

Regulation der Expression von FOXP3 in humanen CD4⁺ T-Zellen

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

**Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)**

genehmigte Dissertation
von

Dipl.- Biol. Darius Moharregg-Khiabani
geboren am 30. Mai 1973 in Neustadt am Rbge.

Referat: Prof. Dr. W. Müller

Koreferat: Prof. Dr. B. Otto

Tag der Promotion: 14.03.2008

Zusammenfassung

Natürliche regulatorische CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen sind in der Lage eine überwiegend Zellkontakt-abhängige Suppression von Effektor T-Zellen zu vermitteln, und sind dadurch entscheidend an der Aufrechterhaltung der immunologischen Homöostase beteiligt. Die Entwicklung und Funktion dieser Zellpopulation ist abhängig von dem Transkriptionsfaktor FOXP3. Ein wesentliches Merkmal ist dabei die anhaltend hohe (sustained high) Expression von FOXP3 in T_{reg} Zellen. Die dafür verantwortlichen spezifischen Kontrollmechanismen sind nur wenig bekannt, genauso wie die daran beteiligten Gene und ihre Genprodukte.

In der vorliegenden Dissertation wurde der Einfluss des Toll-ähnlichen Rezeptors *glycoprotein A repetitions predominant* (GARP) oder *Leucin-rich-repeat-containing protein 32 precursor* (LRRC32), des β -Galaktosid-bindenden Galektins LGALS3 (*lectin, galactoside-binding, soluble, 3*) und der Cystein-Protease Legumain (LGMN) auf die Funktion von humanen CD4⁺ T Helfer (T_h) Zellen untersucht. Im Mittelpunkt steht hierbei der modulierende Einfluss dieser Genprodukte auf die FOXP3-Expression und Funktion. Dafür wurde ein System der retroviralen Überexpression der zu untersuchenden Gene in CD4⁺ T_h-Zellen etabliert und diese phänotypisch auf Veränderungen von Proteinen, z.B. Oberflächenproteine, funktionelle Unterschiede in den Hemmeigenschaften und/oder Einschränkungen in ihrer Proliferation oder Zytokin-Freisetzung sowie transkriptionelle Veränderungen untersucht.

Nach der retroviralen Überexpression von GARP in CD4⁺ T_h- Zellen zeigten diese Zellen in Proliferation und Hemmassays einen regulatorischen Phänotyp. Sie wuchsen nicht mehr durch alleinige T-Zell-Rezeptor Stimulation ohne die Zugabe von exogenen IL-2 und hemmten darüber hinaus die Proliferation von allo-stimulierten T_h-Zellen. Außerdem zeigten sie eine erhöhte Expression von T_{reg} spezifischen Markern, wie CD25, GITR, LGALS3, LGMN und CTLA-4, im Verhältnis zu nicht regulatorischen CD4⁺ T_h-Zellen. Die Übereinstimmung war besser als bei FOXP3 transduzierten CD4⁺ T_h-Zellen. In den mit FOXP3 transduzierten T_h- Zellen war wiederum GARP auch hoch reguliert, was auf einen sich gegenseitig verstärkenden Kreislauf schließen lässt. In jeden Fall ist GARP bedeutend an der Regulation der FOXP3 Expression beteiligt und steuert so direkt den regulatorischen Phänotyp. Die Transduktion von T_h-Zellen mit LGALS3 und LGMN führte zu einer erhöhten FOXP3 und GARP Expression, es wurden jedoch keine regulatorischen Eigenschaften induziert und das Expressionmuster von Treg-Markern war ebenfalls geringer ausgeprägt im Vergleich mit GARP oder FOXP3 transduzierten T_h-Zellen.

Schlagerworte: Regulatorische T-Zellen, FOXP3, GARP

Abstract

Naturally occurring regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells (T_{reg}) are able to induce a predominantly cell contact dependent suppressor function in effector T-cells and play an essential role in the maintenance of the immune homeostasis. The development and function of this cell population depends solely on the transcription factor FOXP3. The main characteristic is the sustained high expression of FOXP3 in T_{reg}. The responsible specific control mechanisms are unknown as are the genes and gene products involved.

