

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
der Universität Würzburg

Direktorin: Prof. Dr. med. Eva-Bettina Bröcker

**Untersuchung der Interaktionskinetik naiver humaner T-Zellen und
dendritischer Zellen in dreidimensionaler Kollagenmatrix und Erfassung
der T-Zell-Aktivierung und - Proliferation unter
Oxidative Mitogenese-Bedingungen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät Würzburg

vorgelegt von
Sabine Brookman-Amisshah
aus Regensburg

Würzburg, Mai 2007

Referent: Prof. Dr. med. P. Friedl

Koreferent: Prof. Dr. M. Lutz

Dekan: Prof. Dr. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung : 23. November 2007

Die Promovendin ist Ärztin

Meinem Sohn Samuel Johannes Kwame

Abstract

Hintergrund: Die Aktivierung naiver T-Zellen ist Folge eines Kontaktes zu Antigen präsentierenden Zellen (APC), die auf ihrer Oberfläche Antigene im MHC-Peptid-Komplex präsentieren. Bisherige Daten zur Kontaktdauer und -dynamik sowie zur nachfolgenden Aktivierung und Proliferation naiver T-Zellen beruhen meist auf Ergebnissen von Experimenten, die in Flüssigkulturmodellen gemacht wurden. Aus diesen resultierte die Beschreibung des sog. statischen Interaktionskonzeptes. Die T-Zell-Aktivierung wird überwiegend als Folge eines einzelnen lang dauernden und statischen Kontaktes zwischen T-Zelle und APC beschrieben (single encounter model), der zu einer kontinuierlichen Stimulation des T-Zell-Rezeptors über mehrere Stunden führt. Dem gegenüber steht das Konzept dynamischer Interaktionen, in dem T-Zell-Aktivierung und -Proliferation als Folge dynamischer, kurz dauernder und sequentieller Kontakte zu einer oder zu verschiedenen DC beschrieben werden (serielles Kontaktmodell).

Methode: Da Flüssigkulturen jedoch nicht annähernd das dreidimensionale Netzwerk lymphatischer Organe widerspiegeln, in dem der Kontakt zwischen T-Zellen und APC in vivo stattfindet, sollten in der vorliegenden Arbeit naive T-Zellen und dendritische Zellen (DC) in einer dreidimensionalen (3D) Umgebung kokultiviert und auf Interaktionsdynamik und Mitoseaktivität untersucht werden. Im Verlauf der oxidativen Mitogenese mit autologen DC in einer 3D Kollagenmatrix über 56 Stunden wurden humane naive T-Zellen auf Dauer und Dynamik der Zell-Zell-Interaktionen videomikroskopisch sowie die nachfolgende Aktivierung und Proliferation mittels Durchflusszytometrie untersucht.

Ergebnisse: Sowohl während der Oxidativen Mitogenese als auch in nicht stimulierten Kontrollkulturen wurden bei naiven T-Zellen fast ausschließlich kurz dauernde, wenige Minuten anhaltende Kontakte zwischen T-Zellen und DC beobachtet. Die mediane Dauer der Kontakte der Kontroll-T-Zellen zu DC war dagegen während aller Beobachtungsintervalle kürzer als die der naiven T-Zellen unter Oxidative Mitogenese-Bedingungen. Es ergaben sich in der Gesamtpopulation der naiven T-Zellen in allen Beobachtungszeiträumen

signifikante Unterschiede bezüglich der medianen Interaktionszeiten unter Oxidative Mitogenese-Bedingungen und Kontrollbedingungen. Die mediane Interaktionszeit unter Oxidative Mitogenese-Bedingungen lag in allen Beobachtungszeiträumen bei über fünf bis zehn Minuten, unter Kontrollbedingungen jeweils zwischen drei und sechs Minuten (p jeweils $< 0,001$). Lediglich in der Gruppe der anfangs DC adhärenen T-Zellen nach 24 – 32 Stunden konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Dauer der Kontakte festgestellt werden ($p = 0,461$). Sowohl die Oxidative Mitogenese – wie auch die Kontrollkulturen zeigten nahezu ausschließlich dynamische und serielle Kontakte zu DC, multizelluläre Aggregate und statische Kontakte traten dagegen nur sehr selten auf. Infolge der Oxidativen Mitogenese, nicht jedoch in Kontrollkulturen, traten 40 % der T-Zellen in den Zellzyklus und durchliefen bis zu sechs Mitosen innerhalb von 96 h.

Ausblick: Die Oxidative Mitogenese ist ein suffizientes Modell der vollständigen Aktivierung humaner peripherer naiver T-Lymphozyten in Kokultivierung mit DC. Passend zu in vivo Befunden sowie in vitro Daten muriner TCR-transgener T-Zellen erfolgt die Aktivierung und nachfolgende Proliferation überwiegend durch dynamische und kurzlebige Interaktionen. Die vorliegende Arbeit bestätigt das serielle Kontaktmodell für die Aktivierung naiver humaner T-Zellen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Abkürzungsverzeichnis.....	1
1.2	Grundlagen der T-Zell-Aktivierung.....	2
1.3	Topographie der immunologischen Synapse.....	3
1.4	T-Zell-APC-Interaktion und Bildung der immunologischen..... Synapse	3
1.5	Voraussetzungen für die Aktivierung von naiven und..... Gedächtnis-T-Zellen	4
1.6	Rolle der T-Zell-Migration bei der Antigenerkennung.....	4
1.7	Grundlagen der T-Zell-Migration.....	4
1.8	Physikalische Kriterien der T-Zell-APC-Interaktion.....	5
1.8.1	Statisches Interaktionskonzept.....	5
1.8.2	Dynamisches Interaktionskonzept.....	5
1.9	Zeil der vorliegenden Arbeit.....	6
2	Material und Methoden.....	8
2.1	Zellisolation.....	8
2.1.1	Isolation peripherer mononukleärer Zellen (PBMC) aus..... Vollblut	8
2.1.2	Isolation von CD4 ⁺ T-Zellen.....	10
2.1.3	Isolation naiver CD45RA ⁺ T-Zellen.....	11
2.1.4	Generierung humaner dendritischer Zellen aus PBMC.....	12
2.2	Oxidative Mitogenese.....	13
2.3	CFSE-Färbung und Durchflusszytometrie der T-Zell-Proliferation sowie statistische Berechnungen	14
2.4	Inkorporation von T-Zellen und dendritischen Zellen in..... 3D-Kollagenmatrices	16
2.5	Zeitraffer-Videomikroskopie.....	17

2.6	Analyse der Interaktionsdauer zwischen T-Zellen und..... dendritischen Zellen	17
3	Ergebnisse.....	19
3.1	Etablierung der Methoden zur Isolation von CD4 ⁺ T-Zellen..... und dendritischen Zellen	19
3.1.1	Reinheit und fehlende Voraktivierung der Gesamt-CD4 ⁺ -Zellpopulation	19
3.1.2	Isolation und Typisierung dendritischer Zellen.....	23
3.2	Interaktionen naiver CD4 ⁺ T-Zellen mit dendritischen Zellen...	24
3.3.	Aktivierung und Proliferation naiver T-Zellen nach..... Kokultivierung mit dendritischen Zellen	37
3.4	Effizienz der Oxidativen Mitogenese im Vergleich mit Antigen-spezifischer T-Zell-Aktivierung	42
4	Diskussion.....	45
4.1	Methodenetablierung zur Isolation nicht voraktivierter..... menschlicher naiver T-Zellen	45
4.2	Oxidative Mitogenese naiver T-Zellen als quantitatives Modell. der Aktivierung naiver T-Zellen	46
4.3	Bestätigung des seriellen Kontaktmodells für naive humane ... T-Zellen	47
4.4	Schlussfolgerungen.....	51
5	Zusammenfassung.....	53
6	Literaturverzeichnis.....	55

1 Einleitung

1.1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
APC	Antigen Presenting Cell (Antigen präsentierende Zelle)
aPHP	autologes Pseudohumanplasma
CD	Cluster of Differentiation
CFSE	Diacetate Succinimydyl Ester
CTLA-4	Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4
DC	Dendritic Cell (Dendritische Zelle)
ECM	Extrazelluläre Matrix
FACS	Fluorescence Activated Cell Scanning/Sorting (= Fluoreszenzaktivierte Durchflusszytometrie)
FCS	Fetal Calf Serum (Fötales Kälberserum)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FSC	Forward scatter (Vorwärtsstreulicht)
GM-CSF	Granulocyte Monocyte Colony Stimulating Factor (Granulozyten-Monozyten koloniestimulierender Faktor)
ICAM-1	Intercellular Cell Adhesion Molecule-1
IFN- γ	Interferon-Gamma
IL-2	Interleukin-2
IS	Immunologische Synapse
Lck	Lymphocyte Specific Protein Tyrosin Kinase p56
LFA-1	Leucocyte Function Antigen Molecule-1
LFA-3	Leucocyte Function Antigen Molecule-3
MEM	Minimal Essential Medium
MHC	Major Histocompatibility Complex (= Haupthistokompatibilitätskomplex)
MTOC	Microtubule Organizing Center
MTP-MMP	Matrix-Metalloproteinase Typ I
NaIO ₄	Natrium-Iodat
OVA	Ovalbumin
OxMi	Oxidative Mitogenese
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells (= einkernige Zellen des peripheren Blutes)
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
SMAC	Supramolecular Activation Cluster
SSC	Sideward Scatter (= Seitwärtsstreulicht)
TCR	T Cell Receptor (= T-Zell-Rezeptor)
TNF- α	Tumor Nekrosis Factor-alpha
uPA	urokinasartiger Plasminogen-Aktivator
uPAR	Rezeptor des uPA
Zap70	Zeta-chain associated protein 70 kD

1.2 Grundlagen der T-Zell-Aktivierung

Die Funktion des menschlichen adaptiven Immunsystems beruht auf der Kommunikation immunkompetenter Zellen mittels sezernierter Faktoren und Zell-Zell-Interaktionen, die zur Antigen-spezifischen Immunität gegenüber Mikroorganismen (Viren, Bakterien, Pilzen) und Parasiten führt. Beteiligt an einer spezifischen Immunantwort sind T- und B-Lymphozyten und deren Produkte, spezifische Antikörper und Zytokine.

Nach ihrer Aktivierung differenzieren B-Lymphozyten zu Antikörper sezernierenden Plasmazellen und vermitteln damit die humorale Immunität. Die Aktivierung von T-Lymphozyten führt dagegen zu deren Proliferation sowie zur nachfolgenden Differenzierung mit Sekretion verschiedener Zytokine sowie zu Effektorfunktionen, insbesondere die zellvermittelte Zytotoxizität. CD4⁺-T-Helferzellen vermitteln die Aktivierung weiterer Zellen, z.B. B-Zell-Aktivierung und Antikörperproduktion sowie die Aktivierung zytotoxischer CD8⁺ Zellen.

Die Aktivierung der T-Zelle erfordert die Interaktion des T-Zell-Rezeptors mit kognatem Peptid, das von den Antigen präsentierenden Zellen (APC) über MHC-Moleküle auf der Oberfläche präsentiert wird. CD8⁺-T-Zellen erkennen Peptide nur in Verbindung mit einem MHC-Klasse-I-Molekül, während CD4⁺-T-Zellen mit MHC-Klasse-II-Molekülen restingiert sind. Die effektivsten APC sind dendritische Zellen (DC), die phagozytotisch aufgenommene Proteine sowohl über MHCII- als auch MHCI-Molekülen präsentieren^{2,5}. Die effektive Interaktion von TCR und MHC Molekülen erfordert eine physikalische Interaktion zwischen T-Zelle und APC, die zur Ausbildung einer molekularen Kontaktstruktur führt, die als „immunologische Synapse“ bezeichnet wird.

Es kommt im Rahmen der Aktivierung einer naiven T-Zelle zunächst zur intrazellulären Signaltransduktion in die T-Zelle, zum Einstrom von Calcium-Ionen^{35,36} und letztendlich zur Transkription spezifischer Gene. Folge ist u. a. eine vermehrte Expression spezifischer Oberflächenproteine der T-Zelle, die experimentell auch als Aktivierungsmarker dienen, z. B. CD25 (Alpha-Untereinheit des IL-2-Rezeptors), CD69 oder des Transferrinrezeptors. Als frühes Zeichen der Aktivierung kommt es außerdem zur Sekretion von IL-2, das

als Wachstums- und Differenzierungsfaktor wirkt. Folge der T-Zell-Aktivierung ist schließlich der Eintritt der T-Zelle in den Zellzyklus mit Zunahme des Zellvolumens infolge gesteigerter Proteinbiosynthese (Blastenbildung) sowie die klonale Proliferation der T-Zelle.

1.3 Topographie der immunologischen Synapse

Die immunologische Synapse (IS) wird in einen zentralen Bereich (ca. 15 nm Durchmesser) und einen peripheren Bereich (ca. 48 nm Durchmesser) unterteilt^{14,16,17}. LFA-1 und ICAM-1 sind Bestandteile des peripheren Ringes^{14,15,16,17,45}. Die initiale Phase der Interaktion zwischen T-Zelle und DC ist antigenunabhängig und wird vor allem durch low-avidity-LFA-1-ICAM-1-Interaktionen bestimmt⁴⁵. TCR-Bindung und -Signalgebung finden dagegen im zentralen Teil der Synapse statt.

1.4 T-Zell-APC-Interaktion und Bildung der immunologischen Synapse

Nach initialer kognater Bindung des T-Zell-Rezeptors (TCR) einer naiven T-Zelle an einen MHC-Peptid-Komplex auf der DC wird der Kontakt über verschiedene Adhäsionsmoleküle der DC und der T-Zelle stabilisiert. Auf Seiten der DC sind dies ICAM-1 (intercellular cell adhesion molecule-1)^{14,16,17}, LFA-1 (leucocyte function antigen molecule-1) und LFA-3 (leucocyte function antigen molecule-3), auf Seiten der CD4⁺-T-Zellen LFA-1, ICAM-1 und CD-2⁶². Die spezifische Bindung des TCR an den MHC-Peptid-Komplex führt zu einer Signalkaskade, einschließlich Kalziumeinstrom, Bildung einer Adhäsionsplattform sowie Aktivierung der Gentranskription⁶³. Die minimale Kontaktzeit zwischen TCR und MHC-Peptid-Komplex, die zur Aktivierung naiver T-Zellen benötigt wird, beträgt bei Aktivierung durch oberflächengebundene MHC-Peptid-Komplexe oder B-Zellen mindestens 20 Stunden⁴¹. In Gegenwart reifer DC verkürzt sich die Dauer des benötigten TCR-Signals auf etwa sechs Stunden, vermutlich aufgrund der besseren Kostimulation⁴⁰.

1.5 Voraussetzungen für die Aktivierung von naiven und Gedächtnis-T-Zellen

Neben der Aktivierung und Differenzierung zu T-Helfer-Zellen entwickelt sich ein nicht genau bekannter Anteil an T-Zellen zu Gedächtnis-T-Zellen. Im Vergleich zu naiven T-Zellen treten Gedächtnis-T-Zellen nach TCR-Aktivierung schneller in den Zellzyklus mit der Bildung von Effektor-T-Zellen ein. Im Vergleich zu naiven T-Zellen exprimieren Gedächtnis-T-Zellen verschiedene Adhäsionsmoleküle wie z.B. LFA-1, CD28 oder β 1-Integrine auf einem höheren Niveau sowie teils in einem voraggregierten Zustand^{28,44}.

Ob und in welchem Zeitraum eine T-Zelle aktiviert wird, ist u. a. auch von der Art der APC abhängig. Naive T-Zellen benötigen zur Aktivierung den Kontakt zur potentesten APC der T-Zell-Aktivierung, der DC². Dem gegenüber kann eine Gedächtnis-T-Zelle sowohl von einer DC, einem Makrophagen als auch von einer B-Zelle aktiviert werden.

Jüngere Untersuchungen haben gezeigt, dass naive und Gedächtniszellen unterschiedliche Formen der immunologischen Synapse ausbilden⁶⁷.

1.6 Rolle der T-Zell-Migration bei der Antigenerkennung

Die Migration von T-Zellen innerhalb lymphatischer Organe ist Voraussetzung für die Erkennung von APC und die Aufnahme von Zell-Zell-Kontakten.

1.7 Grundlagen der T-Zell-Migration

Die Migration von T-Zellen folgt dem Prinzip der „amöboiden“ Migration^{46,49}. Diese ist gekennzeichnet durch eine schnelle Bewegung der Zelle, die unterstützt wird durch ein diffuses Zytoskelett und geringe Adhäsionskräfte. Die Bewegung und Orientierung der Zelle wird beeinflusst durch eine Stimulation verschiedener Zytokine^{46,47,48}. Die Fortbewegung von T-Zellen mit kurz dauernden und schwachen Kontakten zum Substrat erfolgt unter weitgehendem bis teilweise vollständigem Verzicht auf Integrin vermittelte Adhäsion sowohl in

vitro^{46,50} als auch in vivo^{46,51,52}. T-Zellen sind stark formbar und bewegen sich mit für Zellen hohen Geschwindigkeiten von bis zu 30 $\mu\text{m}/\text{min}$ ^{46,53}. Ihre Formbarkeit wird durch an der Innenseite der Zellmembran anliegendes, in kurzen und lichtmikroskopisch somit diffusen Filamenten angeordnetes (cortical filamentous) Aktin ermöglicht, das der Zelle sowohl Flexibilität als auch Stabilität verleiht^{46,50,54}. Neben Integrinen wird auch LFA-1 als migrationsförderndes Molekül auf T-Zellen diskutiert⁶⁸.

1.8 Physikalische Kriterien der T-Zell-APC-Interaktion

Über die Kinetik der T-Zell-APC-Interaktion mit nachfolgender Aktivierung der T-Zelle gibt es verschiedene Konzepte. Dies betrifft insbesondere das Wechselspiel von T-Zell- und APC-Bewegung bzw. die Ausbildung einer stabilen Adhäsion, die der Migration entgegenwirkt.

1.8.1 Statisches Interaktionskonzept

Das statische Interaktionskonzept stellt den ersten und ältesten Ansatz zur Beschreibung der Interaktionen zwischen T-Zellen und APC dar. Die T-Zell-Aktivierung wird hier als Folge eines lang dauernden und statischen Kontaktes zwischen T-Zelle und APC beschrieben (statisches Kontaktmodell)^{3,4,5}. Die T-Zelle muss dabei über mehrere Stunden getriggert werden, um vollständig aktiviert zu werden^{23,41,40}.

Nach der ersten Kontaktaufnahme zur Antigen präsentierenden B-Zellen^{23,36,37,69} oder zu MHC-Peptid-Komplex überzogenen Oberflächen^{13,23} stoppt die Migration^{9,13,33}. Dieses Stopp-Signal wird als erster Schritt bei der Formierung der immunologischen Synapse angesehen¹³.

1.8.2 Dynamisches Interaktionskonzept

Dem Modell der statischen Interaktion steht das dynamische oder serielle Interaktionsmodell gegenüber, in dem T-Zell-Aktivierung und -Proliferation als

Folge dynamischer, kurz dauernder und sequentieller Kontakte zu einer oder zu verschiedenen DC beschrieben werden (serial encounter model). Nach Kontaktaufnahme einer T-Zelle mit einer DC bewegt sich insbesondere die T-Zelle weiter^{10,35,36,37}. Sowohl für Antigen-abhängige und unabhängige Interaktionen wurde dieser persistierende amöboide Migrationstyp gezeigt, der zwar eine vorübergehende Reduktion der Migrationsgeschwindigkeit von ca. 8 auf 3 $\mu\text{m}/\text{min}$ bewirkt^{10,23}, nicht jedoch einen kompletten Migrationsstopp der T-Zelle.

Trotz der meist kurzen Dauer der Zellkontakte resultierte jeweils die vermehrte Expression von CD25 als Zeichen einer Aktivierung der T-Zellen. Außerdem kam es bei Kontaktaufnahme und Migration der T-Zelle über die Oberfläche der APC zum Ca^{2+} -Einstrom, der bis zum Loslösen der T-Zellen oder kurz zuvor andauerte^{23,43}. In Zusammenschau legen diese Befunde nahe, dass sowohl eine Serie kurzlebiger als auch ein einzelner lang dauernder Kontakt zur effektiven Signaltransduktion und Aktivierung der T-Zelle führt. Somit würde gemäß dem Modell serieller Kontakte die T-Zell-Aktivierung und –Proliferation aus einer Aufsummierung sequentieller kurzlebiger Signalstöße resultieren, während stabile Langzeitkontakte ein eher kontinuierliches Signal vermitteln^{23,43}.

