

Bedeutung des Transkriptionsfaktors Foxp3 für die T-Zell Funktion

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation
von

Dipl. Biol. Frank Ocklenburg
geboren am 24.9.1970 in Hamburg

Hannover, 2005

Referent: Prof. Dr. W. Müller
Korreferent: Prof. Dr. H. Holtmann
Tag der Promotion: 20.07.2005

Abstract

CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell (T_{reg}) development and function are critically dependent on the forkhead transcription factor Foxp3. These T_{reg} cells have emerged as a unique population of suppressor T cells involved in the maintenance of peripheral tolerance in transplantation and autoimmunity. Critical target genes of the Foxp3-dependent transcriptional control are still ill-defined, but would enable a better understanding and manipulation of T_{reg} cells in different clinical settings.

Therefore, we applied a system of retroviral overexpression of Foxp3 in human allo-reactive CD4⁺ T helper (T_h) cells to induce a regulatory phenotype and to elucidate critical targets of Foxp3. We observed that retroviral transduction of Foxp3 in T_h cells (T_hFoxp3) was able to induce a regulatory phenotype similar to naturally derived T_{reg} cells expanded by allogenic stimulation and IL-2 *in vitro*. This included an anergic proliferative response upon T cell receptor (TCR) stimulation and suppression of allo-reactive T_h cell proliferation. Contrary to Foxp3, Ctla4 overexpression did not induce a regulatory phenotype in T_h cells. Foxp3-overexpression in T_hFoxp3 cells up-regulated protein expression of CD25, CD28, Ctla4, and IL-10, and regulated the mRNA expression of several genes similar to naturally derived T_{reg} cells, e.g. up-regulation of interleukin-1 receptor 2 (IL1R2) and down-regulation of IL-4 and IL-5. Using GeneChip analysis, we compared the transcriptome of naturally derived T_{reg} cells with that of Foxp3-engineered T_h cells and identified a small set of genes similarly regulated, thus representing Foxp3-dependent target genes. One of these, the ubiquitin-like gene diubiquitin (UBD), represented an interesting gene potentially involved in the regulatory phenotype, as other ubiquitin ligases play an essential role in the regulation of anergy. Therefore, we analyzed the functional outcome of UBD-overexpression in T_h cells (T_hUBD). Our results provide evidence that UBD directly contributes to the Foxp3-dependent regulatory phenotype in that it up-regulates expression of CD25, while down-regulating IL-4 and IL-5 mRNA expression, similar to Foxp3. Moreover, overexpression of UBD in T_hUBD cells impairs T cell proliferation not associated with the induction of Foxp3. As UBD is up-regulated in T_{reg} cells after stimulation but not in CD4⁺CD25⁺ T_{reg} cells analyzed *ex vivo*, its main contribution might be the maintenance of the anergic phenotype after T_{reg} cell activation. Interestingly, Foxp3 and UBD were up-regulated upon TCR stimulation in

the presence of cyclosporine A, suggesting cyclophilin inhibitors as potential adjuncts for the *in vitro* manipulation of T_{reg} cells.

In summary, we provide evidence that UBD presents a critical Foxp3-dependent target gene that contributes mainly to the maintenance of the anergic phenotype of regulatory T cells after activation.

Keywords:

CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells, Foxp3, Diubiquitin

Zusammenfassung

Die Entwicklung und Funktion von CD4⁺CD25⁺ regulatorischer T-Zellen (T_{reg}) ist absolut abhängig von der Funktion des Transkriptionsfaktors Foxp3. CD4⁺CD25⁺-T_{reg}-Zellen sind eine distinkte Population von Suppressor-T-Zellen, welche entscheidend an der Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz beteiligt sind. Allerdings sind wichtige Ziel-Gene, welche einen wesentlichen Beitrag zur Foxp3-abhängigen Genregulation leisten, nur schlecht charakterisiert. Die Identifizierung solcher Ziel-Gene leistet einen entscheidenden Beitrag zu einem besseren Verständnis regulatorischer T-Zellen und der Möglichkeit gezielter Manipulationen im Rahmen geplanter klinisch angewandter regulatorischer T-Zell-Therapien.

Zu diesem Zweck wurde ein System der retroviralen Überexpression von Foxp3 in humanen allo-reaktiven CD4⁺-T_h-Zellen (T_h) zur Induktion eines regulatorischen Phänotyps etabliert. Dies sollte die Identifikation von Foxp3-abhängigen Ziel-Genen ermöglichen. Die retrovirale Überexpression von Foxp3 in T_h-Zellen (T_hFoxp3) führte zu einem regulatorischen Phänotyp vergleichbar dem von T_{reg}-Zellen, welche durch allogene Stimulation und IL-2 *in vitro* expandiert wurden. T_hFoxp3-Zellen wuchsen nicht mehr nach alleiniger T-Zell Rezeptor (TCR) Stimulation ohne exogenes Interleukin-2 (IL-2) (Anergie) und unterdrückten die Proliferation allo-stimulierter T_h-Zellen. Diese Eigenschaften wurden nicht in GFP-Kontroll-Zellen (T_hGFP) oder Ctla4-überexprimierenden T_h-Zellen (T_hCtla4) beobachtet. Foxp3-Überexpression führte zur Induktion der Proteine CD25, CD28, Ctla4 und IL-10. Weiterhin wurde die Genexpression einiger Gene in gleicher Weise verändert wie es in T_{reg}-Zellen zu beobachten war; z.B. wurde Interleukin-1 Rezeptor 2 (IL1R2) induziert und die IL-4- und IL-5-Expression unterdrückt. Mit Hilfe von GeneChip-Analysen wurde daher das Transkriptom der *in vitro* expandierten T_{reg}-Zellen mit dem der Foxp3-transduzierten T_h-Zellen verglichen. Hierbei wurde eine kleine Anzahl ähnlich regulierter Gene identifiziert, welche somit als Foxp3-abhängige Ziel-Gene zu betrachten waren. Da ubiquitinierende Enzyme eine Kontrolle der T-Zell Anergie ausüben, erschien das Foxp3-induzierte Gen Diubiquitin (UBD) besonders interessant. Daher untersuchten wir die Veränderungen der T_h-Zell Funktion nach UBD-Überexpression durch retroviralen Gentransfer. Unsere Ergebnisse belegen eine direkte Beteiligung von UBD an der Foxp3-abhängigen Kontrolle des regulatorischen Phänotyps. UBD-Überexpression induziert die Protein-Expression von CD25 in T_h-Zellen, während die Genexpression von IL-4 und IL-5 wie in T_hFoxp3-Zellen unterdrückt wird. Weiterhin

weisen T_h UBD-Zellen eine Beeinträchtigung ihrer Proliferation auf, ohne dabei die Foxp3-Expression zu induzieren. Da UBD nicht in *ex vivo* analysierten $CD4^+CD25^+$ - T_{reg} -Zellen signifikant reguliert ist, kommt UBD eine wesentliche Funktion in der Aufrechterhaltung der anergen Eigenschaften von T_{reg} -Zellen nach deren Aktivierung zu. Interessanterweise wurden sowohl Foxp3 als auch UBD durch Cyclosporin-A (CSA) bei der TCR-Stimulation hoch-reguliert. Hiermit könnte Cyclophilin-Inhibitoren wie CSA eine Rolle bei der Manipulation von T_{reg} -Zellen *in vitro* zukommen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass UBD ein wichtiges Foxp3-abhängiges Ziel-Gen mit einer entscheidenden Funktion für die Aufrechterhaltung des anergen Phänotyps aktivierter T_{reg} -Zellen darstellt.

Schlagworte:

$CD4^+CD25^+$ regulatorische T-Zellen, Foxp3, Diubiquitin

Inhaltsverzeichnis

Abstract	3
Zusammenfassung	5
Inhaltsverzeichnis	7
Abkürzungsverzeichnis	12
1. Einleitung	15
1.1 T-Zell Toleranz	15
1.2 Periphere Toleranzmechanismen	16
1.3 Regulatorische T-Zellen	17
1.3.1 Toleranz und regulatorische T-Zellen	17
1.3.2 Funktionelle Charakteristika von CD4 ⁺ CD25 ⁺ T _{reg} Zellen	18
1.4 Der Transkriptionsfaktor Foxp3	20
1.5 Zielsetzung der Arbeit	23
2. Material und Methoden	24
2.1 Versuchorganismen	24
2.1.1 Bakterienstamm	24
2.1.2 Zelllinien	24
2.1.3 Humane Zellen	24
2.2 Kulturmedien	24
2.2.1 Kulturmedien und Zusätze für Bakterien	24
2.2.2 Kulturmedium und Zusätze für tierische Zellen	25
2.3 Antikörper	25
2.3.1 Antikörper für FACS-Analysen humaner T-Zellen	25
2.3.2 Antikörper zur Stimulation humaner T-Zellen	26
2.3.3 Antikörper für FACS-Analysen von Mauszellen	26
2.3.4 Antikörper murin zur Stimulation von Maus T-Zellen	26
2.3.5 Antikörper für Western Blots	26
2.4 Primer	27
2.4.1 Primer semiquantitative PCR	27
2.4.2 Primer für Klonierungen	28
2.4.3 Primer für Realtime-RT-PCR	28
2.5 Chemikalien	29
2.6 Verbrauchsmaterial	31
2.7 Geräte	31
2.8 Kits	32

2.9	Restriktionsenzyme	33
2.10	Vektoren	33
3. Methoden		35
3.1	Medien und Zellen	35
3.1.1	Medien und Kultivierungsbedingungen	35
3.1.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen	35
3.1.3	Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung	35
3.2	Zellisolationstechniken	36
3.2.1	<i>Ficoll Hypaque</i> -Gradientenzentrifugation	36
3.2.2	MACS-Zell-Separation	36
3.2.3	Zellsortieren	37
3.3	Kultivierung der T-Zellen	37
3.3.1	Kultivierung der humanen CD4 ⁺ T-Zellen	37
3.3.2	Kultivierung der Maus Hybridom-Zellen	37
3.3.3	T-Zell-Funktions-Assays	38
3.3.4	Proliferationsbestimmungen	38
3.4	Durchflusszytometrische Analytik (FACS)	39
3.4.1	FACS-Analysen	39
3.5	Calciummessungen	40
3.6	Quantitative Zytokinbestimmungen von IL-10 und IFN- γ	41
3.7	Retroviraler Gentransfer	41
3.7.1	Gentransfer in humane T _h -Zellen	42
3.7.2	Gentransfer in murine Hybridomzellen	42
3.8	Luciferase-Assays	43
3.9.	Molekularbiologische Methoden	44
3.9.1	Arrayanalysen	44
3.9.2	Agarose-Gelelektrophoresen	44
3.9.3	Isolierung von Gesamt-RNA	45
3.9.4	Isolierung von Plasmid-DNA	45
3.9.5	Aufreinigung von DNA	45
3.9.6	Bestimmung von Nukleinsäure mittels des Photometers	45
3.9.7	Fällung von RNA	46
3.9.8	Reverse Transkription (RT)	46

3.9.9	Polymerasekettenreaktion (PCR)	47
3.9.9.1	Semiquantitative PCR	47
3.9.9.2	Amplifikation mit <i>High Fidelity</i> Pfu-Polymerase	48
3.9.9.3	<i>RealTime</i> RT-PCR	49
3.9.10	Dephosphorylieren von Vektoren	51
3.9.11	Klonierungen	51
3.9.11.1	Ligation in pCR ^R 4.1Blunt-TOPO	51
3.9.11.2	Ligation in andere Vektoren	51
3.9.12	Klonierungsstrategien	52
3.9.12.1	Retrovirale Überexpression	52
3.9.12.2	<i>Luciferase</i> -Vektor	52
3.10	Mikrobiologische Methoden	53
3.10.1	Transformationen	53
3.10.2	Animpfen von Flüssigkeitskulturen	53
3.10.3	Herstellen von Bakterienstocks	54
3.10.4	Transfektionen	54
3.10.4.1	Transfektion der Verpackungszellen PT67 und GPE86 ⁺	54
3.10.4.2	Transiente Transfektion mit DEAE-Dextran	55
3.11	Proteinchemische Arbeitsmethoden	55
3.11.1	Western Blot	55
4.	Ergebnisse	58
4.1.	Funktionelle Tests CD4 ⁺ CD25 ^{high} abstammender <i>in vitro</i> generierter T _{reg} -Zellen	58
4.1.1	<i>In vitro</i> expandierte T _{reg} -Zellen bleiben anerg und regulatorisch	59
4.1.2	CD4 ⁺ CD25 ^{high} T _{reg} -Zellen können direkt <i>ex vivo</i> durch allogene Stimulation und IL-2 expandiert werden	61
4.1.3	Zellkontakt-abhängige Suppressor-Funktion von T _{reg} -Zellen	62
4.1.5	Einfluß der Fixation auf die Suppressor-Funktion von T _{reg} -Zellen	62
4.1.2	Stabiler CD4 ⁺ CD25 ^{high} Phänotyp <i>in vitro</i> expandierter T _{reg} -Zellen	63
4.2	Foxp3-Expressionsunterschiede	64
4.3	Cyclosporineffekte	65

4.3.1	<i>In vitro</i> -Effekt von Cyclosporin (CSA) auf CD4 T _h Zellen	65
4.3.2	Auswirkungen von CSA auf Foxp3-Expression	66
4.4	Calciumflux	67
4.5	T-Zell-Rezeptor (TCR)-Regulation	69
4.6	Foxp3-Transduktion humaner allo-reaktiver T _h -Zellen induziert einen regulatorischen Phänotyp	70
4.6.1	Vergleichende funktionelle Tests von T _h GFP, T _h Ctla4 und T _h Foxp3 Zellen	71
4.6.2	Ctla4 Expression von T _h GFP, T _h Ctla4-4 und T _h Foxp3 Zellen	72
4.6.3	Semiquantitative PCR für Ctla4	72
4.6.4	Antikörper gegen Ctla4 haben keinen Einfluss auf T _{reg} - oder T _h Ctla4 Zellfunktion	73
4.6.5	TCR-Kinetik für T _h GFP, T _h Ctla4 und T _h Foxp3	74
4.6.7	Foxp3 <i>Real Time</i> -PCR	75
4.7	Murine Hybridomzellen (16.2.11-Zellen) als Testsystem für Foxp3-Effekte	76
4.7.1	NFAT-Aktivierung und CD25-Expression	76
4.8	Einfluss von Foxp3 auf die CD25- und CD28-Expression in T _h Foxp3 Zellen	77
4.8.1	Funktionelle Unterschiede von T _h Foxp3-Zellen mit unterschiedlicher CD25-Expression	78
4.9	Identifikation von UBD als Foxp3-abhängiges Gen	80
4.9.1	UBD beeinflusst die CD25-Expression in T _h -Zellen	84
4.9.2	Funktionelle Veränderungen von T _h UBD Zellen	84
4.9.3	Semiquantitative PCRs zur weiteren Charakterisierung von T _h UBD Zellen	86
4.9.4	<i>Real Time</i> PCRs für LGALS3	87
4.9.5	<i>Western Blot</i> für Foxp3	89
4.9.6	Vergleichende Ca ²⁺ -Flux Messungen für T _h GFP, T _h Foxp3 und T _h UBD Zellen	89
4.9.7	Ionomycin induziert die UBD Expression	90
4.9.8	Cyclosporin-A induziert die UBD Expression	93

5. Diskussion	96
5.1 Charakterisierung von CD4 ⁺ CD25 ⁺ regulatorischen T-Zellen	96
5.2 Isolation und <i>in vitro</i> Expansion humaner regulatorischer CD4 ⁺ CD25 ^{high} T-Zellen	96
5.3 Funktion und Phänotyp der <i>in vitro</i> expandierten humanen CD4 ⁺ CD25 ^{high} T _{reg} -Zellen	97
5.4 Regulatorische CD4 ⁺ CD25 ⁺ T-Zellen: Calciumflux und TCR-Regulation	98
5.5 Foxp3-abhängige transkriptionelle Kontrolle	99
5.6 Der Einfluß von Foxp3 auf die Expression von CD25 und CD28	101
5.7 Transkriptomanalyse zur Bestimmung Foxp3-abhängiger Gene	102
5.8 Der Beitrag von UBD zur Foxp3-abhängigen transkriptionellen Kontrolle	102
5.9 Cyclosporin A als Modulator von Foxp3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ^{high} T-Zellen	106
6. Ausblick	109
Literatur	110
Veröffentlichungen	116
Danksagung	117
Lebenslauf	119
Eidesstattliche Erklärung	121

Abkürzungsverzeichnis

A	Purinbase Adenin
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
Aq. Bideest	bidestilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Pyrimidinbase Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CD3	Assoziiert mit dem Antigenrezeptor von T-Zellen
CD4	Corezeptor für MHC-Klasse-II-Moleküle
CD25	α -Kette des IL-2-Rezeptors
CD28	Rezeptor für costimulierendes Signal (Signal II)
cDNA	complementary DNA, komplementäre DNA
Ci	Curie
cpm	counts per minute, Zerfälle pro Minute
CSA	Cyclosporin
Ctla4	Cytotoxic T lymphocyte antigen
d	Tag
DEAE	Diethylaminoethyl-Dextran-Hydrochlorid
Del.	Deletion
DMFA	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
denat.	denaturierend
DNA	Desoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
Ex	Exon
FKS	Fötale Kälberserum
FL	<i>Firefly</i> Luciferase
Foxp3	Forkhead box P3
G	Purinbase Guanin
g	Gramm, Erdbeschleunigung
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HE	Haematoxylin
HO	Hämoxigenase
H ₂ O	Wasser
IFN- γ	Interferon gamma
IL-2	Interleukin 2
IL-5	Interleukin 5
IL-4	Interleukin 4
IL-10	Interleukin 10

IPEX	<i>Immune dysregulation, polyendocrinopathy X-linked syndrom</i>
IPTG	Isopropyl- β -G-thiogalaktosid
kb	Kilobasenpaar(e)
kDa	Kilodalton
l	Liter
LGALS3	<i>Lectin, Galaktoside-binding, soluble, 3</i>
M	Molar
m	milli-
mA	Milliampere
Mb	Megabasenpaare
mg	Milligramm
min	Minute(n)
mM	Millimolar
mRNA	messenger RNA, Boten RNA
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
μ	mikro-
n	nano-
NaOAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
Na ₃ PO ₄	Natriumphosphat
NFATC1	<i>Nuclear factor of activated T-cells Variante 1</i>
n.s.	<i>not significant</i>
OD	Optische Dichte
p	pico-
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerase Kettenreaktion
pH	negativ dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionenkonzentration
RL	Renilla Luciferase
RL/FL	Quotient Renilla/Firefly Luciferase
RNA	Ribonucleicacid, Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RPS9	Ribosomales Protein S9
rRNA	ribosomale RNA
rpm	Rotationen Pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription
RT-PCR	PCR nach reverser Transkription
s	Sekunde
s	Standardabweichung
<i>scurfy</i>	Foxp3 defiziente Maus (natürliche Mutante)
SDS	Natriumdodecylsulfat
t	Zeitpunkt (-raum)
T	Pyrimidinbase Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	Tris buffered saline
TCR	T-Zell-Rezeptor
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
TE	Tris-EDTA-Puffer
T _h	CD4 ⁺ T-Helfer Zellen
T _h Ctla4	T _h -Zellen transduziert mit dem Gen für CTLA-4

T _h Foxp3	T _h -Zellen transduziert mit dem Gen für Foxp3
T _h GFP	T _h -Kontrollzellen nur mit GFP transduziert
T _h UBD	T _h -Zellen transduziert mit dem Gen für UBD
T _{reg}	CD4 ⁺ CD25 ^{high} abgeleitete regulatorische T-Zellen
Tris	Trishydroxyethylamin
U	Unit
UBD	Diubiquitin
üN	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen
v/v	Volumeneinheit pro Volumeneinheit
w/v	Gewichtseinheit pro Volumeneinheit
W	Watt
wt	Wildtyp
x	Arithmetischer Mittelwert
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

1. Einleitung

1.1 T-Zell Toleranz

Die Hauptaufgabe des spezifischen Immunsystems ist die Unterscheidung zwischen Selbst- und Fremd-Antigenen und die Bildung eines spezifischen immunologischen Gedächtnisses. T-Zellen erkennen dabei mittels ihres T-Zell Rezeptors (TCR) körpereigene *veränderte* Zellen (z.B. eine Virus-infizierte Körperzelle). Der TCR von $CD4^+$ - T_h -Zellen erkennt dabei ein antigenes Peptid im Komplex mit eigenen MHC Klasse II Molekülen (*major histocompatibility complex*), zytotoxische $CD8^+$ -T-Zellen dagegen erkennen ein antigenes Peptid im Komplex mit eigenen MHC Klasse I Molekülen. Da Fremd-Erkennung somit die des *veränderten* Selbst (fremdes Antigen in eigenem MHC) darstellt, ergibt sich die Notwendigkeit eines engen Kontrollsystems. Dieses beginnt bei der Entwicklung des TCR-Repertoires im Thymus (zentrale Toleranz) und wird durch verschiedenste Mechanismen bei der Kontrolle der T-Zell Aktivierung post-thymischer T-Zellen in der Peripherie (periphere Toleranz) fortgesetzt, um die immunologische Homeostase aufrechtzuerhalten.

Da das TCR-Repertoire groß und flexibel genug sein muss, um auf alle potentiellen Umweltantigene reagieren zu können, kann es nicht chromosomal vererbt sein. Diese Vielfalt und Flexibilität wird durch die Umlagerung von diversen Keimbahngenen, bei der sog. V(D)J-Umlagerung der sich im Thymus entwickelnden T-Zellen, gewährleistet. Hierbei wird eine enorme Vielfalt an unterschiedlichen $TCR_{\alpha\beta}$ -Rezeptoren (bzw. $TCR_{\gamma\delta}$ Rezeptoren bei $\gamma\delta$ -T-Zellen) durch stochastische Zusammenlagerung von genomischen Bausteinen aus jeweils ca. 20 verschiedenen variablen (V) Genen mit verschiedenen Verbindungsstücken (D und J Elementen) und einem konstanten Teil (C) gewährleistet. Diese Vielfalt wird durch die variablen Verbindungen der einzelnen Elemente durch das Einführen von Nukleotiden durch die terminale Deoxy-Nukleotidyl Transferase (TdT) potenziert. Ein großer Teil der Thymozyten bildet dabei allerdings keinen funktionstüchtigen TCR. Andererseits entstehen dabei auch immer $TCR_{\alpha\beta}$ -Rezeptoren mit hoher Affinität zum eigenen MHC, welche potentiell auto-reaktiv sind. Die meisten dieser potentiell auto-reaktiven Thymozyten überleben die Thymusentwicklung nicht (negative Selektion). Eine wesentliche Voraussetzung hierfür ist unter anderem, dass möglichst viele Differenzierungsantigene im Thymus präsentiert werden. Dies wird durch den transkriptionellen Aktivator AIRE (*autoimmune regulator*) in Thymusepithelzellen

gewährleistet, der die ektope Expression von verschiedensten Differenzierungsantigenen (z.B. von pankreatischen β -Zellen wie Insulin) im Thymusepithel ermöglicht.

Die Mechanismen der zentralen Toleranz (negative Selektion von auto-reaktiven T-Zellen) sind jedoch nicht komplett. Somit müssen weitere *periphere* Toleranz-Mechanismen bestehen, um die immunologische Homeostase aufrechtzuerhalten. Hierbei gibt es unterschiedliche Mechanismen der Kontrolle, wobei besonders den Foxp3-abhängigen $CD4^+CD25^+$ -T_{reg} Zellen eine wichtige Bedeutung zukommt.

1.2 Periphere Toleranzmechanismen

Man unterscheidet bei der Kontrolle der peripheren T-Zellaktivierung zwischen intrinsischen und extrinsischen Mechanismen. Ein wichtiger intrinsischer Kontrollmechanismus naiver T-Zellen stellt die Notwendigkeit eines zusätzlichen co-stimulatorischen Signals über den CD28-Rezeptor dar. Dies hat zur Folge, dass eine TCR-Stimulation ohne Co-Stimulation zur Induktion einer Toleranz, Anergie oder Apoptose einer T-Zelle führt. Diese erklärt auch die Notwendigkeit, dass co-stimulatorische Moleküle kontrolliert auf professionell Antigen-präsentierende Zellen (dendritische Zellen, DC) und nicht auf jeder Körperzelle expremiert werden. Nur im aktivierten Zustand expremieren DCs ein breites Spektrum von verschiedensten co-stimulatorischen Signalmolekülen. Die Qualität einer T-Zell-Stimulation wird aber nicht nur durch positive co-stimulatorische Moleküle, sondern auch durch negative Signalmoleküle wie Ctl4 und PD-1 kontrolliert und moduliert.

Andererseits kann eine zu starke TCR-Stimulation ebenfalls zum Zelltod führen (AICD = *Activation Induced Cell Death*), was am ehesten damit zu erklären ist, dass dadurch eine überschießende Immunreaktion unterbunden und ein damit verbundener Kollateralschaden vermieden werden soll.

Dendritische Zellen sind aber nicht nur für die Induktion einer effektiven Immunreaktion, sondern auch für die direkte Kontrolle der peripheren Toleranz verantwortlich ²¹. Wie oben beschrieben, expremieren DCs ihre co-stimulatorischen Moleküle nur nach Aktivierung, wobei sie zu potenten Immunstimulatoren ausreifen. Dies geschieht z.B. bei drohender Gefahr (*danger mode*) ⁴⁹ durch eine Virus- oder bakterielle Infektion. Im ruhenden, nicht-aktivierten bzw. unreifen Zustand haben sie dagegen die Eigenschaft, eine Toleranz-erhaltende Funktion auszuüben. Man spricht in diesem Zusammenhang auch von tolerogenen DCs. So sind tolerogene DCs in der

Lage, T-Zellen mit regulatorischen Eigenschaften zu induzieren^{40,82}, andererseits können regulatorische T-Zellen ihrerseits die Ausreifung von DCs behindern und so eine Immunantwort modulieren⁵¹.

1.3 Regulatorische T-Zellen

Neben natürlich vorkommenden regulatorischen CD4⁺CD25⁺-T_{reg} Zellen, die sich Foxp3-abhängig entwickeln, sind auch andere T-Zellen mit suppressiven Eigenschaften bekannt. Dazu gehören z.B. CD8⁺CD28⁻-T-Zellen, welche zumindest beim Menschen ebenfalls Foxp3 exprimieren¹⁷, aber auch NK-T-Zellen und doppel-negative (CD4⁻CD8⁻) T-Zellen¹¹. Bei den CD4⁺-regulatorischen T-Zellen differenziert man heutzutage wenigstens drei unterschiedliche Typen. Diese unterscheiden sich in ihrer Entwicklung, durch die Expression von Foxp3 und dem Mechanismus ihrer suppressiven Eigenschaft. T_R1-Zellen entwickeln sich *in vitro* durch IL-10-behandelte DCs oder durch Vitamin-D3/Dexamethason. Sie können ebenfalls durch CD4⁺CD25⁺-T_{reg} Zellen induziert werden³⁶, was man als mögliche Erklärung des Phänomens der infektiösen Toleranz ansieht. Hierbei können regulatorische T-Zellen mit einer bestimmten Antigen-Spezifität andere regulatorische T-Zellen verschiedener Spezifität instruieren. T_R1-Zellen produzieren im wesentlichen IL-10, nicht aber andere T_H2 Zytokine wie IL-4 und IL-5 und entwickeln sich unabhängig von Foxp3⁷². Im Zusammenhang mit oraler Toleranz wurden sog. T_H3-Zellen charakterisiert, deren Entwicklung ebenfalls Foxp3-unabhängig erfolgt. Wie T_R1-Zellen, können auch T_H3-Zellen durch T_{reg}-Zellen *in vitro* induziert werden⁶⁵. T_{reg}-Zellen produzieren vor allem TGF-β, IL-10 und IL-4. Von diesen beiden regulatorischen CD4⁺-T-Zellen sind die Foxp3-abhängigen CD4⁺CD25⁺-T_{reg}-Zellen abzugrenzen.

1.3.1 Toleranz und regulatorische T-Zellen

Schon vor etwa dreißig Jahren entstand die Vorstellung einer distinkten Population von Suppressor T-Zellen²⁹. Allerdings konnten die dem suppressiven Phänotyp zugrunde liegenden Mechanismen molekularbiologisch und biochemisch wie auch die verantwortliche(n) Lymphozytensubpopulation(en) zu dieser Zeit nicht näher charakterisiert werden. Allerdings wurde beobachtet, dass bis Tag drei postnatal thymektomierte Mäuse schwere Autoimmunerkrankungen entwickelten. Somit erschien der Thymus also als Ursprung von Suppressorzellen wahrscheinlich.

Basierend auf diesen Erkenntnissen konnte erst viel später gezeigt werden, dass CD4⁺-T-Zellen mit konstitutiver Expression von CD25 (Interleukin-2 Rezeptor- α -Kette = IL-2R α) für diese Thymus-abhängigen Effekte verantwortlich sind⁵⁹. Es dauerte wiederum etwa ein Jahrzehnt, bis nachgewiesen werden konnte, dass der Transkriptionsfaktor Foxp3 wesentlich für die Entwicklung und Funktion dieser sog. *natürlich* regulatorischen CD4⁺CD25⁺-T-Zellen verantwortlich ist^{24,35,37}.

1.3.2 Funktionelle Charakteristika von CD4⁺CD25⁺-T_{reg}-Zellen

Natürlich vorkommende regulatorische CD4⁺CD25⁺-T_{reg}-Zellen haben sich als eine Foxp3-abhängige Subpopulation von Suppressor-T-Zellen erwiesen²⁶. Ein Fehlen von Foxp3 führt somit zum Verlust regulatorischer CD4⁺CD25⁺-T-Zellen, was zu einem letalen Immundefekt mit multiplen Autoimmunkrankheiten führt⁵⁵. Bei Menschen sind CD4⁺CD25⁺-T_{reg}-Zellen durch eine starke Expression des Oberflächenmoleküls CD25 (CD25^{high}) gekennzeichnet. Diese Population repräsentiert nur etwa ein bis drei Prozent der gesamten CD4⁺-T-Zellen⁴. Neben der bekannten Foxp3-abhängigen Entwicklung im Thymus ist allerdings auch eine Foxp3-abhängige Konversion von peripheren CD4⁺CD25⁻-T-Zellen zu regulatorischen T-Zellen bekannt^{2,23,77}. Die klinische Bedeutung einer veränderten Zahl oder defekten Suppressorfunktion regulatorischer CD4⁺CD25⁺-T-Zellen wurde in kausalem Zusammenhang mit unterschiedlichsten Erkrankungen beschrieben. Diese sind z.B. Tumorerkrankungen, wie der Morbus Hodgkin und das maligne Melanom, Autoimmunerkrankungen wie das autoimmun-polyglanduläre Syndrom Typ II, die Multiple Sklerose, Myasthenia Gravis, Diabetes mellitus, Psoriasis und in der Transplantation die *Graft versus Host*-Erkrankung^{6,39,44,48,52,67,73,74}.

Der Mechanismus der Immuno-Suppression regulatorischer T-Zellen ist überwiegend Zell-Kontakt abhängig, was hauptsächlich *in vitro* beobachtet werden kann. In verschiedenen *in vivo* Maus-Modellen konnte aber auch eine Zytokin-vermittelte Inhibition von Effektorzellen beobachtet werden. Die für die regulatorische Funktion von T_{reg}-Zellen am häufigsten beschriebenen Zytokine sind TGF- β und IL-10⁷⁵. Obwohl beide Zytokine nicht für deren Funktion und Entwicklung notwendig sind^{56,68}, beeinflussen sie die Entwicklung von Foxp3-abhängigen regulatorischen T-Zellen aus CD4⁺CD25⁻-T-Zellen *in vitro*^{23,61,84}.

Neben diesen immunsuppressiven Zytokinen kommt dem Ctl4-Molekül aus der CD28-Familie eine wichtige Rolle als Modulator und Mediator der regulatorischen

Funktion zu. Ein Verlust von Ctla4 wiederum behindert nicht die Entwicklung und Funktion natürlich regulatorischer CD4⁺CD25⁺-T-Zellen⁷⁰. Ctla4 wird wie CD25 konstitutiv in großer Menge von CD4⁺CD25⁺-T_{reg}-Zellen expremiert. Eine Blockade von Ctla4 behindert die Suppressor-Funktion von T_{reg}-Zellen *in vitro* und *in vivo*⁷⁵. Beim Menschen konnte zudem gezeigt werden, dass die induzierbare Oberflächenexpression von Ctla4 besonders potente CD4⁺CD25⁺-T_{reg}-Zellen kennzeichnet¹⁰. Die Induktion von Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO), welches in dendritischen Zellen zu einem für aktivierte T-Zellen immunosuppressiven Tryptophan-Metaboliten führt, wurde als ein Hauptmechanismus der Ctla4-abhängigen T_{reg}-Zell-Funktion *in vivo* beschrieben²².

An der Zellkontakt-abhängigen Suppression regulatorischer T-Zellen sind nach neuesten Erkenntnissen auch Perforin/Granzym B^{30,31} und das Enzym Häm-Oxygenase I (HO) beteiligt¹⁴. Somit kann zusammenfassend gesagt werden, dass es viele unterschiedliche, sich nicht gegenseitig ausschließende aber ergänzende Mechanismen der T_{reg}-Funktion gibt. Wie im Einzelnen diese *in vivo* reguliert werden und selbst regulieren, bleibt zu klären.

Neben der Suppressor-Funktion ist die Anergie ein wesentliches weiteres Merkmal von CD4⁺CD25⁺-T_{reg}-Zellen, d.h., eine alleinige TCR-Stimulation ohne exogenes IL-2 induziert keine Proliferation. Diese Eigenschaft ist allerdings nur *in vitro* gültig, da *in vivo* eine begrenzte klonale Expansion von regulatorischen CD4⁺CD25⁺-T-Zellen nach Antigen-Stimulation nachgewiesen werden konnte⁷⁶.

Obwohl die konstitutive Expression von CD25 die Isolierung von CD4⁺CD25⁺-T_{reg}-Zellen aus dem Blut von gesunden Probanden ermöglicht, ist CD25 kein spezifischer T_{reg}-Marker, da in aktivierten, nicht-regulatorischen T-Zellen ebenfalls die CD25-Expression induziert wird. Dies gilt auch für andere Moleküle, welche von T_{reg}-Zellen ebenfalls konstitutiv expremiert werden, wie z.B. Ctla4 oder GITR (=TNFRSF18)^{50,63}.

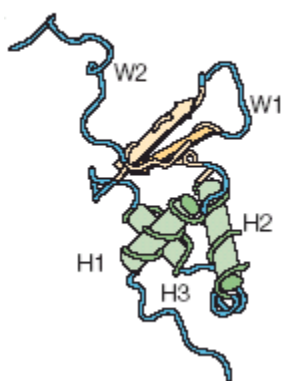
Zusammenfassend ist der regulatorische Phänotyp von natürlichen CD4⁺CD25⁺-T_{reg}-Zellen somit durch ihre Foxp3-abhängige Entwicklung und die dadurch bedingten phänotypischen und funktionellen Besonderheiten charakterisiert. Im Besonderen sind dies ihre konstitutiv hohe Expression von CD25 (und anderer T-Zell Aktivierungsmarker), ihre anerge Eigenschaft *in vitro*, sowie ihre Suppressor-Funktion, welche je nach System durch unterschiedliche Mechanismen vermittelt werden kann.

1.4 Der Transkriptionsfaktor Foxp3

Forkhead Proteine bilden eine eigenständige Familie von Transkriptionsfaktoren (FOX-Familie), die eine Vielzahl zellulärer Differenzierungs-Prozesse steuern⁴². Der Name *forkhead* leitet sich von dem Genprodukt *fkh* von *Drosophila melanogaster* ab, welches für die terminale Musterausbildung in der Embryonalentwicklung notwendig ist. In den letzten zehn Jahren wurden mehr als einhundert Mitglieder der *forkhead* Transkriptionsfaktor-Familie identifiziert. Phylogenetisch unterscheidet man heute zwischen fünfzehn Klassen verschiedener FOX-Proteine.

Die Kristallstruktur der *DNA*-bindenden *forkhead*-Domäne eines Fox-Proteins wurde als *winged helix*-Struktur beschrieben. Die Namensgebung beruht auf ihrer schmetterlingsartigen, zweiflügeligen Erscheinung. Zusätzlich finden sich drei weitere helikale Strukturelemente (s. Abb. 2A). Im Falle von Foxp3 finden sich zusätzlich zu der *forkhead*-Domäne eine Zinkfingerdomäne und ein *coiled-coil-leucine-zipper*-Motif (s. Abb. 2B). Auffällig ist für Foxp3 die Lokalisation der FKH-Domäne am C-terminalen Ende des Proteins im Gegensatz zu anderen Fox-Faktoren. Es wird vermutet, dass aus diesem Grund keine Transaktivierungs-Domäne für Foxp3 vorliegt, was zumindest mit funktionellen Untersuchungen übereinstimmt, nach denen Foxp3 als transkriptioneller Repressor der Zytokin-Expression fungiert^{9,62}.

