

Medizinische Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin
aus der Medizinischen Klinik I für Gastroenterologie
Direktor: Professor Dr. Martin Zeitz

**REGULATORISCHE $\gamma\delta$ T-ZELLEN BEI COLITIS:
EIN NEUER ANSATZPUNKT FÜR DIE THERAPIE?**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades
Doctor rerum medicarum
der Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

vorgelegt von Anja Andrea Kühl
aus Berlin

Referent: Priv. Doz. Dr. Jörg Hoffmann

Korreferent: Professor Dr. Toni Cathomen

Gedruckt mit Genehmigung der Charité - Universitätsmedizin
Berlin
Campus Benjamin Franklin

Promoviert am: 23.06.2006

DANKSAGUNG

Diese Arbeit wurde im immunologischen Labor der Arbeitsgruppe von PD Dr. med. Hoffmann, Oberarzt der Medizinischen Klinik I für Gastroenterologie, durchgeführt, und ich möchte mich als erstes bei allen bedanken, die das Entstehen dieser Arbeit ermöglicht haben:

bei Herrn Professor Dr. Martin Zeitz, Direktor der Medizinischen Klinik I, für die ausgezeichneten Arbeitsmöglichkeiten in seiner Abteilung. Herrn Dr. Jörg Hoffmann danke ich für die interessante Themenstellung, seine Förderung des eigenständigen Denkens und Arbeitens sowie der fachlichen Weiterbildung im In- und Ausland und für die konstruktive Durchsicht dieser Arbeit. Herzlicher Dank gilt Herrn Dr. Christoph Loddenkemper für die hervorragende Einführung in die histologische Begutachtung und für seine unermüdliche Hilfsbereitschaft bei Rückfragen. Von ganzem Herzen danke ich meinen Kollegen in der Arbeitsgruppe, Anne Schönberg und Wolfgang Höhne, die sich für mich nicht nur mit administrativen Problemen sondern vor allem auch mit denen der elektronischen Datenverarbeitung herumschlügen und besonders Nina Pawlowski und Katja Grollich, die mir motivierend und tatkräftig bei allen Versuchen zur Seite standen sowie für die vielen lustigen Stunden ausserhalb des Labors; wir waren ein unschlagbares Team. Ebenso danke ich Dr. Philipp Cremer, dessen fachliche Ratschläge und Aufmunterungen zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen. Für ein anregendes Arbeitsklima und viele interessante Diskussionen danke ich den Arbeitsgruppen Siegmund und Wittig. Ferner möchte ich den Tierpflegern der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin, vor allem Frau Steinbach und Frau Wagner, für die ausgezeichnete Betreuung und Pflege der Tiere sowie ihre Hilfestellungen an den Wochenenden herzlich danken. Für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit danke ich der DCCV e.V. sowie dem BMBF und dem KN CED. Besonders inniger Dank gilt meinen Eltern und meiner Schwester, die mich immer unterstützten und auf meinem beruflichen Werdegang stets gefördert haben. Meiner Familie gebührt allerdings der größte Dank: meinem Mann Bert für sein Vertrauen in mich und seinen unerschütterlichen Glauben an meine Fähigkeiten, für seine unermüdliche Unterstützung und Motivation; sein Urteil und seine Kritik waren und sind mir immer besonders wertvoll und hilfreich und meinem Lennart, der so einige Wochenenden im Labor verbringen musste und dann noch zum Spitzenstecken herangezogen wurde.

