

Der C77G-Polymorphismus im CD45- Gen des Menschen: Phänotypische und funktionelle Auswirkungen in unterschiedlichen Lymphozytensubsets

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biol. Claudia Pokoyski
geboren am 29.06.1981 in Wippra

2012

Referent: Prof. Dr. R. Schwinzer

Korreferent: Prof. Dr. R. Jacobs

Tag der Promotion: 12.04.2012

Für Ronald,

Luise & Mattis

Zusammenfassung

Die Protein-Tyrosin-Phosphatase CD45 ist ein Schlüsselmolekül in der TcR-vermittelten Signaltransduktion. Der C77G-Polymorphismus in Exon A des humanen CD45-Gens tritt mit einer Frequenz von 1-2% bei gesunden Individuen auf und führt zu einer Überexpression von Exon A enthaltenden Isoformen. Von unserer Arbeitsgruppe konnte für memory/aktivierte T-Zellen von C77G-Individuen bereits eine verstärkte Aktivierung der TcR-vermittelten Signaltransduktion sowie ein Einfluss auf die Zytokinantwort und die Zelladhäsion nachgewiesen werden. Ob auch in anderen Lymphozytensubpopulationen phänotypische und/oder funktionelle Konsequenzen aufgrund der C77G-Mutation auftreten, war nicht bekannt und sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden. Besonders interessant erscheinen im Zusammenhang mit der ebenfalls bereits untersuchten Krankheitsassoziation der C77G-Mutation regulatorische T-Zellen (T_{reg}). Aber auch mögliche Veränderungen in den Funktionen von $CD8^+$ T-Zellen und NK-Zellen wären von wesentlicher Bedeutung zur weiteren Einschätzung des C77G-Polymorphismus als potentiell Risikofaktor für bestimmte Autoimmunerkrankungen. Es konnten folgende Ergebnisse erzielt werden: Sowohl von T_{reg} als auch von $CD8^+$ T-Zellen und NK-Zellen von C77G-Individuen werden Exon A enthaltende Isoformen überexprimiert. C77G- T_{reg} zeigten außerdem eine verminderte TcR-vermittelte CD69-Heraufregulation, ließen sich kaum über CD3/CD28-Stimulation expandieren, wiesen verringerte IL-10- und TGF- β -mRNA-Level sowie distinkte Expressionsmuster bestimmter Gene (z.B. Granzym A, TNF, IL-4, IL-10) auf und hatten eine beeinträchtigte suppressive Kapazität. Zwischen wt- und C77G- $CD8^+$ T-Zellen konnten keine weiteren phänotypischen oder funktionellen Unterschiede nachgewiesen werden. NK-Zellen von C77G-Individuen wiesen eine erhöhte CD69-Expression auf und zeigten eine gesteigerte zytotoxische Aktivität. Die variante Expression von CD45RA scheint folglich sowohl für hyperreaktive memory/aktivierte T-Zellen und NK-Zellen als auch hyporeaktive T_{reg} verantwortlich zu sein und könnte somit zur Entstehung von Autoimmunerkrankungen beitragen.

Stichwörter: CD45, CD45-Isoformen, C77G-Polymorphismus

Abstract

The protein tyrosine phosphatase CD45 is a key molecule in TcR-mediated signal transduction. The C77G polymorphism in exon A of the human CD45 gene occurs with a frequency of 1-2% of healthy individuals and results in overexpression of exon A containing isoforms. Our group already established for memory/activated T cells of C77G individuals an enhanced TcR-mediated signal transduction as well as an effect of the polymorphism on cytokine response and cell adhesion. This thesis addressed the question, if other lymphocyte subpopulations show also phenotypical and/or functional consequences due to the C77G mutation. In context with the already analysed disease association of the C77G mutation, regulatory T cells seem to be of special interest. But also possible functional alterations in CD8⁺ T cells and NK cells would be important to further evaluate the C77G polymorphism as potential risk factor for certain autoimmune diseases. The following results were obtained: T_{reg} as well as CD8⁺ T cells and NK cells overexpressed exon A containing isoforms. C77G-T_{reg} showed also a diminished TcR-mediated upregulation of CD69, could be hardly expanded by CD3/CD28 stimulation, had decreased IL-10- and TGF- β -mRNA-levels as well as distinct expression of certain genes (e.g. granzyme A, TNF, IL-4, IL-10) and an impaired suppressive capacity. There could not be detected further phenotypical or functional differences between wt- and C77G-CD8⁺ T cells. NK cells of C77G-individuals showed an increased CD69-expression and an enhanced cytotoxic activity. Thus, the variant expression of CD45RA seems to be responsible for hyperreactive memory/activated T cells and NK cells as well as hyporeactive T_{reg} and could therefore contribute to a reduced prevention of an exceeding immune response and so to the development of autoimmune diseases.

Keywords: CD45, CD45 isoform, C77G polymorphism

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	I
ABSTRACT.....	II
INHALTSVERZEICHNIS	III
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VI
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VIII
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Problemstellung	1
1.2 Aufbau und Struktur von CD45.....	3
1.3 Funktion von CD45	5
1.3.1 Regulation der Kinasen der Src-Familie durch CD45	5
1.3.2 Regulation von zytokinvermittelten Signalwegen.....	7
1.4 Die Regulation der CD45-Phosphatase-Aktivität.....	9
1.5 CD45-Polymorphismen	11
2 MATERIALIEN	14
2.1 Chemikalien.....	14
2.2 Enzyme	15
2.3 Geräte.....	15
2.4 Verbrauchsmaterial	17
2.5 Verwendete Kits	18
2.6 Verwendete magnetische Beads	18
2.7 Puffer und Lösungen.....	18
2.8 Antikörper	19
2.8.1 Primärantikörper	19
2.8.2 Sekundärreagenzien	26
2.8.3 Blockierungsreagenzien.....	26
2.9 Primer.....	27
2.9.1 PCR-Primer.....	27
2.9.2 Realtime-PCR-Primer	27
3 METHODEN.....	29
3.1 Zellen und Medien	29
3.1.1 Identifikation von C77G-Individuen und verwendete Zelllinien	29
3.1.2 Medien und Kultivierungsbedingungen.....	29
3.1.3 Bestimmung der Zellzahl.....	30

3.1.4	Einfrieren und Auftauen von Zellen	30
3.2	Isolierung und Expansion von Zellpopulationen	30
3.2.1	Isolierung humaner peripherer Blut-Leukozyten aus Leukotrap [®] -Filtern ..	30
3.2.2	Ficoll-Separation mononukleärer Zellen aus Spenderblut	31
3.2.3	Isolierung humaner Lymphozytensubpopulationen mittels Fluoreszenz- aktivierter Zellsortierung (FACS)	32
3.2.4	Separation humaner CD4 ⁺ T-Zellen mittels magnetischer Zellsortierung (MACS)	33
3.2.5	Expansion von sortierten CD4 ⁺ CD25 ^{high} T _{reg} mittels Dynabeads Human T- activator CD3/CD28	33
3.2.6	Expansion von sortierten CD8 ⁺ T-Zellen mittels PHA/IL-2	34
3.2.7	Expansion von sortierten NK-Zellen mittels IL-2	35
3.3	Messung der Proliferation	36
3.4	Durchflusszytometrische Analytik	36
3.4.1	Direkte Oberflächenfärbung	37
3.4.2	Indirekte Oberflächenfärbung	38
3.4.3	FoxP3-Färbung	38
3.4.4	Intrazelluläre Färbung	39
3.5	Nachweis der C77G-Mutation	39
3.5.1	Isolierung der DNA	39
3.5.2	Polymerasekettenreaktion und Aufreinigung der Exon A Fragmente	40
3.5.3	Spaltung der PCR-Produkten mit dem Restriktionsenzym <i>MspI</i>	40
3.6	Funktionelle Assays	41
3.6.1	Suppressionsassay	41
3.6.2	BMA031-Stimulationsassay	41
3.6.3	CD107a-Degranulations-Assay	42
3.7	RT-PCR und Real-Time-PCR	43
3.7.1	Isolierung der RNA	43
3.7.2	Reverse Transkription	43
3.7.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	43
3.7.4	Real-Time-PCR	44
3.8	Agilent Microarray	45
3.9	Statistik	46
4	ERGEBNISSE	47
4.1	Die C77G-Mutation als molekulare Ursache für phänotypische Veränderungen bei humanen peripheren Blutlymphozyten	47
4.2	Phänotypische und funktionelle Konsequenzen der C77G-Mutation bei CD4 ⁺ CD25 ^{high} Foxp3 ⁺ regulatorischen T-Zellen	52
4.2.1	Charakterisierung ruhender CD4 ⁺ CD25 ^{high} Foxp3 ⁺ T _{reg}	52
4.2.2	Charakterisierung aktivierter CD4 ⁺ CD25 ^{high} Foxp3 ⁺ T _{reg}	56
4.2.3	Analyse der Genexpressionsmuster aktivierter CD4 ⁺ CD25 ^{high} Foxp3 ⁺ T _{reg} ..	61
4.2.4	Analyse der suppressiven Kapazität aktivierter CD4 ⁺ CD25 ^{high} Foxp3 ⁺ T _{reg} ..	65
4.3	Phänotypische und funktionelle Konsequenzen der C77G-Mutation bei CD8 ⁺ T-Zellen	66

4.3.1	Charakterisierung ruhender CD8 ⁺ T-Zellen.....	67
4.3.2	Charakterisierung aktivierter CD8 ⁺ T-Zellen.....	69
4.3.3	Zytolytische Kapazität	72
4.4	Phänotypische und Funktionelle Konsequenzen der C77G-Mutation bei CD56 ⁺ CD3 ⁻ NK-Zellen.....	74
4.4.1	Charakterisierung ruhender NK-Zellen	74
4.4.2	Charakterisierung aktivierter NK-Zellen	78
4.4.3	Zytolytische Kapazität	80
5	DISKUSSION.....	83
5.1	Besonderheiten im CD45-Isoformen-Muster bei C77G-Individuen	84
5.2	Hyporeaktivität bei T _{reg} versus Hyperreaktivität bei CD4 ⁺ T-Zellen von C77G-Individuen	86
5.3	Ähnliche Reaktivität bei CD8 ⁺ T-Zellen versus Hyperreaktivität bei CD4 ⁺ T-Zellen von C77G-Individuen.....	91
5.4	Mechanismus der Hyperreaktivität bei NK-Zellen.....	92
5.5	Zusammenwirken der verschiedenen Subpopulationen bei C77G-Individuen und die Auswirkungen für Krankheitsassoziationen	94
6	LITERATUR.....	98
	BISHERIGE WISSENSCHAFTLICHE TÄTIGKEIT	107
	LEBENS LAUF	109
	DANKSAGUNG	110

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cpm	<i>counts per minute</i> / Zählimpuls pro Minute
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESS	Exonic Splice Silencer
EthBr	Ethidiumbromid
FACS	Durchflußzytometer (<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FCS	Fötales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung (<i>gravity</i>)
GαM	Ziege anti Maus Antikörper
h	Stunde
³ H-TdR	Tritiummarkiertes Thymidin
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
JAK	Januskinase
MACS	<i>Magnetic Cell Sorting</i> / Magnetische Zellsortierung
mAk	monoklonaler Antikörper
MFI	Mittlere Fluoreszenzaktivität
min	Minute
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
PBMC	periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PHA	Phytoämagglutinin

Abkürzungsverzeichnis

PTP	Protein-Tyrosin-Phosphatase
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription mit anschließender PCR
s	Sekunde
Tab.	Tabelle
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TcR	T-Zellrezeptor
U	<i>Unit</i> /Einheit

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1. 1	Aufbau des CD45-Moleküls.....	4
Abb. 1. 2	Schematische Darstellung der Regulation der p56 ^{lck} -Kinase durch CD45.....	6
Abb. 1. 3	Schematische Darstellung der Regulation der Janus-Kinasen durch CD45.....	8
Abb. 1. 4	Modell der Regulation des Spleißens von Exon A.....	12
Abb. 3. 1	Durchflusszytometrische Analyse sortierter T _{reg}	34
Abb. 3. 2	Durchflusszytometrische Analyse sortierter CD8 ⁺ T-Zellen.....	35
Abb. 3. 3	Durchflusszytometrische Analyse sortierter NK-Zellen.....	35
Abb. 4. 1	Expression von CD45RA und CD45R0 Isoformen auf PBMC von wt- und C77G-Individuen.....	47
Abb. 4. 2	Nachweis der C77G-Mutation im Exon A durch eine MspI spezifische RFLP-Analyse.....	48
Abb. 4. 3	Expressionsmuster der CD45-Isoformen auf ruhenden PBMC.....	50
Abb. 4. 4	Expressionsmuster der CD45-Isoformen auf <i>in vitro</i> aktivierten PBMC.....	51
Abb. 4. 5	Expressionsmuster der CD45-Isoformen auf ruhenden CD4 ⁺ CD25 ^{high} T _{reg}	53
Abb. 4. 6	Expressionsmuster T _{reg} -spezifischer Moleküle.....	54
Abb. 4. 7	CD69-Heraufregulation nach TcR-Stimulation.....	55
Abb. 4. 8	Frequenz von T _{reg} bei wt- und C77G-Individuen.....	56
Abb. 4. 9	<i>In vitro</i> Expansion von sortierten T _{reg}	57
Abb. 4. 10	<i>In vitro</i> Expansion von sortierten T _{reg}	57
Abb. 4. 11	FoxP3-Expression von sortierten und expandierten T _{reg}	58
Abb. 4. 12	Expressionsmuster der CD45-Isoformen auf <i>in vitro</i> aktivierten T _{reg}	59
Abb. 4. 13	mRNA-Expressionsmuster der CD45-Isoformen von <i>in vitro</i> expandierten T _{reg}	60
Abb. 4. 14	Sequenzierung der zusätzlichen Bande bei C77G-T _{reg}	61
Abb. 4. 15	IL-10 und TGF-β mRNA-Expression von <i>in vitro</i> expandierten T _{reg}	62
Abb. 4. 16	Genexpressionsprofil von wt- und C77G-T _{reg}	63
Abb. 4. 17	Signalweg-Module in humanen T _{reg}	64
Abb. 4. 18	Suppressorisches Potenzial von <i>in vitro</i> expandierten T _{reg} mit wt- oder C77G-CD45.....	65
Abb. 4. 19	Suppressorisches Potenzial von <i>in vitro</i> expandierten T _{reg} mit wt- oder C77G-CD45.....	66
Abb. 4. 20	Expressionsmuster der CD45-Isoformen auf ruhenden CD8 ⁺ T-Zellen.....	67
Abb. 4. 21	Expressionsmuster CD8 ⁺ T-Zell-spezifischer Moleküle.....	68
Abb. 4. 22	Frequenz von CD8 ⁺ T-Zellen bei wt- und C77G-Individuen.....	69
Abb. 4. 23	<i>In vitro</i> Expansion von sortierten CD8 ⁺ T-Zellen.....	70
Abb. 4. 24	Expressionsmuster der CD45-Isoformen auf <i>in vitro</i> aktivierten CD8 ⁺ T-Zellen.....	71
Abb. 4. 25	mRNA-Expressionsmuster der CD45-Isoformen von sortierten und <i>in vitro</i> aktivierten CD8 ⁺ T-Zellen.....	72
Abb. 4. 26	CD107a-Assay mit CD8 ⁺ T-Zellen.....	73
Abb. 4. 27	CD107a-Assay mit CD8 ⁺ T-Zellen.....	73
Abb. 4. 28	Expressionsmuster der CD45-Isoformen auf ruhenden CD56 ⁺ CD3 ⁻ NK-Zellen.....	75
Abb. 4. 29	Expressionsmuster NK-Zell-spezifischer Moleküle.....	76
Abb. 4. 30	CD69-Expression auf ruhenden NK-Zellen.....	77
Abb. 4. 31	Frequenz von NK-Zellen bei wt- und C77G-Individuen.....	77
Abb. 4. 32	<i>In vitro</i> Stimulation von sortierten NK-Zellen.....	78
Abb. 4. 33	Expressionsmuster der CD45-Isoformen auf <i>in vitro</i> aktivierten CD56 ⁺ CD3 ⁻ NK-Zellen.....	79

Abbildungsverzeichnis

Abb. 4. 34	mRNA-Expressionsmuster der CD45-Isoformen von sortierten und <i>in vitro</i> aktivierten NK-Zellen.....	80
Abb. 4. 35	CD107a-Assay mit NK-Zellen.....	81
Abb. 4. 36	CD107a-Assay mit NK-Zellen.....	82
Abb. 5. 1	Modellhafte Darstellung der funktionellen Auswirkungen der C77G-Mutation. .	95
Abb. 5. 2	Modellhafte Darstellung der Auswirkungen der C77G-Mutation als „Modifier“-Gen.....	97

1 Einleitung

1.1 Problemstellung

Die Aktivierung von Lymphozyten wird durch ein Zusammenspiel aus Antigen-Rezeptoren, akzessorischen Molekülen (z.B. CD4, CD8), Tyrosin-Kinasen und Tyrosin-Phosphatasen vermittelt. Das CD45-Molekül ist eine Protein-Tyrosin-Phosphatase und verantwortlich für die Regulation induzierbarer Tyrosin-Phosphorylierungen bei Leukozyten. So reguliert CD45 zum Beispiel die Signaltransduktion in T- und B-Zellen und die rezeptorvermittelte Signalübertragung über Zytokine^{1,2}. Hinsichtlich der Expression ist CD45 ein auf allen kernhaltigen, hämatopoetischen Zellen vorkommendes Transmembranprotein und wird durch ein einziges Gen (PTPRC) mit 33 Exons kodiert. Es wird in verschiedenen Isoformen auf der Zelloberfläche exprimiert, die sich in ihrem extrazellulären Anteil unterscheiden und durch alternatives Spleißen von drei variablen Exons (A (4), B (5) und C (6)) entstehen. Die Isoformen werden in komplexen Mustern exprimiert, die sich in Abhängigkeit vom Aktivierungs- und Differenzierungszustand des Leukozyten verändern³. Ruhende T-Zellen exprimieren hochmolekulare Isoformen (CD45RA), welche infolge einer Aktivierung herunterreguliert und durch niedermolekulare Isoformen (CD45R0) abgelöst werden⁴. Die genaue Funktion der verschiedenen CD45-Isoformen bei der Regulation von Immunantworten wird bisher nicht vollständig verstanden.

Möglichkeiten zur Untersuchung der Funktionen der verschiedenen CD45-Isoformen sind zum Beispiel mit einzelnen Isoformen transfizierte Zelllinien⁵ oder Tiermodelle⁶. Ein anderer Zugang, der insbesondere beim Menschen angewendet werden kann, ist die Analyse von CD45-Polymorphismen⁷. Der C77G-Polymorphismus im Exon A des humanen CD45-Gens, der erstmals von unserer Arbeitsgruppe beschrieben wurde, führt zu einer Überexpression von Exon A enthaltenden Isoformen⁸. Der Polymorphismus ist durch eine Punktmutation an Position 77 des Exon A (Transversion von C zu G) gekennzeichnet⁹. Die Transversion ist neutral, sie hat somit keine Aminosäure-Substitution zur Folge. Bis auf einen Fall¹⁰ sind bisher nur Individuen mit Heterozygotie für diese Punktmutation gefunden worden. Die Mutation verändert jedoch die Sequenz

eines regulatorischen *cis*-Spleißelementes ESS (*exonic splice silencer*) und verhindert so den normalen Ablauf des alternativen Spleißens^{11,12}. Bei den betroffenen Individuen werden Exon A enthaltende Isoformen auf Zelltypen exprimiert, die bei Kontrollindividuen normalerweise CD45RA-negativ sind. Es konnte gezeigt werden, dass die aberrante Expression der CD45RA-Isoformen auf memory/aktivierten T-Zellen die Intensität der T-Zellrezeptor-vermittelten Signalgebung erhöht und die Zytokinempfindlichkeit beeinflusst^{13,14}. Diese Daten und die erhöhte Frequenz von C77G-Individuen bei bestimmten Autoimmun- und Infektionserkrankungen^{15,16} könnten Hinweise sein, dass durch die aberrante CD45-Expression möglicherweise Mechanismen gestört werden, die an der Regulation von Immunantworten beteiligt sind.

Bisher ist nicht bekannt, ob die C77G-Mutation, und die daraus resultierende aberrante Expression der CD45RA-Isoformen, neben den memory/aktivierten T-Zellen auch andere Leukozytentypen in ihren Immunfunktionen beeinflusst. Ziel dieser Arbeit war es daher, die funktionellen Konsequenzen der Mutation und die Mechanismen der veränderten Immunfunktionen bei CD4⁺CD25^{high} T_{reg}, CD8⁺ T-Zellen und CD56⁺CD3⁻ NK-Zellen zu analysieren. Folgende Teilaspekte wurden dabei bearbeitet:

1. Welche Auswirkungen hat die C77G-Mutation auf die Ausstattung von verschiedenen Immunzellen mit CD45-Isoformen und zelltypspezifischen Molekülen? Hierzu wurden CD45-Moleküle und typische Marker für die jeweiligen Zelltypen durchflusszytometrisch bei Zellen von normalen Individuen und Trägern der C77G-Mutation untersucht.
2. Gibt es einen Effekt der Mutation auf das Expansionsverhalten einzelner Subpopulationen? Die Zellen wurden durchflusszytometrisch in reine Subpopulationen sortiert und mittels bestimmter Stimuli und Zytokine expandiert.
3. Können funktionelle Unterschiede zwischen wt- und C77G-Immunzellen nachgewiesen werden? Hierzu wurde mit Hilfe von *in vitro* Verfahren die

Funktion der Zellen von wt-Individuen und Individuen mit der C77G-Mutation analysiert.

Das CD45-Forschungsgebiet unterliegt einem kontinuierlichen Wissenszuwachs. Im Folgenden wird daher ein Überblick über den derzeitigen Wissenstand gegeben, wobei der Schwerpunkt der Darstellung auf die Funktion von CD45 bei der Regulation von Immunprozessen und der dabei ablaufenden molekularen Interaktionen gelegt wird.

1.2 Aufbau und Struktur von CD45

Die Protein-Tyrosin-Phosphatase CD45 wird auf allen hämatopoetischen Zellen mit Ausnahme der Erythrozyten exprimiert und auch als allgemeines Leukozytenantigen LCA (*leucocyte common antigen*) bezeichnet³. CD45 nimmt circa 10% der Oberfläche auf T- und B-Zellen ein. Das CD45-Molekül ist ein Typ-I-Transmembranmolekül und besteht aus einer großen extrazellulären Domäne, einer einzelnen Transmembrandomäne, einer zytoplasmatischen Domäne, welche eine keilförmige Struktur aufweist und die zwei Protein-Tyrosin-Phosphatase-Domänen (PTPase) D1 und D2 trägt, und einem aus 79 Aminosäuren bestehenden C-terminalen Endstück¹. Die extrazelluläre Domäne enthält am N-terminalen Ende die variable Domäne mit den alternativ gespleißten Exons, worauf eine zysteinreiche und drei Fibronectin III-ähnliche Domänen folgen (Abb. 1.1). Die enzymatische Aktivität der CD45-Tyrosin-Phosphatase ist in der membranproximalen Domäne D1 lokalisiert, während es sich bei D2 um eine nicht aktive Pseudo-PTPase handelt. Allerdings haben funktionelle Studien gezeigt, dass beide Domänen für eine optimale Phosphatase-Funktion *in vivo* notwendig sind¹⁷.

Durch alternatives Spleißen von drei variablen Exons (A, B und C) können mindestens acht verschiedene Isoformen auf RNA-Ebene generiert werden. Beim Menschen konnten fünf verschiedene Isoformen (ABC, AB, BC, B und 0) auf Protein-Ebene nachgewiesen werden, die sich in ihren extrazellulären Domänen unterscheiden¹. Das alternative Spleißen wird von allgemeinen, negativ-regulatorischen trans-Spleiß-

Faktoren reguliert¹⁸. Außerdem wurde hnRNPLL (heterogenous ribonucleoprotein L-like) als wichtiges regulatorisches Molekül für die signalinduzierte Unterdrückung des variablen Exons 4 identifiziert^{19,20}.

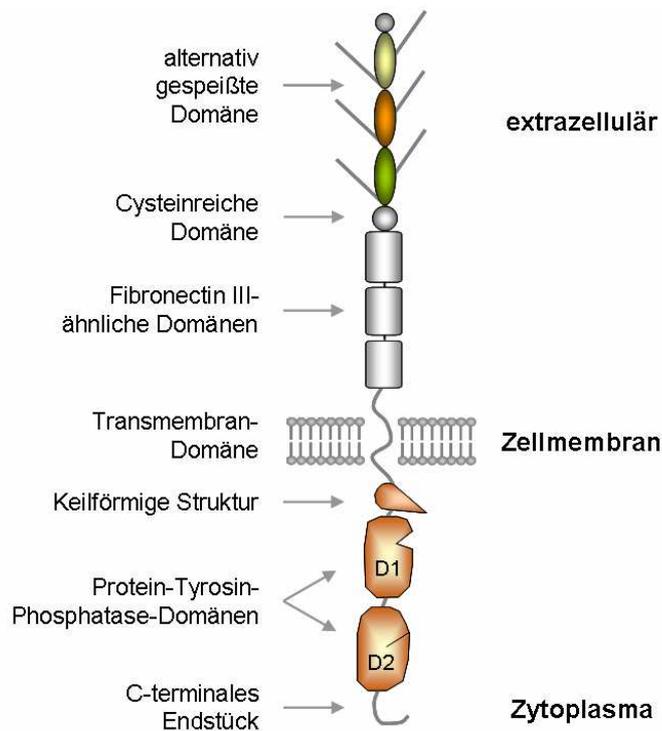


Abb. 1.1 Aufbau des CD45-Moleküls.

CD45 ist ein Typ-I-Transmembranmolekül. Es besteht aus einer großen extrazellulären Domäne, einer einzelnen Transmembrandomäne, einer zytosolischen Domäne, welche eine keilförmige Struktur und die zwei Protein-Tyrosin-Phosphatase-Domänen (PTPase) D1 und D2 trägt, und einem aus 79 Aminosäuren bestehenden C-terminalen Endstück. Die extrazelluläre Domäne enthält am N-terminalen Ende die variable Domäne mit den alternativ gespleißten Exons, worauf eine zysteinreiche und drei Fibronectin III-ähnliche Domänen folgen.

Die alternativ gespleißten Exons, die sich am N-terminalen Ende befinden, enthalten mehrere Bindungsstellen für Glykosylierungen. Diese Glykosylierungen resultieren in einer drastischen Größen- und Ladungszunahme der extrazellulären Domänen der hochmolekularen Isoformen¹. Die Molekulargewichte der verschiedenen Isoformen betragen 220kDa für ABC, 205kDa für AB, 200kDa für BC, 190kDa für B und 180kDa für 0. Mithilfe monoklonaler Antikörper, die mit Exon-spezifischen Epitopen reagieren, können die komplexen Expressionsmuster der CD45-Isoformen untersucht werden. Die Antikörper, die an Exon A-, B- oder C-kodierte Epitope binden, werden als CD45R Antikörper (R für restricted; CD45RA, CD45B und CD45RC) bezeichnet, während

Antikörper, deren Epitope in nicht-variablen Bereichen des CD45-Moleküls liegen, als CD45common Antikörper bezeichnet werden. CD45R0-Antikörper erkennen ein spezifisches Epitop auf der Isoform, der alle drei variabel gespleißten Exons fehlen.

Die Expression der verschiedenen CD45-Isoformen ist zelltypspezifisch und hängt vom Aktivierungs- und Differenzierungsstatus der Zellen ab. Ruhende T-Zellen exprimieren überwiegend hochmolekulare CD45RA- und CD45RB-Isoformen, während memory/aktivierte T-Zellen überwiegend die niedermolekulare CD45R0-Isoform exprimieren⁴. Die genaue Zusammensetzung der verschiedenen CD45-Isoformen auf NK-Zellen ist bisher nicht bekannt. Die Funktionen der einzelnen CD45-Isoformen sind ebenfalls noch nicht vollständig geklärt, sicher ist jedoch, dass CD45 entscheidend für die normale Immunfunktion ist und dass eine veränderte CD45-Expression weitreichende Effekte hat²¹.

1.3 Funktion von CD45

Die Expression von CD45 ist eine Voraussetzung für eine normale Signaltransduktion und Differenzierung von Lymphozyten^{22,23}. Das CD45-Molekül ist beispielsweise ein wichtiger Bestandteil der Zelladhäsionsprozesse bei Makrophagen²⁴, der Galectin-1 induzierten Apoptose bei T- und B-Zellen^{25,26} sowie der Degranulation von Histamin in Mastzellen nach Kreuzvernetzung von Immunglobulinen E (IgE)²⁷. Im Zusammenhang mit dieser Arbeit wird im Folgenden hauptsächlich auf die Funktion von CD45 als Regulator in Signaltransduktionsprozessen in T- und NK-Zellen eingegangen.

1.3.1 Regulation der Kinasen der Src-Familie durch CD45

CD45 hat eine essentielle Funktion bei der Regulation von Tyrosin-Kinasen der Familie der Src-Kinasen wie zum Beispiel p56^{lck}, p59^{fyn}, p59-p62^{yes}, p55^{fgfr}, p56^{lyn} und p59^{hck}, deren Aktivität durch die Phosphorylierung zweier Tyrosine reguliert wird². Ein aktivierender Tyrosinrest ist in der Aktivierungsschleife der katalytischen Domäne

dieser Kinasen lokalisiert, ein inhibierender Tyrosinrest befindet sich am C-Terminus. Durch die Phosphorylierung des aktivierenden Tyrosinrestes werden die Kinasen der Src-Familie aktiviert, während die Phosphorylierung des inhibierenden Tyrosinrestes die Aktivität der Kinase durch eine Konformationsänderung des Proteins verhindert². Die Phosphorylierung des aktivierenden oder des inhibierenden Tyrosins hat somit einen gegenläufigen Effekt auf die Aktivität der Kinasen der Src-Familie. CD45 dephosphoryliert den inhibierenden Tyrosinrest der Kinasen der Src-Familie und wirkt so aktivierend und der Kinase Csk entgegen²⁸.

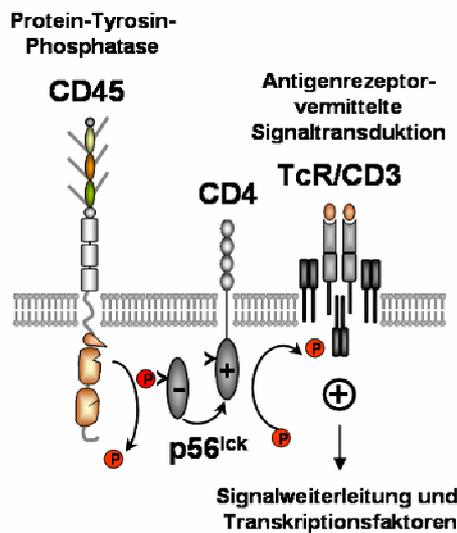


Abb. 1.2 Schematische Darstellung der Regulation der p56^{lck}-Kinase durch CD45.

CD45 ist eine Protein-Tyrosin-Phosphatase und wirkt beispielsweise aktivierend auf die Antigenrezeptor-vermittelte Signaltransduktion in T- und B-Zellen.

Ein Mechanismus, der der Regulation von CD45 bei T-Zellen unterliegt, ist die Kontrolle des Schwellenwertes der Signaltransduktion über den TcR, wobei die Kinasen der Src-Familie als primäre Zielstrukturen identifiziert wurden. Dabei zeigt CD45 in T-Zellen meist eine positive Regulation der p56^{lck}-Aktivität, indem es das inhibierende Tyrosin-505 dephosphoryliert und damit die Csk-vermittelte Inhibierung von p56^{lck} aufhebt (Abb. 1.2). Die Tyrosin-Kinase-Domäne von p56^{lck} enthält das aktivierende Tyrosin-394 und das inhibierende Tyrosin-505, deren Interaktion mit der SH2-Domäne die Kinase in einem inaktiven Zustand hält. Dephosphoryliert CD45 Tyrosin-505, kommt es zu der schon genannten Konformationsänderung, die eine Phosphorylierung von Tyrosin-394 ermöglicht²⁹. Die nun aktivierte Kinase kann mit den Co-Rezeptoren

CD4 bzw. CD8 assoziieren und andere Moleküle wie TcR- ζ phosphorylieren. Die Aktivierung der TcR- ζ -Kette kann wiederum die Rekrutierung der Zap-70-Kinase und schließlich über weitere Ereignisse, wie der Mobilisierung der „second messenger“ PIP2 und Ca^{2+} und der Aktivierung der G-Proteine Vav-1 und Ras, die Transkription bestimmter Gene zur Folge haben²². Die Aktivierung der Kinasen der Src-Familie durch die CD45-Phosphatase kann somit Signaltransduktionskaskaden in Gang setzen, durch die es schließlich zur Zytokinfreisetzung und Proliferation von T-Zellen kommt. Neben dieser Funktion als positiver Regulator der Signaltransduktion ist es allerdings wahrscheinlich, dass CD45 auch den aktivierenden Tyrosinrest in Kinasen der Src-Familie dephosphorylieren kann. Es wird vermutet, dass der Hauptgrund für die hohe CD45-Expression auf T-Zellen die Suppression von hyperaktiven peripheren T-Zellen durch die Dephosphorylierung des aktivierenden Tyrosin-394 ist²⁹.

NK-Zellen exprimieren eine große Anzahl an Kinasen der Src-Familie, die zum Teil von der Protein-Tyrosin-Phosphatase CD45 reguliert werden. CD45 dephosphoryliert die negativ-regulierenden Tyrosine der Kinasen, wodurch diese weiter aktiviert werden können³⁰. Die Aktivität der Kinasen der Src-Familie ist Voraussetzung für die Funktionen der ITAM-tragenden Rezeptoren in NK-Zellen und somit ist auch CD45 für alle ITAM-spezifischen Funktionen der NK-Zellen und Prozesse wie die Degranulation, die Zytokinproduktion und die Expansion während einer viralen Infektion notwendig³⁰. Es ist gegenwärtig unklar, ob CD45 netto einen negativen oder einen positiven Einfluss auf die Aktivität der Kinasen der Src-Familie in NK-Zellen hat²⁸.

Zusammengefasst kann CD45 in Abhängigkeit der Subpopulation bzw. der verschiedenen Entwicklungs- bzw. Aktivierungsstadien einer Subpopulation differentielle Effekte auf die Kinasen der Src-Familie ausüben.

