



Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Fakultät für Klinische Medizin Mannheim
Dissertations-Kurzfassung

Identifizierung und funktionelle Charakterisierung von miRNAs und Oberflächenrezeptoren spezifisch für regulatorische T-Zellen

Autor: Heiko Stahl
Institut / Klinik: Institut für Molekular- und Zellbiologie der Hochschule Mannheim
Doktorvater: Prof. Dr. M. Hafner

Natürliche regulatorische T-Zellen (nTreg) sind verantwortlich für die Aufrechterhaltung der peripheren Selbsttoleranz und regeln Entzündungsprozesse, indem sie aktivierte T-Zellen des erworbenen Immunsystems in ihrem Wachstum kontrollieren. nTreg Zellen sind CD4⁺CD25^{hoch} positive Subpopulationen von T-Zellen, die bisher durch eine hohe Expression des intrazellulären Transkriptionsfaktors FoxP3 charakterisiert wurden. Weil aktivierte humane CD4⁺ Effektor T Zellen (Teff) ebenfalls CD25 und FoxP3 exprimieren, konnte bisher kein Marker gefunden werden, der nur humane nTreg Zellen eindeutig identifiziert.

Als Ziel dieser Dissertation sollten spezifische Oberflächenmarker gefunden werden, die eine eindeutige Charakterisierung von nTreg Zellen ermöglichen und eventuell deren Suppressionsmechanismus vermitteln. Weiterhin sollten microRNAs (miRNAs) untersucht werden, die eine wichtige Rolle bei der Entwicklung bzw. Aufrechterhaltung der Suppressorfunktion von nTreg Zellen spielen.

Zur Identifizierung dieser Membranproteine und miRNAs konnten zwei Technologien verwendet werden. Mittels cDNA All-Exon-Microarrays (Affimetrix) wurden aus denselben Spendern, die Transkriptome von ruhenden und aktivierten humanen nTreg Zellen mit konventionellen CD4⁺ Effektorzellen (Teff) verglichen. Durch die zweite Technologie, iTRAQ-Massenspektrometrie (Applied Biosystems), wurden die entsprechenden Membranproteome der oben genannten Zellpopulationen bestimmt. Somit konnten die Ergebnisse aus einer humanen Genexpressionsstudie, sowie einer humanen Membranproteinexpressionsstudie qualitativ und quantitativ analysiert werden, um nach nTreg spezifischen Membranproteinen und miRNAs zu suchen.

In dieser Dissertationsarbeit wurde die miR-155 genauer analysiert. Durch Transfektion von miR-155 Inhibitoren, sowie synthetische miR-155 Sequenzen in humane nTreg und Teff Zellen, wurde die funktionelle Relevanz der miR-155 Expression untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass eine Inhibierung der miR-155 Expression in Teff Zellen zu einer erhöhten Sensibilisierung gegenüber der nTreg-vermittelten Suppression führte. Eine Überexpression an miR-155 in Teff Zellen hingegen, führte zu Teff Zellen, die entsprechend resistenter gegenüber suppressiven Treg Zellen waren.

Bei der Membranproteinexpressionsanalyse wurden die Aktivierungsmarker GARP, CTLA4 und TNFRSF9 gefunden. In diesem Zusammenhang konnte GARP als spezifischer und singulärer Oberflächenmarker identifiziert werden, welcher ausschließlich von aktivierten FoxP3^{hoch} positiven und hoch suppressiven nTreg Zellen exprimiert wird. Interessanterweise konnten GARP positive Treg Zellen, oder auch rekombinant hergestelltes GARP Protein (rhGARP), die Expression von FoxP3 in Teff Zellen induzieren. Diese induzierte FoxP3-Expression konnte durch blockierende monoklonale anti-GARP Antikörper verhindert werden.

Insgesamt konnte in dieser Dissertation gezeigt werden, dass zum einen die miR-155 Expression in Teff Zellen die Treg-vermittelten Suppression reguliert und zum anderen, dass Treg Zellen durch den Oberflächenmarker GARP charakterisiert werden können, dessen Funktion möglicherweise unter anderem die Transdifferenzierung von Teff Zellen in iTreg Zellen ist. Durch diesen induzierten Toleranzmechanismus wird die Immunsuppression auf natürlichem Wege verstärkt, wodurch z.B. Entzündungsreaktionen schneller ausgeschaltet werden. Weitere Studien zur Erforschung der Regulation und Funktion von GARP, könnten zur Entwicklung von Medikamenten führen, welche die Funktion von GARP nachahmen bzw. verstärken, oder umgekehrt hemmen. Diese könnten gezielt eingesetzt werden, um Autoimmunerkrankungen und Entzündungsprozesse, wie z.B. allergisches Asthma oder auch Krebs zu behandeln.