A)



B)

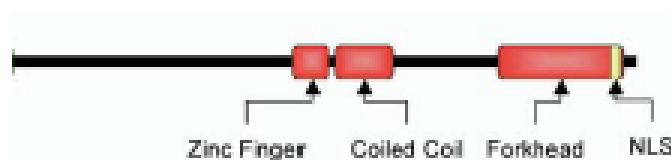


Abb. 2A: Exemplarische Darstellung der dreidimensionalen Struktur der DNA-bindenden Domäne von FOXC2 (W=*winged* Struktur; H=helikale Struktur)

Abb. 2B: Eindimensionale Struktur von FOXP3. Gezeigt sind die *Forkhead*-Domäne, die Cys₂His₂-Zinkfingerdomäne, das *coiled coil*-Leucin-*zipper*-Motif und die NLS (*Nuclear Localisation Site*) (aus: ²⁵)

Es besteht eine große Sequenzhomologie zwischen Foxp3 bei Mensch, Maus und Ratte, so dass man von einer hoch-konservierten Funktion des Proteins ausgehen kann. Foxp3 bindet DNA-Sequenzen in der Promoterregion von Zytokingenen wie IL-2 und unterdrückt dort als transkriptioneller Repressor die NFAT- und NF κ B-induzierte Zytokintranskription. Zudem interagiert Foxp3 außer mit anderen Fox-Proteinen auch mit NFAT und NF κ B direkt^{9,62,78}. Der Verlust der Foxp3-Funktion führt beim Menschen zum IPEX-Syndrom (s.o.). Die Komplexität der transkriptionellen Kontrolle von Foxp3 ist auch dadurch ersichtlich, dass das gleiche Krankheitsbild durch unterschiedliche Mutationen in der FKH-Domäne, aber auch durch Mutationen in den potentiellen Protein-Protein-Wechselwirkungsdomänen (*Leucin-zippers*), bedingt sein kann^{27,55}. Dies verdeutlicht, dass Protein-Protein-Wechselwirkungen und die DNA-Bindung von Foxp3 gleichermaßen für seine korrekte Funktion verantwortlich sind. Ein vergleichbares Syndrom durch eine Mutation im murinen Foxp3 liegt bei der *scurfy* Maus vor und führt zu einem Verlust der DNA-bindenden FKH-Domäne. In Abb. 3 (oberes Bild) sind vereinzelte bekannte Mutationen und die daraus resultierenden Aminosäureveränderungen beim humanen Foxp3 dargestellt; darunter ist das korrespondierende Bild in der *scurfy* Maus illustriert.

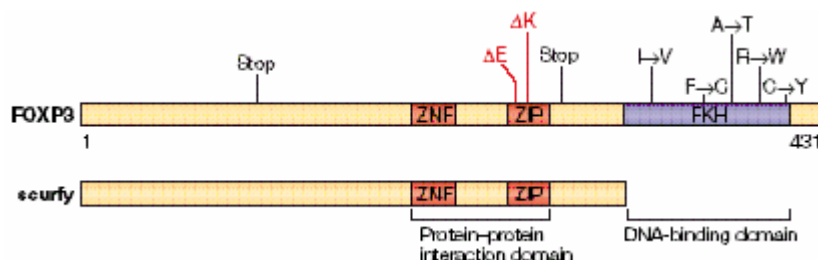


Abb. 3: Humanes Foxp3 (oben): Schematische Darstellung von bekannten Mutationen, die zum IPEX-Syndrom führen (ZIP= Leucin-zipper; FKH=Forkhead domain). *scurfy* Mutation bei der Maus (unten): Korrespondierendes Bild in bei der *scurfy* Mutation, die zu einem Verlust der FKH-Domäne führt (aus: Coffer et. al., 2004)

Ein Vergleich der Proteinexpression in CD4⁺CD25⁺-T_{reg}-Zellen und naiven oder aktivierten CD4⁺CD25⁻-T-Zellen zeigt, dass Foxp3 konstitutiv stark in CD4⁺CD25⁺-T_{reg} expremiert wird^{24,35,37,58}. Somit ist eine Unterscheidung zwischen T_{reg}-Zellen und aktivierten nicht-regulatorischen CD4⁺-T-Zellen möglich. Allerdings wurde bei

humanen T-Zellen nachgewiesen, dass Foxp3-Protein auch in CD4⁺CD25⁻-T-Zellen nach Stimulation expremiert werden kann ⁷⁷. Aufgrund von Einzelzellanalysen von CD4⁺CD25⁻-T-Zellen, kann man davon ausgehen, dass zumindest ein kleiner Teil dieser Zellen Foxp3 expremiert ⁵⁸. Ob diese Zellen potentielle CD25-Vorläufer von *de facto* CD4⁺CD25⁺Foxp3^{high}T_{reg}-Zellen, bleibt zu klären.

Somit steht außer Frage, dass Foxp3 für die Thymusentwicklung von natürlich regulatorischen CD4⁺CD25⁺-T_{reg}-Zellen wie ein Linien-Spezifizierungsfaktor bzw. Differenzierungsfaktor fungiert. Allerdings bleiben einige Fragen offen, da gerade im humanen System wiederholt gezeigt wurde, dass die Foxp3-Expression auf der RNA-Ebene nicht sicher als spezifischer T_{reg}-Marker gelten kann ⁵³. Der Unterschied hinsichtlich der Foxp3-Expression zwischen regulatorischen und nicht-regulatorischen T-Zellen ist somit zumindest ein zeitlicher (zu welcher Phase der T-Zellentwicklung, Thymus oder Peripherie) sowie ein quantitativer und qualitativer (hohe mRNA und Protein-Expression).

Neuere Untersuchungen an Mäusen, die ein *knock-in* Allel kodierend für ein GFP-Foxp3-Fusionsprotein oder eine Kopplung der Foxp3-Expression über eine IRES-Sequenz an eine GFP-Expression besitzen, konnten belegen, dass eine hohe Foxp3-Expression T_{reg}-Zell restringiert ist ^{25,83}. Andererseits konnte auch hierbei eine geringe Foxp3-Expression in CD4⁺CD25⁻- und CD8⁺-T-Zellen nachgewiesen werden ^{25,83}. Somit kann eine Funktion dieser schwachen Foxp3-Expression zumindest nicht ausgeschlossen werden. Es bleibt zu klären, ob Foxp3 in nicht-regulatorischen T-Zellen eine Funktion ausübt und ob sie sich von der in T_{reg}-Zellen unterscheidet.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Primär sollte im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss des Transkriptionsfaktors Foxp3 im Zusammenhang mit der Funktion regulatorischer T-Zellen untersucht werden. Hierfür sollten zunächst entsprechende Sortierungs- und Kultivierungsprotokolle insbesondere zur stabilen Expansion von CD4⁺CD25^{high} abgeleiteten regulatorischen T-Zellen etabliert werden. Diese Zellen wurden zusammen mit den korrespondierenden CD4⁺CD25^{low}-T-Zellen über Monate ohne Verlust ihrer funktionellen Eigenschaften kultiviert. Weiterhin sollte im humanen System Foxp3 retroviral in unsere T_h-Zelllinien transduziert werden, um den dadurch übertragenen partiellen anergen und inhibitorischen Phänotyp genauer hinsichtlich Foxp3-regulierter Gene zu untersuchen. In diesem Rahmen sollten vergleichende *Array*-Analysen mit den transduzierten T_h- und den von CD4⁺CD25^{high} abgeleiteten T_{reg}-Zellen zur Identifizierung von durch Foxp3 regulierten Genen durchgeführt werden. Solche Gene sollten zudem über das Verfahren der semiquantitativen PCR überprüft werden.

Es sollten weiterhin vergleichende Tests zwischen den T_hFoxp3 (bzw. mit anderen potentiell relevanten Konstrukten retroviral transduzierte T_h-Zellen) und den CD4⁺CD25^{high}-T_{reg}-Zellen hinsichtlich einer potentiell differentiellen TCR-Regulation und des Calcium-Flux durchgeführt werden, wobei auch auf Unterschiede in der Expression von Oberflächenmolekülen wie CD25, CD28 oder Ctla4 geachtet werden sollte. In diesem Zusammenhang sollte die mit Anergie- und Toleranzinduktion in Verbindung stehende Substanz Ionomycin und das Immunsuppressivum CSA auf funktionelle Auswirkungen und Induktion Foxp3-abhängiger Gene auf transkriptioneller Ebene untersucht werden.

Zuletzt sollte die potentielle Möglichkeit der *in vitro* Wachstumsförderung von phänotypisch regulatorischen T-Zellen durch den Einsatz von CSA zur gezielten Manipulation bzw. Induktion Foxp3-abhängiger Gene im Sinne einer *ex vivo* T_{reg}-Zelltherapie analysiert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchsorganismen

2.1.1 Bakterienstamm

- *Escherichia coli* TOP10 : Klonierungsstamm (Invitrogen)

2.1.2 Zelllinien

- PT67 : amphotrope Verpackungszelllinie (zur Verfügung gestellt von Dr. M. Wirth, GBF, Braunschweig)
- GPE86⁺ : murine ecotrope Verpackungszelllinie (zur Verfügung gestellt von Dr. S. Weiß, GBF, Braunschweig)
(zur Verfügung gestellt von Dr. S. Weiß)
- 16.2.11 : murine Hybridomzelle spezifisch für Hämagglutinin (110-120), H-2E^d-restringiert
(zur Verfügung gestellt von Dr. S. Weiß)

2.1.3 Humane Zellen

Humane T-Zellen entstammten Vollblutspenden von freiwilligen, gesunden Spendern, mit deren Einwilligung in Übereinstimmung mit den Ethikrichtlinien der MHH.

2.2 Kulturmedien

2.2.1 Kulturmedien und Zusätze für Bakterien

- LB-Medium : nach Sambrook *et al.*, 1989, zur Kultivierung von *E.coli*-Stämmen; 10 g Bacto-Trypton, 10 g Bacto-Hefeextrakt, 5 g NaCl, ad 1000 ml Wasser, autoklaviert
- Agarplatten : zur Herstellung von Agarplatten wurde dem LB-Medium 15 g/l Agar zugesetzt, die Lösung aufgeköcht und in Petrischalen gegossen.
- Antibiotika : Ampicillin (50 µg/ml)
Kanamycin (10 µg/ml)

2.2.2 Kulturmedium und Zusätze für tierische Zellen

- IMDM komplett : Standardmedium für die Kultivierung von allen tierischen Zellen (humane und murine Zellen). Fertigmedium in Pulverform von Gibco (Eggenstein, Deutschland). Angesetzt nach den Angaben des Herstellers. Zugewetzt wurden 10% (v/v) FKS von Biochrom (Berlin, Deutschland), 100 U/ml Penicillin, 100 U/ml Streptomycin, 10% (v/v) *Non Essential Aminoacids* und 10% (v/v) Natriumbicarbonat
- Einfriermedium : FKS mit 10% DMSO

2.3 Antikörper

2.3.1 Antikörper für FACS-Analysen humaner T-Zellen

Cy-Chrome TM anti-human CD152 (CTLA-4), monoclonal, Maus IgG _{2a} , K, cl. BNI3	BD, Pharmingen
Cychrome TM Mouse IgG _{2a} K (Isotykontrolle für anti-human CD152), cl. 6155-178	BD, Pharmingen
PE Anti-Human CD3, monoclonal, Maus IgG _{2a} , K, cl. IHT3a	BD, Pharmingen
FITC anti-human CD4, monoclonal, IgG ₁ , K, cl. RPA-T4	BD, Pharmingen
PE anti-human CD4, monoclonal, IgG ₁ , K, cl. RPA-T4	BD, Pharmingen
PE anti-human CD25, monoclonal, IgG ₁ , K, cl. M-A251	BD, Pharmingen
PE anti-human CD28, monoclonal, IgG ₁ , K, cl. CD28.2	BD, Pharmingen
PE anti-human $\alpha\beta$ TCR, monoclonal, IgM, K, cl. T10B9.1A-31	BD, Pharmingen

2.3.2 Antikörper zur Stimulation humaner T-Zellen

TR66, anti CD3 human, (zur Verfügung gestellt von Dr. S. Weiß, GBF, Braunschweig)

anti-human CD28, BD, monoklonal, IgG₁, K, (cl. CD28.2; NA/LE Aufreinigung)

anti-human CD152 (CTLA-4), BD, monoklonal, Maus IgG_{2a}, K, (cl. BNI3, NA/LE)

2.3.3 Antikörper für FACS-Analysen von Mauszellen

PE anti-maus CD69, monoklonal, IgG₁, K, BD, Pharmingen

cl. P23347

PE anti-maus CD25, monoklonal, IgG₁, K, BD, Pharmingen

cl. H35771

PE anti-maus $\alpha\beta$ TCR, monoklonal, IgM, K, BD, Pharmingen

cl. H57597

2.3.4 Antikörper zur Stimulation von Maus T-Zellen

anti-Maus CD3, Hamster, monoklonal, IgG, cl. 500A2 (zur Verfügung gestellt von Dr. S. Weiß, GBF, Braunschweig)

anti-Maus CD3, Hamster, monoklonal, IgG, BD, Pharmingen (NA/LE)

cl. 2C11

2.3.5 Antikörper für Western Blots

Foxp3 (N-12): sc-21072

Abcam, UK

2.4 Primer

2.4.1 Primer semiquantitative PCR (*Hot Start Polym., Eppendorf*)

Gen	Primersequenzen	Genbank
Ctla4	5`-atg gct tgc ctt gga ttt cag c-3` (s) 5`-cga act aac tgc tgc aag gat cca-3` (as)	NM_005214
Foxp3	5`-tca acg gtg gat gcc cac gc-3` (s) 5`-aga ctc agg ttg tgg cgg atg-3` (as)	NM_014009
IFN- γ	5`-gca ggt cat tca gat gta gcg g-3` (s) 5`-tgt ctt cct tga tgg tct cca cac-3` (as)	NM_000619
IL-4	5`-aac aca act gag aag gaa acc ttc tgc-3` (s) 5`-ctc tct cat gat cgt ctt tag cct ttc-3` (as)	NM_172348.1
IL-5	5`-gag gat gct tct gca ttt gag ttt g-3` (s) 5`-gtc aat gta ttt ctt tat taa gga caa g-3` (as)	NM_000879
IL-10	5`-acc aag acc cag aca tca ag-3` (s) 5`-gag gta caa taa ggt ttc tca ag-3` (as)	AF418271
IL1R2	5`-aaa tga ctc tgc tag gac ggt ccc-3` (s) 5`-tct tcc agg gcc aca tcg tg-3` (as)	NM_004633
LGALS3	5`-ccc atc ttc tgg aca gcc aag tgc-3` (s) 5`-gca tca ttc act gca acc-3` (as)	BC001120.1
RPS9	5`cgc agg cgc aga cgg tgg aag c-3` (s) 5`-cgt agg aga gcg cag aga gaa gtc a-3` (as)	U14971
UBD	5`-ccc aat gct tcc tgc ctc tgt g-3` (s) 5`-gac ccc tgc aac acc cca t-3` (as)	NM_006398

Tabelle 1 : Analyierte Gene in der semiquantitativen PCR

2.4.2 Primer für Klonierungen

Gen	Primersequenz	Genbank
Ctla4	5'-tac ata tct ggg atc aaa gc-3' (s) 3'-att tgg gtt ccg cat cca-5' (as)	NM_005214
Foxp3	5'-aag ctt gac aag gac ccg atg ccc a-3' (s) 3'-ctc gag tca ggg gcc agg tgt agg gt-5' (as)	NM_014009
UBD	5'-tgc aga gat ggc tcc caa tg-3' (s) 3'-gac ccc tgc caa cac ccc at-5' (as)	NM_006398

Tabelle 2: Vollständig amplifizierte Gene für retrovirale Überexpression

2.4.3 Primer für *Realtime*-RT-PCR

Gen	Primersequenz	Genbank
RPS9	5'-cgc agg cgc aga cgg tgg aag c-3' (s) 5'-cga agg gtc tcc gcg ggg tca cat-3' (as)	NM_005214
Foxp3	5'-gaa cgc cat ccg cca cct ga-3' (s) 5'-ccc tgc ccc cac cac ctc tgc-3' (as)	NM_014009
LGALS3	5'-cgg agc acc tgc acc tgg agt cta-3' (s) 5'-tga agc gtg ggt ggt taa agt gga agg-3' (as)	BC001120.1

Tabelle 3: Analysierte Gene in der *Realtime*-PCR

2.5 Chemikalien

Acrylamid, NN`-Methylbisacrylamid	Applichem, Darmstadt
Agar-Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose, Electrophoresis Grade	Invitrogen, UK
Ammoniumpersulfat (APS), p.a.	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Sigma, Steinheim
Bacto™ Trypon	BD, USA
Caseinhydrolysat	Roth, Karlsruhe
Chloramphenicol	Sigma, Steinheim
Chloroquine-Diphosphat-Salz	Sigma, Steinheim
CIAP	MBI Fermentas, UK
CIAP-Puffer 5 x	MBI Fermentas, UK
Citronensäure-1-Hydrat	Riedel, Seelze
Complete Mini, EDTA free (Protease-Inhibitor)	Roche, Mannheim
Coomassie	Serva, Heidelberg
Cyclosporin A (CSA)	Calbiochem, Darmstadt
DEAE-Dextran-Hydrochlorid	Sigma, Steinheim
Destilliertes Wasser	Gibco, Berlin
DNA-Längenstandart 100bp	Invitrogen, UK
DNA-Längenstandart 1kb	Invitrogen, UK
dNTP-Mix 10mM	Peqlab, UK
dNTP-Mix 2,5mM	Invitrogen, UK
DMSO	Merck, Darmstadt
DTT 0,1M	Invitrogen, UK
Ethanol, p.a.	J.T. Baker, NL
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Ficoll	Biochrom, Berlin
FKS	Biochrom, Berlin
Geneticin (G418)	Gibco, Berlin
Glycin, p.a.	Serva, Heidelberg
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
Hot Master Taq Polymerase	Eppendorf, Hamburg

Hot Master Taq Buffer 10 x	Eppendorf, Hamburg
IMDM-Medium	PAA, Austria
Ionomycin	Calbiochem, Darmstadt
Kaliumacetat	Roth, Karlsruhe
Kanamycin	Sigma, Steinheim
Lipofectamin (Transfektionreagenz)	Invitrogen, UK
Lineares Polyacrylamid (LPA)	Ambion, USA
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Roth, Karlsruhe
MEM Non Essential Amino Acids (100x)	PAA, Austria
Mercaptoethanol	Sigma, Steinheim
M-MLV RT, RNase H(-) Point Mutant	Promega, USA
M-MLV RT 5 x Buffer	Promega, USA
Natriumacetat-Puffer-Lsg.	Sigma, Steinheim
Natriumbicarbonat	Sigma, Steinheim
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat-2-hydrat	J.T. Baker, NL
Natrium-Dodecyl-Sulfat	Sigma, Steinheim
Natriumpyruvat	Biochrom, Berlin
Oligo dT-Primer	Invitrogen, UK
OPTIMEM	PAA, Austria
PBS	Biochrom, Berlin
Penicillin	PAA, Austria
Pfu DNA Polymerase	Promega, USA
Pfu DNA Polymerase Puffer 10 x	Promega, USA
Phenylmethylsulfonylfluorid	Serva, Heidelberg
Polyethylenglykol 4000 (PEG)	Fluka, Steinheim
Polyethylenglykol 6000 (PEG)	Roth, Karlsruhe
Phytohemagglutinin	Roche, Mannheim
RNasin Plus Inhibitor	Promega, USA
Schwefelsäure 1N	Riedel, Seelze
Streptavidin-Peroxidase	Sigma, Steinheim
T4 DNA Ligase	Invitrogen, UK
T4 DNA Ligase Puffer 5 x	Invitrogen, UK
TMB-Substrat	Calbiochem, Darmstadt

TEMED	Sigma, Steinheim
Tris	Roth, Karlsruhe
Trypanblau	Biochrom, Berlin
Trypsin-EDTA	PAA, Österreich

2.6 Verbrauchsmaterial

Microtiterplatten , 96 well, Flachboden	Nunc, Wiesbaden
Microtiterplatten, 96 well, Rundboden	Nunc, Wiesbaden
Microtiterplatten, 96 well, Spitzboden	Nunc, Wiesbaden
Microtiterplatten, 48 well, Flachboden	Nunc, Wiesbaden
Microtiterplatten, 24 well, Flachboden	Nunc, Wiesbaden
Microtiterplatten, 6 well, Flachboden	Nunc, Wiesbaden
Reaktionsgefäße, 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße, 2 ml	Eppendorf, Hamburg
UVette®	Eppendorf, Hamburg
Zellkulturflaschen, 50 ml	Greiner, Wiesbaden
Zellkulturflaschen, 250 ml	Nunc, Wiesbaden
Zentrifugenröhrchen, 15ml	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen, 50ml	Sarstedt, Nümbrecht

2.7 Geräte

AutoMACS	Miltenyi Biotech
Bio Photometer	Eppendorf, Hamburg
Durchflußzytometer (FACSCalibur®)	BD, Heidelberg
Elektrophoresekammer	LabTech, UK
FACSVantage	Miltenyi Biotech
Flüssigkeits-Szintillations-Analysator	Sigma, Steinheim
Harvester	Eppendorf, Hamburg
Inkubator	Hera Cell, Germany
Mikroskop	Krüss, Germany
Mikrowelle	Sharp, UK
Mikrozentrifuge Mikro 22R	Hettich, Germany
MoFlo	DakoCytomation, Fort Collins, CO
FacsVantage	BD, Heidelberg

Multifuge	Heraeus, Germany
Pipette 0,5-10 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipette 2-20 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipette 20-200 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipette 100-1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Luminovette für Luciferase	Eppendorf, Hamburg
Rührer	Heidolph, Germany
Spannungsgeber	Biometra, Heidelberg
Sterilbank	Nunc, Germany
Thermomixer Compact	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler	Biometra, Heidelberg
Vortexer	Merck, Darmstadt
Wasserbad	GFL, Germany

2.8 Kits

BD OptEIA™ Human IL-10 ELISA Set	BD, USA
BD OptEIA™ Human IFN-g ELISA Set	BD, USA
CD4 ⁺ <i>no touch isolation kit</i>	Miltenyi Biotech, Germany
Dual Luciferase Reporter Assay System	Promega
Nucleospin Extract II	M & N, Düren
Nucleospin Plasmid	M & N, Düren
Nucleospin RNA II	M & N, Düren
pGEM-T-Easy Vektor System II	Promega, USA
Zero Blunt TOPO PCR cloning kit	Invitrogen, UK
Brilliant SYBR Green QPCR Core Reagent Kit	Stratagene

2.9 Restriktionsenzyme

<i>BamH I</i> (10U/μl)	Invitrogen, UK
<i>Bsp120I</i> (10U/μl)	MBI, USA
<i>Bgl II</i> (10U/μl)	Invitrogen, UK
<i>EcoR I</i> (10U/μl)	Invitrogen, UK
<i>Kpn I</i> (10U/μl)	Invitrogen, UK
<i>Mss I</i> (5U/μl)	MBI Fermentas, USA
<i>Nco I</i> (10U/μl)	Invitrogen, UK
<i>Nde I</i> (5U/μl)	Invitrogen, UK
<i>Not I</i> (15U/μl)	Invitrogen, UK
<i>Pst I</i> (10U/μl)	Invitrogen, UK
<i>Sal I</i> (10U/μl)	Invitrogen, UK
<i>Sst I</i> (10U/μl)	Invitrogen, UK
<i>Xba I</i> (10U/μl)	Invitrogen, UK
<i>Xho I</i> (10U/μl)	Invitrogen, UK

2.10 Vektoren

pcDNA 3 + bzw. -	Invitrogen, USA
pCR4.1-TOPO blunt	Invitrogen, USA
pEGFP-C1, -2, -3	Invitrogen, USA
pEGFP-N1, -2, -3	Invitrogen, USA
pGL3-basic	Promega, UK
pGL3-3xNFAT	
(zur Verfügung gestellt von PD. Dr. K. Wollert, MHH)	
pMSCV-IRES-gfp	(s. Abb. 4)
(zur Verfügung gestellt von. Dr. W. Hansen, Braunschweig ¹³)	
pMSCVpuro	Clontech, USA
pMSCV-pGK-gfp	
(zur Verfügung gestellt von Dr. W. Hansen)	

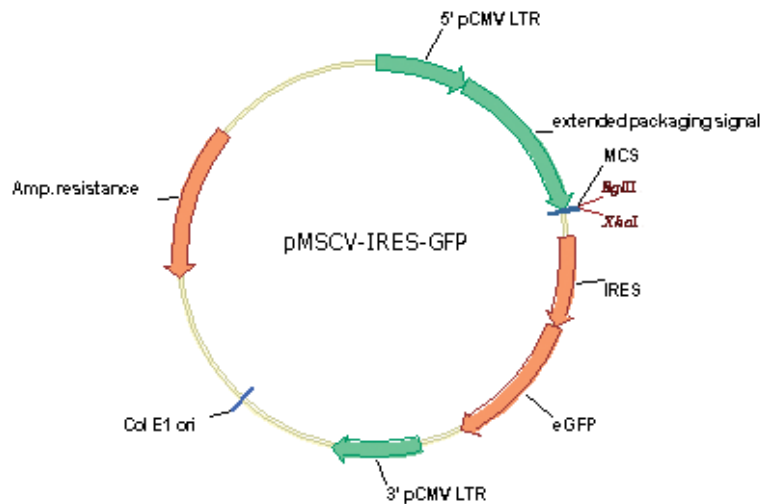


Abb. 4: Schematische Darstellung von pMSCV-IRES-GFP.

Der retrovirale Expressionsvektor pMSCV-IRES-GFP bzw. oder pMSCV-puro ist durch eine 5' und 3' *long terminal repeat* (LTR) gekennzeichnet, welche die Klonierungs-Schnittstellen (*multi cloning site*, MCS) und die IRES-abhängige (*internal ribosome entry site*) GFP (*enhanced green fluorescent protein*, eGFP) einschliessen. Dies ermöglicht den Nachweis von transduzierten T-Zellen durch die über die IRES-gekoppelte GFP-Expression zusammen mit dem davor befindlichen Gen (Foxp3, Ctla4 oder UBD). Bei dem Vektor pMSCV-puro ist die IRES-GFP-Kassette durch das Puromycin-Resistenzgen unter Kontrolle eines eigenen konstitutiven Promoters ersetzt.

3. Methoden

3.1 Medien und Zellen

3.1.1 Medien und Kultivierungsbedingungen

Als Kulturmedium für sowohl humane und murine T-Zellen diente IMDM mit 10% FCS, 100 U/ml Penicillin/Streptomycin, 10% Non Essential Amino-Acids und 10% Natriumbicarbonat. Das FCS wurde vor Gebrauch 30 min bei 56 °C hitzeinaktiviert. Zum Herauswaschen und Zählen der Zellen wurde PBS (pH 7,4) mit 2 mM EDTA verwendet. Die Zellen wurden bei 37 °C, 5 % CO₂-Partialdruck und 95 % gesättigter Wasserdampfatosphäre kultiviert.

3.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Um Zellen für spätere Analysen zu erhalten, werden diese in kaltem Einfriermedium (komplettes Kulturmedium und 10 % DMSO, v/v) in einer definierten Zellzahl (mindestens 2×10^6) resuspendiert und in einer Styroporbox bei -80 °C eingefroren. Die Styroporbox gewährleistet eine Dämpfung des Temperaturabfalls, das DMSO verhindert das Aussalzen und die zellschädigende Bildung von Eiskristallen.

Um eine Rekultivierung von Zellen vorzunehmen, wurden diese bei 37°C unter leichtem Schwenken aufgetaut. Die Zellsuspension wurde dann 1/10 in warmen (37°C) Kulturmedium verdünnt und bei 1000 rpm für 10 min zentrifugiert, in frischem Kulturmedium aufgenommen und weiter kultiviert.

3.1.3 Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mittels einer Neubauerzählkammer. Hierfür wurde ein Aliquot der Zellsuspension in einem angemessenen Verhältnis in Abhängigkeit von der Zelldichte (1:2 bis 1:5) mit Trypanblau gemischt und in die Zählkammer pipettiert und die vitalen Zellen gezählt. Tote Zellen erscheinen blau gefärbt, vitale Zellen dagegen ungefärbt, da sie in der Lage, den Farbstoff aktiv durch ihre Ionenkanäle wieder auszuschleusen.

3.2 Zellisolationstechniken

3.2.1 *Ficoll Hypaque*-Gradientenzentrifugation

CD4⁺-T-Zellen wurden aus peripherem, heparinisiertem Blut gesunder Spender über eine *Ficoll Hypaque*-Gradientenzentrifugation aufgereinigt. Hierfür wurde jeweils 13-15 ml *Ficoll* in 50 ml Falcon-Röhrchen vorgelegt. Die *Ficoll*-Lösung besitzt eine spezifische Dichte von 1,077 g/ml bei 10°C. In einem Verhältnis von ungefähr 1:5 wurde dann das Blut auf das *Ficoll* überschichtet. Anschließend erfolgte eine Dichtegradientenzentrifugation mit 400 x g bei 20°C für 25 min. Es ergab sich eine Schichtung der Blutbestandteile in Abhängigkeit der spezifischen Dichte, wobei sich die Lymphozyten und Monozyten in der Interphase direkt über dem *Ficoll* befanden. Diese Interphase wurde nun vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgenommen und zweimal mit PBS/EDTA gewaschen (1500 rpm bei 4°C für 10 min), gezählt und in Kultur genommen.

3.2.2 MACS-Zell-Separation

Bei der magnetischen Separation handelt es sich um ein Verfahren, bei dem durch monoklonale Antikörper, welche mit magnetischen Microsphären gekoppelt sind, markierte Zellen über einen Magneten getrennt werden. Zur Anreicherung von humanen CD4⁺-Lymphozyten wurde das CD4⁺ *no touch isolation kit* verwendet, bei dem alle im Blut relevanten nicht CD4⁺-Zellen depletiert werden. Für die immunomagnetische Zellseparation wurden die in FACS-Puffer gewaschenen Zellen zunächst über ein 100 µm Mesh (BD Pharmingen) filtriert, um eine Einzelzellsuspension zu erhalten. Dabei wurden 10⁷ Zellen in 80 µl FACS-Puffer mit 20 µl des Biotin-gekoppelten Antikörper-Cocktails (Miltenyi Biotech) aufgenommen und bei 4°C für 10 min unter Agitation inkubiert. Danach wurden die Zellen in etwa 10 ml FACS-Puffer einmal gewaschen, anschließend in 80 µl FACS-Puffer mit 20 µl Microbead-gekoppelten anti-Biotin Antikörper suspendiert und für 15 min bei 4°C inkubiert, danach entsprechend gewaschen und in 500 µl FACS-Puffer pro 10⁸ Gesamtzellen aufgenommen. Die magnetisch gekoppelten Zellen konnten anschließend mit Hilfe eines AutoMACS-Gerätes mit dem Programm „deplete“ (Miltenyi Biotech) von den CD4⁺-T-Zellen getrennt werden, die eine Reinheit von etwa 80-85% aufwiesen.

3.2.3 Zellsortieren

Für die Sortierung von CD4⁺-T-Zellen wurden Lymphozyten wie unter 3.2.1 und 3.2.2 beschrieben präpariert. Es wurden 10⁷ CD4-angereicherte Zellen in 1 ml FACS-Puffer resuspendiert. Anschließend erfolgte eine Färbung mit FITC-konjugierten anti-CD4 und PE-gekoppelten anti-CD25 Antikörpern für 15 min im Dunkeln bei 4°C. Nach der Färbung wurden die Zellen zweimal in FACS-Puffer gewaschen und in je 10⁸ pro 1 ml resuspendiert und anschließend mittels eines MoFlo oder FACSVantage mit einer Reinheit von mehr als 98% sortiert.

3.3 Kultivierung der T-Zellen

3.3.1 Kultivierung der humanen CD4⁺-T-Zellen

Sortierte CD4⁺CD25^{high}- und CD4⁺CD25⁻-T-Zellen wurden nach der Isolation in Langzeitkultur genommen und wöchentlich mit bestrahlten (200 Gy) allogenen EBV-transformierten B-Zellen (LG2-EBV, zur Verfügung gestellt von T. Boon, LICR, Brüssel) im Verhältnis 10:1 (T-Zellen/B-Zellen) stimuliert. Die so generierten alloreaktiven T_H-Zellen (aus CD4⁺CD25⁻) wurden ab Tag drei nach Stimulation mit allogenen bestrahlten B-Zellen (LG2-EBV B-Zellen) mit 20 U/ml rekombinantem humanen IL-2 (Proleukin, zur Verfügung gestellt von P. Wagner, Chiron Corporation, CA) supplementiert. Im Vergleich dazu mussten die regulatorischen CD4⁺CD25^{high}-T-Zellen wegen ihres anergen Phänotyp mit 50-100 U/ml jeden zweiten Tag allogener Stimulation versetzt werden. Die Zellen wurden jeweils in 24-well Platten in 2 ml komplettem Medium kultiviert.

3.3.2 Kultivierung der Maus Hybridom-Zellen

Die Kultivierung der Maus Hybridom-Zellen (16.2.11) ist verhältnismäßig unproblematisch, da diese sehr autonom wachsen. Die Zellen wurden in 6-well Platten kultiviert. Bei Konfluenz wurden die Zellen jeweils in ihrer Kulturplatte herunterverdünnt. Diese Zellen lassen sich über einen sehr langen Zeitraum problemlos kultivieren.

3.3.3 T-Zell-Funktions-Assays

Jeweils 3×10^4 humane T-Zellen wurden als Triplikate mit 3×10^4 bestrahlten LG2-EBV oder $1 \mu\text{g/ml}$ Platten-gebundenem anti-CD3 (TR66 oder Hit3A), $1 \mu\text{g/ml}$ löslichem anti-CD28 oder 1 bis $10 \mu\text{g/ml}$ anti-CD152 (BNI3) mit oder ohne quervernetzendem anti-Maus IgG Zweitantikörper, IL-2, $1 \mu\text{M}$ Cyclosporin-A (CSA) oder $1 \mu\text{M}$ Ionomycin (Iono) (beide Sigma, St. Luis) in 96-well Flachbodenplatten stimuliert. Die Überprüfung der Hemmeigenschaften erfolgte durch Zugabe regulatorischer Zellen im Verhältnis von 1:1 bis 1:0.25 ($T_h:T_{reg}$ Zellen). Zum Testen der Zellkontakt-abhängigen Hemmwirkung wurden Transwellsysteme verwendet, bei denen die allogene stimulierten T_h -Zellen in 96-well Platten von den suppressierenden Zellen durch eine $0,2 \mu\text{m}$ dicke Membran getrennt wurden. Für die Untersuchung der Fixationswirkung auf die Hemmfunktion von T_{reg} -Zellen wurden diese mit 1% para-Formaldehyd (in PBS/2mM EDTA) für 15 min bei Raumtemperatur behandelt und danach mehrfach in Kulturmedium gewaschen. Nach 72 Std. wurde vorsichtig $100 \mu\text{l}$ Überstand (SN) von den Ansätzen abgenommen und für spätere ELISA-Tests bei -20°C gelagert. Anschließend wurden die Platten in dem Heißlabor von Prof. Schwinzer (MHH, Hannover) mit $1 \mu\text{Ci/well}$ [^3H]-Thymidin versetzt, um 16 Std. später die Proliferation durch den Einbau des [^3H]-Thymidin zu messen.

3.3.4 Proliferationsbestimmungen

Das in der S-Phase des Zellzyklus bei der DNA-Synthese eingebaute [^3H]-Thymidin wurde auf Glasfasermatten in einem Harvester (Eppendorf) geerntet. Nach der anschließenden Trocknung bei 58°C wurde die Filtermatte in einer Plastikfolie mit 5 ml Szintillatorflüssigkeit eingeschweißt. Die Messung des [^3H]-Thymidin-Einbaus erfolgte mit einem Flüssigkeits-Szintillations-Analysator (Sigma) Hierbei wurde die eingebaute Tritium-Menge als Zählimpuls pro Minute gemessen (cpm = counts per minute).