1.9 Ziel der vorliegenden Arbeit

Im Rahmen des langfristigen Ziels der vergleichenden Untersuchung der Kontaktdynamik und molekularen Interaktionsfläche naiver und voraktivierter bzw. Gedächtnis-T-Zellen mit Antigen präsentierenden DC sollte im Rahmen dieses Projekts die Gewinnung humaner naiver T-Zellen etabliert und in funktionellen Untersuchungen charakterisiert werden. Zunächst sollten mittels negativer Selektion hochreine naive CD45RA^+ -Zellen gewonnen und auf isolationsbedingte Voraktivierung bzw. Aktivierbarkeit durch DC untersucht werden. Weiterhin sollte geklärt werden, ob naive CD4^+ -Zellen serielle und dynamische Interaktionen mit DC eingehen, vergleichbar zu Daten an CD4^+ -Gesamtpopulationen, und ob diese Interaktionen zu einer adäquaten

Aktivierung und Proliferation der T-Zellen führen. Die Daten der Interaktionskinetik naiver humaner T-Zellen sollen die Grundlage liefern für zukünftige analoge Untersuchungen an T-Gedächtniszellen.

2 Material und Methoden

2.1 Zellisolation

Um sowohl humane DC als auch naive CD4⁺ Zellen zu gewinnen, wurden zunächst periphere mononukleäre Zellen (PBMC) aus Vollblut isoliert.

Mittels positiver Selektionierung wurden CD4⁺ Zellen erhalten, von denen dann die Fraktion der Gedächtnis-T-Zellen durch negative Selektionierung abgetrennt wurde, so dass eine reine Population naiver CD4⁺-Zellen resultierte. Zur Ausreifung dendritischer Zellen wurden Monozyten mittels Zelladhärenz aus PBMC isoliert, kultiviert und mittels Zytokinzugabe ausdifferenziert.

2.1.1 Isolation peripherer mononukleärer Zellen aus Vollblut (PBMC)

Zur Gewinnung peripherer mononukleärer Zellen wurden einem gesunden Spender 20 –100 ml Blut in eine heparinisierte Spritze (Liquemin, Roche) entnommen und mit PBS (phosphatgepufferte physiologische Salzlösung) (70% des entnommenen Blutvolumens) verdünnt.

Dann wurden 15 ml Ficoll (Lymphoprep, Dichte 1,077 g/ml; Progen) als Trennmedium in ein 50 ml Zentrifugationsröhrchen vorgelegt und vorsichtig mit dem verdünnten Blut überschichtet.

Bei der anschließenden Zentrifugation (35 min., 1200 rpm, 4°C) wurden die im Blut enthaltenen Zellen gemäß ihrer Dichte aufgetrennt. Wie aus Abbildung 1 hervorgeht, sanken Zellen höherer Dichte (Erythrozyten, neutrophile Granulozyten) durch die Ficollschicht auf den Röhrchenboden, während leichtere Zellen (PBMC) auf der Ficollschicht und sehr leichte Zellen (z. B. Thrombozyten) auf der Plasmaschicht zu liegen kamen.

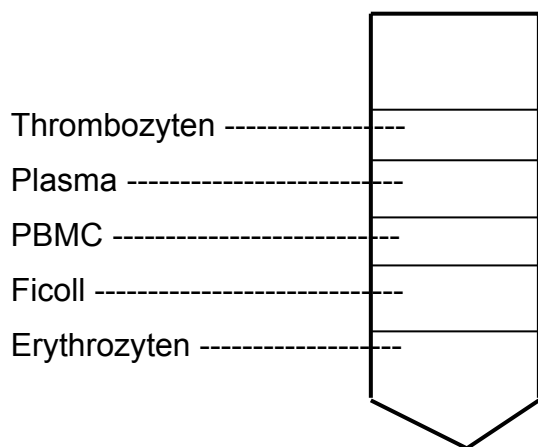


Abb. 1. Fraktionierung von Vollblut und Abtrennung der Zellen über einen Ficoll-Gradienten

Danach wurden mit einer Plastikpasteurpipette die Thrombozyten und anschließend das Plasma abgehoben. Schließlich wurde der auf dem Ficoll liegende PBMC-Ring abgenommen und in ein 50 ml Röhrchen gegeben, in das PBS vorgelegt worden war.

Das für die DC-Kultivierung abgehobene Plasma wurde zentrifugiert (10 min., 3000 rpm, 4°C), sterilfiltriert und komplementinaktiviert (30 min., 56 °C). Um das Trennmedium von den Zellen abzuwaschen, wurde das Röhrchen nach Auffüllen mit PBS bei 300 g für 20 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und verworfen und der Waschschrift nochmals wiederholt. Das Sediment wurde nun, abhängig von der Menge des entnommenen Blutes, in 5 – 20 ml PBS resuspendiert.

Zellzählung

Um die Ausbeute der PBMC-Isolation zu erfassen, wurde die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Um tote Zellen zu identifizieren, wurde eine Portion der Zellsuspension (ca. 20µl) mit Trypanblau verdünnt. Während lebende Zellen sich mit Trypanblau nicht anfärben, wird die Zellmembran geschädigter Zellen von diesem Farbstoff penetriert, so dass sich tote Zellen blau anfärben und so von der Zählung ausgeschlossen werden können.

Jeweils vier große Quadranten der Kammer wurden ausgezählt und der Mittelwert für einen Quadranten berechnet.

Die Zellzahl wurde anhand folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl} = Z \times 10^4 \times F \times V$$

Z = mittlere Zellzahl aus vier ausgezählten großen Quadranten

F = Faktor, um den die Zellsuspension für die Zählung verdünnt wurde

V = Volumen in ml der zu bestimmenden Zellsuspension

2.1.2 Isolation von CD4⁺ T-Zellen

Zur positiven Selektionierung der CD4⁺ T-Zellen wurden Antikörper gekoppelte Beads verwendet. Dabei handelt es sich um einen Eisenkern enthaltende magnetisierbare Polystyrolkugeln, die in diesem Fall mit Anti-CD4-Antikörpern (Maus-anti-Human) behaftet waren.

Die Beads wurden vor jeder Zellseparation zweimal mit PBS gewaschen, um Rückstände zellschädigender Konservierungsmittel zu entfernen.

Die PBMC wurden nun mit den Beads gemischt (85 µl der Antikörperlösung auf 10 ml Vollblut) und die Zellen-Beads-Suspension anschließend 20 Minuten bei 4°C inkubiert.

Homogenität wurde erzielt, indem die Zellsuspension während der Inkubation auf einem Rollentaumelinkubator kontinuierlich vermischt wurde.

Nach der Inkubation wurde die Suspension für zwei Minuten in einen geeigneten Magnetständer (Invitrogen Europe) gestellt, um die an die Beads spezifisch gebundenen CD4⁺ Zellen von den CD4⁻ Zellen abzutrennen.

Der Überstand, der die CD4⁺ Zellen enthielt, wurde abgenommen und in ein weiteres Röhrchen im Magnetständer überführt.

Die an die Beads gebundenen Zellen des ersten Röhrchens wurden nun mit 10 ml PBS/2% FCS (fetales Kälberserum) resuspendiert und auf diese Weise

sechsmal gewaschen. Die Beads wurden in 0,5 ml PBS gesammelt und in ein Eppendorfgefäß überführt.

Um die Beads von den CD4⁺ Zellen abzulösen, wurde ein zweiter Antikörper hinzugegeben, dessen Bindung an den ersten Antikörper eine sterische Veränderung des ersten Antikörpers induziert. Durch diese allosterische Inhibition löst sich der vorher gebundene Anti-CD4 Antikörper der Beads von den CD4⁺ Zellen.

Zur Loslösung der Anti-CD4-Antikörper wurden nun 10 µl pro 10 ml Vollblut der zweiten Antikörperlösung in das Eppendorfgefäß hinzugegeben. Danach wurde die Suspension für 45 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Rollentaumelinkubator inkubiert.

Um die CD4⁺-Zellen von den Beads zu trennen, wurde die Zellen-Beads-Suspension anschließend in einen Magnetständer gestellt. Dabei wanderten die an den zweiten Antikörper gebundenen Beads an die dem Magneten zugewandte Seite. Der die CD4⁺-Zellen enthaltende Überstand wurde abgenommen. Um CD4⁺-Zellen, die noch an den Beads hafteten, abzuwaschen, wurden die Beads mit 10 ml PBS/2% FCS sechsmal gewaschen und die Überstände gesammelt.

2.1.3 Isolation naiver CD45RA⁺ T - Zellen

Um die naiven Zellen (CD45RA⁺-Zellen) aus der Gesamt-CD4⁺-Zellpopulation zu separieren, wurden die Gedächtnis-T-Zellen (CD45R0⁺ Zellen) mit Hilfe einer negativen Selektion abgetrennt.

CD45 ist eine Phosphatase, die aufgrund differentiellen Splicens in naiven T-Zellen einerseits und Gedächtnis-T-Zellen sowie aktivierten T-Zellen andererseits unterschiedlich exprimiert wird. Während naive Zellen vor allem die CD45RA-Isoform exprimieren, wird von Gedächtnis-T-Zellen im Wesentlichen die CD45R0-Isoform exprimiert.

Zur Gewinnung der naiven Zellen wurden die CD4⁺-Zellen nun mit Anti-CD45R0- Antikörper-Lösung (Maus-anti-Human) gemischt (10 µl Antikörper-Lösung pro 10 ml Vollblut) und mit PBS im Verhältnis 1:10 verdünnt. Dann wurde die Suspension 20 Minuten bei 4°C inkubiert. Das Inkubationsröhrchen wurde mit PBS aufgefüllt und anschließend zentrifugiert. Die nicht gebundenen Antikörper verblieben im Überstand und wurden abgenommen. Die im Sediment verbliebenen Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen.

Um die Antikörper-gekoppelten CD45R0⁺ Zellen von den CD45RA⁺ Zellen abzutrennen, wurden Beads verwendet, die mit einem Ziege-anti-Maus-Antikörper behaftet waren. Dieser Antikörper bindet an die zuvor eingesetzten Anti-CD45R0-Antikörper (Maus-anti-human). Die Beads (Ziege-anti-Maus, Stocklösung 4 x 10⁸ Beads/ml) wurden im Verhältnis 7 : 1 zu 10 ml Vollblut hinzu gegeben.

Nach folgender 30minütiger Inkubation bei 4°C wurde das Inkubationsgefäß in den Magnetständer gestellt. Dabei wanderten die Bead-beladenen CD45R0⁺ Zellen zum Magneten. Die freien CD45R0⁻-T-Zellen wurden mit dem Überstand aus dem Gefäß entnommen, gezählt und die Expression von CD45RA durchflusszytometrisch analysiert.

2.1.4 Generierung humaner dendritischer Zellen aus PBMC

Zur Kultivierung humaner DC wurden die PBMC mit RPMI und komplementinaktiviertem autologen aPHP (Pseudohumanplasma) (1-6%) in Petrischalen pipettiert (jeweils 30 – 50 Millionen PBMC pro Platte) und für 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Während der Inkubation adhärierte im Wesentlichen die Monozytenfraktion der PBMC.

Um schwach adhärente, nicht monozytäre Zellen (T-Zellen, B-Zellen) abzuwaschen, wurden die Platten mit dem Medium und PBS gründlich gespült.

Die verbliebenen adhärennten Zellen wurden nun mit DC-Anzuchtmedium überschichtet. Dieses setzte sich zusammen aus 10 ml RPMI, 5% aPHP (500

µl), 1000 U/ml IL 4 und 800 U/ml GM-CSF. Anschließend wurden die Zellkulturplatten im Brutschrank inkubiert.

Nach zwei bzw. fünf Tagen wurden jeweils 5 ml des Mediums abgenommen und zentrifugiert (1200 rpm, 8 min., 4°C). Die im Sediment enthaltenen Zellen wurden mit frischem DC-Anzuchtmedium resuspendiert und wieder auf die ursprüngliche Platte zurückgegeben. Im siebentägigen Verlauf der Kultur kam es zur Ablösung der DC als Zeichen der initialen Maturation. Nicht adhärenente Zellen wurden mit dem Medium von den Platten abgenommen und weiter kultiviert zur Induktion der terminalen Maturation. Zugewetzt wurden 900 µl RPMI-Medium, 1-6% aPHP und 100 µl DC-Cocktail bestehend aus 1000 U/ml IL 4 (Leukomax Sandoz, Strathmann Biotec), 500 U/ml IL 1-alpha, 1000 U/ml IL 6, 1000 U/ml TNF, 1000 U/ml IL 1-beta (alle Strathmann Biotec) sowie 10^{-8} mol PGE2 (Sigma) und 800 U/ml GM-CSF. Nach weiteren drei Tagen wurden die reifen DC mit dem Medium abgenommen, gewaschen und mit naiven CD4⁺-T-Zellen in einem Kollagengel kokultiviert (siehe 3.4).

2.2 Oxidative Mitogenese

Um eine polyklonale Stimulation naiver T-Zellen während der Interaktion mit DC zu ermöglichen, wurden die T-Zellen zuvor mit NaIO₄ behandelt. Der Oxidativen Mitogenese liegt eine Ladungsveränderung von Oberflächenmolekülen zugrunde. Während normalerweise eine Stimulation der T-Zelle nur aus einem Kontakt des TCR mit dem genau passenden, im MHC-Komplex präsentierten Antigen resultiert, wird bei der Oxidativen Mitogenese eine polyklonale, nicht spezifische, aber vergleichbar starke Aktivierung der T-Zelle durch die Kostimulation einer APC erreicht^{71,72}.

Da sowohl die Oxidative Mitogenese als auch die zum Teil anschließend durchgeführte CFSE-Färbung (s.u.) potentiell zellschädigende Prozeduren darstellen, wurde ein schonendes Verfahren entwickelt, welches die migratorische Aktivität aufrechterhielt. Auf der Grundlage methodischer Vorversuche wurden die T-Zellen in 300 µl eiskaltem PBS und 100µl 2 mM

NaIO₄ resuspendiert (Endkonzentration von 0,5 mM NaIO₄) und anschließend 30 Minuten bei 0°C inkubiert. Um die Reaktion zu beenden, wurde das 1,5 ml-Inkubationsröhrchen mit FCS aufgefüllt und zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstands wurden die Zellen in 1 ml kaltem Medium (R10) resuspendiert, gewaschen und entweder in ein Medium oder CFSE-haltigen Puffer resuspendiert.

2.3 CFSE-Färbung und Durchflusszytometrie der T-Zell-Proliferation sowie statistische Berechnungen

Um die Proliferation der T-Zellen zu erfassen, wurden diese zunächst mit dem fluoreszierenden Farbstoff 5,6-carboxyfluorescein diacetate succinimydyl ester (CFSE) beladen. CFSE ist eine unpolare Esterverbindung, die in die Zellen diffundiert. Intrazellulär wird es von unspezifischen Esterasen in polare Moleküle umgewandelt, was zu höheren intrazellulären als extrazellulären CFSE-Konzentrationen führt. Wenn sich eine CFSE beladene T-Zelle teilt, gibt sie den Farbstoff an die Tochterzellen weiter, was jeweils eine Halbierung des zellulären CFSE-Gehaltes zu Folge hat.

Um ein geeignetes Färbeverfahren zu etablieren, wurden die Zellen mit verschiedenen CFSE-Konzentrationen (5; 2,5; 1,25 µM) für unterschiedliche Zeitspannen (7, 5, 3, 2 min) angefärbt und sowohl Färbefizienz, als auch Proliferation der Zellen sowie Aufrechterhaltung ihrer migratorischen Fähigkeiten analysiert. Die Analysen ergaben, dass ein optimales Resultat erhalten wird, wenn die Zellen vor der Färbung zunächst zweimal mit PBS (4° C) gewaschen wurden. Anschließend wurden die Zellen mit einer 2,5 µM CFSE-Lösung in PBS für 3 min bei 37° C inkubiert und danach zweimal mit hitzeinaktiviertem FCS (4° C) gewaschen. CFSE bei 2,5 µM führte zu einer ausreichenden Färbung der Zellen für nachfolgende Proliferationsstudien ohne eine Beeinträchtigung der Zellmigration.

Die Durchflusszytometrie wurde eingesetzt, um die Reinheit der isolierten T-Zellen, die terminale Maturation der DC und T-Zell-Aktivierung und -Proliferation auf Einzelzellniveau zu bestimmen.

Bei der Durchflusszytometrie werden an Fluoreszenzfarbstoff gekoppelte Antikörper verwendet, die sich gegen bestimmte Zelloberflächenantigene richten. Im Zytometer passieren die Zellen einen Laserstrahl (488 nm). Daraus resultiert eine Beugung und Streuung des Laserlichtes sowie die Fluoreszenz der Antikörper gekoppelten Farbstoffe. Sowohl das gebeugte bzw. gestreute Laserlicht als auch das Fluoreszenzlicht werden durch Photodetektoren gemessen und digital analysiert.

Zur durchflusszytometrischen Bestimmung des Reinheitsgrades positiv selektionierter naiver $CD4^+$ -T-Zellen wurden Antikörper gegen CD4- und CD8-Oberflächenantigene verwendet (siehe Abb. 2). Der Aktivierungsgrad der $CD4^+$ T-Zellen nach Positivselektionierung wurde mittels durchflusszytometrischer Messung der Oberflächenantigene CD62L und CD25 bestimmt (Abb. 3). Ebenso wurde die Reinheit negativ selektionierter CD45RA exprimierender T-Zellen mittels CD45RA- und CD45RO-Antikörpern gemessen (Abb. 5). Ob die Kokultivierung mit DC in der Kollagenmatrix zu einer Aktivierung naiver T-Zellen geführt hatte, wurde mittels Verwendung von Antikörpern gegen die Oberflächenantigene CD3 und CD25 sowohl bei naiven T-Zellen nach Oxidativer Mitogenese als auch bei nicht-mitogenen Kontrollkulturen ermittelt.

Zum Ausschluss toter Zellen aus der Analyse wurde eine Vitalfärbung mit Propidiumiodid (PI) durchgeführt. In vitalen Zellen lagert sich nur wenig Propidiumiodid ein, während es in toten Zellen akkumuliert. Somit ist es möglich, die durchflusszytometrisch erfassten Daten apoptotischer Zellen von der endgültigen Auswertung auszuschließen und nur Daten vitaler Zellen zu erhalten.

Zur Färbung für die Durchflusszytometrie wurden jeweils 10µg/ml des benötigten markierten Antikörpers in ein FACS-Röhrchen vorgelegt und pro Messung 50.000 Zellen in PBS dazugegeben (Volumen ca. 80µl). Der Ansatz wurde dann mit der Antikörperlösung zehn Minuten lang bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach Waschen der Zellen und Zugabe von Propidiumiodid (Endkonzentration 50 ng/ml) erfolgte in unmittelbarem Anschluss die durchflusszytometrische Analyse.

Die Signifikanz-Berechnung unterschiedlicher DC-Interaktionszeitspannen der T-Zellen während Oxidativer Mitogenese und der Kontroll-T-Zellen erfolgte mit dem Computerprogramm SPSS 10.0 für Windows. Der dabei verwendete Mann-Whitney-Test (= U-Test) ist ein nicht parametrischer, verteilungsunabhängiger Test. Ein parametrischer, verteilungsabhängiger Test, wie z.B. der T-Test, durfte nicht verwendet werden, da die Interaktionszeiten keine Normalverteilung aufwiesen. Die Berechnungen wurden für alle drei Beobachtungszeiträume jeweils für initial laufende T-Zellen, für anfangs DC adhärenente T-Zellen sowie für die Gesamtpopulation bestehend aus initial laufenden und DC adhärenenten T-Zellen durchgeführt.

Weiterhin wurde berechnet, ob die Kontaktzeiten initial laufender bzw. anfangs adhärenenter T-Zellen jeweils nach 0 – 8 Stunden, nach 24 – 32 Stunden und 48 – 56 Stunden dauernder Kokultivierung signifikant unterschiedlich waren. Da hierbei jeweils drei Gruppen miteinander verglichen wurden (z.B. Interaktionszeiten initial laufender T-Zellen während Oxidativer Mitogenese nach 0 – 8 Stunden Kokultivierung mit den Interaktionszeiten nach 24 – 32 und 48 – 56 Stunden), wurde zur Berechnung der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Der Kruskal-Wallis-Test stellt eine Erweiterung des Mann-Whitney-Tests dar, der für den Vergleich von mehr als zwei nicht normal verteilten Gruppen geeignet ist. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Kontaktzeiten der jeweiligen T-Zell-Populationen lag vor, wenn der Wert der berechneten Prüfgröße $p < 0,05$ war.

2.4 Inkorporation von T-Zellen und dendritischer Zellen in 3D-Kollagenmatrices

Zur Herstellung zellhaltiger Kollagengele wurden zunächst 100.000 naive CD4⁺-T-Zellen und 20.000 DC in 33,3 µl Medium (R10) aufgenommen. Anschließend wurden 66,6 µl einer Kollagenlösung hinzugefügt. Diese war zuvor aus Bikarbonat (25 µl), MEM (minimal essentiell medium) (50 µl) und Vitrogen (375 µl) (Nutacon) hergestellt worden.