1.3.2 Regulation von zytokinvermittelten Signalwegen

Ein weiterer von CD45 beeinflusster Mechanismus ist die negative Regulation zytokinvermittelter Signalwege über die Jak/Stat-Signaltransduktion. Durch die

Bindung von Zytokinen kommt es zur Aggregation des jeweiligen Zytokinrezeptors, wodurch die Januskinasen (JAK) phosphoryliert und aktiviert werden. Aktivierte Januskinasen können wiederum Signalüberträger und Aktivatoren der Transkription (STAT) phosphorylieren, was für deren Dimerisierung und Translokation in den Nukleus notwendig ist. Dort können die STAT-Moleküle mit ihrer DNA-Bindedomäne an bestimmte DNA-Sequenzen binden und die Transkription spezifischer Gene induzieren.

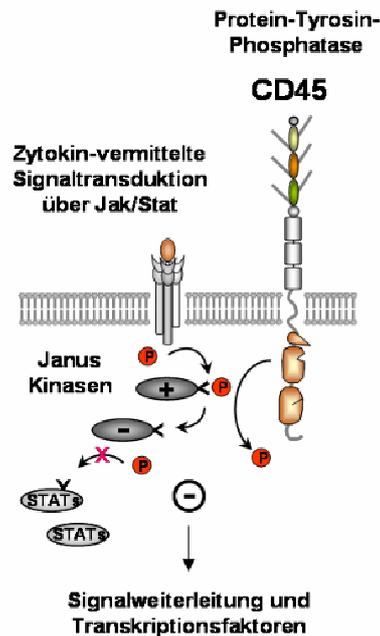


Abb. 1.3 Schematische Darstellung der Regulation der Janus-Kinasen durch CD45.

CD45 ist eine Protein-Tyrosin-Phosphatase und wirkt beispielsweise inhibierend auf die zytokin-induzierte Signaltransduktion über Jak/Stat.

CD45 kann mit den Januskinasen interagieren und durch die Dephosphorylierung der JAKs deren Aktivität senken. Dadurch wird die Signaltransduktion durch den JAK-STAT-Signalweg negativ reguliert und letztendlich die nachgeschalteten zytokin-vermittelten Wachstums- und Differenzierungsprozesse verlangsamt (Abb. 1.3)³¹.

1.4 Die Regulation der CD45-Phosphatase-Aktivität

Die Regulation der CD45-Phosphatase-Aktivität ist vielschichtig. Untersuchte Faktoren, die die Aktivität der verschiedenen Isoformen mitbestimmen, sind die Interaktionen mit potentiellen Liganden, die Dimerisierung, die unterschiedliche Lokalisation von CD45 mit reguliertem Zugang zum Substrat, die Phosphorylierung und die Oxidation^{1,2}. Dabei schließen die unterschiedlichen Modelle einander nicht aus und können für unterschiedliche Zelltypen und/oder Aktivierungszustände durchaus verschieden sein.

Eine Möglichkeit der Regulation könnte die Bindung möglicher Liganden sein, wodurch die Phosphatase eine Konformationsänderung vollziehen könnte, was wiederum den Zugang zu verschiedenen Substraten ermöglicht oder verhindert. Jedoch konnte trotz weitreichender Bemühungen kein echter Ligand identifiziert werden. Für mehrere Glykoproteine, darunter CD22³², Galektin-1²⁶, Glukosidase II³³ und das C-Typ-Lektin MGL³⁴ konnte gezeigt werden, dass sie unspezifisch an T-Zell-Glykoproteine, einschließlich CD45, binden. Ob diese Interaktionen die CD45-Phosphatase-Aktivität direkt beeinflussen, ist derzeit unklar. Eine Möglichkeit wäre, dass sie die Phosphatase-Aktivität über die Lokalisation von CD45 auf der Zelloberfläche regulieren.

Eine weitere Möglichkeit der Regulation wäre die spontane CD45-Dimerisierung. Es wird davon ausgegangen, dass CD45 *in vivo* als Monomer funktionell aktiv ist und die Phosphataseaktivität durch Dimerisierung inaktiviert wird³⁵. Die hochmolekularen Isoformen tragen starke negative Ladungen, welche eine Homodimerisation elektrostatisch verhindern könnten, während die niedermolekulare Isoform CD45R0 möglicherweise effizienter homodimerisieren kann³⁶. Es wird angenommen, dass bei der Dimerisation die Phosphatase-Domänen vom „inhibitorischen Keil“ des jeweils anderen Monomers gebunden und dadurch inaktiviert werden^{37,38}. Der Isoformen-Switch von CD45RABC zu CD45R0 nach einer T-Zell-Aktivierung würde somit die Kinetik und/oder Effizienz der CD45-Dimerisierung verändern. Neuere Daten zur Kristall-Struktur von CD45 weisen allerdings daraufhin, dass die zytoplasmatischen Domänen von CD45 möglicherweise gar nicht dimerisieren können³⁹, weshalb die

alternativen Erklärungen für die Regulation der CD45-Phosphatase-Aktivität vielleicht eher in Betracht gezogen werden sollten.

Die Lokalisation der Komponenten des Signal-Netzwerkes auf und in der Zelle ist ein dynamischer Prozess, weshalb eine weitere Möglichkeit der CD45-Regulation dessen Lokalisation sein könnte. Die Kinasen der Src-Familie beispielsweise wandern immer wieder in die „lipid rafts“, welche die Plattformen für die Signaltransduktion darstellen, hinein und heraus⁴⁰. Die Lokalisation von CD45 könnte über den erleichterten bzw. behinderten Zugang zu bestimmten Substraten einen indirekten Effekt auf die Signaltransduktion haben. Während einer T-Zell-Aktivierung assoziieren die einzelnen „Lipid rafts“ zu makromolekularen Komplexen, den so genannten immunologischen Synapsen. CD45 ist nach Aktivierung in den Makrodomänen konzentriert, aber in den „lipid rafts“ nicht vorhanden. Es wird angenommen, dass wenn CD45 nicht in den „rafts“ vorhanden ist, es die TcR-Signaltransduktion fördert, während CD45 in den „rafts“ oder Makrodomänen der Signaltransduktion entgegenwirkt⁴¹. Die jeweiligen Auswirkungen von CD45 auf die Kinasen der Src-Familie an diesen verschiedenen Lokalisationen erfordern allerdings weitere Untersuchungen. Eine wichtige, noch zu klärende Frage ist, wie die Lokalisation von CD45 selbst reguliert ist. Potentielle Mechanismen, die weiter untersucht werden sollten, wären der sterische Ausschluß von CD45-Molekülen⁴² und die Interaktion von CD45 mit anderen Proteinen⁴³ beziehungsweise mit dem Zytoskelett⁴⁴.

Schließlich könnten auch Proteinmodifikationen wie Phosphorylierung und/oder Oxidation die CD45-Phosphatase-Aktivität modulieren. Eine transiente Tyrosin-Phosphorylierung von CD45 konnte nachgewiesen werden, wenngleich die physiologische Bedeutung dieser Modifikation unklar ist⁴⁵. Auch für reaktive Sauerstoff-Zwischenprodukte konnte gezeigt werden, dass sie die Phosphatase-Aktivität in Neutrophilen inhibieren können⁴⁶. Weiterführende Analysen der potentiellen funktionellen Auswirkungen dieser Modifikationen sind allerdings notwendig.

1.5 CD45-Polymorphismen

Daten von humanen Studien beziehungsweise Studien mit anderen Spezies lassen eine große Variabilität in der extrazellulären Domäne von CD45 erkennen. In der Literatur sind sieben Polymorphismen im humanen CD45-Gen beschrieben, wobei es sich ausnahmslos um Einzel-Nukleotid-Polymorphismen handelt und wovon einige das alternative Spleißen beeinflussen. Es treten sowohl Mutationen in Exon A (C77G⁹, C59A⁴⁷, A54G⁴⁸ und C77T⁴⁹) als auch in Exon B (G69C⁴⁹) und Exon C (A138G⁵⁰ und T127A⁴⁹) auf.

Die zwei am besten beschriebenen humanen CD45-Polymorphismen (C77G und A138G) haben entgegengesetzte Phänotypen, geographische Verteilungen und Krankheitsassoziationen. Der A138G-Polymorphismus tritt in der ost-asiatischen Bevölkerung am häufigsten auf und ist durch eine erhöhte Anzahl an CD45R0⁺-Zellen sowie eine Protektion gegen Autoimmunerkrankungen und Infektionskrankheiten gekennzeichnet. Der C77G-Polymorphismus ist mit einer Frequenz von 1-2% am häufigsten in der kaukasischen Bevölkerung vertreten. Eine erhöhte C77G-Frequenz wurde bei systemischer Sklerose¹⁵, HIV-1⁵¹ und autoimmuner Hepatitis⁵² gefunden. Desweiteren konnte eine Assoziation mit multipler Sklerose in Kohorten aus Deutschland und Italien^{53,54}, jedoch nicht in Kohorten aus Nordamerika und Schweden nachgewiesen werden^{55,56}.

Der C77G-Polymorphismus wurde erstmals 1990 beschrieben⁸ und später auf eine Punktmutation an Position 77 des Exon A zurückgeführt⁹. Bei dieser Mutation handelt es sich um eine Transversion von C zu G (C77G), die keinen Aminosäure-Austausch bewirkt und deshalb auch als stille Mutation bezeichnet wird. Es konnte allerdings nachgewiesen werden, dass die C77G-Mutation das Herausspleißen des Exon A des CD45-Gens verhindert. Beim Vorgang des Spleißens sind sogenannte cis-Elemente für die Erkennung der richtigen Spleißstelle wichtig. Diese cis-Elemente führen entweder zur Rekrutierung des Spleißosoms und zur Inklusion des Exons (Exonic Splicing Enhancer, ESE) oder unterbrechen die Zusammenlagerung des Spleißosoms und bewirken das Herausspleißen des Exons (Exonic Splicing Silencer, ESS). Cis-Elemente dienen als Bindungsstellen für trans-Faktoren beispielsweise aus der Familie der hnRNP-

Proteine (heterogeneous ribonucleoprotein) die entweder verstärkend oder unterdrückend wirken⁵⁷. Beim Spleißen der CD45-prä-mRNA ist die Inklusion der Exons A und C streng reguliert, während die Inklusion von Exon B wahrscheinlich eher zufällig ist⁴. Die Inklusion der Exons A, B und C wird unabhängig voneinander von ähnlichen regulatorischen Elementen kontrolliert. Die ESS-Aktivitäten innerhalb der Exons A und C sind sehr robust, während Exon B ein relativ schwaches ESS aber ein besonders starkes ESE besitzt. Diese Unterschiede in der Balance der regulatorischen Einflüsse liefert eine mechanistische Erklärung für die Beobachtung, dass Exon B in der großen Mehrheit der Transkripte in ruhenden Zellen und sogar in vielen Transkripten von aktivierten Zellen zu finden ist, während die Inklusion der Exons A und C viel seltener ist⁵⁸.

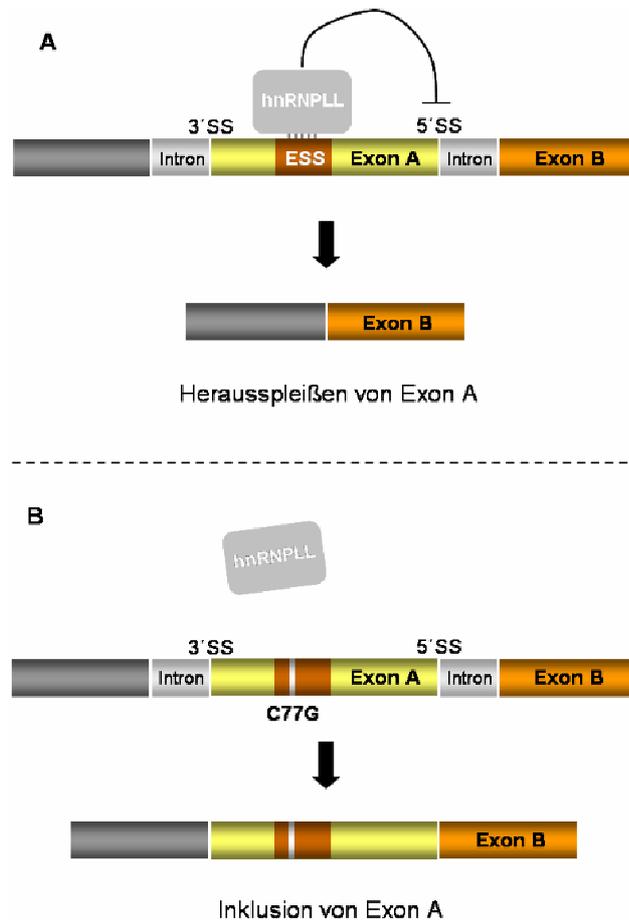


Abb. 1.4 Modell der Regulation des Spleißens von Exon A.

Ein ESS (Exonic Splicing Silencer) im Exon A unterdrückt über die Bindung des trans-Elements hnRNPLL die Erkennung der 5'-Spleißstelle und führt zum Herausspleißen des Exon A (A). Die C77G-Mutation verändert die ESS-Sequenz, so dass hnRNPLL nicht mehr binden kann, wodurch die 5'-Spleißstelle erkannt und genutzt wird. Dies führt zur Inklusion des Exon A (B). (Darstellung adaptiert nach⁵⁹ und⁵⁸)

In Exon A wurde sowohl eine konstitutive 3'-Spleißstelle sowie eine schwache 5'-Spleißstelle identifiziert. Ein ESS (Exonic Splicing Silencer) im Exon A unterdrückt über die Bindung des trans-Elements hnRNPLL (heterogeneous ribonucleoprotein L-like) die Erkennung der 5'-Spleißstelle und führt zum Herausspleißen des Exons (Abb. 1.4A). Durch die C77G-Mutation wird die Sequenz des ESS unterbrochen, welches die Erkennung der 5'-Spleißstelle unterdrückt¹². Dadurch kann der trans-Faktor hnRNPLL nicht binden und es kommt zu einer verstärkten Nutzung der 5'-Spleißstelle und zur Inklusion von Exon A^{19,20} (Abb. 1.4B). Somit verhindert die C77G-Transversion die Herunterregulation von CD45RA-Isoformen auf Zelltypen, die normalerweise CD45RA negativ sind.

Aus der Diskussion über die Assoziation der C77G-Mutation mit Autoimmun- und Infektionserkrankungen ergab sich die Frage nach den möglichen funktionellen Konsequenzen des Polymorphismus. Für memory/aktivierte T-Zellen konnte eine verstärkte Effizienz der TcR-vermittelten Signaltransduktion¹³ und ein Einfluss auf die Zytokin-vermittelten T-Zell-Antworten und die Zelladhäsion¹⁴ nachgewiesen werden. Ob auch in anderen Lymphozytensubpopulationen phänotypische oder funktionelle Konsequenzen aufgrund der C77G-Mutation auftreten, ist bisher nicht geklärt. Besonders interessant erscheinen im Zusammenhang mit der Krankheitsassoziation regulatorische T-Zellen, aber auch mögliche Veränderungen in den Funktionen von CD8⁺ T-Zellen und NK-Zellen wären von wesentlicher Bedeutung zur weiteren Einschätzung des C77G-Polymorphismus als potentiellem Risikofaktor für bestimmte Autoimmunerkrankungen.

2 Materialien

2.1 Chemikalien

Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt
Agarose, ultra rein	Gibco, Eggenheim
β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Bovines Serum Albumin (BSA)	Serva, Heidelberg
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
dNTP	Pharmacia, Freiburg
EDTA 1%	Biochrom, Berlin
Essigsäure, p.a.	Merck, Darmstadt
Ethanol, p.a.	J. T. Baker, Deventer, NL
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Ethylendiamintetraacetat (Tritriplex)	Merck, Darmstadt
Ficoll Lösung	Biochrom, Berlin
Fötale Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin
HEPES	Serva, Heidelberg
Hexanukleotide [pd(N) ₆]	Amersham Biosciences, Freiburg
Immunglobulin G, human (Octagam®)	Octapharm, Langenfeld
Interleukin-2 (IL-2)	Hoffmann-La Roche, Basel
Intraglobin	Octapharm, Langenfeld
Kaliumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Seromed, Berlin
Monensin	Sigma, Deisenhofen
MW-Marker, prestained	Invitrogen, Karlsruhe
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Penicillin	Seromed, Berlin
Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (PBS)	Invitrogen, Karlsruhe

Phytohämagglutinin (PHA)	Murex Diagnostics Ltd., Dartford, UK
Reverse Transkriptase	Stratagene, La Jolla, CA, USA
RPMI 1640	Lonza, Verviers, Belgien
Saponin	Sigma, Deisenhofen
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Streptomycin	Seromed, Berlin
Szintillatorflüssigkeit für Filtermatte	Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim
TC199	Flow, Meckenheim
Thymidin (³ H-Methyl-Thymidin)	Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim
Tris	Sigma, Deisenhofen
Trypanblau	Sigma, Deisenhofen
Xylencyanolblau	Sigma, Deisenhofen
φX174 DNA-Marker	Stratagene, La Jolla, CA, USA

2.2 Enzyme

<i>MspI</i>	NEB, Frankfurt am Main
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Qiagen, Hilden

2.3 Geräte

Brutschrank (Cytoperm)	Heraeus, Hanau
Brutschrank	Sanyo, Bezug über Ewald, Bad Nenndorf
Durchflusszytometer (FACSCalibur®)	Becton Dickinson, Heidelberg
Eagle-eye	Stratagene, La Jolla, CA, USA
Eismaschine	Ziegra, Bezug über Jürgens, Hannover
Flüssigkeits-Szintillations-Analysator	LKB Wallac, Turku, Finnland
Heizblock TB1 Thermoblock	Biometra, Göttingen

Materialien

Magnetrührer (Typ MR 2002)	Heidolph, Bezug über Jürgens, Hannover
Multipette	Eppendorf, Hamburg
PCR-Maschine T3 Thermocycler	Biometra, Göttingen
PCR-Maschine DNA Engine PTC-200	Bio-Rad, München
Real-Time-PCR DNA Engine Opticon	Bio-Rad, München
Sterilbank (Lamin-Air®)	Heraeus, Hanau
Synergy Ultrapure Water Systems	Millipore, Schwalbach
VarioMACS®	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Zellerntegerät	Inotech, Dottikon, Schweiz
Elektrophoresekammern:	
Wide Mini Sub Cell	Bio-Rad, München
Horizon 58	Gibco BRL, Karlsruhe
Pipetten:	
Pipette 2µl	Eppendorf, Hamburg
Pipette 10µl	Eppendorf, Hamburg
Pipette 20µl	Eppendorf, Hamburg
Pipette 100µl	Eppendorf, Hamburg
Pipette 200µl	Eppendorf, Hamburg
Pipette 1000µl	Eppendorf, Hamburg
Pipette 2µl	Gilson, Middleton, USA
Pipette 10µl	Gilson, Middleton, USA
Pipette 20µl	Gilson, Middleton, USA
Pipette 100µl	Gilson, Middleton, USA
Pipette 200µl	Gilson, Middleton, USA
Pipette 1000µl	Gilson, Middleton, USA
Spektralphotometer:	
Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
Nanodrop 2000	Thermo Scientific, Waltham, USA

Zentrifugen:

Biofuge 15	Heraeus, Hanau
Megafuge 1.0	Heraeus, Hanau
Varifuge	Heraeus, Hanau

2.4 Verbrauchsmaterial

Drei-Wege-Hähne	Braun, Melsungen
FACSFlow	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS-Röhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg
Filtermatten	Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim
MACS-MS-Säule	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Mikrotiterplatten, 96-well, Rundboden	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Mikrotiterplatten, 96-well, Rundboden	Nunc, Wiesbaden
Mikrotiterplatten, 96-well, Flachboden	Nunc, Wiesbaden
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße (1,5ml)	Eppendorf, Hamburg
Spritzen (5ml)	Braun, Melsungen
Sprizten (20ml)	Braun, Melsungen
Spritzen (50ml)	Braun, Melsungen
Uvette	Eppendorf, Hamburg
Zellkulturflaschen (250 ml)	Nunc, Wiesbaden
Zellkulturflaschen (50 ml)	Nunc, Wiesbaden
Zellkulturplatten, 24-well	Nunc, Wiesbaden
Zellkulturplatten, 6-well	Nunc, Wiesbaden
Zentrifugenröhrchen (15 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen (50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht

2.5 Verwendete Kits

FoxP3 Fix/Perm Buffer Set	BioLegend, San Diego, USA
NucleoSpin Extract II Kit	Macherey-Nagel, Düren
UltraClean 15 DNA Purification Kit	Dianova, Hamburg
QiaAmp DNA Blood Mini Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Plus Micro Kit	Qiagen, Hilden
DyNAmo cDNA Synthesis Kit	Finnzymes, Espoo, Finnland
DyNAmo™ Flash SYBR® Green qPCR Kit	Finnzymes, Espoo, Finnland

2.6 Verwendete magnetische Beads

Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28	Invitrogen, Oslo, Norwegen
Anti-Mouse IgG MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

2.7 Puffer und Lösungen

MACS-Puffer	5mM EDTA 0,5% BSA gelöst in 500ml PBS o. Ca/Mg sterilfiltriert
-------------	---

Erythrozyten-Lyse-Puffer	8,43g NH ₄ CL 1,09g KHCO ₃ 10ml EDTA (1%) gelöst in 1l VE-H ₂ O sterilfiltriert
--------------------------	--

FACS-Waschmedium	0,5% BSA 0,1% NaN ₃
------------------	-----------------------------------

	gelöst in 2l PBS
Auftragspuffer für Gelelektrophorese	15% Ficoll 0,1% SDS 0,3% Bromphenolblau 0,3% Xylencyanol
TAE-Puffer für Gelelektrophorese	0,04M Tris 0,11% Essigsäure 1mM EDTA (pH 8,0) gelöst in 1l demin. H ₂ O

2.8 Antikörper

Die Informationen zu den verwendeten Antikörpern sind folgendermaßen gegliedert:

Bezeichnung des Antikörpers

- Spezifität
- Herkunft (Spezies)
- Isotyp (bei monoklonalen Antikörpern)
- Quelle (Firma bzw. von wem zur Verfügung gestellt)
- Verwendung in dieser Arbeit

2.8.1 Primärantikörper

CD45RA

- erkennt ein durch Exon A kodiertes Epitop des CD45 Gens, welches sich auf den CD45-Isoformen CD45R(ABC) und CD45R(AB) befindet
- monoklonaler Antikörper aus der Maus, Fluoreszein-konjugiert
- IgG_{2b}

- Pharmingen, San Diego, USA
- verwendet für Zellfärbung

CD45R0

- erkennt ein Epitop der CD45-Isoform CD45R0, die weder das Exon A noch B oder C enthält
- monoklonaler Antikörper aus der Maus, Phycoerythrin-konjugiert
- IgG_{2a}
- Pharmingen, San Diego, USA
- verwendet für Zellfärbung

MEM55 (CD45RB)

- erkennt ein durch Exon B kodiertes Epitop des CD45 Gens, welches sich auf den CD45-Isoformen ABC, AB und B befindet
- monoklonaler Antikörper aus der Maus
- IgG₁
- Serotec, Düsseldorf
- verwendet zur Zellfärbung

MT2 (CD45RC)

- erkennt ein durch Exon C kodiertes Epitop des CD45 Gens, welches in den Isoformen ABC und BC vorkommt
- monoklonaler Antikörper aus der Maus
- IgG₁
- IQ Products, Groningen, Niederlande
- verwendet für Zellfärbung

CD4-FITC

- erkennt das CD4 Antigen
- mAk aus der Maus, Fluoreszein-konjugiert
- IgG₁
- Pharmingen, San Diego, USA
- verwendet für Zellfärbung und Zellsortierung

CD25-PE

- erkennt die α -Kette des IL-2 Rezeptor
- mAK aus der Maus, Phycoerythrin-konjugiert
- IgG₁
- Pharmingen, San Diego, USA
- verwendet für Zellfärbung und Zellsortierung

CD25-APC

- erkennt die α -Kette des IL-2-Rezeptors
- mAK aus der Maus, Allophycocyanin-konjugiert
- IgG₁
- Pharmingen, San Diego, USA
- verwendet für Zellfärbung und Zellsortierung

CD8-PE

- erkennt das CD8 Antigen (32-24 kDa)
- mAk aus der Maus, Phycoerythrin-konjugiert
- IgG₁
- Pharmingen, San Diego, USA
- verwendet für Zellfärbung

CD3-PE

- erkennt das CD3 Antigen
- mAk aus der Maus, Phycoerythrin-konjugiert
- IgG_{2a}
- Pharmingen, San Diego, USA
- verwendet für Zellfärbung

CD56-PE

- erkennt das CD56 Antigen
- mAk aus der Maus, Phycoerythrin-konjugiert
- IgG₁
- Pharmingen, San Diego, USA

- verwendet für Zellfärbung

CD56-APC

- erkennt das CD56 Antigen
- mAk aus der Maus, Allophycocyanin-konjugiert
- IgG₁
- Pharmingen, San Diego, USA
- verwendet für Zellfärbung

CD8-APC

- erkennt das CD8 Antigen
- mAk aus der Maus, Allophycocyanin-konjugiert
- IgG₁
- Pharmingen, San Diego, USA
- verwendet für Zellfärbung

CD3-FITC

- erkennt das CD3 Antigen
- mAk aus der Maus, Fluoreszein-konjugiert
- IgG₁
- Pharmingen, San Diego, USA
- verwendet für Zellfärbung

CD20-PE

- erkennt das CD20 Antigen
- mAk aus der Maus, Phycoerythrin-konjugiert
- IgG_{2b}
- Pharmingen, San Diego, USA
- verwendet für Zellfärbung

FoxP3-Alexa-Fluor-647

- erkennt das FoxP3 Antigen

- mAk aus der Maus, Peridinin Chlorophyll Protein Complex-Cyanine5.5-konjugiert
- IgG₁
- BioLegend, San Diego, USA
- verwendet für Zellfärbung

CD127-PerCP-Cy5.5

- erkennt das CD127 Antigen
- mAk aus der Maus, Peridinin Chlorophyll Protein Complex-Cyanine5.5-konjugiert
- IgG₁
- eBioscience,
- verwendet für Zellfärbung

CTLA-4-bio

- erkennt das CD152 Antigen
- mAk aus der Maus, biotinyliert
- IgG_{2a}
- Pharmingen, San Diego, USA
- verwendet für Zellfärbung

CD28-PE-Cy5

- erkennt das CD28 Antigen
- mAk aus der Maus, Phycoerythrin-Cyanine5-konjugiert
- IgG₁
- Pharmingen, San Diego, USA
- verwendet für Zellfärbung

CD69-PE-Cy5

- erkennt das CD69 Antigen
- mAk aus der Maus, Phycoerythrin-Cyanine5-konjugiert
- IgG₁
- BioLegend, San Diego, USA

- verwendet für Zellfärbung

CD16a-PE-Cy5

- erkennt das CD16 Antigen
- mAk aus der Maus, Phycoerythrin-Cyanine5-konjugiert
- IgG₁
- Pharmingen, San Diego, USA
- verwendet für Zellfärbung

CD161-PE

- erkennt das CD161 Antigen
- mAk aus der Maus, Phycoerythrin-konjugiert
- IgG₁
- Pharmingen, San Diego, USA
- verwendet für Zellfärbung

CD40L

- erkennt das CD40L Antigen
- mAk aus der Maus
- IgG_{2b}
- R&D Systems, Minneapolis, USA
- verwendet für Zellfärbung

CD107a-FITC

- erkennt das CD107a Antigen
- mAk aus der Maus, Fluoreszein-konjugiert
- IgG₁
- Pharmingen, San Diego, USA
- verwendet für Zellfärbung

BMA031 (TcR)

- erkennt eine monomorphe Determinante auf der α/β -Kette des T-Zellrezeptors
- monoklonaler Antikörper aus der Maus

- IgG_{2b}
- freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. R. Kurrele, Aventis, Frankfurt
- zur Stimulation verwendet

AICD8.1 (CD8)

- erkennt das CD8 Antigen
- monoklonaler Antikörper aus der Maus
- IgG₁
- Klon freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. S. C. Meuer, Heidelberg
- verwendet für Zellsortierung (MACS)

3C10 (CD14)

- erkennt das CD14 Antigen
- monoklonaler Antikörper aus der Maus
- IgG_{2b}
- aufgereinigt aus Kultur des B-Zell-Hybridoms CD14
- verwendet für Zellsortierung (MACS)

L243 (HLA-DR)

- erkennt HLA-DR, MHC-Klasse II, monomorphe Determinante
- monoklonaler Antikörper aus der Maus
- IgG_{2a}
- aufgereinigt aus Kultur des B-Zell-Hybridoms HLA-DR
- verwendet für Zellsortierung (MACS)

T199 (CD56)

- erkennt ein Epitop auf dem CD56-Antigen
- monoklonaler Antikörper aus der Maus
- IgG₁
- Klon freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. T. Pietsch, Bonn
- verwendet für Zellsortierung (MACS)

2.8.2 Sekundärreagenzien

G α M-FITC (Ziege anti-Maus-FITC)

- erkennt Epitope auf den schweren und leichten Ketten der Maus-Immunglobuline IgG und IgM
- polyklonaler Antikörper aus der Ziege, Fluoreszein-konjugiert
- Dianova, Hamburg
- verwendet als Sekundärantikörper für Zellfärbung

R α M-PE (Ratte anti-Maus-PE)

- erkennt Epitope auf den schweren und leichten Ketten der Maus-Immunglobuline IgG und IgM
- polyklonaler Antikörper aus der Ratte, Phycoerythrin-konjugiert
- Pharmingen, San Diego, USA
- verwendet als Sekundärantikörper für Zellfärbung

Streptavidin-PE

- erkennt Biotin-Strukturen
- Streptavidin, Phycoerythrin-konjugiert
- Pharmingen, San Diego, USA
- verwendet als Sekundärantikörper für Zellfärbung

2.8.3 Blockierungsreagenzien

OCTAGAM

- Immunglobulin G vom Menschen
- OCTAPHARMA, Langenfeld
- verwendet zur Blockade von FcR-vermittelter, unspezifischer Antikörperbindung in der FACS-Analyse

Normales Maus Serum

- Normales Maus Serum

- Dianova, Hamburg
- verwendet zur Absättigung von freien Valenzen des GaM-FITC Antikörpers in der FACS-Analyse

2.9 Primer

2.9.1 PCR-Primer

HTH6/HTH7

Sense: 5'- GAT TGA CTA CAG CAA AGA TGC -3'

Antisense: 5'- TTG TGG TCT CTG AGA AGT CA -3'

HTH1/HTH2

Sense: 5'- GGC TGG CTT CCA GAT ATG ACC ATG TAT -3'

Antisense: 5'- GGT TGT TTC AGA GGCA TTA AGG TAG G -3'

2.9.2 Realtime-PCR-Primer

β -2-M Effizienz: 98% (E=0,98)

Sense: 5'- CCG TGT GAA CCA TGT GAC TT -3'

Antisense: 5'- CTA AGT TGC CAG CCC TCC TA -3'

FoxP3 Effizienz: 84% (E=0,84)

Sense: 5'- AAG GCT TCA TCT GTG GCA TC -3'

Antisense: 5'- ATT GAG TGT CCG CTG CTT CT -3'

IL-10 Effizienz: 86% (E=0,86)

Sense: 5'- GAG AAC AGC TGC ACC CAC TT -3'

Antisense: 5'- GCA TCA CCT CCT CCA GGT AA -3'

Materialien

TGF- β Effizienz: 90% (E=0,90)

Sense: 5'- CTG CTG TGG CTA CTG GTG CT -3'

Antisense: 5'- CCT CCT TGG CGT AGT AGT CG -3'

3 Methoden

3.1 Zellen und Medien

3.1.1 Identifikation von C77G-Individuen und verwendete Zelllinien

Zur Identifikation von C77G-Probanden wurden Blutproben der Blutspendezentrale (Abteilung Transfusionsmedizin) der Medizinischen Hochschule Hannover analysiert. Bei der Routineblutspende werden sogenannte Leukotrap-Filter verwendet, mit denen Spenderleukozyten aus der Blutkonserve entfernt werden. Aus diesen Filtern, die normalerweise verworfen werden, werden periphere mononukleäre Blutlymphozyten (PBMC) isoliert und weiter verwendet. Die Filter sind anonymisiert und können nicht einem individuellen Blutspender zugeordnet werden. Diese Vorgehensweise wurde mit der lokalen Ethik-Kommission abgestimmt, die bestätigt hat, dass keine rechtlich-ethischen Bedenken dagegen bestehen (Stellungnahme vom 10.01.2007). Insgesamt wurden 743 Filter untersucht, wovon 22 den C77G-Phänotyp aufwiesen. Die Zellen wurden über eine Ficoll-Gradienten-Zentrifugation isoliert und bis zur Verwendung kryokonserviert. Die K562-Zelllinie ist eine humane Leukämie-Zelllinie und wurde über ATCC erworben.

3.1.2 Medien und Kultivierungsbedingungen

Als Standardkulturmedium wurde RPMI 1640 verwendet. Das Medium wurde mit 10% FCS, 50U/ml Penicillin und 50µg/ml Streptomycin versetzt. Das FCS wurde vor Gebrauch 30min lang bei 56°C hitzeinaktiviert und zusammen mit Penicillin und Streptomycin vor der Zugabe ins Kulturmedium sterilfiltriert. Als Waschmedien wurden HEPES-gepuffertes TC199 (pH 7,3) und PBS (pH 7,2) verwendet. Die Kultivierung von Zellen erfolgte bei 37°C, 5% CO₂-Partialdruck und 95% gesättigter Wasserdampfatosphäre im Brutschrank.

3.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 10µl Zellsuspension 1:10 mit Trypanblau (0,16% Trypanblau in 0,9% NaCl) gemischt. Anschließend wurden die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop gezählt. Der Farbstoff Trypanblau kann in Zellen eindringen und nur lebende Zellen sind in der Lage, den Farbstoff aktiv durch Ionenkanäle wieder auszuschleusen. Somit bleiben tote oder beschädigte Zellen blau gefärbt und können von den vitalen Zellen unterschieden werden.

3.1.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen auf eine Zellzahl von 5×10^6 - 1×10^7 Zellen pro 500µl eingestellt. Je 500µl Zellsuspension wurde in sterile Glasampullen vorgelegt und mit je 500µl eiskaltem Einfriermedium (Kulturmedium mit 30% FCS und 20% DMSO) versetzt. Die Zellen wurden zunächst über Nacht langsam (in einer Styroporbox) bei -80°C tiefgefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff bei -195°C gelagert. Die Bildung von Eiskristallen wurde durch die Verwendung von DMSO verhindert.