3.4 Durchflusszytometrische Analytik (FACS)

Die phänotypische Analyse erfolgte mit Hilfe der Durchflusszytometrie nach Färbung der T-Zellen mit verschiedenen markierten monoklonalen Antikörpern. Die Methode ermöglicht die gleichzeitige Messung der relativen Zellgröße, der Granularität sowie die Expressionshöhe von Zelloberflächen oder intrazellulären Molekülen. Bei intrazellulären Molekülen muss die Zellwand zuvor permeabilisiert werden. Im Durchfluss wurden die Zellen über einen Laserstrahl mit einer Wellenlänge von 488 nm oder 595 nm angeregt. Entsprechend der physikalischen Eigenschaften und der Fluoreszenzmarkierung kommt es zur Streuung des Lichtes und zur Fluoreszenzlichtemission. Durch optische und elektronische Detektoren wird das nach vorn (FSC = *forward light scatter*) und das um 90° (SSC = *sideward light scatter*) gestreute Licht gemessen. Der Strahl wird je nach Zelltyp unterschiedlich gestreut. Dabei wird das Signal des FSC hauptsächlich durch die Zellgröße und der Impuls des SSC vorwiegend durch die Granularität bestimmt. Die Emission der verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe wird in 90°-Richtung aufgenommen. Der Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein (FITC) emittiert bei 525/50 nm (FL1) und der Fluoreszenzfarbstoff Phycoerythrin (PE) bei 575/25 nm (FL2), während der Emissionsbereich des dritten Farbstoffes bei 680/39 nm (FL3) liegt. Die Analysen wurden mit der Software CellQuest™ durchgeführt.

3.4.1 FACS-Analysen

Im Falle der Ein-oder-Mehrfarben-Fluoreszenzanalyse wurde eine Grundeinstellung der jeweiligen Zelltypen mit ungefärbten Zellen und einfach-gefärbten und kombiniert gefärbten Zellen vorgenommen. Für jede Färbung wurden jeweils 2×10^5 Zellen für eine Antikörper-Färbung eingesetzt. Diese wurden in 50 µl FACS-Puffer (PBS/2mM EDTA/2% FKS) aufgenommen und auf eine 96 well Rundbodenplatte gegeben. Daraufhin wurden 50 µl einer entsprechend optimierten Antikörperverdünnung hinzugegeben und die Platte für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Platte bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert und noch zwei Mal mit FACS-Puffer gewaschen. Zur FACS-Analyse wurden die Zellen in 400 µl FACS-Puffer mit 1:2000 verdünntem Propidium-iod (PI; 10 mg/ml Stammlösung) aufgenommen, soweit keine CyChrom-markierten Antikörper verwendet wurden. PI erscheint (wie CyChrom) im FL3-Kanal und färbt tote Zellen an. Für Ctl4 wurde neben der Oberflächenexpression des Moleküls nach Iono-Stimulation auch die Menge des

intrazellulären Anteils in verschiedenen Zellpopulationen analysiert. Im Vergleich zu anderen FACS-Färbungen mussten die Zellen hierfür jedoch vorher mit 2.5 % Paraformaldehyd (in PBS/2mM EDTA) 15 min bei Raumtemperatur fixiert werden. Das Permeabilisieren der Zellmembran erfolgte mit 0,5% Sarponin (in PBS/2mM EDTA), welches bei allen weiteren Schritten der Antikörper-Färbung und der Waschschrirte zugesetzt war.

3.5 Calciummessungen

Die Calciummessungen wurden mit Hilfe von Durchflußzytometrie und konfokaler Mikroskopie durchgeführt. Die entsprechenden T-Zell-Populationen wurden mit 1 μ M (für konfokale Mikroskopie) bzw. 2 μ M INDO-1 in Kulturmedium (für die Durchflußzytometrie) bei 37°C für 45 min unter Lichtschutz beladen. Danach wurden die Zellen in 10 ml Medium drei Mal gewaschen. Für die Durchflußzytometrie wurden die Zellen 20 min bei 4°C mit 1 μ g/ml aCD3 (TR66) beladen. In einem MoFlo-Gerät wurde dann in einem Zeitraum zwischen 30 und 60 sec die basale intrazelluläre Calciumkonzentration gemessen. Die Zellen wurden durch *crosslinking* von Zellgebundenem anti-CD3 Antikörpern mit 10 μ g/ml anti-Maus IgG stimuliert. Die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration wurde bestimmt, indem das Verhältnis von an INDO-1 gebundenem (405 nm) zu ungebundenem (515 nm) Calcium gemessen wurde. Zur Auswertung diente FlowJo Software (Tree Star, San Carlos, CA). Die Messung und Auswertung erfolgte mit der freundlichen Unterstützung durch Dr. L. Gröbe (GBF, Braunschweig).

Zur Einzelzellanalyse in der konfokalen Mikroskopie wurden INDO-1 markierte Zellen in sog. Slide-Chambers (Nunc) pipettiert, auf denen zuvor 10 μ g/ml anti-CD3 Antikörper bei 37°C unspezifisch gebunden wurden. Als Analyseverfahren diente die konfokale Mikroskopie, es wurde das Verhältnis von INDO-1 gebundenem (405 nm) zu ungebundenem (460 nm) Calcium gemessen (BIO-Rad, Herkules, CA). Die Messung und Auswertung erfolgte mit der freundlichen Unterstützung durch Dr. K. Dittmar (GBF, Braunschweig).

3.6 Quantitative Zytokinbestimmungen von IL-10 und IFN- γ

Die Zytokine IL-10 und IFN- γ wurden mit den jeweiligen BD OptEIA™ ELISA-sets durchgeführt. Hierfür wurden jeweils 100 μ l Überstand von entsprechenden Proliferationsplatten eingesetzt. Das Protokoll ist für beide ELISA gleich, so dass hier exemplarisch der Ablauf für IL-10 dargestellt werden soll. Zunächst mußte eine entsprechende Anzahl von 96 well Maxisorp®-Platten mit *capture*-Antikörper (1:250) beschichtet werden. Der Antikörper wurde in *coating-buffer* (8,4 g NaHCO₃; 3,56 g Na₂CO₃; ad 1l; pH 9,5) zu jeweils 100 μ l vorgelegt und über Nacht bei 4°C gelagert, so dass der Antikörper an den Plattenboden adsorbieren konnte. Am nächsten Tag wurden die Platten zwei Mal mit *wash-buffer* (PBS pH 7,0 plus 0,05% Tween-20) gewaschen. Danach wurden die Platten mit 300 μ l *assay-diluent* (PBS mit 10% FKS; pH 7,0) für eine Stunde bei RT inkubiert, um unspezifische Bindungen zu reduzieren. Anschließend wurden die Platten erneut dreimal gewaschen und dann die Proben sowie eine serielle Verdünnung eines rekombinanten IL-10-Standards in jeweils 100 μ l auf die Platte pipettiert. Dieser Ansatz wurde dann für zwei Stunden bei RT inkubiert, anschließend erneut drei Mal gewaschen und mit 100 μ l *working detector* (*detection antibody* in *assay diluent* 1:500 plus *avidin-Horseradish-Peroxidase* 1:250) auf die Platten gegeben und für eine Stunde bei RT inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurden 100 μ l einer Substrat-*solution* (TMB) hinzugeben und 30 min bei RT inkubiert. Als letztes wurden 50 μ l *Stop-solution* (H₂SO₄; 1N) hinzugegeben und die Optische Dichte (OD) bei 450 nm bestimmt. Die Messwerte wurden gegen die Korrekturwellenlänge 570 nm gemessen.

3.7 Retroviraler Gentransfer

Bei Retroviren handelt es sich um Viren, die die Eigenschaft besitzen, sich nach der Infektion stabil in das Wirtszellgenom zu integrieren. Somit ist ein vertikaler Gentransfer möglich. Durch diese Eigenschaft sind Retroviren als Genvehikel (Vektor) attraktive Kandidaten zur stabilen genetischen Modifikation. Hierfür wurden retrovirale Vektorsysteme entwickelt, bei denen die viralen Strukturgene entfernt wurden, somit besteht ein Replikationsdefekt. Die fehlenden Strukturgene *gag*, *pol* und *env* für die Virus-Replikation werden durch sogenannte Verpackungszelllinien zur Verfügung gestellt. Das retrovirale, replikationsdefekte Expressionsplasmid wird somit in der Verpackungszelle repliziert, verpackt und als infektiöses Viruspartikel in den Überstand freigegeben. Hiermit können nun entsprechende Zielzellen infiziert

werden. Da normale Zielzellen die Replikations-relevanten Strukturgene nicht tragen, ist das Virus selber nicht mehr in der Lage, sich zu reproduzieren, wodurch eine unkontrollierte Vermehrung unterbunden wird. Nach dem Einbau des Virusgenoms in das Genom der Zielzellen wird das zu analysierende Gen durch die starken *Enhancer*-Elemente des Virus überexprimiert. So lassen sich Rückschlüsse auf die spezifische Wirkung des überexprimierten Gens in dem infizierten Zelltyp ziehen.

3.7.1 Gentransfer in humane T_h-Zellen

Zunächst wurden die cDNAs, welche für Foxp3, Ctla4 und UBD codieren, mit der *Pfu*-Polymerase amplifiziert und in pCR4.1-TOPO kloniert. Nach Bestätigung der Sequenzen (GATC, Biocell, Konstanz) wurden die Sequenzen in pMSCV-IRES-gfp kloniert und anschließend in PT67 (murine amphotrope Verpackungszelllinie) transient mit CaCl₂-DNA Präzipitat transfiziert. Am nächsten Tag wurde das Medium ausgetauscht, um CaCl₂-Reste zu entfernen. Wiederum einen Tag später wurde der Überstand abgenommen und filtriert (0,45 µm), um einen Verpackungszell-freien retroviralen Überstand zu erhalten. Dieser wurde entweder frisch eingesetzt oder bei -80°C bis zur Verwendung gelagert. Zur Infektion wurden 5 x 10⁵ bis 1 x 10⁶ humane T_h-Zellen am Tag zwei nach Stimulation mit allogenen EBV-transformierten B-Zellen in 1,5 ml Eppendorfgefäßen heruterzentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann mit 1 ml retroviralem Überstand mit 2 µl Polybren (8 mg/ml) und 10 U/ml IL-2 aufgenommen und für eine Stunde bei 5000 x g bei RT zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen auf eine 24-well Platte überführt, auf 2 ml Gesamtvolumen mit Kulturmedium aufgefüllt und bei 37°C und 5% CO₂ ganz normal weiterexpandiert. Ein bis zwei Wochen später konnten die positiven Zellen über GFP heraussortiert werden. Diese sortierten Zellen wurden für spätere Proliferations- und Hemmtests bzw. zur Expressionsanalyse weiter wie beschrieben kultiviert.

3.7.2 Gentransfer in murine Hybridomzellen

Das experimentelle Procedere ist identisch mit dem Infektionsprotokoll für humane T-Zellen, mit dem Unterschied, dass als Verpackungszellen murine ecotrope GPE86+ Zellen verwendet wurden und z.T. pMSCV-puro als Expressionsplasmid verwendet wurde. Eine Selektion der infizierten Zellen erfolgte im Falle einer Puromycin-Resistenz durch das pMSCV-puro Plasmid durch die Zugabe von einer letalen Dosis

von Puromycin, die zwischen 1 bis 10 µg/ml je nach *Charge* lag und durch eine Sterbekontrolle mit nicht-infizierten Zellen kontrolliert wurde.

3.8 Luciferase-Assays

Für die *Luciferase*-Messungen wurden verschiedene genomische Promotorregionen, auf die Foxp3 einen Einfluss haben könnte, in ein *Luciferase*-Reporter Plasmid (pGL3-basic) kloniert. Durch eine transiente Transfektion mit DEAE/Dextran (s.3.10.4.2) in 16.2.11 Zellen, welche Foxp3 exprimieren, wurde der Effekt von 3xNFAT getestet. Als Bezug für die jeweilige Transfektionseffizienz diente die Ko-Transfektion mit einer *Renilla-Luciferase*, welche unter der Kontrolle eines konstitutiven Promoters (SV-40) stand. Zur Stimulation der Zellen am Tag nach der Transfektion wurden die Zellen mit löslichem anti-CD3 (Klon 500A2) stimuliert. Die transfizierten Zellen enthielten stabil die folgenden Expressionsplasmide:

A) pMSCV-puro (Negativkontrolle)

B) pMSCV-puro-Foxp3

Jeweils 3×10^6 transfizierte Hybridomzellen wurden mittels DEAE-Dextran (s.3.10.3.3) wie folgt transfiziert. Es wurden jeweils 300 ng SV-40-*Renilla Luciferase* Vektor und 1 µg 3xNFAT-Plasmid zusammen transfiziert. Dann wurden die so transfizierten Zellen ausplattiert und bis zum nächsten Tag bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Tags darauf wurde die Hälfte der Zellen jeweils mit 2 µg anti-CD3 für 6 h stimuliert. Danach wurden die Zellen zweimal gewaschen und final in 100 µl 1 x Passiven Lysis Puffer (Promega) resuspendiert. Bis zur Messung der *Luciferase*-Aktivität wurden die Zellysate bei -80°C eingefroren.

3.9. Molekularbiologische Methoden

3.9.1 Arrayanalysen

Die Arrayanalysen wurde in der Array-Facility der GBF in Braunschweig bei Prof. Dr. med. J. Buer durchgeführt. Verwendung fand der U133A Chip von Affymetrix. Das gesamte Datenset der *Microarray*-Experimente der Foxp3-transduzierten T_h-Zellen im Vergleich mit GFP Kontrollzellen (T_hGFP) sowie der Vergleich von allo-reactiven T_h Zellen mit korrespondierenden CD4⁺CD25^{hi}-abstammenden T_{reg}-Zellen sind bei *Array Express* (accession E-MEXP-228; www.ebi.ac.uk/arrayexpress/) hinterlegt. Die Analyse der signifikant regulierten Gene erfolgte mittels MAS 5.0 Software (Affymetrix). Foxp3-relevante Gene wurden als diejenigen definiert, welche in allen beiden Duplikaten einen Signalunterschied (Fold change) von ≥ 3 oder ≤ -3 aufweisen, oder in allen Vergleichen jeweils dieselbe Signalbeurteilung *increased* (I) oder *decreased* (D) aufwiesen.

3.9.2 Agarose-Gelelektrophoresen

Hierbei handelt es sich um ein Verfahren zur Auftrennung und Identifizierung von DNA-Fragmenten. Zu diesem Zweck wurde zuerst eine entsprechende Menge Agarose in 1 x TAE-Puffer durch Erhitzen in einer Mikrowelle gelöst. Zu der abkühlenden Lösung wurde Ethidiumbromid zugesetzt, welche mit DNA interkaliert. Hierdurch wird später nach der Auftrennung die DNA unter UV-Licht durch das Ethidiumbromid sichtbar. Ist das Gel dann entsprechend heruntergekühlt, gießt man es auf einen Träger und lässt es erstarren. Vorher wurden Kämme zum Erhalt von Taschen in den Träger eingesetzt. Zu analysierende DNA wird nach Zugabe von Lade-Puffer in die einzelnen Gel-Taschen gegeben und in einem Spannungsfeld nach ihrer Größe aufgetrennt. Die DNA ist aufgrund ihrer Phosphatreste negativ geladen und bewegt sich im Spannungsfeld daher zum Pluspol. Kleinere Fragmente bewegen sich in der Agarosematrix schneller als größere. Eine Größenordnung erreichte man unter Zuhilfenahme eines Längenstandards. Es wurden je nach Fragestellung 1 bis 2%-ige Gele verwendet.

3.9.3 Isolierung von Gesamt-RNA

Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte nach dem Standardprotokoll der Firma Macherey & Nagel mit Hilfe des Nucleospin RNA II-Kits. Genomische DNA wird hierbei durch einen DNase-Verdau vor dem Auftragen der RNA auf die RNA-bindende Matrix eliminiert. Die von der Säulenmatrix isolierte RNA wurde final in 40 µl DEPC-behandeltes Wasser aufgenommen und photometrisch auf Konzentration und Reinheit überprüft. Für die photometrische Messung wurden 5 µl RNA in 95 µl TE-Puffer aufgenommen.

3.9.4 Isolierung von Plasmid-DNA

Für die Plasmidisolierung wurde das Nucleospin Plasmid-Kit von Macherey & Nagel benutzt. Die Isolation erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Final wurde die isolierte Plasmidmenge in 50 µl Wasser aufgenommen und ebenfalls, wie in 3.10.6 beschrieben, vermessen.

3.9.5 Aufreinigung von DNA

Um PCR-Amplifikate oder bestimmte geschnittene Vektoren für spätere Experimente aufzureinigen, wurde das Nucleospin Extract II Kit von Macherey & Nagel verwendet. Vorher wurde die DNA aus dem jeweiligen Gel mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten. Die Aufreinigung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Final wurde das Eluat in 25 µl Wasser aufgenommen.

3.9.6 Bestimmung von Nukleinsäure mittels des Photometers

Die Konzentration von Nukleinsäuren kann durch photometrische Messung der Extinktion bei 260 nm bestimmt werden. DNA (RNA) der Konzentration 50 (40) µg/ml hat einen 260 nm-Extinktionswert von ca. 1.0. Daraus ergibt sich die Bestimmungsformel für DNA (RNA)-Lösungen mit dem Verdünnungsfaktor f, gemessen in Küvetten der Schichtdicke 1 cm.

$$\Delta E_{260-320} \times 50(40) \times f = \mu\text{g DNA(RNA)/ml}$$

Das verwendete Photometer erlaubte gleichzeitig eine Einschätzung der Qualität der vorliegenden Nukleinsäuren, indem vier wichtige Kennwellenlängen des Spektrums mitbestimmt wurden:

230 nm (Absorption von Salzen und Kohlenhydraten)

260 nm (Absorptionsmaximum der Basen der Nukleinsäuren)

280 nm (Absorptionsmaximum von Proteinen)

320 nm (Basislinie des Absorptionsspektrums der Nukleinsäuren).

Richtwerte für eine Nukleinsäurepräparation guter Qualität sind ein 230 nm-Wert <50 % und ein 280 nm-Wert <60 % des 260 nm-Wertes. Der Quotient aus der Extinktion bei 260 nm und der bei 280 nm sollte daher einen Wert von 1.8 haben.

3.9.7 Fällung von RNA

In manchen Fällen war es erforderlich, die gewonnene RNA aufzukonzentrieren, was durch eine Fällung erfolgte. Hierbei kommt auf das Gesamt-Volumen von 100 µl der RNA-Lsg. 250 µl 99% Ethanol, 50 µl 7,5 M Ammoniumacetat und 0,5 µl LPA. Der Ansatz wird bei -80°C für 30 min gefällt. Anschließend folgte ein Zentrifugationsschritt für 20 min bei 4°C , gefolgt von einem Waschschrift mit 70% Ethanol.

3.9.8 Reverse Transkription (RT)

Für die cDNA-Synthese wurden bis maximal 5 µg Gesamt-RNA und 1 µl Oligo-dT-Primer auf 12,6 µl Wasser aufgefüllt. Es folgte ein 10-minütiger Inkubationsschritt bei 70°C und anschließend eine Inkubation auf Eis für 2 min. Nun wurden jeweils 7,4 µl *Mastermix* zur reversen Transkription der mRNA zu dem Ansatz hinzupipettiert und bei 42°C für 2 min inkubiert. Der *Mastermix* bestand aus den folgenden Komponenten:

4 µl 5 x Reaktionspuffer (Invitrogen)

2 µl DTT; 100 mM (Invitrogen)

1 µl dNTP; 10 mM (Invitrogen)

0,4 µl RNasin; 400 U/µl (Promega)

Anschließend folgte die Zugabe der Reversen Transkriptase (M-MLV-Reverse Transkriptase; Promega) und ein Inkubationsschritt für 60 min bei 42°C . Als letztes folgte eine Inaktivierung des Enzyms bei 90°C für 5 min und die Hinzugabe von 40 µl TE-Puffer. Die synthetisierte cDNA wurden je nach Anwendung entweder unverdünnt oder in entsprechenden Verdünnungsstufen eingesetzt.

3.9.9 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die von Mullis et al. (1986) vorgestellte Methode ermöglicht *in vitro* die exponentielle Amplifikation einer spezifischen DNA-Sequenz mittels Primer-abhängiger, hitzestabiler DNA-Polymerase (*Taq*-Polymerase) von *Thermus aquaticus*. Die Primer sind in der Regel zwischen 20 und 30 Nukleotide lang und Gen-spezifisch. Der 5'-ständige Primer wird im Folgenden als *forward*-Primer, der am 3' Ende des Produktes liegende als *reverse*-Primer bezeichnet.

Es wurden Primer für bestimmte Gene mit dem Programm *Vektor NTI* konstruiert, welche in unterschiedlichen Exonen liegen sollten, soweit möglich keine Dimere und keine *Hairpin*-Strukturen aufweisen sollten und eine Hybridisierungstemperatur zwischen 50 und 60°C haben sollten .

3.9.9.1 Semiquantitative PCR

Um eine Vergleichbarkeit unterschiedlicher Proben zu gewährleisten, wurden diese mit Hilfe des *housekeeping* Gens RPS9 aufeinander abgeglichen. Bei einem *housekeeping* Gen handelt es sich um ein in großer Menge und ähnlicher Intensität expremiertes Gen, welches nicht wesentlich durch äußere Einflüsse reguliert wird. Die Gene, die in der semiquantitativen PCR überprüft wurden, erwiesen sich in den zugrunde liegenden GenChip-Analysen als potentiell interessant, da sie in regulatorischen T-Zellen als differentiell reguliert erschienen. Die Primerspezifitäten wurden vorher auf der NCBI-*website* (*National Center for Biotechnology Information*) mit Hilfe der *Blast*-Option überprüft.

Für einen 25 µl PCR-Ansatz wurden die folgenden Komponenten in einem Mastermix zusammenpipettiert:

2,5 µl 10 x *Hot Start* PCR-Puffer

1 µl 2,5 mM dNTPs

0,25 µl 100 pmol Primer 1

0,25 µl 100 pmol Primer 2

0,1 µl *Hot Start* Polymerase (5 U/µl)

19,9 µl Wasser

1 µl Template (1/3; 1/9; 1/27 vorverdünnt)

.....

total 25 µl

Das benutzte PCR-Programm war für jedes Gen identisch. PCR-Profil:

Prädenaturierung	95°C	10min	

Denaturierung	94°C	1min	
<i>Annealing</i>	50-60°C	1min	25-35 x Zyklen
Elongation	72°C	2min	

Terminale Elongation	72°C	10min	

3.9.9.2 Amplifikation mit *High Fidelity* Pfu-Polymerase

Es sollten die kodierenden Sequenzen von verschiedenen relevanten Genen, welche sich durch vorangegangene *Array*-Analysen und in der semiquantitativen PCR als differentiell reguliert darstellten, möglichst fehlerfrei amplifiziert werden (s.Tab.2). Zu diesem Zweck wurde die *High Fidelity* Pfu-Polymerase (Promega) benutzt. Dieses Enzym besitzt eine 3' → 5' Exonuklease-Aktivität (*proofreading*), was eine hohe Genauigkeit im Amplifikationsprozeß gewährleistet. Auch hier wurden 25 µl Ansätze bestehend aus den folgenden Komponenten verwendet:

2,5 µl 10 x Pfu Polymease Puffer

1 µl 2,5 mM dNTPs

0,25 µl 100 pmol Primer 1

0,25 µl 100 pmol Primer 2

0,125 µl Pfu Polymerase (3 U/µl)

19,875 µl Wasser

1 µl Template

total 25 µl

Gearbeitet wurde für jedes Gen mit dem folgenden PCR-Programm:

Prädenaturierung	95°C	2min	

Denaturierung	95°C	1min	
<i>Annealing</i>	60°C	30sec	30 - 35 Zyklen
Elongation	72°C	3min	

Terminale Elongation	72°C	10min	

3.9.9.3 *RealTime* RT-PCR

Die *RealTime* RT-PCR erlaubt eine exakte Quantifizierung einer mRNA Expression. Dies beruht auf der Fähigkeit des Testsystems, die Neubildung von DNA in der PCR mittels eines speziellen Detektionssystems schrittweise und in Echtzeit (*realtime*) zu verfolgen. Hierbei wird aus einer Halogenlampe Licht der Wellenlänge 485 nm herausgefiltert. Nun wird über ein Spiegel- und Linsensystem der Lichtstrahl auf die sich im *Cycler* befindlichen PCR-Proben gelenkt. Alle *samples* befinden sich in speziellen optischen PCR-*tubes*, damit nur eine minimale Beeinflussung des Strahlenganges erfolgt. Zur Detektion der neusynthetisierten DNA wird den PCR-Ansätzen SYBR-Green zugesetzt, ein Fluoreszenzfarbstoff, der in die doppelsträngige DNA eingebaut wird. Durch die Bestrahlung des Farbstoffes mit blauem Licht (485 nm) wird dieser zur Emission von grünem Licht (519 nm) angeregt. Ungebundenes SYBR-Green besitzt nur eine geringe Fluoreszenz, wohingegen es durch die Bindung an doppelsträngige DNA zu einer Verstärkung des Fluoreszenzsignals kommt. Hierbei ist die Menge an neu gebildeter DNA direkt proportional zur Fluoreszenzintensität. Das dabei emittierte Licht des Fluoreszenzfarbstoffes wird erneut über ein Filter- und Linsensystem geleitet und wird dabei von einer Kamera detektiert und anschließend mittels einer speziellen Software numerisch wiedergegeben. Bei diesem Verfahren dient eine Standardreihe zur Quantifizierung des untersuchten Gens. Ebenso wie bei der semiquantitativen PCR diente hierbei RPS9 als das *housekeeping* Gen.

Für jede Optimierung einer *Realtime*-PCR ist es erforderlich, das optimale Primerpaar-Verhältnis zu ermitteln. Zu diesem Zweck wird eine sog. Primermatrix erstellt, bei der verschiedene Konzentrationen von Primerpaaren getestet werden.

Alle Primer wurden auf eine Konzentration von 5 pmol/μl eingestellt und zu diesem Zweck jeweils 50 nM, 300 nM und 900 nM von jedem Primer eingesetzt wurden. Die Etablierung der Primermatrix erfolgte durch Tanja Töpfer, GBF, Braunschweig. Dabei entsprachen 50 μl Gesamtvolumen dem Zweieinhalbfachen der benötigten Menge, da jeweils Duplikatbestimmungen durchgeführt wurden. Von diesem Gesamtansatz wurden dann für die Doppelbestimmung jeweils 20 μl in optische PCR-*tubes* vorgelegt und anschließend 30 μl Mastermix hinzugegeben. Dieser setzte sich pro Ansatz wie folgt zusammen:

5 μl 10 x PCR-Puffer
2,5 μl MgCl₂
2 μl dNTPs
8 μl Glycerol
1,5 μl DMSO
0,75 Reference dye (1:50)
5 μl SYBRGreen (1:2000)
0,5 μl Sure Star Taq
4,75 μl Wasser

Als Template diente eine Vorverdünnung an cDNA in 10 μl Wasser. Ebenso wurden auch die in der Primermatrix ermittelten Primerkombinationen auf 10 μl pro Ansatz verdünnt. Nun wurden jeweils 30 μl Mastermix hinzugegeben und die einzelnen Proben als Duplikate in der PCR analysiert. Zur Herstellung der Standardreihe wurde ein *template*-Mix aus allen untersuchten cDNAs zusammenpipettiert. Es wurden dabei Volumina zwischen 3 und 0,01 μl der cDNA eingesetzt und wie die Proben Doppelansätze hergestellt. Alle Ansätze wurden anschließend mit dem GeneAmp PCR System 5700 von Perkin-Elmer gemessen. Es lag dabei folgendes PCR-Programm zugrunde:

Prädenaturierung	95°C	10min	

Denaturierung	95°C	15sec	
<i>Annealing</i>	58/55°C	1min	40Zyklen

3.9.10 Dephosphorylieren von Vektoren

Schneidet man einen Vektor nur mit einem Enzym, so war eine Vorbehandlung mit *Calf Intestine Alkaline Phosphatase* (CIAP) nötig, um die überhängenden Phosphatreste zu entfernen und eine Religation des Vektors zu verhindern und ein Insert mit höherer Effizienz klonieren zu können. Zu diesem Zweck wurde der folgende Reaktionsansatz hergestellt:

25 µl linearisierter Vektor

5 µl 10 x CIAP-Puffer

1 µl CIAP

19 µl Wasser

Es erfolgte eine Inkubation bei 37°C für 30 min und eine anschließende Hitzeinaktivierung des Enzyms bei 85°C für 15 min.

3.9.11 Klonierungen

3.9.11.1 Ligation in pCR^R4.1Blunt-TOPO

Alle über Pfu-PCR amplifizierte Sequenzen (s. Tab 2) relevanter Gene wurden zunächst TOPO-kloniert:

0,5 µl pCR^R4.1Blunt-TOPO (10 ng/µl)

1 µl *salt solution* (1,2 M NaCl; 0,06 M MgCl₂)

4,5 µl PCR-Produkt

Es erfolgte eine Inkubation bei RT für 20min, anschließend wurden 2 µl zur Transformation von chemisch kompetenten *E. coli* (TOP10, Invitrogen) eingesetzt.

3.9.11.2 Ligation in andere Vektoren

Generell wurde für jede Ligation vorher im Agarosegel das Ligationsverhältnis von etwa 1:4 Vektor/Insert ermittelt. Es wurde stets eine Negativkontrolle ohne Insert mitgeführt. Es sollten im Optimalfall in der Negativkontrolle keine oder nur wenige Kolonien wachsen. Für jede Ligation wurde der folgende Reaktionsansatz unter Berücksichtigung des vorher bestimmten Vektor/Insert Verhältnisses vorbereitet:

x µl Vektor geschnitten

y µl Insert

4 µl 5 x Ligase Puffer (Invitrogen)

1 µl T4 DNA Ligase (Invitrogen)

Der Ansatz wurde dann auf 20 µl Wasser aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte im PCR-Block über Nacht bei 16°C.

3.9.12 Klonierungsstrategien

3.9.12.1 Retrovirale Überexpression

Die *Pfu*-Amplifikate (s. Tab. 3) sollten final in die retroviralen Expressionsplasmide kloniert werden. Folgende Zwischenklonierungen waren erforderlich:

Ctla4: Zuerst wurde auf T_{reg}-Zell cDNA eine *Pfu*-PCR durchgeführt. Dieses Amplifikat wurde dann TOPO-kloniert und in diesem Vektor sequenziert. Aus TOPO wurde das Insert *HindIII/EcoRI* herausgeschnitten und in einen so vorgeschrittenen pcDNA3+ Vektor kloniert. Danach wurde das Insert dort über *BglII/SalI* herausgeschnitten und in *BglII/XhoI* in pMSCV-IRES-gfp kloniert.

Foxp3: Als Template diente T_{reg}-Zell cDNA. Das über *Pfu* amplifizierte Produkt wurde zuerst TOPO-kloniert und sequenziert. Die 5'-Primer besaß eine *HindIII*- und der 3'-Primer eine *XhoI*-Schnittstelle. Aus TOPO wurde das Insert *HindIII/XhoI* wieder herausgeschnitten und in einen so geschnittenen pBlueKSP-Vektor kloniert. Dort wurde das Insert wieder *BamHI/XhoI* herausgeschnitten und in *BglII/XhoI* in pMSCV-IRES-gfp kloniert.

UBD: Als Template diente T_{reg} Zell cDNA. Aus TOPO wurde das Insert *PmeI/NotI* nach Sequenzierung herausgeschnitten und über *EcoRV/NotI* in pCDN3- kloniert. Das Fragment wurde dann mit *BamHI/XhoI* herausgeschnitten und über *BglII/XhoI* in pMSCV-IRES-gfp kloniert.

3.9.12.2 Luciferase-Vektor

3xNFAT: Freundlich von zur Verfügung gestellt von Dr. K. Wollert, Kardiologie, MHH.

3.10 Mikrobiologische Methoden

3.10.1 Transformationen

Alle Transformationen wurden nach dem gleichen Protokoll durchgeführt, mit dem Unterschied, dass alle TOPO-Ligationsansätze in kompetente One Shot[®] *E. coli* (Invitrogen) transformiert wurden. Zudem konnte für alle TOPO-Klonierungen ein Blau-Weiß-Screening durch den Zusatz von X-Gal (2% in Dimethylformamid (DMF)) zu dem LB-Agar plus Antibiotikum durchgeführt werden. Der Vektor pCR4.1-TOPO enthält ein funktionsfähiges β -Galaktosidase-Gen. Alle Bakterien die diesen Vektor enthalten, setzen X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galaktosid) enzymatisch um und bilden Galaktose und den blauen Farbstoff 5-Bromo-4Chloro-3-Indol, durch den die Kolonien einen blauen Farbton erhalten. Der Einbau eines Inserts in die *multiple cloning site* zerstört das Leseraster des LacZ-Gens, wodurch keine funktionsfähige β -Galaktosidase mehr gebildet werden kann. Somit erscheinen alle positiven Kolonien (mit gewünschtem Insert) in Gegenwart von X-Gal weiß. Alle anderen Ligationsansätze wurden in die selbst hergestellten kompetenten Zellen transformiert. Zu diesem Zweck wurden jeweils 50 μ l Bakteriensuspension auf Eis aufgetaut. Dann wurde etwa 1 μ g Expressionsplasmid hinzugegeben und 8 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine Inkubation bei 42°C für 30 sec. Anschließend wurden die Ansätze für 2 min auf Eis gestellt, in 200 μ l LB-Medium aufgenommen, und 1 h bei 37°C unter kontinuierlichem Schütteln (150 rpm) inkubiert. Zuletzt wurden die Bakterien auf den antibiotikumhaltigen LB-Agar-Nährböden ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.10.2 Animpfen von Flüssigkeitskulturen

Am nächsten Tag wurden einzelne Kolonien gepickt, in 10 ml LB-Medium plus Ampicillin (50 μ g/ml) oder Kanamycin (10 mg/ml) angeimpft und bei 37°C über Nacht unter kontinuierlichem Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag konnten die Bakteriensuspensionen für eine Plasmidpräparation wie unter 3.9.4 beschrieben verwendet werden.

3.10.3 Herstellen von Bakterienstocks

Für eine kurzfristige Lagerung wurden die Bakterien auf den Agarplatten bei 4°C gelagert. Wollte man einen positiv identifizierten Klon jedoch langfristig lagern, so wurden 600 µl der Übernachtskultur mit 600 µl Glycerin (87% (v/v) in Wasser) gemischt und bei -80°C gelagert.

3.10.4 Transfektionen

Alle synthetisierten Expressionsplasmide wurden je nach Anwendung in verschiedene Zielzellen transfiziert. Das angewandte Verfahren richtete sich zudem danach, ob es sich bei den zu transfizierenden Zellen um adherente oder um Suspensionszellen bzw. um humane oder murine T-Zellen handelte.

3.10.4.1 Transfektion der Verpackungszellen PT67 und GPE86⁺

Die amphotrophen PT67-Zellen und ecotrophen GPE86⁺ Zellen wurden jeweils nach dem CaCl₂-Protokoll transient transfiziert. Bei der CaCl₂-Methode wird ein DNA-CaCl₂-Präzipitat gebildet, das von den Zellen aufgenommen werden kann. Bei den amphotrophen Zellen handelt es sich um S2-Organismen, daher wurden diese Experimente mit freundlicher Unterstützung durch Dr. H. Hauser (GBF, Braunschweig) in dessen S2-Bereich durchgeführt. Für beide Zelltypen wurden 5 x 10⁵ Zellen Tags zuvor in 25 cm² Kulturflaschen ausgesät. Am nächsten Tag wurde das DNA-CaCl₂-Präzipitat vorbereitet. Hierfür wurden pro Transfektion 250 µl einer 2xHEBS Lösung vorgegeben (Lsg. A) und davon getrennt die Plasmid-DNA (5 bis 10 µg) in 25 µl 2,5 M CaCl₂ auf 250 µl mit sterilem Wasser aufgefüllt (Lsg. B). Lösung B wurde dann unter Blasenbildung mit einer Pasteurpipette und einem PipetBoy in Lösung A gegeben und für 45 min bei RT gelagert. Das entstandene DNA-CaCl₂-Präzipitat wurde in das Kulturmedium der zu transfizierenden Zellen gegeben. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt und tags darauf Überstand gesammelt.