In the present dissertation we investigated the influence of the Toll-like receptor *glycoprotein A repetitions predominant* (GARP) or *Leucin-rich-repeat-containig protein 32 precursor* (LRRC32), the *lectin galactoside-binding soluble 3* (LGALS3) and the *cysteine protease legumain* (LGMN) of their impact on the function of human CD4⁺ helper cells (T_h). The central point is the modulation impact of this gene products on the FOXP3 expression and function. We therefore established a system of retroviral overexpression of the above mentioned genes in CD4⁺ T_h-cells. We used this cell lines for investigations of differences in protein expression, e.g. surface proteins, functional differences like suppressor functions, and/or reduction of proliferation, secretion of cytokines and transcriptional changes.

After retroviral overexpression of GARP, the CD4⁺ T_h-cells displays a regulatory phenotype in proliferation and suppressor assays. They didn't grow after T-cell receptor stimulation without additionally exogenous IL-2 and they suppress the proliferation of allo-stimulated T_h-cells. Also they showed an increased expression of T_{reg} specific makers such as CD25, GITR, LGALS3, LGMN and CTLA-4 compared to non-regulating T-cells. The compliance was even stronger than in with FOXP3 transduced CD4⁺ T_h-cells. Besides, FOXP3 transduced T_h-cells, showed an increase of GARP expression, which could imply an self intensifying feed-forward loop. By all means GARP is strongly involved in the regulation of the expression of FOXP3 and controls directly the regulatory phenotype. Although transduction of LGALS3 and LGMN leads to a stronger expression of FOXP3 and GARP, we couldn't monitor induced suppressive characteristics. Also we measured a decreased expression level of of T_{reg} specific makers compared to the expression in GARP or FOXP3 transduced T_h-cells.

Keyword: Regulatory T cells, FOXP3, GARP

Inhaltsverzeichnis:

Zusammenfassung

Abstract

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Zielsetzung der Arbeit

1.	Einleitung	1
1.1	Das spezifische Immunsystem	1
1.2	Regulatorische CD4 ⁺ CD25 ^{hi} T-Zellen	2
1.3.	Transkriptionsfaktoren der FOX-Familie	4
1.4	Der Transkriptionsfaktor FOXP3	4
1.5	GARP (<i>glycoprotein-A repetitions predominant</i>)	6
1.6	LGALS3 (<i>Lectin, Galaktoside-binding, soluble, 3</i>)	7
1.7	LGMN (<i>Legumain</i>)	8
2.	Material	10
2.1	Versuchsorganismen	10
2.1.1	Bakterienstämme	10
2.1.2	Zelllinien	10
2.1.3	Humane T-Zellen	10
2.2	Kulturmedien	10
2.2.1	Kulturmedien und Zusätze für Bakterien	10
2.2.2	Kulturmedium und Zusätze für Zellkultur	11
2.3	Antikörper	11
2.3.1	Antikörper für FACS-Analysen humaner T-Zellen	11
2.3.2	Antikörper zur Stimulation humaner T-Zellen	12
2.4	Primer	12
2.4.1	Primer Semiquantitative PCR	12
2.4.2	Primer Klonierungen	13
2.4.3	Primer für <i>RealTime</i> RT-PCR	14
2.5	Chemikalien	15
2.6	Verbrauchsmaterial	17
2.7	Geräte	17
2.8	Kit's	17

2.9	Restriktionsenzyme	19
2.10	Vektoren	19
2.11	cDNA	19
3.	Methoden	21
3.1	Medien und Zellen	21
3.1.1	Medien und Kultivierungsbedingungen	21
3.1.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen	21
3.1.3	Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung	21
3.2	Zellisolationstechniken	22
3.2.1	<i>Ficoll-Hypaque</i> -Gradientenzentrifugation	22
3.2.2	MACS-Zell-Separation	22
3.2.3	Zellsortieren	23
3.3	Kultivierung der T-Zellen	23
3.3.1	Kultivierung von humanen CD4 ⁺ -T-Zellen	23
3.3.2	Kultivierung der Maus-Hybridom-Zellen	23
3.3.3	T-Zell Funktions-Assays	24
3.3.4	Proliferationsbestimmungen	24
3.4	Durchflusszytometrische Analytik (FACS)	25
3.4.1	FACS-Analysen	25
3.5	Quantitative Zytokinbestimmungen von IL-10, IFN- γ	26
3.6	Retroviraler Gentransfer	27
3.6.1	Gentransfer in humane Antigen-spezifische CD4 ⁺ T-Zellen	27
3.6.2	Gentransfer in murine Hybridomzellen	28
3.7.	Molekularbiologische Methoden	28
3.7.1	Arrayanalysen	28
3.7.2	Agarose-Gelelektrophoresen	28
3.7.3	Isolierung von Gesamt-RNA	29
3.7.4	Isolierung von Plasmid-DNA	29
3.7.5	Aufreinigung von DNA	29
3.7.6	Bestimmung von Nukleinsäure mittels Photometers	30
3.7.7	Fällung von RNA	30
3.7.8	Reverse Transkription	31
3.7.9	Polymerasekettenreaktion (PCR)	31