Die Zellen wurden unter leichtem Schwenken im 37°C warmen Wasserbad aufgetaut, danach langsam zu 10ml eiskaltem Auftaumedium (TC199 mit 20% FCS) pro Ampulle gegeben, sofort zentrifugiert (200xg, 10min) und der Überstand abgesaugt. Durch zwei weitere Waschschrte mit TC199 wurde das restliche, in der Zellkultur toxische DMSO entfernt. Dann wurden die Zellen in Kulturmedium aufgenommen und im Brutschrank kultiviert.

3.2 Isolierung und Expansion von Zellpopulationen

3.2.1 Isolierung humaner peripherer Blut-Leukozyten aus Leukotrap[®]-Filtern

Aus insgesamt 743 Leukotrap[®]-Filtern wurden zwei bis drei Tropfen Blut entnommen. Das Blut wurde mit Ery-Lyse-Puffer behandelt, zweimal mit PBS ohne Ca/Mg

gewaschen und mit mAk gegen CD45RA und CD45R0 gefärbt. Filter von Blutspendern die ein variantes CD45RA-Expressionsmuster aufwiesen, wurden wie im Folgenden beschrieben aufgearbeitet.

Um humane periphere mononukleäre Blutlymphozyten (PBMC) aus Leukotrap[®]-Filtern zu isolieren, wurden zuerst die filternahen Schläuche durchtrennt und an je einen Drei-Wege-Hahn angeschlossen. An den Schlauch in Pfeilrichtung wurde eine ungefüllte, sterile 50ml-Spritze angeschlossen. An den Schlauch entgegen der Pfeilrichtung wurde eine mit PBS ohne Ca/Mg gefüllte 50ml-Spritze angeschlossen. Die Drei-Wege-Hähne wurden geöffnet und das PBS ohne Ca/Mg mit Druck entgegengesetzt der Pfeilrichtung durch den Filter gespült. Die Drei-Wege-Hähne wurden geschlossen und das Blut-PBS-Gemisch in einem Becherglas aufgefangen. Die Spritze entgegen der Pfeilrichtung wurde erneut mit PBS ohne Ca/Mg befüllt und die Drei-Wege-Hähne geöffnet. Das PBS ohne Ca/Mg wurde dreimal mit Druck hin- und hergespült und dann das Blut-PBS-Gemisch wieder in das Becherglas gegeben. Dies wurde so oft wiederholt bis ca. 160ml PBS ohne Ca/Mg durch den Filter gespült waren. Danach wurde die Spritze entgegen der Pfeilrichtung mit Luft gefüllt und die restliche Flüssigkeit aus dem Filter gespült. Das Blut-PBS-Gemisch wurde nun zur Ficoll-Separation verwendet.

3.2.2 Ficoll-Separation mononukleärer Zellen aus Spenderblut

Die peripheren mononukleären Blutzellen wurden über eine Dichtegradientenzentrifugation mittels Ficoll aus dem Blut-PBS-Gemisch separiert. Dazu wurden vier 50ml-Röhrchen mit jeweils 10ml Ficoll 1077 befüllt und vorsichtig mit dem Blut-PBS-Gemisch überschichtet. Die Röhrchen wurden anschließend 30min bei 400xg zentrifugiert. Ficoll hat eine spezifische Dichte von 1,077g/ml bei 10°C und während der Zentrifugation kam es zur Schichtung der Blutbestandteile in Abhängigkeit von ihrer jeweiligen Dichte. Es kam zur Bildung einer Lymphozytenschicht, der Interphase, die mit einer Pasteur-Pipette vorsichtig abgesaugt und in ein neues 50ml-Röhrchen überführt wurde. Die Zellen wurden einer Erythrozyten-Lyse unterzogen und anschließend noch zweimal bei 200xg für 10min mit TC199 gewaschen. Die Zellen

wurden in Kulturmedium über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert, wodurch die Lymphozyten nochmals angereichert wurden, da die Monozyten am Plastik hafteten.

3.2.3 Isolierung humaner Lymphozytensubpopulationen mittels Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung (FACS)

Für bestimmte Fragestellungen ist es von Nutzen, phänotypisch verschiedene Zellen physikalisch voneinander zu trennen. Um dies zu erreichen, können die Zellen mittels FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) sortiert werden, wobei unterschiedlich markierte Zellen in separaten Gefäßen aufgefangen werden. Dazu werden die Zellen der Zellsuspension über ein Schlauchsystem aus dem Röhrchen nacheinander angesaugt und durch eine Düse transportiert. Während die Zellen durch die Düse fließen, oszilliert diese, wodurch der Strahl in Tröpfchen aufgeteilt wird. Diese Tröpfchen enthalten optimalerweise eine einzelne Zelle und werden auf dem weiteren Weg von einem Laser angeregt. Das Vorwärtsstreulicht (FSC, forward scatter), das Seitwärtsstreulicht (SSC, sideward scatter), sowie die Fluoreszenzsignale werden detektiert und erlauben über entsprechende Einstellungen die gewünschten Zellen zu separieren und getrennt aufzufangen. Das eigentliche Sortieren wird über unterschiedliche elektrische Ladungen erreicht. Der Computer versieht entsprechend der zuvor bestimmten Kriterien die Tröpfchen, die die gewünschten Zellen enthalten, mit einer elektrischen Ladung. Damit jede Zelle die richtige Ladung bekommt, muss exakt bestimmt werden, zu welchem Zeitpunkt die jeweilige Zelle den Ladeimpuls passiert (time delay), und das Gerät entsprechend justiert werden. Der geladene Tropfen wird in einem elektrischen Feld nach rechts oder links abgelenkt und in einem neuen Röhrchen aufgefangen. Ungeladene Zellen werden nicht abgelenkt und daher verworfen. Nach der Sortierung wurden die Reinheit und die Zellzahl der sortierten Zellen bestimmt. Um eine gleichmäßige Färbung der zu sortierenden Zellen zu erreichen, wurden die Zellen mit ausreichenden Mengen an Intraglobin und Antikörpern inkubiert. Die Zellen wurden in einem BD FACSAria im Sorter-Labor der MHH sortiert. Bei den Sortierungen für die vorliegende Arbeit konnte jeweils eine Reinheit von >95% erreicht werden.

3.2.4 Separation humaner CD4⁺ T-Zellen mittels magnetischer Zellsortierung (MACS)

Zur negativen Separation humaner CD4⁺ T-Zellen aus PBMC wurde die magnetische Zellsortierung (MACS) verwendet. Dazu wurden die PBMC mit Antikörpern gegen die Zellen inkubiert, die durch die MACS-Separation depletiert werden sollen. Ca. $2\text{-}5 \times 10^6$ PBMC wurden in 1ml TC199 mit 10% FCS aufgenommen und mit 40µg/ml des CD14-Antikörpers 3C10, 40µg/ml des CD56-Antikörpers T199, 40µg/ml des HLA-DR Antikörpers L243 und 20µg/ml des CD8-Antikörpers AICD8.1 versetzt. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 4°C wurden die Zellen mit 10ml TC199 gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Danach folgte ein weiterer Waschschrift mit MACS-Puffer, bevor die Zellen in MACS-Puffer (80µl/ 1×10^7 Zellen) aufgenommen wurden. Nun folgten als Sekundärreagenz magnetische GaM-beads (Ziege-anti-Maus-beads, 20µl/ 1×10^7 Zellen) mit denen die Zellen für 15min bei 4°C inkubiert wurden. Nach einem weiteren Waschschrift mit MACS-Puffer wurden die Zellen in 500µl/ 1×10^8 Zellen MACS-Puffer aufgenommen. Dann wurde eine MS-MACS-Säule im Vario-MACS befestigt und gemäß der Gebrauchsanleitung vorbereitet. Nun wurden die Zellen auf die Säule gegeben, die CD4⁺ T-Zellen mit MACS-Puffer eluiert und mit TC199 gewaschen, während die gefärbten Zellen in der Säule festgehalten wurden. Die separierten Zellen wurden zur Kontrolle der Reinheit durchflusszytometrisch analysiert, wobei eine Reinheit zwischen 80% und 95% erreicht wurde.

3.2.5 Expansion von sortierten CD4⁺CD25^{high} T_{reg} mittels Dynabeads Human T-activator CD3/CD28

Für die Sortierung wurden PBMC mit Intraglobin und mAk gegen CD4 und CD25 gefärbt. Nach einem Waschschrift mit TC199 und einem weiteren Waschschrift mit MACS-Puffer wurden die Zellen in MACS-Puffer resuspendiert und zum Vereinzeln durch ein Zellsieb gespült. Bei der anschließenden Sortierung wurden CD4⁺CD25^{high} Zellen durch elektronisches „Gating“ selektiert (Abb. 3.1).

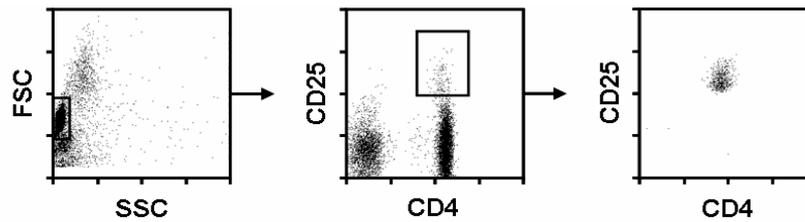


Abb. 3.1 Durchflusszytometrische Analyse sortierter T_{reg}

Gezeigt ist jeweils eine repräsentative Abbildung von $CD4^+CD25^{high}$ regulatorischen T-Zellen vor und nach der Sortierung mit dem FACSAria-Zellsortiergerät.

Zur Expansion von sortierten $CD4^+CD25^{high}$ T_{reg} wurden mit CD3/C28-Antikörpern beladene Dynabeads und hoch-dosiertes IL-2 eingesetzt. CD3 stimuliert die Zellen über den TcR/CD3-Komplex und CD28 ist ein wichtiges kostimulatorisches Molekül zur Aktivierung und Proliferation von T-Zellen. $CD4^+CD25^{high}$ T_{reg} brauchen allerdings zusätzlich eine hohe Dosis an IL-2 (300U/ml) um zu proliferieren, da sie sonst anerg bleiben. Die Dynabeads wurden vor Verwendung in 1ml PBS mit 0,1% BSA gewaschen. Nach der Sortierung erfolgte die Kultivierung der Zellen mit einem vierfachen Überschuss an Dynabeads für eine Woche bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank. Nach dieser Woche wurden die Dynabeads mittels eines Magneten von den Zellen entfernt, diese erneut gezählt und für weitere vier Tage mit frischen Dynabeads im Verhältnis 1:1 kultiviert. Darauf folgten zwei Tage Kultivierung ohne Dynabeads, bevor die Zellen für funktionelle Untersuchungen verwendet wurden.

3.2.6 Expansion von sortierten $CD8^+$ T-Zellen mittels PHA/IL-2

Für die Sortierung wurden PBMC mit Intraglobin und mAk gegen CD8 gefärbt. Nach einem Waschschrift mit TC199 und einem weiteren Waschschrift mit MACS-Puffer wurden die Zellen in MACS-Puffer resuspendiert und zum Vereinzeln durch ein Zellsieb gespült. Bei der anschließenden Sortierung wurden $CD8^+$ Zellen durch elektronisches „Gating“ selektiert (Abb. 3.2).

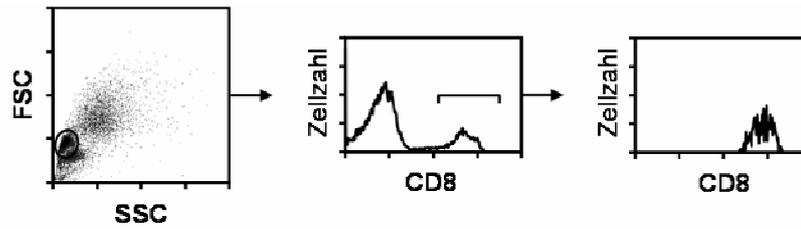


Abb. 3.2 Durchflusszytometrische Analyse sortierter CD8⁺ T-Zellen.

Gezeigt ist jeweils eine repräsentative Abbildung von CD8⁺ T-Zellen vor und nach der Sortierung mit dem FACS Aria-Zellsortiergerät.

Sortierte CD8⁺ T-Zellen wurden für 24h mit 1µg/ml PHA kultiviert, anschließend gewaschen und für weitere sechs Tage mit 50U/ml IL-2 bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert, bevor sie für funktionelle Untersuchungen verwendet wurden.

3.2.7 Expansion von sortierten NK-Zellen mittels IL-2

Für die Sortierung wurden PBMC mit Intraglobin und mAk gegen CD56 und CD3 gefärbt. Nach einem Waschschrift mit TC199 und einem weiteren Waschschrift mit MACS-Puffer wurden die Zellen in MACS-Puffer resuspendiert und zum Vereinzeln durch ein Zellsieb gespült. Bei der anschließenden Sortierung wurden C56⁺CD3⁻ Zellen durch elektronisches „Gating“ selektiert (Abb. 3.3).

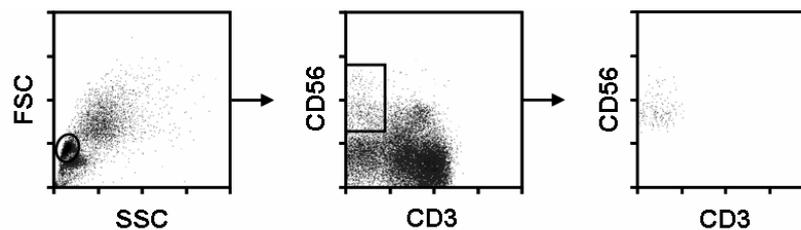


Abb. 3.3 Durchflusszytometrische Analyse sortierter NK-Zellen.

Gezeigt ist jeweils eine repräsentative Abbildung von CD56⁺CD3⁻ NK-Zellen vor und nach der Sortierung mit dem FACS Aria-Zellsortiergerät.

Die sortierten NK-Zellen wurden mit 200U/ml IL-2 für sieben Tage bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert, bevor sie für funktionelle Untersuchungen verwendet wurden.

3.3 Messung der Proliferation

Die Proliferation von Zellen kann durch den Einbau von ^3H -Thymidin in die DNA sich teilender Zellen quantifiziert werden. Hierfür wurden die Zellen während der letzten 16h der Inkubation mit $1\mu\text{Ci } ^3\text{H}$ -Thymidin in $50\mu\text{l}$ RPMI inkubiert. Während dieser Inkubationszeit wird das radioaktivmarkierte Nukleotid von proliferierenden Zellen in ihre DNA eingebaut. Die Radioaktivität wurde anschließend mit einem β -Counter bestimmt.

Für einen Proliferationsansatz wurden pro Stimulus Mehrfachansätze (je nach vorhandener Zellmenge) pipettiert, wovon jeweils das arithmetische Mittel errechnet wurde. Nach vier Tagen Stimulation erfolgte die Markierung der Zellen mit $1\mu\text{Ci } ^3\text{H}$ -Thymidin und die Inkubation für weitere 16 Stunden. Die Zellen wurden danach mit Hilfe eines Zellerntegerätes (Harvester) auf eine Filtermatte überführt. Dies geschieht durch Absaugen mit destilliertem Wasser wodurch die Zellen lysieren und ihre DNA freisetzen. Die DNA-Ketten und darin eingebautes ^3H -Thymidin werden auf der Filtermatte aufgefangen, während Zelltrümmer und nicht eingebautes ^3H -Thymidin die Matte passieren. Die Filtermatte wurde eine Stunde bei 63°C getrocknet und nach Zugabe von 4ml Szintillationsflüssigkeit in einer Folie verschweißt. Die Messung der Radioaktivität erfolgte im Flüssigkeits-Szintillations-Analysator (β -counter) mit einer Zählzeit von einer Minute. Die Proliferation wurde als Funktion der Radioaktivität in Zählimpulsen pro Minute (cpm) dargestellt.

3.4 Durchflusszytometrische Analytik

Bei der Durchflusszytometrie werden verschiedene Eigenschaften einzelner Zellen einer Zellsuspension untersucht, während diese nacheinander durch das Messgerät fließen. Die Zellsuspension wird über ein Schlauchsystem durch eine Küvette gesaugt. Die Zellen werden dabei durch hydrodynamische Fokussierung einzeln hintereinander durch das Zentrum der Küvette geleitet. Die zellulären Eigenschaften, die dabei vom Durchflusszytometer gemessen werden, sind zum einen das Streulicht, das von jeder Zelle erzeugt wird, und zum anderen das Fluoreszenzlicht, das von spezifisch

gebundenen fluoreszenzmarkierten Antikörpern stammt. Das Streulicht wird von der Zellgröße (Vorwärtsstreulicht, Forward-Scatter) und der Granularität (Seitwärtsstreulicht, Side-Scatter) bestimmt. In der Dotplot-Darstellung des Seitwärtsstreulichtes gegen das Vorwärtsstreulicht ergibt sich eine charakteristische Aufteilung der Zellen, in der Lymphozyten von Monozyten und Granulozyten unterschieden werden können.

Um die Zellen phänotypisch zu untersuchen, verwendet man Antikörper, an die fluoreszierende Farbstoffe gekoppelt sind. Wenn farblich unterschiedlich markierte Antikörper verwendet werden, können mehrere Antigene gleichzeitig auf einer Zelle nachgewiesen werden. Dazu müssen alle Farbstoffe deutlich unterschiedliche Emissionsmaxima aufweisen, damit sie von Detektoren getrennt voneinander gemessen werden können. Moderne Durchflusszytometer besitzen zwei oder mehr Laser mit unterschiedlicher Wellenlänge, so dass es möglich ist, mehrere verschiedene Farbstoffe gleichzeitig einzusetzen. Häufig verwendete Farbstoffe in der Durchflusszytometrie sind beispielsweise Fluorescein-isothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), Peridinin Chlorophyll Protein (PerCP) und Allophycocyanin (APC). Für die Messungen im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Gerät mit zwei Lasern verwendet, mit dem bis zu drei Farbstoffe gleichzeitig gemessen wurden. Die Fluoreszenzintensität ist ein Maß für die Leuchtstärke des gebundenen Farbstoffes. Sie ist bei gesättigtem Einsatz der Antikörper proportional zur Antigendichte auf den Zellen. Jede Zelle sendet jedoch auch ohne Färbung eine gewisse Fluoreszenz aus, die sogenannte Autofluoreszenz. Um die Autofluoreszenz der Zellen von einer positiven Fluoreszenzintensität des gebundenen Antikörpers abgrenzen zu können, wurde für jedes Experiment eine Kontrollmessung der Zellen ohne Antikörper vorgenommen. Die Analysen erfolgten an einem FACSCalibur™ und die Datenverarbeitung mit der Software Summit 5.1 (Beckman Coulter).

3.4.1 Direkte Oberflächenfärbung

Die Färbung der Zellen erfolgte in einer 96-Loch-Mikrotiterplatte, wobei die Zellen so eingestellt wurden, dass sich pro Vertiefung $0,5 \times 10^5$ bis 5×10^5 Zellen befanden. Die

Zellen wurden für 1min bei 200xg zentrifugiert und der Überstand abgeschüttet. Nach zweimaligem Waschen (Zentrifugation: 200xg, 1min, 4°C; Waschmedium: PBS mit 0,5% BSA und 0,1%NaN₃) wurden die Zellen in 20µl humanem Intraglobin (Immunglobulin G 10mg/ml) resuspendiert und für 1min unter Schütteln inkubiert. Das Intraglobin wurde zum Abblocken von spezifischen Bindungen über Fc-Rezeptoren der Zellen verwendet. Zu dieser Zellsuspension wurden die spezifischen fluoreszenzmarkierten mAk pipettiert und die Ansätze für 20min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurden nicht gebundene Antikörper durch zwei Waschschriffe aus der Zellsuspension entfernt. Nun konnten die Zellen im FACS gemessen werden.

3.4.2 Indirekte Oberflächenfärbung

Bei der indirekten Färbung wurden aufgereinigte oder biotinylierte Primärantikörper verwendet, an die in einem sekundären Inkubationsschritt fluoreszenzmarkierter GαM-FITC oder RαM-PE bzw. fluoreszenzmarkiertes Streptavidin bindet und anschließend im FACS gemessen werden kann. Um unspezifische Färbungen zu vermeiden, erfolgten indirekte Färbungen jeweils vor den direkten Oberflächenfärbungen. Hierfür wurden die Zellen mit 20µl humanem Intraglobin (Immunglobulin G 10mg/ml) und dem aufgereinigten bzw. biotinylierten Antikörper versetzt und für 20 Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einmal gewaschen (Zentrifugation: 200xg, 1min, 4°C; Waschmedium: PBS mit 0,5% BSA und 0,1%NaN₃), nochmals mit Intraglobin sowie gam-FITC, ram-PE bzw. Streptavidin-PE versetzt und für 20 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach nochmaligem Waschen erfolgte die weitere Phänotypisierung mittels direkt markierter Antikörper.

3.4.3 FoxP3-Färbung

Für die intrazelluläre Färbung von FoxP3 in T_{reg} wurde zuerst die Oberflächenfärbung mit mAk gegen CD4 und CD25 durchgeführt. Dann wurden die Zellen laut der Herstellerangaben des FoxP3 Fix/Perm Buffer Sets fixiert, permeabilisiert und gefärbt.

Nach zwei weiteren Waschschritten (Zentrifugation: 200xg, 1min, 4°C; Waschmedium: PBS mit 0,5% BSA und 0,1%NaN₃) wurden die Zellen im FACS gemessen.

3.4.4 Intrazelluläre Färbung

Intrazelluläre Färbungen erfolgten gegebenenfalls jeweils nach der Oberflächenfärbung. Nach zweimaligem Waschen (Zentrifugation: 200xg, 1min, 4°C; Waschmedium: PBS mit 0,5% BSA und 0,1%NaN₃) wurden die Zellen mit 4%igem Paraformaldehyd für 10min bei Raumtemperatur fixiert. Nun konnten die Zellmembranen durch die Zugabe des Detergens Saponin (0,2%) für 10min perforiert werden. Dann wurden Blockadelösung und Antikörper gegen intrazelluläre Antigene zu den Zellen gegeben und für 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Mit Sekundärantikörpern wurde genauso verfahren. Nach zwei weiteren Waschschrritten erfolgte die Messung der Zellen im FACS.

3.5 Nachweis der C77G-Mutation

Auch andere Mutationen führen zu einer aberranten CD45RA-Expression. Deshalb war es notwendig, die C77G-Mutation bei den 22 identifizierten Individuen mit veränderter CD45RA-Expression molekularbiologisch nachzuweisen. Der Nachweis erfolgte durch eine Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus-Analyse (RFLP). Dazu wurde von allen Individuen genomische DNA isoliert, mittels PCR Exon A vervielfältigt und mit dem Restriktionsenzym MspI geschnitten.

3.5.1 Isolierung der DNA

PBMC wurden über Nacht mit 1µg/ml PHA kultiviert, gewaschen und für ca. eine Woche mit 25U/ml IL-2 weiterkultiviert. Danach wurden die Zellen gezählt und 5x10⁶ Zellen in 200µl PBS aufgenommen. Die Isolation der DNA erfolgt mit dem QIAmp

DNA Blood Mini Kit von Qiagen nach den Angaben des Herstellers. Die isolierte DNA wurde in einem Gesamtvolumen von 200µl H₂O eluiert. Die Konzentration und Reinheit der DNA wurde photometrisch bestimmt. Die Lagerung der DNA erfolgte bei -20°C.

3.5.2 Polymerasekettenreaktion und Aufreinigung der Exon A Fragmente

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist ein Verfahren zur Vervielfältigung von bestimmten DNA-Abschnitten *in vitro*. Mit Hilfe der thermostabilen DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* und geeigneten Sense- und Antisense-Primern wird in thermischen Reaktionsschritten ein definierter Bereich der DNA amplifiziert. In der vorliegenden Arbeit wurde die PCR für den Nachweis der C77G Mutation eingesetzt, wofür zunächst die Nukleotidsequenz 1-120 von Exon A amplifiziert wurde. Der PCR-Ansatz umfasst ein 60µl Reaktionsvolumen, bestehend aus 300ng genomischer DNA, 6µl 10x PCR-Puffer, 1,2µl dNTPs (Gemisch aus jeweils 10 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP), 5µM 5'- und 3'-Primer (HTH6 und HTH7) und 2U TaqDNA-Polymerase. Nach einer initialen fünfminütigen Denaturierung bei 94°C wurden für die Amplifikation folgende Zeiten und Temperaturen verwendet: 30s Denaturierung bei 94°C, 60s Primerhybridisierung bei 65°C und 60s Elongation bei 72°C. Insgesamt wurde diese Zyklusfolge 35mal wiederholt und eine fünfminütige Auffüllphase bei 72°C schloss die PCR-Reaktion ab. Die PCR-Produkte wurden auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen und ca. 1h bei 65V laufen gelassen. Die 120bp-Banden wurden auf dem UV-Tisch aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt. Die Aufreinigung der Fragmente wurde nach Herstellerangaben mit dem UltraClean DNA Purification Kit durchgeführt.

3.5.3 Spaltung der PCR-Produkten mit dem Restriktionsenzym *MspI*

Das aufgereinigte PCR-Produkt wurde mit 1µl Puffer und 1µl *MspI* versetzt und 2h bei 37°C im Heizblock inkubiert. Anschließend wurden die verdauten PCR-Produkte auf

ein 3,5%iges Agarosegel aufgetragen und ca. 1h bei 70V aufgetrennt. Die Banden wurden unter UV-Licht sichtbar gemacht und fotografisch festgehalten.

3.6 Funktionelle Assays

3.6.1 Suppressionsassay

Regulatorische T-Zellen haben die Funktion, die Aktivierung des Immunsystems durch die Suppression der T-Zellaktivierung zu unterdrücken und dadurch die Selbsttoleranz des Immunsystems zu regulieren.

Für die Suppressionsassays wurden 1×10^4 MACS-sortierte $CD4^+$ T-Zellen für 4 Tage mit 2×10^3 CD3/CD28 Tcell expander Beads in An- bzw. Abwesenheit von 1×10^4 expandierten T_{reg} in einem Endvolumen von 200 μ l Kulturmedium stimuliert. Die Proliferation wurde anschließend anhand des 3H -Thymidin-Einbaus gemessen.

3.6.2 TcR-vermittelte CD69-Expression

Der Antikörper BMA031 bindet an die konstante Region der α/β -Kette des T-Zell-Rezeptors (TcR) und ist in der Lage auch ohne Kreuzvernetzung eine Signalübertragung auszulösen. Durch die Stimulation mit verschiedenen BMA031-Konzentrationen kann die Heraufregulation der Expression von Aktivierungsmarkern wie CD69 dosisabhängig analysiert werden. Dazu wurde BMA031 in vier Konzentrationen von 0-3 μ g/ml über Nacht bei 4°C an Plastik gekoppelt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die PBMC (1×10^6 Zellen/ml) dazugegeben und für 3h im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit anti-CD4, anti-CD25 und anti-CD69 gefärbt und am Durchflusszytometer analysiert.

3.6.3 CD107a-Degranulations-Assay

CD107a ist ein Lysosomen-assoziiertes Membranprotein auf der luminalen Seite von Vesikeln. Die CD107a-Expression auf der Zelloberfläche wird nach Stimulation von zytotoxischen Zellen stark heraufreguliert und korreliert sowohl mit der Zytokinsekretion als auch mit der Zell-vermittelten Lyse von Zielzellen. Deshalb kann CD107a als Marker für die Degranulation dieser Zellen verwendet werden.

Für CD107a-Assays mit CD8⁺ T-Zellen wurden PBMC für drei Tage im Brutschrank mit 1µl/ml PHA voraktiviert. Zur Stimulation wurde BMA031 in einer Konzentration von 2µg/ml über Nacht bei 4°C in einer Mikrotiterplatte an Plastik gekoppelt. Nach zweimaligem Waschen der Mikrotiterplatte mit PBS wurden 2x10⁵ Zellen/ml, 20µl humanes Intraglobin, 10µl anti-CD107a-FITC bzw. IgG₁-FITC und 5µg/ml Monensin dazugegeben und für 4h im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Monensin verhindert die Ansäuerung der endozytischen Vesikel und den Abbau der reinternalisierten CD107a-Proteine von der Zelloberfläche, so dass die Proteine nach Stimulation sichtbar bleiben. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit anti-CD8 mAk gefärbt und am Durchflusszytometer analysiert.

Für die CD107a-Assays mit NK-Zellen wurden PBMC für eine Woche im Brutschrank mit 200U/ml IL-2 voraktiviert. Für dieses Assay wurden K562-Zellen zur Stimulation verwendet, welche sich als Zielzellen für NK-Zellen eignen. K562-Zellen exprimieren keine MHC-Klasse-I-Moleküle auf ihrer Oberfläche, welche notwendig sind um die Aktivität der NK-Zellen zu inhibieren. Es wurden 2x10⁵ PBMC/ml alleine bzw. mit 2x10⁵ K562-Zellen/ml sowie 20µl humanem Intraglobin, 10µl anti-CD107a-FITC bzw. IgG₁-FITC und 5µg/ml Monensin in eine Mikrotiterplatte gegeben und für 4h im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit anti-CD56 mAk und anti-CD3-mAK gefärbt und am Durchflusszytometer analysiert.

3.7 RT-PCR und Real-Time-PCR

3.7.1 Isolierung der RNA

Um RNA aus geringen Zellzahlen zu isolieren, wurde das RNeasy Plus Micro Kit von Qiagen verwendet. Die Zellen wurden in 1,5ml Eppendorfgefäße überführt und die RNA laut Herstellerangaben isoliert. Die RNA wurde in 14µl RNase-freiem H₂O aufgenommen. Die Konzentration der aufgereinigten RNA wurde am Nanodrop bestimmt. Die RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.7.2 Reverse Transkription

Für die Umschreibung der RNA in cDNA wurde das DyNAmo cDNA Synthesis Kit von Finnzymes verwendet. Eine optimale cDNA-Synthese bekommt man laut Herstellerangaben ab 200ng aufwärts, allerdings wurden auch darunterliegende RNA-Mengen problemlos in cDNA umgeschrieben. Für die RT-Real-Time-PCR-Experimente wurden jeweils 500ng RNA in cDNA umgeschrieben.

3.7.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine Methode, um DNA mithilfe einer DNA-Polymerase *in vitro* zu vervielfältigen. Der Begriff „Kettenreaktion“ beschreibt die Tatsache, dass die Produkte vorheriger Zyklen als Ausgang für den nächsten Zyklus dienen und somit eine exponentielle Vervielfältigung ermöglichen.

Der PCR-Ansatz umfasst ein 30µl Reaktionsvolumen, bestehend aus 50-200ng cDNA, 3µl 10x PCR-Puffer, 0,6µl dNTPs (Gemisch aus jeweils 10mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP), 5µM 5'- und 3'-Primer (HTH1 und HTH2) und 2U TaqDNA-Polymerase. Nach einer initialen fünfminütigen Denaturierung bei 94°C wurden für die Amplifikation folgende Zeiten und Temperaturen verwendet: 45s Denaturierung bei

94°C, 45s Primerhybridisierung bei 62°C und 45s Elongation bei 72°C. Insgesamt wurde diese Zyklenfolge 33mal wiederholt und eine fünfminütige Auffüllphase bei 72°C schloss die PCR-Reaktion ab. Die PCR-Produkte wurden auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen und ca. 1h bei 65V laufen gelassen.

3.7.4 Real-Time-PCR

Die RT-Real-Time-PCR ist eine Vervielfältigungs- und Quantifizierungsmethode für Nukleinsäuren. Die Vervielfältigung basiert auf der herkömmlichen PCR-Methode, die Quantifizierung der PCR-Produkte auf der Fluoreszenzmessung von Fluorochromen, wie beispielsweise SYBR[®] Green, welches an die entstehende doppelsträngige DNA bindet, fluoresziert und sich somit detektieren lässt. Hierbei muss zwischen den drei Phasen der PCR unterschieden werden: der Anlaufphase, der exponentiellen Phase und der Plateauphase. Während die konventionelle PCR die Nukleinsäuremenge in der Plateauphase bestimmt, misst die RT-Real-Time-PCR diese in der exponentiellen Phase. Dabei gilt, je eher die Kurve in die exponentielle Phase übergeht, desto mehr Nukleinsäure war anfangs vorhanden. Diese Unterschiede werden anhand des Schwellwertzyklus (cycle of threshold; C(T)) analysiert. Der CT-Wert gibt den Übergang der Kurve von der Anlaufphase zur exponentiellen Phase an. Da die Amplifikationen von verschiedenen Targetsequenzen unterschiedlich effizient sind, müssen die Effizienzen der Primerpaare vor der Untersuchung bestimmt werden. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe der Primerpaare von unverdünnt über 1, 1:10, 1:50 bis 1:100 angefertigt und die nach der Reaktion vorliegenden C(T)-Werte in einer Grafik gegen den Logarithmus der Konzentration aufgetragen. Die resultierende Geradensteigung wurde in die Gleichung $E = 10^{-1/m} - 1$ eingesetzt und die Effizienzen der Primerpaare berechnet. Die effizienzbereinigte Quantifizierung der mRNA-Mengen wurde nach folgender Gleichung durchgeführt⁶⁰:

$$\text{ratio} = (E+1)_{\text{Zielgen}}^{\Delta\text{CT}(\text{Kontrolle-Behandlung})} / (E+1)_{\text{Referenzgen}}^{\Delta\text{CT}(\text{Kontrolle-Behandlung})}$$

Die Quantifizierung anhand der RT-Real-Time-PCR ist sehr exakt und aufgrund der hohen Empfindlichkeit der fluorometrischen Messung sehr sensitiv. Bereits zehn bis

hundert Kopien der Targetsequenz sind ausreichend, um eine Quantifizierung vorzunehmen. Die Quantifizierung kann absolut oder relativ erfolgen. Für die absolute Quantifizierung einer Targetsequenz wird ein Standard verwendet, während bei der relativen Quantifizierung bei jeder Reaktion ein Referenzgen (Housekeeping-Gen) mitanalysiert wird.

Für einen Reaktions-Ansatz wurden 2µl cDNA mit entsprechenden Mengen H₂O und Primern vermischt und anschließend mit 25µl Master Mix von NEB Finnzymes DyNAmo SYBR®Green versetzt. Um die Bildung von Primerdimeren zu erfassen, wurde für jedes Primerpaar ein Ansatz ohne cDNA mitanalysiert. Das PCR-Programm wurde nach einer initialen 7-minütigen Denaturierung bei 94°C folgendermaßen gewählt: 15s Denaturierung bei 94°C, 15s Primerhybridisierung bei 58°C und 30s Elongation bei 72°C. Insgesamt wurde diese Zyklusfolge 40-mal wiederholt und im Anschluss eine Schmelzkurve durchgeführt. Dabei wurde die Temperatur alle 2s von 72°C um jeweils 1°C auf 95°C erhöht. Die Schmelzkurve stellt eine Qualitätskontrolle der generierten PCR-Produkte dar.