3.10.4.2 Transiente Transfektion mit DEAE-Dextran

Dieses Verfahren wurde für Luciferase-Assays in 16.2.11 Hybridomzellen verwendet. Die Transfektionseffizienz lag dabei zwischen 2-10%. Zur Durchführung der Transfektion wurden die zu transfizierenden Zellen abgenommen und einmal mit 1x PBS gewaschen. Pro Transfektionsansatz wurden jeweils 3×10^6 Zellen in 300 μ l TBS-Puffer (8 g NaCl; 0,2 g KCl; 3 g Tris base ad 800 ml Wasser pH 7,4; auffüllen auf 1 l Wasser) aufgenommen und in 1,5 ml Eppendorfgefäße vorgelegt. Parallel wurde ein Transfektionsmix bestehend aus folgenden Komponenten angesetzt:

15 μ l DEAE-Dextran (15 mg/ml)

12 μ l Chloroquine (2 mg/ml)

285 μ l TBS-Puffer

Anschließend wurden die Zellen in den Eppendorfgefäßen herunterzentrifugiert. Parallel wurde in 1,5 ml Eppendorfgefäßen ein DNA-Mix hergestellt, indem 1 μ g Plasmid-DNA in die Gefäße pipettiert und der Ansatz mit 300 μ l TBS aufgefüllt wurde. Danach wurden 300 μ l Transfektionsmix hinzupipettiert und die gesamten 600 μ l auf das Zellpellet gegeben. Es erfolgte eine Inkubation für 45 min bei RT. Anschließend wurde der Ansatz erneut zentrifugiert und zweimal mit Kulturmedium gewaschen. Als letztes wurden die Zellen ausplattiert und über Nacht bei 37°C, 5% CO₂ und 95% gesättigter Wasserdampfatosphäre inkubiert. Je nach Fragestellung wurden die Zellen tags darauf direkt in passivem Lysisbuffer aufgenommen oder vorher mit anti-CD3 Antikörpern stimuliert.

3.11 Proteinchemische Arbeitsmethoden

3.11.1 Western Blot

Für den spezifischen Nachweis eines bestimmten Proteins in einem Gemisch wird häufig ein spezifischer Antikörper benutzt, der im Western Blot zum Nachweis herangezogen wird. Zu diesem Zweck wird das Proteingemisch zunächst auf einem SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Hierfür werden die zu analysierenden Zellen zunächst zentrifugiert und in 20 μ l 2 x SDS-Ladepuffer aufgenommen. Hierbei denaturiert SDS (Sodiumdodecylsulfat) die Proteine und verbindet diese zu negativ geladenen SDS-Protein-Komplexen. Sie besitzen ein konstantes Massen- und Ladungsverhältnis. In der SDS-Page wandert dabei der SDS-Proteinkomplex im elektrischen Feld zum positiven Pol. Das Gel besteht aus einem Sammelgel (Tris-

HCl pH 6,8; 3-4% Acrylamid) und einem Trenngel (Tris-HCl pH 8,8; 5-20% Acrylamid). Indem man einen Marker, welcher aus Proteinen bekannter Größe zusammengesetzt ist, auf dem Gel mitlaufen lässt, kann das Molekulargewicht der zu detektierenden Proteinbanden bestimmt werden. Nach der Auftrennung wird das Gemisch auf eine Nitrocellulose-Membran mittels Elektroblob übertragen (Blotten). Zu diesem Zweck wird die Membran zunächst in Blottingpuffer gelegt. Der Transfer erfolgt bei 160 mA für 40 min in einer Blotting-Kammer. Anschließend wird die Membran mit Milchpulver (unspezifische Proteine) abgesättigt, damit keine unspezifische Bindung des Antikörpers an die Membran selbst erfolgt (Blocken). Das Blocken erfolgt eine Stunde mit 10% Milchpulver in TBS-T (TBS mit 0,1 % Tween). Anschließend wird die Membran einmal 10 min und dann zweimal für 5 min mit TBS-T gewaschen. Für die nachfolgende Antikörperbindung wird der betreffende Antikörper in der zuvor durch Titration ermittelten Konzentration in 5% Milchpulver verdünnt und die Membran eine Stunde bei RT geschüttelt und daraufhin bei 4°C über Nacht inkubiert. Hierdurch bindet der Antikörper an sein Antigen. Am nächsten Tag folgt die Inkubation mit einem mit Peroxidase gekoppelten Zweitantikörper, welcher sich gegen den Primärantikörper richtet. Zur anschließenden Detektion wird ein Lumineszenzreagenz verwendet, welches von der Peroxidase unter Emission von Licht umgesetzt wird. Der Nachweis erfolgt mit Hilfe eines ECL-Hyper-Films von Amersham. Folgende Reagenzien wurden für die Western Blots benötigt:

Acrylamid-Mix:	Rotiphorese Gel 30 (30% Acrylamid,; 0,8% Bisacrylamid; in Wasser) (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
Trenngel 10%:	4 ml Wasser; 3,3 ml Acrylamid-Mix; 2,5 ml 1,5 M Tris in Wasser pH 8,8; 0,1 ml 10% (w/v) SDS in Wasser; 0,1 ml 10 APS in Wasser; 0,004 ml TEMED
Sammelgel:	2,7 ml Wasser; 0,67 ml Acrylamid-Mix; 0,5 ml 1 M Tris in Wasser pH 6,8; 0,04 ml 10% (w/v) SDS in Wasser; 0,04 ml 10% (w/v) APS in Wasser; 0,004 ml TEMED
2 x SDS-	
Probenpuffer:	1,5 g Tris pH 6,8, 20 ml Glycerin; 46 ml 10% (w/v) SDS in Wasser; 10 ml β -Mercaptoethanol; 4 ml 0,05% (w/v); Bromphenolblau in Wasser; Wasser ad 100 ml

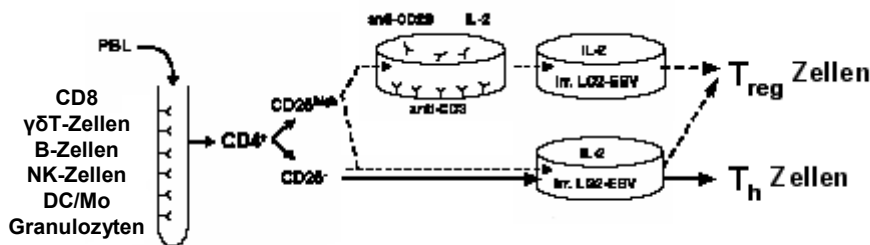
Protein-Marker:	Rainbow-Marker RPN 756 (Amersham, Braunschweig, Deutschland)
Laufpuffer:	30 g Tris und 144 g Glycerin; pH 8,6; 10 g SDS; Wasser ad 1000 ml
Blotting-Puffer:	5,8 g Tris; 29,5 g Glycerin; 1 g SDS; 200 ml Methanol; Wasser ad 1000 ml
Nitrocellulose-Membrane:	Porengröße 0,2 μm (Soratus, Göttingen, Deutschland)
10 x TBS:	6,1 g Tris; 8 g NaCl; 2 g KCl; Wasser ad 1000 ml
TBS-T:	1 x TBS mit 0,1% (v/v) Tween [®] 20

4. Ergebnisse

4.1. Funktionelle Tests $CD4^+CD25^{high}$ abstammender *in vitro* generierter T_{reg} -Zellen

Abb. 5 zeigt unser etabliertes Kultivierungsverfahren humaner $CD4^+$ -T-Zellen: Nachdem die Vollblutproben entsprechend aufgereinigt und aufgetrennt wurden, konnte über Zellsortieren die Fraktion der $CD4^+CD25^-$ von den $CD4^+CD25^{high}$ - T_{reg} -Zellen mit hoher Reinheit ($\geq 99\%$) separiert werden.

A)



B)

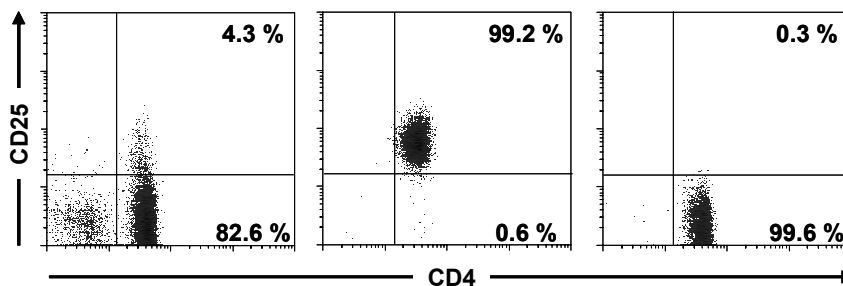


Abb.5: Isolierung und Langzeitkultur von $CD4^+CD25^{high}$ -abstammenden T_{reg} -Zellen.

A) $CD4^+$ -Lymphozyten aus peripherem Blut gesunder Spender wurden nach Ficoll-Trennung durch Depletion von $CD8^+$, $\gamma\delta TCR^+$, B-Zellen, DCs bzw. Makrophagen (Mo), und Granulozyten über MACS-Technologie angereichert. Danach erfolgte ihre Trennung zu nicht-regulatorischen $CD25^-$ und regulatorischen $CD25^{high}$ -Subpopulation. $CD25^{high}$ - T_{reg} -Zellen wurde danach unspezifisch mit Platten-gebundenen anti-CD3 und löslichen anti-CD28 Antikörpern und IL-2 stimuliert, bevor sie wöchentlich mit allogenen, bestrahlten (irr.) LG2-EBV B-Zellen und IL-2 wöchentlich restimuliert wurden. Alternative wurden T_{reg} -Zellen auch direkt mit allogenen, LG2-EBV B-Zellen und IL-2 stimuliert. Es bestand im Ergebnis zwischen beiden Protokollen kein Unterschied (s. 4.1.2 und Abb. 7).

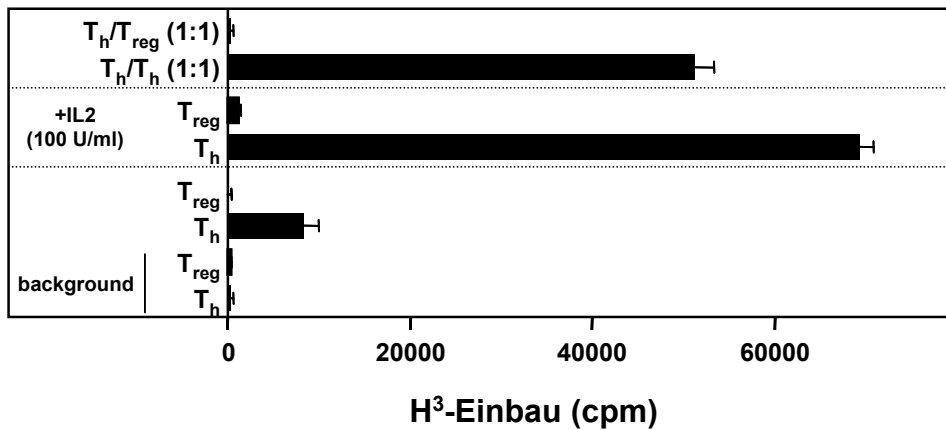
B) Repräsentative Re-Analyse nach Zellsortierung. Links dargestellt ist die Ausgangspopulation vor Sortierung, in der Mitte die Re-Analyse der $CD4^+CD25^{high}$ -Treg-Zellen, rechts die der $CD4^+CD25^-$ T-Zellen nach Sortierung (benutztes Gerät hier: MoFlo). Die Reinheiten der $CD25^{high}$ bzw. $CD25^-$ -Fraktion der $CD4^+$ T-Zellen betragen jeweils $\geq 99\%$.

Die CD4⁺CD25^{high} abstammenden regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) wurden entweder einmal mit anti-CD3 (1 µg/ml Platten-gebunden), löslichem anti-CD28 (1 µg/ml) und IL-2 (50-100 U/ml) unspezifisch vorstimuliert bevor sie wöchentlich mit allogenen EBV-transformierten, bestrahlten B-Zellen (LG2-EBV) und IL-2 (50-100 U/ml) jeden zweiten Tag expandiert wurden. Alternativ wurden die sortierten T_{reg}-Zellen direkt mit LG2-EBV B-Zellen und IL-2 stimuliert. Beide Protokolle führten zu einer Expansion der T_{reg} Zellen von bis zu 10¹⁰ Zellen über einen Zeitraum von ein bis zwei Monaten. Trotz der massiven Expansion blieb der T_{reg}-spezifische regulatorische Phänotyp aber erhalten (s. 4.1.1). Weiterhin konnten diese *in vitro* expandierten T_{reg}-Zellen problemlos bei -80°C wie normale T_h-Zellen gelagert und auch wieder in Kultur genommen werden, was für das Vorhaben einer regulatorischen T-Zell Therapie von Vorteil ist, da diese Zellen zu einem späteren Zeitpunkt eingesetzt werden können. Die nicht-regulatorischen CD4⁺CD25⁻-T-Zellen wurden zu allo-reaktiven T_h-Zellen durch Stimulation mit den allogenen LG2-EBV B-Zellen differenziert. Hierbei wurde IL-2 ab Tag 3 zur Expansion hinzugegeben. Zur Bestätigung ihrer jeweiligen funktionellen Eigenschaften wurden diverse *in vitro* Proliferations- und Hemmtests durchgeführt.

4.1.1 *In vitro* expandierte T_{reg}-Zellen bleiben anerg und regulatorisch

Aus Abb. 6 ist ersichtlich, dass die *in vitro* Expansion die wesentlichen funktionellen Eigenschaften von CD4⁺CD25^{high}-T_{reg}-Zellen nicht veränderten. Auch nach mehr als drei Monaten wiesen sie weiterhin einen anergen Phänotyp auf, d.h. sie proliferierten nicht auf alleinige anti-CD3 oder allogene Stimulation (LG2-EBV B-Zellen) ohne exogenes IL-2 im Gegensatz zu den generierten allo-reaktiven T_h-Zellen. Weiterhin supprimierten sie die anti-CD3 (Abb. 6A) oder Alloantigen-stimulierte Proliferation von T_h-Zellen (Abb.6B). Dieser suppressive Effekt wurde Dosis-abhängig durch IL-2-Zugabe von mehr als 10 U/ml aufgehoben (Abb. 6B.)

A)



B)

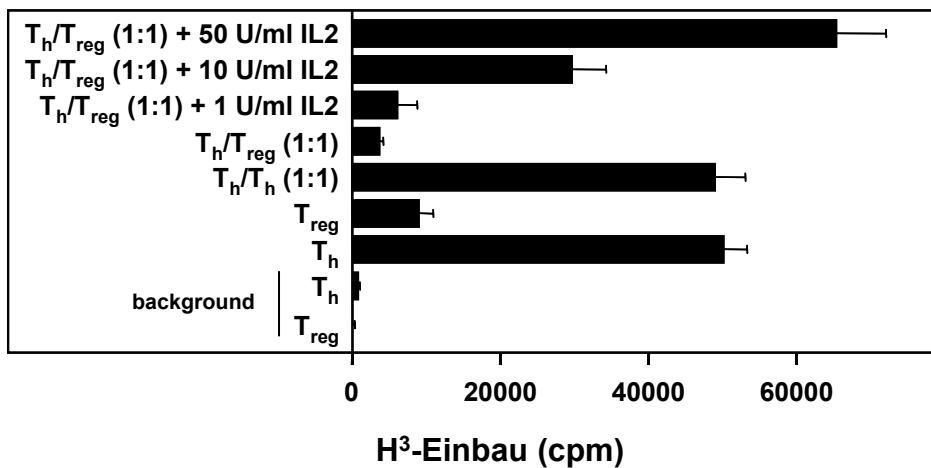


Abb. 6: T_{reg}-Zellen behalten ihren regulatorischen Phänotyp auch nach Expansion *in vitro*

A) CD4⁺CD25^{high} T-Zellen, welche mit Hilfe unseres Protokolls expandiert wurden, behielten konsistent ihren anergen und suppressiven Phänotyp allo-reaktiver T_h Zellen bei Stimulation mit plattengebundenem aCD3, background = unstimuliert

B) Entsprechendes Bild wie A) bei nomineller Stimulation durch bestrahlte LG2-EBV B-Zellen. Die suppressive Eigenschaft von T_{reg}-Zellen wird bei einer IL-2 Dosis von >10 U/ml aufgehoben. background = unstimuliert

4.1.2 CD4⁺CD25^{high}-T_{reg}-Zellen können direkt *ex vivo* durch allogene Stimulation und IL-2 expandiert werden

Da natürlich regulatorische CD4⁺CD25^{high}-T_{reg}-Zellen anerg sind, ist es nicht möglich, zu entscheiden, ob eine definierte Stimulation mit allogenen B-Zellen auch tatsächlich Antigen-spezifisch T_{reg}-Zellen stimuliert. Daher wurde initial die erste Stimulation unspezifisch durch anti-CD3/-CD28/IL-2 vorgenommen. Diese Stimulation erzwingt sicher das Wachstum von T_{reg}-Zellen^{4,20,43}. Danach wurden diese unspezifisch vorstimulierten T_{reg}-Zellen wöchentlich mit allogenen LG2-EBV B-Zellen und IL-2 stimuliert. Die so generierten T_{reg}-Zellen unterschieden sich phänotypisch und funktionell nicht. Sie waren anerg und in gleicher Weise suppressiv für Alloantigen-stimulierte T_h-Zellen (Abb. 7).

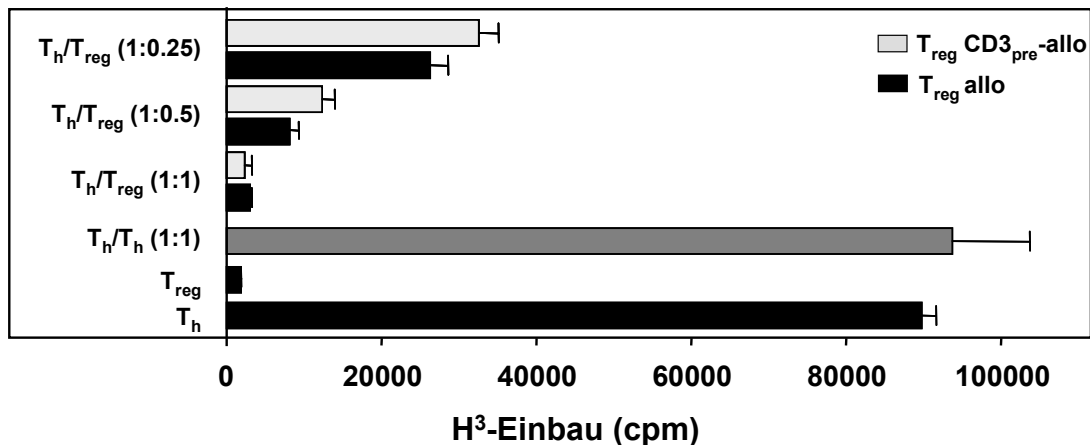


Abb. 7: Die Suppressor-Funktion unterschiedlich generierter T_{reg}-Zellen ist vergleichbar. CD4⁺CD25^{high} T_{reg}-Zellen, welche entweder direkt allogenen mit LG2-EBV/ IL-2 (=T_{reg} allo) oder verzögert nach einmaliger Stimulation mit antiCD3/antiCD28/IL-2 (=T_{reg} CD3_{pre}-allo) allogenen stimuliert wurden, suppressieren in gleicher Weise die Proliferation allo-reaktiver T_h-Zellen (T_h) in unterschiedlichen T_{reg}/T_h-Zell Verhältnissen, was durch T_h-Zellen auch bei einem Verhältnis von 1:1 nicht erreicht wird (T_h/T_h 1:1). Nicht dargestellt ist der unstimulierte H³-Einbau, welcher unter 700 cpm lag.

4.1.3 Zellkontakt-abhängige Suppressor-Funktion von T_{reg} -Zellen

Ein Charakteristikum das *in vitro* zu beobachten ist, ist die Zell-Kontakt abhängige Suppressor-Funktion von regulatorischen $CD4^+CD25^{high}$ -T-Zellen. In Abb. 8 wird deutlich, dass die *in vitro* generierten T_{reg} -Zellen diese Eigenschaft weiterhin aufweisen. Nur bei direktem Zell-Zell-Kontakt mit allogenen-stimulierten T_h -Zellen kommt es zu einer Suppression ihrer Proliferation. Werden T_{reg} - und T_h -Zellen durch eine semipermeable Membran getrennt, erfolgt keine signifikante Hemmung der T_h -Zell-Proliferation. Hierbei macht es keinen Unterschied, ob dabei allogene Stimulatorzellen (LG2-EBV) mit im oberen Transwell (TW) zusammen mit den T_{reg} -Zellen enthalten sind oder nicht (in der Abbildung durch ein „+“ oder „-“ gekennzeichnet). Als Kontrolle wurden ebenfalls normale T_h -Zellen mit allogenen LG2-EBV im Transwell stimuliert, um eventuelle unspezifische Effekte durch das Transwell-Insert auszuschließen. Hierbei erfolgte aber ebenfalls keine Einschränkung der Proliferation der T_h -Zell-Proliferation, welche unterhalb des Transwells gemessen wurde.

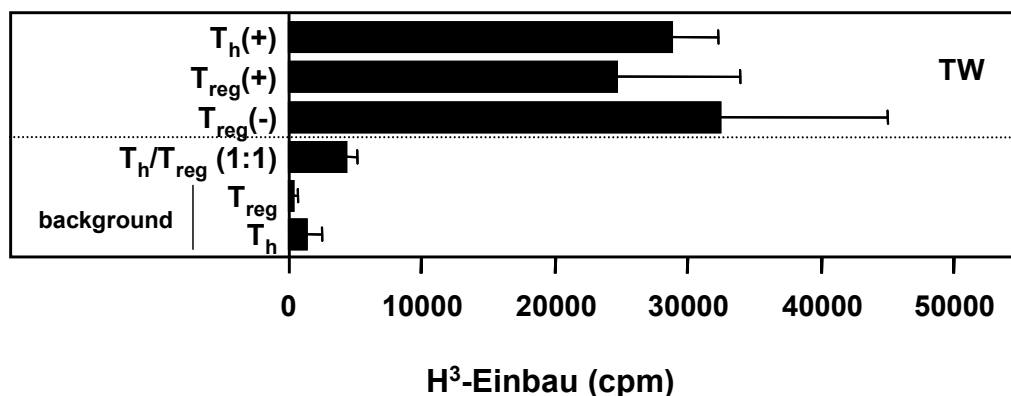


Abb.8: Transwelltest zum Nachweis der Zell-Zell-Kontakt abhängigen Hemmfunktion (TW = Transwell; + = plus LG2-EBV im oberen well; - = ohne LG2-EBV im oberen well). Repräsentative Darstellung von drei unterschiedlichen getesteten T_{reg} -Zelllinien.

4.1.5 Einfluß der Fixation auf die Suppressor-Funktion von T_{reg} -Zellen

Der Einfluss der Fixation mit para-Formaldehyd auf die regulatorische Eigenschaft der T_{reg} -Zellen wird aus Abb. 9 ersichtlich. Getestet wurden drei verschiedene fixierte T_{reg} Zelllinien (T_{regi} , T_{regii} und T_{regiii}) in ihrer Eigenschaft die T_h -Zell-Proliferation zu suppremierieren.

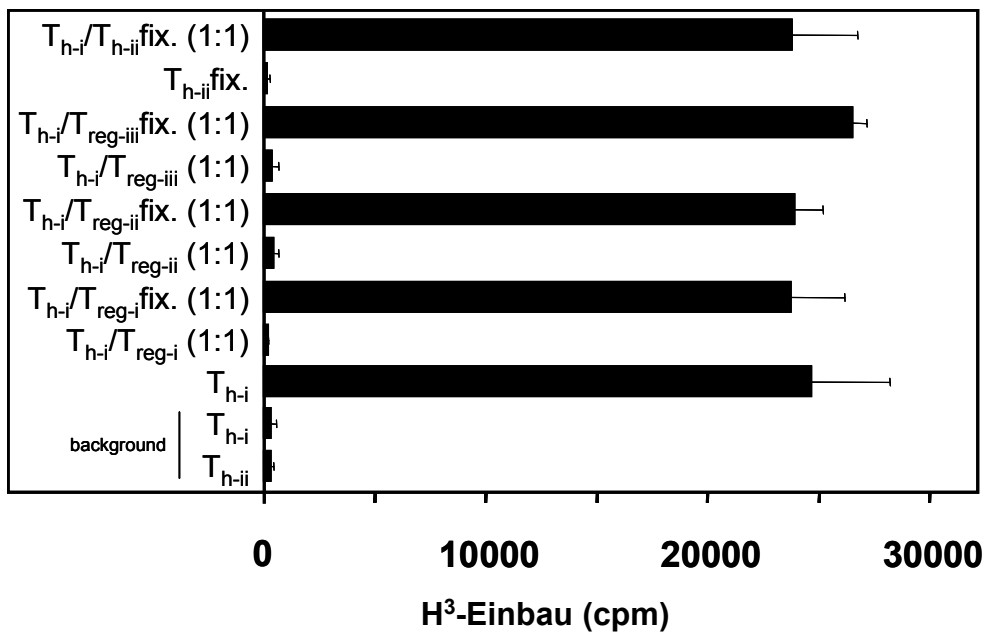


Abb.9: Der Einfluss der Fixation mittels Paraformaldehyd auf die Hemmfunktion

Drei unabhängige T_{reg}-Zelllinien wurden auf ihre Hemmfunktion nach Fixation mit para-Formaldehyd untersucht. Die Fixation führt zum Verlust der Hemmfunktion

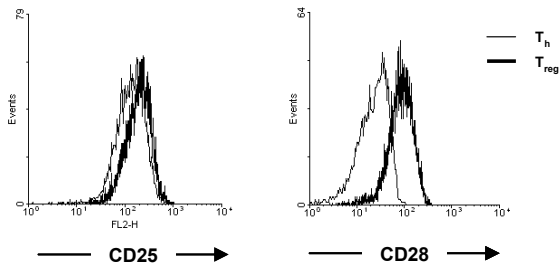
Als Negativkontrolle diente eine unabhängige allo-reaktive in gleicher Weise behandelte T_h-Zelllinie, um unspezifische Effekte der Fixation auszuschließen. Nach Fixation mit 1% para-Formaldehyd für 15 min waren sie nicht mehr in der Lage, die allogenen stimulierte T_h-Zell-Proliferation zu hemmen. Die Aufhebung der Hemmeigenschaft steht im Gegensatz zu Berichten, in denen bei *ex vivo* analysierten CD4⁺CD25^{high}-T_{reg}-Zellen keine Beeinträchtigung ihrer Hemmfunktion beobachtet wurde^{18,36}.

4.1.2 Stabiler CD4⁺CD25^{high} Phänotyp *in vitro* expandierter T_{reg}-Zellen

Allo-reaktive, nicht-regulatorische T_h-Zellen regulieren die CD25-Expression im Verlaufe von bis zu drei Tagen nach einer TCR-Stimulation soweit hoch, dass sie kaum noch von T_{reg}-Zellen zu unterschieden sind. Exemplarisch ist hier in Abb. 10A eine Analyse am Tag drei nach Allo-Stimulation gezeigt. Im Gegensatz zu CD25 ist die CD28-Expression auch am Tag drei nach Stimulation in T_{reg}-Zellen weiterhin höher als in T_h-Zellen (Abb. 10A). Im weiteren Verlaufe nach der Stimulation kommen T_h-Zellen in eine sog. „resting phase“, wobei die CD25-Expression wieder herunterreguliert wird; dies ist ab Tag 7 deutlich sichtbar (Abb. 10B). Im Gegensatz

dazu exprimieren die $CD4^+CD25^{high}$ -abstammenden T_{reg} -Zellen weiterhin konstitutiv CD25 in hoher Menge (Abb. 10B). Die $TCR\alpha\beta$ - und $CD3\epsilon$ -Expression von T_{reg} - und T_h -Zellen weichen nicht wesentlich voneinander ab (Abb. 10B).

A)



B)

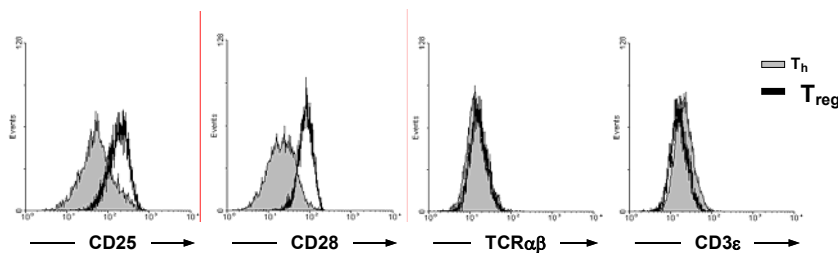


Abb. 10: FACS-Analyse verschiedener Oberflächenmarker bei T_h und T_{reg}

A) Vergleichende Analyse von CD25 und CD28 bei T_h und T_{reg} an Tag 3 nach Allo-stim.

Die CD28-Expression erscheint am Tag 3 nach Restimulation immer noch höher in T_{reg} - als in T_h -Zellen

B) Typische Herunterregulation von CD25 bei T_h -Zellen an Tag 7 nach Restimulation (Ruhephase), die T_{reg} -Zellen hingegen behalten stabil ihre konstitutive CD25-Expression. Die $TCR\alpha\beta$ - und $CD3\epsilon$ -Expression erscheint zwischen beiden Populationen nicht verändert

4.2 Foxp3-Expressionsunterschiede

Die stabil hohe Proteinexpression von CD25, CD28 und Ctla4 sowie die anhaltende Anergie und Suppressor-Funktion von *in vitro* expandierten T_{reg} -Zellen wird durch die hohe Foxp3-Expression gewährleistet. Im Vergleich zu allo-reaktiven T_h -Zellen ist in T_{reg} -Zellen unabhängig einer Stimulation immer eine stärkere Foxp3 mRNA Expression nachzuweisen. In Abb. 11 ist eine *Realtime*-RT-PCR Analyse der relativen Foxp3-Expression von T_{reg} -Zellen im Vergleich zu T_h Zellen dargestellt. Auch nach Stimulation mit anti-CD3/IL-2 oder anti-CD3/-CD28/IL-2, welche eine Proliferation von T_{reg} -Zellen erzwingt, ist die Foxp3-Expression unverändert um ein

Vielfaches höher als in T_h -Zellen. Hierbei gab es keinen festen Schwellenwert, da die relativen Expressionsunterschiede zwischen verschiedenen T_{reg} - und T_h -Zellen individuell sehr stark schwanken. In vier unterschiedlichen T_{reg} -Zelllinien konnten wir im Vergleich mit korrespondierenden T_h -Zellen einen relativen Unterschied der Foxp3-Expression von einer 4-fach (s.Abb.11) bis 20-fach höheren Expression von Foxp3 nachweisen. Funktionell und phänotypisch unterschieden sich diese Treg-Zellen nicht.

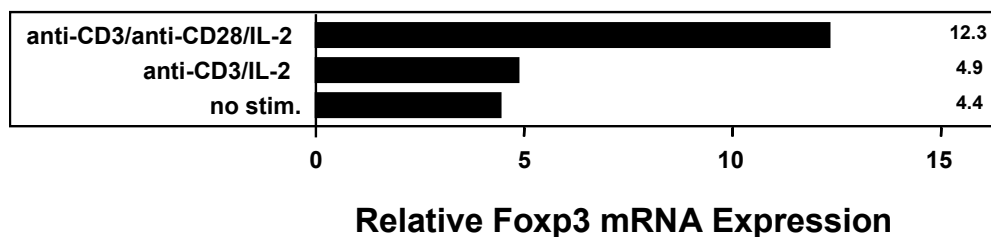


Abb.11: T_{reg} -Zellen weisen auch nach *in vitro* Expansion eine stabil hohe Foxp3 mRNA Expression auf.

Vergleich von vier unterschiedlichen T_{reg} -Zelllinien. Der relative Vergleich zu den korrespondierenden T_h -Zelllinien zeigt eine bis zu zwanzigfach höhere Foxp3-Expression auf

4.3 Cyclosporineffekte

4.3.1 *In vitro*-Effekt von Cyclosporin (CSA) auf $CD4^+$ - T_h -Zellen

Hierbei sollte der Einfluss des Immunsuppressivums Cyclosporin auf das Proliferations- und Inhibitionsverhalten von $CD4^+$ -T-Helfer-Zellen *in vitro* untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden $CD4^+$ - T_h -Zellen mit aCD3 und CSA oder Ionomycin oder aCD28 oder DMSO stimuliert und einen Tag später in einen Proliferations- und Hemmassay eingesetzt (s.Abb. 12). Das Immunsuppressivum CSA interferiert mit der Ca^{2+} /Calcineurin/NFAT-abhängigen Aktivierung von T-Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass die mit CSA vorbehandelten $CD4^+$ - T_h -Zellen im Vergleich zu den aCD3/CD28 vorstimulierten einen ausgeprägteren Hemmeffekt erworben haben (s. Sternchen). Weiterhin ist erkennbar, dass sogar nur *recently activated* aCD3/IL-2 oder aCD3/CD28/IL-2 vorstimulierte $CD4^+$ - T_h -Zellen suppremierend wirken.

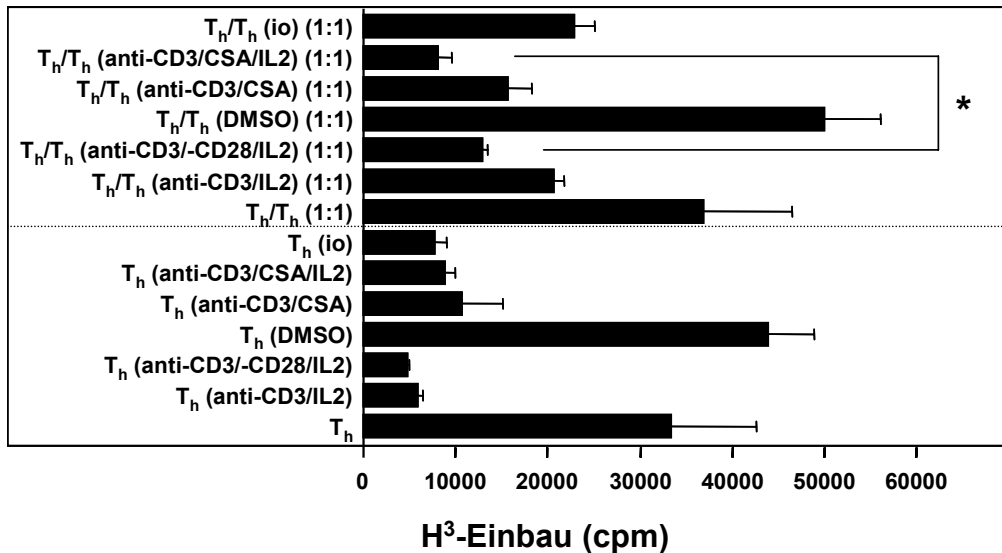


Abb.12: Wirkung von CSA *in vitro* auf funktionelle Eigenschaften von CD4-T_h-Zellen

CSA vorbehandelte CD4-T_h-Zellen zeigen eine vergleichsweise stärkere Hemmeigenschaft als die nur mit aCD3/CD28 stimulierten (Sternchen). Selbst die nur *recently activated* mit aCD3/IL-2 bzw. die aCD3/CD28/IL-2 stimulierten CD4-T_h-Zellen zeigten einen inhibierenden Phänotyp

4.3.2 Auswirkungen von CSA auf Foxp3-Expression

Weiterhin sollte korrespondierend semiquantitativ die mRNA-Menge an Foxp3 bestimmt werden. Zu diesem Anlass wurden in gleicher Weise unsere T_{reg}- als auch die T_h-Zelllinien wie oben beschrieben behandelt. Hierbei wurde nur die Stimulation mit aCD3 plus DMSO oder CSA auf transkriptioneller Ebene miteinander verglichen. Um einen Vergleich aller vier Proben zu ermöglichen, wurde die synthetisierte cDNA zunächst mittels RPS9 abgeglichen. Wie in Abb. 13 ersichtlich, führte die Stimulation mit CSA zu mehr Foxp3-mRNA als in der DMSO-Kontrolle. Eine *in vitro*-Stimulation mit CSA bewirkt somit eine Heraufregulation des Transkriptionsfaktors Foxp3, was wiederum zu einer funktionellen Einschränkung der Zellen und zu einem partiell inhibitorischen Phänotyp führt.

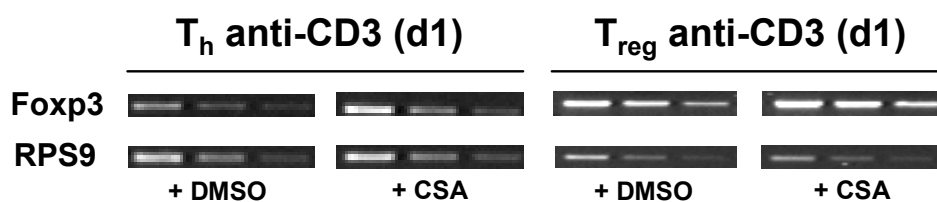


Abb.13: Semiquantitative PCR für Foxp3 nach CSA-Behandlung

Die *in vitro* Stimulation mit CSA führt sowohl in T_h- als auch in T_{reg}-Zellen zu einer Foxp3 mRNA-Induktion im Vergleich zu der DMSO-Kontrolle (RPS9-Abgleich).