3.7.9.1	Semiquantitative PCR	32
3.7.9.2	Amplifikation mit <i>High Fidelity</i> Pfu-Polymerase	33
3.7.9.3	<i>RealTime</i> RT-PCR	34
3.7.10	Dephosphorylieren von Vektoren	36
3.7.11	Klonierungen	36
3.7.11.1	Ligation in pCR ^R 4.1Blunt-TOPO	36
3.7.11.2	Ligation in andere Vektoren	36
3.7.12	Klonierungsstrategien	37
3.7.12.1	Retrovirale Überexpression	37
3.8	Mikrobiologische Methoden	38
3.8.1	Transformationen	38
3.8.2	Animpfen von Flüssigkeitskulturen	38
3.8.3	Herstellen von Bakterienstocks	39
3.8.4	Transfektionen	39
3.8.4.1	Transfektion der Verpackungszellen PT67 und GPE86 ⁺	39
3.8.4.2	Transiente Transfektion mit DEAE-Dextran	40
4.	Ergebnisse	41
4.1	Verifizierung der Chip-Analysen	41
4.2	Kontrolle der Transduktionseffizienz nach Re-Expansion 2 bis 3 Wochen	
	Post-Sort	41
4.3	Vergleichende funktionelle Tests von T _h GARP, T _h LGALS3, T _h LGMN, T _h FOXP3 und T _h GFP	43
4.4	Zellkontaktabhängige Suppressor-Eigenschaft von den transduzierten T _h -Zellen	44
4.5	Expression von Treg spezifischen Markern in T _h GARP, T _h LGALS3, T _h LGMN, T _h FOXP3	45
4.6	LGALS3 als spezifischer Marker für natürliche regulatorische T-Zellen	46
4.7	Untersuchungen der Expression von FOXP3 und CD25 nach Stimulation anti CD3/IL-2	47
4.7.1	Real-Time PCR für IL-2, FOXP3 und GARP nach Stimulation mit anti CD3 und exogenen IL-2	49
4.8	Semiquantitative RT-PCR von FOXP3 regulierten Genen	51
4.9	Zytokin Freisetzung nach Stimulation und exogenem IL-2	52

4.10	Identifizierung weiterer T _{reg} spezifischer Gene	54
4.10.1	Expression von CD27 und CD28 in transduzierten T _h -Zelllinien	54
4.10.2	Semiquantitative RT-PCR der neu identifizierten Gene vor und nach Stimulation mit anti CD3/IL-2	55
4.11	TGF-β1 induziert einen regulatorischen Zelltyp	57
4.11.1	<i>Real-Time</i> PCR für GARP und FOXP3 nach TGFβ-1 Zugabe	57
4.11.2	Semiquantitative RT-PCR von GARP und FOXP3 nach TGF-β1 Zugabe	58
4.11.3	FACS-Analyse der Marker für natürlich vorkommende T _{reg} -Zellen	59
4.11.4	Vergleichende funktionelle Tests auf die hemmende Wirkung von TGFβ-1	60
5.	Diskussion	61
5.1	Generierung eines System der retroviralen Überexpression in allo-reaktiven CD4 ⁺ -T _h -Zellen	62
5.1.1	Funktionelle Untersuchungen der Transduzierten CD4 ⁺ -T _h -Zellen	62
5.1.2	Analyse des Expressionsmuster Treg spezifischer Marker	64
5.1.3	Untersuchungen über die trankriptionelle Kontrolle der transduzierten Gene mittels Real-Time und semiquantitative RT-PCR	64
5.1.4	Das Zytokinprofil der transduzierten T _h -Zellen	65
5.2	Differentielle Untersuchungen weiterer Treg spezifischer Gene	65
5.3	Untersuchungen über die Wirkung von TFGβ-1 auf FOXP3 und GARP	66
6.	Literatur	68
7.	Veröffentlichungen	75
8.	Abbildungsverzeichnis	76
9.	Tabellenverzeichnis	77