3.8 Agilent Microarray

Microarrays beruhen auf der komplementären Basenpaarung von Nukleotidsequenzen. Auf einem Agilent Custom Gene Expression Microarray 4x44K befinden sich beispielsweise 44000 Oligonukleotide, die 41000 Gene repräsentieren. Diese Oligonukleotide, die eine Länge von 60 Nukleotiden haben, werden mittels eines Tintenstrahl-Verfahrens Base für Base auf einen Glasträger gebracht. Die 60-mer Länge ermöglicht dabei eine große Sensitivität. Wird ein Microarray mit einer Probe mit unbekanntem fluoreszenzmarkierten Nukleinsäuresequenzen versetzt, binden bestimmte Nukleinsäuren auf Grund ihrer Komplementarität an bestimmten Sonden. Dieser Vorgang wird als Hybridisierung bezeichnet. Die Auswertung erfolgt über die Messung der Fluoreszenzsignale. Mit dieser Methode können die Expressions-Level tausender Gene gleichzeitig analysiert werden.

Expandierte T_{reg} wurden nach einer zweistündigen Stimulation mit CD3/CD28-Beads (1:5) in RLT-Puffer bei -80°C eingefroren und gesammelt. Später wurde aus diesen Proben RNA mit dem RNeasy Plus Micro Kit von Qiagen isoliert. Die Zellen wurden in 1,5ml Eppendorfgefäße überführt und die RNA laut Herstellerangaben isoliert. Die RNA wurde in $14\mu\text{l}$ RNase-freiem H_2O aufgenommen. Die Konzentration der aufgereinigten RNA wurde am Nanodrop bestimmt und die RNA bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Es wurden zwei gemischte RNA-Proben aus jeweils drei wt-Individuen bzw. 3 C77G-Individuen mit äquimolaren Mengen an RNA von den einzelnen Individuen vorbereitet. Die Agilent Microarray Analyse wurde von der Serviceeinheit Genomanalytik am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig unter Leitung von Dr. R. Geffers durchgeführt. Die Qualität und die Integrität der RNA wurden mit einem Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) kontrolliert, bevor 100ng RNA für die Cy3-Markierung nach dem Einfarben Quick Amp Labeling Protokoll (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) verwendet wurden. Die markierte cRNA wurde für 16h bei 68°C auf einen Agilent Custom Gene Expression Microarray 4x44K hybridisiert und anschließend mit einem Agilent DNA Microarray Scanner gescannt. Die Expression-Werte wurden mit dem Software-Paket Feature Extraction 10.5.1.1 (Agilent Technologies; Waldbronn, Germany) berechnet. Die statistische Analyse der Expressions-Daten wurde mit dem Gene Spring Software-Paket (Agilent Technologies; Waldbronn, Germany) durchgeführt.

3.9 Statistik

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten wurde mit dem ungepaarten Student's-t-Test (t-Test) durchgeführt. Alle Ergebnisse wurden als arithmetischer Mittelwert \pm Standardabweichung des Mittelwertes angegeben.

4 Ergebnisse

4.1 Die C77G-Mutation als molekulare Ursache für phänotypische Veränderungen bei humanen peripheren Blutlymphozyten

Bei einer Doppelfärbung von peripheren mononukleären Blutlymphozyten (PBMC) mit monoklonalen Antikörpern (mAk) gegen CD45RA und CD45R0 waren bei etwa 97% der gesunden Blutspender drei Subpopulationen nachweisbar (Abb. 4.1). Als ruhende/nicht-aktivierte Zellen werden $CD45RA^+CD45R0^-$ Zellen bezeichnet, während memory/aktivierte Zellen sich als $CD45RA^-CD45R0^+$ darstellen.

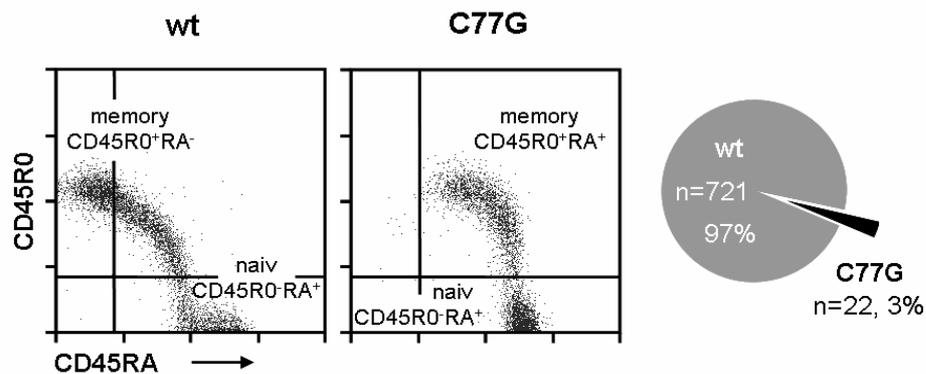


Abb. 4.1 Expression von CD45RA und CD45R0 Isoformen auf PBMC von wt- und C77G-Individuen.

Frisch isolierte, periphere mononukleäre Blutlymphozyten (PBMC) wurden mittels einer Zweifarbanalyse mit den mAk CD45RA-FITC und CD45R0-PE durchflusszytometrisch analysiert. Der linke Dotplot stellt das CD45RA/R0-Expressionsmuster eines wt-Individuums dar, während im rechten Dotplot das CD45RA/R0-Expressionsmuster eines C77G-Individuums gezeigt ist. Unter insgesamt 743 untersuchten gesunden Blutspendern aus der Abteilung Transfusionsmedizin der MHH konnten 22 Individuen (ca. 3%) mit dem C77G-Polymorphismus identifiziert werden.

Doppelt positive Zellen stellen ein Übergangsstadium von kürzlich aktivierten Zellen dar, die CD45RA noch nicht herunterreguliert haben. Bei etwa 3% der gesunden Blutspender zeigte sich allerdings ein variantes CD45-Expressionsmuster. Bei diesen Spendern waren die memory/aktivierten Zellen nicht $CD45RA^-CD45R0^+$, sondern $CD45RA^+CD45R0^+$ (Abb. 4.1). Diesem varianten Expressionsmuster liegt ein Polymorphismus im CD45-Gen zugrunde, der ursprünglich in unserer Arbeitsgruppe identifiziert wurde⁸. Der Polymorphismus ist durch eine Punktmutation an Position 77 des Exon A (Transversion von C zu G) gekennzeichnet. Die Transversion ist neutral, sie

hat keine Aminosäuresubstitution zur Folge und bis auf einen Fall¹⁰ sind nur Individuen mit Heterozygotie für diese Mutation bekannt. Diese Punktmutation verhindert allerdings das Spleißen des Exons A und damit die Herunterregulation der CD45RA-Isoformen nach Aktivierung.

Insgesamt wurden im Rahmen dieser Arbeit 743 gesunde Blutspender analysiert, wovon 22 Spender (ca. 3%) ein variantes CD45RA-Expressionsmuster aufwiesen (Abb. 4.1). Es ist eine weitere Mutation (C59A) im Exon A beschrieben worden, die in der Durchflusszytometrie den gleichen Phänotyp aufweist⁴⁷. Daher wurde mittels einer RFLP-Analyse untersucht, welche der Mutationen bei dem verwendeten Material mit variantem CD45RA-Expressionsmuster vorliegt.

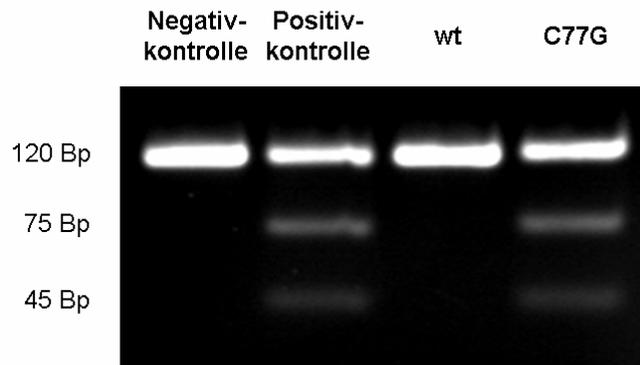


Abb. 4.2 Nachweis der C77G-Mutation im Exon A durch eine *MspI* spezifische RFLP-Analyse.

DNA wurde aus PBMC von Individuen mit wt- und C77G-CD45RA-Expressionsmuster isoliert. Mit Hilfe der PCR-Technik wurden die Nukleotidpositionen 1-120 von Exon A amplifiziert. Die DNA-Proben wurden mit *MspI* verdaut und die Fragmente in einem 3,5%igen Agarosegel aufgetrennt. Als Kontrollen wurden jeweils die DNA eines schon identifizierten wt-Individuums (Negativkontrolle) und eines bereits identifizierten C77G-Individuums (Positivkontrolle) mitgeführt.

Durch die Transversion von C zu G entsteht eine spezifische Schnittstelle für das Restriktionsenzym *MspI* (CCCG→CCGG). Das wt-Allel wird durch *MspI* nicht gespalten, weshalb bei wt-Individuen nur eine Bande bei 120bp zu sehen ist (Abb. 4.2). Das variante Allel hingegen wird durch *MspI* in zwei Fragmente zu 75bp und 45bp gespalten. Bei varianten Individuen traten somit nach dem Restriktionsverdau zwei kleinere Banden bei 75bp und 45bp auf. Die zusätzliche Bande von 120bp bei C77G-Individuen deutete auf heterozygote Träger der C77G-Mutation mit jeweils einem wt-

und einem C77G-Allel hin. Bei allen 22 Individuen mit variantem CD45RA-Expressionmuster wurde eine Heterozygotie für die C77G-Mutation nachgewiesen.

Bisher wurden die Untersuchungen zur Auswirkung des C77G-Polymorphismus mit memory/aktivierten T-Zellen durchgeführt. Diese Zellen zeigen einen besonders ausgeprägten Phänotyp des varianten CD45RA-Expressionsmusters. Aktivierte wt-T-Zellen sind CD45RA-negativ, während aktivierte C77G-T-Zellen zu 100% CD45RA-positiv sind^{13,14}. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, in welchem Umfang regulatorische T-Zellen, CD8⁺ T-Zellen und NK-Zellen in ihrer Isoformenausstattung durch die C77G-Mutation beeinflusst werden. Dafür wurden mAk gegen die alternativ gespleißten Exons A, B und C sowie gegen die CD45R0-Isoform verwendet.

Schon bei der Analyse von ruhenden und aktivierten PBMC konnten signifikante Unterschiede in der CD45RA- und CD45R0-Expression zwischen wt- und C77G-Individuen beobachtet werden (Abb. 4.3 und 4.4). Ruhende PBMC von C77G-Individuen zeigten sowohl eine signifikant höhere CD45RA-Expression als auch eine signifikant niedrigere CD45R0-Expression im Vergleich zu wt-Individuen. Ruhende wt-PBMC waren zu circa 70% CD45RA-positiv und zu circa 55% CD45R0-positiv, während ruhende C77G-PBMC zu 100% CD45RA-positiv und zu nur durchschnittlich 35% CD45R0-positiv waren. Die Expressionsmuster von CD45RB und CD45RC unterschieden sich dagegen auf ruhenden PBMC nicht zwischen wt- und C77G-Individuen. CD45RB wurde von nahezu allen Zellen und CD45RC im Mittel von 80% der Zellen exprimiert.

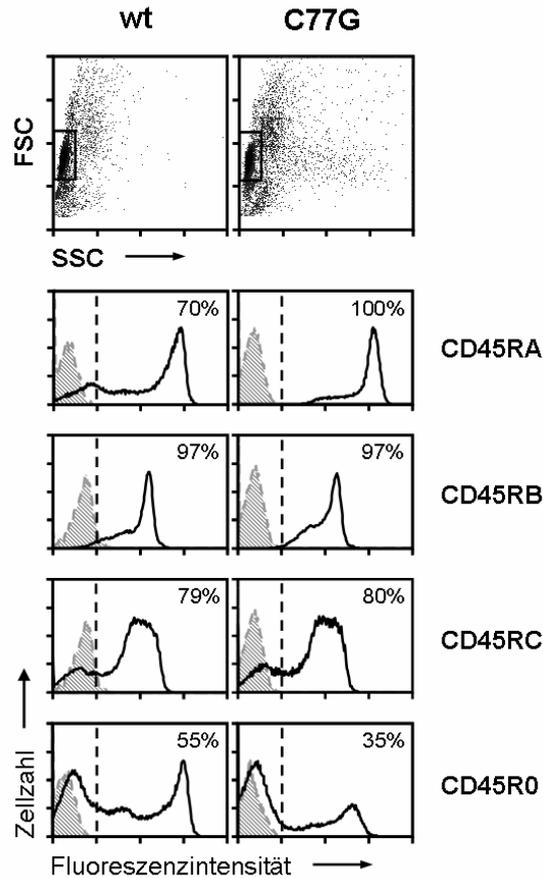


Abb. 4.3 Expressionsmuster der CD45-Isoformen auf ruhenden PBMC.

Ruhende PBMC (schwarzer Rahmen im Dotplot) von wt- und C77G-Individuen wurden mittels Einfarb- oder Zweifarbanalyse mit mAk auf ihre Expression von CD45RA, CD45RB, CD45RC und CD45R0 durchflusszytometrisch analysiert (ungefüllte Histogramme). Die grau schraffierten Histogramme zeigen ungefärbte PBMC als Kontrolle. Positive und negative Zellen wurden anhand der Negativkontrolle unterschieden (gestrichelter Marker) und die Prozente an positiven Zellen sind angegeben. Ähnliche Expressionsmuster wurden in mindestens zwei weiteren Experimenten beobachtet.

Auf aktivierten Zellen ist der Unterschied in der CD45RA-Expression noch deutlicher als bei ruhenden Zellen, da nach Aktivierung CD45RA-Isoformen von wt-PBMC herunterreguliert werden, während C77G-PBMC dazu nicht in der Lage waren (Abb. 4.4). PBMC von C77G-Individuen exprimieren auf allen Zellen CD45RA, was eine signifikant höhere Expression als bei wt-Individuen mit im Durchschnitt 32% CD45RA-positiven Zellen ist. Vergleicht man die Expressionsdichten der CD45RA-Moleküle von ruhenden Zellen mit aktivierten Zellen miteinander, sieht man, dass diese sowohl bei wt- als auch bei C77G-Individuen geringer werden (Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) ruhend: wt 317 ± 49 , C77G 770 ± 174 , MFI aktiviert: wt 37 ± 4 , C77G 203 ± 9). Dass trotzdem alle C77G-PBMC CD45RA-positiv waren, weist auf einen heterozygoten Genotyp der C77G-Mutation mit einem normal gespleißten

Allel hin. Aktivierte PBMC wiesen keine Unterschiede in ihrer Expression von CD45R0, CD45RB und CD45RC zwischen wt- und C77G-Individuen auf.

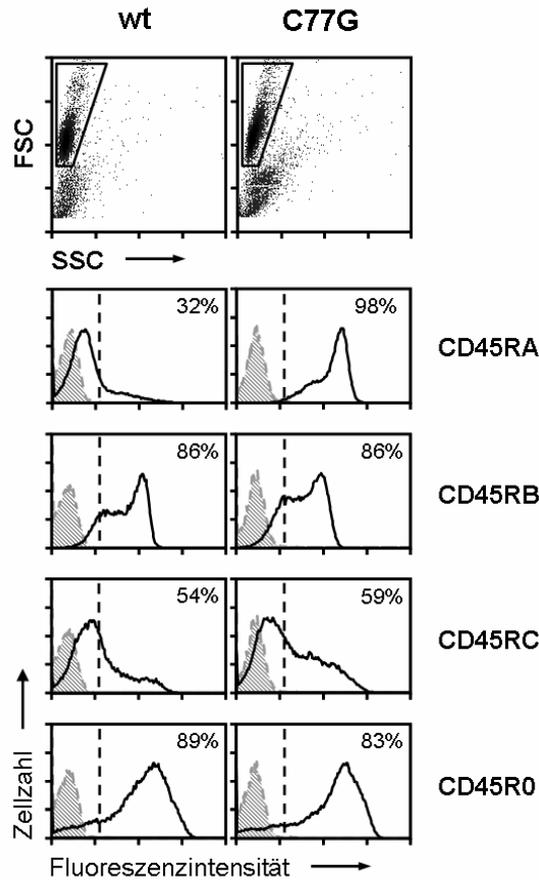


Abb. 4.4 Expressionsmuster der CD45-Isoformen auf *in vitro* aktivierten PBMC.

PBMC von wt- und C77G-Individuen wurden für die Untersuchung für 24h mit PHA aktiviert und anschließend für sechs Tage mit 25U/ml IL-2 kultiviert. Die aktivierten PBMC (schwarzer Rahmen im Dotplot) wurden mittels Einfarb- oder Zweifarbanalyse mit mAks auf ihre Expression von CD45RA, CD45RB, CD45RC und CD45R0 durchflusszytometrisch analysiert (ungefüllte Histogramme). Die grau schraffierten Histogramme zeigen ungefärbte PBMC als Kontrolle. Positive und negative Zellen wurden anhand der Negativkontrolle unterschieden (gestrichelter Marker) und die Prozente an positiven Zellen sind angegeben. Ähnliche Expressionsmuster wurden in mindestens zwei weiteren Experimenten beobachtet.

Allerdings wurden beim Vergleich von ruhenden mit aktivierten PBMC (Abb. 4.3 und 4.4) die Heraufregulation von CD45R0 (MFI ruhend: wt 136 ± 27 , C77G 100 ± 12 , MFI aktiviert: wt 205 ± 53 , C77G 185 ± 42) sowie die Herunterregulation von CD45RC (MFI ruhend: wt 152 ± 36 , C77G 161 ± 31 , MFI aktiviert: wt 63 ± 11 , C77G 55 ± 4) deutlich.

4.2 Phänotypische und funktionelle Konsequenzen der C77G-Mutation bei CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen

Um mögliche phänotypische und funktionelle Unterschiede zwischen T_{reg} von wt- und C77G-Individuen nachweisen zu können, wurden zunächst die Expressionsmuster der verschiedenen CD45-Isoformen und von T_{reg}-spezifischen Molekülen verglichen. Weitere Untersuchungen fokussierten auf die Darstellung zellulärer Funktionen nach TcR-vermittelter Stimulation wie die Expression des Aktivierungsmarkers CD69, die Proliferation, die Zytokinsynthese und die suppressive Kapazität der T_{reg}.

4.2.1 Charakterisierung ruhender CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ T_{reg}

Die phänotypischen Auswirkungen der C77G-Mutation auf T_{reg} wurden mittels durchflusszytometrischer Analysen untersucht. Dabei wurden mAk gegen die alternativ gespleißten Exons A, B und C sowie gegen die CD45R0-Isoform verwendet. Wie bei den PBMC konnten signifikante Unterschiede in der CD45RA- und CD45R0-Expression zwischen ruhenden T_{reg} von wt- und C77G-Individuen nachgewiesen werden (Abb. 4.5).

Dabei war der Unterschied in der CD45RA-Expression besonders stark ausgeprägt mit nahezu 100% CD45RA-positiven Zellen bei C77G-Individuen gegenüber nur circa 27% CD45RA-positiven Zellen bei wt-Individuen. Für CD45R0 waren hingegen im Mittel nur 72% der C77G-T_{reg} positiv, während es bei den wt-T_{reg} circa 90% waren. In der CD45RB- und CD45RC-Expression konnten keine Unterschiede zwischen T_{reg} von wt- und C77G-Individuen gefunden werden. Für CD45RB waren 80-90%, für CD45RC 40-50% der Zellen positiv.

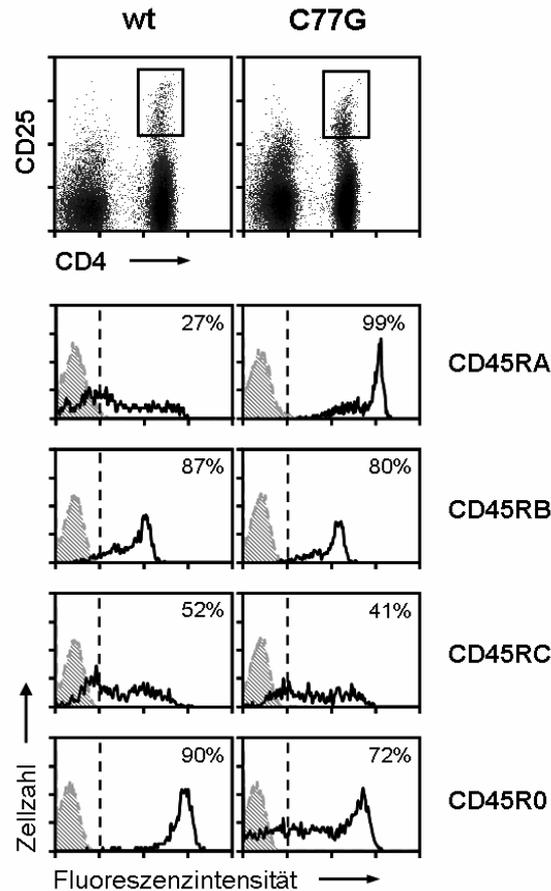


Abb. 4.5 Expressionsmuster der CD45-Isoformen auf ruhenden $CD4^+CD25^{high}$ T_{reg} .

Ruhende PBMC von wt- und C77G-Individuen wurden mittels einer Dreifarbanalyse auf ihre Expression von CD4/CD25 (schwarzer Rahmen im Dotplot) und entweder CD45RA, CD45RB, CD45RC oder CD45R0 durchflusszytometrisch analysiert (ungefüllte Histogramme). Die grau schraffierten Histogramme zeigen ungefärbte PBMC als Kontrolle. Positive und negative Zellen wurden anhand der Negativkontrolle unterschieden (gestrichelter Marker) und die Prozente an positiven Zellen sind angegeben. Ähnliche Expressionsmuster wurden in mindestens zwei weiteren Experimenten beobachtet.

Die T_{reg} -spezifischen Moleküle FoxP3, CD127, CTLA-4 und CD28 wurden zur weiteren phänotypischen Charakterisierung der Zellen ebenfalls analysiert. Alle Moleküle zeigten sowohl bei wt- als auch bei C77G-Individuen die erwarteten Expressionsmuster (Abb. 4.6). Der überwiegende Teil der T_{reg} war positiv für die Moleküle FoxP3, CTLA-4, CD28 und schwach positiv für CD127. Auf der Basis der vorliegenden Untersuchungen wurden keine Unterschiede in den T_{reg} -spezifischen Expressionsmustern dieser Moleküle zwischen wt- T_{reg} und C77G- T_{reg} gefunden.

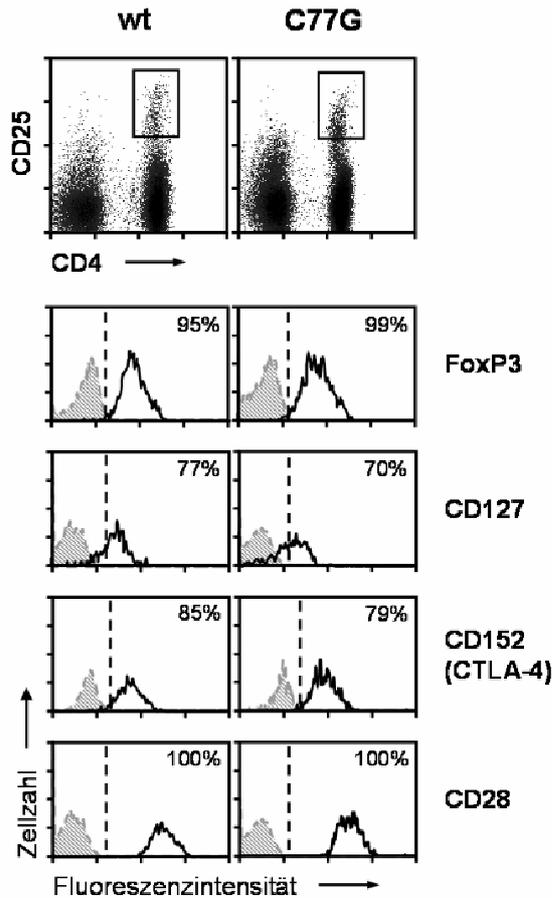


Abb. 4. 6 Expressionsmuster T_{reg} -spezifischer Moleküle.

Ruhende PBMC von wt- und C77G-Individuen wurden mittels einer Dreifarbanalyse mit mAK auf ihre Expression von CD4/CD25 (schwarzer Rahmen im Dotplot) und entweder FoxP3, CD127, CD152 (CTLA-4), oder CD28 durchflusszytometrisch analysiert (ungefüllte Histogramme). Die grau schraffierten Histogramme zeigen ungefärbte PBMC als Kontrolle. Positive und negative Zellen wurden anhand der Negativkontrolle unterschieden (gestrichelter Marker) und die Prozente an positiven Zellen sind angegeben. Ähnliche Expressionsmuster wurden in mindestens zwei weiteren Experimenten beobachtet.

CD45 ist eine Protein-Tyrosin-Phosphatase, die unter anderem die Antigenrezeptor-vermittelte Signaltransduktion in T-Zellen reguliert. Um einen ersten Eindruck der Konsequenzen der aberranten CD45RA-Expression bei C77G-Individuen auf die Signaltransduktion zu bekommen, wurde die Kinetik der Heraufregulation des frühen Aktivierungsmarkers CD69 nach TcR-Stimulation untersucht. Die CD69-Expression wurde auf „gegateten“ $CD4^+CD25^{high} T_{reg}$ analysiert (Abb. 4.7).

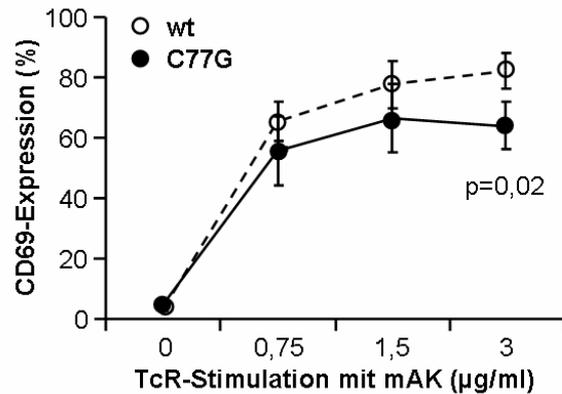


Abb. 4.7 CD69-Heraufregulation nach TcR-Stimulation.

PBMC von wt- und C77G-Individuen wurden für 3h mit verschiedenen Konzentrationen von immobilisiertem mAK BMA031 stimuliert. Die CD69-Expression wurde auf „gegateten“ CD4⁺CD25^{high} T_{reg} durchflusszytometrisch analysiert. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes von drei unabhängigen Experimenten dargestellt.

Es zeigte sich, dass ruhende C77G-T_{reg} mit ca. 4% CD69-positiven Zellen dieselbe initiale CD69-Expression wie ruhende wt-T_{reg} aufwiesen. Nach TcR-Stimulation zeigten die C77G-T_{reg} eine verminderte Heraufregulation der CD69-Expression verglichen mit wt-T_{reg}. Der deutlichste und auch zugleich signifikante Unterschied resultierte bei der höchsten Konzentration des stimulierenden Antikörpers. Während T_{reg} von wt-Individuen hier 82% CD69-positiv Zellen aufwiesen, waren es bei C77G-Individuen nur 64%. Diese Beobachtungen deuten auf eine verminderte TcR-vermittelte Signaltransduktion in C77G-T_{reg} hin.

4.2.2 Charakterisierung aktivierter $CD4^+CD25^{\text{high}}Foxp3^+$ T_{reg}

Ein Hindernis um weitere funktionelle Untersuchungen mit ruhenden T_{reg} durchzuführen, stellte die geringe Frequenz von T_{reg} bei gesunden Individuen dar. Die durchschnittliche Frequenz der T_{reg} lag sowohl bei wt- als auch bei C77G-Individuen bei ca. 1% (Abb. 4.8). Eine weitere Hürde war das Fehlen eines exklusiven Oberflächenmarkers, um die T_{reg} auch nach Aktivierung der Zellen zu identifizieren.

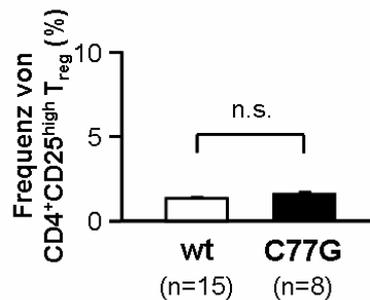


Abb. 4.8 Frequenz von T_{reg} bei wt- und C77G-Individuen.

Ruhende PBMC von wt- und C77G-Individuen wurden mittels einer Zweifarbanalyse auf ihre Expression von CD4 und CD25 durchflusszytometrisch analysiert. Die Daten sind als Prozent $CD4^+CD25^{\text{high}}$ Zellen \pm Standardfehler des Mittelwertes dargestellt.

Um beide Hindernisse zu überwinden, wurden die T_{reg} für alle weiteren Untersuchungen gefärbt, sortiert und expandiert. Zur Charakterisierung regulatorischer T-Zellen von wt- und C77G-Individuen wurde für diese Arbeit die Markerkombination $CD4^+CD25^{\text{high}}$ verwendet. Die Sortierung erfolgte über elektronische Zellsortierung, wobei im Durchschnitt 5×10^4 T_{reg} mit einer mittleren Reinheit von 95% erhalten wurden. Anschließend wurden die T_{reg} mit CD3/CD28-beladenen Beads in Kulturmedium mit hochdosiertem IL-2 expandiert, entsprechend der von Hoffmann et. al. etablierten *in vitro* Expansions-Methode für T_{reg} ⁶¹. Zunächst wurde versucht die Zellen über drei Wochen zu expandieren und an den angegebenen Tagen zu zählen (Abb. 4.9). Interessanterweise war es nicht möglich T_{reg} von C77G-Individuen länger als zwei bis drei Wochen zu expandieren, danach waren die Zellzahlen wieder rückläufig. T_{reg} von wt-Individuen konnten wesentlich länger expandiert werden.

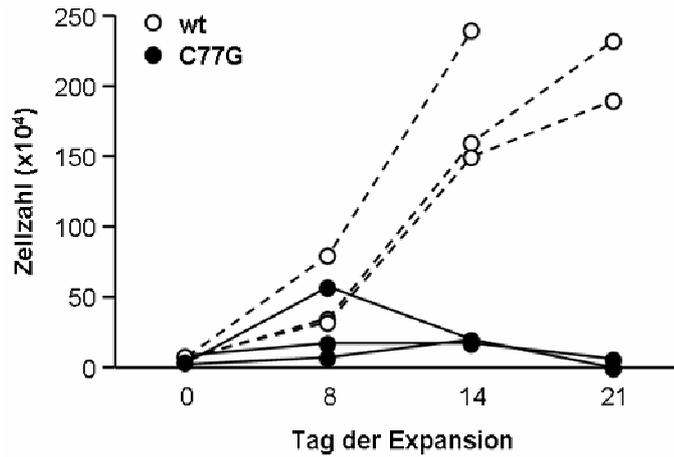


Abb. 4.9 *In vitro* Expansion von sortierten T_{reg}.

CD4⁺CD25^{high} T_{reg} von wt- und C77G-Individuen wurden wie in Abschnitt 3.2.5 beschrieben sortiert und expandiert. Zu den verschiedenen Zeitpunkten (Tag 0, 8, 14 und 21) wurde die absolute Zellzahl bestimmt.

Aufgrund dieser Beobachtungen wurden die Zellen für alle weiteren Experimente für zwei Wochen expandiert und direkt weiterverwendet. Die Zellen wurden jeweils am ersten Tag der Expansion, an Tag 9 und Tag 15 gezählt (Abb. 4.10).

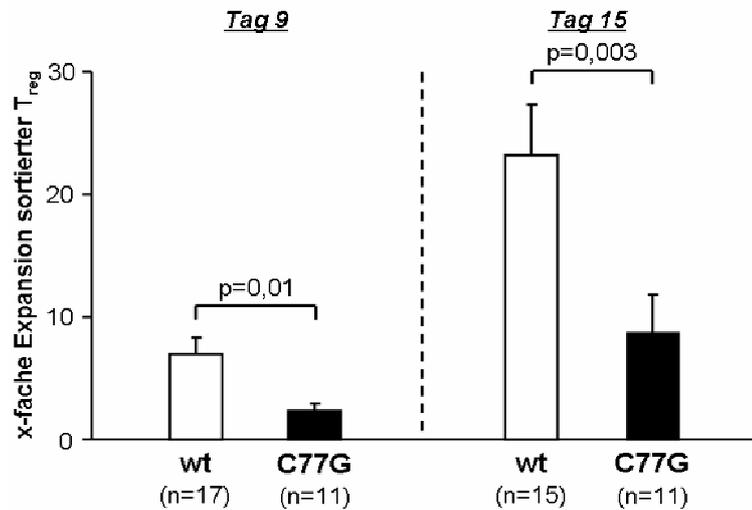


Abb. 4.10 *In vitro* Expansion von sortierten T_{reg}.

CD4⁺CD25^{high} T_{reg} von wt- und C77G-Individuen wurden wie in Abschnitt 3.2.5 beschrieben sortiert und expandiert. An Tag 0, 9 und 15 wurde jeweils die absolute Zellzahl bestimmt. Die Zellzahl wurde anschließend durch die Zellzahl der jeweiligen Startpopulation geteilt, um die x-fache Expansionsrate zu errechnen. Die Ergebnisse sind als x-fache Expansion ± Standardfehler des Mittelwertes von der angegebenen Zahl an Experimenten dargestellt.

T_{reg} von C77G-Individuen zeigten eine signifikant reduzierte Expansionsrate im Vergleich zu T_{reg} von wt-Individuen. An Tag 9 sowie an Tag 15 wurden Unterschiede im Umfang der Expression beobachtet. C77G-T_{reg} zeigten nur ein Drittel der

Expansionsrate, die bei wt- T_{reg} beobachtet wurde. Diese Beobachtung deutete auf eine verminderte Reaktivität der T_{reg} von C77G-Individuen hin.

