

Kapitel 5

Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein Kultursystem zu etablieren, das die Analyse der IFN- γ Produktion von Th1 polarisierten naiven CD4⁺ Th-Zellen zuläßt. Dieses Kultursystem mußte APC unabhängig sein und die Stimulation und Kultivierung von kleinen, aber genau bestimmten Zellzahlen zulassen. Die Th1 Polarisierung in Form einer IFN- γ Induktion erfolgte durch die Zugabe von IL-12 und α IL-4. Es gelang erstmals auf der Ebene der naiven CD4⁺Th-Zellen eine Gruppe von gesunden Individuen und Patienten zu analysieren und zu vergleichen. Im Kollektiv der Gesunden konnten statistisch signifikante Unterschiede zwischen CD31⁺ und CD31⁻ CD45RA⁺CD45RO⁻CD4⁺Th-Zellen aufgezeigt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen die These von Th1 Shift bei Patienten mit RA erstmalig auch auf der Ebene der antigenunerfahrenen CD4⁺Th-Zellen.

5.1 Die magnetische Mehrparameter-Zellsortierung als Methode zur Isolierung von CD45RA⁺ CD45RO⁻ CD4⁺ Th-Zellen aus dem adulten peripheren Blut

Von vielen Arbeitsgruppen wurden zur Analyse von humanen naiven CD4⁺ Th-Zellen Nabelschnurblut-Zellen verwendet (Demeure et al., 1994; Delespesse et al., 1998). In der vorliegenden Arbeit wurde ein System etabliert, welches die Untersuchung von naiven Zellen aus dem peripheren Blut adulter Spender ermöglicht.

Die Population der humanen CD4⁺ Th-Zellen kann an Hand der Expression von Isoformen des CD45 Antigens (CD45RA/CD45RO) in Subpopulationen aufgeteilt werden. Untersuchungen mit "Recall"-Antigenen wie dem Tetanustoxin zeigten, daß CD4⁺ CD45RO⁺ CD45RA⁻ Th-Zellen maximal zur Proliferation und Zytokinproduktion angeregt werden können, während sich CD4⁺ CD45RA⁺

CD45RO⁻ Th-Zellen schlecht stimulieren lassen (Akbar et al., 1988). Es konnte gezeigt werden, daß die naiven Zellen nach Stimulation ihren CD45RA-Rezeptor nach und nach verlieren, gleichzeitig verstärkt die CD45RO Isoform ausprägen und sich zu Gedächtniszellen umwandeln.

Die Methode der Isolierung von CD45RA⁺ CD45RO⁻ CD4⁺ Th-Zellen mittels der magnetischen Mehrparametersortierung gewährleistet durch zwei aufeinander folgende CD4⁺ Anreicherungen mit sich daran anschließender Depletion der CD45RO⁺ Zellen eine ausreichend hohe Reinheit der gewünschten Zellfraktion und einen Ausschluß der schwach CD4⁺ exprimierenden Monozyten (CD4⁺ Th-Zellen >98%; CD45RA⁺ Th-Zellen >99%). Ohne die Trennung der naiven CD45RA⁺ Th-Zellen von den antigenerfahrenen CD45RO⁺ Th-Zellen wäre ein Analyse der Zytokinproduktion nach Stimulation der naiven Th-Zellen nicht möglich, da der Einfluß der antigenerfahrenen Zellen eine Aussage über den Zytokinstatus der naiven Zellen verhindern würde.

5.2 CD45RA⁺ CD45RO⁻ CD4⁺ Th-Zellkulturen

5.2.1 *In vitro* Aktivierung durch immobilisierte α CD3 und α CD28 Antikörper

Um naive Th-Zellen unter *in vitro* Bedingungen zur Proliferation und Zytokinexpression zu veranlassen, sind zellvermittelte Stimulationssignale notwendig. In dieser Arbeit wurden die Konzentrationen der immobilisierten α CD3/ α CD28 verwendet, die sich für eine optimale Proliferation und Zytokinexpression von CD45RA⁺ CD45RO⁻ CD4⁺ Th-Zellen als optimal erwiesen hatten (siehe Diplomarbeit S. Kimmig). Die Aktivierung der CD31⁺/CD31⁻ Th-Zellen durch dieses Stimulationssystem wurde im späteren Verlauf der Arbeit überprüft.