4.4 Calciumflux

Indo-1-markierte Zellen wurden mit anti-CD3 Antikörpern beladen. Die Hinzugabe eines Quervernetzenden Sekundäantikörpers nach 60 s führte jeweils zur Ca^{2+} -Mobilisation. Der Bruch in der Kurve ist durch die Zeit bedingt, welche für die Herausnahme, der Zugabe des Sekundäantikörpers, und dem Wiedereinsetzen der T-Zellen in den FACS-Fluß vergeht. Die Auswertung erfolgte durch FloJo *software*, wobei der Prozentsatz der Ca^{2+} -responsiven Zellen, welche über dem Schwellenwert ohne Stimulation reagieren, dargestellt sind.

Veränderungen des Calciumstoffwechsel können zur Induktion von Anergie führen³². Bei der Analyse der TCR-stimulierten Ca^{2+} -Mobilisation von murinen $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ - T_{reg} -Zellen *ex vivo* wurde zudem eine herabgesetzte Fähigkeit zur Ca^{2+} -Mobilisation nachgewiesen²⁸. Unsere Ergebnisse jedoch zeigten etwas anderes: unsere humanen *in vitro* expandierten T_{reg} -Zellen zeigten im Vergleich zu allo-reaktiven T_{h} -Zellen einen länger anhaltenden anti-CD3 stimulierten Ca^{2+} -flux. Dieser Umstand wird verdeutlicht durch die verlängerte Zeitspanne, um nach dem initialen Ca^{2+} -*peak* wieder das *steady state*-Niveau zu erreichen. Letzteres lag zudem auch höher im Vergleich zu T_{h} -Zellen (s.Abb 14). Gezeigt ist die Analyse mittels Durchflußytometrie.

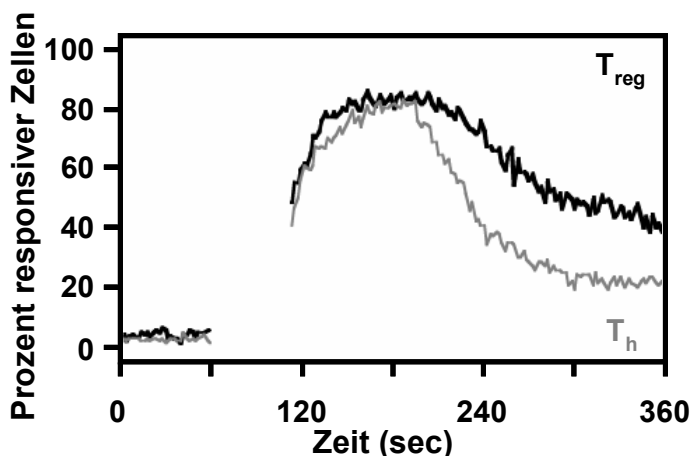


Abb.14: Anti-CD3 stimulierte Ca^{2+} -Mobilisation von T_{reg} -Zellen

Die humanen T_{reg} -Zellen zeigen einen deutlich verlängerten (sustained) Ca^{2+} -Flux nach aCD3-Stimulation als die T_{h} -Zellen. Diese zeigte sich durch die verlängerte Zeitspanne zum Erreichen des *steady state* Levels nach dem initialen Calcium-Peak und durch die entsprechend länger anhaltende Plateau-Phase im Vergleich zu den T_{h} -Zellen.

Bestätigt wurden diese Ergebnisse auf der Einzelzellebene durch konfokale Mikroskopie (Abb. 15). Hierbei wurden INDO-1 markierte T-Zellen in sog. *MicroChambers* mit an den Plattenboden gebundenem anti-CD3 stimuliert.

Hierbei wurde bei T_{reg} -Zellen überwiegend das Profil einer sog. „sustained“ Ca^{2+} -Mobilisation beobachtet. D.h. nach dem initialen kurzen Ca^{2+} -Peak kam es nicht zu einem Rückgang des Ca^{2+} -Flusses auf ein niedriges Erhaltungsniveau wie bei T_h -Zellen (rechtes Bild), sondern blieb auf einem hohen Niveau erhalten (linkes Bild) wie man es normalerweise durch Ionomycin induzieren kann. Dies ist insofern interessant, als dass für einen Ionomycin-induzierten *sustained* Ca^{2+} -Flux berichtet wurde, dass er Anergie-assoziierte Gene induzieren kann ⁴⁶.

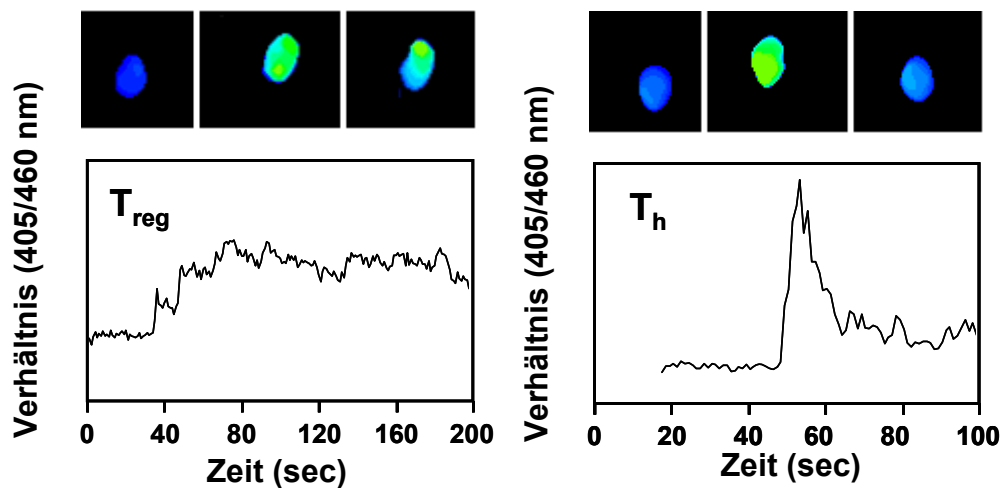


Abb.15: Einzelzellanalyse für Ca^{2+} -Flux durch konfokale Mikroskopie.

INDO-1 markierte T-Zellen wurden auf anti-CD3 beschichteten Objektträgern stimuliert und die anti-CD3-induzierte Ca^{2+} -Mobilisation einzelner Zellen über die Zeit aufgenommen. Repräsentative Darstellung der intrazellulären Ca^{2+} -Veränderung in T_{reg} - (links) und T_h -Zellen (rechts) als das Verhältnis von INDO-1 gebundenem (405 nm) zu ungebundenem (460 nm) Calcium. Jeweils darüber sind korrespondierend Einzelzelldarstellungen zu den jeweiligen Zeitpunkten dargestellt, wobei die Höhe der Ca^{2+} -Mobilisation der Intensität der Farbe Grün entspricht. T_{reg} -Zellen wiesen dabei in vier unabhängigen Untersuchungen jeweils immer Zeichen einer erhöhten (*sustained*) Ca^{2+} -Mobilisation auf.

4.5 T-Zell-Rezeptor (TCR)-Regulation

Das Ausmaß der Herunterregulation der TCR-Expression nach TCR-Stimulation korreliert normalerweise mit der „Stärke“ und Qualität des Stimulus, was bei veränderten Peptid-Liganden sehr gut untersucht ist ³. D.h., ein starker Stimulus, welcher die Effektorfunktionen einer T-Zelle vollständig induziert, führt zu einer Internalisierung der TCR-Moleküle und damit einem Verlust der Oberflächenexpression. Ein partieller/schwacher Stimulus, welcher Effektorfunktionen nicht induziert, führt zu einer geringen Veränderung der TCR-Expression.

Interessanterweise konnten wir beobachten, dass T_{reg} -Zellen auf denselben anti-CD3 Stimulus (1 μ g/ml Platten-gebunden) im Vergleich mit T_h -Zellen eine herabgesetzte TCR-Herunterregulation zu unterschiedlichen Zeitpunkten aufwiesen. In Abb. 16 ist repräsentativ der Zeitpunkt vier Stunden nach Stimulation im Vergleich zur nicht-stimulierten, basalen TCR-Expression dargestellt. Dies würde bedeuten, dass die Erhaltung der Anergie von T_{reg} -Zellen unter anderem dadurch gesichert zu sein scheint, dass ein starkes TCR-Signal jeweils nur als schwaches/partielles Signal wahrgenommen werden kann bzw. dass Treg-Zellen gewissermaßen eine sehr hohe Reizschwelle haben.

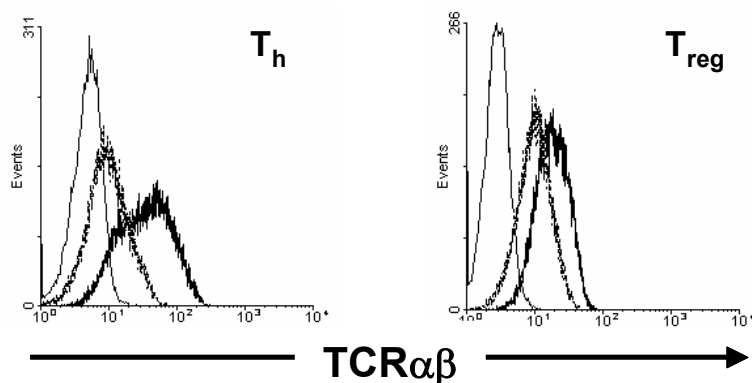


Abb.16: Differentielle TCR $\alpha\beta$ -Regulation bei T_h -und T_{reg} -Zellen.

Die anti-CD3 induzierte TCR-Herunterregulation ist bei T_{reg} -Zellen im Vergleich T_h -Zellen jeweils herabgesetzt. Exemplarisch ist hier der Zeitpunkt 4 Stunden nach anti-CD3 Stimulation gezeigt (basale TCR-Expression, dicke schwarze Linie; anti-CD3 stimulierte TCR Expression, dünne gestrichelte Linie; nicht gefärbte Kontrolle, dünne Linie).

4.6 Foxp3-Transduktion humaner allo-reaktiver T_h-Zellen induziert einen regulatorischen Phänotyp

Die konstitutive, hohe Foxp3-Expression von T_{reg}-Zellen im Vergleich zu T_h-Zellen ist maßgeblich für den stabilen regulatorischen Phänotyp von T_{reg}-Zellen verantwortlich. Um die Foxp3-induzierten molekularen Mechanismen besser charakterisieren und wichtige Foxp3-abhängige Gene identifizieren zu können, wurde ein System der retroviralen Überexpression von Foxp3 in humanen differenzierten, allo-reaktiven T_h-Zellen (T_hFoxp3) verwendet. Als Kontrolle wurde das leere Kontrollplasmid mit GFP in gleicher Weise transduziert (T_hGFP). Weiterhin wurde Ctla4 als wichtiges Gen, welches bei der Aufrechterhaltung der immunologischen Homöostase in Verbindung mit T_{reg}-Zellen eine Rolle spielen kann in gleicher Weise (T_hCtla4) auf seinen möglichen Einfluss auf den Foxp3-abhängigen regulatorischen Phänotyp hin untersucht.

4.6.1 Vergleichende funktionelle Tests von T_h GFP, T_h Ctla4 und T_h Foxp3 Zellen

Abb. 17 zeigt, dass die Überexpression von Foxp3 in T_h -Zellen eine Anergie vergleichbar den T_{reg} -Zellen induziert, d.h., die alleinige anti-CD3 Stimulation führt bei T_h Foxp3-Zellen zu keiner Proliferation.

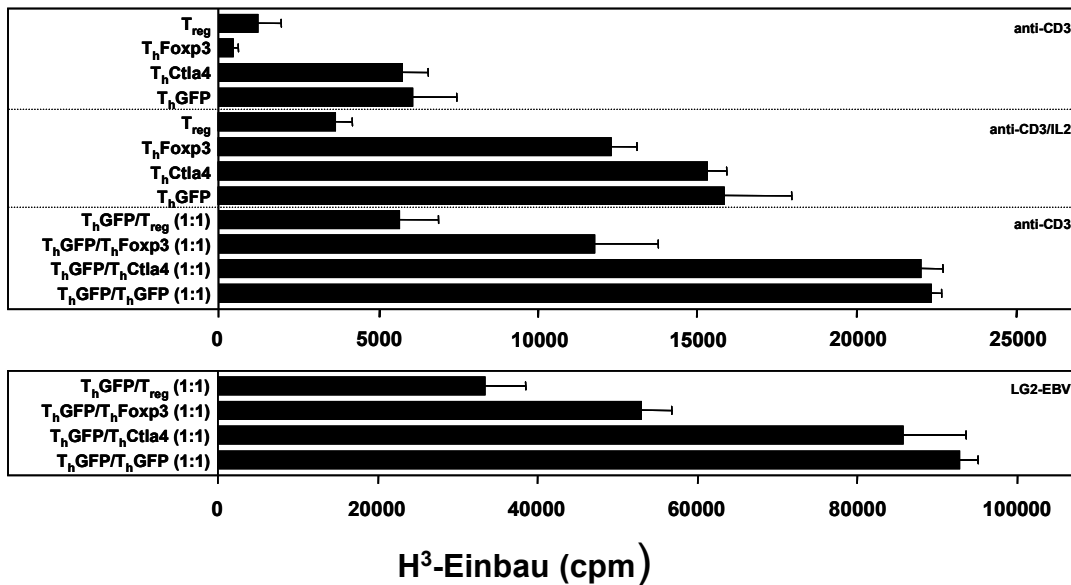


Abb.17: Vergleichende funktionelle Tests nach allogener und aCD3-Stimulation von T_h GFP-, T_h Foxp3- und T_h Ctla4-Zellen

Die Foxp3-Transduktion in humane T_h -Zellen induziert eine anerge proliferative Antwort auf aCD3-Stimulation (oberes Bild), teilweise durch IL-2 reversibel, und induziert eine Suppressoreigenschaft im Testverhältnis 1:1 vergleichsweise mit T_{reg} -Zellen, allerdings weniger stark ausgeprägt. Dieser Effekt wurde bei T_h Ctla4-Zellen nicht beobachtet. Das gleiche gilt für die allogene Stimulation (unteres Bild). Gezeigt ist eins von vier repräsentativen Experimenten.

Was die Suppressor-Eigenschaften von T_h Foxp3-Zellen betrifft, ist ersichtlich, dass sie einen partiell regulatorischen Phänotyp aufweisen, indem sie die sowohl allogene (LG2-EBV) als auch anti-CD3 stimulierte T_h -Zell-Proliferation hemmen. Dieser Effekt war allerdings stets geringer als der von T_{reg} -Zellen. Im Gegensatz dazu führte die retrovirale Überexpression von Ctla4 weder zu einer Einschränkung der Proliferation noch zur Induktion von Suppressoreigenschaften von T_h Ctla4-Zellen.

4.6.2 Ctla4 Expression von T_hGFP, T_hCtla4 und T_hFoxp3 Zellen

Anders als im Falle von Foxp3 führte die Überexpression von Ctla4 nicht zu einem regulatorischen Phänotyp, obwohl die Ctla4-Expression bei den T_hCtla4-Zellen viel stärker ausgeprägt war als in den T_hFoxp3-Zellen (Abb. 18A). Andererseits waren T_hCtla4-Zellen in Bezug auf die Ctla4-Expression nicht von T_{reg}-Zellen zu unterscheiden (Abb. 18B). Diese legt nahe, dass Effekte von Ctla4 überwiegend indirekter Art sind und im Zusammenhang mit einer komplexen Immunreaktion *in vivo* zu sehen sind, wie z.B. die Induktion vonIDO in DCs *in vivo*²².

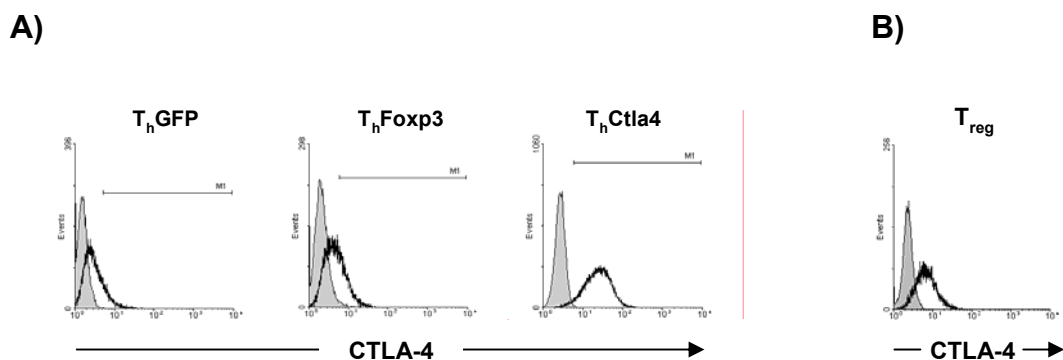


Abb.18: Färbung der gesamten (intrazellulären) CTLA-4 Expression

A) Vergleichende Ctla4-Färbung von T_hGFP-, T_hFoxp3- und T_hCtla4 Zellen.

Die Überexpression von Ctla4 führte trotz stark ausgeprägter Ctla4-Expression nicht zu einem im Vergleich zu T_hFoxp3 regulatorischen Phänotyp. Vergleichsweise scheint die Ctla4-Expression in T_hCtla4-Zellen weniger stark.

B) Im Vergleich ist eine Färbung von Ctla4 bei T_{reg}-Zellen dargestellt. Das Expressionsniveau von Ctla4 bewegt sich ungefähr auf dem von T_hCtla4 (s.18A).

4.6.3 Semiquantitative PCR für Ctla4

Korrespondierend wurde mit Hilfe der semiquantitativen PCR die Menge an Ctla4 mRNA aller drei transduzierten T_h-Zellen überprüft. Die umgeschriebene cDNA-Menge der unterschiedlichen Proben wurde über das *house keeping* Gen RPS9 abgeglichen (s.Abb. 19). Die mit Ctla4 transduzierten T_h-Zellen zeigen im Vergleich zu den T_hGFP- und T_hFoxp3-Zellen eine deutlich höhere Ctla4 mRNA-Expression ohne Veränderung der Foxp3 mRNA-Expression. Deutlich wird auch, dass normale T_h-Zellen Foxp3 mRNA exprimieren, so dass der Unterschied zwischen

regulatorischen und nicht-regulatorischen T-Zellen nur ein relativer ist. Somit ist der alleinige Vergleich der Genexpression von T_{reg} -Zellen mit T_h -Zellen nicht in der Lage, Foxp3-abhängige Gene zu identifizieren, da mehr oder weniger von Foxp3 hiermit nicht zu unterscheiden ist. Diese Frage kann allerdings durch die Analyse differentiell regulierter Gene in T_h -Zellen nach Foxp3-Überexpression beantwortet werden.

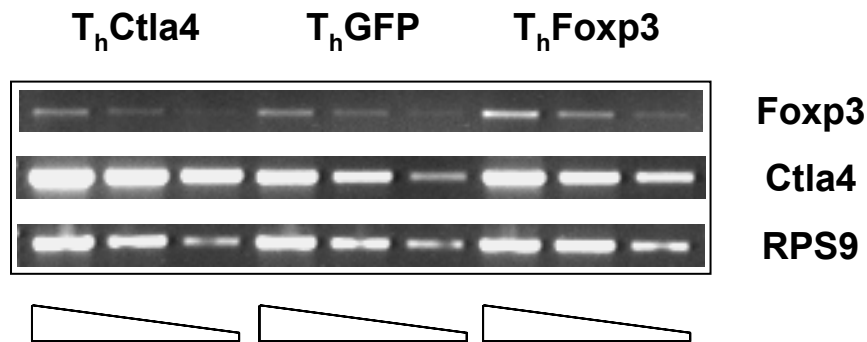


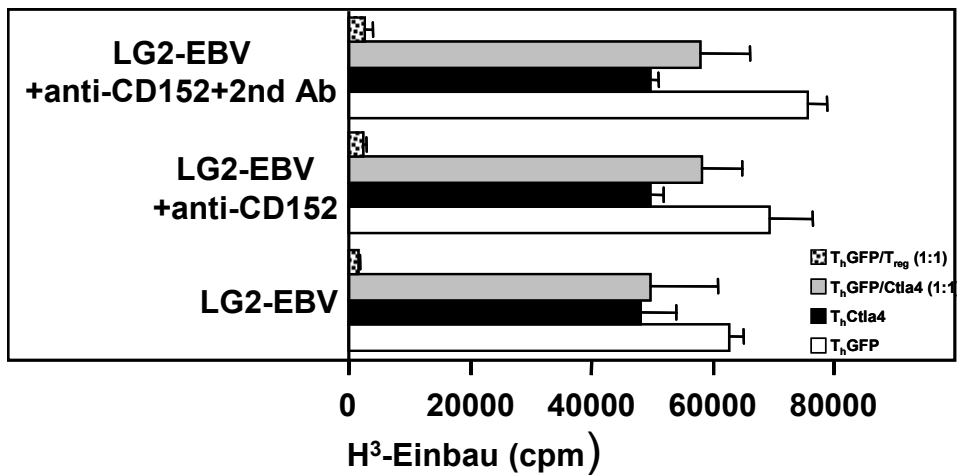
Abb.19: Analyse der Foxp3 und Ctla-4 mRNA Expression in transduzierten T_h -GFP-, T_h Foxp3- und T_h Ctla4-Zellen

Die T_h Ctla4-Zellen weisen eine erwartbare hohe Expression an Ctla4 im Vergleich zu den T_h GFP- und T_h Foxp3-Zellen auf. Dieser Effekt wird jedoch seinerseits nicht von einer verstärkten Foxp3 mRNA-Expression begleitet (Abgleich mit RPS9).

4.6.4 Antikörper gegen Ctla4 haben keinen Einfluss auf T_{reg} - oder T_h Ctla4-Zellfunktion

Eine Blockade von Ctla4 durch anti-Ctla4-4 Antikörper kann die Suppressor-Eigenschaften von *ex vivo* analysierten T_{reg} -Zellen herabsetzen. Diese Beobachtungen konnten wir bei unseren T_{reg} -Zellen nicht bestätigen, wie Abb. 20A zeigt. Antikörper gegen Ctla4 (aCD152) alleine oder mit sekundärem, quervernetzenden Antikörpern (2nd Ab) hatten keinen Einfluss auf die Hemmeigenschaften von T_{reg} -Zellen noch wurde eine solche Eigenschaft in T_h Ctla4-Zellen damit induziert Die Quervernetzung von anti-Ctla4-Antikörpern kann, im Gegensatz zu der Blockierung von Ctla4/Rezeptor Wechselwirkung durch anti-Ctla-4 Antikörper, die Zytokin-Expression der Ctla4 expremierenden Zelle selber verändern⁶⁰. Somit erklärt sich, dass anti-Ctla4-Antikörper die Proliferation von T_h -Zellen verstärken konnte (Abb. 20B; $p > 0,002$), was allerdings durch Ctla4-Überexpression nicht verändert wurde (Abb. 20A).

A)



B)

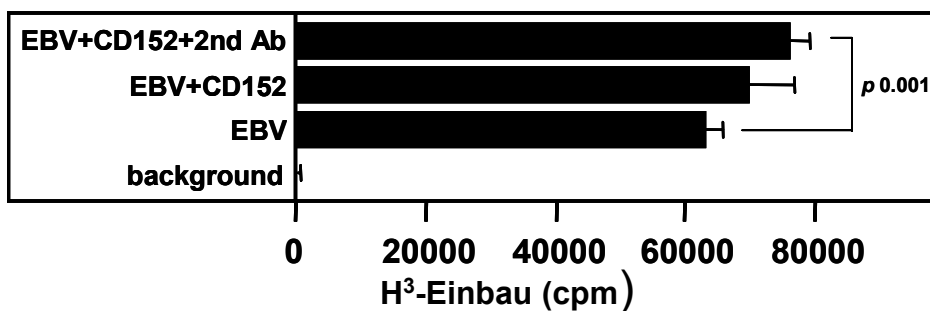


Abb.20 Einfluss von anti-Ctla4 Antikörpern auf T_{reg}- und T_hCtla4-Zellen

A) Vergleichende Proliferations- und Hemmassays von T_{reg} und T_hCtla4 ohne aCD152, mit aCD152 und mit aCD152/2nd Ab

Antikörper gegen Ctla4 mit oder ohne quervernetzendem zweiten Antikörper führten zu keiner Beeinträchtigung der Hemmfunktion von T_{reg}-Zellen. Ferner wurde durch sie eine Hemmung in T_hCtla4-Zellen induziert.

B) Proliferation von T_h-Zellen plus/minus aCD152 oder aCD152/2nd Ab

Die Proliferation von T_h-Zellen wird durch aCD152 im Vergleich zu nur mit LG2-EBV B-Zellen signifikant verstärkt.

4.6.5 TCR-Kinetik für T_hGFP-, T_hCtla4- und T_hFoxp3-Zellen

Im Vorhergehenden wurde die T_{reg}-spezifische Einschränkung der TCR-Herunterregulation nach anti-CD3 Stimulation beschrieben. Um die Frage zu klären, ob dieser Effekt Foxp3-abhängig ist, wurden in gleicher Weise T_hFoxp3-Zellen und Kontroll-Zellen untersucht. Verglichen mit T_hGFP- oder T_hCtla4-Zellen, welche zuvor als nicht-anerg charakterisiert wurden, wurde bei T_hFoxp3-Zellen zu verschiedenen

Zeitpunkten nach anti-CD3 Stimulation eine den T_{reg} -Zellen vergleichbare Störung der TCR-Herunterregulation beobachtet (s.Abb. 21). Ähnliche Beobachtungen wurden auch in murinen 16.2.11 Hybridomzellen, welche Foxp3-transduziert wurden, gemacht. Somit ist die gestörte TCR-Herunterregulation eine direkte Folge einer Foxp3-Überexpression.

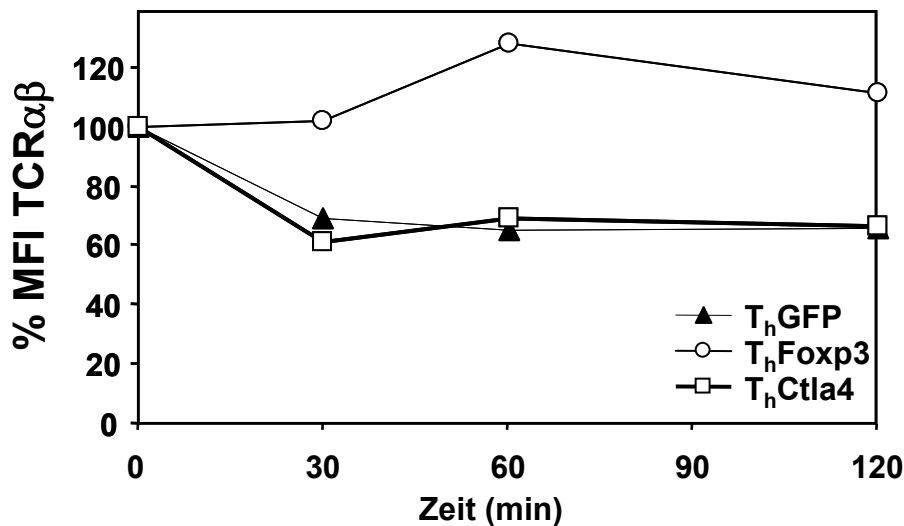


Abb.21: TCR-Kinetik humaner T_h GFP-, T_h Ctla4- und T_h Foxp3-Zellen

Die Beeinträchtigung der TCR-Herunterregulation erscheint als hauptsächlich durch Foxp3 induziert. Die T_h GFP- und T_h Ctla4-Zellen weisen eine vergleichsweise normale TCR-Herunterregulation auf. Das Ausmaß der TCR-Herunterregulation ist ausgedrückt durch die Hauptfluoreszenzintensität (MFI) der TCR-Regulation einzelner nicht-stimulierter Zellen.

4.6.7 Foxp3 Real Time-PCR

Es wurden durch Foxp3-Überexpression in differenzierten T_h -Zellen wesentliche Eigenschaften natürlich regulatorischer T_{reg} -Zellen, bestehend aus Anergie, Suppressor-Funktion, und gestörter TCR-Herunterregulation, induziert. Diese Eigenschaften wurden somit allein durch eine Nachahmung der konstitutiv höheren Foxp3-Expression von T_{reg} -Zellen im Vergleich zu T_h -Zellen zum großen Teil bedingt. Abb. 22 bestätigt die quantitativen Unterschiede der Foxp3-Expression durch die retrovirale Foxp3-Transduktion mittels quantitativer *Realtime*-RT-PCR. Ähnlich dem relativen Unterschied beim Vergleich der Foxp3-Expression von T_{reg} - mit T_h -Zellen exprimieren T_h Foxp3-Zellen unabhängig der Stimulation ein Vielfaches mehr an Foxp3 mRNA verglichen mit Kontroll- T_h GFP Zellen. Der deutlichere Unterschied am

Tag drei nach TCR-Stimulation ist unter anderem auch dadurch bedingt, dass die relative Foxp3-Expression in T_hGFP-Zellen abnimmt.

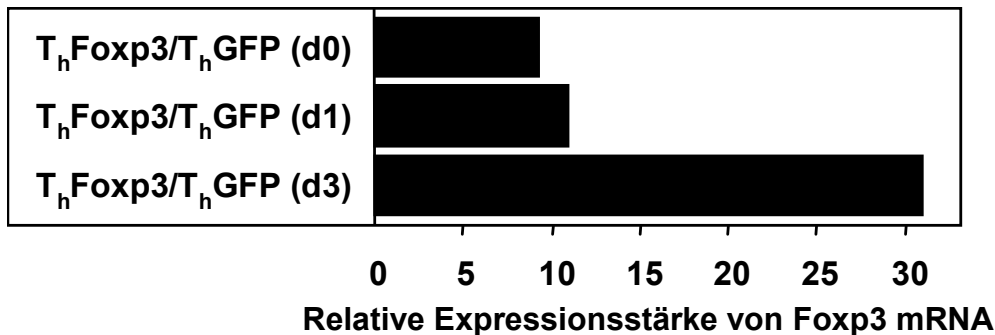


Abb.22: *Real Time*- PCR für Foxp3 an d₀, d_{1a} CD3/28, d₃ aCD3/28

Auch für die T_hFoxp3-Zellen gilt, dass sie wie T_{reg}-Zellen stets im relativen Verhältnis zu den GFP-Kontrollzellen eine viel stärkere Foxp3-Expression unabhängig von der Stimulation aufweisen.

4.7 Murine Hybridomzellen (16.2.11-Zellen) als Testsystem für Foxp3-Effekte

4.7.1 NFAT-Aktivierung und CD25-Expression

Zur Analyse des Einflusses von Foxp3 auf die NFAT-Aktivierung dienten die murinen Hybridomzellen. Untersucht wurden dabei sowohl murines und humanes Foxp3 im Vergleich mit einer GFP-Kontrolle. Die Konstrukte wurden stabil als Konstrukt in pMSCV-Puro in die Hybridomzellen transfiziert und mit Puromycin selektioniert. Zur Untersuchung des Einflusses von Foxp3 auf die NFAT-Aktivierung wurden sowohl der pGL3-NFAT-Vektor und der Renilla-Luciferase-Vektor transient in die Hybridomzellen transfiziert. Aus Abb. 23A ist zu entnehmen, dass sowohl im Falle des humanen als auch des murinen Foxp3 wie erwartet eine Unterdrückung einer NFAT-abhängigen Genregulation erfolgte. Diese Beobachtung spricht für die beschriebene Rolle von Foxp3 als transkriptioneller Repressor. Andererseits wurde die CD25-Expression der Hybridomzellen durch Foxp3 induziert (Abb. 23B). In diesem Falle kann man nur spekulieren, dass der transkriptionelle Repressor Foxp3 indirekt wirkt, z.B. durch Hemmung der Transkription und damit Expression von Faktoren, welche die CD25 Expression unterdrücken.

A)



B)

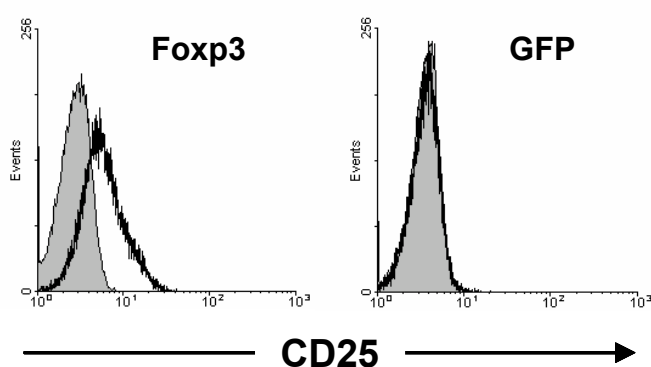


Abb.23: A) Einfluss von murinem und humanem Foxp3 auf die NFAT-abhängige Genexpression
 Humanes (hum) und murines (mm) Foxp3 führen in den Hybridomzellen zur Unterdrückung der NFAT-abhängigen Genregulation, was die Rolle von Foxp3 als transkriptioneller Repressor verdeutlicht.

B) Vergleichender Einfluss von Foxp3 auf die CD25-Expression

Im Gegensatz zur GFP-Kontrolle zeigen die 16.2.11-Foxp3 Hybridomzellen eine verstärkte CD25-Expression (dünne hellblaue Linie=nicht gefärbte Kontrolle; schwarze dicke Linie=aCD3 stimulierte CD25-Expression).

4.8 Einfluss von Foxp3 auf die CD25- und CD28-Expression in T_hFoxp3-Zellen

Obwohl in Hybridomzellen ein positiver Effekt von Foxp3 auf die CD25-Expression deutlich wurde, war in den humanen allo-reaktiven T_hFoxp3-Zellen der Effekt von Foxp3 auf die CD25-Expression nicht so deutlich. Abb. 24 zeigt, dass Foxp3-Überexpression nicht bei allen Zellen CD25 hochreguliert und sogar im Vergleich mit T_hGFP-Zellen zwei unterschiedliche Populationen (CD25^{high} und CD25^{low}) abzugrenzen sind. Untersuchungen mit murinen naiven CD4⁺CD25⁻-T-Zellen, welche mit Foxp3 transduziert wurden, stehen im Einklang mit dieser Beobachtung.

Ähnliches ist oben für die Ctl4-Expression gezeigt worden; auch hier war die alleinige Foxp3-Überexpression nicht in der Lage eine ähnliche hohe Ctl4-Expression vergleichbar den T_{reg}-Zellen zu induzieren. Nur die Foxp3-induzierte CD28-Expression war mit der von Treg-Zellen vergleichbar.

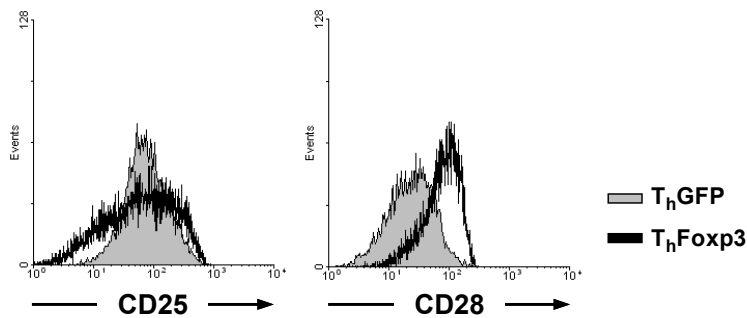


Abb.24: Vergleichende CD25- und CD28-Färbung von T_hFoxp3- und T_h-Zellen

Foxp3 führt nicht bei allen T_hFoxp3-Zellen zur Heraufregulation von CD25, sondern zu im Vergleich mit T_hGFP-Zellen zwei unterschiedlichen Populationen (CD25^{high} und CD25^{low}). CD28 ist jedoch deutlich in T_hFoxp3- im Vergleich zu T_hGFP-Zellen reguliert.

4.8.1 Funktionelle Unterschiede von T_hFoxp3-Zellen mit unterschiedlicher CD25-Expression

Wie bereits gezeigt, erreichten nie alle T_hFoxp3-Zellen das hohe CD25-Expressionsniveau wie unsere T_{reg}-Zellen. Aus diesem Grund erschien es interessant, T_hFoxp3-Zellen mit verschieden starker CD25-Expression getrennt zu untersuchen. Hierfür wurden T_hFoxp3-Zellen mit PE-konjugiertem CD25-Antikörper gefärbt und in die CD25^{high} und CD25^{low}-Subpopulationen sortiert. Abb. 25 zeigt die Reanalyse der T_hFoxp3-CD25^{high}- und T_hFoxp3-CD25^{low}-Zellen nach Zellsortierung. Diese beiden Zellpopulationen wurden anschließend wieder in Kultur genommen und wiederholt getestet.