Die Kollagen-Zellen-Mischung wurde nun in mit Paraffin-Vaseline (jeweils 50%) abgedichtete Glaskammern pipettiert und bei 37°C und 5 Vol% CO₂ so lange inkubiert, bis das Kollagen zu Fasern auspolymerisiert war und sich ein fibrilläres Gel ausgebildet hatte. Anschließend wurden die Kammern mit vorgewärmtem und pH-äquilibriertem Medium aufgefüllt und mit Paraffin-Vaseline luftdicht verschlossen.

2.5 Zeitraffer - Videomikroskopie

Für die Analyse der Zellmigration und der Zell-Zell-Interaktionen wurden die Kollagengele mit einem Mikroskop (20fache Mikroskopvergrößerung) dargestellt. Das Mikroskopbild wurde über einen Zeitraum von mindestens 56 Stunden mit einer Videokamera gefilmt und in 300fachem Zeitraffer auf Videobändern mitgeschnitten. Während der Aufnahme wurde die Temperatur der Gele konstant bei 37°C gehalten. Die Erwärmung der Gele erfolgte mit jeweils zwei Rotlichtlampen, die von einer Thermostatanlage (Fa. Latzke) gesteuert wurden. Oxidative-Mitogenese-Experimente und nicht stimulierte Kontrollkulturen wurden zeitgleich untersucht.

2.6 Analyse der Interaktionsdauer zwischen T-Zellen und dendritischen Zellen

Die aufgenommenen Videofilme wurden am Computer mit Hilfe der Programme AV-Master-Video for Windows, Version 2.1 (FAST-Multimedia Inc.) und Microsoft Vid Cap (Windows 95) digitalisiert. Anschließend wurden die Filme mit dem Video Editor, Version 5.01 (Ulead Systems Inc.) komprimiert und auf CD-Rom gebrannt.

Zur Analyse der Dauer der Interaktionen von naiven CD4⁺ T-Zellen mit DC wurden die digitalisierten Filme mit Quicktime-Player (Apple-Macintosh) am Computer abgespielt und pro Versuchsansatz jeweils drei Zeitintervalle (Stunden 0-8, 24-32 und 48-56) ausgewertet.

Hierfür wurden am Monitor Anfangs- und Endzeiten aller erkennbaren Kontakte von T-Zellen mit DC ermittelt und die Dauer der Interaktionen errechnet.

Eine Schwierigkeit bestand darin, tatsächliche Kontakte zwischen DC und T-Zellen von optischen Überlagerungen von Zellen, die sich in verschiedenen Ebenen des Gels befanden, zu differenzieren.

Kriterium für einen Kontakt war deshalb zum einen eine nahezu identische Abbildungsschärfe von DC und T-Zelle. Eine identische Schärfe ließ darauf schließen, dass sich beide Zellen in derselben Gelebene befanden. Ein weiteres Indiz für einen T-Zell-DC-Kontakt war eine Verhaltensänderung der T-Zelle, z. B. ein Bewegungsstopp, eine Verzögerung der Bewegung oder eine Änderung der Bewegungsrichtung entlang des Zellkörpers der DC. Das Ende eines Kontakts war durch ein Freiwerden der T-Zelle, häufig einhergehend mit einer Änderung der T-Zell-Morphologie, ihrer Bewegungsgeschwindigkeit und der Abbildungsschärfe gekennzeichnet.

Um Kontakte nicht mehrfach zu werten, wurden der Laufweg der T-Zellen und die Regionen, in denen die Kontakte stattgefunden hatten, grafisch dokumentiert. Dafür wurde der Weg einzelner T-Zellen auf einer am Monitor befestigten Folie mit einem Stift nachgefahren und auf dieser Linie auch die Orte der Kontakte eingetragen.

Die Mediane der Interaktionsdauer wurden mit Microsoft Excel für die drei Messintervalle jeweils einer Probe berechnet. Statistische Werte wurden für die einzelnen Zeitabschnitte jeweils getrennt berechnet für T-Zellen, die zu Beginn der Aufnahmen bereits an eine DC gebunden waren, initial frei laufende T-Zellen und für die Gesamtheit der T-Zellen.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung der Methoden zur Isolation von CD4⁺ T-Zellen und dendritischen Zellen

3.1.1. Reinheit und fehlende Voraktivierung der Gesamt-CD4⁺-Zell-Population

Zunächst sollten aus menschlichen peripheren CD4⁺ T-Zellen, die aus PBMC isoliert wurden, naive T-Zellen gewonnen werden. Die Reinheit der CD4⁺ T-Zellen betrug > 98 % (Abb. 2).

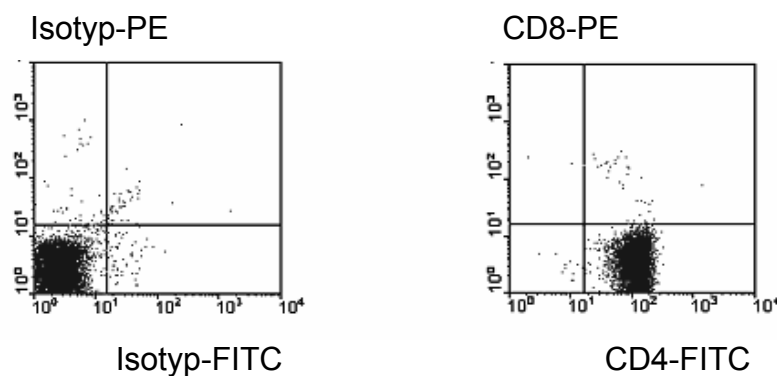


Abbildung 2. Reinheitsgrad aufgereinigter CD4⁺-T-Zellen. CD4⁺ T-Zellen wurden aus PBMC durch positive Selektionierung isoliert. Der Reinheitsgrad der T-Zellen wurde anschließend durchflusszytometrisch erfasst (> 98 % CD4⁺ T-Zellen).

Da die Isolation der CD4⁺-T-Zellen mittels positiver Selektionierung durchgeführt worden war, musste sichergestellt werden, dass nicht bereits der Separationsvorgang selbst zur Aktivierung der T-Zellen geführt hatte. Positiv selektionierte CD4⁺-T-Zellen zeigten auf ihrer Oberfläche eine hohe Dichte von CD62L/L-Selektin. Daraus kann geschlossen werden, dass die Separation nicht zu einem Abschilfern („shedding“) von CD62L führte. Dieser Befund weist auf eine ausgebliebene Voraktivierung hin, da CD62L von T-Zellen bereits bei geringer Aktivierung von der Zelloberfläche gesheddet wird⁶⁹. Die Zellselektionierung führte weiterhin nicht zur Aufregulation von CD25, weder

direkt im Anschluss zur Isolation (Abb. 3) noch im Verlauf der Kultivierung isolierter T-Zellen über mehrere Tage in Gegenwart oder Abwesenheit von DC (vgl. Abb. 6). CD25 ist die α -Kette des IL-2-Rezeptors und gilt als klassischer T-Zell-Aktivierungsmarker.

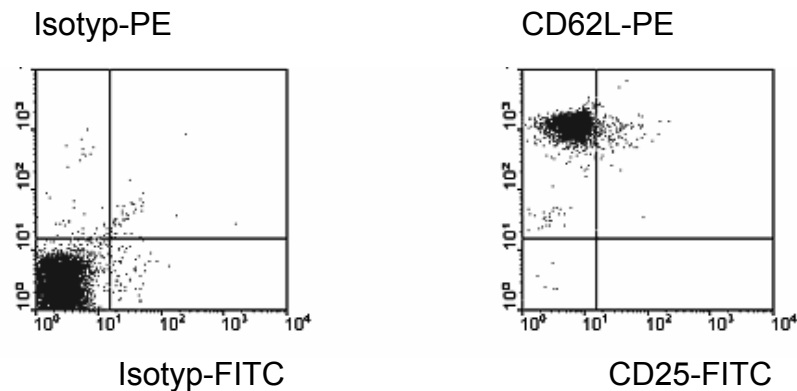


Abbildung 3. Aktivierungsgrad aufgereinigter CD4⁺-T-Zellen. CD4⁺ T-Zellen wurden aus PBMC durch positive Selektionierung isoliert. Der Aktivierungsgrad der T-Zellen wurde anschließend durchflusszytometrisch erfasst.

Diese Daten bestätigen eine ausbleibende T-Zell-Aktivierung nach Positivselektionierung, wenn ein sekundärer „detach a bead-Antikörper“ verwendet wird, wie zuvor von Friedl et al¹ gezeigt. Im nächsten Schritt sollten naive CD4⁺ CD45RA⁺ Zellen isoliert werden. CD45 stellt eine membranständige Phosphatase dar, die in Leukozyten aufgrund differenziellen Splicens in unterschiedlichen Isoformen exprimiert wird. Periphere, positiv selektionierte, nicht aktivierte CD4⁺Zellen enthalten drei CD45-Subpopulationen. Naive T-Zellen exprimieren CD45RA auf hohem Niveau und sehr wenig bis kein CD45R0 auf der Oberfläche (Abb. 4a). Gedächtnis-T-Zellen, aber auch aktivierte naive T-Zellen (nicht dargestellt), exprimieren dagegen CD45R0, und kaum CD45RA (Abb. 4b). Neben diesen definierten Populationen kommen auch noch Übergangsformen vor, die sowohl CD45RA als auch CD45R0 ausbilden (Abb. 4c).

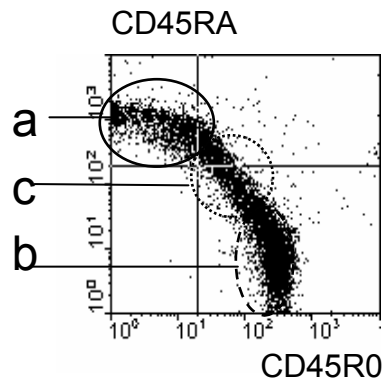


Abbildung 4. CD45-Subpopulationen innerhalb nicht voraktivierter CD4⁺Zellen. Durchflusszytometrische Erfassung exprimierter CD45-Oberflächenmarker in nicht voraktivierten CD4⁺ T-Zellen.

Aufgrund ihrer Negativität für CD45R0 bot sich an, CD45RA⁺ naive Zellen durch negative Selektionierung gegen CD45R0⁺ Zellen zu gewinnen. Nach diesem Aufreinigungsschritt betrug der Anteil CD45RA⁺ CD45R0⁻ Zellen mehr als 93% (Abb. 5).

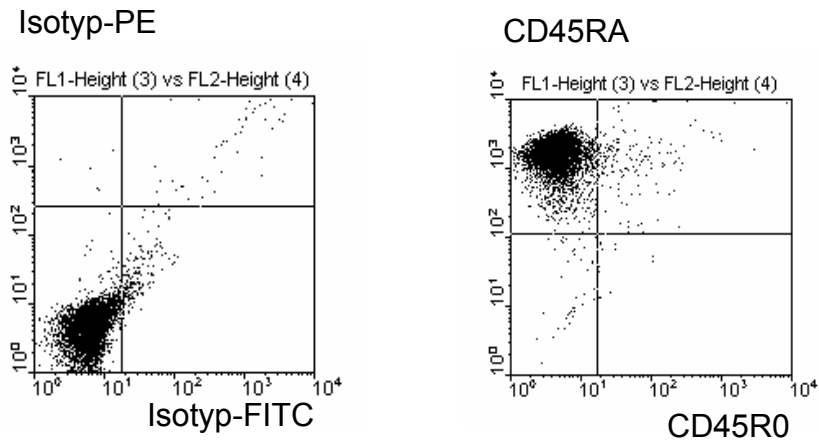


Abbildung 5. Reinheitsgrad aufgereinigter naiver CD4⁺ T-Zellen. CD45R0 exprimierende T-Zellen wurden durch negative Selektionierung aus CD4⁺ T-Zellen depletiert. Der Reinheitsgrad naiver CD45RA exprimierender T-Zellen wurde anschließend durchflusszytometrisch erfasst. 93,6% der T-Zellen waren im linken oberen Quadranten lokalisiert. Der Reinheitsgrad wurde vor jedem Experiment geprüft. Isolierte T-Zellen wurden für Kokulturen mit DC nur bei einer Reinheit > 90 % verwendet.

Um auszuschließen, dass bereits die Isolation zu einer T-Zell-Aktivierung führte, wurden Langzeitversuche mit nicht zusätzlich aktivierten isolierten T-Zellen durchgeführt. Um zusätzlich auszuschließen, dass die Kollagenmatrix selbst

naive T-Zellen voraktiviert, wurden CD45RA⁺ T-Zellen in Kollagengelen ohne APC über 48 h kultiviert, mittels Kollagenaseverdau isoliert und durchflusszytometrisch analysiert.

T-Zellen gehen nach ihrer Aktivierung in ein Lymphoblastenstadium über, was durch eine Zunahme der Zellgröße und der Granularität sowie durch eine Expression von CD25 charakterisiert ist^{23,61}. Weder eine Zunahme der Größe oder Granularität noch der Expression von CD25 waren nachweisbar. Somit behielten die Zellen nach Isolation einen ruhenden, nicht voraktivierten Phänotypen bei.

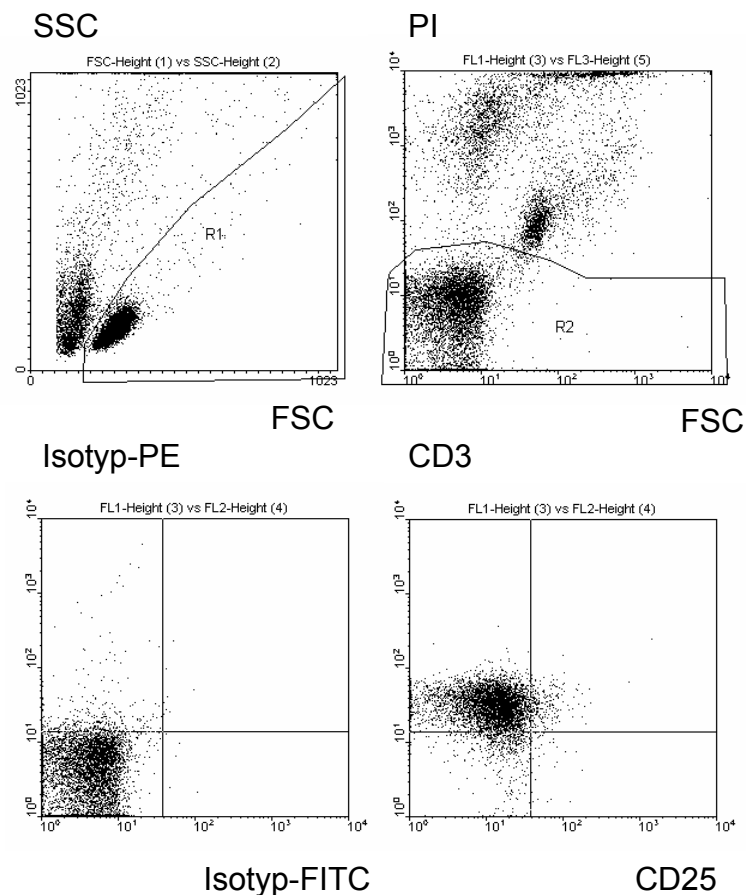


Abbildung 6. Ruhender Phänotyp in isolierten naiven T-Zellen nach 48h Kultur in 3D Kollagenmatrix. Humane CD45⁺ CD45RA⁺ CD45RO⁻ T-Zellen wurden in 3D-Kollagengelen inkorporiert. Nach 48 Stunden wurden die Gele mit Kollagenase verdaut und die T-Zellen durchflusszytometrisch analysiert. A: Größe (FSC) versus Granularität (SSC). Zytotoxisch geschädigte Propidiumiodid (PI)-positive Zellen wurden durch Setzen eines Gates ausgeschlossen (B). Die Abbildung zeigt die niedrige Expression von CD25 sowie Positivität des T-Zellmarkers CD3 (C und D).

3.1.2 Isolation und Typisierung dendritischer Zellen

Terminal matrierte DC sind die wichtigsten APC für die Aktivierung naiver T-Zellen². Um zu gewährleisten, dass die zur Kokultivierung mit T-Zellen verwendeten APC tatsächlich terminal ausgereifte DC waren, wurde überprüft, ob sie die für DC typische Morphologie aufwiesen und ob sie bestimmte, für DC charakteristische Moleküle, insbesondere MHC II und CD86 auf ihrer Oberfläche exprimierten. In vitro generierte DC bildeten multiple längliche Dendriten aus, wie sie für DC charakteristisch sind (Abb. 7). Weiterhin waren multizelluläre kleine Cluster erkennbar, wie sie für matrierte DC ebenfalls typisch sind.

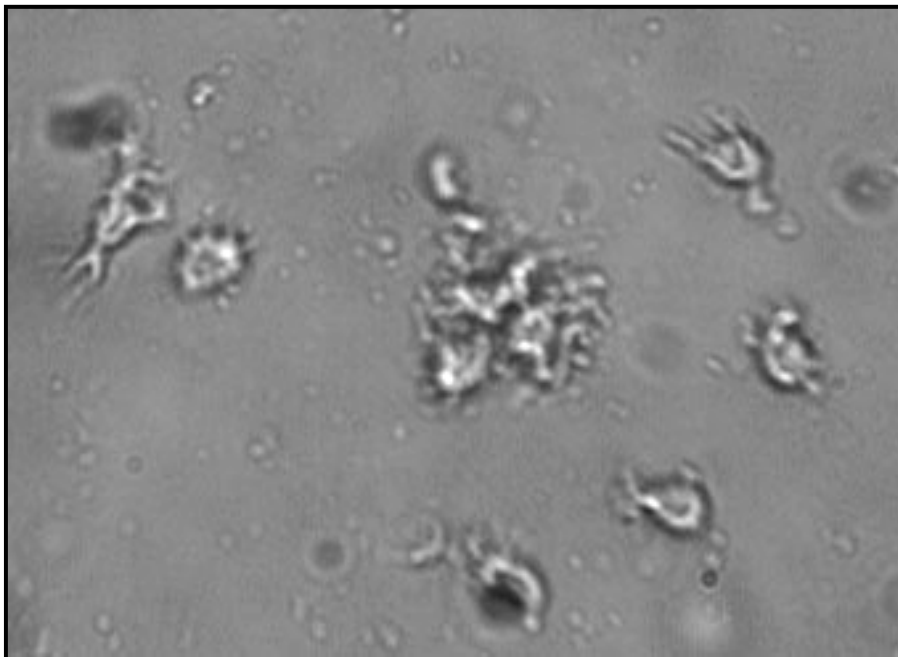


Abbildung 7. Mikroskopische Darstellung terminal matriierter DC. Humane Monozyten aus peripherem Blut wurden sieben Tage lang mit GM-CSF und anschließend drei Tage lang mit einem Zytokin-Cocktail inkubiert (siehe Material und Methoden 3.2.4).

Die durchflusszytometrische Analyse dieser Zellen ergab, dass sie auf ihrer Oberfläche eine Vielzahl von MHC-Klasse-II-Molekülen exprimierten und

mehrheitlich auch CD86-Moleküle. Als DC-Ligand von CD28 und CTLA-4 auf T-Zellen vermittelt CD86 kostimulatorische Informationen und ist somit für die Aktivierung naiver T-Zellen essentiell.

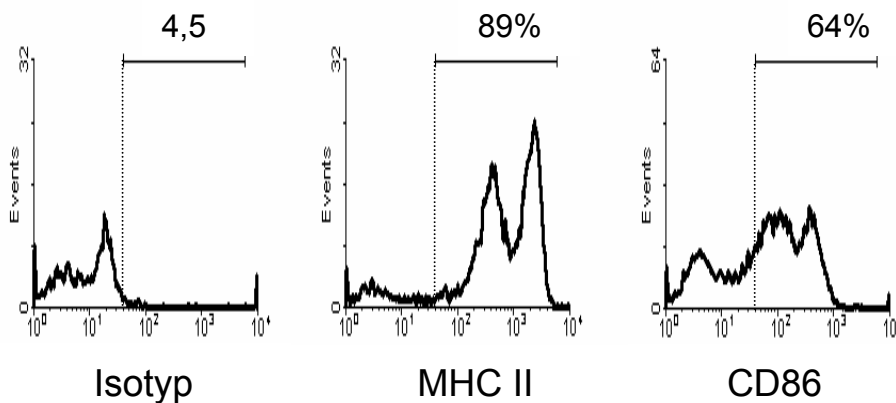


Abbildung 8. Expression von MHC-Klasse II (MHCII) und CD86 auf dendritischen Zellen. Humane Monozyten aus peripherem Blut wurden sieben Tage lang mit GM-CSF und anschließend drei Tage lang mit einem Zytokin-Cocktail inkubiert (siehe Material und Methoden 3.2.4). Durchflusszytometrische Messung.