In der Literatur wird für die α CD3/ α CD28 Stimulation von naiven Th-Zellen eine Dauer von 48h beschrieben (Iezzi et al., 1998), da sonst eine Überstimulation zu Apoptoseprozessen führen würde. Zunächst wurde ausgetestet, ob die Anwesenheit von α CD3/ α CD28 über den gesamten Kulturzeitraum negative Auswirkungen auf die "Recovery" hat. Weder lichtmikroskopisch noch durchflußzytometrisch konnte ein

Absterben der Zellen beobachtet werden. Die Analyse der Zytokinexpression zeigte eindeutig höhere Werte in den langzeitstimulierten Kulturen (siehe Abb. 6), so daß keine negativen Effekte nachgewiesen werden konnten. Denkbar wäre ein Aktivitätsverlust der immobilisierten Antikörper nach einem gewissen Zeitraum oder eine zunehmende Instabilität.

5.2.2 *In vitro* Polarisierung

Als entscheidendes Signal für eine Entwicklung der naiven Zellen in die proinflammatorische Richtung wird das von den Makrophagen sezernierte Zytokin IL-12 angesehen (Wu et al., 1993). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Da IL-4 als wichtigstes Signal für die Polarisierung der Zellen in Th2 Richtung angesehen wird, ist die Polarisierung noch ausgeprägter, wenn zusätzlich zu IL-12 noch α IL-4 in die Zellkulturen gegeben wird, um die Entwicklung in die Th2 Richtung zu blockieren (Abb.5). Auch die Polarisierung der naiven CD45RA⁺ Th-Zellen zu Th2 - Zytokin produzierenden Zellen konnte gezeigt werden (Abb.6). Dies wurde jedoch nicht weiter verfolgt, da die Frequenzen der IL-4 positiven Zellen nach Polarisierung und zweimaliger Restimulation sehr niedrig sind. Hinzu kam, daß für zusätzliche Th2 polarisierte Ansätze parallel zu den Th1 Stimulationen nicht genügend Material zur Verfügung stand.

Für humane CD4⁺ Th-Zellen, die aus dem Nabelschnurblut isoliert wurden, führt eine Restimulation am vierten Kulturtag zu maximaler IFN- γ Produktion (Sornasse et al., 1996). In anderen laborinternen Arbeiten wurde die IFN- γ Produktion nach vier und sechs Kulturtagen verglichen. Die höchsten Zytokinwerte wurden nach sechs Kulturtagen sowohl für unpolarisierte, als auch für Th1 polarisierte Kulturen beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurde die IFN- γ Produktion nach fünf und sieben Kulturtagen verglichen. Es konnte gezeigt werden, daß eine Restimulation der Th1 polarisierten Zellen nach fünf Kulturtagen in Bezug auf die IFN- γ Produktion besser ist, als eine Restimulation nach sieben Tagen (Abb.7). Für die spätere Versuchsanordnung erwies sich eine Restimulation nach 5 Tagen auch als

zweckmäßig, da nach fünf Tagen das Kulturmedium in den 96-Wellplates verbraucht ist. Ein 1-Wellssystem bietet für diese Versuchsanordnung große Vorteile, da ein Umsetzen der Zellen immer mit entsprechenden Verlusten verbunden ist. Da der Kulturüberstand für einen IFN- γ ELISA genutzt wurde, konnte das verbrauchte Medium auch nicht gegen unverbrauchtes ausgetauscht werden.

5.3 CD4⁺ CD45RA⁺ CD45RO⁻ Th-Zellen: Eine homogene Population?

Vorausgegangene Experimente von S. Kimmig haben gezeigt, daß die Zytokinexpression von restimulierten CD45RA⁺Th-Zellen keine homogenen Frequenzen liefert. Besonders für das Effektorzytokin IFN- γ fiel eine große Varianz zwischen den einzelnen Spendern auf.