10. Lebenslauf	78
11. Danksagung	80
12. Eidesstattliche Erklärung	81

Abkürzungsverzeichnis

A	Purinbase Adenin
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
Aq. Bidest	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
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	Fötales Kälberserum
FL	<i>Firefly</i> Luciferase
FOXP3	Forkhead box P3
G	Purinbase Guanin
g	Gramm, Erdbeschleunigung
GARP	<i>glycoprotein A repetitions predominant</i>
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HE	Haematoxylin
HO	Hämoxigenase
H ₂ O	Wasser
IFN- γ	Interferon gamma
IL-2	Interleukin 2
IL-4	Interleukin 4
IL-5	Interleukin 5
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
LGMN	<i>Legumain</i>
LGALS3	<i>Lectin, Galaktoside-binding, soluble, 3</i>
M	Molar
m	milli-
mA	Milliampere
Mb	Megabasenpaare
mg	Milligramm
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
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</i> Variante 1
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
sog.	so genannt
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'-Tetramethyldiamin

TE	Tris-EDTA-Puffer
TGFβ1	Transforming growth factor β1
T _h	CD4 ⁺ T-Helfer Zellen
T _h FOXP3	T _h -Zellen transduziert mit dem Gen für FOXP3
T _h GARP	T _h -Zellen transduziert mit dem Gen für GARP
T _h GFP	T _h -Kontrollzellen nur mit GFP transduziert
T _h LGALS3	T _h -Zellen transduziert mit dem Gen für LGALS
T _h LGMN	T _h -Zellen transduziert mit dem Gen für LGMN
T _{reg}	CD4 ⁺ CD25 ^{high} abgeleitete regulatorische T-Zellen
Tris	Trishydroxyethylamin
U	Unit
UBD	Ubiquitin D
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

Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit soll der Einfluss des Toll-ähnlichen Rezeptors *glycoprotein A repetitions predominant* (GARP) oder *Leucin-rich-repeat-containig protein 32 precursor* (LRR32), des β -Galaktosid-bindenden Galektins LGALS3 (*lectin, galactoside-binding, soluble, 3*) und der Cystein-Protease Legumain (LGMN) auf die Funktion von humanen CD4⁺ T Helfer (T_h) Zellen untersucht werden. Im Mittelpunkt steht hierbei der modulierende Einfluss dieser Genprodukte auf die FOXP3-Expression und -Funktion. FOXP3 ist ein transkriptioneller Modulator aus der Familie der Forkhead/Winged Helix-Transkriptionsfaktoren, welcher die Entwicklung und Funktion von regulatorischen CD4⁺CD25^{hi} T-Zellen (T_{reg}) maßgeblich bestimmt¹. Alle drei Genprodukte, GARP, LGALS3 und LGMN, wurden durch Gen-Chip-Analysen in humanen CD4⁺CD25^{hi} T_{reg}-Zellen und FOXP3-transduzierten T_h-Zellen als mögliche FOXP3-abhängige Gene identifiziert². Daher stellen GARP, LGALS3 und LGMN interessante Zielgene mit potentieller Bedeutung für die FOXP3-abhängige Genregulation und damit für den regulatorischen Phänotyp von T_{reg}-Zellen dar. Regulatorische CD4⁺CD25^{hi} T-Zellen stellen eine kleine Subpopulation von 1% bis 3% der humanen CD4⁺ T-Zellen mit entscheidender Bedeutung für die Aufrechterhaltung der immunologischen Homöostase dar³. Funktionell zeichnen sich CD4⁺CD25^{hi} T_{reg}-Zellen durch eine Interleukin-2 (IL-2) abhängige, eingeschränkte Proliferation aus (Anergie). Weiterhin führt die T-Zell-Rezeptor-Stimulation von CD4⁺CD25^{hi} T_{reg}-Zellen zur Aktivierung einer überwiegend Zell-Zell-Kontakt-abhängigen Hemmung von Effektor-T-Zellen. Die Bedeutung von FOXP3 für die Entwicklung und Funktion von CD4⁺CD25^{hi} T_{reg}-Zellen sowie die periphere, immunologische Homöostase wird durch den angeborenen Immundefekt bei Mutationen im FOXP3-Gen deutlich⁴. Solche Patienten weisen eine generalisierte Autoimmunität (IPEX, immune dysregulation, polyendocrinopathy X-linked) auf. Darüber hinaus wurde in den letzten Jahren ein Zusammenhang von CD4⁺CD25^{hi} T_{reg}-Zellen und verschiedensten Erkrankungsprozessen wie Tumorerkrankungen, Infektionen, Allergien, Transplantatabstoßung und *graft versus host disease* (GVHD) aufgezeigt⁵⁻¹². Dies führte zu klinischen Konzepten einer T_{reg}-Zell-Therapie zur Behandlung von Autoimmunität, Transplantat-Toleranz, Tumorerkrankungen und chronischen Infektionserkrankungen. Um diesen Mechanismus zu verstehen werden FOXP3, GARP, LGALS3 und LGMN retroviral in humane, nicht-regulatorische, allo-reaktive CD4⁺ T_h-Zellen transduziert. Anschließend werden phänotypische Veränderungen von Proteinen, z.B. Oberflächenproteine durch FACS-Analyse, funktionelle Unterschiede in den Hemmeigenschaften und/oder Einschränkungen der