Um die Möglichkeit auszuschließen, dass die T_{reg} von wt- und C77G-Individuen nach der Sortierung und Expansion unterschiedliche Zellpopulationen darstellen, wurden die Zellen phänotypisch charakterisiert. Humane T_{reg} sind nicht der einzige Zelltyp, der den Transkriptionsfaktor FoxP3 exprimiert, aber es ist trotz allem ein guter Marker um die Qualität der sortierten und expandierten T_{reg} zu evaluieren. Die intrazelluläre FoxP3-Expression von expandierten wt- und C77G- T_{reg} war vergleichbar, beide waren zu ca. 93% FoxP3-positiv (Abb. 4.11A). Auf mRNA-Ebene allerdings konnte ein Unterschied in der FoxP3-Expression gefunden werden. Die Menge an FoxP3-mRNA war in C77G- T_{reg} im Vergleich zu wt- T_{reg} etwa um das 2-fache erhöht (Abb. 4.11B).

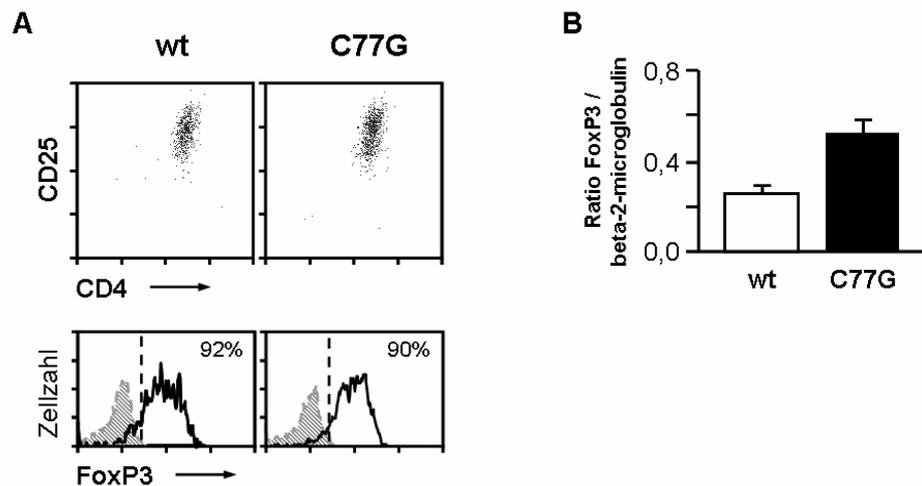


Abb. 4.11 FoxP3-Expression von sortierten und expandierten T_{reg} .

A Aktivierte $CD4^+CD25^{high}$ T_{reg} von wt- und C77G-Individuen wurden mittels einer Dreifarbanalyse auf ihre FoxP3-Expression durchflusszytometrisch analysiert (ungefüllte Histogramme). Die grau schraffierten Histogramme zeigen die Isotypkontrolle. Positive und negative Zellen wurden anhand der Negativkontrolle unterschieden (gestrichelter Marker) und die Prozente an positiven Zellen sind angegeben. Ähnliche Expressionsmuster wurden in mindestens zwei weiteren Experimenten beobachtet. **B** Die RNA von expandierten und stimulierten (2h mit 1:5 CD3/CD28-beads) $CD4^+CD25^{high}$ T_{reg} von wt- und C77G-Individuen wurde isoliert. Die Menge an FoxP3-mRNA wurde mittels RT-qPCR bestimmt. β -2-Microglobulin wurde als Housekeeping-Gen zur Normalisierung verwendet. Die Daten sind als mittlere relative Expression \pm Standardfehler des Mittelwertes von drei unabhängigen Experimenten dargestellt.

Das CD45-Expressionsmuster wurde auch auf aktivierten/expandierten T_{reg} -Zellen analysiert, und, wie bei ruhenden Zellen, konnte auch hier eine deutliche CD45RA-Überexpression festgestellt werden (Abb. 4.12). Während nur durchschnittlich 18% der wt- T_{reg} positiv für CD45RA waren, waren es bei C77G- T_{reg} nahezu alle Zellen. Der

deutliche Unterschied in der CD45R0-Expression zwischen wt- und C77G-Individuen auf ruhenden T_{reg} , konnte, wie schon bei den PBMC, bei aktivierten/expandieren T_{reg} nicht mehr gezeigt werden. Beide T_{reg} -Populationen waren zu circa 99% CD45R0-positiv. Auch für die CD45RB- und CD45RC-Expression konnten keine Unterschiede zwischen wt- und C77G- T_{reg} nachgewiesen werden. Für CD45RB waren jeweils 55-60%, für CD45RC jeweils circa 20% der Zellen positiv.

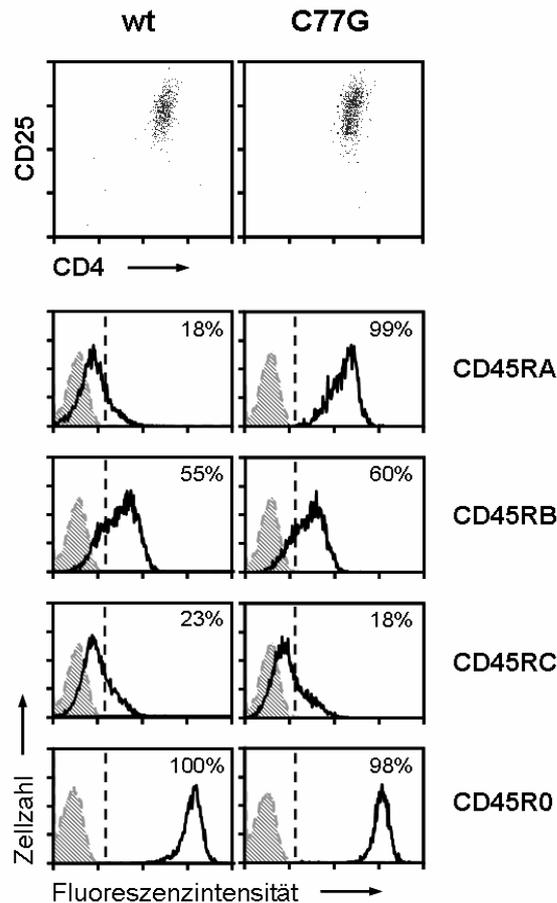


Abb. 4. 12 Expressionsmuster der CD45-Isoformen auf *in vitro* aktivierten T_{reg} .

$CD4^+CD25^{high}$ T_{reg} von wt- und C77G-Individuen wurden für die Untersuchung wie in Abschnitt 3.2.5 beschrieben aktiviert. Die aktivierten $CD4^+CD25^{high}$ T_{reg} wurden mittels mAks auf ihre Expression von CD45RA, CD45RB, CD45RC oder CD45R0 durchflusszytometrisch analysiert (ungefüllte Histogramme). Die grau schraffierten Histogramme zeigen ungefärbte T_{reg} als Kontrolle. Positive und negative Zellen wurden anhand der Negativkontrolle unterschieden (gestrichelter Marker) und die Prozente an positiven Zellen sind angegeben. Ähnliche Expressionsmuster wurden in mindestens zwei weiteren Experimenten beobachtet.

Beim Vergleich von ruhenden mit aktivierten T_{reg} (Abb. 4.5 und 4.12) wurde die Herunterregulation von CD45RA (MFI ruhend: wt 80 ± 18 , C77G 780 ± 91 ; MFI aktiviert: wt 20 ± 3 , C77G 200 ± 14) und CD45RC (MFI ruhend: wt 61 ± 6 , C77G 68 ± 39 ;

MFI aktiviert: wt 24 ± 3 , C77G 22 ± 2) sowie die Heraufregulation von CD45R0 (MFI ruhend: wt 706 ± 36 , C77G 279 ± 40 ; MFI aktiviert: wt 737 ± 150 , C77G 539 ± 117) deutlich, wobei die Herunterregulation von CD45RA bei C77G-Individuen nur in einer etwas schwächeren Expression resultierte, was wiederum Ausdruck des Vorliegens der Heterozygotie der C77G-Mutation ist.

Die durchflusszytometrischen Daten deuten darauf hin, dass es sich bei der zusätzlichen Isoform, die von den T_{reg} varianter Spender exprimiert wird, um die AB-Isoform handelt, da Exon C nach Aktivierung scheinbar normal gespleißt und herunterreguliert wird (Abb. 4.12). Diese Beobachtung sollte mittels einer RT-PCR-Analyse geprüft werden. Die Primer, die für diese PCR verwendet wurden, waren in Exon 2 und 7 lokalisiert, damit alle alternativ gespleißten Exons in den Produkten erhalten werden.

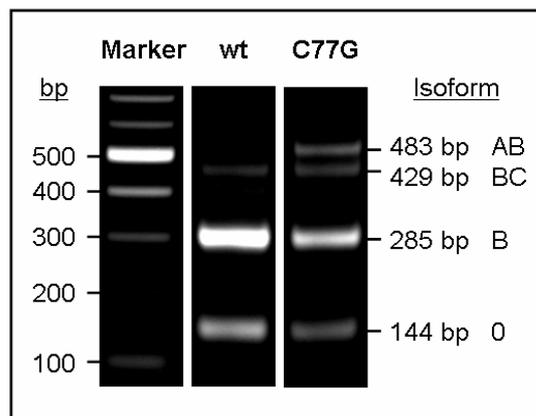


Abb. 4.13 mRNA-Expressionsmuster der CD45-Isoformen von *in vitro* expandierten T_{reg}.

Die RNA von expandierten und stimulierten (2h mit 1:5 CD3/CD28-beads) CD4⁺CD25^{high} T_{reg} von wt- und C77G-Individuen wurde isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die PCR-Primer waren in den Exons 2 und 7 lokalisiert, damit alle alternativ gespleißten Isoformen analysiert werden konnten. Ähnliche Expressionsmuster wurden in mindestens zwei weiteren Experimenten beobachtet.

Die Gelelektrophorese zeigte drei Banden (429bp, 285bp und 144bp) in den wt-T_{reg} für die CD45-Isoformen BC, B und 0 (Abb. 4.13). Für die C77G-T_{reg} wurde dasselbe Isoformenmuster erhalten, allerdings mit einer zusätzlichen Bande von 483bp. Um zu klären, um welche CD45-Isoform es sich bei der zusätzlichen Bande handelt, wurde diese sequenziert und konnte dadurch eindeutig als die AB-Isoform bestätigt werden (Abb. 4.14).

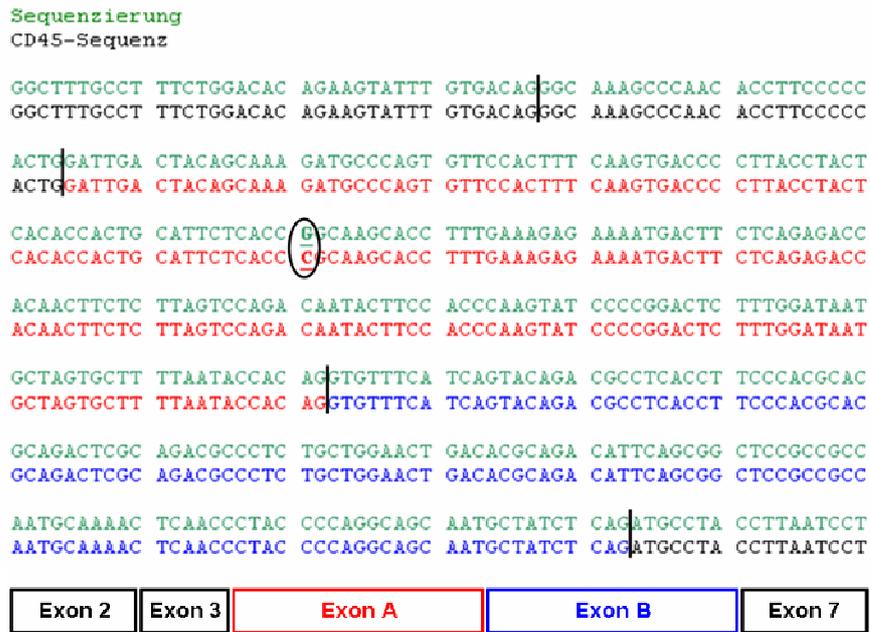


Abb. 4. 14 Sequenzierung der zusätzlichen Bande bei C77G-T_{reg}.

Das PCR-Produkt wurde aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt. Das aufgereinigte PCR-Produkt wurde von GATC Biotech sequenziert. Die senkrechten Striche innerhalb der Sequenz markieren die Exon-Grenzen. Unten ist eine schematische Abbildung der mRNA-Sequenz der AB-Isoform dargestellt. Die Markierung kennzeichnet die Mutation an Position 77 des Exon A.

Zusätzlich enthielt das PCR-Produkt die C77G-Mutation an Position 77 des Exon A, wobei allerdings neben einem Peak für G auch ein kleinerer Peak für C im Chromatogram vorlag. Diese Daten weisen darauf hin, dass die zusätzliche AB-Isoform auf C77G-T_{reg} hauptsächlich von dem Allel stammt, welches die Mutation trägt.

4.2.3 Analyse der Genexpressionsmuster aktivierter CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ T_{reg}

Es wird angenommen, dass humane regulatorische T-Zellen ihre Suppression unter anderem über suppressive Zytokine wie IL-10 und TGF-β vermitteln. Falls C77G-T_{reg} wie vermutet hyporeaktiv sein sollten, haben sie möglicherweise eine reduzierte Expression an suppressiven Zytokinen, weshalb die Zytokinproduktion von sortierten und expandierten wt- und C77G-T_{reg} auf mRNA-Ebene analysiert wurde.

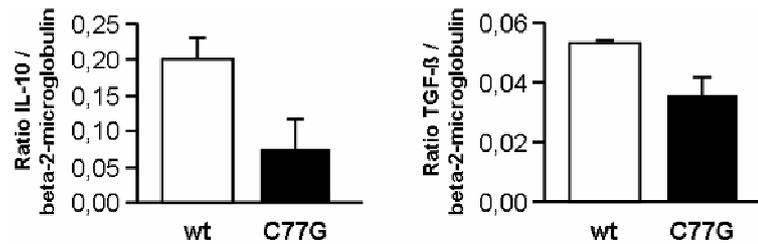


Abb. 4.15 IL-10 und TGF- β mRNA-Expression von *in vitro* expandierten T_{reg}.

Die RNA von expandierten und stimulierten (2h mit 1:5 CD3/CD28-beads) T_{reg} von wt- und C77G-Individuen wurde isoliert. Die Menge an IL-10- und TGF- β -Transkripten wurde mittels RT-qPCR bestimmt. β -2-Microglobulin wurde als Housekeeping-Gen zur Normalisierung verwendet. Die Daten sind als mittlere relative Expression \pm Standardfehler des Mittelwertes von drei unabhängigen Experimenten dargestellt.

Die Menge an IL-10- und TGF- β -Transkripten wurde mittels Realtime-PCR untersucht (Abb. 4.15). Die Menge an IL-10-mRNA war in C77G-T_{reg} im Vergleich zu wt-T_{reg} um das 2,7-fache reduziert. Auch bei TGF- β war eine Reduktion (1,5-fach) in C77G-T_{reg} verglichen zu wt-T_{reg} zu beobachten.

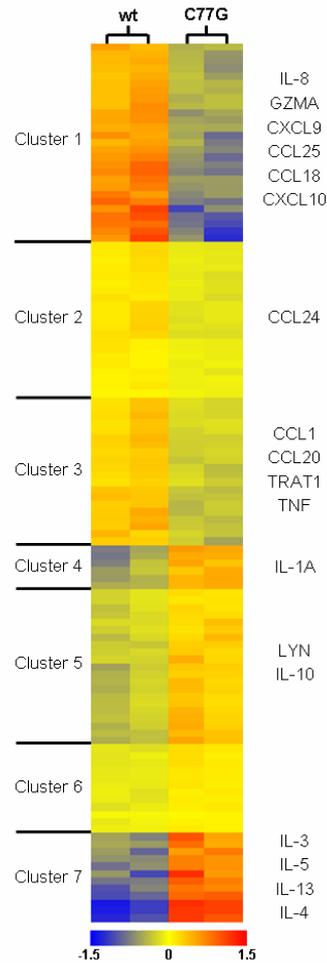


Abb. 4. 16 Genexpressionsprofil von wt- und C77G-T_{reg}.

Insgesamt konnten 3650 unterschiedlich exprimierte Gene beim Vergleich von wt- und C77G-Individuen in *in vitro* expandierten T_{reg} identifiziert werden (ungepaarter t-Test, p-Wert ≤ 0,05). Von diesen 3650 Genen wurden die 79 dargestellten Gene in Übereinstimmung mit einer GeneOntology-Analyse mit dem Begriff „Immunreaktion“ assoziiert. Die Expressionsdaten werden als hierarchische Cluster-Abbildung mit relativen Werten zur durchschnittlichen Genexpression (zentralisierter Mittelwert) präsentiert: eine blaue Färbung zeigt eine Genexpression unter dem Mittelwert an, eine rote Färbung zeigt eine Genexpression über dem Mittelwert an. Besonders interessante Gene sind an der rechten Seite dargestellt.

Um die Unterschiede zwischen wt- und C77G-T_{reg} weiter zu charakterisieren, wurde eine umfassende Genexpressions-Analyse durchgeführt. Die T_{reg} von wt- und C77G-Individuen wurden sortiert und für 13 Tage mit CD3/CD28-beads und IL-2 stimuliert. Für weitere zwei Tage wurden die Zellen ohne Stimulus kultiviert, um dann mit CD3/CD28-beads für 2h restimuliert zu werden. Aus diesen Zellen wurde die RNA extrahiert, „gepoolt“ (RNA von jeweils drei wt-Individuen beziehungsweise drei C77G-Individuen) und die „Pools“ jeweils zweimal mit einem Agilent Custom Gene Expression Microarray 4x44K analysiert. Insgesamt konnten 3650 unterschiedlich exprimierte Gene beim Vergleich von wt- und C77G-Individuen in *in vitro* expandierten

T_{reg} identifiziert werden (ungepaarter t-Test, p-Wert ≤ 0,05). Von diesen 3650 Genen wurden die 79 dargestellten Gene in Übereinstimmung mit einer GeneOntology-Analyse mit dem Begriff „Immunreaktion“ assoziiert (Abb. 4.16).

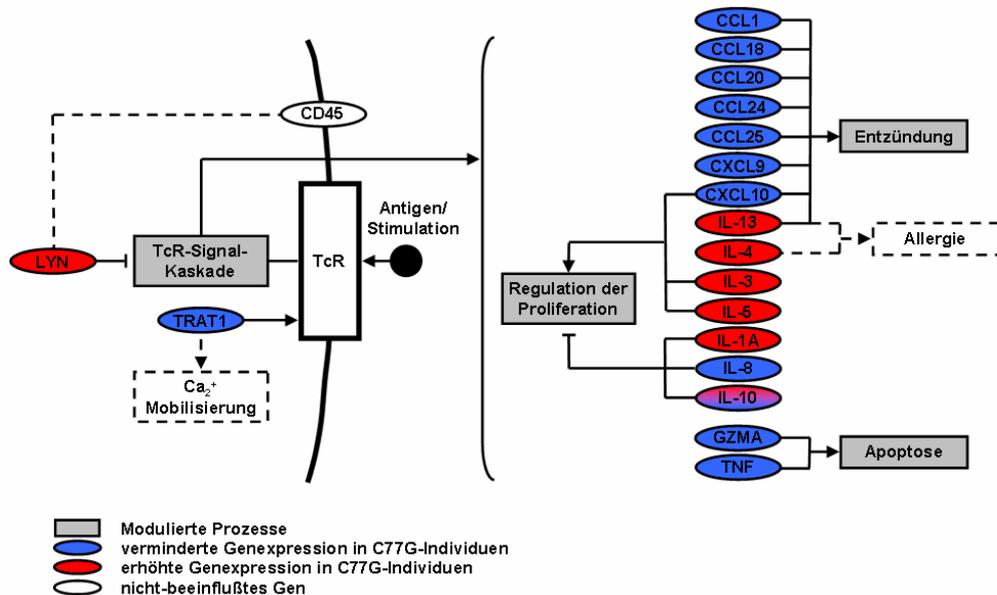


Abb. 4.17 Signalweg-Module in humanen T_{reg}.

Schematische Darstellung von möglichen Signalweg-Modulen (grau), die in C77G-T_{reg} anders reguliert sind. Eine verminderte Genexpression bei C77G-T_{reg} im Vergleich zu wt-T_{reg} ist mit blauen Symbolen markiert, während eine erhöhte Genexpression mit roten Symbolen markiert ist. Ungefüllte Symbole stellen entweder nicht beeinflusste Gene oder vermutete weitere Signalweg-Module dar.

Die weitere Analyse dieser 79 Gene mittels zweier Signalweg-Datenbanken (KEGG und GenMapp) ergab eine Assoziation mit vier Signalweg-Modulen: die TcR-Signal-Kaskade, die Regulation der Proliferation, die Entzündung und die Apoptose (Abb. 4.17). Die TcR-Signal-Kaskade selbst scheint weniger beeinflusst zu sein, aber am Ende der Kaskade sind einige Gene von regulierenden Molekülen wie beispielsweise IL-4, IL-5 und TNF verschieden exprimiert, die mit den drei übrigen Signalwegen assoziiert waren. Darunter befanden sich einige erhöht und einige vermindert exprimierte Gene, welche in der Lage sind, die Proliferation entweder positiv oder negativ zu regulieren (z.B. IL-3, IL-5, IL-10). Beim Entzündungs-Modul zeigten die meisten Gene eine verminderte Expression in C77G-Individuen, was man als Hyporeaktivität dieser Zellen interpretieren könnte. Granzym A (GZMA) und Tumornekrosefaktor (TNF) zeigten ebenfalls geringere Expressionslevel in C77G-Individuen, was einen negativen Effekt auf die Vermittlung der Apoptose haben könnte.

4.2.4 Analyse der suppressiven Kapazität aktivierter $CD4^+CD25^{high}Foxp3^+$ T_{reg}

Die reduzierte TcR-vermittelte Signaltransduktion, die verminderte Expansionsrate und die verminderte Zytokinproduktion von $C77G-T_{reg}$ unterstützen die Hypothese, dass die erhöhte CD45RA-Expression einen eher hyporeaktiven Phänotyp in $C77G-T_{reg}$ hervorruft. Dies könnte bedeuten, dass die Fähigkeit zur Suppression von $CD4^+$ T-Zellen in T_{reg} von $C77G$ -Individuen ebenfalls vermindert sein könnte. Um die suppressorische Kapazität der *in vitro* expandierten T_{reg} zu analysieren, wurden $CD4^+$ T-Zellen mit CD3/CD28-beads allein oder in Anwesenheit von expandierten T_{reg} stimuliert (Abb. 4.18).

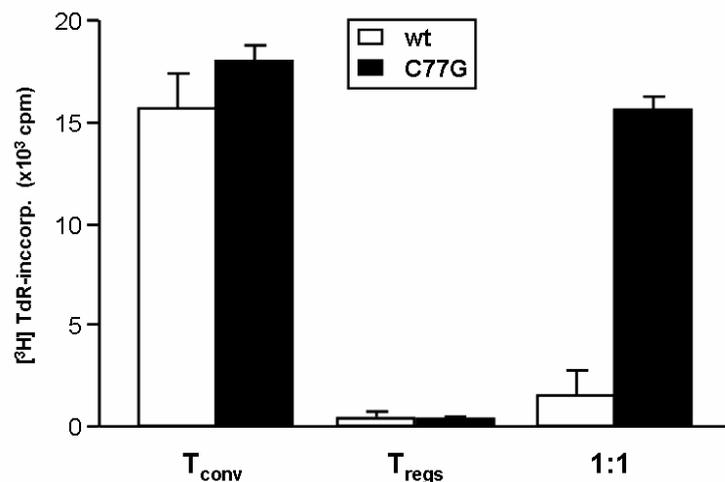


Abb. 4.18 Suppressorisches Potenzial von *in vitro* expandierten T_{reg} mit wt- oder $C77G$ -CD45.

Dargestellt ist ein Einzelexperiment mit sortierten und *in vitro* expandierten $CD4^+CD25^{high} T_{reg}$ sowie frisch isolierten $CD4^+$ T-Zellen je eines wt- und eines $C77G$ -Individuums. $CD4^+$ T-Zellen und T_{reg} wurden alleine (1×10^4 Zellen/well) oder zusammen in Kulturen mit CD3/CD28-beads (1:5) für fünf Tage stimuliert. Die Proliferation wurde anhand des [³H]-TdR-Einbaus während der letzten 16h gemessen.

$CD4^+$ T-Zellen des wt- und des $C77G$ -Individuums zeigten eine starke Proliferation auf den CD3/CD28-Stimulus, wogegen die zugehörigen T_{reg} nicht proliferierten (Abb. 4.18). Wenn die $CD4^+$ T-Zellen in Anwesenheit von T_{reg} stimuliert wurden, war die proliferative Antwort der wt-Zellen wie erwartet merklich reduziert. Im Gegensatz dazu zeigten die T_{reg} des $C77G$ -Individuums nur eine schwache bzw. keine suppressive Aktivität.

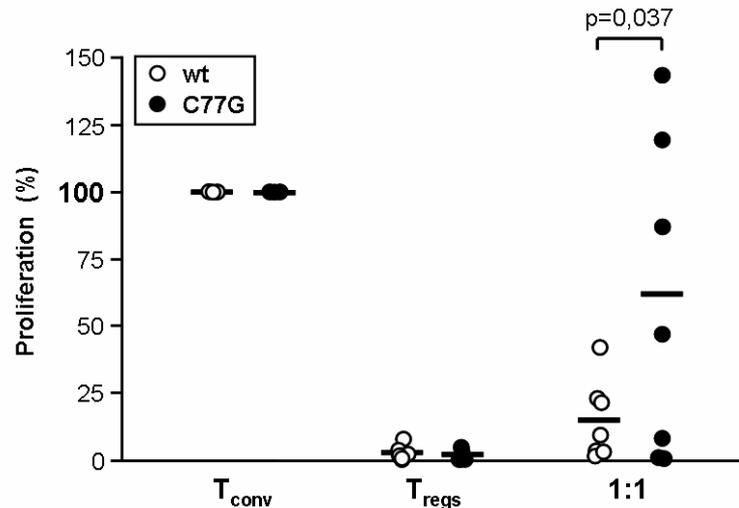


Abb. 4.19 Suppressorisches Potenzial von *in vitro* expandierten T_{reg} mit wt- oder C77G-CD45.

Die Daten stellen sieben unabhängige Experimente mit wt-Zellen und sieben unabhängige Experimente mit C77G-Zellen dar. Sortierte und *in vitro* expandierte T_{reg} sowie frisch isolierte CD4⁺ T-Zellen wurden alleine (1×10^4 Zellen/well) oder zusammen in Kokulturen mit CD3/CD28-beads (1:5) für fünf Tage stimuliert. Die Proliferation wurde anhand des [³H]-TdR-Einbaus während der letzten 16h gemessen. Die Ergebnisse für die T_{reg} und die 1:1-Kokulturen sind in Bezug zur Proliferation der CD4⁺ T-Zellen dargestellt, welche auf 100% gesetzt wurde. Die horizontalen Balken zeigen jeweils den Mittelwert für die verschiedenen Gruppen.

Um zu untersuchen, ob die verminderte Suppression ein generelles Merkmal von CD45RA-überexprimierenden T_{reg} ist, wurden weitere Experimente mit Zellen von insgesamt je sieben unterschiedlichen wt- und C77G-Individuen durchgeführt. Die wt-T_{reg} supprimierten die Proliferation von CD4⁺ T-Zellen im Mittel um 85% (Abb. 4.19). Die T_{reg} von C77G-Individuen zeigten von starker Suppression über keine Suppression bis hin zu einer Steigerung der Proliferation der CD4⁺ T-Zellen insgesamt eine große Variabilität in ihrer suppressiven Kapazität. Im Mittel supprimierten die C77G-T_{reg} die Proliferation der CD4⁺ T-Zellen nur zu 40%. T_{reg} von C77G-Individuen scheinen somit eine verminderte Kapazität zur Suppression von CD4⁺ T-Zellen aufzuweisen.

4.3 Phänotypische und funktionelle Konsequenzen der C77G-Mutation bei CD8⁺ T-Zellen

Für die Untersuchung der eventuell vorhandenen phänotypischen und funktionellen Unterschiede zwischen CD8⁺ T-Zellen von wt- und C77G-Individuen wurden zunächst die Expressionsmuster der verschiedenen CD45-Isoformen und von CD8⁺ T-Zell-spezifischen Molekülen verglichen. Weitere Untersuchungen zielten auf die Darstellung

zellulärer Funktionen nach TcR-vermittelter Stimulation wie der Proliferation und der zytolytischen Kapazität der CD8⁺ T-Zellen ab.

4.3.1 Charakterisierung ruhender CD8⁺ T-Zellen

Die phänotypischen Auswirkungen der C77G-Mutation auf CD8⁺ T-Zellen wurden mit durchflusszytometrischen Verfahren untersucht. In der CD45RA-Expression wurde ein signifikanter, wenn auch weniger stark ausgeprägter Unterschied als bei PBMC und T_{reg} zwischen ruhenden CD8⁺ T-Zellen von wt- und C77G-Individuen beobachtet.

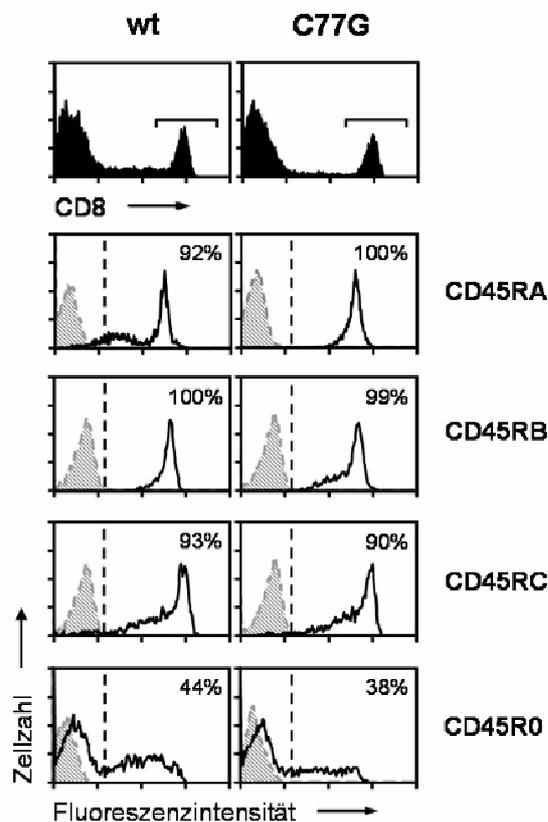


Abb. 4. 20 Expressionsmuster der CD45-Isoformen auf ruhenden CD8⁺ T-Zellen.

Ruhende PBMC von wt- und C77G-Individuen wurden mittels einer Zweifarbanalyse auf ihre Expression von CD8 (schwarze Histogramme) und entweder CD45RA, CD45RB, CD45RC oder CD45R0 durchflusszytometrisch analysiert (ungefüllte Histogramme). Die grau schraffierten Histogramme zeigen ungefärbte PBMC als Kontrolle. Positive und negative Zellen wurden anhand der Negativkontrolle unterschieden (gestrichelter Marker) und die Prozente an positiven Zellen sind angegeben. Ähnliche Expressionsmuster wurden in mindestens zwei weiteren Experimenten beobachtet.

Nahezu alle CD8⁺ T-Zellen von wt- und C77G-Individuen waren CD45RA-positiv, wobei es bei wt-Individuen neben einer stark positiven auch eine kleinere, schwach

positive CD45RA-Population gab, die bei C77G-Individuen nicht auftrat (Abb. 4.20). In der CD45R0-Expression konnte für ruhende CD8⁺ T-Zellen, anders als bei PBMC und T_{reg}, kein Unterschied zwischen wt- und C77G-Individuen festgestellt werden. Sowohl wt- als auch C77G-CD8⁺ T-Zellen waren zu circa 40% CD45R0-positiv. In der CD45RB- und CD45RC-Expression konnten ebenfalls keine Unterschiede zwischen CD8⁺ T-Zellen von wt- und C77G-Individuen festgestellt werden. Die Zellen waren nahezu alle CD45RB-positiv und durchschnittlich zu 90% CD45RC-positiv.

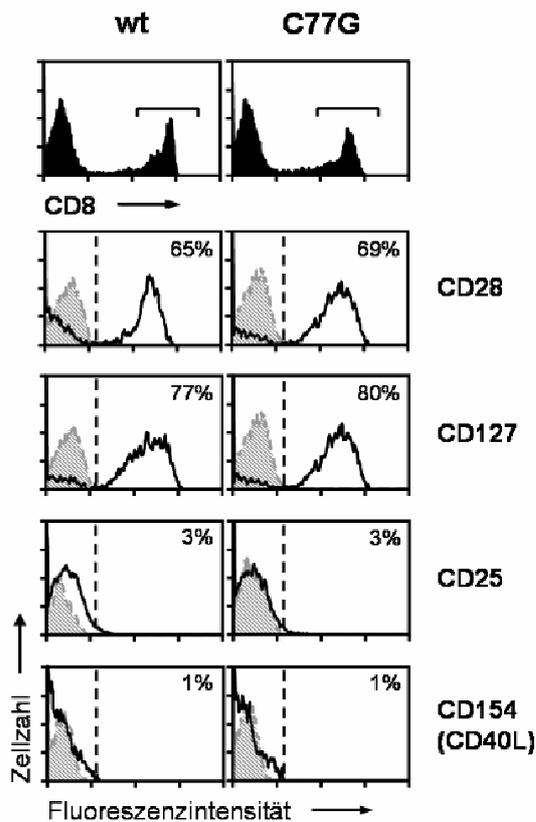


Abb. 4. 21 Expressionsmuster CD8⁺ T-Zell-spezifischer Moleküle.

Ruhende PBMC von wt- und C77G-Individuen wurden mittels einer Zweifarbanalyse auf ihre Expression von CD8 (schwarze Histogramme) und entweder CD28, CD127, CD25 oder CD154 (CD40L) durchflusszytometrisch analysiert (ungefüllte Histogramme). Die grau schraffierten Histogramme zeigen ungefärbte PBMC als Kontrolle. Positive und negative Zellen wurden anhand der Negativkontrolle unterschieden (gestrichelter Marker) und die Prozente an positiven Zellen sind angegeben. Ähnliche Expressionsmuster wurden in mindestens zwei weiteren Experimenten beobachtet.