Eine mögliche Erklärung für diese Unterschiede könnte das Auftreten von antigenerfahrenen Zellen innerhalb der Population der CD4⁺ CD45RA⁺ CD45RO⁻ Th-Zellen sein. Denkbar wäre jedoch auch eine andere Erklärung. In der Kindheit und Jugend stammen die naiven Zellen aus dem Thymus, der sich im Laufe der Adoleszenz zurückbildet. Der Anteil der naiven CD4⁺ Th-Zellen nimmt zwar im Laufe des Lebens von über 90% im Nabelschnurblut auf 25-45% im peripheren adulten Blut ab (Demeure et al., 1994; Delespesse et al., 1998), ist aber auch im Senium immer noch nachweisbar. Die vorhandenen naiven Th-Zellen müssen nach der Thymusinvolutions klonal expandieren, um den Bestand nicht zu stark absinken zu lassen. Abhängig von den Bedingungen während der klonalen Expansion, z.B. der Anwesenheit von IFN- α , wären Unterschiede zwischen den Klonen denkbar.

S. Kimmig gelang es in ihrer Diplomarbeit erstmals auch bei gesunden Spendern Zellen, die ein für antigenerfahrene Zellen typisches Zytokinprofil aufwiesen, innerhalb des CD45RA⁺ CD45RO⁻ CD4⁺ Th-Zellkompartimentes zu detektieren. Sie war in der Lage, in der Fraktion der CD45RA⁺ CD4⁺ Zellen ein kleines Kompartiment an CD27⁻ T-Zellen nachzuweisen, das nach polyklonaler Stimulation zu 50% IFN- γ Produzenten beinhaltete. CD27⁻T-Zellen sind normalerweise ausschließlich in der Fraktion der CD45RO⁺ CD45RA⁻ CD4⁺ Th-Zellen zu finden und entstehen nach wiederholter Antigenstimulation (DeJonge et al., 1992). Es muß sich um einen äußerst stabilen

Phänotyp handeln, da nachgewiesen wurde, daß eine Reexpression des einmal „verlorenen“ CD27 Rezeptors auf isolierten Zellen aus dem peripheren Blut nicht mehr möglich ist (Hinzen et al., 1993). Es wurde diskutiert, ob es sich bei dieser Zellpopulation um hochspezialisierte Memory/Effektor Th-Zellen handeln könnte (Baars et al., 1995).

Zur Unterscheidung von naiven und antigenerfahrenen Zellen wird u.a. auch der CD31 Rezeptor herangezogen, der von einem Teil der CD45RA⁺ Th-Zellen exprimiert wird (DeLisser et al., 1994; Tanaka et al., 1992). Wenn CD27⁺ Th-Zellen innerhalb der CD4⁺ CD45RA⁺ Th-Zellen zu detektieren sind, befinden sie sich ausschließlich in der Population der CD31⁻ Th-Zellen, die somit einige antigenerfahrene Zellen enthalten könnte.

Es gibt noch mehr Hinweise in der Literatur, daß es sich bei den CD45RA⁺ CD45RO⁻ CD4⁺ Th-Zellen um keine homogene Population naiver Zellen handelt. Ergebnisse von D. Hamman sprechen dafür, daß von den aktivierten CD45RA⁺ Th-Zellen in einem Übergangsstadium ein kleiner Teil der ehemals naiven Zellen beide Rezeptoren sehr intensiv exprimiert (CD45RA^{bright}/CD45RO^{bright}), während der größere Teil ebenfalls beide Rezeptoren mit viel geringerer Intensität exprimiert (CD45RA^{low}/CD45RO^{low}). Nach der Sortierung und Kultivierung dieser low-Zellen, wird ein Teil der Zellen zur reinen CD45RA⁺ Isoform, ein kleiner Teil prägt nur noch den CD45RO⁺ Rezeptor aus, und ca. die Hälfte der Zellen behält den CD45RA^{low}/CD45RO^{low} Phänotyp bei. Diese Beobachtungen sprechen dafür, daß ein Teil der CD45RA^{low}/CD45RO^{low} Th-Zellen antigenerfahren ist. Sie können aber in Abwesenheit von antigenen Stimuli zum naiven CD45RA⁺ Phänotyp konvertieren (Hamann et al., 1996).

Die Fraktion der CD45RA⁺ CD45RO⁻ CD4⁺ Th-Zellen scheint somit nicht zwangsläufig eine homogene Zellpopulation zu sein. Um den Einfluß von nicht klar definierten Zellen auszuschließen, wurden die CD4⁺ CD45RA⁺ CD45RO⁻ Th-Zellen auf der Ebene der CD31⁺/CD31⁻ getrennt analysiert.