Proliferation (Anergie) und Zytokin-Freisetzung sowie transkriptionelle Veränderungen durch quantitative Polymerase-Ketten-Reaktionen untersucht. Ziel dabei ist, FOXP3 spezifische Kontrollmechanismen in der für den regulatorischen Phänotyp entscheidenden gleichmäßig hohen (sustained high) Expressionsmuster von FOXP3 zu finden¹³ und so ein besseres Verständnis über die FOXP3-Regulation und der der FOXP3 abhängigen Gene in natürlichen regulatorischen T-Zellen zu bekommen.

1. Einleitung

1.1 Das spezifische Immunsystem

Die Funktion des spezifischen Immunsystems ist die Unterscheidung zwischen „fremd“ und „selbst“ zur Abwehr von äußeren, potentiell gefährlichen, sog. Umweltantigenen und die Bildung eines spezifischen immunologischen Gedächtnisses und die Aufrechterhaltung der immunologischen Homöostase. In diesem System erkennen spezifische T-Zellen mittels ihres T-Zell-Rezeptors (TCR) einen Veränderten Haupthistokompatibilitäts (*major histocompatibility complex*, MHC)-Peptid-Komplexes auf körpereigenen Zellen als „fremd“ und aktivieren daraufhin wiederum Mechanismen zur Deletion dieser Zellen, zum Beispiel mittels Effektor-Zellen z.B. der CD8 zytotoxischen T-Zellen, die gegen diese veränderten körpereigenen Zellen vorgehen und sie zerstören. Dabei unterscheidet man die $CD4^+$ T_H -Zellen, die ein antigenes Peptid im Komplex mit dem MHC-Klasse II-Molekülen erkennen von den cytotoxischen $CD8^+$ T-Zellen, die ein antigenes Peptid im Komplex mit dem MHC-Klasse I-Molekül erkennen. MHC-Klasse I-Moleküle nehmen überwiegend Peptide von Proteinen auf, die im Zytosol z.B. bei einer Virusinfektion synthetisiert werden, und MHC-Klasse II-Moleküle binden überwiegend Peptide von exogenen Proteinen, welche z.B. mittels Phagocytose durch Antigen-Präsentierende Zellen aufgenommen wurden. Innerhalb dieses Systems bedeutet Fremderkennung immer „verändertes Selbst“. Darum benötigt das System ein enges und sehr effektives Kontrollsystem, da bei einer fehlerhaften Aktivierung immer eigenes Gewebe geschädigt werden würde. Dieses Kontrollsystem beginnt bei der Entwicklung der T-Zellen im Thymus durch die Mechanismen der positiven und negativen Selektion. Das Thymusepithel spielt hierbei eine wichtige Rolle bei der Selektion des T-Zell Rezeptor Repertoires. Das Gen AIRE (autoimmune regulator) gewährleistet, dass körpereigene Differenzierungsantigene aus unterschiedlichsten Organen im Thymusepithel expremiert werden, wie z.B. aus den pankreatischen β -Zellen. Positive Selektion bedeutet, dass ein T-Zell Rezeptor ein eigenes MHC Molekül erkennt, aber keine Selbstreaktivität ggf. im Thymusepithel expremierte Selbstantigene aufweist. Negative Selektion dagegen bedeutet, dass potentiell selbsreaktive T-Zellen über ihren TCR nicht die positiven Signale zur Weiterentwicklung erhalten, sondern durch Apoptose sterben. So werden fast alle T-Zellen eliminiert, die eine zu hohe Affinität gegenüber dem Selbst-MHC entwickeln und somit potentiell autoreaktiv sind. Durch diese sehr stringente Selektion von T-Zellen werden mehr

als 95% der sich im Thymus entwickelten T-Zellen eliminiert. Dies bezeichnet man als „zentrale Toleranz“, d.h. bevor T-Zellen den Thymus als naive T-Zellen verlassen. Da diese Mechanismen aber nicht vollständig sicher sind, existieren mehrere weitere Kontrollmechanismen, welche potentiell Selbst-reaktive T-Zellen, die durch die Thymuskontrolle „hindurchgerutscht“ sind, zu kontrollieren. Diese Mechanismen grenzt man daher als „periphere Toleranz“ ab. In diesem Zusammenhang spielen regulatorische $CD4^+CD25^{hi}$ T-Zellen eine zentrale Rolle.

