

Charakterisierung von CD25+ regulatorischen T Zellen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Markus Kleinewietfeld

aus Rietberg

Berlin 2006

1. Gutachter: Prof. Thomas Blankenstein

2. Gutachter: Prof. Wolfgang Uckert

Disputation am 21.12.2006

für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	4
1.1 IMMUNOLOGISCHE SELBST-TOLERANZ	5
1.1.1 <i>Zentrale Toleranz</i>	6
1.1.2 <i>Periphere Toleranz</i>	8
1.2 REGULATORISCHE T-ZELLEN ZUR AUFRECHTERHALTUNG PERIPHERER TOLERANZ	9
1.2.1 <i>Tr1 und Th3 CD4+ regulatorische T-Zellen</i>	11
1.2.2 <i>Natürliche CD25+CD4+ regulatorische T-Zellen</i>	12
1.2.2.1 Phänotyp von CD25+ regulatorischen T-Zellen	13
1.2.2.2 Entstehung von CD25+ regulatorischen T-Zellen	15
1.2.2.3 Wirkungsweise von CD25+ regulatorischen T-Zellen	16
1.2.2.4 Kontrolle von CD25+ regulatorischen T-Zellen	18
1.2.2.5 Unterschiede von humanen und murinen CD25+ regulatorischen T-Zellen	19
1.3 DIE ROLLE VON CD25+ REGULATORISCHEN T-ZELLEN IN AUTOIMMUNKRANKHEITEN UND IN DER TUMORIMMUNOLOGIE	20
1.3.1 <i>CD25+ Treg zur Therapie von Autoimmunkrankheiten</i>	21
1.3.2 <i>Die Rolle von CD25+ Treg bei der Tumورimmuntherapie</i>	24
1.4 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	26
2. MATERIAL UND METHODEN	27
2.1 MATERIALIEN	27
2.1.1 <i>Chemikalien & Verbrauchsmaterial</i>	27
2.1.1 <i>Peptide und biologisches Material</i>	27
2.1.2 <i>Puffer, Medien und Lösungen</i>	28
2.1.4 <i>Versuchstiere</i>	29
2.1.5 <i>Monoklonale Antikörper</i>	29
2.1.6 <i>Synthetische Oligonukleotide</i>	31
2.1.7 <i>Geräte</i>	32
2.1.8 <i>Software</i>	33
2.2 METHODEN	33
2.2.1 <i>Agarose Gelelektrophorese</i>	33
2.2.2 <i>Präparation von Zellsuspensionen</i>	34
2.2.2.1 Präparation von murinen Milzzellen	34
2.2.2.2 Präparation von murinen Thymuszellen	34
2.2.2.3 Präparation von murinen Lymphknotenzellen	34
2.2.2.4 Präparation von murinen PBMC	35
2.2.2.5 Präparation von murinen Zellen aus Peyerschen Plaques	35
2.2.2.6 Präparation von Tumor-Infiltraten	35
2.2.2.7 Präparation von ZNS-Infiltraten	36
2.2.2.8 Präparation von humanen PBMC	36
2.2.3 <i>Antikörperfärbung</i>	36
2.2.3.1 <i>Oberflächen Färbung</i>	36
	1

2.2.3.2 Intrazelluläre Färbung	37
2.2.4 <i>Fluoreszenz-aktivierte-Zellsortierung/Durchflusszytometrie</i>	37
2.2.4.1 Allgemeines Prinzip	37
2.2.4.2 Sortierung von Zellen	38
2.2.4.3 Durchflusszytometrische Analyse von Zellsuspensionen	38
2.2.5 <i>Magnetische Zellsortierung</i>	39
2.2.6 <i>RNA Isolation</i>	39
2.2.7 <i>Copy DNA (cDNA) Präparation</i>	40
2.2.8 <i>Realtime RT-PCR</i>	40
2.2.9 <i>Genexpressionsanalysen</i>	41
2.2.10 <i>Zellkultur</i>	42
2.2.10.1 Suppressions-Assay	42
2.2.10.2 Migrations-Assay	43
2.2.10.4 Proliferations-Assay & T-Zell Restimulation	43
2.2.10.5 Ko-Kultivierung von Treg und dendritischen Zellen	44
2.2.11 <i>BrdU Markierung und durchflusszytometrischer Nachweis</i>	44
2.2.12 <i>CFDA-SE Markierung und adoptiver Transfer von T-Zellen</i>	44
2.2.13 <i>Induktion und Wertung von EAE in SJL/J Mäusen</i>	45
2.2.14 <i>Adhäsions-Assay</i>	45
2.2.15 <i>Tumorinduktion mit J558L Plasmazytom Zellen</i>	46
2.2.15.1 J558L-Tumorzelllinie	46
2.2.15.2 Applikation von Tumorzellen	46
2.2.16 <i>Tumorinduktion mit B16 Melanom Zellen</i>	46
2.2.16.1 B16-Tumorzelllinie	46
2.2.16.2 Applikation von Tumorzellen	46
3. ERGEBNISSE	47
3.1 GENEXPRESSIONSANALYSE VON CD25+ CD4+ T-ZELLEN	47
3.2 CCR6 DEFINIERT EFFEKTOR-GEDÄCHTNISZELL ÄHNLICHE REGULATORISCHE CD25+ CD4+ T-ZELLEN IN DER MAUS (T _{REM})	55
3.2.1 <i>Die CCR6 Expression auf CD4+T-Zellen in der Maus</i>	56
3.2.2 <i>CCR6 als Treg Marker</i>	58
3.2.3 <i>Die CCR6 Expression segregiert mit einem aktivierten Effektor-Gedächtniszell Phänotyp</i>	64
3.2.4 <i>Die CCR6 Expression definiert T-Zellen mit einer hohen Proliferationsrate</i>	66
3.2.5 <i>Eine CCR6 Expression wird nach Antigenkontakt in vivo induziert</i>	68
3.2.6 <i>CCR6+ Treg können auf das Chemokin CCL20 reagieren</i>	75
3.2.7 <i>CCR6+ Treg unterscheiden sich funktionell von CCR6- Treg</i>	78
3.2.8 <i>CCR6+ Treg akkumulieren in peripheren Geweben im Verlauf von Entzündungen</i>	81
3.2.8.1 CCR6+ Treg akkumulieren im zentralen Nervensystem während des Verlaufs von EAE	81
3.2.8.2 CCR6+ Treg akkumulieren im Tumor-Infiltrat	86
3.3 CCR6+ EFFEKTOR-GEDÄCHTNISZELL ÄHNLICHE REGULATORISCHE CD25+ T ZELLEN IM MENSCHEN	92
3.3.1 <i>CCR6 Expression auf CD4+T-Zellen im Menschen</i>	92
3.3.2 <i>CCR6+ humane CD25^{high} CD4+ Zellen sind regulatorische T-Zellen</i>	97