3.2 Interaktionen naiver $CD4^+$ T-Zellen mit dendritischen Zellen

Als quantitatives Aktivierungsmodell humaner naiver T-Zellen wurde die Oxidative Mitogenese eingesetzt, wie zuvor für die $CD4^+$ Populationen beschrieben²³. Um die Zeitspannen der Interaktionen von naiven $CD4^+$ -T-Zellen mit DC im Kollagengel zu ermitteln, waren die Zellen mit Videokameras im Zeitraffermodus über einen Zeitraum von mindestens 56 Stunden gefilmt worden. Von jedem Film waren anschließend drei jeweils acht Stunden lange Zeitintervalle digitalisiert worden. Die Zeitsegmente befanden sich in der frühen Kokultivierungsphase (0-8 Stunden), in der mittleren Phase (24-32 Stunden) und in der späten Phase (48-56 Stunden). Die digitalisierten Filmabschnitte wurden dann mittels Bild-zu-Bild-Analyse ausgewertet.

Um Übergangszustände von migrierend zu nicht migrierend und umgekehrt eindeutig zu erfassen, wurde protokolliert, ob initial wandernde T-Zellen Kontakt

zu DC aufnahmen, ob zu Beginn der Kontaktbeobachtung die T-Zellen bereits mit DC interagierten oder ob nicht migrierende T-Zellen von wandernden DC mitgenommen wurden. Abbildung 9 zeigt beispielhaft die rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Kontaktes einer DC mit einer T-Zelle.

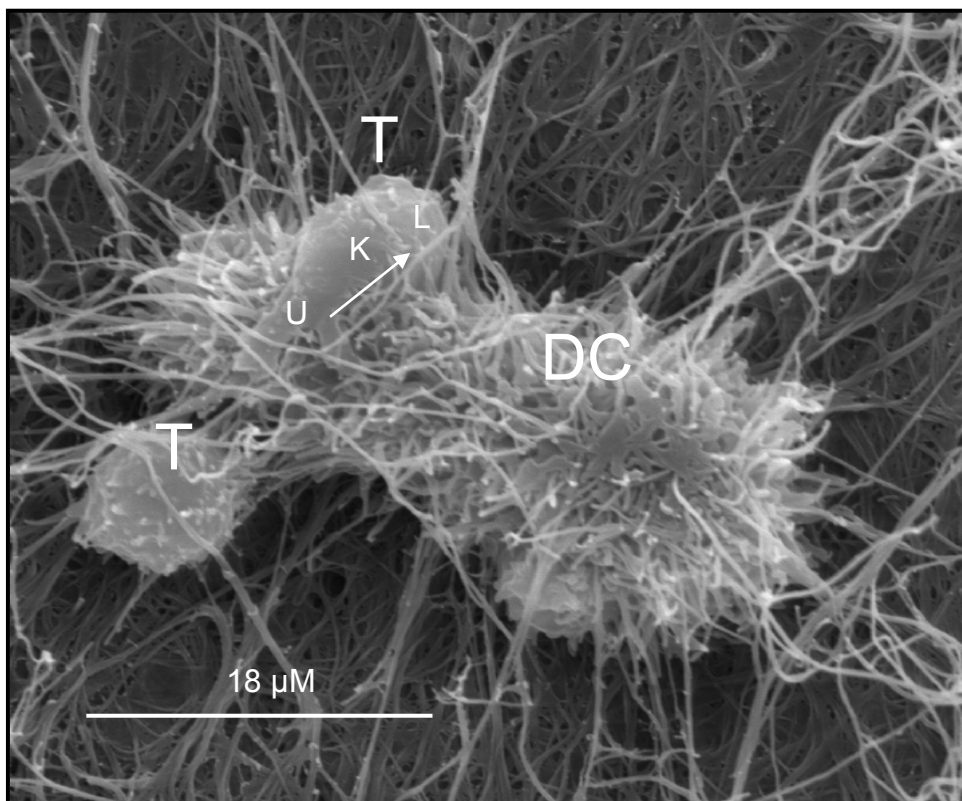


Abbildung 9. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Kontaktes zwischen zwei T-Zellen und einer dendritischen Zelle während der Oxidativen Mitogenese. Die obere T-Zelle weist die typische polare Organisation (L = leading edge, K = Körper, U = Uropod) während eines DC-Kontaktes auf. Der Pfeil symbolisiert die Migrationsrichtung der T-Zelle.

Mit Hilfe eines hoch auflösenden Objektivs (100fache Vergrößerung) wurde weiterhin die Dynamik der Kontakte näher analysiert. Abbildung 10 zeigt Ausschnitte aus den ausgewerteten Filmen.

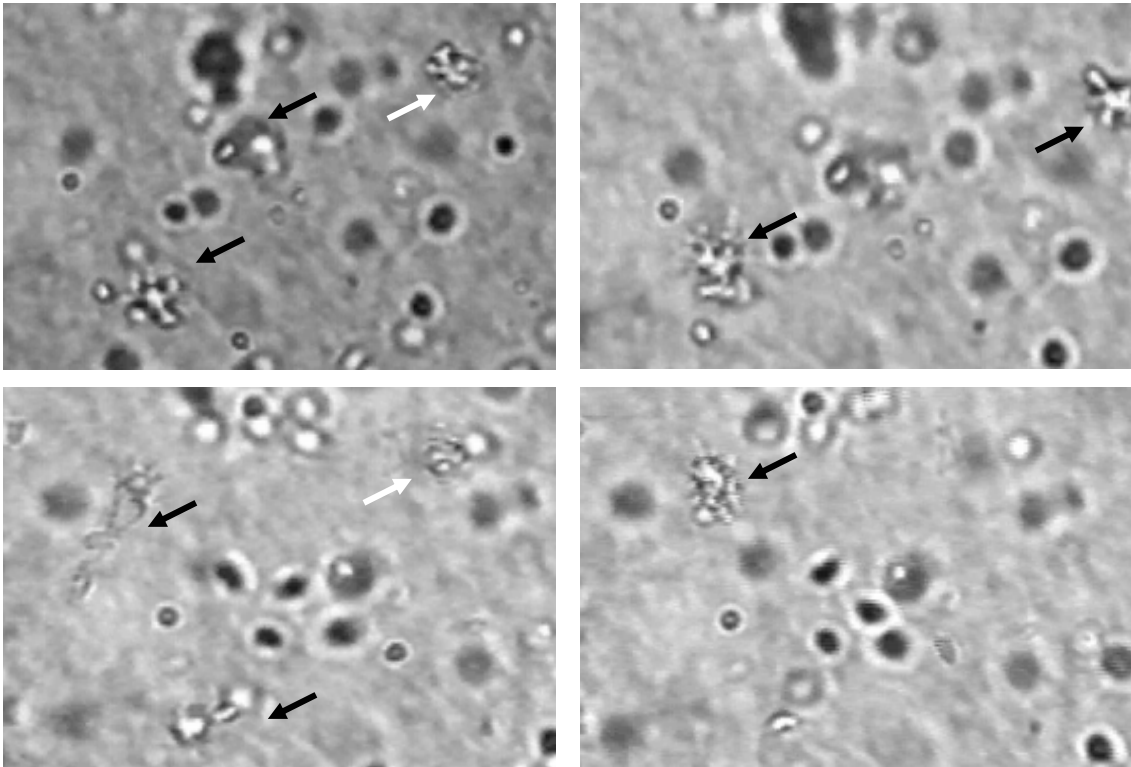


Abbildung 10. Die Abbildungen zeigen Ausschnitte aus den ausgewerteten Filmen (100fache Vergrößerung) mit dynamischen Kontakten zwischen DC und naiven T-Zellen (schwarze Pfeile), sessile T-Zellen (runde Zellen) und DC, die sich nicht in einer Interaktion befinden (weiße Pfeile)⁷³.

Die Kontakte von T-Zellen zu DC waren dynamisch, d.h. es kam nach Kontaktaufnahme nicht zu einem lang andauernden Migrationsstopp der T-Zellen, sondern die T-Zellen wanderten während des Kontakts weitgehend kontinuierlich über die Oberfläche der DC. Oft wurden repetitive Kontakte einer T-Zelle zur selben DC beobachtet, d.h. die T-Zelle kontaktierte dieselbe DC mehrmals hintereinander. Die Kontakte wurden unterbrochen von unterschiedlich langen Phasen, in denen die T-Zelle durch das Kollagengewebe wanderte. Weiterhin wurden aufeinander folgende Kontakte von T-Zellen zu verschiedenen, oft benachbarten DC beobachtet. DC konnten gleichzeitig Kontakt zu mehreren T-Zellen unterhalten, wobei jedoch die Bildung größerer multizellulärer Aggregate aus DC und T-Zellen ausblieb. Während des Kontaktes mit einer oder mehreren T-Zellen blieb die DC meist in DC-typischer

Bewegung. Abbildung 11 und 12 zeigen typische, dynamische Interaktionen naiver T-Zellen mit DC während unter Oxidative Mitogenese-Bedingungen.

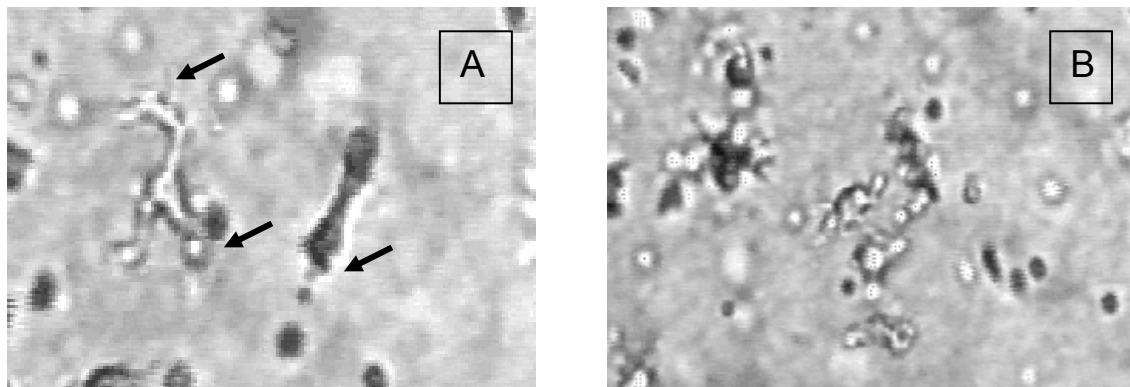


Abbildung 11. Abbildung A zeigt die dynamische Interaktion zweier DC mit naiven Oxidative Mitogenese-T-Zellen (schwarze Pfeile). In Abbildung B Darstellung mehrerer dynamischer Interaktionen von DC mit verschiedenen naiven T-Zellen⁷³.

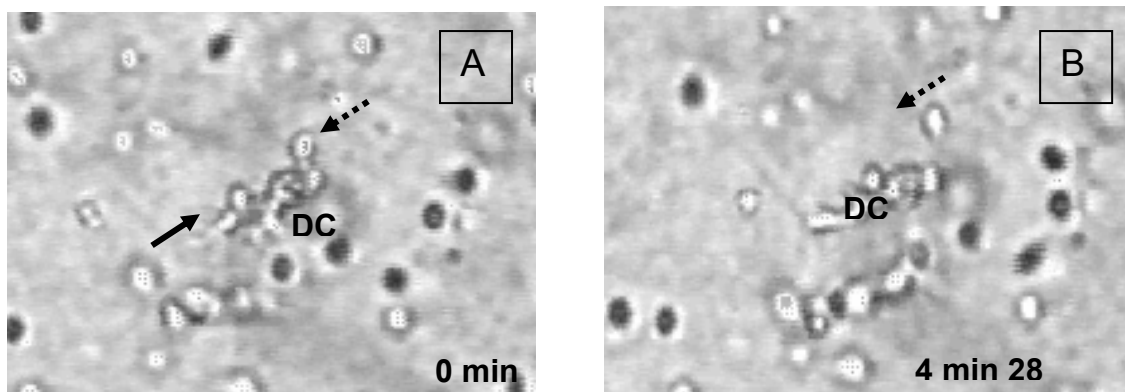


Abbildung 12. Die DC (Bildmitte, schwarzer Pfeil) interagiert mit mehreren naiven Oxidative Mitogenese-T-Zellen, die sich über ihre Oberfläche bewegen. Eine der T-Zellen (gestrichelter schwarzer Pfeil) beginnt in Abbildung A, sich von der DC abzulösen. In Abbildung B ist der Ablösevorgang bereits abgeschlossen⁷³.

Zellen der Kontroll- sowie der Oxidative Mitogenese-Ansätze unterschieden sich weder hinsichtlich des Migrationsverhaltens noch der Kontaktdynamik.

Abbildung 13 zeigt die dynamischen Interaktionen naiver nicht-mitogener Kontroll-T-Zellen mit DC.

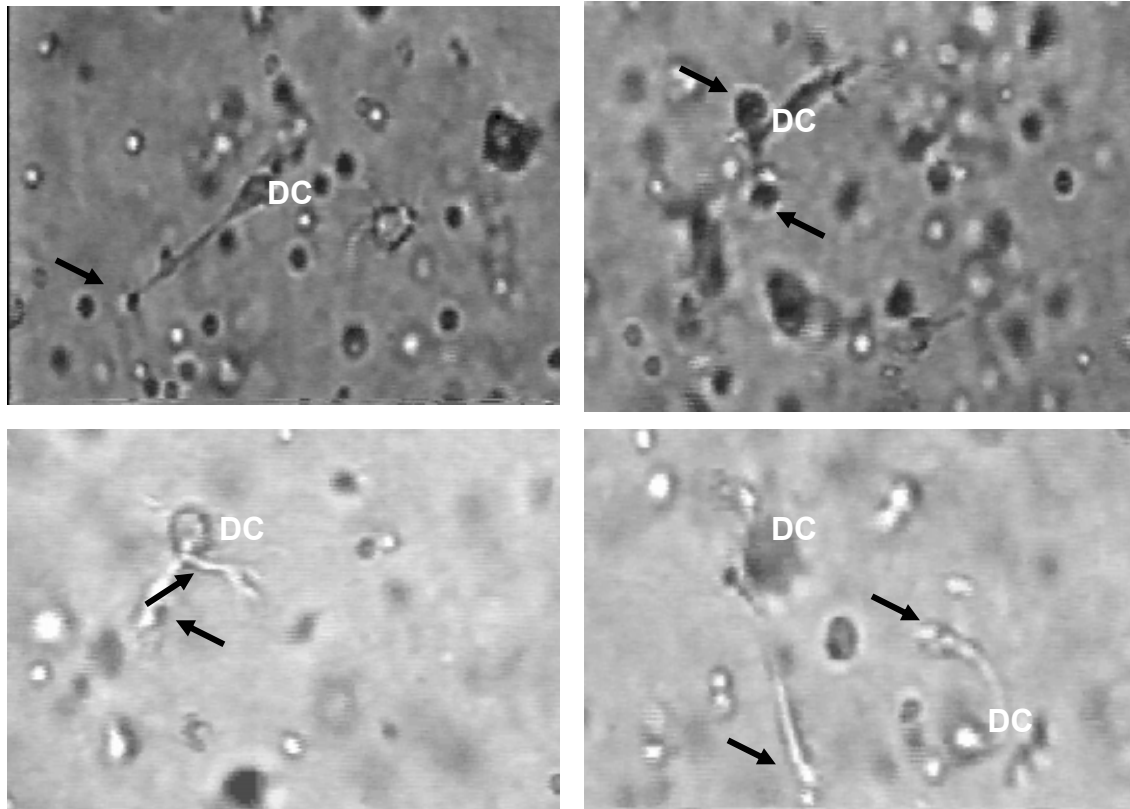


Abbildung 13. Die Abbildungen zeigen Interaktionen naiver Kontroll-T-Zellen (schwarze Pfeile) mit DC. Ebenso wie in den Oxidative Mitogenese-Experimenten waren in den Kontrollexperimenten die Kontakte fast durchweg dynamisch⁷³.

Um festzustellen, wie lange die Interaktionen von T-Zellen mit DC dauerten, waren die Anfangs- und Endzeiten aller erkennbaren T-Zell-DC-Kontakte ermittelt und daraus die Interaktionsdauer errechnet worden. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 14 – 16 dargestellt.

Die meisten Kontakte naiver T-Zellen während der Oxidativen Mitogenese innerhalb der ersten acht Stunden der Kokultivierung dauerten nur wenige Minuten an (Abb. 14A). Vereinzelt wurden zwar auch länger dauernde, teilweise über das gesamte Beobachtungsintervall anhaltende Kontakte beobachtet, der Großteil der Interaktionen war jedoch kürzer als 20 Minuten. Für Kontroll-T-Zellen wurden in den ersten acht Stunden der Kokultivierung allerdings noch häufiger kurze, nur wenige Minuten andauernde Kontakte zu DC registriert.

Zellkontakte, die länger als 45 Minuten dauerten, wurden kaum beobachtet (siehe auch Tabelle 1). Die mediane Interaktionsdauer der Kontrollansätze war mit sechs Minuten signifikant kürzer als in den Oxidative Mitogenese-Kulturen (mediane Interaktionsdauer zehn Minuten) ($p < 0,001$).

Der überwiegende Anteil der Kontakte initial migrierender naiver T-Zellen lag während der Oxidativen Mitogenese zwischen zwei und zehn Minuten. Nur gelegentlich wurden über mehrere Stunden andauernde Kontakte beobachtet. Für initial migrierende Kontroll-T-Zellen dauerte der bei weitem größte Teil der Interaktionen zwischen einer und zehn Minuten an, der Anteil lang dauernder Kontakte war vernachlässigbar. Die mediane Kontaktdauer naiver T-Zellen während der Oxidativen Mitogenese war mit sechs Minuten länger als die mediane Kontaktdauer der Kontroll-T-Zellen von fünf Minuten ($p = 0,020$).

Kontakte von DC mit initial bereits adhärenen T-Zellen dauerten meist über zehn Minuten während der Oxidativen Mitogenese und teils auch in den Kontrollkulturen (Abb. 14 C). Die mediane Interaktionsdauer unter Oxidative Mitogenese-Bedingungen betrug 17,5 Minuten und war somit signifikant höher als für initial motile T-Zellen unter Oxidative Mitogenese-Bedingungen ($p < 0,001$). Hier unterschieden sich die medianen Interaktionszeiten initial DC adhärenen T-Zellen während der Oxidativen Mitogenese nur marginal signifikant von der Interaktionsdauer nicht-mitogener Kontroll-T-Zellen ($p = 0,033$ nach Bonferroni-Korrektur).

Im weiteren Verlauf zeigten sich nach 24 – 32-stündiger Kokultivierung weiterhin überwiegend kurzlebige Kontakte (Abb. 15), unabhängig ob für Kontrollzellen oder unter Bedingungen der Oxidativen Mitogenese. Auch in diesem Beobachtungsintervall wurden in der Kontroll-Gruppe etwas kürzere Kontakte als in der Gruppe der T-Zellen während der Oxidativen Mitogenese festgestellt. Die mediane Interaktionsdauer der Kontroll-T-Zellen zu DC betrug in diesem Zeitraum vier Minuten und war somit signifikant kürzer ($p < 0,001$) als unter Oxidative Mitogenese-Bedingungen (7 min). Die Kontakte unter oxidative Mitogenese-Bedingungen initial laufender T-Zellen zu DC dauerten meist nur

wenige Minuten an. Mehrere Stunden andauernde Kontakte wurden nur selten beobachtet. Über den gesamten Beobachtungszeitraum anhaltende Kontakte wurden nicht registriert. Initial laufende Kontroll-T-Zellen gingen noch häufiger lediglich kurz dauernde Kontakte zu DC ein. Nur einige wenige Kontakte dauerten länger als eine Stunde. Kontakte über einen Zeitraum von mehr als 100 Minuten fanden nicht statt. Die mediane Interaktionsdauer initial laufender Kontroll-T-Zellen (4 min) war, wie auch im ersten Beobachtungsintervall, signifikant geringer ($p < 0,001$) als die der naiven T-Zellen während der Oxidativen Mitogenese (7 min). Nach 24 bis 32 h Kokultivierung wurden unter Oxidative Mitogenese-Bedingungen einige länger dauernde Kontakte initial DC adhärenter T-Zellen registriert. Sieben Kontakte wurden über den gesamten Zeitraum aufrechterhalten. Daneben fanden sich jedoch auch hier zahlreiche kurze, nur wenige Minuten andauernde Kontakte. Auch die Kontakte anfangs DC adhärenter Kontroll-T-Zellen hielten häufiger über mehrere Stunden oder über den gesamten Beobachtungszeitraum an, daneben fanden sich jedoch auch hier zahlreiche kurz dauernde Kontakte zu DC. Die mediane Interaktionsdauer unter Oxidative Mitogenese-Bedingungen (8 min) unterschied sich nicht signifikant von der medianen Interaktionsdauer in der Kontrollgruppe (7 min) ($p = 0,461$).