1.2 Regulatorische $CD4^+CD25^{hi}$ T-Zellen

Vor etwa dreißig Jahren wurde die Theorie einer Population von Suppressor- Zellen entwickelt¹⁴. Es konnte zur damaligen Zeit die diesem suppressiven Phänotyp zugeordneten Mechanismen weder molekularbiologisch noch biochemisch erklärt werden. Auch war es nicht möglich, die entsprechende Lymphozytenpopulation näher zu charakterisieren. Ein erster Hinweis auf den Ursprung der gesuchten Zellen ergab sich aus der Beobachtung, dass bis Tag 3 postnatal thymektomierte Mäuse schwere Autoimmunerkrankungen wie Gastritis, Thyroiditis und Diabetes entwickelten. Dadurch vermutete man den Thymus als wahrscheinlichsten Ursprungsort dieser Suppressor-Zellen. Später konnten die $CD4^+$ T-Zellen, die CD25 (Interleukin-2-Rezeptor-alpha-Kette) konstitutiv Expremieren, für diesen Thymus abhängigen Effekt verantwortlich gemacht werden¹⁵⁻¹⁷. Danach dauerte es noch etwa zehn Jahre, bis der Transkriptionsfaktor FOXP3 identifiziert wurde, der wesentlich für die Entwicklung und Funktion dieser natürlich vorkommenden regulatorischen $CD4^+CD25^+$ T-Zellen beim Menschen ist. Außer der schon genannten Suppressor-Funktion der $CD4^+CD25^+$ regulatorischen T-Zellen, ist eines der wichtigsten Merkmale ihre eingeschränkte Proliferation auf alleinigen T-Zell Rezeptor Stimulus ohne exogenes IL2 (Anergie) *in vitro*. Allerdings gilt diese Beobachtung nur *in vitro*, da eine klonale Expansion von $CD4^+CD25^+$ -T-Zellen nach Antigen-Stimulation *in vivo* gezeigt werden konnte. Neben den *natürlich* vorkommenden regulatorischen $CD4^+CD25^+$ T-Zellen gibt es noch weitere Subtypen, die suppressive Eigenschaften besitzen und die z.T. nicht abhängig von FOXP3 sind. Zu ihnen zählen die *regulatorische* T_H3 T-Zellen, welche durch orale Zufuhr eines Antigens induziert werden können¹⁸. Diese zeichnen sich durch die Sekretion von TGF β -1, IL-10 und IL-4 aus. Weiter sind *regulatorische* Tr1 T-Zellen gut charakterisiert. Diese entwickeln sich *in viro* mittels IL-10 behandelter, dendritischer Zellen oder durch Zugabe von Vitamin D3/Dexamethason¹⁹. Tr1-Zellen können jedoch auch durch $CD4^+CD25^+$ -T-Zellen induziert werden²⁰. Dies ist eine