3.3.3 <i>CCR6+ regulatorische- und Effektor-Gedächtniszell ähnliche Populationen im Menschen unterscheiden sich durch eine differentielle Adhäsionsmolekül-Expression</i>	98
3.3.3.1 Abwesenheit von CD49d auf CCR6+ CD25 ^{high} Effektor-Gedächtniszell ähnlichen Treg	98
3.3.3.2 Die Regulation von CD49d steuert die differentielle Expression von VLA-4 auf T _{REM} und T _{EM}	100
3.3.3.3 Gegensätzliche Expression von VLA-4 und CLA auf humanen CD4+ T-Zellen	102
3.3.3.4 CD49d und CCR6 definieren humane Treg mit der höchsten Foxp3 Expression	106
3.3.4 <i>CD49d und CCR6 Expression in der Maus</i>	108
3.4 DER EINFLUSS VON DEM CHEMOKINREZEPTOR CCR6 WÄHREND DER THYMUS GESTEUERTEN ENTWICKLUNG VON CD25+ TREG	111
3.4.1 <i>CCR6 Expression auf murinen Thymozyten</i>	111
3.4.2 <i>CCR6+ CD25+ Thymozyten sind Treg-Vorläuferzellen</i>	113
3.4.3 <i>Phänotyp von CCR6+ CD25+ Thymozyten</i>	117
3.4.4 <i>CCR6 defiziente Mäuse haben keine offensichtlichen Störungen während der Treg Zell Entwicklung</i>	119
4. DISKUSSION	121
4.1 EXPRESSIONSPROFIL VON CD25+CD4+ REGULATORISCHEN T-ZELLEN	122
4.2 CCR6 DEFINIERT EFFEKTOR-GEDÄCHTNISZELL ÄHNLICHE REGULATORISCHE CD25+ CD4+ T-ZELLEN IN DER MAUS UND IM MENSCHEN (T _{REM})	124
4.2.1 <i>CD25+ Treg bezeichnen eine heterogene Zellpopulation und können phänotypisch und funktionell in unterschiedliche Subpopulationen unterteilt werden</i>	125
4.2.2 <i>Die Entstehung von T_{REM} verläuft parallel zur T_{EM} Induktion</i>	130
4.2.3 <i>Die Balance von antagonistisch wirkenden CCR6+ T_{REM} und T_{EM} kontrolliert die Immunreaktion im entzündeten Gewebe</i>	132
4.3 DIE ENTWICKLUNG VON CD25+ TREG VORLÄUFERZELLEN IM THYMUS	139
4.3.1 <i>CCR6 Expression von Thymozyten</i>	139
4.3.2 <i>CCR6 identifiziert Thymozyten mit der höchsten Foxp3 Expression</i>	140
4.3.3 <i>Die CCR6 Expression im Thymus scheint eine Vorstufe von reifen CD25+ Thymozyten zu charakterisieren</i>	141
4.4 ZUSAMMENFASSUNG DER DISKUSSION	145
4.5 AUSBLICK	147
5. LITERATURVERZEICHNIS	149
6. ZUSAMMENFASSUNG	159
7. SUMMARY	161
8. ABKÜRZUNGEN	163
9. DANKSAGUNG	165
10. EIDESTÄTTLICHE ERKLÄRUNG	166