Zur weiteren phänotypischen Charakterisierung wurden die CD8⁺ T-Zell-spezifischen Moleküle CD28, CD127, CD25 und CD40L durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 4.21). Auch hier wurden sowohl bei wt- als auch bei C77G-Individuen die erwarteten Expressionsmuster gefunden. Sowohl wt- und C77G-CD8⁺ T-Zellen waren größtenteils

positiv für CD28 und CD127 und negativ für CD25 und CD40L. Es wurden keine phänotypischen Unterschiede zwischen wt- und C77G-CD8⁺ T-Zellen beobachtet.

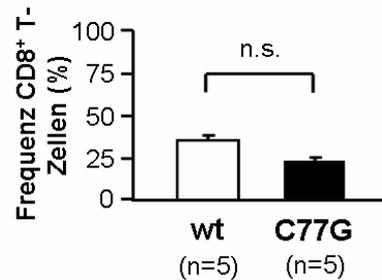


Abb. 4. 22 Frequenz von CD8⁺ T-Zellen bei wt- und C77G-Individuen.

Ruhende PBMC von wt- und C77G-Individuen wurden mittels einer Einfarbanalyse auf ihre Expression von CD8 durchflusszytometrisch analysiert. Die Daten sind als Prozent CD8⁺ Zellen ± Standardfehler des Mittelwertes dargestellt.

Auch der Anteil an CD8⁺ T-Zellen an den PBMC war nicht verschieden beim Vergleich von wt- und C77G-CD8⁺ T-Zellen. Die durchschnittliche Frequenz CD8⁺ T-Zellen lag sowohl für wt- als auch bei C77G-Individuen bei circa 27% (Abb. 4.22). Insgesamt scheint die variante CD45RA-Expression in ruhenden CD8⁺ T-Zellen keine Auswirkungen zu haben.

4.3.2 Charakterisierung aktivierter CD8⁺ T-Zellen

CD4⁺ T-Zellen von C77G-Individuen zeigen nach allogener Stimulation eine erhöhte Proliferationsrate im Vergleich zu CD4⁺ T-Zellen von wt-Individuen⁶². Um das Proliferationsverhalten von CD8⁺ T-Zellen von wt- und C77G-Individuen vergleichen zu können, wurden die Zellen sortiert, mit PHA und IL-2 für eine Woche kultiviert und jeweils beim Start der Kultivierung und an Tag 7 gezählt (Abb. 4.23). Es konnten keine Unterschiede bei der Expansion von CD8⁺ T-Zellen von wt- und C77G-Individuen festgestellt werden.

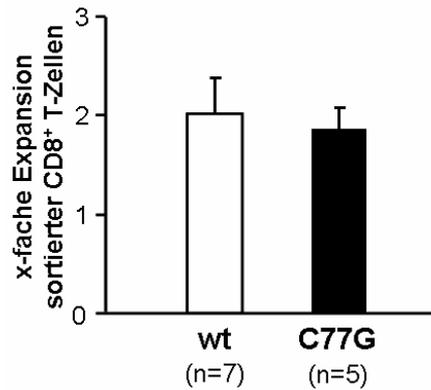


Abb. 4. 23 *In vitro* Expansion von sortierten CD8⁺ T-Zellen.

CD8⁺ T-Zellen von wt- und C77G-Individuen wurden wie in Abschnitt 3.2.6 beschrieben sortiert und expandiert. An Tag 0 und Tag 7 wurde jeweils die absolute Zellzahl bestimmt. Die Zellzahl wurde anschließend durch die Zellzahl der jeweiligen Startpopulation geteilt um die x-fache Expansionsrate zu errechnen. Die Ergebnisse sind als x-fache Expansion ± Standardfehler des Mittelwertes von der angegebenen Zahl an Experimenten dargestellt.

Das CD45-Expressionsmuster wurde auch auf aktivierten/expandierten CD8⁺ T-Zellen analysiert. Es konnte eine deutliche CD45RA-Überexpression festgestellt werden. Während im Mittel nur 54% der wt-CD8⁺ T-Zellen positiv für CD45RA waren, waren alle C77G-CD8⁺ T-Zellen CD45RA-positiv (Abb. 4.24). Für die CD45RB-, CD45RC- und CD45R0-Expression konnten keine Unterschiede zwischen wt- und C77G-CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen werden. Für CD45RB waren durchschnittlich jeweils 100%, für CD45RC 60-70% und für CD45R0 80-90% der Zellen positiv. Auch hier resultierte beim Vergleich von aktivierten mit ruhenden CD8⁺ T-Zellen (Abb. 4.20 und 4.24) eine Aktivierung in einer Herunterregulation von CD45RA (MFI ruhend: wt 190±12, C77G 359±21 ; MFI aktiviert: wt 41±10 , C77G 236±17) und CD45RC (MFI ruhend: wt 503±27, C77G 468±49 ; MFI aktiviert: wt 224±89, C77G 188±19) sowie in einer Heraufregulation von CD45R0 (MFI ruhend: wt 130±36, C77G 85±32 ; MFI aktiviert: wt 137±33, C77G 117±29), wobei die Herunterregulation von CD45RA bei C77G-Individuen wie schon bei den T_{reg} nur zu einer etwas schwächeren Expression führte.

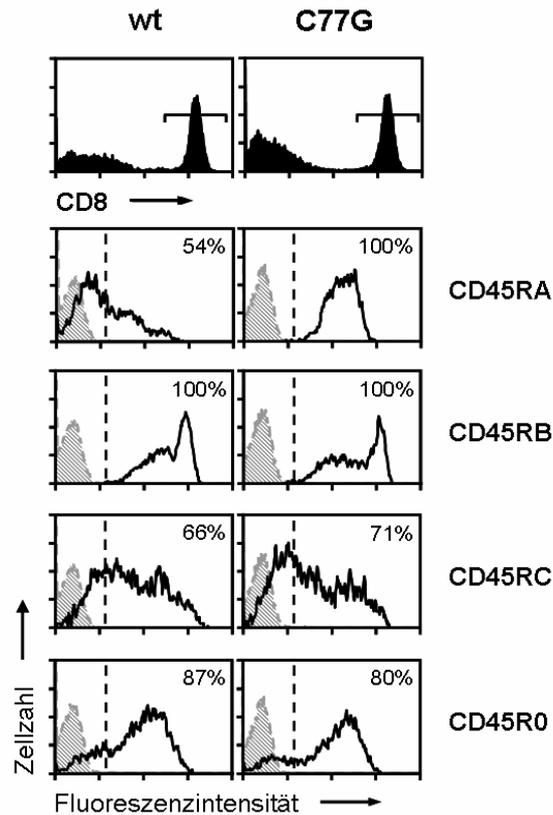


Abb. 4. 24 Expressionsmuster der CD45-Isoformen auf *in vitro* aktivierten CD8⁺ T-Zellen.

PBMC von wt- und C77G-Individuen wurden für die Untersuchung für 24h mit PHA aktiviert und anschließend für sechs Tage mit 25U/ml IL-2 kultiviert. Die Zellen wurden mittels einer Zweifarbanalyse auf ihre Expression von CD8 (schwarze Histogramme) und entweder CD45RA, CD45RB, CD45RC oder CD45R0 durchflusszytometrisch analysiert (ungefüllte Histogramme). Die grau schraffierten Histogramme zeigen ungefärbte PBMC als Kontrolle. Positive und negative Zellen wurden anhand der Negativkontrolle unterschieden (gestrichelter Marker) und die Prozente an positiven Zellen sind angegeben. Ähnliche Expressionsmuster wurden in mindestens zwei weiteren Experimenten beobachtet.

Aufgrund der durchflusszytometrischen Analysen lässt sich keine Aussage treffen, um welche Exon A enthaltende Isoform es sich handelt, die von den stark CD45RA-positiven CD8⁺ T-Zellen varianter Spender vermehrt exprimiert wird. Es könnte sich sowohl um die ABC-Isoform als auch um die AB-Isoform handeln, da Exon A und Exon C nach Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen nicht vollständig herunterreguliert wurden. Deshalb sollte mittels einer RT-PCR-Analyse untersucht werden, welche Isoform für die erhöhte CD45RA-Expression verantwortlich ist. Die Primer, die für diese PCR verwendet wurden, waren in Exon 2 und 7 lokalisiert, damit alle alternativ gespleißten Exons in den Produkten enthalten sind.

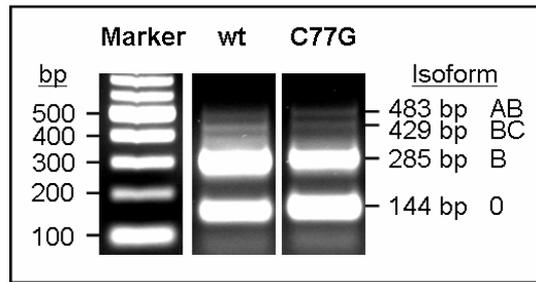


Abb. 4. 25 mRNA-Expressionsmuster der CD45-Isoformen von sortierten und *in vitro* aktivierten CD8⁺ T-Zellen.

Die RNA von sortierten und stimulierten CD8⁺ T-Zellen (siehe Abschnitt 3.2.6) von wt- und C77G-Individuen wurde isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die PCR-Primer binden in den Exons 2 und 7, damit alle alternativ gespleißten Isoformen analysiert werden konnten.

Die Gelelektrophorese zeigt vier Banden in den wt-CD8⁺ T-Zellen für die Isoformen CD45(AB) (483bp), CD45(BC) (429bp), CD45(B) (285bp) und CD45(0) (144bp) (Abb. 4.25). Für die C77G-CD8⁺ T-Zellen wurde dasselbe Isoformenmuster erhalten. Die ABC-Isoform (627bp) wurde in aktivierten wt- und C77G-CD8⁺ T-Zellen nicht exprimiert. Somit scheint die AB-Isoform auch bei CD8⁺ T-Zellen von C77G-Individuen für die verstärkte CD45RA-Expression verantwortlich zu sein.

4.3.3 Zytolytische Kapazität

CD8⁺ T-Zellen werden auch als zytotoxische T-Zellen bezeichnet und können infizierte Zellen durch Apoptose eliminieren. Werden reife zytotoxische T-Zellen durch die Bindung an ein MHC-I-Protein, welches ihr spezifisches Fremd-Antigen präsentiert, aktiviert, so schütten sie Perforine und Granzyme aus, welche die MHC-I-tragende Zelle in den programmierten Zelltod treiben. Die zytolytischen Eigenschaften von wt- und C77G-CD8⁺-T-Zellen sollten nach einer polyklonalen Aktivierung über den TcR mittels einer CD107a-Analyse verglichen werden. Die CD107a-Expression auf der Zelloberfläche wird nach Stimulation von zytotoxischen Zellen stark heraufreguliert und korreliert sowohl mit der Zytokinsekretion als auch mit der Zell-vermittelten Lyse von Zielzellen. Deshalb kann CD107a als Marker für die Degranulation dieser Zellen verwendet werden.

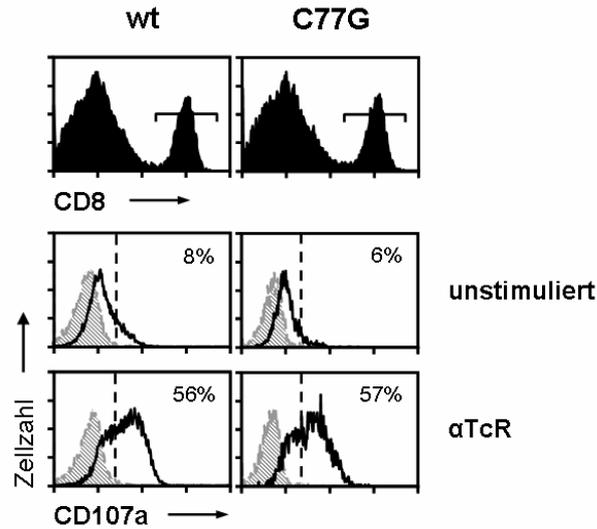


Abb. 4. 26 CD107a-Assay mit CD8⁺ T-Zellen.

PBMC von wt- und C77G-Individuen wurden für drei Tage im Brutschrank mit 1µl/ml PHA voraktiviert. 2×10^5 Zellen/ml der voraktivierten PBMC wurden mit 2µg/ml BMA031 für 4h im Brutschrank inkubiert und anschließend mittels einer Zweifarbanalyse auf die Expression von CD8 (Histgramme oben) und CD107a durchflusszytometrisch analysiert (ungefüllte Histgramme). Die grau schattierten Histgramme zeigen die Isotypkontrolle. Positive und negative Zellen wurden anhand der Isotypkontrolle unterschieden (gestrichelter Marker) und die Prozente an positiven Zellen sind angegeben. Ähnliche Expressionsmuster wurden in mindestens zwei weiteren Experimenten beobachtet.

In Abbildung 4.26 ist beispielhaft das Ergebnis eines CD107a-Assays mit voraktivierten CD8⁺ T-Zellen graphisch dargestellt. Man kann sehen, dass ein kleiner Anteil an CD8⁺ T-Zellen auch ohne Stimulation über den TcR CD107a-positiv ist. Nach Stimulation über den TcR nimmt die CD107a-Expression allerdings wie erwartet stark zu.

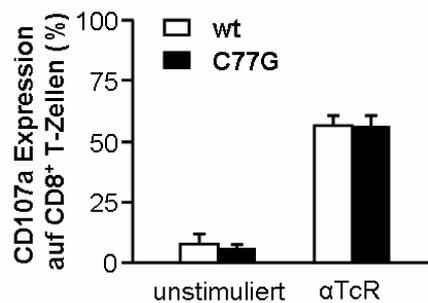


Abb. 4. 27 CD107a-Assay mit CD8⁺ T-Zellen.

PBMC von wt- und C77G-Individuen wurden für drei Tage im Brutschrank mit 1µl/ml PHA voraktiviert. 2×10^5 Zellen/ml voraktivierte PBMC wurden mit 2µg/ml BMA031 für 4h im Brutschrank stimuliert und anschließend mittels einer Zweifarbanalyse auf die Expression von CD8 und CD107a durchflusszytometrisch untersucht. Die Daten sind als prozentuale CD107a-Expression auf CD8⁺ T-Zellen ± Standardfehler des Mittelwertes von mindestens drei Experimenten dargestellt.

Beim Vergleich der CD107a-Expression von wt- und C77G-Individuen zeigten sich sowohl bei unstimulierten als auch bei TcR-stimulierten CD8⁺ T-Zellen keine Unterschiede (Abb. 4.27). Unstimulierte CD8⁺ T-Zellen exprimierten bei beiden ca. 7% CD107a und nach TcR-Stimulation ließ sich die Expression auf ca. 60% CD107a-positive Zellen erhöhen. Diese Daten weisen darauf hin, dass ein variantes CD45-Expressionsmuster keinen Einfluss auf die durch TcR-Stimulation ausgelöste Degranulierung von CD8⁺ T-Zellen zu haben scheint.

4.4 Phänotypische und funktionelle Konsequenzen der C77G-Mutation bei CD56⁺CD3⁻ NK-Zellen

Für die Untersuchung der möglicherweise vorhandenen phänotypischen und funktionellen Unterschiede zwischen CD56⁺CD3⁻ NK-Zellen von wt- und C77G-Individuen wurden wiederum die Expressionsmuster der verschiedenen CD45-Isoformen und von CD56⁺CD3⁻ NK-Zell-spezifischen Molekülen verglichen. Weitere Untersuchungen fokussierten wie auch bei CD8⁺ T-Zellen auf die Darstellung zellulärer Funktionen nach TcR-vermittelter Stimulation wie der Proliferation und der zytolytischen Kapazität der CD56⁺CD3⁻ NK-Zellen.

4.4.1 Charakterisierung ruhender NK-Zellen

Die phänotypischen Auswirkungen der C77G-Mutation auf CD56⁺CD3⁻ NK-Zellen wurden mit den Verfahren der Durchflusszytometrie untersucht. Allerdings wurde anders als bei den schon untersuchten Populationen kein deutlicher Unterschied in der CD45RA-Expression zwischen ruhenden NK-Zellen von wt- und C77G-Individuen beobachtet. Die NK-Zellen sowohl von wt-Individuen als auch von C77G-Individuen waren zu nahezu 100% CD45RA-positiv (Abb. 4.28).

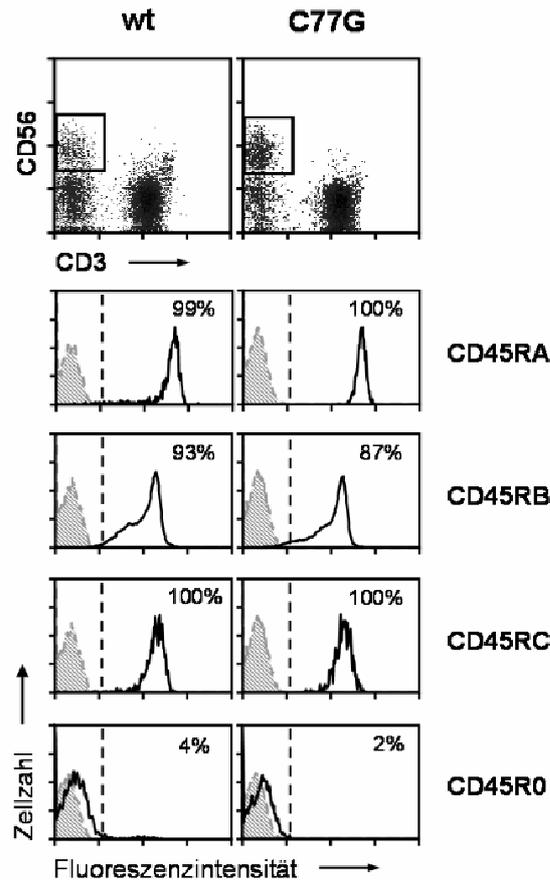


Abb. 4. 28 Expressionsmuster der CD45-Isoformen auf ruhenden CD56⁺CD3⁻ NK-Zellen.

Ruhende PBMC von wt- und C77G-Individuen wurden mittels einer Dreifarbanalyse auf ihre Expression von CD56/CD3 (schwarzer Rahmen im Dotplot) und entweder CD45RA, CD45RB, CD45RC oder CD45R0 durchflusszytometrisch analysiert (ungefüllte Histogramme). Die grau schattierten Histogramme zeigen ungefärbte PBMC als Kontrolle. Positive und negative Zellen wurden anhand der Negativkontrolle unterschieden (gestrichelter Marker) und die Prozente an positiven Zellen sind angegeben. Ähnliche Expressionsmuster wurden in mindestens zwei weiteren Experimenten beobachtet.

Nur circa 2-4% der NK-Zellen von wt- und C77G-Individuen zeigten im ruhenden Zustand eine CD45R0-Expression. Auch hinsichtlich der CD45RB und CD45RC-Expression wurden keine Unterschiede zwischen wt- und C77G-Individuen beobachtet. CD45RB wurde auf ungefähr 90% und CD45RC auf allen Zellen exprimiert.

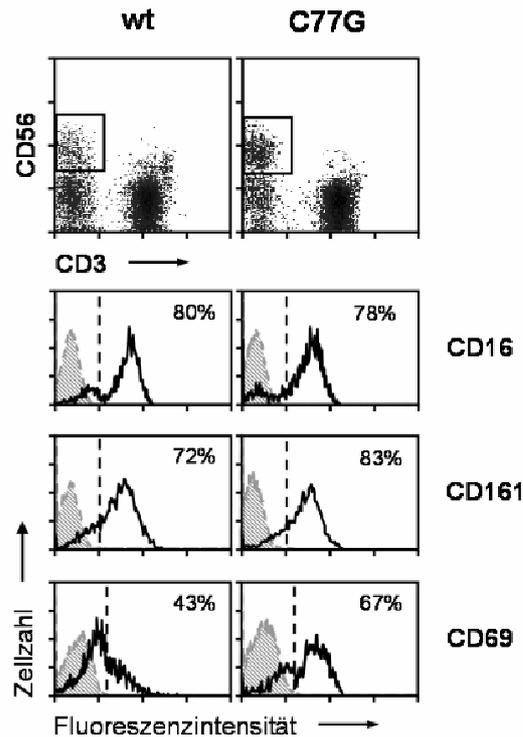


Abb. 4. 29 Expressionsmuster NK-Zell-spezifischer Moleküle.

Ruhende PBMC von wt- und C77G-Individuen wurden mittels einer Dreifarbanalyse auf ihre Expression von CD56 und CD3 (schwarzer Rahmen im Dotplot) und entweder CD16, CD161 und CD69 durchflusszytometrisch analysiert (ungefüllte Histogramme). Die grau schraffierten Histogramme zeigen ungefärbte PBMC als Kontrolle. Positive und negative Zellen wurden anhand der Negativkontrolle unterschieden (gestrichelter Marker) und die Prozente an positiven Zellen sind angegeben. Ähnliche Expressionsmuster wurden in mindestens zwei weiteren Experimenten beobachtet.

Die Expression der NK-Zell-spezifischen Moleküle CD16 und CD161 zeigten ebenfalls die erwarteten Muster. Sowohl wt- als auch C77G-NK-Zellen waren CD16- und CD161-positiv, und es konnten keine Unterschiede zwischen wt- und C77G-Individuen beobachtet werden (Abb. 4.29).

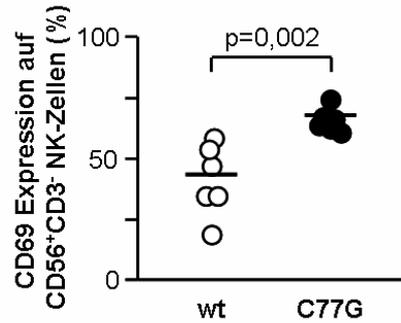


Abb. 4.30 CD69-Expression auf ruhenden NK-Zellen.

PBMC von wt- und C77G-Individuen wurden mittels einer Dreifarbanalyse auf ihre Expression von CD56, CD3 und CD69 durchflusszytometrisch analysiert. Die Daten sind als Prozent CD69-positiver Zellen der CD56⁺CD3⁻ NK-Zellen dargestellt, wobei der waagerechte Strich dem Mittelwert entspricht.

Der Aktivierungsmarker CD69 wurde allerdings von C77G-NK-Zellen verglichen mit wt-NK-Zellen auf signifikant mehr Zellen exprimiert (Abb. 4.29 und 4.30). NK-Zellen von wt-Individuen waren zu ca. 40% CD69-positiv, während bei C77G-Individuen ca. 70% CD69-positive NK-Zellen gefunden wurden. Dies deutet auf einen erhöhten Aktivierungsstatus der C77G-NK-Zellen hin.

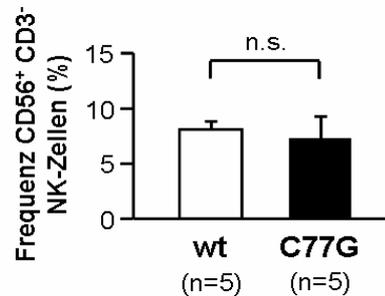


Abb. 4.31 Frequenz von NK-Zellen bei wt- und C77G-Individuen.

Ruhende PBMC von wt- und C77G-Individuen wurden mittels einer Zweifarbanalyse auf ihre Expression von CD56 und CD3 durchflusszytometrisch analysiert. Die Daten sind als Prozent CD56⁺CD3⁻ Zellen ± Standardfehler des Mittelwertes dargestellt.

Der Anteil von NK-Zellen an den PBMC war jedoch bei beiden Gruppen gleich. Die durchschnittliche Frequenz der NK-Zellen lag bei circa 7,5% (Abb. 4.31).

4.4.2 Charakterisierung aktivierter NK-Zellen

Um Unterschiede zwischen NK-Zellen von wt- und C77G-Individuen auf eine Stimulation mit dem Zytokin IL-2 zu analysieren, wurden die Zellen für eine Woche mit 200U/ml kultiviert und anschließend die Zellzahl bestimmt und das CD45-Isoformenmuster untersucht. Nach der Kultivierung konnte kein Unterschied in der Zellzahl zwischen wt- und C77G-Individuen festgestellt werden (Abb. 4.32). Beim Vergleich der Zellzahlen zwischen eingesetzten und stimulierten Zellen wurde beobachtet, dass die Zellen durch IL-2 am Leben erhalten wurden, aber nicht proliferierten.

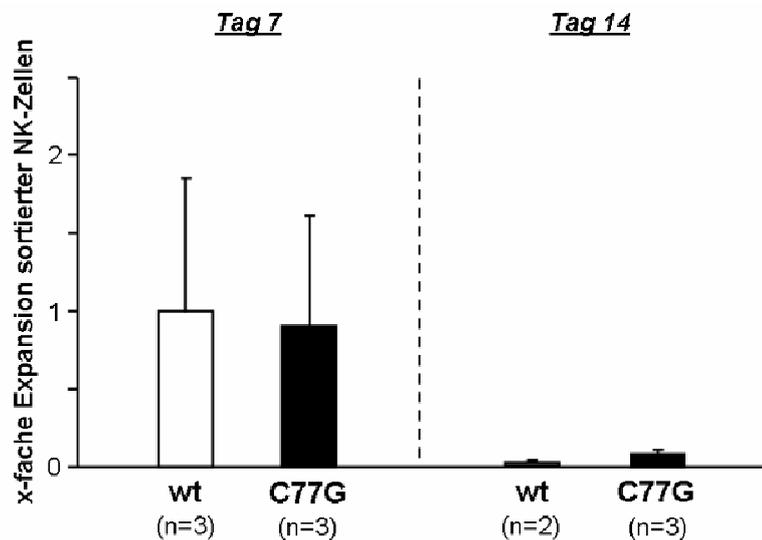


Abb. 4.32 *In vitro* Stimulation von sortierten NK-Zellen.

CD56⁺CD3⁻ NK-Zellen von wt- und C77G-Individuen wurden wie in 3.2.7 beschrieben sortiert und expandiert. An Tag 0, 7 und 14 wurde jeweils die absolute Zellzahl bestimmt. Die Zellzahl wurde anschließend durch die Zellzahl der jeweiligen Startpopulation geteilt um die x-fache Expansionsrate zu errechnen. Die Ergebnisse sind als x-fache Expansion \pm Standardfehler des Mittelwertes von der angegebenen Zahl an Experimenten dargestellt.

Die Analyse des CD45-Isoformenmusters ergab, dass aktivierte C77G-NK-Zellen mit 100% positiven NK-Zellen CD45RA signifikant höher exprimieren als wt-NK-Zellen mit im Mittel 88% positiven NK-Zellen (Abb. 4.33). In der CD45R0-Expression konnte kein Unterschied zwischen wt- und C77G-NK-Zellen nachgewiesen werden. Beide exprimieren CD45R0 zu circa 40% auf ihrer Zelloberfläche. In der CD45RB- und CD45RC-Expression konnte ebenfalls kein Unterschied zwischen NK-Zellen von wt- und C77G-Individuen gefunden werden. Die Zellen waren zu 40-60% CD45RB-positiv und zu circa 95% CD45RC-positiv.

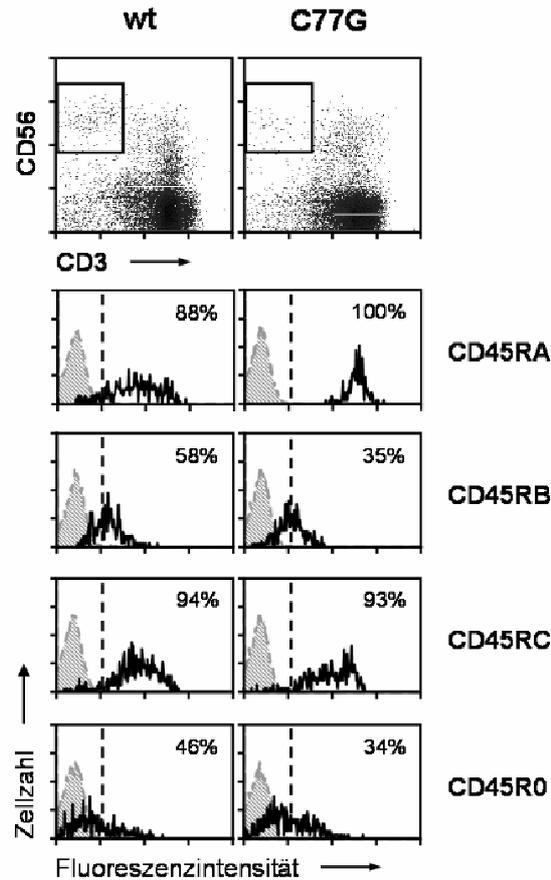


Abb. 4.33 Expressionsmuster der CD45-Isoformen auf *in vitro* aktivierten CD56⁺CD3⁻ NK-Zellen.

PBMC von wt- und C77G-Individuen wurden für die Untersuchung für eine Woche mit 200U/ml IL-2 kultiviert. Die Zellen wurden mittels einer Dreifarbanalyse auf ihre Expression von CD56 und CD3 (schwarzer Rahmen im Dotplot) und entweder CD45RA, CD45RB, CD45RC oder CD45R0 durchflusszytometrisch analysiert (ungefüllte Histogramme). Die grau schattierten Histogramme zeigen ungefärbte PBMC als Kontrolle. Positive und negative Zellen wurden anhand der Negativkontrolle unterschieden (gestrichelter Marker) und die Prozente an positiven Zellen sind angegeben. Ähnliche Expressionsmuster wurden in mindestens zwei weiteren Experimenten beobachtet.

Aufgrund der durchflusszytometrischen Analysen lässt sich wie bei CD8⁺ T-Zellen keine Aussage treffen, um welche zusätzliche Isoform es sich handelt, die von den NK-Zellen varianter Spender vermehrt exprimiert wird. Es könnte sich sowohl um die ABC-Isoform als auch um die AB-Isoform handeln, da Exon A und Exon C nach Aktivierung von NK-Zellen nicht herunterreguliert werden. Deshalb sollte ebenfalls mittels einer RT-PCR-Analyse untersucht werden, welche Isoform für die erhöhte CD45RA-Expression verantwortlich ist. Die Primer, die für diese PCR verwendet wurden, waren in Exon 2 und 7 lokalisiert, damit alle alternativ gespleißten Exons in den Produkten enthalten sind.

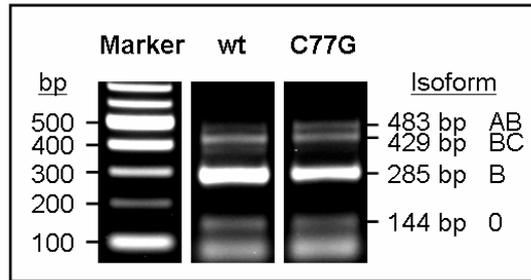


Abb. 4.34 mRNA-Expressionsmuster der CD45-Isoformen von sortierten und *in vitro* aktivierten NK-Zellen.

Die RNA von sortierten und stimulierten CD56⁺CD3⁻ NK-Zellen (siehe Abschnitt 3.2.7) von wt- und C77G-Individuen wurde isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die PCR-Primer waren in den Exons 2 und 7 lokalisiert, damit alle alternativ gespleißten Isoformen analysiert werden konnten.

Die Gelelektrophorese zeigte vier Banden in den wt-NK-Zellen für die CD45-Isoformen AB (483bp), BC (429bp), B (285bp) und R0 (144bp) (Abb. 4.34). Für die C77G-NK-Zellen wurde dasselbe Isoformenmuster erhalten, allerdings mit einer deutlich stärker exprimierten Bande von 483bp (AB-Isoform). Die ABC-Isoform (627bp) wurde in aktivierten NK-Zellen nicht exprimiert. Somit scheint die AB-Isoform auch bei NK-Zellen von C77G-Individuen für die verstärkte CD45RA-Expression verantwortlich zu sein.

4.4.3 Zytolytische Kapazität

NK-Zellen sind wie CD8⁺ T-Zellen in der Lage veränderte Zellen, wie Tumorzellen und virusinfizierte Zellen, zu erkennen und zu eliminieren. Die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen wird von aktivierenden und inhibierenden Oberflächenrezeptoren reguliert. Inhibierende Oberflächenrezeptoren interagieren unter anderem mit MHC-Klasse-I-Molekülen auf der Zielzelle. NK-Zellen werden hauptsächlich durch fehlende MHC-Klasse-I-Moleküle auf der Zielzelle aktiviert, wodurch die inhibierenden Signale fehlen. Aufgrund dessen sind K562-Zellen als Zielzellen für die Untersuchung der zytolytischen Aktivität von NK-Zellen geeignet, da sie keine MHC-Klasse-I-Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimieren. Die zytolytischen Eigenschaften von wt- und C77G-NK-Zellen sollen nach Aktivierung mit K562-Zellen mittels einer CD107a-Analyse verglichen werden.

Da für die CD107a-Analyse zwei Zelltypen zusammen inkubiert wurden, sollte zunächst einmal festgestellt werden, ob sich die Zelltypen durchflusszytometrisch trennen lassen. Abbildung 4.35A zeigt Dotplots von PBMC alleine, K562-Zellen alleine und beiden Zelltypen gemeinsam. PBMC und K562-Zellen lassen sich allein durch ihre Größenunterschiede im Vorwärts-/Seitwärts-Scatter trennen, so dass für die Analyse auf PBMC „gated“ werden konnte.

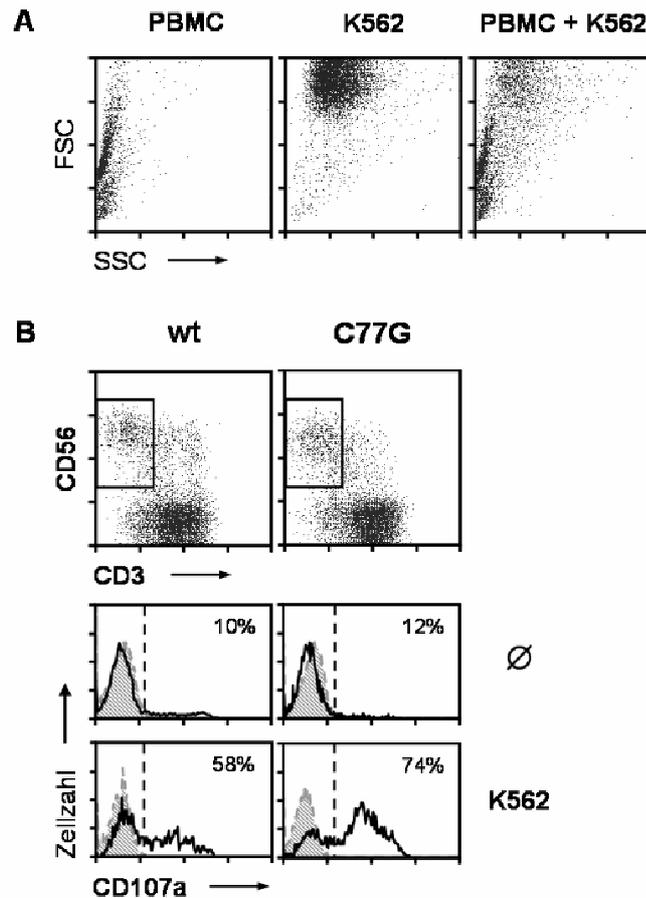


Abb. 4.35 CD107a-Assay mit NK-Zellen.