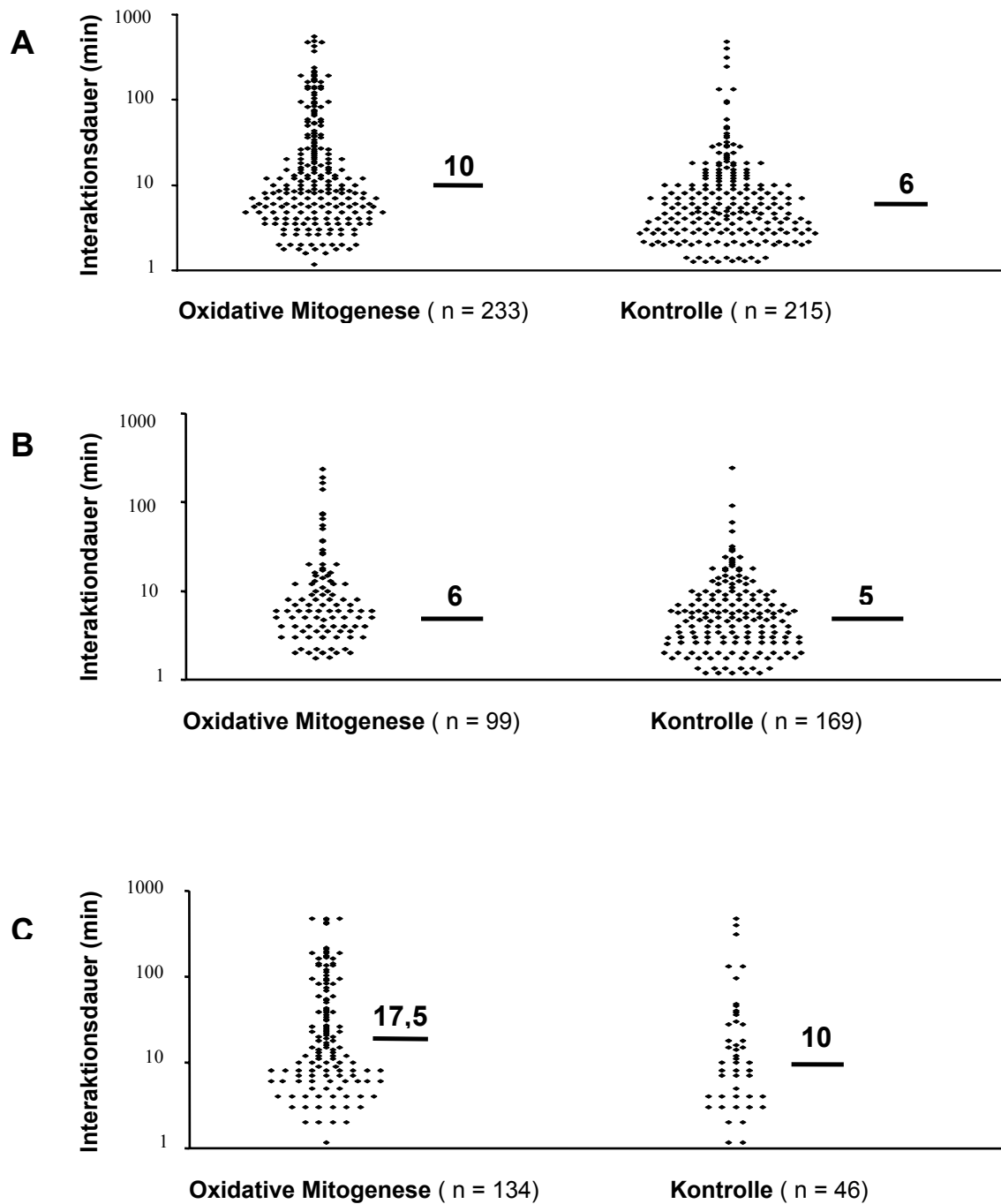


Abbildung 14. Dauer der Interaktionen naiver humaner T-Zellen während Oxidativer Mitogenese und nicht-mitogenen Kontroll-T-Zellen mit dendritischen Zellen. Beobachtungszeitraum 0 - 8 Stunden. Die T-Zellen wurden zusammen mit dendritischen Zellen in Kollagengele eingebettet und über einen Zeitraum von 56 Stunden gefilmt. Anschließend wurden die digitalisierten Filme visuell ausgewertet. Die Anfangs- und Endzeiten aller erkennbaren Kontakte wurden ermittelt und daraus die Dauer der Interaktionen errechnet. **A:** Dauer der Interaktionen aller naiven T-Zellen mit DC nach 0 – 8 Stunden Kokultur. **B:** Dauer der DC-Interaktionen initial laufender T-Zellen. **C:** Dauer der Interaktionen von anfangs DC-adhärennten T-Zellen. Rechts der Abbildungen sind die medianen Interaktionszeiten angegeben.

Auch im dritten Beobachtungszeitraum, nach 48 bis 56 Stunden Kokultivierung, dauerten die meisten Kontakte naiver T-Zellen unter Oxidative Mitogenese-Bedingungen weniger als 15 Minuten an (Abb. 16). Vereinzelt wurden einige Kontakte zu DC beobachtet, die mehrere Stunden oder über den gesamten Zeitraum anhielten. In der Kontroll-Gruppe wurden dagegen signifikant häufiger kurze Kontakte zwischen einer und zehn Minuten registriert. Noch seltener als während der Oxidativen Mitogenese wurden Kontakte zu DC beobachtet, die über mehrere Stunden oder über den gesamten Zeitraum beibehalten wurden. Die mediane Interaktionsdauer betrug 3,5 Minuten und war gegenüber der medianen Interaktionsdauer der T-Zellen unter Oxidative Mitogenese-Bedingungen, welche acht Minuten betrug, signifikant verkürzt ($p < 0,001$). Die meisten Kontakte initial wandernder T-Zellen während der Oxidativen Mitogenese dauerte zwischen einer und 15 Minuten an, die meisten Kontakte der Kontroll-T-Zellen zu DC zwischen einer und zehn Minuten. In beiden Gruppen wurden nur vereinzelt länger dauernde Kontakte beobachtet. Die mediane Interaktionsdauer unter Oxidative Mitogenese-Bedingungen war mit sechs Minuten signifikant länger ($p < 0,001$) als die der initial laufenden Kontroll-T-Zellen, die lediglich drei Minuten betrug. Die Interaktionen anfangs DC adhärenter T-Zellen während der Oxidativen Mitogenese (Abb. 16 C) dauerten in diesem Beobachtungszeitraum meist länger als eine Stunde an oder wurden teilweise sogar über den gesamten Zeitraum beibehalten. Kurze, nur über einige Minuten anhaltende Kontakte wurden dagegen nur vereinzelt registriert. Die mediane Interaktionsdauer war mit 25 Minuten dementsprechend lang. Auch in der Kontroll-Gruppe wurden einige stundenlange Kontakte registriert, die Mehrzahl der Kontakte zu DC dauerte jedoch nur wenige Minuten an. Die mediane Interaktionsdauer in der Kontrollgruppe (5 min) war signifikant kürzer als die der T-Zellen unter Oxidative Mitogenese-Bedingungen ($p < 0,001$). Die mediane Dauer der Kontakte der Kontroll-T-Zellen zu DC war während aller Beobachtungsintervalle kürzer als die der naiven T - Zellen während der

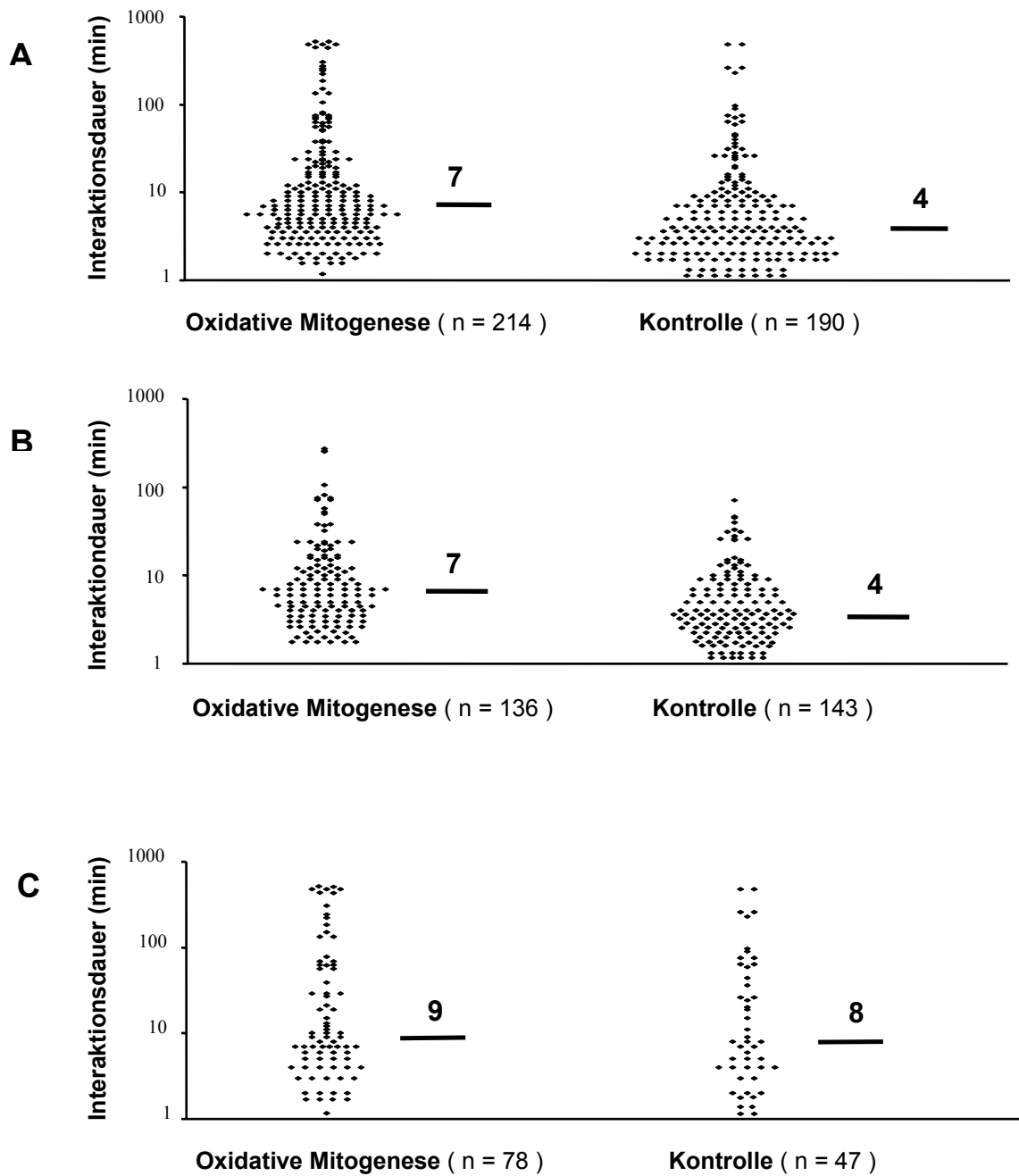


Abbildung 15. Dauer der Interaktionen naiver humaner T-Zellen während Oxidativer Mitogenese und nicht-mitogenen Kontroll-T-Zellen mit dendritischen Zellen. Beobachtungszeitraum 24 - 32 Stunden. Zur Methode siehe Abb. 10. **A:** Dauer der Interaktionen aller naiven T-Zellen mit DC nach 24 - 32 Stunden Kokultur. **B:** Dauer der DC-Interaktionen initial laufender T-Zellen. **C:** Dauer der Interaktionen von anfangs DC-adhärenenten T-Zellen. Rechts der Abbildungen sind die medianen Interaktionszeiten angegeben.

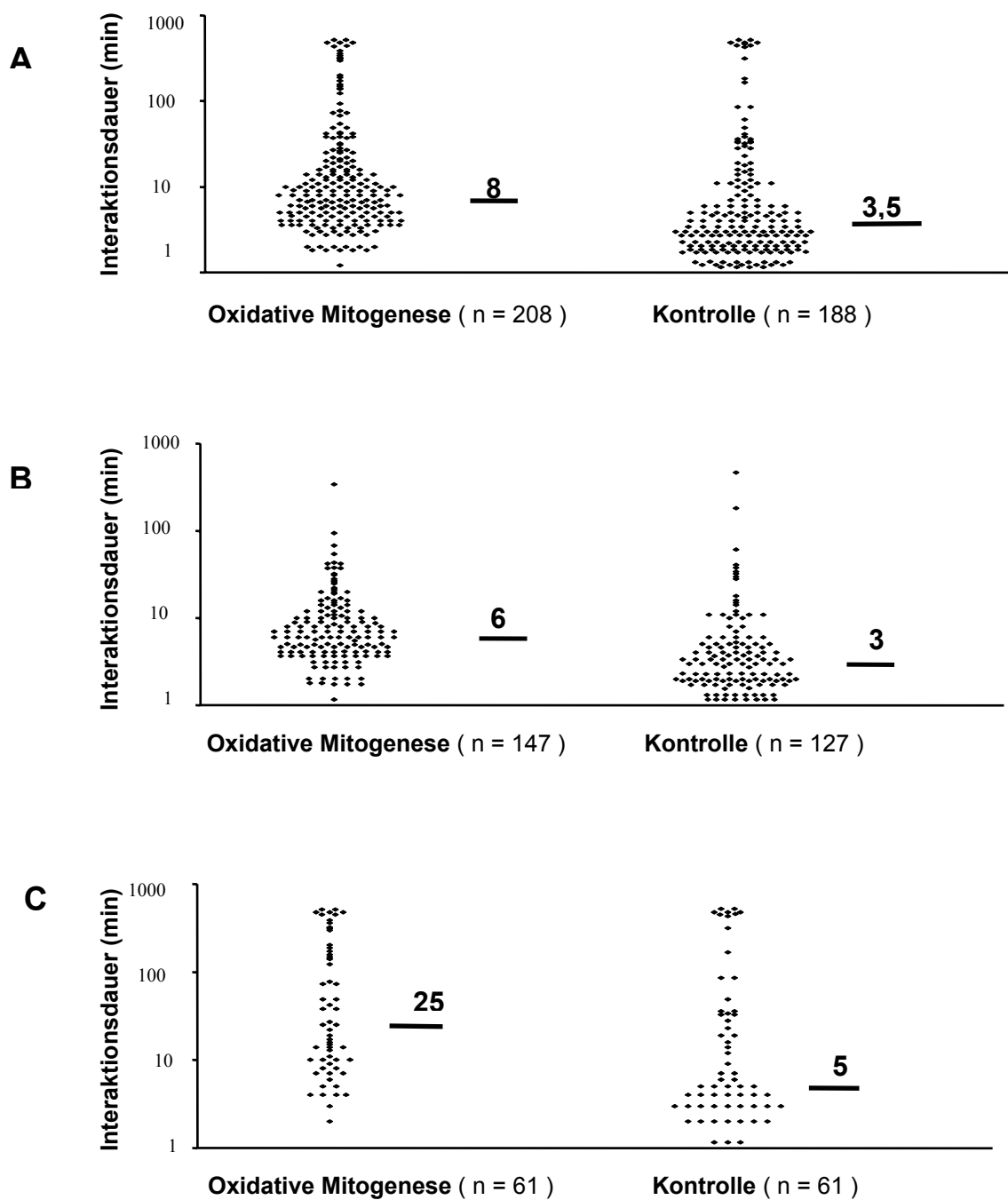


Abbildung 16. Dauer der Interaktionen naiver humaner T-Zellen während Oxidativer Mitogenese und nicht-mitogenen Kontroll-T-Zellen mit dendritischen Zellen. Beobachtungszeitraum 48 - 56 Stunden. Zur Methode siehe Abb. 10. **A:** Dauer der Interaktionen aller naiven T-Zellen mit DC nach 48 - 56 Stunden Kokultur. **B:** Dauer der DC-Interaktionen initial laufender T-Zellen. **C:** Dauer der Interaktionen von anfangs DC-adhärennten T-Zellen. Rechts der Abbildungen sind die medianen Interaktionszeiten angegeben.

Oxidativen Mitogenese. Es ergaben sich in fast allen Fällen signifikante Unterschiede bezüglich der medianen Interaktionszeiten unter Oxidative Mitogenese-Bedingungen und Kontrollbedingungen. Lediglich in der Gruppe der anfangs DC adhärenen T- Zellen nach 24 – 32 Stunden konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen naiven T-Zellen während Oxidativer Mitogenese und nicht-mitogenen Kontroll-Kulturen bezüglich der Dauer der Kontakte festgestellt werden.

Tabelle 1 zeigt vergleichend die Anzahl kurz dauernder (unter 45 Minuten) und lang dauernder Kontakte (über 45 Minuten) naiver T-Zellen unter Oxidative Mitogenese-Bedingungen und naiver Kontroll-T-Zellen, unterteilt in primäre laufende und DC adhärenen T-Zellen. Die Mehrzahl der Kontakte in beiden Gruppen war kurz dauernd, Kontroll-T-Zellen gingen jedoch relativ häufiger kurz dauernde Kontakte (unter 45 Minuten) zu DC ein. In der Untergruppe der DC adhärenen T-Zellen fanden sich häufiger länger dauernde Kontakte als bei den primär laufenden naiven T-Zellen.

Tab.1. Kontaktdauer naiver T-Zellen nach Oxidativer Mitogenese und nicht-mitogener Kontroll-T-Zellen

	Oxidative Mitogenese				Kontrolle			
	p.l. Zellen		adhärent		p.l. Zellen		adhärent	
	<45	>45	<45	>45	<45	>45	<45	>45
Kontaktzeit (min)/Kulturdauer								
0 – 8 h	78 (78,8%)	21 (21,2%)	105 (78,4%)	29 (21,6%)	161 (95,2%)	8 (4,8%)	41 (89,1%)	5 (10,9%)
24 – 32 h	123 (90,4%)	13 (9,6%)	60 (76,9%)	18 (23,1%)	140 (97,9%)	3 (2,1%)	36 (76,6%)	11 (23,4%)
48 - 56 h	137 (93,2%)	10 (6,8%)	41 (67,2%)	20 (32,8%)	127 (100%)	0 (0%)	46 (75,4%)	15 (24,6%)

Tabelle 1. Die mediane Dauer der Kontakte der Kontroll-T-Zellen war während aller Beobachtungszeiträume kürzer als die der naiven T-Zellen während Oxidativer Mitogenese. Die Mehrzahl der Kontakte in beiden Gruppen war kurz dauernd, in der Kontrollgruppe gingen T-Zellen jedoch relativ häufiger kurz dauernde Kontakte (unter 45 Minuten) zu DC ein. In der Gruppe der DC-adhärenenten T-Zellen fanden häufiger länger dauernde Kontakte über 45 Minuten statt.

In allen Beobachtungszeiträumen waren sowohl unter Oxidative Mitogenese- als auch unter Kontrollbedingungen T-Zell-DC-Interaktionen initial migrierender T-Zellen signifikant kürzer als die Interaktionen der zu Beginn eines Beobachtungszeitraumes DC adhärenenten T-Zellen ($p < 0,05$).

Während sich die mediane Kontaktdauer initial migrierender naiver T-Zellen zu DC während Oxidativer Mitogenese nach 0 – 8 Stunden nicht signifikant von den medianen Kontaktzeiten nach 24 – 32 und 48 – 56 Stunden unterschied ($p = 0,928$), wurden jedoch signifikante Unterschiede in dieser Gruppe bei den anfangs DC adhärenenten T-Zellen ($p = 0,005$) festgestellt (mediane Dauer nach

0 – 8 Stunden: 17,5 Minuten; nach 24 - 32 Stunden: 9 Minuten; nach 48 – 56 Stunden: 25 Minuten).

Auch in der Gesamtpopulation der T-Zellen nach Oxidativer Mitogenese unterschieden sich die Interaktionszeiten im Beobachtungsverlauf signifikant ($p < 0,001$) voneinander (mediane Dauer nach 0 – 8 Stunden: 10 Minuten; nach 24 – 32 Stunden: 7 Minuten; nach 48 – 56 Stunden: 8 Minuten).

Ebenso unterschieden sich in den nicht-mitogenen Kontrollgruppen die Interaktionszeiten der gesamten Population zu verschiedenen Zeiten der Kokultivierung signifikant voneinander ($p = 0,002$). Die mediane Dauer der Interaktionszeiten nahm im Zeitverlauf ab (mediane Dauer nach 0 –8 Stunden: 6 Minuten, nach 24 – 32 Stunden: 4 Minuten; nach 48 – 56 Stunden: 3,5 Minuten). Die Kontaktzeiten anfangs DC adhärenter Kontroll-T-Zellen zeigten jedoch zu verschiedenen Zeiten der Kultivierung keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,733$). Die Kontaktzeiten initial laufender Kontroll-T-Zellen in den verschiedenen Beobachtungsintervallen unterschieden sich dagegen signifikant ($p < 0,001$). Auch hier nahm, wie in der gesamten Kontroll-Population, die mediane Dauer der Interaktionen im Verlauf der Kokultivierung ab (mediane Dauer nach 0 – 8 Stunden: 5 Minuten; nach 24 – 32 Stunden: 4 Minuten; nach 48 – 56 Stunden: 3 Minuten).