5.4 CD31⁺ und CD31⁻ Th-Zellen

Man kann die CD45RA-Fraktion wie bereits beschrieben an Hand der CD31 Expression in zwei Kompartimente untergliedern (DeLisser et al., 1994; Tanaka et al., 1992), wobei die Fraktion der CD31⁻ Th-Zellen unter bestimmten Bedingungen Zellen mit antigenerfahrenem Zytokinmuster aufweist (Thiel et al., 1997).

Die aktivierte CD45RA⁺ Th-Zelle exprimiert noch relativ lange den CD31⁺ Rezeptor. Im Gegensatz dazu konvertiert der CD45 Rezeptor relativ schnell von der CD45RA Isoform in die CD45RO Isoform. Mit der Zeit muß jedoch auch das CD31 Molekül verloren gehen, da man CD31⁺ Zellen vorwiegend in der CD45RA⁺ Population finden kann (Torimoto et al., 1992; Stockinger et al., 1992). Durch die Trennung von CD31⁺/CD31⁻ Th-Zellen in die beiden Subsets sollen mögliche Beeinflussungen vermieden werden.

5.4.1 Isolierung der CD31⁺/CD31⁻ Populationen mit Hilfe der magnetischen Mehrparametersortierung

In zwei aufeinanderfolgenden Separationsschritten wurde für die CD31⁺ Fraktion eine >98% Reinheit erreicht, während die CD31⁻ Th-Zellpopulation nur mit einer Reinheit von \approx 90-93% isoliert werden konnte. Da die Reinheit der CD31⁺ Zellpopulation für die Untersuchungen der naiven Zellen absolut ausreichend war, wurde von weiteren Separationsschritten abgesehen.

5.4.2 Aktivierung und Kultivierung der CD31⁺ und CD31⁻ Th-Zell-Kulturen

Für die CD31⁺ und CD31⁻ Th-Zellen wurden die optimalen Stimulationskonzentrationen der immobilisierten α CD3/ α CD28 Antikörper überprüft. Hintergrund für diesen Versuch ist die bereits von vielen Arbeitsgruppen beschriebene unterschiedliche Aktivierungsschwelle für antigenerfahrene und naive Zellen. Antigenerfahrene Zellen reagieren auf wesentlich schwächere CD3/TCR vermittelte Stimulationssignale als naive Zellen (Luqman et al., 1992; Jong et al., 1991). Es wäre

denkbar, daß sich die CD31⁻ Th-Zellen, die unter Umständen antigenerfahrenen Zellen enthalten, hinsichtlich ihrer Aktivierungsschwelle von den CD31⁺ Th-Zellen unterscheiden. Die durchgeführten Versuche zeigten aber keine Unterschiede zwischen CD31⁺/CD31⁻ Th-Zellen auf der einen Seite und CD45RA⁺ Th-Zellen auf der anderen Seite.

Es konnten gering erhöhte Zytokinfrequenzen für IFN- γ , IL-2 und TNF- α im suboptimalen Stimulationsbereich für die CD31⁻ Th-Zellpopulation detektiert werden (Abb.10). Da die Unterschiede zwischen den Populationen vergleichsweise gering waren und sich bei optimalen Stimulationskonzentrationen die Effektorzytokinfrequenzen der beiden Populationen angleichen, wurde α CD3 in der Konzentration von 1 μ g/ml, die auch bei den CD45RA⁺ Th-Zellen zu einer optimalen Zytokinproduktion geführt hatte, eingesetzt.

5.4.3 IL-12 Titration

Um für den späteren Vergleich zwischen Th1 polarisierten naiven Th-Zellen von RA-Patienten und Gesunden einen optimalen Titrationsbereich festlegen zu können, in dem Unterschiede in der Induktionskinetik zwischen den beiden Gruppen detektierbar sind, wurde zunächst IL-12 über einen sehr großen Konzentrationsbereich titriert. Besonderes Interesse galt der minimalen IL-12 Konzentration, die ausreichend ist, um den Anteil der IFN- γ Produzenten im Vergleich zur unpolarisierten Kontrolle zu steigern. Es konnte gezeigt werden, daß bereits sehr niedrige Konzentrationen von IL-12 (0,01ng/ml) zu einer deutlichen Steigerung des Anteils der IFN- γ positiven Zellen führen.