A Dargestellt sind Dotplots von PBMC alleine, K562-Zellen alleine und beiden Zelltypen gemeinsam. **B** PBMC von wt- und C77G-Individuen wurden für sieben Tage mit 200U/ml IL-2 im Brutschrank voraktiviert. 2×10^5 Zellen/ml der voraktivierten PBMC wurden alleine oder mit 2×10^5 K562 für 4h im Brutschrank inkubiert und anschließend auf die Expression von CD56 und CD3 (schwarzer Rahmen) und CD107a durchflusszytometrisch untersucht (ungefüllte Histogramme). Die grau schattierten Histogramme zeigen die Isotypkontrolle. Positive und negative Zellen wurden anhand der Isotypkontrolle unterschieden (gestrichelter Marker) und die Prozente an positiven Zellen sind angegeben. Ähnliche Expressionsmuster wurden in mindestens zwei weiteren Experimenten beobachtet.

In Abbildung 4.35B ist beispielhaft das Ergebnis eines CD107a-Assays mit voraktivierten NK-Zellen graphisch dargestellt. Eine kleine Population der NK-Zellen

zeigt auch ohne Stimulation schon eine Reaktivität mit CD107a-Antikörpern. Nach Stimulation mit K562-Zellen nimmt die CD107a-Expression wie erwartet deutlich zu.

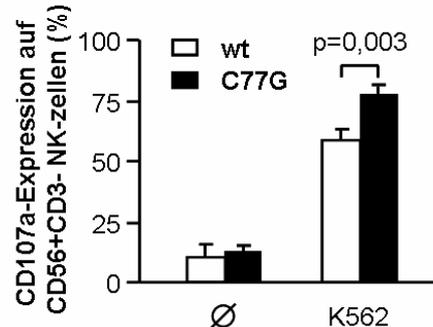


Abb. 4. 36 CD107a-Assay mit NK-Zellen.

PBMC von wt- und C77G-Individuen wurden für sieben Tage mit 200U/ml IL-2 im Brutschrank voraktiviert. 2×10^5 Zellen/ml der voraktivierten PBMC wurden alleine oder mit 2×10^5 K562 für 4h im Brutschrank stimuliert und anschließend mittels einer Zweifarbanalyse auf die Expression von CD56, CD3 und CD107a durchflusszytometrisch untersucht. Die Daten sind als prozentuale CD107a-Expression auf CD56⁺CD3⁻ NK-Zellen \pm Standardfehler des Mittelwertes von mindestens drei Experimenten dargestellt.

Beim Vergleich der CD107a-Expression von wt- und C77G-Individuen zeigte sich, dass es bei unstimulierten NK-Zellen keinen Unterschied gibt. Sowohl wt- als auch C77G-Individuen wiesen ca. 11,5% CD107a-positive NK-Zellen auf. Nach Stimulation mit K562-Zellen allerdings zeigten die C77G-NK-Zellen eine signifikant höhere CD107a-Expression im Vergleich zu wt-NK-Zellen (Abb. 4.36). Während stimulierte wt-NK-Zellen zu circa 52% CD107a-positiv waren, waren es bei C77G-NK-Zellen circa 68%. Auch diese Daten weisen, ähnlich wie die erhöhte CD69-Expression auf C77G-NK-Zellen, darauf hin, dass der C77G-Polymorphismus einen Einfluss auf den Aktivierungsstatus und hier speziell auf die durch TcR-Stimulation ausgelöste Degranulierung der C77G-NK-Zellen hat. Beides spricht für eher hyperreaktive NK-Zellen bei C77G-Individuen.

5 Diskussion

CD45 ist ein wichtiges Molekül in der Antigenrezeptor-Signaltransduktions-Kaskade¹ und für die Differenzierung und Funktion von Lymphozyten notwendig. Es hat die Kapazität, den Schwellenwert des Antigenrezeptors sowohl positiv als auch negativ zu regulieren^{6,63} und die Kombination der CD45-Isoformen auf der Zelloberfläche ist entscheidend für die Effekte auf die Signaltransduktion²¹. Durch alternatives Spleißen dreier variabler Exons (A, B und C) werden verschiedene CD45-Isoformen auf der Zelloberfläche exprimiert, deren Funktionen im Einzelnen allerdings nur unvollständig verstanden sind. Aufgrund der Schwierigkeiten beim Transfizieren von humanen Lymphozyten *in vitro*, wurde in dieser Arbeit ein natürlich vorkommendes genetisches Modell, der C77G-Polymorphismus im CD45-Gen, verwendet, um die Bedeutung einer abberanten Isoform-Expression beim Menschen zu untersuchen. Die C77G-Transversion verhindert das normale Spleißen des Exon A, wodurch auf memory/aktivierten T-Zellen von C77G-Individuen drei CD45-Isoformen (B, 0 und AB) exprimiert werden, während bei wt-Individuen nur die Isoformen CD45(B) und CD45(0) vorkommen. Die zusätzliche CD45RA-Expression auf memory/aktivierten T-Zellen von C77G-Individuen resultiert in einer verstärkten TcR-Signaltransduktion¹³ und einer gesteigerten Zytokinempfindlichkeit bei CD4⁺ T-Zellen¹⁴. Außerdem wurde eine erhöhte Frequenz von C77G-Individuen bei bestimmten Autoimmun- und Infektionserkrankungen gefunden¹⁵.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die phänotypischen und funktionellen Auswirkungen des C77G-Polymorphismus bei verschiedenen Lymphozyten-subpopulationen zu untersuchen. Hierzu wurden die CD45-Expressionsmuster sowie die Expressionsmuster weiterer Zelloberflächenmoleküle und intrazellulärer Moleküle bei CD4⁺CD25^{high} T_{reg}, CD8⁺ T-Zellen und CD56⁺CD3⁻ NK-Zellen von wt- und C77G-Individuen miteinander verglichen. Des Weiteren wurden die einzelnen Populationen in verschiedenen *in vitro*-Assays funktionell untersucht. Die erhaltenen Daten weisen auf eine Hyporeaktivität von CD4⁺CD25^{high} T_{reg} und eine Hyperreaktivität von CD56⁺CD3⁻ NK-Zellen bei varianten Individuen hin. CD8⁺ T-Zellen von C77G-Individuen hingegen

scheinen in ihren funktionellen Eigenschaften nicht von der abberanten CD45RA-Expression beeinflusst zu werden. Daraus ergeben sich für die Diskussion folgende Fragen: (1) Welche Besonderheiten im CD45-Isoformen-Muster charakterisieren die verschiedenen Subpopulationen, (2) wie kann die Hyporeaktivität von C77G-T_{reg} und (3) die ähnliche Reaktivität bei wt- und C77G-CD8⁺ T-Zellen im Vergleich mit der Hyperreaktivität von C77G-CD4⁺ T-Zellen erklärt werden, (4) nach welchem Mechanismus könnte die variante Expression von CD45RA-Isoformen die NK-Zellreaktivität verändern und (5) wie könnten die funktionellen Besonderheiten varianter Lymphozytenpopulationen zusammenwirken und möglicherweise zur Suszeptibilität von C77G-Individuen für bestimmte Erkrankungen beitragen.

5.1 Besonderheiten im CD45-Isoformen-Muster bei C77G-Individuen

Da in älteren Studien mit wt- und C77G-Gesamtlymphozyten keine Veränderungen der Immunfunktionen nachgewiesen werden konnten⁸, wurde in jüngeren Studien auf Zelltypen fokussiert, die einen markanten Unterschied im Phänotyp zwischen wt- und C77G-Individuen aufwiesen^{13,14}, um mögliche funktionelle Konsequenzen der C77G-Mutation zu untersuchen. So konnten für memory/aktivierte CD4⁺ T-Zellen von C77G-Individuen, die einen markanten Unterschied in der CD45RA-Expression zeigen, auch funktionelle Unterschiede nachgewiesen werden¹³. In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Lymphozytensubpopulationen analysiert, wobei T_{reg} den markantesten CD45RA-Phänotyp aufwies, während bei den aktivierten CD8⁺ T-Zellen und den aktivierten NK-Zellen der Unterschied in der CD45RA-Expression ebenfalls deutlich, aber nicht so markant wie bei T_{reg} war (Abb. 4.12, 4.23 und 4.32). Die erhöhte CD45RA-Expression resultierte sowohl bei T_{reg} als auch bei CD8⁺ T-Zellen und NK-Zellen von C77G-Individuen aus einer zusätzlich exprimierten Isoform, wobei es sich eindeutig um die AB-Isoform handelte (Abb. 4.13, 4.24 und 4.33), die bei T_{reg} vorrangig vom mutierten Allel generiert zu werden scheint (Abb. 4.14).

Ein Phänomen über das schon in früheren Studien spekuliert wurde⁹ und das nun zum ersten Mal nachgewiesen werden konnte, ist eine signifikant geringere CD45R0-Expression bei ruhenden Lymphozyten von C77G-Individuen (Abb. 4.3). Dieser Befund war in einigen Subpopulationen, wie CD4⁺ T-Zellen und T_{reg}, markanter ausgeprägt als in anderen Subpopulationen, wie CD8⁺ T-Zellen und NK-Zellen. Nach den bisherigen Erkenntnissen zum Spleißen von CD45¹¹ ist es unwahrscheinlich, dass die prä-mRNA, die vom mutierten Allel stammt, zur CD45R0-Isoform gespleißt werden kann. Somit würde man rein rechnerisch eine geringere CD45R0-Expression auf der Zelloberfläche von C77G-Lymphozyten erwarten, da die gemessene CD45R0-Expression nur von CD45R0-mRNA, die vom wt-Allel generiert wurde, stammen kann. Wenn dieses Model stimmen sollte, würde man erwarten, dass homozygote Träger des C77G-Polymorphismus nicht in der Lage sind die CD45R0-Isoform zu bilden. Bisher konnte allerdings nur ein homozygoter Träger identifiziert werden, wobei keine weiteren Analysen zu phänotypischen oder funktionellen Besonderheiten durchgeführt wurden¹⁰. Die CD45-Isoformen-Muster in den mRNA-Analysen von T_{reg} weisen ebenfalls auf eine geringere CD45R0-Expression bei C77G-Individuen hin (Abb. 4.13). Ein wt-Allel scheint allerdings auszureichen, um eine normale CD45R0-Expression auf der Zelloberfläche aktivierter Zellen zu erhalten. Diese Daten deuten darauf hin, dass nach der Aktivierung von C77G-Lymphozyten allein die variante CD45RAB-Expression die Ursache der veränderten Reaktivität ist, während bei einigen ruhenden C77G-Subpopulationen auch die verminderte CD45R0-Expression eine Rolle spielen könnte.

Auf mRNA-Ebene konnte sowohl bei aktivierten wt- als auch bei aktivierten C77G-T_{reg} die CD45(BC)-Isoform nachgewiesen werden (Abb. 4.13). Exon C wird normalerweise genau wie Exon A nach Aktivierung herunterreguliert, so dass weder die CD45(ABC)- noch die CD45(BC)-Isoform auf der Zelloberfläche exprimiert werden⁵⁹. Weshalb in aktivierten Zellen die CD45(BC)-mRNA, jedoch nicht das CD45(BC)-Molekül auf der Zelloberfläche, nachgewiesen werden konnte, ist unklar, aber dieser Befund sollte keine Auswirkungen auf die Signaltransduktions-Ereignisse an der Zelloberfläche haben und wurde nicht weiter untersucht.

5.2 Hyporeaktivität bei T_{reg} versus Hyperreaktivität bei $CD4^+$ T-Zellen von C77G-Individuen

T_{reg} spielen eine wichtige Rolle bei der Kontrolle von Immunantworten. Eine Veränderung in der T_{reg} -Funktion kann zur Verminderung oder zum Wegfall der natürlichen Selbst-Toleranz führen, was zur Entwicklung von Autoimmunerkrankungen beiträgt. Die Untersuchungen mit $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+$ T_{reg} von C77G-Individuen ergaben, dass diese Subpopulation (1) CD45RA-Isoformen überexprimiert, (2) eine verminderte Heraufregulation von CD69 nach TcR-Stimulation zeigt, (3) sich *in vitro* nicht gut über CD3/CD28-Stimulation expandieren lässt, (4) verringerte IL-10- und TGF- β -mRNA-Level sowie distinkte Expressionsmuster bestimmter Gene wie beispielsweise Granzym A, TNF, IL-4 oder IL-10 aufweist und (5) eine beeinträchtigte Kapazität hat, die Proliferation von $CD4^+$ T-Zellen zu supprimieren. Diese Daten deuten darauf hin, dass das variante Expressionsmuster von CD45RA zu einem eher hyporeaktiven Phänotyp bei C77G- T_{reg} führt.

Es ist grundsätzlich denkbar, dass andere Ursachen für die unterschiedlichen Reaktionen verantwortlich sind, da „normale“ Probanden untersucht wurden, die sich in vielen anderen Parametern unterscheiden. Die Schlussfolgerung, dass der C77G-Polymorphismus und die resultierende variante CD45RA-Expression für die T_{reg} -Hyporeaktivität verantwortlich sind, wird von ähnlichen Argumenten wie die früher etablierte C77G-T-Zell-Hyperreaktivität bei memory/aktivierten $CD4^+$ T-Zellen unterstützt¹³. Es wurde insgesamt eine verminderte T_{reg} -Reaktivität bei C77G-Individuen mit allen verschiedenen Analyse-Methoden gefunden, weshalb es unwahrscheinlich ist, dass die funktionellen Unterschiede auf experimentelle Variabilität zurückzuführen sind. Es wurde ebenfalls schon früher diskutiert, dass funktionelle Unterschiede am wahrscheinlichsten in Zelltypen gefunden werden, die wie T_{reg} signifikant von der C77G-Mutation beeinflusst werden, weshalb die funktionellen Untersuchungen für diese Arbeit auch hauptsächlich auf diese Subpopulation fokussiert wurden.

Die Veränderung der Isoform-Kombination könnte die TcR-Signaltransduktion von C77G-T_{reg}, ähnlich wie bei den transgenen Mäusen, so beeinflussen, dass die normale Reaktivität verstärkt wird. Transgene Mäuse mit veränderten CD45-Isoformen-Kombinationen, welche die variante CD45-Expression beim Menschen imitieren, zeigen einen schnelleren Ausbruch und schweren Verlauf von Autoimmunerkrankungen⁶⁴. Allerdings reagieren T_{reg} und CD4⁺ T-Zellen verschieden auf denselben biochemischen Stimulus⁶⁵. CD4⁺ T-Zellen durchlaufen nach TcR-Aktivierung und adäquater Ko-Stimulation ein typisches Aktivierungsprogramm, welches die Produktion von IL-2 und ihre Proliferation einschließt. T_{reg} reagieren nahezu nicht auf TcR-vermittelte Signale, sie produzieren weder IL-2 noch proliferieren sie, allerdings supprimieren sie die Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen. Daraus ergab sich die Arbeitshypothese, dass wenn C77G-CD4⁺ T-Zellen nach Aktivierung hyperreaktiv sind, T_{reg} nach Aktivierung möglicherweise hyporeaktiv bleiben.

Die ersten Daten, die diese Arbeitshypothese unterstützten, waren die verminderte Heraufregulation von CD69 nach TcR-Stimulation bei C77G-T_{reg}, was auch in der Microarray-Analyse bestätigt werden konnte. CD69 ist ein Membranrezeptor, der nach einer Aktivierung vorübergehend exprimiert wird und als negativer Modulator bei autoimmuner Reaktivität und Inflammation fungiert⁶⁶. Die Quervernetzung von CD69 induziert die Produktion von TGF- β , welches als anti-inflammatorisches Zytokin fungiert. Das bedeutet, je mehr CD69 exprimiert wird, desto stärker ist die negative Rückkopplung oder der supprimierende Einfluss über TGF- β auf die Inflammation. C77G-T_{reg} exprimierten weniger CD69 als wt-T_{reg}, weshalb ihre negative Rückkopplung beeinträchtigt zu sein scheint, was möglicherweise zu einer verminderten Produktion von TGF- β und einer reduzierten supprimierenden Aktivität führt. Es wurde schon gezeigt, dass CD45 die Zytokinrezeptor-induzierte Signaltransduktion über Jaks negativ reguliert³¹, so dass eine zusätzliche CD45-Isoform auf der Zelloberfläche durchaus zu einer verminderten Produktion von supprimierenden Zytokinen und dadurch zu einer Hyporeaktivität der C77G-T_{reg} führen könnte. Die Zytokine IL-10 und TGF- β , die in CD4⁺ T-Zellen einen unreaktiven Zustand hervorrufen, wurden analysiert und kamen in C77G-T_{reg} vermindert vor, was mit der reduzierten Heraufregulation von CD69 in C77G-T_{reg} korreliert.

Weitere Hinweise zum allgemeinen Zustand der C77G-T_{reg} im Vergleich zu wt-T_{reg} lieferte eine globale Genexpressions-Untersuchung mittels einer Microarray-Analyse (Abb 4.17), die eine Assoziation mit vier Signalweg-Modulen ergab: die TcR-Signal-Kaskade, die Regulation der Proliferation, die Entzündungsreaktion und die Apoptose. Die TcR-Signal-Kaskade der C77G-T_{reg} selbst scheint weniger beeinflusst zu sein, aber am Ende der Kaskade werden einige Gene von regulierenden Molekülen verschieden exprimiert, die mit den drei übrigen Signalwegen assoziiert waren. Direkt mit der TcR-Signal-Kaskade konnten die Moleküle TRIM (TcR interacting molecule; auch als TRAT1 bezeichnet) und Lyn assoziiert werden, wobei TRIM eine verminderte Expression und Lyn eine erhöhte Expression in C77G-T_{reg} zeigte. TRIM ist ein transmembranes Adaptorprotein, welches ausschließlich in T-Zellen exprimiert wird. Es assoziiert mit dem TcR/CD3/ζ-Komplex und scheint die spontane TcR-Internalisierung zu inhibieren und die Ca²⁺-Mobilisierung zu verstärken⁶⁷. Durch eine Veränderung der Dauer der TcR-Expression verstärkt TRIM somit die T-Zell-Aktivierung. Eine verminderte Expression von TRIM in C77G-T_{reg}, könnte demnach in einer verminderten T-Zell-Aktivierung resultieren, allerdings gibt es bislang keine Hinweise auf eine Interaktion zwischen CD45 und TRIM.

Lyn gehört zur Familie der Src-Kinasen, wird vorwiegend in B-Zellen, aber kaum in T-Zellen, exprimiert^{68,69} und ist als ein Schlüsselenzym in die Regulation der Zellaktivierung involviert. Dabei kann Lyn die Zellaktivierung, abhängig von Stimulus und Differenzierungsstatus, begünstigen oder inhibieren⁷⁰. Inwieweit die bei C77G-T_{reg} gefundene erhöhte Lyn-Expression einen, möglicherweise negativen, Einfluss auf die TcR-Signal-Kaskade haben könnte, müsste weiter untersucht werden, eine Interaktion mit CD45 ist dagegen schon bekannt⁷⁰. Ob die Regulation der Proliferation durch die erhöhte CD45RA-Expression beeinflusst wird, lässt sich anhand der Microarray-Daten schwer einschätzen, da sowohl positiv (IL-3⁷¹) als auch negativ (IL-10⁷²) wirkende Moleküle erhöht oder vermindert exprimiert werden. Der Einfluss auf eine Entzündungsreaktion scheint dagegen bei C77G-T_{reg} eher schwächer als bei wt-T_{reg} zu sein. Die Zytokine IL-4 und IL-13 werden allerdings von C77G-T_{reg} vermehrt exprimiert, was möglicherweise zur Entstehung von Allergien beitragen könnte⁷³. Natürliche T_{reg} sind auch in der Lage Granzym A zu exprimieren und zeigen zytolytische Aktivität gegenüber autologen Zielzellen wie beispielsweise CD4⁺ und

CD8⁺ T-Zellen⁷⁴. Hierbei scheint die erhöhte CD45RA-Expression bei C77G-Individuen einen eher negativen Einfluss auf die zytolytische Aktivität der T_{reg} auszuüben. Insgesamt könnten auch diese Daten auf eher hyporeaktive C77G-Treg hinweisen, es sind allerdings weitere Untersuchungen notwendig um dies zu bestätigen.

Das verminderte Aktivierungspotential der C77G-T_{reg} in den Expansions-Experimenten fügt sich ebenfalls in die Hypothese der Hyporeaktivität ein. Es wurde schon gezeigt, dass CD45RA⁺ T_{reg} signifikant weniger proliferieren als CD45R0⁺ T_{reg}⁷⁵, und obwohl die CD45RA⁺ T_{reg} normalerweise im Laufe der Proliferation einen CD45RA⁺CD45R0⁺ Phänotyp annehmen, weisen diese Beobachtungen auf einen negativen Einfluss der CD45RA-Isoformen auf die T_{reg}-Proliferation hin. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass T_{reg} mit einer stetigen Expression von CD45RA nach einem CD3/CD28-Stimulus schlechter expandierten und die Proliferation sogar circa drei Wochen nach dem Start der Expansion abfiel. Allerdings ist die CD45-Phosphatase nicht nur wichtig für die TcR-Signaltransduktion, sondern wird ebenfalls mit Apoptose assoziiert²⁵. Demnach könnte ein, bedingt durch das aberrante CD45RA-Expressionsmuster, verstärkter programmierter Zelltod ebenfalls zu einem frühen Zellverlust bei den C77G-T_{reg} führen. Das verminderte suppressive Potenzial könnte bedeuten, dass die C77G-T_{reg}, die ursprünglich in Kultur genommen wurden, von nicht-T_{reg} überwachsen wurden. Um dies auszuschließen, wurden die FoxP3⁺ Zellen in den expandierten Kulturen analysiert. FoxP3 stellt einen der besten Marker für T_{reg} dar, wobei die FoxP3-DNA-Methylierung derzeit das verlässlichste Merkmal für natürliche T_{reg} ist⁷⁶. Die FoxP3-Expression ist auch hier ein hilfreicher Marker um die Qualität der expandierten T_{reg} einzuschätzen, obwohl FoxP3 nach Aktivierung auch von CD4⁺ T-Zellen transient exprimiert wird und diese so von den T_{reg} nicht mehr zu trennen sind. Die wt- wie auch die C77G-T_{reg} waren zu ca. 93% FoxP3-positiv, weshalb ein Überwachsen mit nicht-T_{reg}-Zellen eher unwahrscheinlich ist, da es sich bei den wt-T_{reg} tatsächlich um suppressive T_{reg} handelte.

Auf mRNA-Ebene wurden sogar höhere FoxP3-mRNA-Transkriptmengen bei T_{reg} von C77G-Individuen im Vergleich zu wt-Individuen gefunden (Abb. 4.11B). Dies würde ebenfalls zur Hypothese der hyporeaktiven T_{reg} passen, da die Expression von FoxP3 notwendig ist, um den nicht-reaktiven Phänotyp der T_{reg} aufrecht zu erhalten⁷⁷. Der

Hauptunterschied zwischen ruhenden CD4⁺ T-Zellen und T_{reg} ist die Expression von FoxP3, was darauf hinweist, dass die Unterschiede in der TcR-Signaltransduktion eine Konsequenz der FoxP3-Expression ist⁶⁵. Das erste Ereignis nach einer Stimulation des TcR ist die Aktivierung der Kinase der Src-Familie p56^{lck}, welche anschließend die ITAMs in den intrazellulären Domänen der CD3ε- und CD3ζ-Kette phosphoryliert. Die Phosphorylierung von Tyrosinresten in der CD3ζ-Kette bildet eine Bindungsstelle für Zap70, welches dann von p56^{lck} phosphoryliert und aktiviert werden kann. Anschließend ist Zap70 in der Lage weitere nachgeschaltete Substrate zu phosphorylieren und somit das Signal weiterzuverbreiten. Es konnte gezeigt werden, dass die Veränderung in der TcR-Signaltransduktion bei T_{reg} im frühestmöglichen Schritt auftrat⁷⁸. Eine Stimulation des TcR resultierte in einer reduzierten Phosphorylierung der CD3ζ-Kette bei T_{reg} im Vergleich zu CD4⁺ T-Zellen. Dies wurde von einer verminderten Rekrutierung und Aktivierung von Zap70 begleitet. Ein Modell wie FoxP3 die proximalen Ereignisse der TcR-Signaltransduktion beeinflussen könnte, wäre beispielsweise die Unterdrückung eines bisher unbekanntes Genprodukts, das für eine produktive TcR-Signaltransduktion notwendig ist. Kandidaten für solche Moleküle schließen Tyrosin-Phosphatasen (CD45?) oder -kinasen ein, die die sehr frühen Ereignisse der TcR-Signaltransduktion regulieren, einschließlich der Tyrosin-Phosphorylierung der CD3ζ-Kette von Lck⁶⁵.

Die Untersuchung der suppressiven Funktion ergab eine verminderte Kapazität der expandierten C77G-T_{reg}, die Proliferation von CD4⁺ T-Zellen zu unterdrücken, wenngleich mit einer großen Streuung (Abb. 4.18). Die hohe Streuung in der suppressiven Kapazität der C77G-T_{reg} könnte möglicherweise durch Effekte erklärt werden, die den Einfluss der C77G-Mutation in einigen Individuen neutralisiert. Diese neutralisierenden Effekte könnten für zukünftige Untersuchungen den C77G-Polymorphismus betreffend interessant sein. Dennoch scheinen Dysfunktionen in der Suppression, wie für C77G-T_{reg} gezeigt, ein wichtiger Faktor bei der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen zu sein⁷⁹. Regulatorische T-Zellen repräsentieren einen Teil der peripheren Toleranz und sind in der Lage autoaggressive T-Zellen zu supprimieren. Zusammengefasst, weisen diese Daten daraufhin, dass die aberrante CD45RA-Expression auf T_{reg} von gesunden Individuen die normale T_{reg}-Aktivität beeinträchtigt.

5.3 Ähnliche Reaktivität bei CD8⁺ T-Zellen versus Hyperreaktivität bei CD4⁺ T-Zellen von C77G-Individuen

CD8⁺ T-Zellen werden auch als zytotoxische T-Zellen bezeichnet und sind in der Lage in geschädigten Zellen über bestimmte Signalwege (Fas/FasL, Perforin/Granzym) einen programmierten Zelltod auszulösen. CD4- und CD8-Moleküle sind als Korezeptoren während der TcR-Signaltransduktion aktiv, indem sie an denselben Liganden wie der TcR binden und dadurch die Empfindlichkeit gegenüber dem Antigen verstärken. Während CD4⁺ T-Zellen auf MHC-II-Molekülen präsentierte Antigene erkennen, die auf der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen exprimiert werden, erkennen CD8⁺ T-Zellen von MHC-I-Molekülen präsentierte Antigene vor allem auf viral infizierten Zellen und Tumorzellen. Auch in CD8⁺ T-Zellen kontrolliert die CD45-Phosphatase die Aktivität der p56^{lck}-Kinase, die mit dem CD8-Korezeptor assoziiert und die TcR-Signaltransduktions-Kaskade auslöst. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass CD8⁺ T-Zellen von C77G-Individuen (1) CD45RA-Isoformen überexprimieren und (2) eine vergleichbare proliferative und (3) zytotoxische Kapazität zeigen wie CD8⁺ T-Zellen von wt-Individuen. Die Signaltransduktionswege von CD8⁺ T-Zellen scheinen demnach nicht von der variant exprimierten CD45-Isoform beeinflusst zu werden.

Obwohl sowohl CD4- als auch CD8-Moleküle die Signaltransduktion über den TcR verstärken, konnte gezeigt werden, dass das Crosslinking des CD4-TcR-Komplexes eine 4-fach größere p56^{lck}-Kinase-Aktivität und eine erhöhte Tyrosin-Phosphorylierung von intrazellulären Substraten verglichen mit dem Crosslinking des CD8-TcR-Komplexes initiiert. Die Signaltransduktion über den CD8-TcR-Komplex scheint demnach weniger mit der Aktivierung von Tyrosin-Kinasen zusammenzuhängen, sondern eher vom Proteinkinase-C-Signalweg abhängig zu sein⁸⁰. CD8⁺ T-Zellen zeigten auch eine verminderte Ca²⁺ Mobilisierung im Vergleich mit CD4⁺ T-Zellen⁸¹. Dies könnte insgesamt zu einem erhöhten Schwellenwert zur Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen führen, was einen wichtigen physiologischen Schutzmechanismus darstellen könnte, um zytotoxische T-Zellen nur bei Notwendigkeit zu aktivieren, da es ansonsten zu einer schweren Schädigung von gesundem Gewebe kommen könnte. Dieser

Schutzmechanismus scheint nicht von einer erhöhten CD45RA-Expression beeinflusst zu werden.

5.4 Mechanismus der Hyperreaktivität bei NK-Zellen

Natürliche Killerzellen sind aus dem Knochenmark stammende granuläre Lymphozyten des angeborenen Immunsystems, deren Antigenrezeptoren bereits vorliegen und nicht erst durch Umlagerung von Gensegmenten resultieren. Mit diesen Oberflächenstrukturen haben NK-Zellen die Fähigkeit, entartete Zellen ohne vorherige Sensibilisierung zu lysieren. Die NK-Zell-Aktivität wird durch die Balance verschiedener Rezeptoren, die entweder aktivierende oder inhibierende Signale senden, kontrolliert. In CD45-defizienten Mäusen wurde eine merklich erhöhte Anzahl an NK-Zellen beobachtet⁸², was auf eine Funktion von CD45 in dieser Zellpopulation hinweist. NK-Zellen exprimieren eine große Anzahl an Kinasen der Src-Familie (z.B. Fyn, Lck und Lyn), welche zum Teil von der Protein-Tyrosin-Phosphatase CD45 kontrolliert werden³⁰. Derzeit ist unklar ob CD45 netto einen positiven oder negativen Effekt auf die Kinasen der Src-Familien in NK-Zellen hat. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass CD56⁺CD3⁻ NK-Zellen von C77G-Individuen (1) CD45RA-Isoformen überexprimieren, (2) eine erhöhte CD69-Expression im unstimulierten Zustand aufweisen, (3) und eine gesteigerte zytotoxische Aktivität gegenüber K562-Zellen haben.

Ruhende NK-Zellen von C77G-Individuen unterscheiden sich in ihrem CD45-Isoformen-Muster augenscheinlich nicht von wt-Individuen (Abb. 4.28). Der Unterschied in der CD45RA-Expression ist jedoch auch hier vorhanden, aber nur minimal ausgeprägt. Auch der Anteil der NK-Zellen an den Lymphozyten sowie die Expression der NK-Zell-spezifischen Moleküle CD16 und CD161 ist vergleichbar zwischen wt- und C77G-Individuen. Ein markanter phänotypischer Unterschied ist die erhöhte CD69-Expression auf ruhenden NK-Zellen von C77G-Individuen (Abb. 4.28, 4.29), was auf eine erhöhte zytolytische Aktivität dieser Zellen hinweist, da die CD69-Expression und die zytolytische Aktivität eng miteinander korrelieren⁸³. In der Tat

konnte ebenfalls eine gesteigerte zytolytische Aktivität bei IL-2-stimulierten NK-Zellen von C77G-Individuen gegenüber K562-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 4.34, 4.35). Sowohl aktivierte NK-Zellen von wt-Individuen als auch aktivierte NK-Zellen von C77G-Individuen exprimieren CD45RA auf der Zelloberfläche, allerdings sind bei C77G-Individuen 100% aller NK-Zellen CD45RA-positiv und CD45RA wird in sehr viel höherer Dichte exprimiert (Abb. 4.32). Die signifikant erhöhte CD45RA-Expression auf aktivierten NK-Zellen von C77G-Individuen könnte für eine Hyperreaktivität in NK-Zellen verantwortlich sein.

Es wurde bereits gezeigt, dass das Fehlen von CD45-Molekülen unterschiedliche Effekte auf die Effektorfunktionen von NK-Zellen hat⁸⁴. Während die Zytotoxizität nur leicht reduziert war, waren die Zytokin- und Chemokinproduktion stark inhibiert. Die Zytokin- und Chemokinproduktion scheinen also mit der Funktion der CD45-Phosphatase eng verknüpft zu sein, was einen interessanten Aspekt für weitere Untersuchungen darstellt. Die Zytotoxizität hingegen scheint nur zum Teil über einen CD45-abhängigen Signalweg reguliert zu werden. Die Kinasen der Syk-Familie (Syk und Zap70) sind für die Verbreitung des Signals, welches zur Aktivierung der Effektorfunktionen in T-Zellen, B-Zellen, myeloiden Zellen und NK-Zellen führt, zuständig. Die meisten reifen hematopoetischen Zellen exprimieren entweder Syk oder Zap70. NK-Zellen bilden jedoch eine Ausnahme, denn sie exprimieren große Mengen von beiden Kinasen. Die Src-Kinasen, kontrolliert von CD45, phosphorylieren die Tyrosinreste der ITAMs von aktivierenden Rezeptoren, an welche die Kinasen der Syk-Familie binden. Die Kinasen der Src-Familie phosphorylieren und aktivieren die ITAM-gebundenen Kinasen Syk und Zap70. Es wird angenommen, dass Syk und Zap70 redundante Rollen bei der Verbreitung von ITAM-Signalen in NK-Zellen spielen. Während Zap70 allerdings von der Anwesenheit der Kinasen der Src-Familie und somit auch von CD45 abhängig ist, kontrolliert Syk die CD45-unabhängigen, ITAM-spezifischen NK-Zell-Funktionen. Die variante CD45RA-Expression könnte somit einen direkten Einfluss auf die Zap70-Kinase-Aktivität haben.

Die Kinase Zap70 wird nur von T-Zellen und NK-Zellen exprimiert und muss zur Aktivierung durch die Kinasen der Src-Familie Lck oder Fyn phosphoryliert werden⁸⁵.

Die Expression von mehr hochmolekularen CD45RA-Isoformen könnte zu einer erhöhten Phosphatase-Aktivität führen, wodurch die Kinasen der Src-Familie und schließlich der Syk-Familie stärker phosphoryliert werden und somit einen höheren Aktivierungsstatus erhalten könnten. In varianten T-Zellen konnte bereits eine stärkere Phosphorylierung der Zap70- Kinase nachgewiesen werden¹³. Könnte man für Zap70 in NK-Zellen ebenfalls eine stärkere Phosphorylierung nachweisen, würde das darauf hindeuten, dass die variante CD45RA-Expression die Signaltransduktion in NK-Zellen von C77G-Individuen verstärkt.