Anhand der oben genannten Daten zeigt sich, dass die vorbeschriebene Interaktionskinetik kurzlebiger Kontakte²³ insbesondere der Kinetik naiver T-Zellen entspricht.

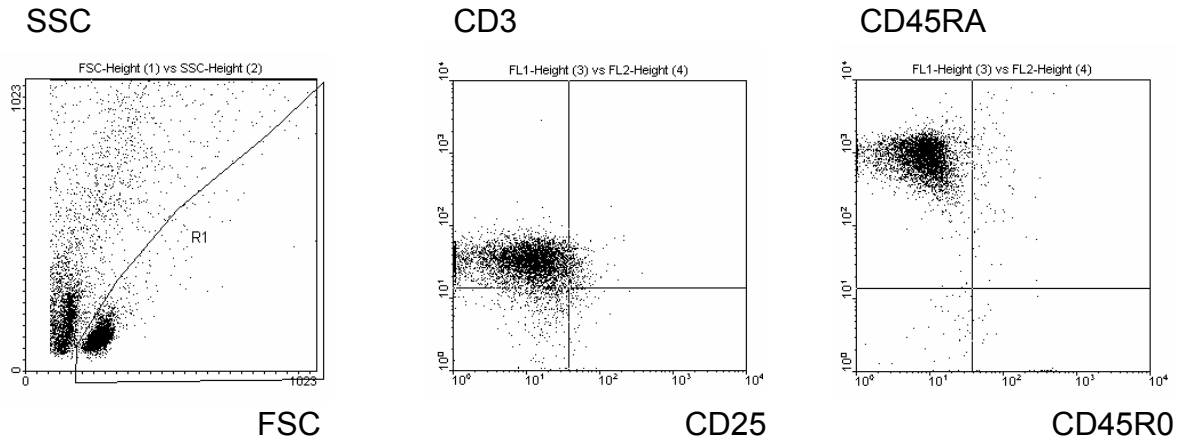
3.3 Aktivierung und Proliferation naiver T-Zellen nach Kokultivierung mit dendritischen Zellen

Um festzustellen, ob die dynamischen und im Wesentlichen nur kurz dauernden T-Zell-DC-Kontakte auch zur Aktivierung der naiven T-Zellen führen, wurde

zunächst die Expression von T-Zell-Aktivierungsmarkern durchflusszytometrisch untersucht. Als Aktivierungsmarker wurde die Expression von CD25 und CD45R0 verwendet. Ferner wurde untersucht, ob sich T-Lymphozyten während der Kokultivierung mit DC in T-Lymphoblasten umgewandelt hatten. Lymphoblasten stellen die aktivierte Form der T-Lymphozyten dar und können mit Hilfe der Durchflusszytometrie identifiziert werden, da sie sowohl größer als T-Lymphozyten sind als auch eine höhere Granularität aufweisen als diese. Aus Abbildung 17 ist ersichtlich, dass, im Gegensatz zu Kontroll-T-Zellen, die Kokultivierung naiver T-Zellen mit DC unter Oxidative Mitogenese-Bedingungen zur Expression von CD25 und Aufregulation von CD45R0 sowie zur Ausbildung großer und stark granulierter T-Zellblasten geführt hatte. Aus den Kontakten naiver nicht-mitogener Kontroll-T-Zellen zu DC resultierte dagegen keine Blastenbildung.

Da für eine suffiziente Immunreaktion letztlich aber die klonale Proliferation der T-Zellen erforderlich ist, wurde abschließend untersucht, ob die dargestellte T-Zell-Aktivierung auch in der Proliferation der Zellen mündete. Hierfür waren die T-Zellen vor der Kokultivierung mit DC mit dem fluoreszierenden Farbstoff CFSE beladen worden.

Kontrolle



Oxidative Mitogenese

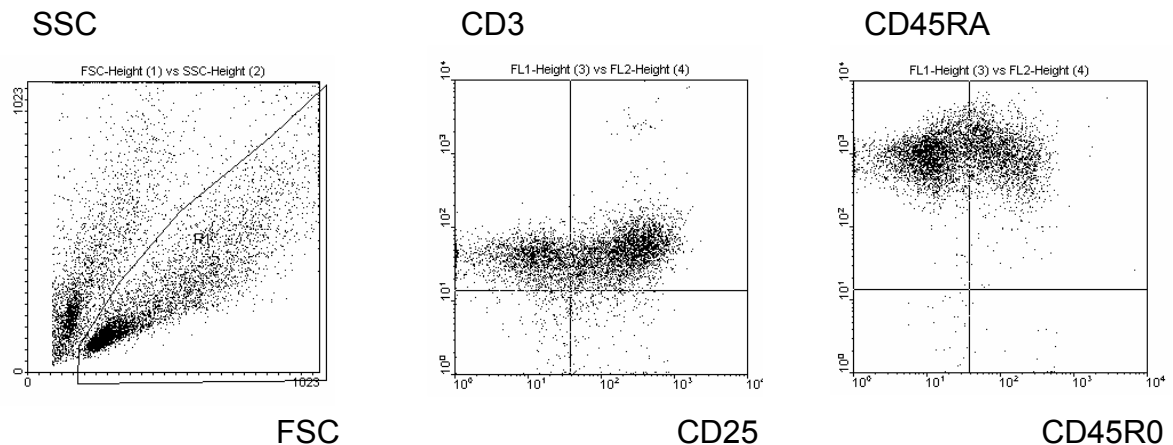


Abbildung 17. T-Zellaktivierung im Kollagengel. Dendritische Zellen wurden zusammen mit autologen naiven $CD4^+$ -T-Zellen in dreidimensionalen Kollagengelen für 48 Stunden kokultiviert. Anschließend wurden die Kollagenfibrillen mit Kollagenase verdaut, die Zellen isoliert und durchflusszytometrisch analysiert. Die Identifikation der T-Zellen erfolgte mittels Nachweis des T-Zell-spezifischen CD3-Moleküls. Propidiumiodid-positive Zellen wurden von der Analyse ausgeschlossen (vgl. Abb. 6).

Wurde die CFSE-Färbung nach publizierten Protokollen, wie sie für Suspensionszellen üblich sind, durchgeführt⁷⁰, waren die Zellen in Matrixkulturen teils nicht in der Lage zu proliferieren. Die Ursache hierfür dürfte in der Schädigung der Zellen der T-Zellen, möglicherweise mit Beeinträchtigung ihrer migratorischen Fähigkeiten liegen. In Konzentrationsreihen wurde der Effekt von CFSE auf die Migration von $CD4^+$ Zellen orientierend untersucht. 5 μ M CFSE führte zu reduzierter Migration, nicht jedoch 2,5 μ M CFSE. Eine

ausreichende Fluoreszenz der Zellen wurde mittels 2,5 μM CFSE erreicht (vgl. Abb. 18).

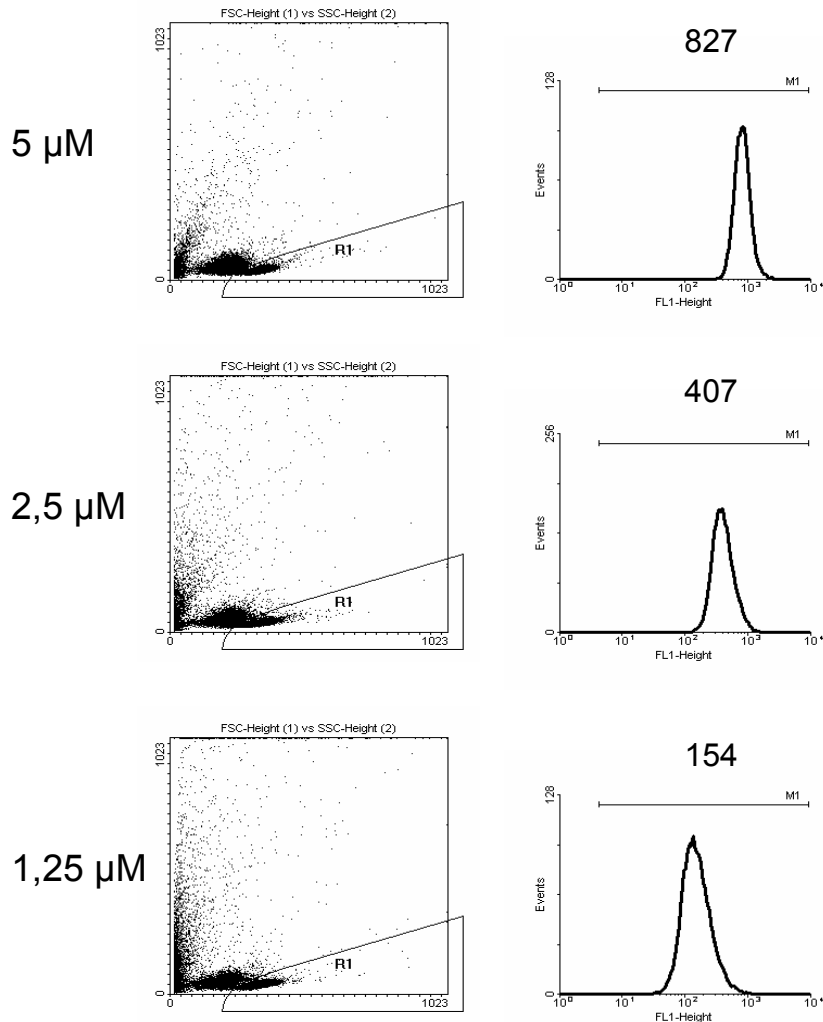
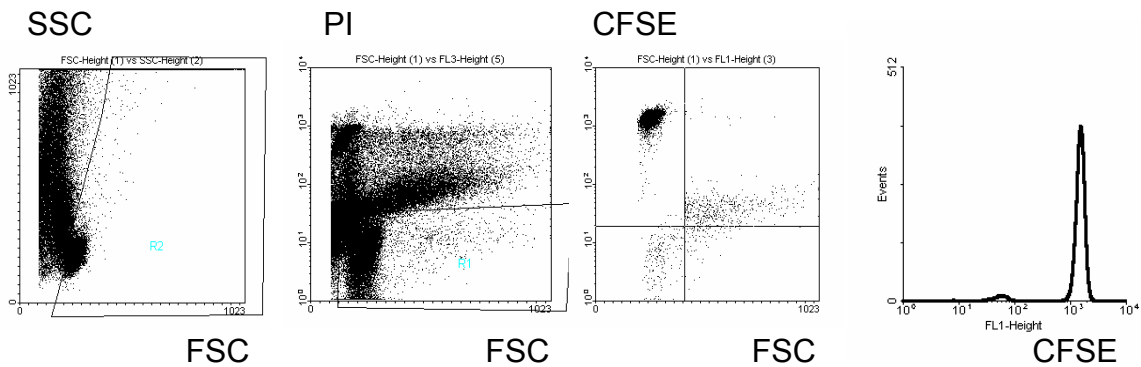


Abbildung 18. Anfärbung von CD4^+ T-Zellen mit verschiedenen CFSE-Konzentrationen. Isolierte CD4^+ Zellen wurden für drei Minuten mit 5, 2,5 oder 1,25 μM CFSE gefärbt und die resultierende Fluoreszenz nach 24 Stunden durchflusszytometrisch gemessen.

Aus Abbildung 19 ist ersichtlich, dass es innerhalb von 96 Stunden zu einer Proliferation naiver T-Zellen nach Oxidativer Mitogenese kam, eine Proliferation naiver Kontroll-T-Zellen nach Kokultivierung in Kollagenmatrix blieb jedoch aus.

Kontrolle



Oxidative Mitogenese

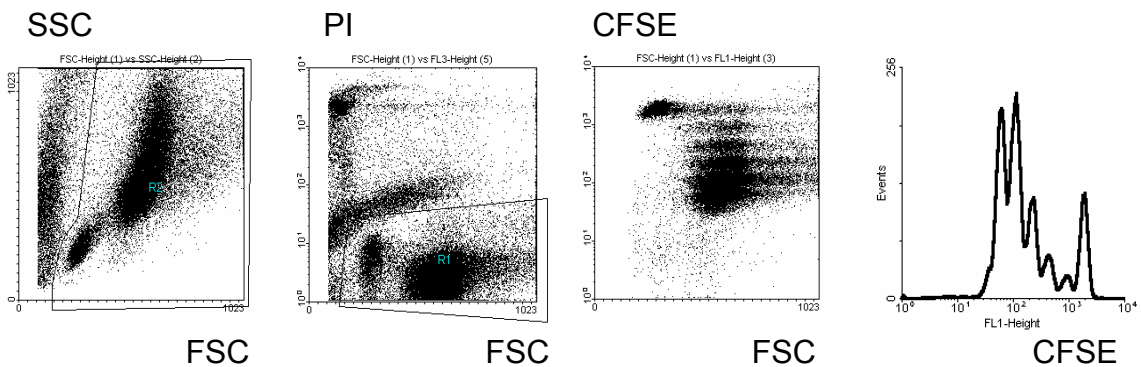


Abbildung 19. T-Zell-Proliferation im Kollagen gel. Dendritische Zellen wurden zusammen mit autologen, CFSE markierten, naiven CD4⁺-T-Zellen in dreidimensionalen Kollagen gellen für 96 Stunden kokultiviert. Anschließend wurden die Gele mit Kollagenase verdaut und die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. PI-positive Zellen wurden von der Analyse ausgeschlossen.

Abbildung 20 zeigt gegenüberstellend die Proliferation von Gedächtnis-T-Zellen und naiven T-Zellen nach Oxidativer Mitogenese und Kokultivierung mit DC in einer Kollagenmatrix. Somit erlaubt dieses Verfahren einen Vergleich der Proliferation naiver humaner T-Zellen mit der von Gedächtnis-T-Zellen für 3D-Kollagenkulturen.

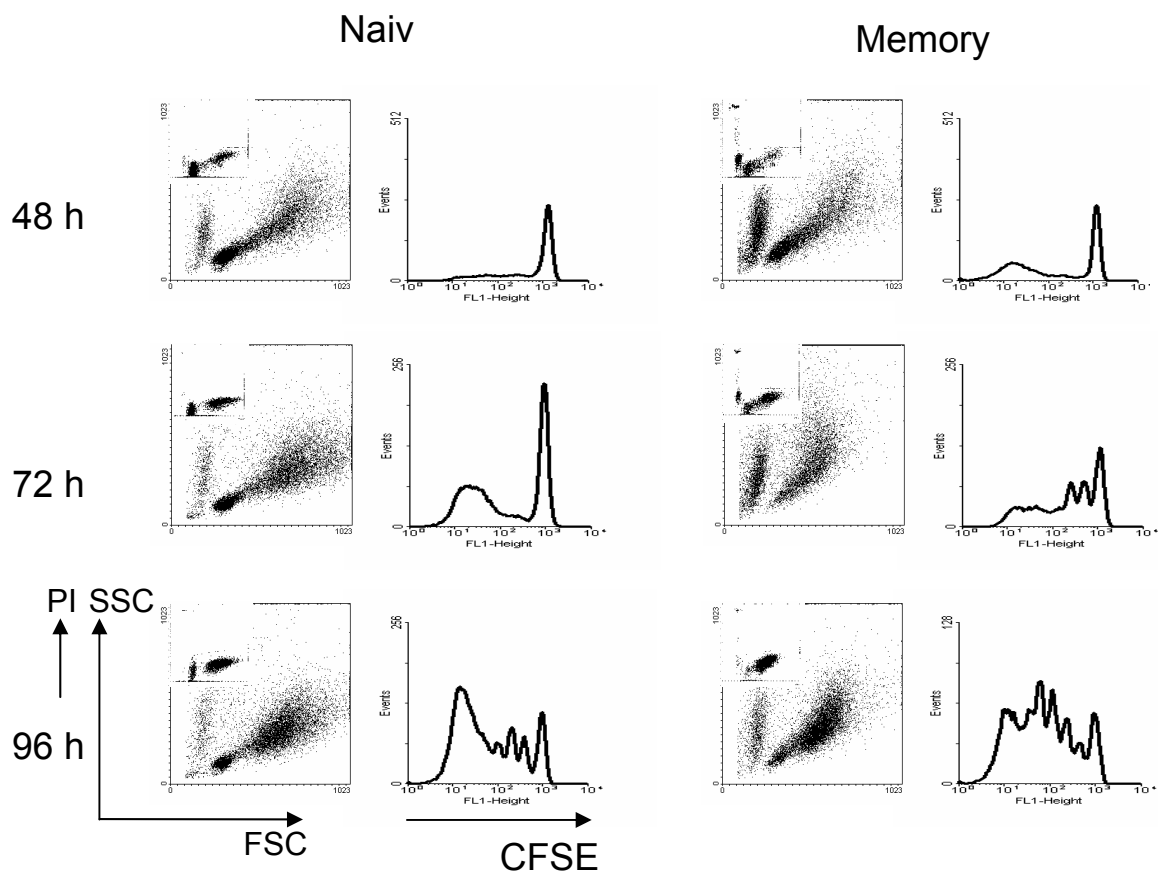


Abb. 20. Vergleich der Proliferation naiver CD4⁺ T-Zellen und Gedächtnis-T-Zellen. Naive und Gedächtnis-T-Zellen wurden nach Oxidativer Mitogenese mit DC (Verhältnis DC : T-Zellen 1 :100) in der Kollagenmatrix kokultiviert. Nach unterschiedlichen Zeitpunkten wurde die Matrix mit Kollagenase verdaut und die Proliferation durchflusszytometrisch erfasst.

3.4 Effizienz der Oxidativen Mitogenese im Vergleich mit Antigen-spezifischer T- Zell-Aktivierung

Das Modell der Oxidativen Mitogenese liefert eine breite polyklonale Aktivierung von T-Zellen unabhängig vom jeweiligen TCR-Typ, so dass es für die Bildgebung von Einzelkontakten besser geeignet erschien als z.B. die T-Zell-Aktivierung durch Superantigen. Um die tatsächliche Effizienz der Aktivierung kontrolliert zu etablieren, wurden die T-Zellen von DO11.10 Mäusen parallel sowohl mittels TCR-spezifischem OVA-Peptid als auch Oxidativer Mitogenese in 3D-Kollagenmatrices analysiert. Der Anteil der nicht proliferierenden naiven T-Zellen betrug nach Oxidativer Mitogenese 59,5 %.

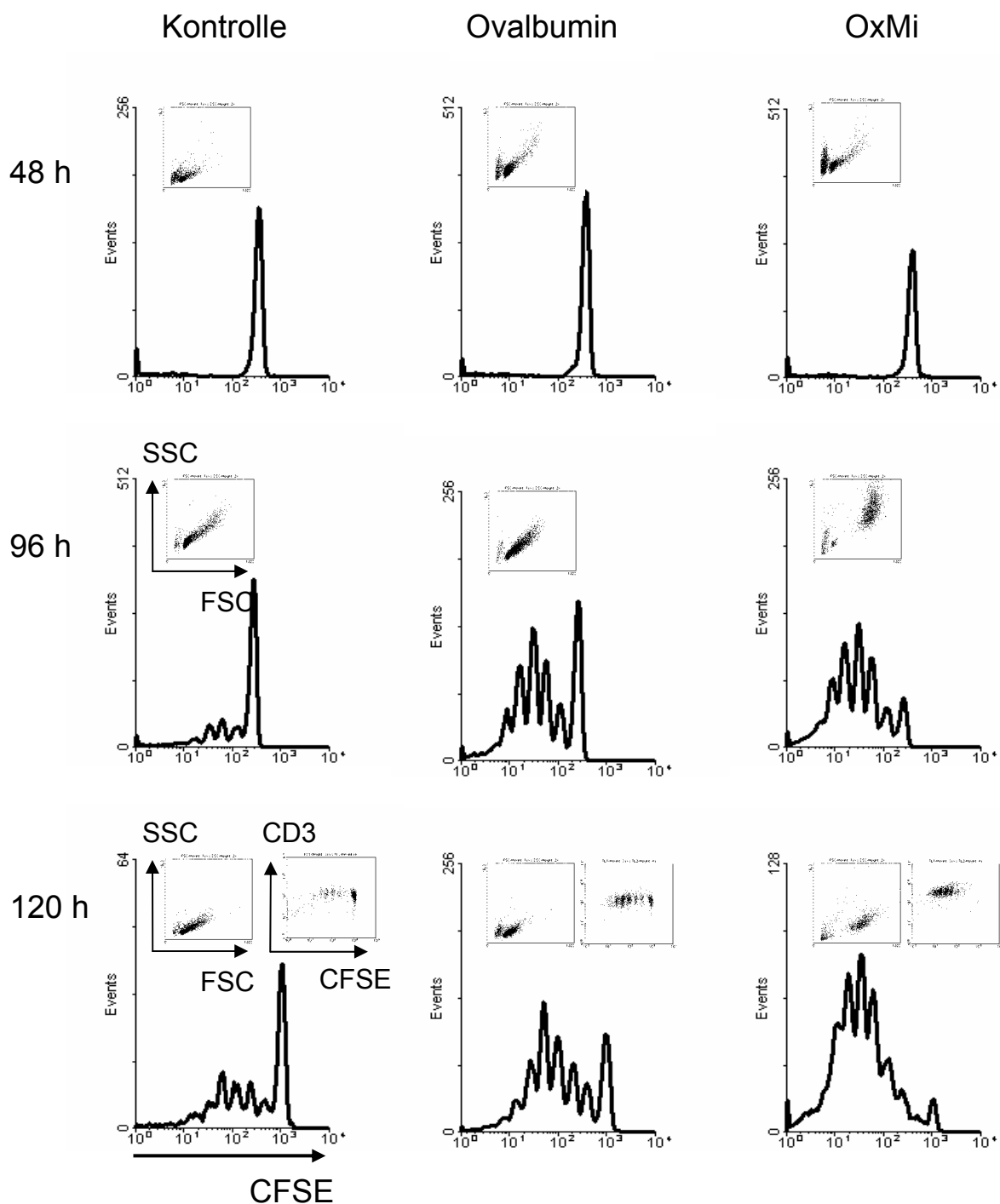


Abbildung 21. Proliferation muriner OVA-transgener CD4⁺ T-Zellen aus DO11.10 Mäusen.