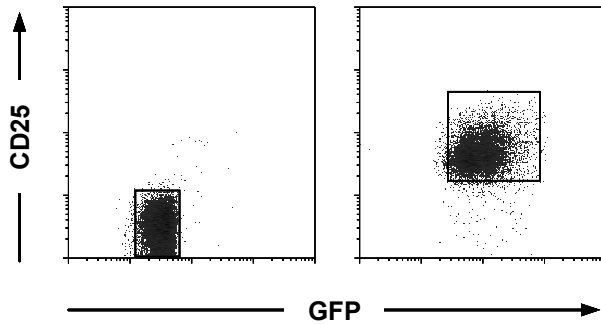


Abb.25: Reanalyse von T_h Foxp3 anhand ihrer Expressionsdichte von CD25
Das rechte Bild zeigt die $CD25^{low}$, das rechte Bild die $CD25^{high}$ Population

Wie in Abb. 26 dargestellt, zeigen T_h Foxp3- $CD25^{high}$ - und T_h Foxp3- $CD25^{low}$ -Zellen eine deutliche proliferative Einschränkung, welche durch IL-2-Zugabe reversibel ist (Anergie). Eine entsprechende Hemmfunktion ist für beide T_h Foxp3-Subpopulationen nachzuweisen. Die Unterschiede erscheinen gering aber signifikant ($p < 0,002$) und entsprechen der Beobachtung im murinen System, wo ebenfalls gezeigt wurde, dass eine Foxp3-abhängige Hemmfunktion nicht notwendigerweise an die CD25-Expression gekoppelt ist²⁵.

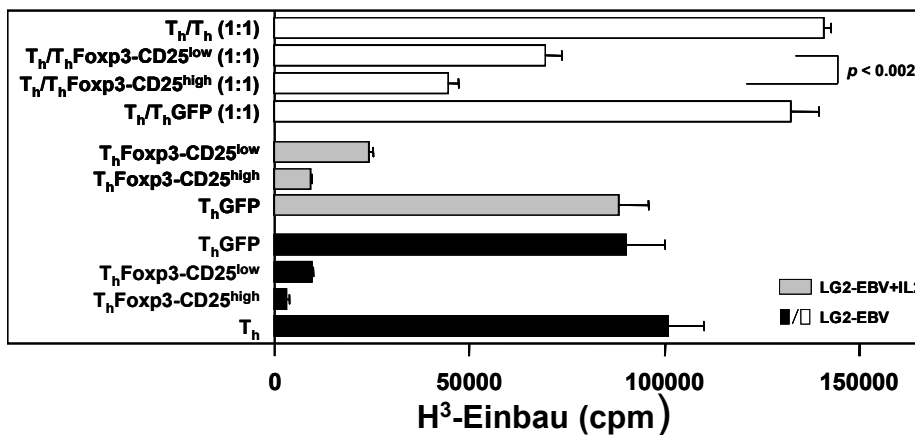


Abb.26: Proliferations- und Hemmassay für T_h Foxp3- $CD25^{high}$ - and T_h Foxp3- $CD25^{low}$ -Zellen.
Die Signifikanz des Unterschiedes der Hemmfunktion von $CD25^{high}$ - im Vergleich mit $CD25^{low}$ T_h Foxp3 Zellen wurde durch zweiseitigen *Students T-test* ermittelt. Die T_h Foxp3- $CD25^{low}$ und T_h Foxp3- $CD25^{high}$ -Zellen zeigen eine deutliche proliferative Einschränkung. Die Unterschiede erscheinen als gering signifikant ($p < 0,002$).

Die T_h Foxp3- $CD25^{high}$ -Zellen erwiesen sich allerdings über die Zeit nicht als phänotypisch stabil, da nach etwa einem Monat die CD25-Expression wieder teilweise herunterreguliert worden war (Abb. 27). Dies bestätigt die Hypothese, dass

die CD25-Regulation des vormaligen T_H -Programmes nicht vollständig durch Foxp3-Überexpression überwunden werden kann.

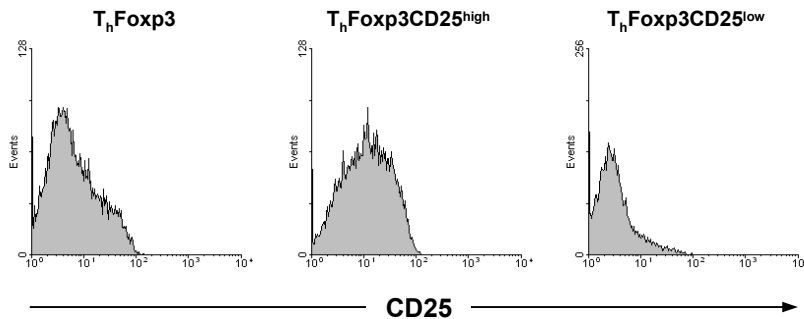


Abb.27: Instabilität des T_H Foxp3CD25^{high} Phänotyps.

Nach einem Monat erwiesen sich die T_H Foxp3-CD25^{high}-Zellen als phänotypisch instabil. Es fanden sich wiederum Zellen, die den Phänotyp T_H Foxp3-CD25^{low} aufwiesen. Diese Beobachtung spricht für eine inherente T_H -Zell-Kontrollfunktion der CD25-Expression, welche den Foxp3-Effekt wiederum dominiert. Auf der linken Seite sind die Original- T_H -Foxp3-Zellen, in der Mitte die CD25^{high}- und rechts die CD25^{low}-Fraktion dargestellt. Gezeigt ist die Situation einen Monat nach Resortieren am folgenden Tag sieben nach Restimulation.

4.9 Identifikation von UBD als Foxp3-abhängiges Gen

Da eine den natürlich regulatorischen T_{reg} -Zellen vergleichbare konstitutive Foxp3-Expression in T_H Foxp3-Zellen wesentliche Merkmale des regulatorischen Phänotyps induzierte, ergab sich hiermit die Grundlage zur Identifizierung von Foxp3-abhängigen Ziel-Genen. Hierfür wurden GeneChip Analysen (U133A von Affymetrix) von zwei Paaren von T_{reg} -Zellen mit ihren korrespondierend allo-reaktiven T_H -Zellen in Bezug zu den Unterschieden zwischen zwei unabhängigen Vergleichen von T_H Foxp3- und T_H GFP-Zellen zugrunde gelegt. Es wurden Gene berücksichtigt, welche in beiden Vergleichen von regulatorischen T-Zellen unabhängig die selben Eigenschaften aufwiesen: 1) Expressionsunterschiede (nach MAS 5.0 Software Algorithmen) sollten einheitlich in allen Experimenten entweder erhöht (*change*: I oder MI; I = increased, MI = marginal increased) oder erniedrigt (*change*: D oder MD; D = decreased, MD = marginal decreased) sein, und/oder 2) die Größe der Signalunterschiede sollte in allen Vergleichen einheitlich ≥ 3 -fach hoch oder runter-reguliert sein. Hieraus ergab sich ein Set an 39 signifikant regulierten Genen (Tab. 4). Dieser Ansatz wird dadurch gestützt, dass bekannte T_{reg} -Marker-Gene wie CD25, TNFRSF1B, CCR7 und CTLA-4 in der Analyse mit erfasst werden^{13,67}. Da Ubiquitin

Ligasen eine besondere Bedeutung bei der Regulation der T-Zell Anergie zukommt⁵⁴, erschien das Ubiquitin-ähnliche Gen Diubiquitin (UBD) als ein besonders interessanter Kandidat mit möglicher Funktion in der Foxp3-abhängigen Genregulation. Anzumerken bleibt, dass Foxp3 durch die von uns gewählten Kriterien nicht erfasst wurde, da es die genannten Kriterien nicht bei allen Vergleichen erfüllte.

Tabelle 4

ProbeSet	GenBank	Name	T _h Foxp3/T _h GFP		T _{reg} /T _h		CD25 ^{high} /CD25 ⁻		T _h Foxp3/T _h GFP		T _{reg} /T _h		CD25 ^{high} /CD25 ⁻	
			FC (I)	FC (II)	FC (I)	FC (II)	FC (I)	FC (II)	change (I)	change (II)	change (I)	change (II)	change (I)	change (II)
221334_s_at	NM_014009	FOXP3	4.5	2.0	1.6	4.8	1.8	1.7	I	I	NC	I	NC	NC
206942_s_at	NM_002674	PMCH	9.9	2.4	2.6	5.3	5.0	10.2	I	I	I	I	I	I
210299_s_at	AF063002	FHL1	7.4	14.8	3.3	11.0	-1.2	-2.6	NC	I	NC	I	NC	D
205890_s_at	NM_006398	UBD	6.5	12.7	3.5	4.4	1.6	-1.2	NC	I	NC	I	NC	NC
216144_at	AL137378	---	5.0	4.4	5.3	3.6	2.2	1.3	NC	I	NC	I	NC	NC
208029_s_at	NM_018407	LAPTM4B	4.2	13.2	10.5	30.9	-1.2	-1.3	MI	I	I	I	I	NC
210930_s_at	AF177761	ERBB2	3.8	4.7	4.4	7.6	1.8	-1.4	NC	I	NC	I	NC	NC
219456_s_at	AW027923	RIN3	3.7	5.1	9.4	7.3	1.8	2.1	NC	I	I	I	NC	I
206337_at	NM_001838	CCR7	3.7	2.2	1.9	10.5	-2.1	-2.2	I	I	I	I	I	D
208949_s_at	BC001120	LGALS3	2.7	4.1	2.8	7.4	7.2	7.2	I	I	I	I	I	I
211559_s_at	L49506	CCNG2	1.9	1.7	1.9	2.0	2.7	3.6	I	I	I	I	I	I
211269_s_at	K03122	IL2RA	1.8	3.2	1.7	11.6	12.1	13.6	I	I	I	I	I	I
203508_at	NM_001066	TNFRSF1B	1.6	1.9	2.4	3.2	3.8	3.4	I	I	I	I	I	I
213620_s_at	AA126728	ICAM2	1.4	1.3	1.4	3.0	-1.0	-1.2	I	I	I	I	I	NC
221331_x_at	NM_005214	CTLA4	1.3	1.5	2.2	2.2	6.6	8.0	I	I	I	I	I	I
210538_s_at	U37546	BIRC3	1.3	1.5	1.8	2.5	2.0	3.2	I	I	I	I	I	I
205159_at	AV756141	CSF2RB	1.3	3.9	1.7	3.5	2.5	3.5	I	I	I	I	I	I
38149_at	D29642	---	-1.2	-1.2	-1.6	-1.6	1.6	1.4	I	I	I	I	I	I
219869_s_at	NM_022154	SLC39A8	-1.3	-1.3	-1.5	-4.9	-1.1	-1.3	I	I	I	I	I	D
1405_i_at	M21121	CCL5	-1.3	-1.6	-16.2	-119.5	-12.4	-9.7	I	I	I	I	I	D
219033_at	NM_024615	PARP8	-1.4	-1.4	-1.7	-1.9	1.0	1.1	I	I	I	I	I	D
207735_at	NM_017831	RNF125	-1.4	-2.0	-2.0	-3.8	1.2	-1.2	I	I	I	I	I	NC
210038_at	AL137145	PRKCC	-1.4	-1.4	-1.7	-2.6	1.4	1.2	I	I	I	I	I	NC
210046_s_at	U52144	IDH2	-1.4	-1.5	-1.6	-3.3	1.2	-1.1	I	I	I	I	I	NC
211795_s_at	AF198052	FYB	-1.4	-1.8	-2.8	-2.5	-1.1	1.4	I	I	I	I	I	I
209732_at	BC005254	CLEC2B	-1.4	-1.2	-1.8	-8.4	-1.1	1.4	I	I	I	I	I	I
218805_at	NM_018384	GIMAP5	-1.5	-1.7	-1.9	-3.3	-1.8	-2.0	I	I	I	I	I	I
210140_at	AF031824	CSIT7	-1.5	-1.5	-2.4	-10.7	2.4	-1.2	I	I	I	I	I	I
213618_at	AB011152	CENTD1	-1.5	-1.5	-2.1	-2.5	1.0	1.6	I	I	I	I	I	I
201061_s_at	M81635	STOM	-1.5	-1.3	-29.5	-3.5	-2.3	-3.1	I	I	I	I	I	I
219243_at	NM_018326	GIMAP4	-1.7	-2.1	-2.0	-2.4	-1.2	-1.2	I	I	I	I	I	NC
205495_s_at	NM_006433	GNL1	-1.8	-2.6	-17.5	-13.5	-9.2	-32.8	I	I	I	I	I	I
219520_s_at	NM_018458	KIAA1280	-1.8	-2.0	-1.2	-1.0	1.0	1.0	I	I	I	I	I	I
204009_s_at	W80678	KRAS	-1.8	-1.5	-2.0	-2.8	-1.4	-1.2	I	I	I	I	I	I
213958_at	AW134823	CD6	-2.2	-1.7	-1.7	-1.5	-1.2	-1.8	I	I	I	I	I	I
216920_s_at	M27331	TARP	-2.8	-1.8	-3.9	-1.6	-2.2	-3.5	I	I	I	I	I	I
213915_at	NM_005601	NRG7	-3.0	-2.0	-24.0	-81.0	-2.3	-8.3	I	I	I	I	I	I
204157_s_at	NM_025164	KIAA0999	-3.0	-6.7	-6.1	-6.6	1.2	-1.3	I	I	I	I	I	NC
205798_at	NM_002185	IL7R	-3.9	-8.5	-6.0	-1.6	-1.8	-1.6	I	I	I	I	I	I
206666_at	NM_002104	GZMK	-5.7	-1.8	-21.8	-510.9	-3.4	-5.2	I	I	I	I	I	I

Differentiell ähnlich regulierte Gene in T_hFoxp3 und T_{reg}-Zellen im Vergleich mit ihrer jeweiligen T_hGFP bzw. T_h-Zell Kontrolle durch GeneChip Analyse. Der relative Expressionsunterschied (FC = fold change) bzw. die Beurteilung der Expressionsunterschiede (relativ erhöhte Expression = I oder MI; relativ erniedrigt = D oder MD; kein Unterschied = NC) nach MAS 5.0 Software ist angegeben. ProbeSet = U133A Zuordnung, Name = Gensymbol, GenBank = Gendatenbank-Eintrag.

Zum Vergleich sind in Tab. 4 die Daten von *ex vivo* analysierten CD4⁺CD25⁻-T-Zellen und CD4⁺CD25^{high}-T_{reg}-Zellen dargestellt (zur Verfügung gestellt von Dr. M. Probst-Kepper), um die Veränderungen der Genexpression nach Stimulation *in vitro* aufzuzeigen. Für UBD gilt hierbei, dass eine differentielle Expression erst nach der *in vitro*-Aktivierung der T_{reg}-Zellen nachzuweisen ist, was nahe legt, dass seine potentielle Funktion in der Erhaltung Foxp3-abhängigen regulatorischen Phänotyps liegen könnte. Abb. 28 zeigt die Bestätigung der erhöhten und Foxp3-abhängigen UBD mRNA-Expression. Es wird deutlich, dass UBD durch Foxp3-Überexpression in T_hFoxp3-Zellen induziert wird, allerdings nicht dieselbe Expressionsstärke wie in den T_{reg}-Zellen erreicht. Im Falle der T_hCtla4-Zellen konnten wir (s. Abb. 28) eine leichte, aber in unabhängigen Kontrollen nicht stabil erhöhte UBD-Expression nachweisen. Im Gegensatz dazu wurde die UBD-Expression in drei unterschiedlichen T_hFoxp3-Zellen stabil erhöht. Im Unterschied zu Foxp3 unterliegt die UBD-Expression einer TCR-abhängigen Regulation. Nach Aktivierung mit aCD3/-CD28/IL-2 lässt sich in allen analysierten Zellen einschließlich den T_{reg}-Zellen eine UBD-Herunterregulation nachweisen.

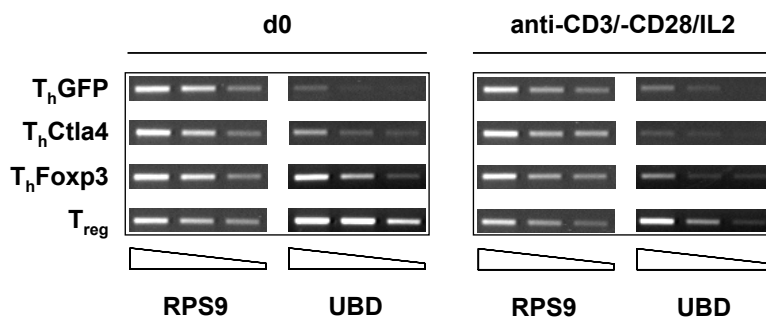


Abb. 28: Semiquantitative PCR für UBD in T_hGFP-, T_hCTLA-4-, T_hFoxp3- und T_{reg}-Zellen.

In drei unabhängigen T_hFoxp3 Zelllinien konnte die Foxp3-abhängige UBD-Induktion bestätigt werden. Die UBD-Expression unterliegt einer TCR-abhängigen negativen Kontrolle, da nach vollständiger Stimulation durch anti-CD3/-CD28/IL-2 die Expression von UBD deutlich in allen analysierten T-Zellen herunterreguliert wird (dargestellt ist hier Tag 3 nach Stimulation, Abgleich mit RPS9).

4.9.1 UBD beeinflusst die CD25-Expression in T_h-Zellen

Wie die Untersuchung der phänotypischen Veränderungen der bekannten Foxp3-abhängigen Marker CD25, CD28 oder CTLA-4 zeigte, ließ sich eine UBD-abhängige Induktion der CD25-Expression nachweisen (Abb.29). Dabei war der Einfluss von UBD auf die CD25-Expression deutlicher als in den T_hFoxp3-Zellen.

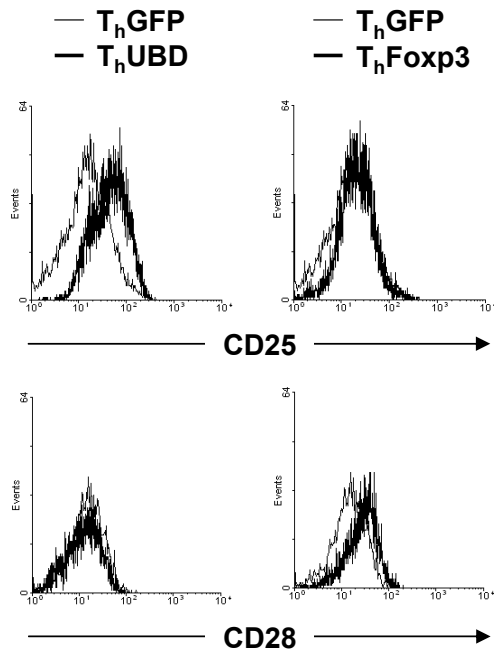


Abb.29: Vergleichende Analyse von CD25 und CD28 von T_hFoxp3- und T_hUBD-Zellen im Vergleich mit Kontroll T_hGFP-Zellen.

Die Überexpression von UBD in den allo-reaktiven T_h-Zellen führt zu einer stärkeren Induktion von CD25 als bei T_hFoxp3. Im Gegensatz zu T_hFoxp3 wird die CD28-Expression in den T_hUBD-Zellen nicht verändert, welche durch Foxp3 jedoch immer erhöht wird.

4.9.2 Funktionelle Veränderungen von T_hUBD-Zellen

Da UBD zumindest an der Regulation eines wesentlichen Markers von CD4⁺CD25⁺-T_{reg}-Zellen, nämlich der CD25-Expression, beteiligt zu sein scheint, wurden im Weiteren mögliche funktionelle Veränderungen untersucht. In den Abb. 30 und 31 sind jeweils die korrespondierenden Proliferationsdaten in Abhängigkeit von der Art der jeweiligen Stimulation durch anti-CD3 oder allogene Stimulation und die induzierte Zytokinfreisetzung von IFN- γ und IL-10 dargestellt. Überraschend war hierbei, dass T_hUBD-Zellen eine von der wiederholten TCR-Stimulation abhängige Veränderung durchmachten. Die ersten Analysen von T_hUBD-Zellen nach

Zellsortierung zeigten nur eine erhöhte Freisetzung von IFN- γ (Abb.30 und 31). Im Verlaufe der weiteren Kultivierung der Zellen entwickelte sich jedoch eine Anergie wie bei T_hFoxp3- oder T_{reg}-Zellen (Abb.32). Zu diesem Zeitpunkt ließ sich dann eine erhöhte IL-10-Sekretion nachweisen. Für die T_hFoxp3-Zellen gilt, dass sie im Vergleich zu den anderen getesteten Zellen jeweils am meisten IL-10 synthetisieren. Für unsere *in vitro* expandierten T_{reg}-Zellen gilt, dass sie im Vergleich mit T_h-Zellen kaum IFN- γ und IL-10 auf Allo- oder anti-CD3-Stimulation synthetisieren (Abb.30 und 31).

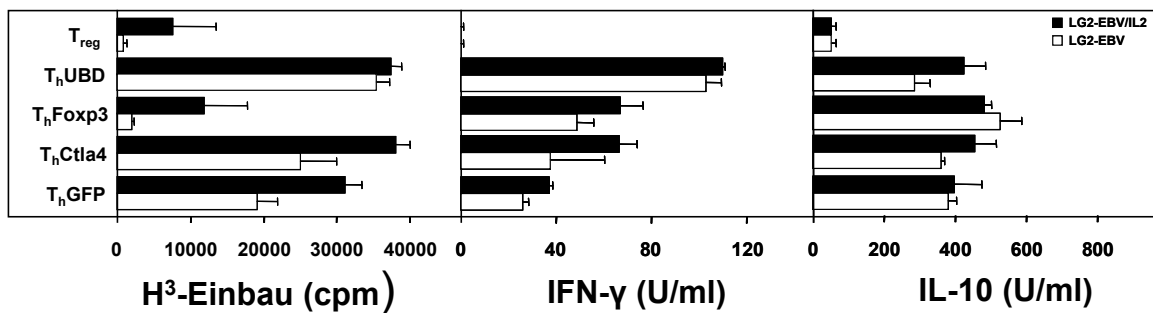


Abb.30: Analyse der Proliferation und Zytokin-Freisetzung nach allogener Stimulation von T_hUBD-Zellen im Vergleich mit und T_hFoxp3-, T_hCtla4-, T_hGFP- und T_{reg}-Zellen.

T_hUBD-Zellen weisen direkt nach der Sortierung über GFP keine Einschränkung ihrer Proliferation auf (links), produzieren aber mehr IFN- γ (Mitte). Die IL-10 Produktion (rechts) ist ebenfalls nicht erhöht. T_hFoxp3- und T_{reg}-Zellen dagegen sind anerg. Diese Beobachtung wurde in drei unabhängigen T_hUBD Zelllinien bestätigt.

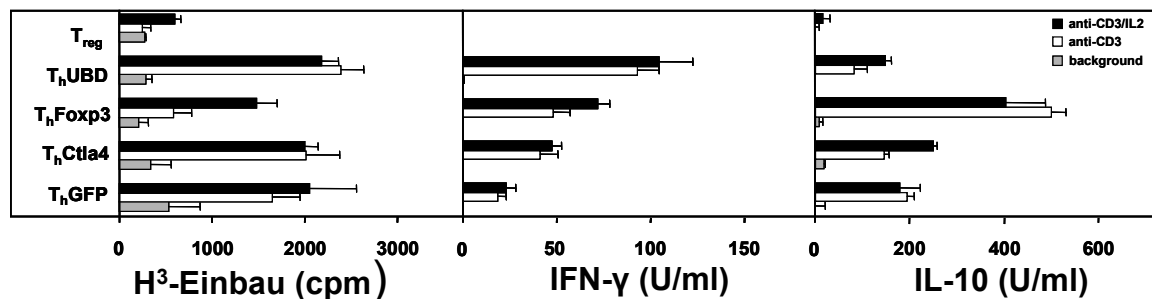


Abb.31: Analyse der Proliferation und Zytokin-Freisetzung nach anti-CD3-Stimulation von T_hUBD-Zellen im Vergleich mit und T_hFoxp3-, T_hCtla4-, T_hGFP- und T_{reg}-Zellen.

Wie in Abb. 30 bei allogener Stimulation dargestellt, ist auch nach anti-CD3 Stimulation keine Proliferations-Einschränkung (links) und eine erhöhte IFN- γ Sekretion (Mitte) von T_hUBD-Zellen in den ersten Analysen nach Zellsortierung nachweisbar. Die IL-10 Sekretion (rechts) ist ebenfalls nicht erhöht. Diese Beobachtung wurde in drei unabhängigen T_hUBD Zelllinien bestätigt.

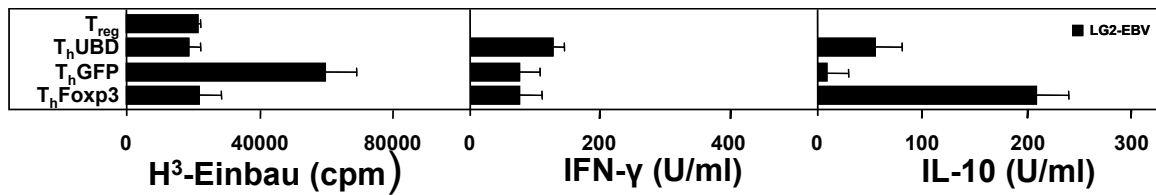


Abb. 32: UBD-Überexpression führt in Abhängigkeit wiederholter TCR-Stimulation zu einer Einschränkung der T-Zell-Proliferation.

Nach mindestens 3-maliger Re-Stimulation entwickelten UBD-transduzierte T_h-Zellen einen anergen Phänotyp vergleichbar den T_hFoxp3- oder T_{reg}-Zellen. Gezeigt ist hier die Proliferation nach Allo-Stimulation mit LG2-EBV B-Zellen (links). Dies wurde von einer erhöhten IL-10 Produktion begleitet (rechts), die IFN- γ Sekretion war noch leicht erhöht. Die durchschnittliche background-Proliferation lag unter 2010 cpm. Repräsentative Darstellung von drei unabhängigen T_hUBD-Zelllinien.

4.9.3 Semiquantitative PCRs zur weiteren Charakterisierung von T_hUBD-Zellen

Hierbei wurden erneut T_hGFP-, T_hUBD- und T_hFoxp3-Zellen hinsichtlich der Transkriptionsstärke verschiedener Gene untersucht. Auch hier diente das *housekeeping* Gen RPS9 zum Abgleich der cDNA-Mengen. In Abb. 33 erkennt man zunächst, dass der anerge Phänotyp von T_hUBD-Zellen nicht mit einer Induktion von Foxp3 einhergeht. Dies bedeutet, dass UBD unabhängig von Foxp3 in die Regulation der Anergie eingreift. Weiterhin führt die Überexpression von UBD in T_h-Zellen, ähnlich den T_hFoxp3-Zellen, zu einer verminderten Expression von IL-4- und IL-5-mRNA. Diese Effekte korrelierten allerdings nicht mit einer veränderten GATA-3-Expression, welches die T_h2-Differenzierung und somit die Zytokine IL-4 und IL-5 steuert⁶⁴. Obwohl die in T_hUBD-Zellen zu beobachtende erhöhte IFN- γ -Expression (als T_h1 Zytokin) die Unterdrückung der T_h2-Zytokine IL-4 und IL-5 erklären könnte, scheidet diese Erklärung zumindest für T_hFoxp3-Zellen aus, da hier keine erhöhte IFN- γ -Expression nachzuweisen war.

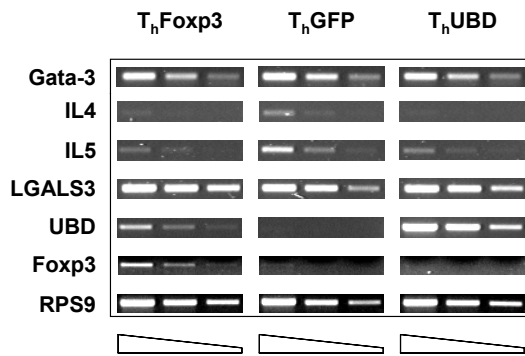
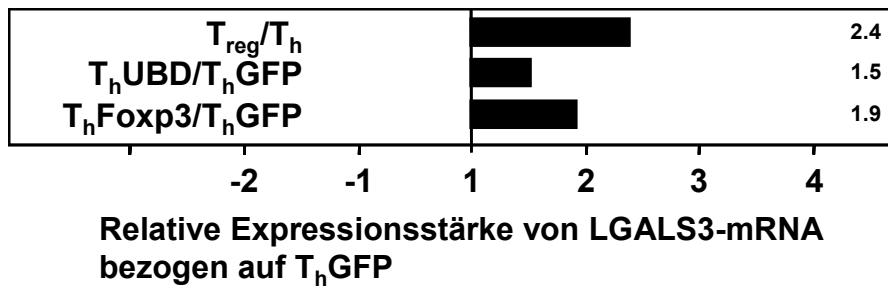


Abb.33: Vergleichende Semiquantitative PCR von T_hFoxp3-, T_hGFP- und T_hUBD-Zellen
 Der anerge Phänotyp von T_hUBD-Zellen geht nicht mit einer Induktion von Foxp3 einher. Die Überexpression von UBD in T_h-Zellen führt ähnlich zu T_hFoxp3 zu einer verminderten Expression von IL-4- und IL-5-mRNA (Abgleich mit RPS9).

4.9.4 Real Time PCRs für LGALS3

Da für LGALS3 eine Suppression der IL-4- und IL-5-Transkription beschrieben ist¹⁶, untersuchten wir die LGALS3-Expression zusätzlich durch quantitative *RealTime*-RT-PCR. Hierbei wurden verschiedene T_hUBD-, T_hFoxp3- und die T_{reg}-Zellen analysiert (Abb.34). Obwohl in den analysierten T_hUBD- und T_hFoxp3-Zellen die IL-4- und IL-5-Transkription jeweils herunterreguliert war, korrelierte dies nicht mit einer signifikant erhöhten LGALS3-Expression. Somit scheint UBD an der Regulation der Zytokingene IL-4 und IL-5 direkt beteiligt zu sein.

A)



B)

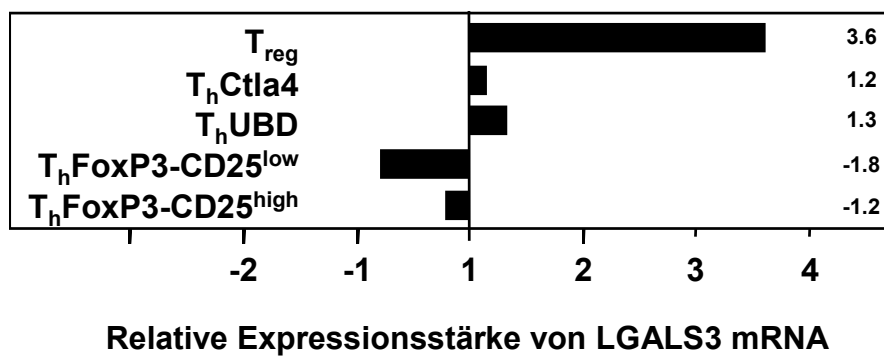


Abb.34: *Real Time* PCR für LGALS3 in unterschiedlichen T_hUBD - und T_hFoxp3 -Zellen.

A) Die T_hUBD - und T_hFoxp3 -Zellen zeigten keine signifikante erhöhte Expression von LGALS3. Dargestellt ist die relative LGALS3 mRNA-Expression von T_hUBD -Zellen, T_hFoxp3 - und T_{reg} -Zellen bezogen auf die entsprechende Expression in T_hGFP -Zellen.

B) LGALS3 mRNA-Expression für T_{reg} -, T_hCtla4 -, T_hUBD - und $T_hFoxp3-CD25^{high}$ - bzw. $T_hFoxp3-CD25^{low}$ -Zellen. Außer den T_{reg} -Zellen zeigten die anderen Zellen ebenfalls keine signifikante Induktion der LGALS3 mRNA-Expression

4.9.5 Western Blot für Foxp3

Der anerge Phänotyp von T_hUBD Zellen ist zumindest in der Analyse der mRNA Expression unabhängig von Foxp3 (s.4.9.3). Um einen möglichen Einfluss von UBD auf die Proteinexpression von Foxp3 auszuschließen, wurde ein *Western Blot* durchgeführt (s.Abb.35). Hierbei konnte eine Induktion der Foxp3-Protein-Expression durch UBD aber ausgeschlossen werden.

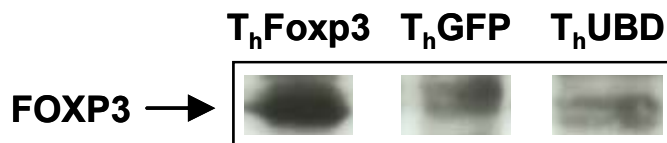


Abb.35: *Western Blot* für Foxp3

Der Pfeil markiert die Größe von Foxp3 (ca. 50 kd). Die Doppelbande erklärt sich durch eine Splicevariante von Foxp3⁴⁷. Benutzt wurde ein Ziege-anti-human polyklonaler Antikörper.

4.9.6 Vergleichende Ca²⁺-Flux Messungen für T_hGFP-, T_hFoxp3- und T_hUBD-Zellen

Es sollte für T_hUBD-Zellen, welche wie T_hFoxp3-Zellen eine Einschränkung der Proliferation aufwiesen, ein möglicher Einfluss von UBD auf die Calcium-Mobilisation wie in 4.4 beschrieben analysiert werden. Wie in Abb.36 ersichtlich, bewirkt die Überexpression von UBD einen zu Foxp3 gegensätzlichen Effekt. Während T_hFoxp3-Zellen einen über die Zeit länger anhaltenden Calcium-Flux aufweisen, kommt es bei T_hUBD-Zellen zu einer Einschränkung der Calcium-Mobilisation.

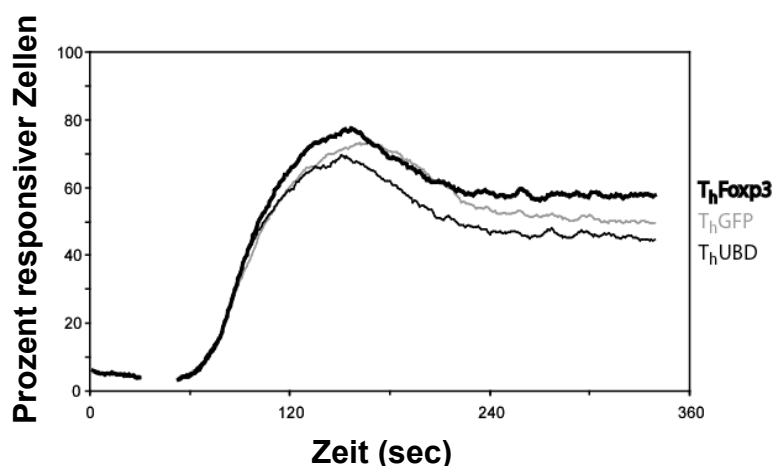


Abb.36 Einfluss von Foxp3 bzw. UBD auf die anti-CD3 induzierten Calcium-Mobilisation.

Ähnlich zu T_{reg} -Zellen (s.Abb.14) führte die Foxp3-Überexpression zu einer Erhöhung der anti-CD3 induzierten Calcium-Mobilisation. Im Unterschied dazu führte die alleinige UBD-Überexpression zu einer herabgesetzten Calcium-Mobilisation wie es für $CD4^+CD25^+$ - T_{reg} -Zellen bei der *ex vivo* Analyse beschrieben wurde²⁸. Repräsentative Darstellung von drei unabhängigen Messungen am MoFlo. Wie zuvor beschrieben wurden die INDO-1 markierten, anti-CD3 beladenen T-Zellen durch Zugabe von quervernetzende Antikörpern nach 30 sec stimuliert.