5.5 Zusammenwirken der verschiedenen Subpopulationen bei C77G-Individuen und die Auswirkungen für Krankheitsassoziationen

Die Beobachtungen in T_{reg} , $CD4^+$ T-Zellen, $CD8^+$ T-Zellen und NK-Zellen unterstreichen die Bedeutsamkeit die CD45-Phosphatase in verschiedenen Zelltypen zu untersuchen, da ihre Funktion je nach zellulärem Kontext unterschiedlich zu sein scheint. Innerhalb eines Trägers der C77G-Mutation kommen sowohl hyperreaktive memory/aktivierte $CD4^+$ T-Zellen und NK-Zellen als auch hyporeaktive regulatorische T-Zellen vor. All diese Zelltypen müssen bei einer Immunantwort auf Antigene in einem komplexen Prozess reguliert werden. Dieser Prozess beinhaltet das Auslösen einer starken Immunantwort gegen Pathogene während gleichzeitig die Toleranz zum Selbst erhalten werden muss. Dass T-Zellen mit einer Spezifität für Selbst-Antigene im peripheren Blut präsent sind und nach einer Aktivierung in Autoimmunprozesse involviert werden können, ist ein normaler Zustand, wobei eine zentrale Rolle von ruhenden $CD45RA^+$ T-Zellen als Quelle für potenziell pathogene Effektorzellen nachgewiesen werden konnte⁸⁶. Die erhöhte CD45RA-Expression bei C77G-Individuen könnte somit einen Einfluss auf die immunologische Toleranz haben und möglicherweise zur vermehrten Entstehung von Autoimmunerkrankungen beitragen.

Regulatorische T-Zellen sind entscheidend für die Erhaltung der peripheren Toleranz und der Vermeidung übermäßiger Immunreaktionen. Sie inhibieren die Proliferation und die Effektorfunktionen einer großen Bandbreite an verschiedenen Zelltypen des

Immunsystems wie konventionellen $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen^{87,88}, B-Zellen⁸⁹, dendritischen Zellen⁹⁰, Monozyten/Makrophagen⁹¹, NKT-Zellen⁹² und NK-Zellen⁹³. Sind T_{reg} nicht in der Lage starke Immunantworten zu supprimieren, wie es hier für $C77G$ - T_{reg} gezeigt wurde, kann dies entscheidende Auswirkungen auf die Entstehung von Autoimmunerkrankungen haben⁹⁴.

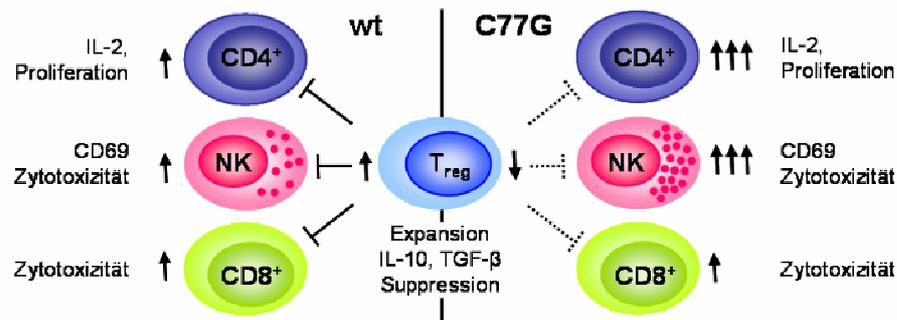


Abb. 5.1 Modellhafte Darstellung der funktionellen Auswirkungen der C77G-Mutation.

Regulatorische T-Zellen haben die Fähigkeit viele Zelltypen durch verschiedene Mechanismen in ihren Funktionen zu inhibieren. Bei Individuen mit der $C77G$ -Mutation wurden für einige Mechanismen Hinweise auf eine verminderte Funktionsfähigkeit der T_{reg} gefunden (z.B. verminderte Expansion und Suppression). $CD4^+$ T-Zellen von $C77G$ -Individuen zeigten zudem eine vermehrte Produktion von IL-2 und eine gesteigerte Proliferation, und auch NK-Zellen von $C77G$ -Individuen wiesen eine verstärkte CD69-Expression und eine erhöhte Zytotoxizität auf.

Bisher konnten vier wesentliche, von T_{reg} genutzte Mechanismen der Suppression identifiziert werden: die Suppression durch inhibitorische Zytokine, die Suppression durch Zytolyse, die Suppression durch Störung der Metabolit-Verfügbarkeit und die Suppression durch die Modulation der Reifung oder der Funktion von dendritischen Zellen⁹⁵. Einige der Mechanismen wirken dabei auf alle genannten Zelltypen, während andere Mechanismen zelltypspezifisch zu sein scheinen. Die supprimierenden Zytokine IL-10 und/oder TGF- β können in membran-gebundener oder löslicher Form alle genannten Zelltypen inhibieren⁹⁶⁻⁹⁸. Aktivierte natürliche T_{reg} exprimieren außerdem Granzym A und TNF und sind in der Lage autologe Zielzellen, wie $CD4^+$ T-Zellen, $CD8^+$ T-Zellen, Monozyten und dendritische Zellen, zu lysieren⁷⁴. Bei Individuen mit der $C77G$ -Mutation wurden in dieser Arbeit für einige Mechanismen Hinweise auf eine verminderte Funktionsfähigkeit der T_{reg} gefunden (z.B. verminderte Expansion und Suppression), während $CD4^+$ T-Zellen von $C77G$ -Individuen gleichzeitig eine vermehrte Produktion von IL-2 und eine gesteigerte Proliferation zeigten und auch NK-

Zellen von C77G-Individuen eine verstärkte CD69-Expression und eine erhöhte Zytotoxizität aufwiesen. Daraus könnte man den Schluss ziehen, dass hyporeaktive T_{reg} bei C77G-Individuen zu einer reduzierten Vermeidung übermäßiger Immunreaktionen führen (Abb. 5.1), da die jeweiligen Effektorzellen in ihren Funktionen nicht ausreichend inhibiert werden. Was die Auswirkungen der C77G-Mutation auf B-Zellen, Monozyten/Makrophagen und dendritische Zellen angeht, gibt es erste Hinweise, allerdings müssten diese Lymphozytensubpopulationen erst noch eingehend untersucht werden.

Die CD45-Genvarianten gehören nach einem Modell von Marrack et al. zu den Genen, die das gesamte Reaktionsspektrum des Immunsystems und damit die Suszeptibilität für viele verschiedene Typen von Autoimmunerkrankungen beeinflussen⁹⁹. Der C77G-Polymorphismus stellt allerdings keinen Hauptrisikofaktor für die Entwicklung von Autoimmunerkrankungen dar, denn obwohl die phänotypischen Konsequenzen bei allen C77G-Individuen gleich sind, äußern sich funktionelle Konsequenzen anscheinend nur innerhalb eines bestimmten genetischen Hintergrundes. Die veränderten Reaktionen, die in dieser Arbeit gezeigt werden konnten, haben allein keine Krankheitskonsequenz. Dies wird schon allein dadurch gezeigt, dass alle untersuchten Zellen von gesunden Individuen stammten. Gene, die solche Effekte verursachen, werden auch als sogenannte „Modifier“-Gene bezeichnet und sind Varianten eines Gens, die die phänotypische Ausprägung eines anderen Gens modulieren können¹⁰⁰. Drei Klassen von Varianten können bei einem bestimmten Gen vorkommen: das Suszeptibilitäts-Allel (erhöht Krankheitsrisiko), das neutrale Allel (keine Auswirkung) und das protektive Allel (reduziert Krankheitsrisiko).

Eine Krankheitsassoziation des C77G-Polymorphismus konnte in einigen untersuchten Kollektiven mit Multipler Sklerose, Autoimmuner Hepatitis, Systemischer Sklerose, Langerhans-Zell-Hystiozytose und HIV-Infektionen nachgewiesen werden^{15,51-54,101}, in anderen Studien allerdings nicht^{10,55,56,102}, was die Einschätzung als Risikofaktor erschwert. Dass die CD45-Genvarianten dennoch eine Bedeutung in der Suszeptibilität für bestimmte Erkrankungen haben, bestätigen auch Untersuchungen von Individuen mit dem A138G Polymorphismus im Exon C des CD45-Gens¹⁰³. Der A138G-

Polymorphismus begünstigt das Spleißen zu niedermolekularen CD45-Isoformen und ist möglicherweise mit einer geringeren Suszeptibilität (protektives Allel) für bestimmte Erkrankungen assoziiert.

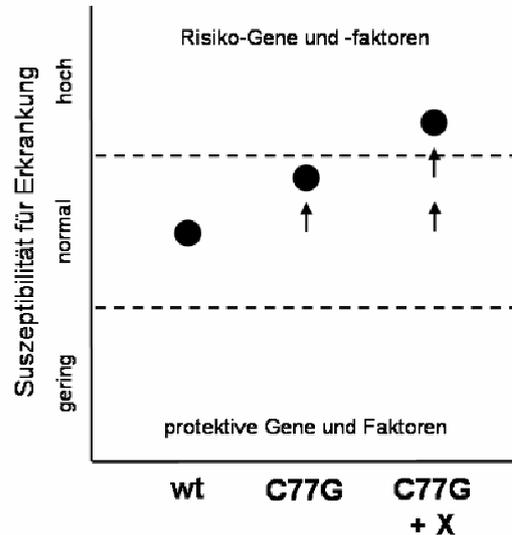


Abb. 5.2 Modellhafte Darstellung der Auswirkungen der C77G-Mutation als „Modifier“-Gen.

Der C77G-Polymorphismus ist möglicherweise ein „Modifier“-Gen, das die Suszeptibilität für bestimmte Erkrankungen erhöht (Suszeptibilitäts-Allel), also die Anfälligkeit von „normal“ in Richtung „hoch“ verschiebt, allein aber noch keine Krankheit auslöst. Erst wenn zusätzlich noch weitere Faktoren (X) dazukommen, steigt das Krankheitsrisiko.

Beim C77G-Polymorphismus handelt es sich aufgrund der erhöhten Aktivität von Effektorzellen und der gleichzeitig verminderten Aktivität von regulatorischen T-Zellen möglicherweise um ein „Modifier“-Gen, das die Suszeptibilität für bestimmte Erkrankungen erhöht (Suszeptibilitäts-Allel), also die Anfälligkeit von „normal“ in Richtung „hoch“ verschiebt (Abb. 5.2). Der Polymorphismus allein löst aber noch keine Krankheit aus. Erst wenn zusätzlich noch weitere Faktoren beziehungsweise ein bestimmter genetischer Hintergrund dazukommen, würde das Krankheitsrisiko eindeutig ansteigen. Insgesamt weisen die Daten darauf hin, dass die C77G-Genvariante des CD45-Gens ein „Modifier“-Gen sein könnte, allerdings sind noch weitere Untersuchungen notwendig, um zu analysieren in welchen genetischen Hintergründen die C77G-Mutation Auswirkungen hat.

6 Literatur

1. Hermiston, M. L., Xu, Z. & Weiss, A. CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells. *Annu Rev Immunol* 21, 107-37 (2003).
2. Holmes, N. CD45: all is not yet crystal clear. *Immunology* 117, 145-55 (2006).
3. Thomas, M. L. & Lefrancois, L. Differential expression of the leucocyte-common antigen family. *Immunol Today* 9, 320-6 (1988).
4. Lynch, K. W. & Weiss, A. A model system for activation-induced alternative splicing of CD45 pre-mRNA in T cells implicates protein kinase C and Ras. *Mol Cell Biol* 20, 70-80 (2000).
5. Leitenberg, D., Boutin, Y., Lu, D. D. & Bottomly, K. Biochemical association of CD45 with the T cell receptor complex: regulation by CD45 isoform and during T cell activation. *Immunity* 10, 701-11 (1999).
6. Alexander, D. R. The CD45 tyrosine phosphatase: a positive and negative regulator of immune cell function. *Semin Immunol* 12, 349-59 (2000).
7. Tchilian, E. Z. & Beverley, P. C. Altered CD45 expression and disease. *Trends Immunol* 27, 146-53 (2006).
8. Schwinzer, R. & Wonigeit, K. Genetically determined lack of CD45R- T cells in healthy individuals. Evidence for a regulatory polymorphism of CD45R antigen expression. *J Exp Med* 171, 1803-8 (1990).
9. Thude, H., Hundrieser, J., Wonigeit, K. & Schwinzer, R. A point mutation in the human CD45 gene associated with defective splicing of exon A. *Eur J Immunol* 25, 2101-6 (1995).
10. Ramanujam, R., Pirskanen, R. & Hammarstrom, L. The CD45 77C/G allele is not associated with myasthenia gravis - a reassessment of the potential role of CD45 in autoimmunity. *BMC Res Notes* 3, 292 (2010).
11. Lynch, K. W. & Weiss, A. A CD45 polymorphism associated with multiple sclerosis disrupts an exonic splicing silencer. *J Biol Chem* 276, 24341-7 (2001).
12. Zilch, C. F. et al. A point mutation within CD45 exon A is the cause of variant CD45RA splicing in humans. *Eur J Immunol* 28, 22-9 (1998).

13. Do, H. T., Baars, W., Borns, K., Windhagen, A. & Schwinzer, R. The 77C->G mutation in the human CD45 (PTPRC) gene leads to increased intensity of TCR signaling in T cell lines from healthy individuals and patients with multiple sclerosis. *J Immunol* 176, 931-8 (2006).
14. Windhagen, A., Sonmez, D., Hornig-Do, H. T., Kalinowsky, A. & Schwinzer, R. Altered CD45 isoform expression in C77G carriers influences cytokine responsiveness and adhesion properties of T cells. *Clin Exp Immunol* 150, 509-17 (2007).
15. Schwinzer, R. et al. Enhanced frequency of a PTPRC (CD45) exon A mutation (77C-->G) in systemic sclerosis. *Genes Immun* 4, 168-9 (2003).
16. Dawes, R. et al. Altered CD45 expression in C77G carriers influences immune function and outcome of hepatitis C infection. *J Med Genet* 43, 678-84 (2006).
17. Desai, D. M., Sap, J., Silvennoinen, O., Schlessinger, J. & Weiss, A. The catalytic activity of the CD45 membrane-proximal phosphatase domain is required for TCR signaling and regulation. *Embo J* 13, 4002-10 (1994).
18. Rothstein, D. M., Saito, H., Streuli, M., Schlossman, S. F. & Morimoto, C. The alternative splicing of the CD45 tyrosine phosphatase is controlled by negative regulatory trans-acting splicing factors. *J Biol Chem* 267, 7139-47 (1992).
19. Oberdoerffer, S. et al. Regulation of CD45 alternative splicing by heterogeneous ribonucleoprotein, hnRNPLL. *Science* 321, 686-91 (2008).
20. Topp, J. D., Jackson, J., Melton, A. A. & Lynch, K. W. A cell-based screen for splicing regulators identifies hnRNP LL as a distinct signal-induced repressor of CD45 variable exon 4. *Rna* 14, 2038-49 (2008).
21. Dawes, R. et al. Combinations of CD45 isoforms are crucial for immune function and disease. *J Immunol* 176, 3417-25 (2006).
22. Koretzky, G. A. Role of the CD45 tyrosine phosphatase in signal transduction in the immune system. *Faseb J* 7, 420-6 (1993).
23. Irie-Sasaki, J., Sasaki, T. & Penninger, J. M. CD45 regulated signaling pathways. *Curr Top Med Chem* 3, 783-96 (2003).
24. Roach, T. et al. CD45 regulates Src family member kinase activity associated with macrophage integrin-mediated adhesion. *Curr Biol* 7, 408-17 (1997).
25. Nguyen, J. T. et al. CD45 modulates galectin-1-induced T cell death: regulation by expression of core 2 O-glycans. *J Immunol* 167, 5697-707 (2001).

26. Amano, M., Galvan, M., He, J. & Baum, L. G. The ST6Gal I sialyltransferase selectively modifies N-glycans on CD45 to negatively regulate galectin-1-induced CD45 clustering, phosphatase modulation, and T cell death. *J Biol Chem* 278, 7469-75 (2003).
27. Berger, S. A., Mak, T. W. & Paige, C. J. Leukocyte common antigen (CD45) is required for immunoglobulin E-mediated degranulation of mast cells. *J Exp Med* 180, 471-6 (1994).
28. Hermiston, M. L., Zikherman, J. & Zhu, J. W. CD45, CD148, and Lyp/Pep: critical phosphatases regulating Src family kinase signaling networks in immune cells. *Immunol Rev* 228, 288-311 (2009).
29. McNeill, L. et al. The differential regulation of Lck kinase phosphorylation sites by CD45 is critical for T cell receptor signaling responses. *Immunity* 27, 425-37 (2007).
30. Hesslein, D. G. et al. Differential requirements for CD45 in NK-cell function reveal distinct roles for Syk-family kinases. *Blood* 117, 3087-95 (2011).
31. Irie-Sasaki, J. et al. CD45 is a JAK phosphatase and negatively regulates cytokine receptor signalling. *Nature* 409, 349-54 (2001).
32. Sgroi, D., Koretzky, G. A. & Stamenkovic, I. Regulation of CD45 engagement by the B-cell receptor CD22. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 4026-30 (1995).
33. Baldwin, T. A., Gogela-Spehar, M. & Ostergaard, H. L. Specific isoforms of the resident endoplasmic reticulum protein glucosidase II associate with the CD45 protein-tyrosine phosphatase via a lectin-like interaction. *J Biol Chem* 275, 32071-6 (2000).
34. van Vliet, S. J., Gringhuis, S. I., Geijtenbeek, T. B. & van Kooyk, Y. Regulation of effector T cells by antigen-presenting cells via interaction of the C-type lectin MGL with CD45. *Nat Immunol* 7, 1200-8 (2006).
35. Majeti, R., Bilwes, A. M., Noel, J. P., Hunter, T. & Weiss, A. Dimerization-induced inhibition of receptor protein tyrosine phosphatase function through an inhibitory wedge. *Science* 279, 88-91 (1998).
36. Xu, Z. & Weiss, A. Negative regulation of CD45 by differential homodimerization of the alternatively spliced isoforms. *Nat Immunol* 3, 764-71 (2002).
37. Majeti, R. et al. An inactivating point mutation in the inhibitory wedge of CD45 causes lymphoproliferation and autoimmunity. *Cell* 103, 1059-70 (2000).

38. Bilwes, A. M., den Hertog, J., Hunter, T. & Noel, J. P. Structural basis for inhibition of receptor protein-tyrosine phosphatase- α by dimerization. *Nature* 382, 555-9 (1996).
39. Nam, H. J., Poy, F., Saito, H. & Frederick, C. A. Structural basis for the function and regulation of the receptor protein tyrosine phosphatase CD45. *J Exp Med* 201, 441-52 (2005).
40. Dustin, M. L. Hunter to gatherer and back: immunological synapses and kinapses as variations on the theme of amoeboid locomotion. *Annu Rev Cell Dev Biol* 24, 577-96 (2008).
41. He, X., Woodford-Thomas, T. A., Johnson, K. G., Shah, D. D. & Thomas, M. L. Targeting of CD45 protein tyrosine phosphatase activity to lipid microdomains on the T cell surface inhibits TCR signaling. *Eur J Immunol* 32, 2578-87 (2002).
42. Thomas, M. L. The leukocyte common antigen family. *Annu Rev Immunol* 7, 339-69 (1989).
43. Irlles, C. et al. CD45 ectodomain controls interaction with GEMs and Lck activity for optimal TCR signaling. *Nat Immunol* 4, 189-97 (2003).
44. Pradhan, D. & Morrow, J. The spectrin-ankyrin skeleton controls CD45 surface display and interleukin-2 production. *Immunity* 17, 303-15 (2002).
45. Autero, M. et al. Tyrosine phosphorylation of CD45 phosphotyrosine phosphatase by p50csk kinase creates a binding site for p56lck tyrosine kinase and activates the phosphatase. *Mol Cell Biol* 14, 1308-21 (1994).
46. Fialkow, L., Chan, C. K. & Downey, G. P. Inhibition of CD45 during neutrophil activation. *J Immunol* 158, 5409-17 (1997).
47. Jacobsen, M. et al. A novel mutation in PTPRC interferes with splicing and alters the structure of the human CD45 molecule. *Immunogenetics* 54, 158-63 (2002).
48. Stanton, T. et al. CD45 variant alleles: possibly increased frequency of a novel exon 4 CD45 polymorphism in HIV seropositive Ugandans. *Immunogenetics* 56, 107-10 (2004).
49. Gomez-Lira, M. et al. CD45 and multiple sclerosis: the exon 4 C77G polymorphism (additional studies and meta-analysis) and new markers. *J Neuroimmunol* 140, 216-21 (2003).
50. Stanton, T. et al. A high-frequency polymorphism in exon 6 of the CD45 tyrosine phosphatase gene (PTPRC) resulting in altered isoform expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 5997-6002 (2003).

51. Tchilian, E. Z. et al. A point mutation in CD45 may be associated with an increased risk of HIV-1 infection. *Aids* 15, 1892-4 (2001).
52. Vogel, A., Strassburg, C. P. & Manns, M. P. 77 C/G mutation in the tyrosine phosphatase CD45 gene and autoimmune hepatitis: evidence for a genetic link. *Genes Immun* 4, 79-81 (2003).
53. Jacobsen, M. et al. A point mutation in PTPRC is associated with the development of multiple sclerosis. *Nat Genet* 26, 495-9 (2000).
54. Ballerini, C. et al. Protein tyrosine phosphatase receptor-type C exon 4 gene mutation distribution in an Italian multiple sclerosis population. *Neurosci Lett* 328, 325-7 (2002).
55. Barcellos, L. F. et al. PTPRC (CD45) is not associated with the development of multiple sclerosis in U.S. patients. *Nat Genet* 29, 23-4 (2001).
56. Vorechovsky, I. et al. Does 77C-->G in PTPRC modify autoimmune disorders linked to the major histocompatibility locus? *Nat Genet* 29, 22-3 (2001).
57. Wang, G. S. & Cooper, T. A. Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery. *Nat Rev Genet* 8, 749-61 (2007).
58. Tong, A., Nguyen, J. & Lynch, K. W. Differential expression of CD45 isoforms is controlled by the combined activity of basal and inducible splicing-regulatory elements in each of the variable exons. *J Biol Chem* 280, 38297-304 (2005).
59. Lynch, K. W. Consequences of regulated pre-mRNA splicing in the immune system. *Nat Rev Immunol* 4, 931-40 (2004).
60. Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29, e45 (2001).
61. Hoffmann, P., Eder, R., Kunz-Schughart, L. A., Andreesen, R. & Edinger, M. Large-scale in vitro expansion of polyclonal human CD4(+)CD25high regulatory T cells. *Blood* 104, 895-903 (2004).
62. Do, H. T., Baars, W. & Schwinzer, R. Functional significance of the 77C --> G polymorphism in the human CD45 gene: enhanced T-cell reactivity by variantly expressed CD45RA isoforms. *Transplant Proc* 37, 51-2 (2005).
63. Gervais, F. G. & Veillette, A. Reconstitution of interactions between protein-tyrosine phosphatase CD45 and tyrosine-protein kinase p56(lck) in nonlymphoid cells. *J Biol Chem* 272, 12754-61 (1997).

64. Tchilian, E. Z. et al. Altered CD45 isoform expression affects lymphocyte function in CD45 Tg mice. *Int Immunol* 16, 1323-32 (2004).
65. Campbell, D. J. & Ziegler, S. F. FOXP3 modifies the phenotypic and functional properties of regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 7, 305-10 (2007).
66. Sancho, D. et al. CD69 downregulates autoimmune reactivity through active transforming growth factor-beta production in collagen-induced arthritis. *J Clin Invest* 112, 872-82 (2003).
67. Kirchgessner, H. et al. The transmembrane adaptor protein TRIM regulates T cell receptor (TCR) expression and TCR-mediated signaling via an association with the TCR zeta chain. *J Exp Med* 193, 1269-84 (2001).
68. Yamanashi, Y., Kakiuchi, T., Mizuguchi, J., Yamamoto, T. & Toyoshima, K. Association of B cell antigen receptor with protein tyrosine kinase Lyn. *Science* 251, 192-4 (1991).
69. Yamanashi, Y. et al. Selective expression of a protein-tyrosine kinase, p56lyn, in hematopoietic cells and association with production of human T-cell lymphotropic virus type I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 6538-42 (1989).
70. Xu, Y., Harder, K. W., Huntington, N. D., Hibbs, M. L. & Tarlinton, D. M. Lyn tyrosine kinase: accentuating the positive and the negative. *Immunity* 22, 9-18 (2005).
71. Yang, Y. C. & Clark, S. C. Interleukin-3: molecular biology and biologic activities. *Hematol Oncol Clin North Am* 3, 441-52 (1989).
72. Del Prete, G. et al. Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. *J Immunol* 150, 353-60 (1993).
73. Wills-Karp, M. et al. Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science* 282, 2258-61 (1998).
74. Grossman, W. J. et al. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity* 21, 589-601 (2004).
75. Booth, N. J. et al. Different proliferative potential and migratory characteristics of human CD4⁺ regulatory T cells that express either CD45RA or CD45RO. *J Immunol* 184, 4317-26 (2010).
76. Baron, U. et al. DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3(+) conventional T cells. *Eur J Immunol* 37, 2378-89 (2007).

77. Hori, S., Nomura, T. & Sakaguchi, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299, 1057-61 (2003).
78. Tsang, J. Y. et al. Altered proximal T cell receptor (TCR) signaling in human CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Leukoc Biol* 80, 145-51 (2006).
79. Viglietta, V., Baecher-Allan, C., Weiner, H. L. & Hafler, D. A. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* 199, 971-9 (2004).
80. Ravichandran, K. S. & Burakoff, S. J. Evidence for differential intracellular signaling via CD4 and CD8 molecules. *J Exp Med* 179, 727-32 (1994).
81. Arrol, H. P., Church, L. D., Bacon, P. A. & Young, S. P. Intracellular calcium signalling patterns reflect the differentiation status of human T cells. *Clin Exp Immunol* 153, 86-95 (2008).
82. Yamada, H., Kishihara, K., Kong, Y. Y. & Nomoto, K. Enhanced generation of NK cells with intact cytotoxic function in CD45 exon 6-deficient mice. *J Immunol* 157, 1523-8 (1996).
83. Lanier, L. L. et al. Interleukin 2 activation of natural killer cells rapidly induces the expression and phosphorylation of the Leu-23 activation antigen. *J Exp Med* 167, 1572-85 (1988).
84. Hesslein, D. G., Takaki, R., Hermiston, M. L., Weiss, A. & Lanier, L. L. Dysregulation of signaling pathways in CD45-deficient NK cells leads to differentially regulated cytotoxicity and cytokine production. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 7012-7 (2006).
85. Chu, D. H., Morita, C. T. & Weiss, A. The Syk family of protein tyrosine kinases in T-cell activation and development. *Immunol Rev* 165, 167-80 (1998).
86. Muraro, P. A., Pette, M., Bielekova, B., McFarland, H. F. & Martin, R. Human autoreactive CD4+ T cells from naive CD45RA+ and memory CD45RO+ subsets differ with respect to epitope specificity and functional antigen avidity. *J Immunol* 164, 5474-81 (2000).
87. Thornton, A. M. & Shevach, E. M. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* 188, 287-96 (1998).
88. Piccirillo, C. A. & Shevach, E. M. Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells. *J Immunol* 167, 1137-40 (2001).

89. Lim, H. W., Hillsamer, P., Banham, A. H. & Kim, C. H. Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells. *J Immunol* 175, 4180-3 (2005).
90. Fallarino, F. et al. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol* 4, 1206-12 (2003).
91. Taams, L. S. et al. Modulation of monocyte/macrophage function by human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Hum Immunol* 66, 222-30 (2005).
92. Azuma, T., Takahashi, T., Kunisato, A., Kitamura, T. & Hirai, H. Human CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells suppress NKT cell functions. *Cancer Res* 63, 4516-20 (2003).
93. Ralainirina, N. et al. Control of NK cell functions by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *J Leukoc Biol* 81, 144-53 (2007).
94. Costantino, C. M., Baecher-Allan, C. M. & Hafler, D. A. Human regulatory T cells and autoimmunity. *Eur J Immunol* 38, 921-4 (2008).
95. Vignali, D. A., Collison, L. W. & Workman, C. J. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* 8, 523-32 (2008).
96. Nakamura, K., Kitani, A. & Strober, W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾ regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med* 194, 629-44 (2001).
97. Andre, S., Tough, D. F., Lacroix-Desmazes, S., Kaveri, S. V. & Bayry, J. Surveillance of antigen-presenting cells by CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in autoimmunity: immunopathogenesis and therapeutic implications. *Am J Pathol* 174, 1575-87 (2009).
98. Ghiringhelli, F. et al. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. *J Exp Med* 202, 1075-85 (2005).
99. Marrack, P., Kappler, J. & Kotzin, B. L. Autoimmune disease: why and where it occurs. *Nat Med* 7, 899-905 (2001).
100. Nadeau, J. H. & Topol, E. J. The genetics of health. *Nat Genet* 38, 1095-8 (2006).
101. Boxall, S. et al. Abnormal cell surface antigen expression in individuals with variant CD45 splicing and histiocytosis. *Pediatr Res* 55, 478-84 (2004).

102. Kirsten, H. et al. No association between systemic sclerosis and C77G polymorphism in the human PTPRC (CD45) gene. *J Rheumatol* 35, 1817-9 (2008).
103. Boxall, S. et al. Disease associations and altered immune function in CD45 138G variant carriers. *Hum Mol Genet* 13, 2377-84 (2004).

Bisherige wissenschaftliche Tätigkeit

Manuskripte

Pokoyski C., Lienen T., Schock E., Plege-Fleck A., Geffers R., Schwinzer R. Altered CD45 isoform combination in C77G carriers influences the function of CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺ regulatory T cells. Manuskript in Vorbereitung.

Gabaev I., Steinbrück L., Pokoyski C., Pich A., Schwinzer R., Schulz T.F., Jacobs R., Messerle M., Kay-Jackson P.C. The Human cytomegalovirus UL11 Protein Interacts with the Receptor Tyrosine Phosphatase CD45, Resulting in Functional Paralysis of T Cells. Plos Pathog 7(12) (2011).

Wilk E., Marquardt N., Pokoyski C., Schmidt R.E., Jacobs R. Murine CXCR3⁺CD27^{high} NK cells resemble the human CD56bright NK cell population. Eur J Immunol. May: 40(5):1428-39 (2010).

Vorträge und Posterpräsentationen

Pokoyski C., Lienen T., Borns K., Schwinzer R. Role of CD45 isoforms in the function of CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺ regulatory T cells.
40. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunology, Leipzig (2010).
(Vortrag und Poster)

Pokoyski C., Lienen T., Borns K., Schwinzer R. Role of CD45 isoforms in the function of CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺ regulatory T cells.
8. Treffen des Arbeitskreises Transplantationsimmunologie der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, Würzburg (2010).
(Vortrag)

Pokoyski C., Baars W., Borns K., Schwinzer R. CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells of individuals carrying the CD45 C77G polymorphism show an impaired suppressive capacity.
6. Spring School on Immunology der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, Ettal (2010).
(Poster)

Kellner C., Vondran F., Miest M., Schwinzer R. The CD45 C77G polymorphism: studies in healthy individuals and transplant recipients.
6. Treffen des Arbeitskreises Transplantationsimmunologie der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, Hannover (2008).
(Vortrag)

Kellner C., Baars W., Borns K., Schwinzer R. Characterization of CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells in individuals carrying the CD45 C77G polymorphism. Joint Annual Meeting of Immunology of the Austrian and German Societies, Wien (2008).
(Poster)

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Claudia Pokoyski, geb. Kellner
Geburtstag	29.06.1981
Geburtsort	Wippra
Familienstand	verheiratet, 2 Kinder

Schulbildung

Juni 2000	Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife auf dem Gymnasium am Markt Hettstedt (Note 1,7)
------------------	--

Hochschulstudium

Oktober 2000 – August 2006	Studium der Biologie an der Universität Hannover Diplomarbeit zu dem Thema: „Charakterisierung muriner NK-Zellsubpopulationen“ in der Klinik für Immunologie und Rheumatologie an der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH) unter Betreuung von Prof. Dr. R. Jacobs Note Diplomprüfung: 1,0
Februar 2004 – August 2004	2 Auslandssemester an der Central Queensland University, Australien

Promotion

seit Oktober 2006	wissenschaftliche Mitarbeiterin im Transplantationslabor der Klinik für Viszeral- und Transplantationschirurgie der MHH mit dem Ziel der Promotion im Rahmen eines durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft geförderten Projekts
--------------------------	---

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Reinhard Schwinzer möchte ich sehr herzlich für die Betreuung meiner Doktorarbeit danken. Seine ständige Diskussionsbereitschaft und viele hilfreiche Denkanstöße haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Außerdem möchte ich mich bei ihm für die Bereitstellung des gut ausgestatteten Arbeitsplatzes in dem von ihm geleiteten Transplantationslabor bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. Roland Jacobs bedanke ich mich für die Bereitschaft der Übernahme des Korreferats.

Den Mitarbeitern des Transplantationslabors danke ich für die gute Arbeitsatmosphäre und die große Hilfsbereitschaft. Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. Annegret Pflege-Fleck für die gute Zusammenarbeit und die vielen hilfreichen Diskussionen. Dr. Joachim Hundrieser danke ich für die gewissenhafte Korrektur dieser Arbeit. Ganz herzlich danke ich auch Sonja Kollrich, Katja Borns, Lilli Kraus und Wiebke Baars, die mich bei der praktischen Arbeit unterstützt haben.

Besonderer Dank gilt außerdem meiner Familie. Vor allem meinem Mann Ronald danke ich für seine Unterstützung in den letzten Jahren.

Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (Projekt: Schw437/2) gefördert.

Erklärung

Hierdurch erkläre ich, dass ich meine Dissertation mit dem Titel „Der C77G-Polymorphismus im CD45-Gen des Menschen: Phänotypische und funktionelle Auswirkungen in unterschiedlichen Lymphozytensubsets“ selbständig verfasst und die benutzten Hilfsmittel und Quellen sowie gegebenenfalls die zu Hilfeleistungen herangezogenen Institutionen vollständig angegeben habe.

Die Dissertation wurde nicht schon als Masterarbeit, Diplomarbeit oder andere Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, den 15.12.2011

Claudia Pokoyski