Mit zunehmender IL-12 Konzentration ließ sich eine zunehmende Differenzierung der CD31⁺/CD31⁻ Th-Zellen zu IFN- γ Effektorzellen nachweisen, allerdings nur bis zu Konzentrationen von 0,1-0,2ng/ml. IL-12 Konzentrationen höher als 0,2ng/ml führen zu einem Absinken des Anteils der IFN- γ positiven Zellen. Dieses Phänomen wurde bei unterschiedlichen gesunden Spendern beobachtet und trat auch bei den mit der FACS-Methode sortierten Zellen auf (siehe Abb. 11/14).

Um auf der Ebene der naiven Zellen von RA-Patienten eine verstärkte Differenzierungsfähigkeit zu inflammatorischen Effektorzellen nachweisen zu können, wurden die Zellen mit drei unterschiedlichen Konzentrationen IL-12 stimuliert. Dadurch wurde es möglich, auch im suboptimalen Stimulationsbereich Unterschiede auf Rezeptorexpressionsebene zu detektieren, die eventuell im optimalen Stimulationsbereich nicht mehr nachweisbar gewesen wären.

5.5 Analyse des Zytokinmusters von Th 1 polarisierten CD31⁺/CD31⁻ Th-Zellen gesunder Spender

5.5.1 IFN- γ Expression nach IL-12 Induktion

Mit zunehmender IL-12 Konzentration zeigten alle gesunden Spender eine Zunahme der IFN- γ Produzenten von ungefähr 10% in den unpolarisierten Kulturen auf ca. 30% in den mit der höchsten IL-12 Konzentration stimulierten Ansätzen. Die Spender unterschieden sich vor allem in den Kontrollansätzen voneinander, reagierten aber dann relativ homogen auf das IL-12 Polarisierungssignal (Abb.18/20/21). Die deutlichste Reaktion zeigten alle Spender bei der höchsten IL-12 Konzentration, während die niedrigen Konzentrationen nur schwache Effekte auf den Anteil der IFN- γ Produzenten ausübten.

Die Streuung der Werte ist bei der CD31⁻ Th-Zellpopulation annähernd doppelt so groß wie die der CD31⁺ Zellfraktion. Sie lassen sich im niedrigen Konzentrationsbereich insgesamt schlechter als die positiven Zellen polarisieren und reagieren erst auf die letzte IL-12 Konzentration, dann aber mit erheblichen individuellen Unterschieden. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen von S. Kimmig überein, die ebenfalls eine größere Variabilität in der CD31⁻ Th-Zellsubpopulation beschrieben hat.

Die größere Streubreite der CD31⁻ Th-Zellen könnte sich mit dem Auftreten der unter Umständen antigenerfahrenen Zellen innerhalb der CD31⁻ Th-Zellpopulation erklären lassen.

Die Analyse des IFN- γ im Überstand durch den ELISA bestätigt die oben beschriebenen Phänomene. Hier lassen sich erst für die letzten beiden Titrationsstufen nennenswerte IFN- γ Konzentrationen detektieren. Während die CD31⁺ Th-Zellen ein sehr homogenes Titrationsverhalten mit minimaler Streuungsweite aufweisen, zeigen die CD31⁻ Th-Zellen eine 5 mal größere Streuungsweite (Abb.21). Obwohl mit beiden Methoden ähnliche Unterschiede zwischen den CD31⁺ und CD31⁻ Th-Zellen gemessen werden konnten, ist bei der FACS-Messung die Streuung größer.

Möglicherweise werden die Zellen durch die Restimulation und Fixierung unterschiedlich stark beeinflusst, so daß die Unterschiede erst nach der Kultur entstehen. Der ELISA ist in dieser Hinsicht eine einfachere Methode, ohne vergleichbare Störeinflüsse.

5.5.2 Expression von TNF- α und IL-2 im Laufe der Titration

Alle Spender zeigen im Vergleich zu den IFN- γ Analysen eine sehr homogene Zytokinexpression sowohl für IL-2 als auch für TNF- α . D.h., auf eine neutrale Stimulation reagieren alle Spender mit einer quantitativ vergleichbaren Zytokinantwort. Die Analyse zeigt, daß die CD31⁻ Th-Zellen eine annähernd doppelt so große Streubreite aufweisen, wie die CD31⁺ Th-Zellpopulation. IL-2 ist im Anfangsstadium der Aktivierung von naiven Zellen nicht spezifisch für ein proinflammatorisches oder ein antiinflammatorisches Zytokinmuster. Die Induktion des Effektorzytokins IL-2 ist unabhängig von der IL-12 Stimulation, da sich der Anteil der IL-2 positiven Zellen in den Kulturen, die mit IL-12 stimuliert wurden, nicht von der unpolarisierten Kultur unterscheidet (Abb.23).