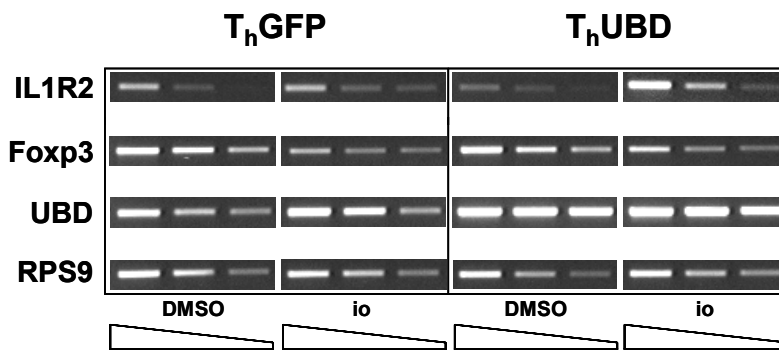
4.9.7 Ionomycin induziert die UBD-Expression

Ionomycin bewirkt als Calcium-Ionophor einen anhaltenden (sustained) Ca^{2+} -Flux. Dies führt bei T-Zellen über die Cyclophilin-abhängige Induktion von E3 Ubiquitin-Ligasen zur Induktion einer Anergie³². Daher untersuchten wir den Einfluss von Ionomycin auf die UBD-Expression. Abb.37A zeigt, dass eine Ionomycin-Behandlung (1 μ M) über einen Tag im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle die UBD-Expression in T_h -Zellen (T_hGFP) erhöht. Im Gegensatz dazu wird die Foxp3-Expression erniedrigt, was auch durch eine UBD-Überexpression nicht verhindert wird. Die damit einhergehende funktionelle Einschränkung der T-Zellfunktion (Anergie) ist in Abb.37B dargestellt. Die mit dieser Einschränkung einhergehende Suppressor-Eigenschaft wird durch UBD-Überexpression, welche alleine schon die Proliferation herabsetzt, nicht verbessert. Dies steht in Übereinstimmung mit der Hypothese, dass der Einfluss von UBD auf den Foxp3-abhängigen regulatorischen Phänotyp im Wesentlichen in der Regulation der Anergie und nicht der Suppressoreigenschaft von T_{reg} -Zellen liegt.

Interessanterweise wurde die Genexpression von Interleukin-1 Rezeptor-2 (IL1R2), durch Ionomycin nur im Zusammenhang mit UBD-Überexpression induziert (Abb.37A). IL1R2 wurde in den GeneChip Analysen der T_{reg} -Zellen im Vergleich zu

T_h-Zellen als signifikant reguliert identifiziert, erfüllte aber für die analysierten T_hFoxp3-Zellen nicht die hier zugrunde gelegten Kriterien einer signifikanten Regulation. Die Foxp3-abhängige Induktion von IL1R2 in T_hFoxp3-Zellen konnte durch RT-PCR in drei unabhängigen T_hFoxp3-Zelllinien bestätigt werden (Abb.38), wird aber durch UBD selber nicht induziert (Abb.37A und 38). Somit kann für UBD eine weitere Beteiligung an der Foxp3-abhängigen Genregulation durch einen kooperativen Effekt im Zusammenhang mit einem erhöhten Calcium-Flux herausgestellt werden.

A)



B)

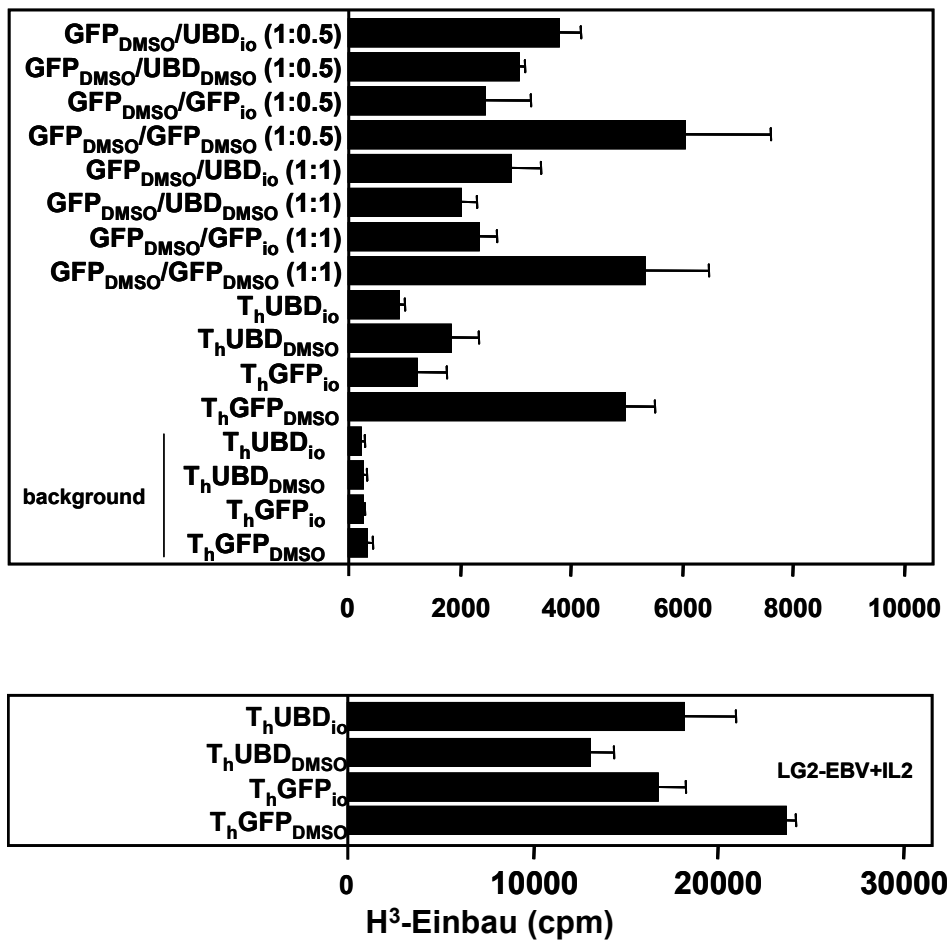


Abb.37 Ionomycin induziert UBD und eine funktionelle Einschränkung.

A) UBD wird durch Ionomycin (io) in den T_h GFP-Zellen induziert, die Foxp3-Expression jedoch dagegen -auch bei UBD-Überexpression (T_h UBD)- herabgesetzt. Die Expression von IL1R2 wird synergistisch durch Ionomycin (=sustained Ca²⁺-Flux) und UBD induziert (Abgleich mit RPS9). B) Ionomycin induziert eine Einschränkung der allo-stimulierten Proliferation (LG2-EBV) von T_h GFP -vergleichbar der UBD Überexpression (T_h UBD_{DMSO})- und führt auch zu einer suppressiven Eigenschaft (obere Abbildung). Letztere wird durch UBD nicht verstärkt. Im unteren Bild ist die Aufhebung der Anergie durch exogenes IL-2 dargestellt.

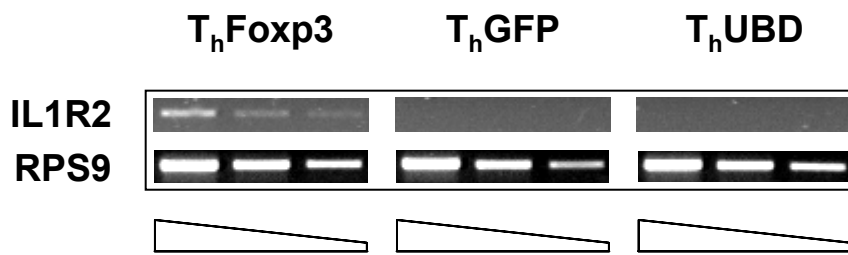


Abb.38: IL1R2 wird Foxp3-abhängig induziert.

Repräsentative semi-quantitative RT-PCR Analyse der Foxp3-induzierten IL1R2 Induktion, und damit eine funktionelle Einschränkung. UBD-Überexpression beeinflusst die IL1R2 Expression nicht (s. Ab.37A). Abgleich mit RPS9.

4.9.8 Cyclosporin-A induziert die UBD-Expression

Vorangehende Untersuchungen zeigten, dass eine TCR-Stimulation in Anwesenheit von Cyclosporin A (CSA) von T_h⁻ und T_{reg}-Zellen die Foxp3 mRNA-Expression erhöht. Da UBD ein Foxp3-induziertes Gen darstellt, untersuchten wir den Einfluss von CSA auf die Expression von UBD in CD4⁺-T-Zellen nach allogener Stimulation durch LG2-EBV B-Zellen. Um ein Überleben der T-Zellen in Anwesenheit von CSA (1 µg/ml) zu gewährleisten, wurde die Stimulation mit 10 U/ml IL-2 supplementiert. Interessanterweise wurde durch CSA-Behandlung im Vergleich mit der Lösungsmittelkontrolle (DMSO) die UBD Expression deutlich induziert (Abb.39).

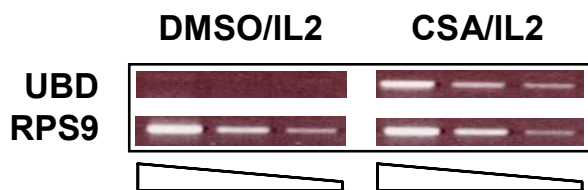


Abb.39. CSA beeinflusst die UBD Expression allo-stimulierter CD4⁺-T-Zellen.

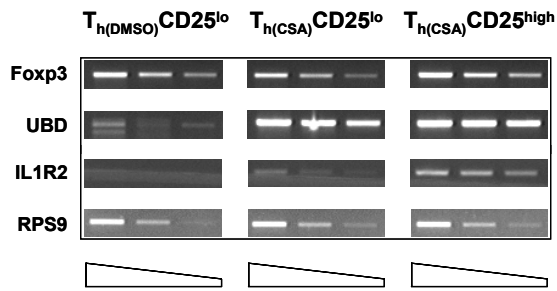
Durch MACS isolierte CD4⁺-T-Zellen (Reinheit: 95%; freundlich zur Verfügung gestellt von Dipl. biol. S. Pförtner, GBF, Braunschweig) wurden mit allogenen bestrahlten LG2-EBV B-Zellen und CSA (CSA/IL2) bzw. DMSO (DMSO/IL2) als Lösungsmittelkontrolle jeweils mit 10 U/ml IL-2 stimuliert. Dargestellt ist die semi-quantitative Analyse der UBD-Expression nach dreimaliger Stimulation. CSA induziert deutlich die UBD-Expression im Vergleich zur DMSO-Kontrolle.

Da Gesamt-CD4⁺-T-Zellen CD4⁺CD25⁺-T_{reg}-Zellen beinhalten, wurden nach dreimaliger Allo-Stimulation die CD4⁺CD25^{high} von den CD4⁺CD25^{low}-T-Zellen durch

Sortieren getrennt. In der CSA-behandelten Probe war der relative Anteil an CD4⁺CD25^{high}-T-Zellen im Vergleich mit der DMSO-Kontrolle um den Faktor 9 erhöht (von 0.1% versus 0.9%). Dies steht im Einklang mit Beobachtungen, dass Rapamycin, ein weiteres Cyclophilin-bindendes Immunsuppressivum, das Wachstum von CD4⁺CD25⁺-T_{reg}-Zellen *in vitro* fördert⁸. Allerdings hat Rapamycin einen anderen Wirkmechanismus als CSA.

Die CD4⁺CD25^{low} T-Zellen wurden durch Zellsortierung von den CD4⁺CD25^{high}-T_{reg}-Zellen getrennt und durch alleinige Allostimulation (ohne CSA) expandiert. Bei der Genanalyse stellte sich heraus, dass diese CD25^{low}-T-Zellen eine ähnlich starke UBD-Expression wie die von ihnen getrennten CD4⁺CD25^{high}-T_{reg}-Zellen aufwiesen, was nicht bei den CD4⁺CD25^{low}-T-Zellen aus der DMSO-Kontrolle der Fall war (Abb.40A). Die vorangegangene Charakterisierung von UBD als Anergie-regulierendes Gen wurde dadurch bestätigt, dass diese durch CSA-induzierten CD4⁺CD25^{low}UBD^{hi}-T-Zellen -im Vergleich mit den CD4⁺CD25^{low}-T-Zellen aus der DMSO Kontrolle- eine funktionelle Einschränkung aufwiesen (Abb.40B). Diese war wiederum nicht mit einer erhöhten Foxp3-Expression wie bei den zuvor analysierten T_hUBD-Zellen verbunden.

A)



B)

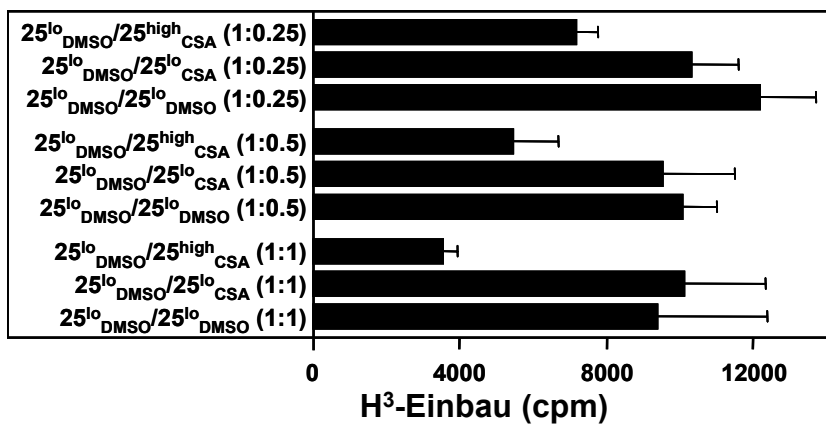
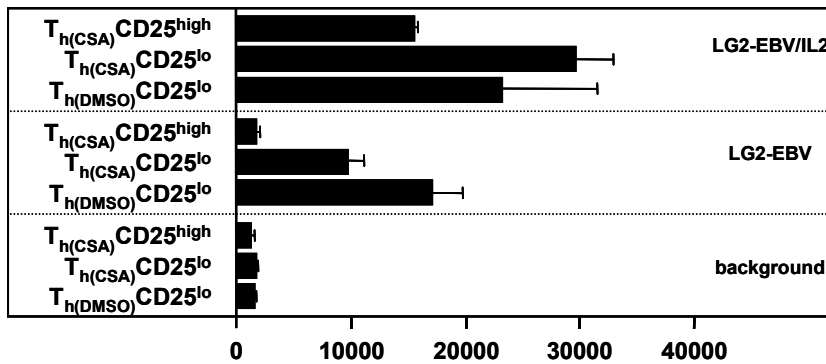


Abb. 40:

A) Die nach CSA-Behandlung durch Zellsortieren erhaltenen $T_{h(CSA)}CD25^{low}$ -Zellen weisen eine ähnlich starke Expression von UBD wie die $T_{h(CSA)}CD25^{high}$ -Zellen auf, allerdings ohne Einfluss von Foxp3. In den $T_{h(CSA)}CD25^{lo}$ -Zellen, welche eine funktionelle Einschränkung aufwiesen, zeigte sich im Gegensatz zu den $T_{h(CSA)}CD25^{lo}$ - und den DMSO-Kontrollzellen eine Heraufregulation von IL1R2. Abgleich mit RPS9.

B) Die korrespondierende Proliferation der Zellen zeigt nach Stimulation mit LG2-EBV B-Zellen, dass die $T_{h(CSA)}CD25^{high}$ -Zellen im Vergleich zu den $T_{h(CSA)}CD25^{lo}$ - und den DMSO-Kontrollzellen eine funktionelle Einschränkung aufwiesen (oberes Bild). Parallel besitzen die $T_{h(CSA)}CD25^{high}$ -Zellen eine titrierbare Hemmfunktion (unteres Bild).

5. Diskussion

5.1 Charakterisierung von CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen

Regulatorische CD4⁺CD25⁺-T-Zellen stellen eine bedeutende Population von Suppressor-T-Zellen dar. Sie sind wesentlich an der Aufrechterhaltung der peripheren Immunhomeostase beteiligt. Da ihre Differenzierung und Funktion von dem Transkriptionsfaktor Foxp3 abhängig ist²⁶, wird dieser zurecht als *Rheostat der Immunreaktion* bezeichnet⁵⁵. Dies wird durch das klinische Bild der letalen, autoimmunen Multiorganerkrankung bei Fehlen eines funktionellen Foxp3-Proteins illustriert⁵⁵. Das wachsende klinische Interesse an der Entwicklung von regulatorischen T-Zell-Therapien für die Behandlung von Autoimmunerkrankungen oder der Transplantat-Abstoßung^{11,79,80} bedingt somit die Notwendigkeit für die genaue Kenntnis der molekularen Mechanismen der Foxp3-abhängigen Genregulation.

5.2 Isolation und *in vitro*-Expansion humaner regulatorischer CD4⁺CD25^{high}-T-Zellen

Ein großes Problem für die mögliche Anwendung von CD4⁺CD25⁺-T_{reg}-Zellen stellt besonders beim Menschen ihre geringe Anzahl von nur 1-3% der CD4-positiven peripheren Blutlymphozyten gesunder Spender dar. Diese sind hierbei, im Gegensatz zur Maus, nur in der CD25^{high}-Fraktion der CD25-positiven Zellen zu finden. Um eine angemessene Zellzahl für potentiell klinische Anwendungen zu erreichen, bedarf es somit der Etablierung von Protokollen, die eine sichere Expansion dieser Zellen *ex vivo* erlauben. Der von uns gewählte Ansatz der Zellsortierung als Grundlage zur Isolation von humanen CD4⁺CD25^{high}-T_{reg}-Zellen verdeutlicht diese Problematik und stellt gleichzeitig eine mögliche Lösung dar. Ausgehend von etwa 200 ml einer Vollblutspende eines gesunden Probanden können nach Anreicherung von CD4⁺-Zellen mit Hilfe der MACS-Technologie und nachfolgender FACS-Sortierung zwischen 100.000 bis 500.000 CD4⁺CD25^{high}-T_{reg}-Zellen in großer Reinheit (> 99%) gewonnen werden. Dies stellte sich als absolute Notwendigkeit heraus, um eine „Kontamination“ von CD25-positiven nicht-regulatorischen T-Zellen zu vermeiden. Diese nicht-regulatorischen T-Zellen sind durch die hohen Dosen an IL-2, notwendig für die effiziente Expansion der anergen

CD4⁺CD25^{high}-T_{reg}-Zellen, hiermit vor dem suppressiven Effekt der CD4⁺CD25^{high}-T_{reg}-Zellen geschützt. Da nicht-regulatorische T-Zellen zudem schneller als CD4⁺CD25^{high}-T_{reg}-Zellen proliferieren, können sie diese mit der Zeit „überwachsen“. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dieses Problem, durch technische Gründe bedingt, offensichtlich. Hierbei wurde die angestrebte Reinheit von > 99% an CD4⁺CD25^{high}-T_{reg}-Zellen nicht erreicht. Diese Zellen wiesen anfänglich die typischen funktionellen Merkmale regulatorischer T-Zellen über mehr als einen Monat der *in vitro*-Expansion auf. D.h., sie waren anerg auf anti-CD3 bzw. Allostimulation ohne exogenes IL-2 und sie supprimierten die Proliferation von anti-CD3 oder allo-stimulierten T_H-Zellen. Erst nach etwa drei Monaten Kultivierung wurde deutlich, dass der anerge und suppressive Phänotyp verlorenging. Zu diesem Zeitpunkt allerdings hätte man eine klinisch relevante Zellzahl für eine regulatorische T-Zell Therapie, bei einer zu beobachtenden Expansion von etwa 10 – 100-fach pro Woche, längst erreicht. Die Sortierung der CD4⁺CD25^{high}-T_{reg}-Zellen zu einer Reinheit von > 99% dagegen gewährleistete eine funktionelle und phänotypische Stabilität dieser Zellen über Monate der Expansion *in vitro*. Wir konnten diese T_{reg}-Zellen zudem ohne Probleme wie andere Kulturzellen einfrieren und wieder in Kultur nehmen. Somit ist das für die klinische Anwendung von regulatorischen T-Zellen diskutierte Problem der geringen Zellzahl¹¹ praktisch gelöst, wie auch andere Arbeiten belegen^{5,34,38}.

5.3 Funktion und Phänotyp der *in vitro* expandierten humanen CD4⁺CD25^{high}-T_{reg}-Zellen

Die isolierten CD4⁺CD25^{high}-T_{reg}-Zellen zeigten auch nach langer Kultivierungszeit von mehr als 6 Monaten konstant ihre typischen Eigenschaften. So waren sie weiterhin anerg auf alleinige anti-CD3 oder Allo-Stimulation mit EBV-transformierten B-Zellen (LG2-EBV). Ihre Suppressor-Funktion war weiterhin Zell-Zell-Kontakt abhängig und wurde durch IL-2 in einer Konzentration von mehr als 10 U/ml wieder aufgehoben. Entgegen anderen Berichten^{18,36} wurde die Hemmfunktion unserer *in vitro* expandierten CD4⁺CD25^{high}-T_{reg}-Zellen durch Fixation mit para-Formaldehyd unterbunden. Dies kann bedeuten, dass entweder ein inhibitorisch aktives Molekül auf der Zelloberfläche durch die Fixation zerstört wurde oder aktive Prozesse wie die Sekretion bestimmter Zytokine bzw. die Bildung von Stoffwechselmetaboliten

unterbunden wurden. Zur Zeit ist allerdings weiterhin unklar, welcher Mechanismus der Zell-Zell-Kontakt abhängigen Hemmung zugrunde liegt.

Bekannte phänotypische Eigenschaften von $CD4^+CD25^{\text{high}}$ - T_{reg} -Zellen in Form der konstitutiv hohen Expression von CD25, CD28 und Ctl α 4 wurden durch die *in vitro* Kultur ebenfalls nicht beeinflusst.

Diese funktionelle und phänotypische Stabilität wurde durch die unabhängig vom Aktivierungsstatus hohe Foxp3-Expression der $CD4^+CD25^{\text{high}}$ - T_{reg} -Zellen im Vergleich zu allo-reaktiven T_{h} -Zellen begleitet. Zudem wurde beobachtet, dass T-Helfer-Zellen ihre vergleichsweise niedrige Foxp3-Expression nach Stimulation sogar noch herunterregulieren. Dies lässt vermuten, dass die funktionellen und phänotypischen Eigenschaften von $CD4^+CD25^{\text{high}}$ - T_{reg} -Zellen durch die anhaltend hohe Foxp3-Expression gewährleistet wird. Die Untersuchung der molekularen Mechanismen, welche durch Foxp3 kontrolliert werden und wie diese in Bezug zu den funktionellen und phänotypischen Eigenschaften von $CD4^+CD25^{\text{high}}$ - T_{reg} -Zellen stehen, war das Ziel dieser Arbeit.

5.4 Regulatorische $CD4^+CD25^+$ -T-Zellen: Calciumflux und TCR-Regulation

Die kultivierten T_{reg} -Zellen zeigten einen im Vergleich zu den T_{h} -Zellen erhöhten und anhaltenden Calcium-Flux nach aCD3-Stimulation. Dieses konnte sowohl in der MoFlo- als auch in der Einzel-Zell-Analyse durch konfokale Mikroskopie beobachtet werden. Im Gegensatz dazu wurde für *ex vivo* untersuchte murine regulatorische $CD4^+CD25^+$ -T-Zellen ein verminderter Ca^{2+} -Flux beschrieben²⁸. Die Beobachtung, dass bei den kultivierten humanen T_{reg} -Zellen ein erhöhter Calcium-Flux nach Stimulation erfolgt, steht andererseits im Einklang mit der Beobachtung, dass ein durch das Calciumionophor Ionomycin induzierter anhaltender (*sustained*) Calcium-Flux in murinen T-Zellen zur Induktion einer Anergie führt⁴⁶. Diese Anergieinduktion konnten wir auch bei humanen T_{h} -Zellen nachweisen. Somit liegt die Vermutung nahe, dass der erhöhte, anhaltende Calcium-Flux von T_{reg} -Zellen einen nicht unerheblichen Beitrag zur Erhaltung ihrer Anergie leistet, der direkt durch die Induktion von E3-Ubiquitin Ligasen am TCR angreifen könnte³². Die Ionomycin-induzierten E3-Ubiquitin Ligasen Cbl-b, Itch oder GRAIL³² führen zu einer Degradation von wichtigen TCR-assoziierten Signalmolekülen wie PKC- θ oder PLC-

γ . Die Folge dieser Proteindegradation ist die Hyporesponsivität der TCR-Signaltransduktion.

Dass einer der Foxp3-Effekte direkt am TCR-Komplex ansetzt, wurde durch die gestörte TCR-Herunterregulation (*down-modulation*) von T_{reg}^- im Vergleich zu T_H^- Zellen angezeigt. Es ist bekannt, dass das Ausmaß der TCR-Herunterregulation mit der Stärke der Stimulation des T-Zell-Rezeptors und der daraus resultierenden Effektorfunktion korreliert³. So bewirkt ein partieller Agonist eine eingeschränkte TCR-Herunterregulation¹⁹. Diese partielle TCR-Stimulation kann ihrerseits zur Anergie oder Toleranz führen. Da T_{reg} -Zellen eine verzögerte Herunterregulation ihres TCR aufweisen, kann man daraus folgern, dass sie einen starken TCR-Stimulus jeweils nur als schwach/partiell interpretieren können, was zum Erhalt ihres anergen Phänotyps beitragen würde.

5.5 Foxp3-abhängige transkriptionelle Kontrolle

Es gelang durch retrovirale Überexpression von Foxp3 in allo-reaktiven T_H -Zellen (T_H Foxp3) ein bestehendes Effektorprogramm zu einem regulatorischen Programm „umzuprogrammieren“. Foxp3-transduzierte T_H -Zellen waren wie T_{reg} -Zellen anerg auf alleinige anti-CD3 oder Alloantigen-Stimulation und erwarben eine suppressive Eigenschaft. Das Ausmaß dieser Eigenschaften erreichte dabei aber nicht das der natürlich regulatorischen T_{reg} -Zellen. Ein möglicher Grund hierfür kann darin liegen, dass das bestehende Effektorprogramm nicht vollständig von Foxp3 dominiert werden kann. Dies wird auch dadurch angezeigt, dass z.B. die bestehende Effektor-Zytokinproduktion nicht unterdrückt wurde, so dass im Gegensatz zu T_{reg} -Zellen T_H Foxp3-Zellen weiterhin $IFN-\gamma$ produzieren konnten. Weiterhin wurde die Regulation der CD25-Expression, als Aktivierungsmarker einer Effektor-Zelle, ebenfalls nicht vollständig aufgehoben. Allerdings wurden auch bei der Foxp3-Transduktion von naiven murinen $CD4^+CD25^-$ -T-Zellen nicht alle Merkmale einer $CD4^+CD25^+$ - T_{reg} -Zelle in gleichem Maße induziert²⁴. Möglicherweise fehlt somit reifen T-Zellen ein durch Foxp3 nur während der Thymusentwicklung anschaltbares Set an Genen, welche dies mitbedingen müssen, oder dies wird durch nicht unterdrückte Bestandteile des reifen T-Zell-Differenzierungsprogramms unterdrückt.

Die Foxp3-Überexpression in T_H Foxp3-Zellen führte weiterhin zu einem erhöhten anti-CD3 induzierten Calcium-Flux und zu einer verzögerten TCR-Herunterregulation

ähnlich den Beobachtungen bei T_{reg}-Zellen. Somit werden diese Phänomene durch eine hohe Foxp3-Expression verursacht.

Insgesamt konnte die Foxp3 zugeschriebene Rolle als linienspezifischer Differenzierungsfaktor und *Master-Regulator* für regulatorische T-Zellen somit weitgehend bestätigt werden. Daraus wird der Grund für das Interesse an der gezielten Manipulation von T_h Zellen mittels Gentransfer von Foxp3 klar ersichtlich: es ergibt sich hierdurch die Möglichkeit der Reprogrammierung von differenzierten Antigen-spezifischen T-Zellen. So könnten z.B. Transplantat-abstoßende Effektor T-Zellen (Alloantigen-spezifisch) zu Toleranz-übertragenden regulatorischen T-Zellen mit bekannter Antigen-Spezifität reprogrammiert werden, wie es in unserem *in vitro*-Model gezeigt wurde. Die TCR-Spezifität dieser Zellen wäre somit von vornherein bekannt. Im Gegensatz hierzu ist für die hier beschriebenen, durch Allo-Stimulation und IL-2 expandierten CD4⁺CD25^{high}-T_{reg}-Zellen, deren Antigen-spezifität völlig unklar. Einerseits sind sie anerg, so dass man nicht mit den für Effektor T-Zellen etablierten Messparametern einer spezifischen TCR-Erkennung in Form der TCR-stimulierten Proliferation arbeiten kann. Zum anderen hemmen sie *in vitro* viele Effektor T-Zellen Antigen-unspezifisch. Das Problem für eine klinische Anwendung solcher *in vitro* expandierter T_{reg}-Zellen beinhaltet, dass man einem Patienten somit entweder ein „Zuviel“ an unspezifischer Immunsuppression, aber auch an spezifischer Immunsuppression geben könnte. Letzteres erklärt sich aus Beobachtungen in der Tumorummunologie. Hier werden Selbst-Antigen spezifische T_{reg}-Zellen für die Unterdrückung der anti-tumoralen Immunantwort verantwortlich gemacht, da sie Tumor-spezifische Effektor T-Zellen supprimieren^{1,48,74}. Die Manipulation eines Antigen-spezifischen Effektorprogramms durch Foxp3 bietet hierfür einen möglichen Lösungsansatz, soweit ein sicheres und effektives Gentransfersystem besteht, was nicht für die hier experimentell angewandte retrovirale Gentransduktion gilt.

Ctla4 wurde in die Untersuchungen eingeschlossen, da Ctla4 durch retrovirale Überexpression von Foxp3 in humanen und murinen CD4⁺-T-Zellen induziert werden kann^{35,81}. Somit besteht die Möglichkeit, dass Ctla4 direkt zu dem durch Foxp3 induzierten Phänotyp beiträgt. Im Gegensatz zu Foxp3 führte die retrovirale Überexpression von Ctla4 zu keinem anergen oder regulatorischen Phänotyp, obwohl die Ctla4-Proteinmenge mit der von T_{reg}-Zellen vergleichbar war. Insgesamt bleibt somit die Rolle von Ctla4 im Zusammenhang mit der durch Foxp3 induzierten

transkriptionellen Kontrolle unklar. Es ist spekulativ, dass Ctla4 eine Rolle nur im Zusammenhang mit einer hohen Foxp3-Expression zukommt. Andererseits führte die Foxp3-Überexpression in T_hFoxp3-Zellen nicht zu der hohen Ctla4-Expression von T_hCtla4- oder T_{reg}-Zellen. T_hFoxp3-Zellen wiesen somit unabhängig davon einen regulatorischen Phänotyp auf.

Weitere Ergebnisse für CTLA-4 zeigten, dass blockierende Antikörper gegen Ctla4 bei T_{reg}-Zellen zu keiner Beeinträchtigung der inhibitorischen Funktion führten und vielmehr die Proliferation der T_h-Zellen verstärkten, wie bereits von Thornton *et. al.*, 2004 berichtet⁷¹. Diese Antikörperbehandlung führte somit wie erwartet bei unseren T_hCtla4-Zellen ebenfalls zu keiner Beeinträchtigung ihrer Funktion.

5.6 Der Einfluß von Foxp3 auf die Expression von CD25 und CD28

Wie sich zeigte, erreichten die transduzierten T_hFoxp3-Zellen nie das hohe Expressionsniveau von CD25 wie die kultivierten und expandierten T_{reg}-Zellen. Ähnliches wurde auch bei der Foxp3-Transduktion von murinen naive CD4⁺CD25⁻-T-Zellen beobachtet²⁴. In unserem Falle sollte daher zusätzlich der Effekt einer unterschiedlichen CD25-Expression (CD25^{high} vs. CD25^{low}) von T_h-Foxp3-Zellen untersucht werden. Es konnte festgestellt werden, dass der regulatorische Phänotyp der CD25^{high}- im Vergleich zu CD25^{low}-T_hFoxp3-Zellen nur stärker ausgeprägt war. Diese Beobachtung stimmt mit Berichten überein, dass Foxp3 eine suppressive Eigenschaft unabhängig von der CD25-Expression überträgt²⁵. Weiterhin sollte die Expression von CD28 innerhalb der verschiedenen getesteten Zellpopulationen untersucht werden. Es zeigte sich, dass sowohl bei den T_{reg}- als auch bei den T_hFoxp3-Zellen eine deutliche Induktion von CD28 erfolgte.

Im Gegensatz zu der CD25-Expression blieb die CD28-Expression allerdings homogen höher. Möglicherweise ist somit CD28 ein vergleichsweise besserer Marker als CD25 alleine. Eine genaue Unterscheidung von möglichen humanen T_{reg}-Zell-Subpopulationen mit unterschiedlichen Eigenschaften ist Gegenstand laufender Forschungen⁶⁵.

5.7 Transkriptomanalyse zur Bestimmung Foxp3-abhängiger Gene

Zur Identifikation von Genen, die in direktem Zusammenhang mit der transkriptionellen Kontrollfunktion von Foxp3 stehen, wurde eine GeneChip-Analyse durchgeführt. Bei dieser Analyse wurde das genetische Programm von CD4⁺CD25^{high} abgeleiteten T_{reg}-Zellen mit dem der durch Foxp3-Transduktion generierten T_h-Zellen mit regulatorischem Phänotyp verglichen. Dabei wurden Gene herausgefiltert, welche in allen unterschiedlichen Vergleichen (T_{reg}- vs T_h-Zellen bzw. T_hFoxp3- vs T_hGFP - Zellen) dieselbe Regulation aufwiesen. Dies waren z.T. bekannte Marker von T_{reg}-Zellen wie CD25, CTLA-4, TNFRSF1B oder CCR7. Andere Gene, die durch Foxp3 induziert werden, wie beispielsweise CD28 oder IL1R2, konnten durch die GeneChip Analyse nicht identifiziert werden. Im Rahmen dieser Untersuchungen konnte Diubiquitin (UBD oder FAT10) als Foxp3-reguliertes Gen identifiziert werden. Im Gegensatz zu den T_{reg}- und T_hFoxp3-Zellen erschien UBD in *ex vivo* analysierten CD4⁺CD25⁺-T_{reg}-Zellen nicht signifikant expremiert bzw. reguliert, was eine mögliche Bedeutung von UBD bei der Aufrechterhaltung des regulatorischen Phänotyps nach T_{reg}-Zell-Aktivierung vermuten ließ.

5.8 Der Beitrag von UBD zur Foxp3-abhängigen transkriptionellen Kontrolle

Ursprünglich wurde UBD als Gen identifiziert, welches ausschließlich in Dendritischen Zellen und reifen B-Zellen expremiert wird⁷. Funktionell wurde UBD weiterhin eine Rolle in der Protein-Degradation, der Apoptose und dem Aufbau des Spindelapparats zugeschrieben^{45,57}. Weiterhin ist bekannt, dass IFN- γ die UBD Expression reguliert sowie ein UBD-bindendes Protein induziert, welches wiederum den Abbau von UBD beschleunigt³³.

Ubiquitinierende Proteine kontrollieren zwar T-Zell Anergie³²- eine Funktion von UBD in der Kontrolle der T-Zell Anergie bzw. der Physiologie regulatorischer T-Zellen war bisher jedoch nicht bekannt. Ein möglicher Grund dafür kann die Tatsache sein, dass UBD nur nach Aktivierung ein signifikantes Expressionsniveau erreicht. Da Foxp3 als ein transkriptioneller Repressor beschrieben wird⁶², kann man im Falle der Foxp3-induzierten UBD-Expression von einem indirekten Effekt ausgehen, beispielsweise die Suppression von Repressoren der UBD-Transkription. Ein weiterer Beleg für die

Abhängigkeit der UBD-Expression von Foxp3 ist die Tatsache, dass die Stimulation von CD4⁺-T-Zellen in Anwesenheit von Cyclosporin A zur Induktion von Foxp3 und Foxp3-abhängigen Genen wie IL1R2 und UBD führt. Dieses deutet darauf hin, dass UBD selbst in differenzierten nicht-regulatorischen T_h-Zellen, welche durch eine geringe Expression von Foxp3 charakterisiert sind, möglicherweise Foxp3-abhängig reguliert wird. UBD wird in T_{reg}⁻ und T_hFoxp3-Zellen verglichen mit T_hGFP- und T_hCtla4-Zellen weitaus stärker expremiert. Im Gegensatz zu Foxp3 wird UBD nach vollständiger Aktivierung durch aCD3/-CD28/IL-2 in T_{reg}⁻ und T_hFoxp3-Zellen herunterreguliert. Diese bedeutet, dass eine weitere Foxp3-unabhängige Kontrolle der UBD-Expression oder ein die Foxp3-Kontrolle dominierender Mechanismus existieren muss. Beide regulatorischen T-Zell-Populationen sind durch eine Stimulations-unabhängige hohe Foxp3-Expression gekennzeichnet, was aber die UBD-Herunter-Regulation nach TCR-Stimulation nicht verhindern kann.

Ein wichtiger Effekt von UBD ist die Induktion von CD25. Die ein bis zwei Wochen nach der UBD-Transduktion und Zellsortierung der T_hUBD-Zellen gemachten funktionellen Tests zeigten zunächst keine signifikante Einschränkung der Proliferation dieser Zellen und eine erhöhte IFN- γ -Sekretion. Erstaunlicherweise entwickelte sich in drei unabhängig generierten T_hUBD-Zellen im weiteren Verlauf eine partielle Einschränkung der Proliferation (anergischer Phänotyp), was mit erhöhter IL-10-Produktion einherging.