INHALT

DANKSAGUNG

iii

INHALT

iv-vi

1	EINLEITUNG	1-15
1.1	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED)	1-3
1.2	$\gamma\delta$ T-Zellen	3-6
1.3	$\gamma\delta$ T-Zellen bei CED	6-8
1.4	CED-Tiermodelle	8-15
1.4.1	<i>Induzierbare Mausmodelle</i>	9-12
1.4.1.1	<i>DSS-induzierte Colitis</i>	10
1.4.1.2	<i>TNBS-induzierte Colitis</i>	11-12
1.4.2	<i>Genetische Mausmodelle</i>	12-15
1.4.2.1	<i>IL-2 ko Mäuse</i>	12-13
1.4.2.2	<i>TNF^{ΔARE} Mäuse</i>	14-15
2	ZIELSETZUNG	16
3	MATERIAL UND METHODEN	17-39
3.1	Material	17-25
3.1.1	<i>Geräte</i>	17
3.1.2	<i>Verbrauchsmaterial</i>	18
3.1.3	<i>Antikörper und Primer</i>	18-19
3.1.4	<i>Chemikalien und Reagenzien</i>	19-21
3.1.5	<i>Zytokine und Stimulanzen</i>	22
3.1.6	<i>Lösungen und Puffer</i>	22-23
3.1.7	<i>Zellmedien</i>	24
3.1.8	<i>Versuchstiere (Mäuse)</i>	24
3.1.9	<i>Hybridome</i>	25
3.2	Methoden	25-39
3.2.1	<i>Aufzucht und Behandlung von Versuchstieren</i>	25-26
3.2.2	<i>Colitis-Induktion</i>	26
3.2.3	<i>Zellkultur</i>	27-28
3.2.3.1	<i>in vitro-Kultivierung von $\gamma\delta$ T-Zellen</i>	27-28
3.2.4	<i>Antikörpergewinnung</i>	28-29

3.2.5	Antikörpermarkierung	29-30
3.2.6	Zellisolierung	30-33
3.2.6.1	<i>Isolierung von Splenozyten</i>	30
3.2.6.2	<i>Isolierung von Lymphozyten aus mesenterialen Lymphknoten</i>	30
3.2.6.3	<i>Isolierung von Lamina propria Lymphozyten</i>	31
3.2.6.4	<i>Isolierung muriner $\gamma\delta$ T-Zellen</i>	31-32
3.2.6.5	<i>Isolierung humaner $\gamma\delta$ T-Zellen</i>	32
3.2.6.6	<i>Isolierung humaner $CD4^+CD25^+$ T-Zellen</i>	32-33
3.2.7	Molekularbiologische Methoden	33-35
3.2.7.1	<i>DNA-Isolierung</i>	33-34
3.2.7.2	<i>PCR</i>	34
3.2.7.3	<i>Gel-Elektrophorese</i>	34-35
3.2.8	Analytik	35-39
	<i>Proliferationstest</i>	35-36
	<i>ELISA</i>	36-37
	<i>Durchflusszytometrie</i>	37-38
	<i>Histologie</i>	38-39
	<i>Hämogramm</i>	39
	<i>Statistik</i>	39
4	ERGEBNISSE	40-81
4.1	Einfluss einer $\gamma\delta$ T-Zelldepletion auf den Verlauf einer DSS-induzierten Colitis	40-42
4.2	Verlauf einer DSS-induzierten Colitis bei $\gamma\delta$ T-Zelldefizienz	43-47
4.3	$\gamma\delta$ T-Zelldepletion im immunologischen Colitis-Modell der IL2 ko Maus	48-53
4.4	$\gamma\delta$ T-Zelldepletion im immunologischen Crohn-Modell der $TNF^{\Delta ARE}$ Maus	54-57
4.5	$\gamma\delta$ T-Zelldepletion bei IFN-γ ko-Mäusen mit DSS-induzierter Colitis	58-60
4.6	Transfer von $\gamma\delta$ T-Zellen in Mäuse mit TNBS-induzierter Colitis	61-72
4.7	<i>In vitro</i>-Generierung humaner $\gamma\delta$ T-Zellen	73-81

4.7.1	<i>Eigenschaften humaner $\gamma\delta$ T-Zellen in vitro</i>	73-77
4.7.2	<i>Anreicherung humaner $\gamma\delta$ T-Zellen in vitro</i>	77-81
5	DISKUSSION	82-95
5.1	Defizienz/Depletion von $\gamma\delta$ T-Zellen verschlimmert CED	82-89
5.2	Transfer von $\gamma\delta$ T-Zellen verbessert CED	89-92
5.3	$\gamma\delta$ T-Zellen sind anerg und wirken supprimierend	92-94
5.4	$\gamma\delta$ T-Zellen lassen sich <i>in vitro</i> expandieren	94-95
6	ZUSAMMENFASSUNG	I-XXIV
	Summary	III-IV
	Bibliographie	V-XV
	Abkürzungen	XVI-XVIII
	Lebenslauf	XIX-XX
	Publikationsliste	XXI-XXII
	Selbständigkeitserklärung	XXIII