TNF- α wird zu den proinflammatorischen Zytokinen gezählt (Romagnani et al., 1991). IL-12 induziert in naiven Th-Zellen die Sekretion von Th1 Zytokinen (Seder et al., 1993), allerdings werden direkte Effekte nur für die IFN- γ Expression beschrieben, die in dieser Arbeit auch gezeigt werden konnten. TNF- α selbst wird eine Th1 induktive Funktion zugeschrieben. Es gibt Hinweise darauf, daß TNF- α die verstärkte Expression von IL-1 und IFN- γ bewirken kann, wobei es sich nicht um einen unidirektionalen Prozeß handeln soll (Feldmann et al., 1996).

Es entsprach nicht den Erwartungen, daß sich die TNF- α Expression der Th1 polarisierten Kulturen nicht von der unpolarisierten Kontrollansätzen unterschied und auch im Laufe der Titration kein Anstieg des Anteils der Produzenten zu beobachten war.

5.6 Analyse der Patienten

Die Aussagen zu den Patientendaten können nur als Hinweise verstanden werden, da mit drei erkrankten Personen keine signifikanten Aussagen möglich sind.

Zwei von drei Patienten zeigten bereits in den unpolarisierten Kontrollansätzen einen Anteil von IFN- γ positiven Zellen, der oberhalb des Bereiches lag, der für die gesunden Spender ermittelt werden konnte (Abb.24). Besonders die beiden geringen IL-12 Konzentrationen induzierten bei diesen beiden Patienten im Vergleich zu den Gesunden und zur unpolarisierten Kontrolle deutlich mehr IFN- γ Produzenten. Die Gesunden wiesen statistisch keine signifikanten Unterschiede zwischen den unpolarisierten Kulturen und den mit 0,001ng/ml IL-12 polarisierten Kulturen auf (Abb. 20, 24). Der dritte Patient hatte besonders niedrige IFN- γ Werte in der Kontrolle (2%), besaß dann aber eine große IL-12 Sensibilität. D.h., in Bezug auf den niedrigen Ausgangswert steigerte sich der Anteil der IFN- γ positiven Zellen in einem stärkeren Maße (um das 10-fache), als dies bei den gesunden Spendern der Fall war, die nur eine 3-3,5-fache Steigerung erfuhren (Abb. 24).

Die Analyse der IL-2 und TNF- α Produzenten zeigte dagegen eine gute Übereinstimmung mit den Werten, die für die gesunden Spender ermittelt wurden. Sowohl die Induktion von TNF- α als auch von IL-2 zeigte keine Unterschiede zwischen den unpolarisierten und den IL-12 stimulierten Kulturen. Demnach scheinen sich Gesunde und RA-Patienten hauptsächlich in Bezug auf die Expression des Th1 Zytokins IFN- γ zu unterscheiden.

Man kann für diese drei Patienten also eine erhöhte IFN- γ Induktionsfähigkeit auf der einen Seite, und für zwei von drei Patienten ein bereits proinflammatorisches

Zytokinmuster im unpolarisierten Zustand konstatieren. Diese Arbeit unterstützt die "Th1-Shift" These, die in der Literatur für die antigenerfahrenen CD4⁺ Zellen von RA-Patienten formuliert wurde. Unklar ist, wie es zu diesem Unterschied zwischen den gesunden Spendern und den RA-Patienten kommt. Als Erklärung wäre es zum Beispiel möglich, daß die Patienten auf Grund einer genetischen Prädisposition verstärkt den IL-12 Rezeptor exprimieren und so eine schnellere Signaltransduktion möglich ist, die zu einer verstärkten IFN- γ Expression führt.