mögliche Erklärung für das Phänomen der infektiösen Toleranz. Dabei können regulatorische T-Zellen mit bestimmter Antigen-Spezifität wiederum andere regulatorische T-Zellen verschiedener Spezifitäten aktivieren. Neben diesen T-Zellen gibt es noch $CD8^+CD28^-$ T-Zellen die, zumindest beim Menschen, FOXP3 exprimieren, NK T-Zellen und $CD4^-CD8^-$ -T-Zellen, die ebenfalls einen suppressiven Phänotyp besitzen²¹. Im Focus dieser Arbeit stehen die *natürlich* vorkommenden regulatorischen $CD4^+CD25^{hi}$ T-Zellen. Im peripheren Blut von Menschen repräsentieren diese einen Anteil von 1-3% der $CD4^+$ T-Zellen. Dabei sind diese im Gegensatz zu den Mäusen nur in der $CD25^{high}$ -Fraktion der $CD25$ positiven Zellen zu finden. Sie exprimieren immunsuppressive Zytokine wie IL-10 und TGF- β -1, aber keine Effektor Zytokine wie IL2 oder IFN- γ ²². Daneben spielt CTLA4 aus der Familie, der CD28-Moleküle eine wichtige Rolle bei der Modulation und als Mediator von regulatorischen Funktionen. Der Verlust von CTLA4 unterbindet aber nicht die Entwicklung und die Funktion der natürlichen $CD4^+CD25^+$ T-Zellen, da diese durch die Zytokine IL-10 und TGF- β -1 kompensiert werden kann²³. Weiterhin zeigen *in vitro* humane $CTLA4^+CD4^+CD25^+$ -T-Zellen eine bessere suppressive Fähigkeit als die $CTLA4^-CD4^+CD25^+$ -T-Zellen. Außerdem ist die Expression von FOXP3 einer der charakteristischen Faktoren von natürlich vorkommenden regulatorischen T-Zellen. Neben der FOXP3-abhängigen Entwicklung im Thymus ist auch ein alternativer Weg beschrieben, bei dem es zu einer auch FOXP3-gesteuerten Transformation von peripheren $CD4^+CD25^-$ -T-Zellen zu regulatorischen T-Zellen kommt. Die wichtige Rolle, die FOXP3 bei der Entwicklung und Funktion von regulatorischen $CD4^+CD25^+$ T-Zellen spielt, und die daraus resultierende, klinische Bedeutung wird klar, wenn man die Situation von Menschen betrachtet, bei denen das FOXP3-Genprodukt fehlt oder nicht richtig funktioniert. Dabei unterscheidet man zwischen Mutationen im FOXP3-Gen, die ein Totalausfall von FOXP3 hervorrufen und Mutationen in der leucin-zipper Region, was die Protein-Protein Wechselwirkungen einschränkt und damit die Funktion als Transkriptionsfaktor beeinflusst²⁴. Der Totalausfall führt bei Menschen zum Verlust der regulatorischen $CD4^+CD25^+$ T-Zellen, was einen letalen Immundefekt mit multiplen Autoimmunkrankheiten (IPEX-Syndrom) bewirkt^{25,26}.

Die weitere klinische Relevanz einer veränderten Anzahl oder veränderten Suppressorfunktionen von regulatorischen $CD4^+CD25^+$ -T-Zellen wurde bereits in einem kausalen Zusammenhang mit verschiedenen Erkrankungen beschrieben. Zu diesen zählen neben Tumorerkrankungen wie dem Morbus Hodgkin und dem malignen Melanom auch Autoimmunkrankheiten wie das autoimmun-polyglanduläre Syndrom II, Multiple Sklerose, Myasthenia Gravis, Diabetis mellitus, Psoriasis und die *Graft versus Host*-Erkrankung²⁷⁻³⁵.

Somit ist die voranschreitende Analyse des Transkriptionsfaktors FOXP3 ein entscheidender Faktor zum besseren Verständnis der Entwicklung und Funktion von regulatorischen CD4⁺CD25⁺T-Zellen.

1.3 Transkriptionsfaktoren der FOX-Familie

Die forkhead-Proteine stellen eine eigene, hoch konservierte Familie von Transkriptionsfaktoren dar, die eine wichtige Rolle bei einer Vielzahl von zellulären Differenzierungsprozessen steuern³⁶. Benannt wurde diese Familie ursprünglich nach dem forkhead-Genprodukt *fkh* der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*, welches für die terminale Musterausbildung in der Embryonalentwicklung verantwortlich ist^{37,38}. Bis heute wurden über 100 forkhead-Gene in einer Vielzahl von Spezies gefunden, die alle eine konservierte DNS-bindende Domäne besitzen. Es steigt die Anzahl von *forkhead*-Genen mit zunehmender anatomischer Komplexität von 4 bekannten Mitgliedern bei der Bierhefe *Saccharomyces cerevisiae* auf über 35 bei Menschen und Mäusen³⁹. Bei Untersuchungen der Kristallstruktur eines Fox-Proteins wurde die DNS-bindende sog. *forkhead*-Domäne als *winged helix*-Struktur beschrieben. Der Namen leitet sich von ihrer dreidimensionalen Form ab, die als schmetterlingsartige, zweiflügelige Struktur beschrieben wird. Daran schließen sich drei α -helikale und drei β -Strukturen an, die gemeinsam mit „Flügeln“ (W) die *winged helix*-Struktur bilden. Dabei gilt, dass diese Struktur sich aus C1- β 1 α 2- α 3- β 2 W1- β 3-W2 zusammensetzt. Unterschiede zwischen den einzelnen Mitgliedern der Familie gibt es durch zusätzliche α -Helices und/oder fehlende β -„Flügel“. Zudem konzentriert sich die Variabilität auf die „Flügel“ zwischen dem zweiten und dritten Helice, welche auch für die größten strukturellen Unterschiede verantwortlich sind. Den höchsten Grad an Konservierung auf dem Niveau der Aminosäuren gibt es in der dritten Helix^{40,41}.