CFSE gefärbte CD4⁺ T-Zellen wurden unbehandelt (Kontrolle), mit Ovalbumin-beladenen DC oder nach Oxidativer Mitogenese mit OVA-Peptid-freien DC aus Balb/v Mäusen (Verhältnis DC : T-Zellen 1 : 5) in der Kollagenmatrix kokultiviert wie beschrieben²³. Zu einem Ansatz wurde Ovalbumin in der Dosierung 1 mg/ml hinzugegeben. Nach unterschiedlichen Zeitpunkten (48h, 96h, 120h) wurde die Matrix mit Kollagenase verdaut und die Proliferation durchflusszytometrisch erfasst. Mit Oxidativer Mitogenese und Ovalbumin wurden vergleichbare Proliferationsraten erzielt (Proliferationsrate der naiven T-Zellen nach Oxidativer Mitogenese 40,5 %) Für die geringfügige Proliferation im Kontrollansatz könnte die Präsentation von z.B. Bestandteilen von FCS verantwortlich sein.

Somit können in TCR-transgenen murinen T-Zellen mittels Oxidativer Mitogenese vergleichbare Proliferationsraten wie nach Verabreichung des spezifischen Antigens erzielt werden.

Aus den mit Hilfe dieses Verfahrens ermittelten Resultaten geht hervor, dass sich in den nicht-mitogenen Kontroll-T-Zellen nach 96-stündiger Kokultivierung mit DC im Gegensatz zu den T-Zellen nach Oxidativer Mitogenese lediglich eine geringe Hintergrundproliferation zeigte. Für die diese geringfügige Proliferation im Kontrollansatz könnte die Präsentation von z. B. Bestandteilen von FCS verantwortlich sein. Zahlreiche Messungen waren jedoch auch ohne Mitoseaktivität. Dagegen resultierte in der Gruppe der naiven T-Zellen nach Oxidativer Mitogenese eine lebhafte Zellteilungsaktivität von bis zu sieben Zellteilungen.

Insgesamt kann zusammengefasst werden, dass sich naive humane T-Zellen unter Oxidative Mitogenese-Bedingungen und nicht-mitogene Kontroll-T-Zellen signifikant in der Kontaktdauer zu DC unterschieden. Keine Unterschiede wurden dagegen hinsichtlich Migrationsverhalten, Interaktionstypus bzw. Kontaktdynamik gefunden. Die Interaktionen naiver T-Zellen in der Oxidativen Mitogenese waren somit dynamisch, seriell und resultierten in einer T-Zell-Aktivierung und Proliferation, die den Effekten peptidspezifischer Interaktionen im TCR-transgenen Mausmodell vergleichbar waren.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden Interaktionen naiver humaner CD4⁺ T-Zellen mit DC in einer dreidimensionalen Kollagenmatrix untersucht. Die Kultur in Kollagenmatrices erlaubt durch ihre dreidimensionale Struktur sowohl eine dynamische Migration als auch eine gezielte Positionierung der Zellen. Ziel der Arbeit war einerseits die Etablierung einer adäquaten Methode zur Isolierung migrations- und proliferationsfähiger naiver T-Zellen. Als quantitatives Modell der Aktivierung diente die Oxidative Mitogenese. Des Weiteren sollte das serielle Kontaktmodell (serial encounter model) auch für humane naive T-Zellen bestätigt werden.

4.1 Methodenetablierung zur Isolation nicht voraktivierter menschlicher naiver T-Zellen

Ziel der Arbeit war u. a. die Etablierung einer Methode zur Isolation naiver humaner T-Zellen, die migrations- und proliferationsfähig sind. Die Mehrzahl der isolierten T-Zellen wanderte spontan und über mehrere Tage und war gekennzeichnet durch eine hohe Proliferationsrate. Durch Negativselektionierung CD45RA⁺ naiver T-Zellen von CD45RO⁺ T-Zellen wurde ein Verbleiben von Beads auf den Zellen vermieden. Somit ist durch die zuvor beschriebene Methode eine Isolation hochreiner und funktionell intakter Zellsubsets möglich.

Die in Experimenten anderer Arbeitsgruppen z. T. beschriebenen diskrepanten Befunde könnten u. a. auch durch die Isolationsmethode bedingt sein^{7,10,25,26,44,61}. Durch präparative Fehler während der Zellisolation, wie z.B. eine Unterbrechung der Kühlkette, aber auch nach optimal verlaufener Isolation, erhält man teilweise Zellpopulationen mit z. T. nur 40 % spontan migrierenden, jedoch trotzdem zu 90 % vitalen Zellen (Nachweis mittels Propidiumiodid- oder Trypanblaufärbung). Während der Kontakt von T-Zellen und DC in Flüssigkeitskulturen vor allem durch passive Bewegung der Zellen im Flüssigkeitsstrom infolge von Konvektion und Strömung des Mediums erzielt

wird, ist in einer dreidimensionalen Umgebung eine aktive Wanderung der T-Zellen zu den DC notwendig. Das reduziert den Anteil der Zellen, die aktiviert werden können, auf die migrierende Population, die eine suffiziente Anzahl an Kontakten etablierte. Weiterhin zeigen Zeitraffersequenzen, dass nicht migrierende Zellen in dreidimensionaler Umgebung zunächst von wandernden DC kontaktiert werden und schließlich beginnen, auf der DC zu wandern oder aber relativ statisch auf der DC verbleiben. Möglicherweise handelt es sich bei den beobachteten lang dauernden und statischen Interaktionen zwischen T-Zellen und DC um seitens der T-Zelle passiv etablierte Kontakte, wobei im jeweiligen Beobachtungszeitraum keine Migration induziert wurde.

4.2 Oxidative Mitogenese naiver T-Zellen als quantitatives Modell der Aktivierung naiver T-Zellen

Die Mehrzahl der bisher durchgeführten Untersuchungen von T-Zell-APC-Interaktionen wurde mit transgenen oder klonogenen Mauszellen durchgeführt^{10,28}. Quantitative Modelle für humane Zellen – wie im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt – sind notwendig, um systemspezifische Artefakte, etwa besonders stabile T-Zell-DC-Adhäsion infolge hochaffiner TCR-MHC-Interaktion, auszuschließen. Durch Verwendung der Oxidativen Mitogenese als quantitatives Modell der Aktivierung naiver T-Zellen wurde die Interaktion mit einem transgenen TCR vermieden, der eventuell künstlich hocheffiziente Bedingungen schaffen könnte für eine nachfolgende T-Zell-Aktivierung. Aus Inzuchtstämmen stammende Mauszellen könnten zudem stammbedingt Besonderheiten, wie z.B. eine besonders gute oder schlechte Motilität in vitro ausweisen. Zellen aus peripherem Blut des Menschen könnten sich zudem unterscheiden von Zellen, die aus der Mausmilz gewonnen wurden, z.B. im Sinne einer fehlenden Voraktivierung der Migration. Da die Oxidative Mitogenese ein unabhängiges, effizientes Modell der polyklonalen T-Zell-Aktivierung im Humansystem darstellt, repräsentiert dieses Modell am ehesten die natürlichen Interaktionsvorgänge zwischen naiven T-Zellen und DC.

Einschränkend ist hinzuzufügen, dass das Oxidative Mitogenese-Modell ein nicht direkt TCR abhängiges Modell darstellt.

4.3 Bestätigung des seriellen Kontaktmodells für naive humane T-Zellen

Während für naive Mauslymphozyten von unabhängigen Arbeitsgruppen gezeigt wurde, dass die initiale T-Zell-Aktivierung durch eine Serie kurzlebiger Interaktionen induziert wird^{23,24,42}, ist für menschliche T-Zellen bisher unbekannt, ob naive oder andere T-Zell-Subpopulationen dem seriellen Kontaktmodell folgen. In der vorliegenden Arbeit wurde daher die polyklonale Aktivierung isolierter peripherer T-Zellen im Modell der Oxidativen Mitogenese untersucht^{2,23}. Sowohl unter Oxidative Mitogenese- als auch unter Kontrollbedingungen wurden dabei fast ausschließlich dynamische T-Zell-DC-Kontakte beobachtet, langlebige und dynamische Interaktionen waren dagegen selten. Sowohl T-Zellen während Oxidativer Mitogenese als auch nicht-mitogene Kontroll-T-Zellen nahmen während der Migration oft sequentielle Kontakte zur selben oder zu benachbarten DC auf. In den Oxidative Mitogenese-Experimenten wurde zwar eine um ca. 50 % längere Interaktionsdauer im Vergleich zu den Kontrollexperimenten gemessen, die Mehrheit der Interaktionen dauerte aber in beiden Gruppen lediglich drei bis 20 Minuten. In den Oxidative Mitogenese-Experimenten, nicht jedoch in den Kontrollexperimenten, resultierten die Interaktionen in einer vollständigen Aktivierung der naiven T-Zellen und deren Proliferation.

Die Beobachtung kurz dauernder, serieller und dynamischer Interaktionen zwischen T-Zellen und APC wurde auch in anderen Arbeiten bestätigt. Gunzer et al.²³ beobachteten in Kollagengelen kurz dauernde und dynamische Kontakte mit Hilfe hoch auflösender Objektive (100fache Vergrößerung). Lediglich zu Beginn der Interaktion wurde eine geringe Reduktion der Migrationsgeschwindigkeit naiver T-Zellen, jedoch auch bei länger dauernden Interaktionen, kein kompletter Migrationsstopp verzeichnet⁶¹. Multizelluläre Aggregate wurden hier nicht beobachtet, die DC hatten meist nur Kontakt zu

lediglich einer oder wenigen T-Zellen. Auch Underhill et al.¹⁰ berichten über dynamische Kontakte von Hybrid-T-Zellen mit Antigen präsentierenden Makrophagen. Allerdings nahmen Underhill et al.¹⁰ an, dass es zu Beginn der Interaktion zunächst zu einem Stopp-Signal kommt, das in eine anschließende dynamische Interaktionsphase übergeht. Erste In-vivo-Analysen wurden kürzlich veröffentlicht, um Aussagen darüber machen zu können, wie T-Zell-APC-Interaktionen in vivo aussehen, z. T. allerdings mit widersprüchlichen Befunden. Miller et al.²⁴ beobachteten überwiegend dynamische und kurz dauernde Interaktionen in „Schwärmen“, dagegen nur wenige multizelluläre statische Kontakte. Ingulli et al.⁷ registrierten kleine Aggregate einer oder weniger T-Zellen pro DC. Stoll et al.²⁵ berichten dagegen über lang dauernde T-Zell-DC-Interaktionen. Bousso et al.²⁶ beobachteten in einer dreidimensionalen Thymusorgankultur vereinzelt zwar auch lang dauernde Kontakte zwischen sechs und zwölf Stunden, meist aber dynamische Kontakte (zwischen 13 und 36 min). Miller et al.⁴⁴ machten in lebenden explantierten Lymphknoten folgende Beobachtungen mittels Zwei-Photon-Mikroskopie: In den ersten zwei Stunden nach Eintritt in den Lymphknoten gingen naive T-Zellen v. a. kurze, dynamische und serielle Kontakte zu DC (durchschnittlich 11 bis 12 min) ein, spätere Stadien waren dagegen charakterisiert durch die Ausbildung länger dauernder multizellulärer, jedoch überwiegend dynamischer Kontakte. Anschließend gingen die T-Zellen bei bereits beginnender Größenzunahme wieder überwiegend kurz dauernde Kontakte zu DC ein (durchschnittlich 20 min). Innerhalb von 24 Stunden kam es zu einer Aktivierung und Proliferation naiver T-Zellen. Miller et al.^{24,44} sowie auch Bousso et al.²⁶ vermuten, dass die verschiedenen Kontaktmöglichkeiten eventuell. progressive Stadien des Aktivierungsvorganges darstellen. Wie bei Miller et al.⁴⁴ wurden sich sequentiell verändernde Kontaktzeiten unlängst auch für CD8⁺ T-Zellen und DC nach adoptivem Transfer der T-Zellen beschrieben⁴². Simultan durchgeführte durchflusszytometrische Untersuchungen ergaben, dass lange Kontakte aus Interaktionen von DC mit bereits aktivierten CD8⁺ T-Zellen (CD69⁺) resultierten, während sich die T-Zellen in dem Zeitraum, in dem sie bereits überwiegend kurze Kontakte herstellten, bereits einige Male geteilt hatten.

Bedingt durch die Beobachtung begrenzter Zeiträume und die zweidimensionale Darstellung der analysierten Zellen ist es andererseits auch möglich, dass der tatsächliche Anteil lang dauernder Kontakte unterschätzt wurde. Durch die Registrierung der Interaktionen lediglich in der fokussierten Ebene wurden einzelne Kontakte als beendet gewertet, wenn die interagierenden Zellen die Gelebene wechselten. Auch Überlagerungen einzelner Zellen im Kollagengel könnten zur Registrierung fälschlich kurzer Kontakte geführt haben. Zudem könnten Kontakte, die bereits zu Beginn eines Beobachtungsintervalls bestanden bzw. am Ende eines Intervalls noch nicht beendet waren, deutlich kürzer registriert worden sein als sie tatsächlich waren. Ebenso kann nicht sicher ausgeschlossen werden, dass zu Beginn eines Beobachtungszeitraumes bereits vorliegende Kontakte nicht bereits im vorhergehenden Intervall bestanden hatten, im nächsten Beobachtungsintervall aber als neue Kontakte gewertet wurden. Trotz dieser technischen Einschränkungen kann aber festgehalten werden, dass die überwiegende Mehrheit der Kontakte nur wenige Minuten andauerten, somit die Befunde der Dynamik im Lymphknoten *in vivo*, wie von Mempel et al.⁴² beschrieben, rekapitulieren. Insgesamt waren die Interaktionen naiver T-Zellen, die bereits zu Beginn eines Beobachtungszeitraumes an einer DC adhärenz waren, sowohl in den Oxidative Mitogenese- als auch in den Kontrollexperimenten während aller Beobachtungsintervalle signifikant länger als die der initial frei migrierenden T-Zellen (vgl. Abb. 10 bis 12). Aus methodischen Gründen war nicht zu differenzieren, ob dieser Befund die Variabilität der Interaktionsform darstellt oder aus passiver Aggregation während des Polymerisationsprozesses folgte. Auch die Verwendung unterschiedlicher Subtypen von APC und T-Zellen könnte mitverantwortlich für die beobachteten Unterschiede bezüglich der Kontaktmodi sein. DC besitzen eine hoch entwickelte Membrandynamik und –bewegung²³ sogar während T-Zellen an sie gebunden sind^{23,29}. Zusätzlich verfügen sie über eine Vielzahl kostimulatorischer Moleküle und können verschiedene Zytokine sezernieren^{31,32}. All dies könnte ihnen ermöglichen, dynamischere Kontakte zu T-Zellen einzugehen als andere APC. Auch die für die Aktivierung von T-Zellen benötigte Gesamtkontaktdauer könnte sich somit

reduzieren, verglichen mit der Kontaktdauer, die in einfacheren Modellen beobachtet wurde. Von Gunzer et al.^{11,61} wurde berichtet, dass die Interaktionen in Kollagengelen zwischen naiven T-Zellen mit DC tatsächlich dynamisch sind, während sie zwischen naiven T-Zellen und naiven B-Zellen aber statisch verlaufen¹¹. Somit kommt dem Typ der eingesetzten APC eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung naiver T-Zellen zu. In einer Studie in unserem Labor wurden in Parallelexperimenten mit Gedächtnis-T-Zellen teils deutlich verlängerte Interaktionszeiten zu DC beobachtet. Die Dauer der Kontakte wurde durch Verwendung eines blockierenden LFA-1-Antikörpers deutlich verkürzt (Hendrik Fischer, persönliche Mitteilung).

Während die Kontakte naiver Kontroll-T-Zellen nicht in ihrer Aktivierung resultierten, kam es zu einer vollständigen Aktivierung naiver T-Zellen nach Oxidativer Mitogenese mit Expression der Oberflächenmarker CD45R0 und CD25 als Folge kurz dauernder und dynamischer Interaktionen. Aufgrund der relativ vollständigen Aktivierung und Proliferation der T-Zellen repräsentiert die Oxidative Mitogenese ein valides Modell für die Analyse der immunologischen Synapse, sowohl in zweidimensionalen als auch in dreidimensionalen Modellen. Bei im Kollagenmatrix-Modell fast durchweg dynamischen T-Zell-DC-Interaktionen erscheint es fraglich, ob es während einer dynamischen Interaktion von T-Zellen mit DC überhaupt zur Ausbildung einer stabilen immunologischen Synapse kommt. Während eines dynamischen Kontaktes verändert sich die Kontaktzone zwischen T-Zelle und DC durch die häufig wechselnde Position der Zellen zueinander ständig. Dennoch kommt es zu einer vollständigen Aktivierung der naiven T-Zellen. Auch Miller et al.⁴⁴ beobachteten in den oben beschriebenen In-vivo-Experimenten von T-Zell-DC-Kontakten neben dynamischen, kurz dauernden und seriellen Kontakten zwischen naiven T-Zellen und DC in einem Stadium zwar auch länger dauernde Kontakte in Form multizellulärer Aggregate, diese waren jedoch ebenfalls durchweg dynamisch.

Die immunologische Synapse erreicht ihre stabile Struktur innerhalb von fünf Minuten¹⁵, das Triggern des TCR und seine anschließende Internalisierung werden jedoch über mehrere Stunden aufrechterhalten. Somit liegen kurze,

dynamische Kontakte im Erwartungsbereich einer effizienten Calcium-Signalgebung. Lee et al.³⁹ registrierten die stärkste Signalgebung bereits drei bis sieben Minuten nach Kontaktaufnahme und vor Ausbildung der reifen immunologischen Synapse.

Friedl et al.⁴³ erklären mit dem seriellen Kontaktmodell, wie naive T-Zellen durch serielle, dynamische Kontakte zu DC vollständig aktiviert werden können. Auch die Kontaktfrequenz und nicht nur die Kontaktdauer, wie im single encounter model vorausgesetzt, könnte entscheidend sein für die Aktivierung einer T-Zelle. Friedl et al.⁴³ gehen davon aus, dass für eine Aktivierung von T-Zellen eine bestimmte Anzahl von Interaktionen mit APC stattgefunden haben muss. Die Anzahl variiert dabei für verschiedene Arten von T-Zellen, TCR-Subtypen, APC-Typen und Umgebungsfaktoren. Der Kontakt zu verschiedenen DC führt dabei zu diskreten kurzen Signalen, die über einen gewissen Zeitraum gesammelt werden. Das serielle Kontaktmodell könnte damit eine Erklärung liefern für die Entstehung und Kontrolle bzw. das Ausbleiben einer Immunantwort. Liegt eine hohe Dichte Antigen beladener DC vor, wie beispielsweise während einer akuten Infektion⁴⁰, könnte eine einzelne T-Zelle durch zahlreiche Interaktionen mit DC in kurzer Zeit ausreichend Signale sammeln und somit aktiviert werden. Eine niedrige Dichte von Antigen präsentierenden DC⁴⁰ würde dagegen die Wahrscheinlichkeit verringern, dass T-Zellen die zur Aktivierung notwendige Anzahl an Interaktionen eingehen können. Eine Anergie der T-Zellen wäre dann die Folge.