E3-Ubiquitin Ligasen spielen, wie bereits erwähnt, eine wichtige Rolle bei der Induktion der T-Zell-Anergie. Die E3-Proteine Itch, Cbl-b und GRAIL beispielsweise markieren TCR-Signalmoleküle, welche hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert sind, für deren Protein-Abbau³². UBD wurde bisher nicht mit der TCR-Signal-Transduktion in Verbindung gebracht, obwohl dieses Enzym Proteine für deren Abbau markiert. Dieses wiederum ist insbesondere für die beobachteten Effekte bezüglich der differenziellen TCR-Herunterregulation bei den T_{reg}⁻ im Vergleich zu T_h-Zellen von Bedeutung. Es zeigt sich, dass UBD selber diesen Effekt nicht bedingt. Die TCR-Herunterregulation von T_hUBD-Zellen war nicht wesentlich eingeschränkt. Die beschriebenen pro-apoptotischen Effekte von UBD in anderen Zellsystemen wären andererseits charakteristisch für den zu Apoptose neigenden Phänotyp regulatorischer CD4⁺CD25^{high}-T-Zellen⁶⁹.

Weiterhin ist für UBD eine nukleäre Lokalisation beschrieben worden⁴¹. Dieses spräche vielleicht für eine transkriptionelle Kontrollfunktion von UBD in Gefolge

(*downstream*) der Transkription von Foxp3. UBD könnte Foxp3-induziert die Aktivität einiger Transkriptionsfaktoren beeinflussen durch den UBD-gesteuerten Proteinabbau wie bei anderen Ubiquitin-Ligasen bekannt¹⁵. UBD könnte allerdings auch eine nicht-proteolytische Funktion ausüben. So ist z.B. für die Hdm2-abhängige Ubiquitinierung des HIV-kodierten Transaktivators eine Aktivierung der Tat-abhängigen Genkontrolle beschrieben worden¹². Für die erste These spricht die Beobachtung der Unterdrückung der IL-4 und IL-5 Transkription. Für die zweite Möglichkeit der positiven Beeinflussung einer Genregulation spräche der beobachtete synergistische Effekt auf die IL1R2-Induktion durch erhöhten Calcium-Flux und UBD. Die Hemmung der IL-4- und IL-5-Transkription sowohl in den T_hFoxp3- und den T_hUBD-Zellen wiederum war unabhängig von der GATA-3-Expression, welches die T_h2-Differenzierung und damit die Expression von IL-4 und IL-5 steuert. Auch eine LGALS3-Induktion konnte hierfür ausgeschlossen werden, welches die IL-4- und IL-5-Transkription hemmen kann¹⁶. Die Untersuchung der Expressionsstärke von LGALS3 durch quantitative *Realtime*-PCR ergab, dass keine Heraufregulation von LGALS3 sowohl in den T_hFoxp3- als auch in den T_hUBD-Zellen erfolgen musste. Insgesamt bleibt damit der Mechanismus der Herunterregulation von IL-4 und IL-5 ungeklärt. Man kann jedoch davon ausgehen, dass der Einfluss auf die Transkription von IL-4 und IL-5 eine Folge der *downstream*-Aktivierung von UBD durch den Masterregulator Foxp3 ist. Ein weiteres Argument für diese postulierte Hierarchie ist, dass T_hUBD-Zellen IL-4 und IL-5 regulieren ohne dabei Foxp3 zu induzieren. Die UBD-Expression ist, wie bereits beschrieben, in *ex vivo* analysierten regulatorischen CD4⁺CD25^{high}-T-Zellen nicht differentiell exprimiert, wird aber in den T_{reg}-Zellen nach deren Aktivierung *in vitro* induziert. Diese Tatsache lässt auf eine hauptsächliche Funktion von UBD bei der Aufrechterhaltung der Foxp3-abhängigen Anergie nach T_{reg}-Zell-Aktivierung schließen.

Weiterhin zeigte sich bezüglich der Analyse des Calcium-Flux ein gegensätzlicher Effekt zu dem beobachteten Einfluss in den Foxp3-transduzierten Zellen, bei denen ein länger anhaltender Calcium-Flux registriert werden konnte. Eine der einfachsten Methoden der Toleranzinduktion (Anergie) in T-Zellen ist die Behandlung mit dem Calcium-Ionophor Ionomycin. Hierbei wird die Freisetzung von intrazellulärem Calcium anhaltend erhöht. Dies wiederum führt zur Induktion von E3-Ubiquitin Ligasen und zu T-Zell-Anergie. Interessanterweise induzierte Ionomycin ebenfalls UBD. Die Ionomycin-induzierte funktionelle Einschränkung war unabhängig von der

Foxp3-Induktion und verstärkte bei UBD-Überexpression nicht deren Suppressoreigenschaft. Dies deutet auf die überwiegende Rolle in der Regulation der T-Zell Anergie von UBD.

In Abb.41 ist eine hypothetische Darstellung der möglichen Interaktionen von Foxp3 und UBD illustriert. Die erhöhte Foxp3-Expression führt zu einer UBD-Induktion. Dies wiederum zieht eine UBD-abhängige Suppression der IL-4- und IL-5-Transkription nach sich. Da UBD alleine IL1R2 nicht induziert und den Calcium-Flux negativ beeinflusst, bei Foxp3 der Calcium-Flux erhöht ist und UBD wie auch IL1R2 induziert werden, kann davon ausgegangen werden, dass Foxp3 im Calcium-Stoffwechsel über UBD dominiert, dass aber der erhöhte Calcium-Flux zusammen mit UBD synergistisch IL1R2 reguliert. Letzteres wurde durch Ionomycin in T_h UBD-Zellen imitiert.

Somit stellt UBD ein wichtiges Ziel-Gen von Foxp3 in der Erhaltung der Anergie von T_{reg} -Zellen bei Aktivierung dar. Zu untersuchen bleibt, welche Rolle den durch CSA induzierten UBD^{high} - $CD4^+$ -T-Zellen *in vivo* zukommt. Diese Zellen weisen eine UBD-abhängige Anergie ohne erhöhte Foxp3-Expression auf.

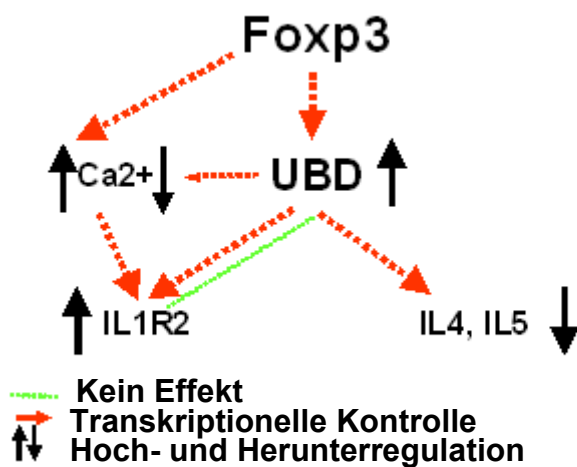


Abb.41: Hypothetische Interaktion von Foxp3 und UBD

Zusammenfassend kann man also die folgenden Punkte festhalten: CD4⁺CD25^{high}-T_{reg} Zellen kommt eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der immunologischen Homöostase und der Transplantat-Toleranz zu. Dabei spielt der Transkriptionsfaktor Foxp3 eine tragende Rolle als Masterregulator (*master switch*) bei der Entwicklung und Funktion regulatorischer T-Zellen und ist weiterhin in der Lage, sogar differenzierte T_h-Zellen zu einem regulatorischen Phänotyp zu reprogrammieren. Hierbei nimmt UBD eine wichtige Funktion als durch Foxp3 reguliertes Gen ein, welches involviert ist in die Erhaltung der Anergie nach TCR-Stimulation von T_{reg}-Zellen. Ein detailliertes Verständnis der molekularen Zusammenhänge zwischen Foxp3 und UBD würde zu einem besseren Verständnis und zu effektiveren Manipulationsmöglichkeiten von T_{reg}-Zellen im Rahmen einer potentiell möglichen klinischen Applikation führen. Bezüglich der regulatorischen T-Zellen ist jedoch immer noch die wichtigste Frage die der Antigen-spezifität offen. Die Klärung dieser Frage wäre die wichtigste Aufgabe für den Entwurf einer antigen-spezifischen Toleranz-Induktion in der Allo- als auch in der Xeno-Transplantation.

5.9 Cyclosporin A als Modulator von Foxp3⁺CD4⁺CD25^{high} T-Zellen

Es ist bekannt, dass die Anergieinduktion durch Ionomycin durch den Calcineurin-Inhibitor Cyclosporin A (CSA) wieder aufgehoben kann. Es sollte die Wirkung von CSA auf differenzierte T_h-Zellen untersucht werden. Es konnte beobachtet werden, dass durch die Gabe von CSA bei TCR-Stimulation Foxp3 und UBD heraufreguliert wurden. Diese Tatsache qualifiziert CSA als spezifischen Modulator der Expression von Foxp3 und/oder Foxp3-abhängigen Genen, was für eine *in vitro*-Generierung antigen-spezifischer regulatorischer T-Zellen nützlich sein könnte. Zu diesem Zweck wurden CD4⁺-T-Zellen *ex vivo* allo-stimuliert und CSA plus eine geringe Dosis IL-2 hinzugegeben. Nach dreimaliger Restimulation konnte festgestellt werden, dass CD28 in höherem Maße als CD25 hochreguliert wurde. Weiterhin erlangten die CSA-stimulierten CD4⁺-T-Zellen einen partiell anergen und suppressierenden Phänotyp. Ebenso wurden Foxp3 und Foxp3-abhängige Gene, wie Ctla4, LGALS3 und UBD induziert. Es wurden in diese Analyse auch sortierte CD4⁺CD25^{low}-T-Zellen einbezogen, welche vorher durch die Präsenz von CSA einer Differenzierung unterlagen. Diese Zellen zeigten eine eingeschränkte proliferative Eigenschaft. Es zeigte sich, dass durch die kontinuierliche Gabe von CSA das Herauswachsen von

Zellen mit erhöhter Expression von Foxp3 bzw. Foxp3-abhängigen Genen (inklusive UBD) und partiell anergem und inhibitorischem Phänotyp erfolgt. Für Rapamycin ist berichtet worden, dass sich durch dieses Immunsuppressivum selektiv T_{reg}-Zellen *in vitro* expandieren lassen⁸. Im Gegensatz zu CSA inhibiert Rapamycin nicht die durch den TCR induzierte Calcineurin-Aktivität, sondern die Serin/Threonin Proteinkinase mTOR. Dabei werden durch Cytokine oder Wachstumsfaktoren induzierte Signalwege blockiert. Zusammengefasst lässt sich festhalten, dass die Wirkung von verfügbaren Immunsuppressiva auf die Foxp3-Expression und die damit verbundene potentielle Manipulationsmöglichkeit von T_{reg}-Zellen im Rahmen einer möglichen *ex vivo*-T_{reg}-Zelltherapie weiter intensiv erforscht werden muss. Weiterhin ist festzuhalten, dass die durch Ionomycin/Ca²⁺ induzierte Anergie assoziiert mit der Calcineurin-abhängigen Induktion der E3-Ubiquitin Ligase schließlich im Abbau von für die TCR-Signal-Transduktion relevanten Schlüssel-Signal-Proteinen resultiert. Dieser Prozess wiederum interferiert mit der Wirkung von CSA und stellt somit einen differentiellen Pfad der Anergie verbunden mit der Induktion von UBD oder noch nicht weiter definierten Genprodukten dar. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass CSA plus IL-2 das Herauswachsen von *de facto* CD4⁺CD25^{high}Foxp3^{high}UBD^{high} T_{reg}-Zellen *in vitro* fördert, wodurch sich CSA als Reagenz zur gezielten *in vitro*-Manipulation von T_{reg}-Zellen eignet. Weiterhin fördert CSA in diesem experimentellen Design die Entwicklung von partiell anergen CD4⁺CD25^{low}UBD^{high}-Zellen, deren Rolle in der Immunantwort noch weiter untersucht werden muss.

Generell sollten einige Dinge jedoch in jedem Fall kritisch hinterfragt werden. Problematisch an dem Ansatz, eine Krankheits-fördernde, differenzierte T-Helfer Zelle mittels der Transduktion von Foxp3 in eine regulatorische T-Zelle zu reprogrammieren, ist die Tatsache, dass wir erst beginnen, die Foxp3-abhängige transkriptionelle Kontrollfunktion zu verstehen. Weiterhin ist ersichtlich geworden, dass der durch Foxp3 induzierte regulatorische Phänotyp in den T_H-Zellen nur partiell dem von CD4⁺CD25^{high} abgeleiteten T_{reg}-Zellen gleichkommt. Ferner ist dieser Phänotyp nicht stabil im zeitlichen Verlauf der *in vitro*-Kultivierung. Es wird klar, dass zum heutigen Zeitpunkt noch wesentliche Faktoren und Mechanismen unklar sind zur Etablierung eines vollständigen T_{reg}-Phänotyps. Die vergleichende Genom-weite Transkriptomanalyse genetisch veränderter T_H-Zellen und natürlich vorkommender regulatorischer T-Zellen stellt eine gute Ausgangsbasis zur weiteren Klärung von

genetischen und mechanistischen Aspekten der aktiven Immunsuppression im Krankheitsgeschehen dar und bietet neue potentielle molekulare Ziele für eine therapeutische Manipulation bei Patienten.

6. Ausblick

Wie bereits erörtert, bleiben viele Fragen bezüglich des komplett zu charakterisierenden Genotyps regulatorischer T-Zellen unbeantwortet. Hierzu müssen weitere potentiell regulierte Gene näher im Rahmen von Expressionsstudien getestet werden. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Konstruktion eines effektiven si-RNA-Konstrukts, um die potentiell durch Foxp3 kontrollierten Gene direkt in T_{reg}-Zellen näher beschreiben zu können. Zunächst aber besteht die elementare Fragestellung nach der Antigen-Spezifität regulatorischer T-Zellen. In Abb.42 ist die Herangehensweise an diese Fragestellung schematisch dargestellt. Auf der linken Seite ist das bestehende Problem der nicht-bekanntenen Antigen-spezifität regulatorischer T-Zellen bzw. die Probleme, welche durch ihre anergen Eigenschaften eine spezifische TCR-Stimulation nicht sicher nachweisen lassen, illustriert. Unsere kultivierten T_{reg}-Zelllinien sind zumindest oligoklonal, was die Analyse der TCR-Repertoire-Vielfalt aufzeigte. Eine Voraussetzung für die Untersuchung der Antigen-Spezifität ist jedoch die Kenntnis eines klonalen TCR einer einzelnen T_{reg}-Zelle. Hierzu müssten T_{reg}-Zellen kloniert werden, um sicher die spezifischen TCR $\alpha\beta$ -Gene isolieren zu können. Diese ergäben dann zusammen mit dem humanen CD4⁺-Molekül einen funktionellen TCR in einem heterologen Expressions-System, wie z.B. in den murinen TCR-negativen Bw $\alpha\beta$ -Hybridomzellen. Dieser würde dann bei Kontakt mit seinem spezifischen Antigen in Komplex mit entsprechenden MHC II Molekülen zur IL-2 Produktion dieser Zellen und damit zu der Möglichkeit der Identifikation der Antigen-Spezifität einer humanen anergen T_{reg}-Zelle führen.



Abb.42: Möglicher Ansatz zur Klärung der Frage nach der Antigen-spezifität von T_{reg}

Literatur

1. Antony,P.A. *et al.* CD8+ T Cell Immunity Against a Tumor/Self-Antigen Is Augmented by CD4+ T Helper Cells and Hindered by Naturally Occurring T Regulatory Cells. *J Immunol* **174**, 2591-2601 (2005).
2. Apostolou,I. & von Boehmer,H. In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells. *J Exp. Med.* **199**, 1401-1408 (2004).
3. Bachmann,M.F. *et al.* Peptide-induced T cell receptor down-regulation on naive T cells predicts agonist/partial agonist properties and strictly correlates with T cell activation. *Eur. J Immunol* **27**, 2195-2203 (1997).
4. Baecher-Allan,C., Brown,J.A., Freeman,G.J. & Hafler,D.A. CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *J. Immunol.* **167**, 1245-1253 (2001).
5. Baecher-Allan,C., Wolf,E. & Hafler,D.A. Functional analysis of highly defined, FACS-isolated populations of human regulatory CD4(+)CD25(+) T cells. *Clin Immunol* **115**, 10-18 (2005).
6. Balandina,A., Lecart,S., Darteville,P., Saoudi,A. & Berrih-Aknin,S. Functional defect of regulatory CD4+CD25+ T cells in the thymus of patients with autoimmune Myasthenia Gravis. *Blood* 2003-2011 (2004).
7. Bates,E.E. *et al.* Identification and analysis of a novel member of the ubiquitin family expressed in dendritic cells and mature B cells. *Eur. J Immunol* **27**, 2471-2477 (1997).
8. Battaglia,M., Stabilini,A. & Roncarolo,M.G. Rapamycin selectively expands CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells. *Blood* 2004-2010 (2005).
9. Bettelli,E., Dastrange,M. & Oukka,M. Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF- κ B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. *PNAS* **102**, 5138-5143 (2005).
10. Birebent,B. *et al.* Suppressive properties of human CD4+CD25+ regulatory T cells are dependent on CTLA-4 expression. *Eur. J Immunol* **34**, 3485-3496 (2004).
11. Bluestone,J.A. REGULATORY T-CELL THERAPY: IS IT READY FOR THE CLINIC? *Nat Rev Immunol* **5**, 343-349 (2005).
12. Bres,V. *et al.* A non-proteolytic role for ubiquitin in Tat-mediated transactivation of the HIV-1 promoter. *Nat Cell Biol* **5**, 754-761 (2003).
13. Bruder,D. *et al.* Frontline: Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells. *Eur. J. Immunol.* **34**, 623-630 (2004).
14. Choi,B.M., Pae,H.O., Jeong,Y.R., Kim,Y.M. & Chung,H.T. Critical role of heme oxygenase-1 in Foxp3-mediated immune suppression. *Biochem. Biophys. Res Commun.* **327**, 1066-1071 (2005).

15. Conaway,R.C., Brower,C.S. & Conaway,J.W. Emerging Roles of Ubiquitin in Transcription Regulation. *Science* **296**, 1254-1258 (2002).
16. Cortegano,I. *et al.* Galectin-3 Down-Regulates IL-5 Gene Expression on Different Cell Types. *J Immunol* **161**, 385-389 (1998).
17. Cosmi,L. *et al.* Human CD8+CD25+ thymocytes share phenotypic and functional features with CD4+CD25+ regulatory thymocytes. *Blood* **102**, 4107-4114 (2003).
18. Dieckmann,D., Bruett,C.H., Ploettner,H., Lutz,M.B. & Schuler,G. Human CD4(+)/CD25(+) regulatory, contact-dependent T cells induce interleukin 10-producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells [corrected]. *J. Exp. Med.* **196**, 247-253 (2002).
19. Ding,Y.H., Baker,B.M., Garboczi,D.N., Biddison,W.E. & Wiley,D.C. Four A6-TCR/peptide/HLA-A2 structures that generate very different T cell signals are nearly identical. *Immunity*. **11**, 45-56 (1999).
20. Earle,K.E. *et al.* In vitro expanded human CD4+CD25+ regulatory T cells suppress effector T cell proliferation. *Clin Immunol* **115**, 3-9 (2005).
21. Enk,A.H. Dendritic cells in tolerance induction. *Immunology Letters* **99**, 8-11 (2005).
22. Fallarino,F. *et al.* Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol* **4**, 1206-1212 (2003).
23. Fantini,M.C. *et al.* Cutting Edge: TGF- β Induces a Regulatory Phenotype in CD4+CD25- T Cells through Foxp3 Induction and Down-Regulation of Smad7. *J Immunol* **172**, 5149-5153 (2004).
24. Fontenot,J.D., Gavin,M.A. & Rudensky,A.Y. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* **4**, 330-336 (2003).
25. Fontenot,J.D. *et al.* Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity* **22**, 329-341 (2005).
26. Fontenot,J.D. & Rudensky,A.Y. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nat Immunol* **6**, 331-337 (2005).
27. Gambineri,E., Torgerson,T.R. & Ochs,H.D. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis. *Curr. Opin. Rheumatol.* **15**, 430-435 (2003).
28. Gavin,M.A., Clarke,S.R., Negrou,E., Gallegos,A. & Rudensky,A. Homeostasis and anergy of CD4(+)/CD25(+) suppressor T cells in vivo. *Nat. Immunol* **3**, 33-41 (2002).

29. Gershon,R.K. & Kondo,K. Infectious immunological tolerance. *Immunology* **21**, 903-914 (1971).
30. Gondek,D.C., Lu,L.F., Quezada,S.A., Sakaguchi,S. & Noelle,R.J. Cutting Edge: Contact-Mediated Suppression by CD4+CD25+ Regulatory Cells Involves a Granzyme B-Dependent, Perforin-Independent Mechanism. *J Immunol* **174**, 1783-1786 (2005).
31. 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).
32. Heissmeyer,V. *et al.* Calcineurin imposes T cell unresponsiveness through targeted proteolysis of signaling proteins. *Nat. Immunol* **5**, 255-265 (2004).
33. Hipp,M.S., Raasi,S., Groettrup,M. & Schmidtke,G. NEDD8 Ultimate Buster-1L Interacts with the Ubiquitin-like Protein FAT10 and Accelerates Its Degradation. *J. Biol. Chem.* **279**, 16503-16510 (2004).
34. 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).
35. Hori,S., Nomura,T. & Sakaguchi,S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* **299**, 1057-1061 (2003).
36. Jonuleit,H. *et al.* Infectious tolerance: human CD25(+) regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4(+) T helper cells. *J. Exp. Med.* **196**, 255-260 (2002).
37. Khattri,R., Cox,T., Yasayko,S.A. & Ramsdell,F. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat. Immunol.* **4**, 337-342 (2003).
38. Koenen,H.J.P.M., Fasse,E. & Joosten,I. IL-15 and Cognate Antigen Successfully Expand De Novo-Induced Human Antigen-Specific Regulatory CD4+ T Cells That Require Antigen-Specific Activation for Suppression. *J Immunol* **171**, 6431-6441 (2003).
39. Kriegel,M.A. *et al.* Defective Suppressor Function of Human CD4+ CD25+ Regulatory T Cells in Autoimmune Polyglandular Syndrome Type II. *J Exp. Med.* **199**, 1285-1291 (2004).
40. Kubsch,S., Graulich,E., Knop,J. & Steinbrink,K. Suppressor activity of anergic T cells induced by IL-10-treated human dendritic cells: association with IL-2- and CTLA-4-dependent G1 arrest of the cell cycle regulated by p27Kip1. *Eur. J Immunol* **33**, 1988-1997 (2003).
41. Lee,C.G. *et al.* Expression of the FAT10 gene is highly upregulated in hepatocellular carcinoma and other gastrointestinal and gynecological cancers. *Oncogene* **22**, 2592-2603 (2003).
42. Lehmann,O.J., Sowden,J.C., Carlsson,P., Jordan,T. & Bhattacharya,S.S. Fox's in development and disease. *Trends Genet.* **19**, 339-344 (2003).

43. Levings, M.K., Sangregorio, R. & Roncarolo, M.G. Human cd25(+)cd4(+) t regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. *J. Exp. Med.* **193**, 1295-1302 (2001).
44. Lindley, S. *et al.* Defective Suppressor Function in CD4+CD25+ T-Cells From Patients With Type 1 Diabetes. *Diabetes* **54**, 92-99 (2005).
45. Liu, Y.C. *et al.* A MHC-encoded ubiquitin-like protein (FAT10) binds noncovalently to the spindle assembly checkpoint protein MAD2. *PNAS* **96**, 4313-4318 (1999).
46. Macian, F. *et al.* Transcriptional mechanisms underlying lymphocyte tolerance. *Cell* **109**, 719-731 (2002).
47. Manavalan, J.S. *et al.* Alloantigen specific CD8+CD28- FOXP3+ T suppressor cells induce ILT3+ ILT4+ tolerogenic endothelial cells, inhibiting alloreactivity. *Int. Immunol.* dxh107 (2004).
48. Marshall, N.A. *et al.* Immunosuppressive regulatory T cells are abundant in the reactive lymphocytes of Hodgkin lymphoma. *Blood* **103**, 1755-1762 (2004).
49. Matzinger, P. The Danger Model: A Renewed Sense of Self. *Science* **296**, 301-305 (2002).
50. McHugh, R.S. *et al.* CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* **16**, 311-323 (2002).
51. Misra, N., Bayry, J., Lacroix-Desmazes, S., Kazatchkine, M.D. & Kaveri, S.V. Cutting Edge: Human CD4+CD25+ T Cells Restrain the Maturation and Antigen-Presenting Function of Dendritic Cells. *J Immunol* **172**, 4676-4680 (2004).
52. Miura, Y. *et al.* Association of Foxp3 regulatory gene expression with graft-versus-host disease. *Blood* 2004-03 (2004).
53. Morgan, M.E. *et al.* Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4(+)CD25(+) T regulatory cells in humans. *Hum. Immunol* **66**, 13-20 (2005).
54. Mueller, D.L. E3 ubiquitin ligases as T cell anergy factors. *Nat Immunol* **5**, 883-890 (2004).
55. Ochs, H.D., Ziegler, S.F. & Torgerson, T.R. FOXP3 acts as a rheostat of the immune response. *Immunol Rev.* **203**, 156-164 (2005).
56. Piccirillo, C.A. *et al.* CD4+CD25+ Regulatory T Cells Can Mediate Suppressor Function in the Absence of Transforming Growth Factor {beta}1 Production and Responsiveness. *J. Exp. Med.* **196**, 237-246 (2002).

57. Raasi,S., Schmidtke,G. & Groettrup,M. The Ubiquitin-like Protein FAT10 Forms Covalent Conjugates and Induces Apoptosis. *J. Biol. Chem.* **276**, 35334-35343 (2001).
58. Roncador,G. *et al.* Analysis of FOXP3 protein expression in human CD4(+)CD25(+) regulatory T cells at the single-cell level. *Eur J Immunol* (2005).
59. Sakaguchi,S., Sakaguchi,N., Asano,M., Itoh,M. & Toda,M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* **155**, 1151-1164 (1995).
60. Saverino,D. *et al.* Dual Effect of CD85/Leukocyte Ig-Like Receptor-1/Ig-Like Transcript 2 and CD152 (CTLA-4) on Cytokine Production by Antigen-Stimulated Human T Cells. *J Immunol* **168**, 207-215 (2002).
61. Schramm,C. *et al.* TGF{beta} regulates the CD4+CD25+ T-cell pool and the expression of Foxp3 in vivo. *Int. Immunol.* **16**, 1241-1249 (2004).
62. Schubert,L.A., Jeffery,E., Zhang,Y., Ramsdell,F. & Ziegler,S.F. Scurfin (FOXP3) acts as a repressor of transcription and regulates T cell activation. *J. Biol. Chem.* **276**, 37672-37679 (2001).
63. Shimizu,J., Yamazaki,S., Takahashi,T., Ishida,Y. & Sakaguchi,S. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat. Immunol.* **3**, 135-142 (2002).
64. Skapenko,A. *et al.* GATA-3 in Human T Cell Helper Type 2 Development. *J Exp. Med.* **199**, 423-428 (2004).
65. Stassen,M. *et al.* Human CD25+ regulatory T cells: two subsets defined by the integrins alpha4beta7 or alpha4beta1 confer distinct suppressive properties upon CD4+ T helper cells. *Eur. J Immunol* **34**, 1303-1311 (2004).
66. Sturn,A., Quackenbush,J. & Trajanoski,Z. Genesis: cluster analysis of microarray data. *Bioinformatics.* **18**, 207-208 (2002).
67. Sugiyama,H. *et al.* Dysfunctional Blood and Target Tissue CD4+CD25high Regulatory T Cells in Psoriasis: Mechanism Underlying Unrestrained Pathogenic Effector T Cell Proliferation. *J Immunol* **174**, 164-173 (2005).
68. Suri-Payer,E. & Cantor,H. Differential cytokine requirements for regulation of autoimmune gastritis and colitis by CD4(+)CD25(+) T cells. *J Autoimmun.* **16**, 115-123 (2001).
69. Taams,L.S. *et al.* Human anergic/suppressive CD4(+)CD25(+) T cells: a highly differentiated and apoptosis-prone population. *Eur. J Immunol* **31**, 1122-1131 (2001).
70. Takahashi,S. *et al.* In vivo overexpression of CTLA-4 suppresses lymphoproliferative diseases and thymic negative selection. *Eur. J Immunol* **35**, 399-407 (2005).

71. Thornton, A.M., Piccirillo, C.A. & Shevach, E.M. Activation requirements for the induction of CD4+CD25+ T cell suppressor function. *Eur. J Immunol* **34**, 366-376 (2004).
72. Vieira, P.L. *et al.* IL-10-Secreting Regulatory T Cells Do Not Express Foxp3 but Have Comparable Regulatory Function to Naturally Occurring CD4+CD25+ Regulatory T Cells. *J Immunol* **172**, 5986-5993 (2004).
73. Vigiotta, 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**, 971-979 (2004).
74. Viguier, M. *et al.* Foxp3 Expressing CD4+CD25high Regulatory T Cells Are Overrepresented in Human Metastatic Melanoma Lymph Nodes and Inhibit the Function of Infiltrating T Cells. *J Immunol* **173**, 1444-1453 (2004).
75. von Boehmer, H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat Immunol* **6**, 338-344 (2005).
76. Walker, L.S., Chodos, A., Eggens, M., Dooks, H. & Abbas, A.K. Antigen-dependent proliferation of CD4+ CD25+ regulatory T cells in vivo. *J. Exp. Med.* **198**, 249-258 (2003).
77. Walker, R. *et al.* Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+. *J. Clin. Invest* **112**, 1437-1443 (2003).
78. Wang, B., Lin, D., Li, C. & Tucker, P. Multiple domains define the expression and regulatory properties of Foxp1 forkhead transcriptional repressors. *J Biol. Chem.* **278**, 24259-24268 (2003).
79. Wickelgren, I. IMMUNOLOGY: Policing the Immune System. *Science* **306**, 596-599 (2004).
80. Wood, K.J. & Sakaguchi, S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 199-210 (2003).
81. Yagi, H. *et al.* Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int. Immunol.* **16**, 1643-1656 (2004).
82. Yamazaki, S. *et al.* Direct expansion of functional CD25+ CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *J. Exp. Med.* **198**, 235-247 (2003).
83. Zelenay, S. *et al.* Foxp3+. *Proc. Natl Acad Sci U. S. A* **102**, 4091-4096 (2005).
84. Zheng, S.G., Gray, J.D., Ohtsuka, K., Yamagiwa, S. & Horwitz, D.A. Generation ex vivo of TGF-beta-producing regulatory T cells from CD4+CD25- precursors. *J. Immunol.* **169**, 4183-4189 (2002).

Veröffentlichungen

Probst-Kepper, M., H. J. Hecht, H. Herrmann, V. Janke, **F. Ocklenburg**, J. Klemmner, B. J. van den Eynde, and S. Weiss. Conformational restraints and flexibility of 14-meric peptides in complex with HLA-B*3501. *J Immunol* **173**, 5610-5616 (2004).

Danksagung

Der Initiative von Prof. Dr. med. R. Pichlmayr (†), Prof. Dr. med. K. Wonigeit und Prof. Dr. med. J. Klempnauer ist es zu verdanken, dass die Nachwuchsgruppe für Xenotransplantation in der Abteilung Viszeral- und Transplantationschirurgie der Medizinischen Hochschule Hannover durch die Förderung aus Mitteln der *VolkswagenStiftung* ins Leben gerufen wurde.

Der *VolkswagenStiftung* ist für die umfangreiche Förderung sehr herzlich zu danken. Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. M. Probst-Kepper, der in seiner Funktion als Arbeitsgruppenleiter für die Bereitstellung des interessanten Dissertations-Themas, die engagierte praktische und theoretische Betreuung dieser Arbeit und die kritische Durchsicht des Manuskripts verantwortlich ist, sowie Frau Dr. rer. nat. V. Janke für ihre intensive Mithilfe und Unterstützung, die zum Gelingen dieser Arbeit maßgeblich beigetragen hat.

Ich möchte mich sehr herzlich bei Prof. Dr. rer. nat. W. Müller für seine Bereitschaft zur Übernahme des Referats und seine freundliche und kompetente Beratung hinsichtlich der Planung und Durchführung der Promotion bedanken.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. H. Holtmann danke ich für die Übernahme des Korreferats. Mein Dank gilt den Mitarbeitern der GBF, Braunschweig: Dr. rer. nat. H. Hauser und Dr. rer. nat. S. Weiß für die Unterstützung und Ermöglichung der Raumnutzung bei der Durchführung der S2-Arbeiten, Prof. Dr. med. J. Buer und Dr. rer. nat. R. Geffers für die Unterstützung bei den *GeneChip*-Analysen. Weiterhin Dr. rer. nat. L. Gröbe für die Unterstützung bei der Calcium-Messung und Zellsortierung am MoFlo, Dr. med. K.E. Dittmar für seine Unterstützung bei der konfokalen Mikroskopie, MTA T. Töpfer für ihre Unterstützung bei der Durchführung der *RealTime*-RT-PCR, MTA M. Höxter für Zellsortierung am FACS-Vantage, MTA H. Hermann für die Hilfe bei den *WesternBlots*.

Prof. Dr. rer. nat. R. Schwinzer und seinen Mitarbeitern ist zudem für die Nutzungsmöglichkeit des Heißlabors im Rahmen der Tritium-Messungen zu danken. Unserer BTA Frau K. Wagner ist für ihre unermüdliche Mitarbeit im Rahmen dieses Projekts zu danken, sowie Dipl. biol. D. Moharreggh-Khiabani, aus der Arbeitsgruppe Xenotransplantation und Dr. rer. nat. A. Hundrieser aus der Abtlg. für Viszeral- und Transplantationschirurgie, die neben motivierenden kompetenten Kollegen mit der Zeit auch gute Freunde für mich wurden.

Meinen lieben Eltern und Frau R. Söker für Ihre Geduld und Unterstützung, was aufgrund der jahrelangen örtlichen Trennung nicht immer selbstverständlich war. Zuletzt sei meiner lieben Großtante Frau Gertrud Drossel gedankt- sie konnte den Abschluß dieser Arbeit leider nicht mehr miterleben.

Lebenslauf

Angaben zur Person

Name Frank Ocklenburg
Anschrift Richard-Wagner-Str. 2c
28209 Bremen
E-mail frankocklenburg@gmx.de
Geburtsdatum 24. September 1970
Geburtsort Hamburg

Schulbildung

1984 – 1990 Schulzentrum des Sekundarbereichs II,
Horn, Gymnasium; Abschluss: Abitur im Juni 1990

Zivildienst

11/1990 – 02/1991 Tagesstätte für geistig und mehrfach behinderte
Menschen

Berufsausbildung

07/1992 – 07/1994 Ausbildung zum Medizinisch-Technischen-
Laboratoriums-Assistenten (MTLA)

Studium

10/1995 – 09/2001 Studium der Biologie als Diplom-Studiengang
Diplomthema: Identifizierung von Schimmelpilzen über
repetitive DNA-Sequenzen

Promotion

Seit 01.01.2002 Beschäftigung als wissenschaftlicher Mitarbeiter an der
Medizinischen Hochschule in Hannover,
in der Nachwuchsgruppe Xenotransplantation
(Leiter: Dr. med. M. Probst-Kepper)
der Abteilung für Viszeral- und Transplantationschirurgie
(Abtlg.-Leiter: Prof. Dr. med. J. Klempnauer)

Berufserfahrung

03/1995 - 08/1995 Tätigkeit als MTLA in dem medizinischen
Gemeinschaftslabor Drs. Sandkamp/Köster, Bremen

Studienbegleitende Tätigkeiten

08/1995 - 09/2001 Nebentätigkeit im Laborbereich des
Gemeinschaftslabor Drs. Sandkamp/Köster, Bremen

10/1997 - 09/2001 Betreuung von geistig behinderten Menschen in einem
sonderpädagogischen Wohnheim in Bremen

Besondere Kenntnisse

Sprachen Englisch, Spanisch

PC-Kenntnisse Microsoft Office, Vektor-NTI, Genesis⁶⁶

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die dem Fachbereich Biochemie der Universität Hannover vorgelegte Dissertation mit dem Titel

„Bedeutung des Transkriptionsfaktors Foxp3 für die T-Zell-Funktion“

selbständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe, sowie keine anderen als in der Arbeit angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner anderen in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch wurde diese oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Hannover, den 23.5.2005