

Functional characterization of rat CTLA-4 and CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells

Dissertation zur Erlangung des
Naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Vorgelegt von
Chia-Huey Lin
aus Taipei, Taiwan

Würzburg, 2003

Eingereicht am: _____

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: _____

Gutachter: Herr Prof. Dr. Thomas Hünig

Gutachter: Herr Prof. Dr. Jörg Hacker

Tag des Promotionskolloquiums: _____

Doktorurkunde ausgehändigt am: _____

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation „ Functional characterization of rat CTLA-4 and CD25+CD4+ regulatory T cells „ selbstständig angefertigt, und keine anderen als die von mir angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt wurde.

Außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegt Graden habe ich früher keine weiteren akademischen Grade erworben, oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den 15. 12. 2003

Chia-Huey Lin

Danksagung:

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Thomas Hünig angefertigt.

Mein ganz besonderer Dank geht an Herrn Prof. Thomas Hünig für die interessante Themen, die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung, stets Bereitschaft zur Diskussion, und die Bereitstellung eines ausgezeichneten Arbeitsumfeldes.

Herrn Prof. Jörg Hacker danke ich dafür, dass er sich bereit erklärt hat, für diese Arbeit als Gutachter seitens der Fakultät für Biologie zu fungieren.

Weiterhin danke ich Frau Prof. Schimpl für viele angenehme, lehrreiche und inspirierende Diskussionen.

Herzlich Danke ich Xin Ding, Kevin Dennehy, und Elwira Pyz für die freundschaftliche Unterstützung innerhalb und außerhalb des Labors.

Auch danke ich allen jetzigen und früheren Mitarbeitern im Institut für Virologie und Immunbiologie für die Schaffung eines stets angenehmen Arbeitsklima.

Herrn Dr. Martin Trischler danke ich herzlich für das Korrekturlesen.

Für meine Mutter und Kae

CONTENTS

Chapter 1 GENERAL INTRODUCTION

1.1	T cell immune responses	1
1.2	CTLA-4: a negative regulator for T cell responses	2
1.3	CD25 ⁺ CD4 ⁺ regulatory T cells	4
1.4	CD28 superagonists	6
1.5	Aim of this work	7

Chapter 2 MATERIAL AND METHODS

2.1	Animals	9
2.2	Antibodies	9
2.3	Construction of rat CTLA-4hlg fusion proteins expressing vector pH β SAPr-1-gpt-rCTLA-4-Hr1	9
2.4	Immunization and cell fusion	10
2.5	Construction of a CTLA-4-GFP retroviral vector and retroviral transduction	12
2.6	ELISAs	13
2.7	Western blotting	14
2.8	Cell purification and cell culture	15
2.9	Immobilization of mAbs on latex beads	16
2.10	Immobilization of mAbs on Dynabeads	16
2.11	Proliferation assays and suppression assays	17
2.12	Flow cytometry	18
2.13	Analysis of DNA content	19

2.14	<i>In vivo</i> expansion of T cells by CD28 superagonist	19
2.15	Transfer of CFSE-labelled CD25 ⁻ CD4 ⁺ T cells	19
Chapter 3	MODULATION OF T CELL RESPONSE WITH CTLA-4 SPECIFIC ANTIBODIES	
3.1	Introduction	20
3.2	Characterization of rat CTLA-4 by monoclonal antibodies	22
3.2.1	Generation of rat CTLA-4 specific monoclonal antibodies	22
3.2.2	Expression of CTLA-4 in naive rat CD4 ⁺ T cells	23
3.2.3	Upregulation of CTLA-4 in stimulated rat T cells	24
3.3	Regulation of rat T cell responses by CTLA-4	25
3.4	Discussion	27
Chapter 4	MODULATION OF T CELL RESPONSE BY RAT CD25⁺CD4⁺ T CELLS	
4.1	Introduction	32
4.2	Characterization of CD25 ⁺ CD4 ⁺ cells from untreated rats	34
4.3	<i>In vitro</i> responses of rat CD25 ⁺ CD4 ⁺ T cells	35
4.3.1	Effect of exogenous IL-2 on CD25 ⁺ CD4 ⁺ cells	35
4.3.2	Costimulation versus CD28 superagonist stimulation	36
4.4	Interaction between CD25 ⁺ CD4 ⁺ and CD25 ⁻ CD4 ⁺ cells from naïve LEW rats	40
4.5	Responses and suppressive effect of <i>in vitro</i> activated rat CD25 ⁺ CD4 ⁺ T cells	43
4.5.1	Proliferation of preactivated CD25 ⁺ CD4 ⁺ T cells upon restimulation	43
4.5.2	Suppressive effect of preactivated CD25 ⁺ CD4 ⁺ T cells	44
4.5.3	Suppressive capacity of CD28 superagonist activated CD25 ⁻ versus CD25 ⁺ CD4 ⁺ T cells	46

4.6	Characterization of CD25 ⁺ CD4 ⁺ cells from CD28 superagonist injected rats	49
4.7	Suppressor activity of <i>in vivo</i> CD28 superagonist activated CD25 ⁺ CD4 ⁺ T cells	52
4.8	Discussion	53
Chapter 5	GENERAL DISCUSSION	60
Appendices	Abbreviations	67
	References	68
	Summary	77
	Zusammenfassung (Summary in Deutsch)	79
	Lebenslauf	81
	Publikationsliste	83