4.4 Schlussfolgerungen

Um die Natur von T-Zell-APC-Interaktionen näher zu beleuchten, sollten sich weitere in-vitro- als auch in-vivo-Untersuchungen anschließen. Dauer und Dynamik der Kontakte als auch die nachfolgende Aktivierung und Proliferation der T-Zellen sollten in Abhängigkeit von verschiedenen T-Zell-Typen, der Art der APC und unterschiedlichen Umgebungsfaktoren näher untersucht werden. Um das Prinzip der Interaktion von T-Zellen mit APC, wie der DC, letztlich zu verstehen, wären vor allem methodisch einwandfreie in-vivo-Analysen intakter

lymphatischer Organe erforderlich, die es ermöglichen, Interaktionen von T-Zellen und APC eingehend und unter möglichst natürlichen Voraussetzungen zu untersuchen.

5 Zusammenfassung

Die Aktivierung naiver T-Zellen ist Folge eines Kontaktes zu Antigen präsentierenden Zellen (APC), die auf ihrer Oberfläche Antigene im MHC-Peptid-Komplex präsentieren. Bisherige Daten zur Kontaktdauer und -dynamik sowie zur nachfolgenden Aktivierung und Proliferation naiver T-Zellen beruhten meist auf Experimenten, die in Flüssigkulturmodellen gemacht wurden. Diese spiegeln jedoch nicht annähernd das dreidimensionale Netzwerk lymphatischer Organe wider, in dem der Kontakt zwischen humanen T-Zellen und APC in vivo stattfindet.

In der vorliegenden Arbeit wurden Kontakte zwischen naiven humanen T-Zellen und dendritischen Zellen (DC) in einer dreidimensionalen Kollagenmatrix sowohl bezüglich Dauer und Dynamik als auch die nachfolgende Aktivierung und Proliferation der naiven T-Zellen untersucht. Zur Aktivierung wurden T-Zellen mit NaIO_4 vorbehandelt und mit nicht vorbehandelten Kontrollzellen verglichen. Die Beobachtung der Zell-Zell-Kontakte erfolgte durch eine Langzeitanalyse mittels Zeitraffer-Videomikroskopie in jeweils drei festgelegten Beobachtungszeiträumen (0 bis 8 Stunden, 24 bis 32 Stunden und 48 bis 56 Stunden der Kokultivierung). Ob es infolge der Kontakte zu einer Aktivierung und Proliferation der naiven T-Zellen gekommen war, wurde mittels FACS-Analyse von Aktivierungsmarkern ermittelt. Zur Erfassung der Proliferation naiver CFSE-gefärbter T-Zellen nach Oxidativer Mitogenese und Kokultivierung mit dendritischen Zellen war eigens ein Protokoll etabliert worden.

Die Ergebnisse zeigen, dass im Kollagengel sowohl unter Oxidative Mitogenese-Bedingungen als auch in den nicht-mitogenen Kontrollkulturen fast ausschließlich kurz dauernde, meist nur wenige Minuten anhaltende Kontakte zwischen T-Zellen und DC beobachtet wurden. Über mehrere Stunden anhaltende T-Zell-DC-Kontakte, wie für Flüssigkulturen beschrieben, wurden dagegen nur sehr selten beobachtet. Es zeigten sich signifikant längere Kontaktzeiten unter Oxidative Mitogenese-Bedingungen im Vergleich zu den

Kontaktzeiten der Kontroll-T-Zellen. Die mediane Kontaktdauer lag jedoch in beiden Zellpopulationen während aller Beobachtungszeiträume bei nur wenigen Minuten. In beiden Zellpopulationen wurden fast ausschließlich dynamische und serielle Kontakte zu DC beobachtet. Multizelluläre Aggregate und statische Kontakte wurden dagegen in beiden Populationen nur selten gesehen. Als Folge der kurz dauernden, dynamischen und seriellen Kontakte zu DC kam es in der Population der naiven T-Zellen nach Oxidativer Mitogenese, nicht aber in der Kontrollpopulation zu einer anschließenden Aktivierung und Proliferation der naiven T-Zellen. Lang dauernde und statische T-Zell-DC-Kontakte, wie in Flüssigkeitskulturmodellen beobachtet und im single encounter model als notwendig für eine nachfolgende Aktivierung naiver T-Zellen beschrieben, wurden in dreidimensionaler Kollagenmatrix nur selten beobachtet.

Schlussfolgernd waren Aktivierung und Proliferation der beobachteten naiven T-Zellen im Kollagenmatrixmodell nach Oxidativer Mitogenese, wie im seriellen Kontaktmodell beschrieben, Folge sequentieller, kurz dauernder und dynamischer Kontakte zu einer oder auch zu mehreren DC. Um ein besseres Verständnis bezüglich der Natur von T-Zell-APC-Interaktionen zu erlangen, sollten sich weitere Untersuchungen, u. a. auch von humanen Gedächtnis-T-Zellen und anderen APC als DC sowohl in Kollagenmatrix als auch in in-vivo-Experimenten nicht transgener T-Zellen im Mausmodell anschließen.

6 Literaturverzeichnis

1. Friedl P., Noble PB., Zanker KS. T-lymphocyte locomotion in a three-dimensional collagen matrix. Expression and function of cell adhesion molecules. *J Immunol* 1995; 154: 4973-85
2. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998; 392: 245-52
3. Inaba K, Witmer MD, Steinman RM. Clustering of dendritic cells, helper T lymphocytes and histocompatible B cells during primary antibody responses in vitro. *J. Exp. Med.* 1984; 160: 858-876
4. Kupfer A, Singer SJ. The specific interaction of helper T cells and antigen – presenting B cells. IV. Membrane and cytoskeletal reorganizations in the bound T cell as a function of antigen dose. *J Exp. Med.* 1989; 170: 1697-1713
5. Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol.* 1991 ; 9: 271-296
6. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392: 245-254
7. Ingulli E, Mondino A, Khoruts A and Jenkins MK. In vivo detection of dendritic cell antigen presentation to CD4⁺ T cells. *J. Exp. Med.* 1997; 185: 2133-2141
8. Van Vorrhis WC, Valinsky J, Hoffman E, Luban J, Hair LS, Steinman RM. Relative efficacy of human monocytes and dendritic cells as accessory cells for T cell replication. *J. Exp. Med.* 1983; 158: 174-191
9. Inaba K, Steinman RM. Accessory cell-T lymphocyte interactions. Antigen-dependent and –independent clustering. *J. Exp. Med.* 1986; 163: 247-261

10. Underhill DM, Bassetti M, Rudensky A, Aderem A. Dynamic interactions of macrophages with T cells during antigen presentation. *J. Exp. Med.* 1999; 190: 1909-1914
11. Gunzer M, Weishaupt C, Basoglu Y, Grabbe S. Antigen specific interactions of T cells with B cells or DC differ fundamentally in terms of dynamics, interaction plane and outcome. O1 im Abstractband zum 7th International Symposium on Dendritic Cells. September 2001 in Bamberg Hergg. Schuler, Steinkasserer, Stingl
12. Lanzavecchia A, Iezzi G, Viola A. From TCR engagement to T cell activation: a kinetic view of T cell behaviour. *Cell* 1999; 96: 1-4
13. Dustin ML, Bromley SK, Kan Z, Peterson DA, Unanue E.R. Antigen receptor engagement delivers a stop signal to migrating T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997; 94: 3909-3913
14. Dustin ML, Shaw AS. Costimulation: building an immunological synapse. *Science* 1999; 283: 649-650
15. Grakoui A, Bromley SK, Sumen C, Davis MM, Shaw AS, Allen PM, Dustin ML. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 1999; 285: 221-227
16. Monks CR, Freiberg BA, Kupfer H, Sciaky N, Kupfer A. Three-dimensional segregation of supramolekular activation clusters in T cells. *Nature* 1998; 395: 82-86
17. Shaw AS, Dustin ML. Making the T cell receptor go the distance: a topological view of T cell activation. *Immunity* 1997; 6: 362-369

18. Ushiki T, Ohtani O, Abe K. Scanning electron microscopic studies of reticular framework in the rat mesenteric lymph node. *Anat. Rec.* 1995; 241: 113-122
19. Ebnet K, Kaldjian EP, Anderson AO, Shaw, S. Orchestrated information transfer underlying leukocyte endothelial interactions. *Annu. Rev. Immunol.* 1996 ; 14: 155-177
20. Gretz JE, Anderson AO, Shwa S. Cords, channels, corridors and conduits: critical architectural elements facilitating cell interactions in the lymph node cortex. *Immunol. Rev.* 1997; 156: 11-24
21. Maniotis AJ et al. Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments and nucleoplasm that stabilize nuclear structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997; 94: 849-854
22. Miyamoto S. et al. Integrins can collaborate with growth factors for phosphorylation of receptor tyrosine kinase and MAP kinase activation: roles of integrin aggregation and occupancy of receptors. *J. Cell Biol.* 1996; 135: 1633-1642
23. Gunzer M, Schäfer A, Borgmann S, Grabbe S, Zänker KS, Bröcker EB, Kämpgen E, Friedl P. Antigen presentation in extracellular matrix: interactions of T cells with dendritic cells are dynamic, short lived and sequential. *Immunity* 2000; 13: 323-332
24. Miller MJ, Wei SH, Parker I, Cahalan MD. Two-photon imaging of lymphocyte motility and antigen response in intact lymph node. *Science* 2002; 296: 1869-1873
25. Stoll S, Delon J, Brotz TM, Germain RN. Dynamic imaging of T cell-dendritic cell interactions in lymph nodes. *Science* 2002; 296: 1873-1876

26. Bousso P, Bhakta NR, Lewis RS, Robey E. Dynamics of thymocyte-stromal cell interactions visualized by two-photon microscopy. *Science* 2002; 296: 1876-1880
27. King PD, Katz DR. Human tonsillar dendritic cell-induces T cell responses: analysis of molecular mechanisms using monoclonal antibodies. *Eur. J. Immunol.* 1989; 19: 581-587
28. Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 1990; 346: 425-434
29. Gunzer M, Kämpgen E, Bröcker EB, Zänker KS, Friedl P. Migration of dendritic cells in 3D-collagen lattices: visualization of dynamic interactions with the substratum and the distribution of surface structures via a novel confocal reflection imaging technique. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1997; 417: 97-103
30. Friedl P, Entschladen F, Conrad C, Niggemann B, Zänker KS. CD4⁺ T lymphocytes migrating in three-dimensional collagen lattices lack focal adhesions and utilize β 1 integrin-independent strategies for polarization, interaction with collagen fibers and locomotion. *Eur. J. Immunol.* 1998; 28: 2331-2343
31. Abbas AK, Sharpe AH. T-cell stimulation: an abundance of B7s. *Nat. Med.* 1999; 5: 1345-1346
32. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification and their role in immunity. *Immunity* 2000; 12: 1221-127
33. Lanzavecchia A, Sallusto F. From synapses to immunological memory: the role of sustained T cell stimulation. *Curr. Opin. Immunol.* 2000; 12: 92-98

34. Valitutti S, Müller S, Cella M, Padovan E, Lanzavecchia A. Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide-MHC complexes. *Nature* 1995a; 375: 148-151
35. Delon J, Bercovici N, Raposo G, Liblau R, Trautmann A. Antigen-dependent and -independent Ca^{2+} responses triggered in T cells by dendritic cells compared with B cells. *J. Exp. Med.* 1998a; 188: 1473-1484
36. Delon J, Bercovici N, Liblau R, Trautmann A. Imaging antigen recognition by naive CD4⁺ T cells: compulsory cytoskeletal alterations for the triggering of an intracellular calcium response. *Eur. J. Immunol.* 1998b; 28: 716-729
37. Valitutti S, Dessing M, Aktories K, Gallati H, Lanzavecchia A. Sustained signaling leading to T cell activation results from prolonged T cell receptor occupancy. Role of the actin cytoskeleton. *J. Exp. Med.* 1995; 181: 577-584
38. Valitutti S, Müller S, Dessing M, Lanzavecchia A. Signal extinction and T cell repolarization in T helper cell-antigen-presenting cell conjugates. *Eur. J. Immunol.* 1996; 26: 2012-2016
39. Lee KH, Holdorf AD, Dustin ML, Chan AC, Allen PM, Shaw AS. T cell receptor signaling precedes immunological synapse formation. *Science* 2002; 295: 1539-1542
40. Sallusto F, Lanzavecchia A. Mobilizing dendritic cells for tolerance, priming and chronic inflammation. *J. Exp. Med.* 1999; 189: 611-614
41. Jezi G, Karjalainen K, Lanzavecchia A. The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cells. *Immunity* 1998; 8: 89-95

42. Mempel TR, Henrickson SE, Von Andrian UH. T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature*. 2004 Jan 8;427(6970):154-9
43. Friedl P, Gunzer M. Interaction of T cells with APC: the serial encounter model. *Trends in Immunology*. April 2001; 22: 187- 191
44. Miller JM, Safrina O, Parker I, Cahalan MD. Imaging the single cell dynamics of CD4⁺ T cell activation by dendritic cells in lymph nodes. 2004; 200: 847 - 856
45. Friedl P, Bröcker EB. TCR triggering on the move: diversity of t-cell interactions with antigen-presenting cells. *Immunological Reviews*. 2002; 186: 83 – 89
46. Friedl P. Prespecification and plasticity: shifting mechanisms of cell migration. *Current opinion in Cell Biology*. 2004; 16: 14 – 23
47. Lauffenburger DA, Horwitz AF. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 1996; 84: 359 – 369
48. Friedl P, Wolf K. Tumor cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer*. 2003; 3: 362 – 374
49. Friedl P, Borgmann S, Bröcker EB. Leukocyte crawling through extracellular matrix and Dictyostelium paradigm of movement – lessons from a social amoeba. *J Leukoc Biol*. 2001; 70: 491 – 509
50. Friedl P, Entschladen F, Conrad C, Niggemann B, Zanker KS. CD4⁺ T lymphocytes migrating in three-dimensional collagen lattices lack focal adhesions and utilize β -1 integrin-independent strategies for polarization,

interaction with collagen fibers and locomotion. *Eur J Immunol.* 1998 ; 28 : 2331 – 2343

51. Werr J, Xie X, Hedqvist P, Ruoslahti E, Lindbom L. β 1 integrins are critically involved in neutrophil locomotion in extravascular tissue in vivo. *J Exp Med.* 1998; 187: 2091 – 2096

52. Brakebusch C, Fillatreau S, Potocnik AJ, Bungartz G, Wilhelm P, Svensson M, Kearney P, Korner H, Gray D, Fassler R. β 1 integrin is not essential for hematopoiesis but is necessary for the T cell-dependent IgM antibody response. *Immunity.* 2002; 16: 465 – 477

53. Friedl P, Zanker KS, Bröcker EB. Cell migration strategies in 3D extracellular matrix: differences in morphology, cell matrix interactions and integrin function. *Micros Res Tech.* 1998 ; 43 : 369 – 378

54. Wolf K, Müller R, Borgmann S, Bröcker EB, Friedl P. Amoeboid shape change and contact guidance: T cell migration mechanisms in fibrillar collagen independent of matrix remodeling by MMPs and other proteases. *Blood.* 2003; 102: 3262 – 3269

55. Mandeville JT, Lawson MA, Maxfield FR. Dynamic imaging of neutrophil migration in three dimensions : mechanical interactions between cells and matrix. *J Leukoc Biol.* 1997; 61: 188 – 200

56. Dustin ML, Allen PM, Shaw AS. Environmental control of immunological synapse formation and duration. *Trend Immunol.* 2001; 22: 192 – 194

57. Negelescu PA, Krasieva TB, Khan A, Kerschbaum HH, Cahalan MD. Polarity of T cell shape, motility and sensitivity to antigen. *Immunity* 1996; 4: 421 - 430

58. Gretz JE, Kaldjian EP, Anderson AO, Shaw S. Sophisticated strategies of information encounter in the lymph node: the reticular network as a conduit of soluble information and a highway for cell traffic. *J Immunol.* 1996; 157: 495 - 499
59. Kaldjian EP, Gertz JE, Anderson AO, Shi Y, Shaw S. Spatial and molecular organization of lymph node T cell cortex: a labyrinthine cavity bounded by an epithelium-like monolayer of fibroblastic reticular cells anchored to basement membrane-like extracellular matrix. *Int Immunol.* 2001; 13: 1243 – 1253
60. Faroudi M, Zaru R, Müller S, Valitutti S. Cutting edge: T lymphocyte activation by repeated immunological synapse formation and intermittent signaling. *J Immunol.* 2003; 171: 1128 – 1132
61. Gunzer M, Weishaupt C, Hillmer A, Basoglu J, Friedl P, Dittmar KE, Kolanus W, Varga G, Grabbe S. A spectrum of biophysiological interaction modes between T cells and different antigen-presenting cells during priming in 3-D collagen and in vivo. *Blood* 2004; 104: 2801 – 2809
62. Hart DN. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 1997. 90: 3245 - 3287
63. Valitutti S, Lanzavecchia A. Serial triggering of TCRs: a basis for the sensitivity and specificity of antigen recognition. *Immunol Today* 1997. 18: 299 - 304
64. Schoenberger SP, Toes RE, van der Voort EI et al. T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* 1998. 393: 480 - 483

65. Ridge JP, Di Rosa F, Matzinger P. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4⁺ T-helper and a T-killer cell. *Nature* 1998. 393 (6684): 474 - 478
66. Friedl P, Bröcker EB. T cell migration in three-dimensional extracellular matrix: guidance by polarity and sensations. *Dev Immunol* 2000; 7: 249 – 266 (entspricht 68)
67. Feuillet V, Lucas B, Di Santo JP, Bismuth G, Trautmann A. Multiple survival signals are delivered by dendritic cells to naive CD4⁺ T cells. *Eur J Immunol*. 2005. 35 (9) : 2563 – 2572
68. Dustin ML, Carpen O, Springer TA. Regulation of locomotion and cell-cell contact by the LFA-1 and ICAM-1 adhesion receptors. *J Immunol*. 1992. 148 (9): 2654-2663
69. Schleiffenbaum B et al. Soluble L-selectin is present in human plasma at high levels and retains functional activity. *J Cell Biol*. 1992. 119(1):229-38.
70. Hasbold J, Hodgkin PD. Flow cytometric cell division tracking using nuclei. *Cytometry*. 2000. 40(3):230-7.
71. Rhodes J et al. Therapeutic potentiation of the immune system by costimulatory Schiff-base-forming drugs. *Nature* 1995.377(6544):71-5.
72. Inaba K et al. Dendritic cells induce T lymphocytes to release B cell-stimulating factors by an interleukin 2-dependent mechanism. *J Exp Med*. 1983. 158(6):2040-57.
73. CD-ROM Interaktionen naive T-Zellen und dendritische Zellen, Oxidative Mitogenese und Kontrollläufe

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. P. Friedl danke ich für die Überlassung des Themas der vorliegenden Dissertation und die fachliche Betreuung sowie für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes zur Durchführung der Laborarbeiten in der Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie.

Bei Herrn PD Dr. med. S. Borgmann, stetiger und geduldiger Betreuer und Motivator, möchte ich mich ganz herzlich für die fachliche und menschliche Hilfestellung bedanken, ohne die die Umsetzung meiner Doktorarbeit nicht möglich gewesen wäre.

Für die praktische Hilfe bei der Erlernung der Arbeitstechniken sowie für die Hilfestellungen im Laboralltag möchte ich mich bei Frau Martina Joßberger und allen weiteren Mitarbeitern des Labors bedanken.

Herrn Alexander Becker möchte ich für die technische Hilfe danken, ohne die meine Arbeit den Weg aus meinem Rechner nicht geschafft hätte.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern Johann und Erika sowie meinen Schwestern Heike und Laura für ihre Unterstützung danken.

Mein Dank gilt auch meinem Sohn Samuel und Matthias May, dem Mann, mit dem ich den Rest meines Lebens verbringen möchte, dafür, dass sie beide einfach immer für mich da sind.

Sabine Brookman-Amisshah

Lebenslauf

Personalien

Name: Sabine Brookman-Amisshah
Geburtsdatum: 8. April 1976
Geburtsort: Bad Brückenau
Anschrift: Wöhrdstraße 17, 93059 Regensburg
Familienstand: geschieden
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1982 bis 1986 Grundschule Schondratal
1986 bis 1995 Franz-Miltenberger-Gymnasium, Bad Brückenau
06/1995 Abiturprüfung

Studium

10/1995 bis 10/2002 Studium der Humanmedizin an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität in Würzburg
07/1997 Ärztliche Vorprüfung
07/1998 1. Teil der Ärztlichen Prüfung
03/2001 2. Teil der Ärztlichen Prüfung
10/2002 3. Teil der Ärztlichen Prüfung

10/2000 bis 09/2001 und 10/2002 bis 09/2003 Erziehungsurlaub

Beruf

10/2003 bis 09/2004 Ärztin im Praktikum, Abteilung für Kinderurologie der Universität Regensburg, Klinik St. Hedwig

10/2004 bis 12/2005

Assistenzärztin, Abteilung für Kinderurologie der
Universität Regensburg, Klinik St. Hedwig

Seit 01/2006

Assistenzärztin in der Klinik für Urologie und
Kinderurologie, Kliniken Nordoberpfalz AG