Monokine induced by IFN γ
ml	Milliliter
NF κ B	Nuclear Factor κ B
OAS	Oligoadenylate Synthetase
p48	48kDa IRSE binding protein
PBMC	Periphial Blood Mononuclear Cells (mononukleäre Zellen der Blutes)
PCR	Polymerase Chaine Reaction
pDC	plasmozytoide Dendritische Zelle
PE	Phycoerythrin
PKR	Interferon inducible RNA dependent protein kinase
PMN	polymorphal nuclear neutrophils
s.o.	siehe oben
sog.	sogenannt(e/r)
Stabw	Standardabweichung
STAT	Signal Transductor and Activator of Transcription
s.u.	siehe unten
Tab.	Tabllle
Tc1	cytotoxische T-Zelle
TGF	Tumor Groth Factor
Th1/2	T-Helferzelle 1/2
TLR	Toll-like Receptor
Tyk	Tyrosin Kinase
z.B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

4.1	Dosis-Wirkungskurve der durch IFN induzierten Punktzahlen auf der ELIS- POT Platte.	27
4.2	Anzahl der IP-10 Punkte durch Stimulation mit IFN bei CD3+ T-Lymphozyten und CD14+ Monozyten	28
4.3	Steigerung der Punkt-Zahl pro Well in CD3+ T-Lymphozyten und CD 14+ Monozyten durch Stimulation mit IFN α und IFN γ	28
4.4	Vervielfachung der basalen Anzahl der Punkte auf der ELISPOT Platte nach IFN γ und nach IFN γ + IFN α Stimulation	29
4.5	EC50 der IFN-Konzentration als mediane Fluoreszenz bei Stimulation von CD14+ Monozyten	32
4.6	FACS Bilder der IFN α Stimulation	33
4.7	Repräsentative Darstellung der ELISA-Ergebnisse eines Probanden aus den Versuchen mit neutralisierenden Ak, IFN α	35
4.8	Repräsentative Darstellung der ELISA-Ergebnisse eines Probanden aus den Versuchen mit neutralisierenden Ak, IFN γ	35
4.9	IP-10 Produktion in ng/ml unter Stimulation mit IFN α bzw. IFN γ	36
4.10	Mittelwerte und Standardabweichungen der EC25, EC50 und EC75 unter IFN α und IFN γ Stimulation	37
4.11	Darstellung der kalkulierten Sezernierungskurven unter IFN α Stimulation . .	37
4.12	Darstellung der kalkulierten Sezernierungskurven unter IFN γ Stimulation . .	38
4.13	Intraindividuelle Variationsbreiten als %CV der EC25, EC50, max. IP-10 und y10/y1 im Vergleich	41
4.14	Schwankung der Standardabweichung der basalen IP-10 Produktion und der relativen Sensitivität gegenüber IFN α und IFN γ zueinander	41

Tabellenverzeichnis

3.1	verwendete Reagenzien	16
3.2	Zusammensetzung selbst hergestellter Lösungen	17
3.3	Verbrauchsmaterialien und Geräte	17
3.4	IFN α -Stimulationsreihen im ELISPOT	18
3.5	IFN γ -Stimulationsreihe im ELISPOT	18
3.6	FACS-Farbstoffe im ELISPOT	19
3.7	IFN α -/IFN γ -Stimulationsreihe des intrazellulären IP-10 FACS	20
3.8	Farbsubstrate der FACS Färbung	22
3.9	IFN α -/IFN γ -Stimulationsreihe im ELISA	22
3.10	Konzentrationen der IP-10 Standard-Verdünnungsreihe im ELISA	23
4.1	AK der FACS Färbung im ELISPOT	26
4.2	Gesamtauswertung der Ergebnisse des ELISPOT-Versuchs	30
4.3	EC50 (IFN in ng/ml) der IP-10 Sezernierung unter IFN α bzw. unter IFN γ Stimulation	38
4.4	Rohwerte der basalen IP-10 Sezernierung	39
4.5	Mittelwerte (IFN α und IFN γ), Standardabweichung (sd) und der Koeffizien- ten der Variabilität (%CV) der EC50 bzw. der Y10/Y1	40
5.1	Konzentrationen der IFN in den verschiedenen Versuchsansätzen	45

Danksagungen

Mein Dank gilt zu allererst **Dr. med. John Foerster** für die intensive Betreuung während der gesamten experimentellen Arbeit und bei der Abfassung der Dissertation. **Prof. Dr. Wolfram Sterry** danke ich für die Überlassung des Themas.

Ich danke den Mitgliedern der **AG von Prof. Dr. Walden** für die Möglichkeit ihre Laborgeräte zu benutzen. Vielen Dank für die erklärende Einführung und Hilfe bei Problemen mit dem Material. Ebenso möchte ich mich bei **Wajahn Kohlmann** und **Judith Junge** für die gute Arbeitsatmosphäre in unserer Arbeitsgruppe bedanken.

Mein besonderer Dank gilt **allen Probanden**, die mir immer wieder ihr Blut für die Versuche zur Verfügung gestellt haben.

Zu besonders großem Dank bin ich **Jörg Dieckmann** verpflichtet, der sich - trotz eigenem engen Zeitplan - immer wieder geduldig die Zeit genommen hat, die Probleme mit dem LaTeX-Programm zu lösen.

Nicht zuletzt gebührt mein Dank **meiner Familie** und **meinen Freunden**, die mich moralisch unterstützt und immer wieder motiviert haben, diese Arbeit fertig zu stellen.

Curriculum Vitae

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

Eidesstattliche Erklärung

Ich, Stefanie Beier, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema:“ Entwicklung eines IP-10 Bioassays zur Bestimmung der Interferon-Sensitivität“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, den 20. Juni 2007