5.7 MACS- und FACS-Sortierung im Vergleich

Die magnetische Mehrparameter Zellsortierung ist eine gut etablierte Methode, die auch von anderen Arbeitsgruppen zur Isolierung von naiven CD4⁺ Th-Zellen, die anschließend kultiviert wurden, genutzt wird. Für das Zielexperiment dieser Arbeit erwiesen sich jedoch zwei wesentliche Punkte als ungünstig. Zum einen war der zeitliche Aufwand, der für eine vollständige Isolierung der CD31⁺/CD31⁻ Th-Zellen aus dem peripheren Blut benötigt wurde vergleichsweise groß (zehn bis zwölf Stunden). Dieser lange Arbeitsprozeß führte unvermeidlich zu einer Belastung der Zellen. Zum anderen mußte die Zellzahl in einer Zählkammer lichtmikroskopisch bestimmt werden. Ein Zählfehler wirkt sich bei kleinen Zellzahlen stärker aus, als bei großen. Durch mehrfaches Zählen und Arbeiten mit dem Mittelwert der Zellzahlbestimmungen wurde versucht, den Fehler so klein wie möglich zu halten. Die Zellzahl konnte nicht beliebig oft bestimmt werden, da die Zellmenge bei vielen Versuchen kaum für alle Ansätze ausreichte und jede Zählung einen Zellverlust bedeutete. Eine wirklich exakte Bestimmung der Zellzahl ließ diese Methode demnach nicht zu.

Mit der fluoreszenzaktivierten Zellsortierung (FACS) ist es möglich, exakte Zellzahlen zu bestimmen. Die Reinheit der Sortierung ist für die CD31⁺ Fraktion mit der der magnetischen Mehrparameter Zellsortierung vergleichbar (>95%), für die CD31⁻ Zellen lag sie mit ca. 85% deutlich schlechter. In der Regel konnte mit einer FACS-Sortierung ca. zwei bis drei Stunden gegenüber der MACS-Sortierung eingespart

werden, so daß die Zellen schneller in Kultur genommen werden konnten. Die extrem hohen hygienischen Anforderungen, die für das Wachstum der Zellen unabdingbar sind, konnten aber im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit nicht so optimiert werden, daß die FACS-Methode als die Methode der ersten Wahl bezeichnet werden könnte. Der Anteil der kontaminierten Zellproben lag zeitweise bei über 80% und konnte trotz intensiver Bemühungen kaum gesenkt werden. Während des Sortierungsvorganges sind die Zellen relativ hohen Drücken und Beschleunigungen ausgesetzt. Dies beeinflußt die Vitalität der Zellen nach der Sortierung zusätzlich negativ.

Es gelang einige Male, die CD4⁺ Th-Zellen von gesunden Spendern mit Hilfe des FACS-Sorters auf CD31⁺ und CD31⁻ Th-Zellen zu sortieren und nach fünf Tagen in Kultur zu analysieren. Insgesamt zeigen die beiden Populationen ein ähnliches Titrationsverhalten wie die Zellen, die mit der MACS-Methode sortiert wurden. Ein deutlicher Anstieg der IFN- γ Produzenten war erst bei höheren IL-12 Konzentrationen sichtbar, während der Anteil der IL-2 und TNF- α Produzenten in den polarisierten und unpolarisierten Kulturen konstant blieb (Abb. 15).

Abschließend läßt sich sagen, daß beide Sortiermethoden geeignet sind, um CD31⁺/CD31⁻ Th-Zellen aus dem peripheren adulten Blut zu isolieren. Es hat sich aber gezeigt, daß die MACS-Sortierung die für die Zellen schonendere Methode darstellt. Sollte es aber möglich sein, die Kontaminationsprobleme deutlich zu reduzieren, so wäre die FACS-Sortierung im Hinblick auf die geringen Zellzahlen die Methode der Wahl, um ein größeres Patientengut zu untersuchen.

5.8 Weiterführende Experimente

In weiterführenden Experimenten sollte überprüft werden, ob sich die Unterschiede, die sich in dieser Arbeit aus dem Vergleich zwischen Gesunden und RA-Patienten auf der Ebene der CD31⁺ und CD31⁻ Th-Zellen ergeben haben, durch weitere Patientenanalysen bestätigen lassen. Da in der Literatur für diese Erkrankung auch eine Verminderung der antiinflammatorischen Zytokine beschrieben wurde, sollte ein Kultursystem etabliert werden, das den Vergleich der Th2 spezifischen Zytokine von Patienten und Gesunden ermöglicht.

Diskussion