1.4 Der Transkriptionsfaktor FOXP3

Bei dem Transkriptionsfaktor FOXP3, bei dem es eine große Sequenzhomologie zwischen Mensch, Maus und Ratte gibt, ist die *Forkhead*-Domäne in Gegensatz zu anderen Mitgliedern der Fox-Familie am C-terminalen Ende lokalisiert⁴². Vor der *Forkhead*-Domäne, befindet sich ein *coiled-coil-leucin-zipper-Motif* und davor eine Zinkfingerdomäne. Dies könnte einer der Gründe sein, weshalb es bei FOXP3 keine Transaktivierungsdomäne gibt. Einen Hinweis auf seine Funktion ergaben funktionelle Untersuchungen, die zeigten, dass FOXP3 als

transkriptioneller Repressor fungiert, der die Expression von Zytokinen wie IL-2 unterdrückt^{43,44}. Die bisherigen Untersuchungen zeigen, dass FOXP3 DNS-Sequenzen in den Promotorregionen der Interleukine bindet und dort als transkriptioneller Repressor die induzierte Zytokintranskription von NFAT und NFκB verhindert⁴⁵. Außerdem besitzt FOXP3 die Fähigkeit mit anderen Mitgliedern der Fox-Familie über das *coiled-coil-leucin-zipper-Motif* zu binden und kann außerdem mit Proteinen wie NFAT und NFκB direkt interagieren. NFAT aktiviert dabei die Expression von FOXP3 und reguliert die Expression von IL2⁴⁶. Die bis heute postulierte Hauptfunktion von FOXP3 ist die eines Lienen-Spezifizierungsmarkers bzw. Differenzierungsfaktors von natürlich vorkommenden, Regulatorischen CD4⁺CD25⁺-T-Zellen. Dies konnte sowohl durch Mutationen im humanen FOXP3-Gen (IPEX-Syndrom) als auch bei *knock-out* Mäusen (*scurfy*) gezeigt werden⁴⁷⁻⁵⁰. Dabei gilt jedoch, dass FOXP3 nicht wie bisher beschrieben- einen „Marker“ für natürlich vorkommende, humane, regulatorische CD4⁺CD25⁺-T-Zellen darstellt⁵¹. Belegt werden konnte dies durch die Beobachtung, dass FOXP3 beim Menschen auch in aktivierten, nicht regulatorischen Effektor CD4⁺ T-Zellen nach T-Zell Rezeptor Stimulation heraufreguliert wird^{4,52}. Dabei werden aber nicht die Expressionsstärken regulatorischen T-Zellen erreicht, wodurch sich zumindest teilweise eine fehlende Beeinträchtigung der Effektorzytokinproduktion in solchen Effektor T-Zellen erklären lässt. Diese produzieren IL2, da wahrscheinlich der „threshold“ von FOXP3 nicht erreicht wird. In diesen Fällen ist noch zu klären, ob diese geringe Expression von FOXP3 eine tatsächliche Funktion ausübt und wie diese sich darstellt. Im Gegensatz dazu, ist FOXP3 bei Mäusen ein spezifischer Marker für regulatorische T-Zellen. Beim Menschen hingegen hat FOXP3 einen aktivierenden Effekt auf Gene wie CTLA4, GITR und CD25⁵³, die bei der Suche nach spezifischen Genen von regulatorischen T-Zellen beteiligt sind. Zu diesen potentiellen Marker-Genen, die bei Chipanalysen in humanen CD4⁺CD25^{hi}-T_{reg}-Zellen und FOXP3-transduzierten T_h-Zellen bestimmt wurden, zählen neben den genannten CD25 und CTLA4 (Maus) auch Gene wie GARP (*glycoprotein-A repetitions predominant*), LGALS3 (*Lectin, Galaktoside-binding, soluble, 3*) und LGMN (*Legumain*)^{2,54}.

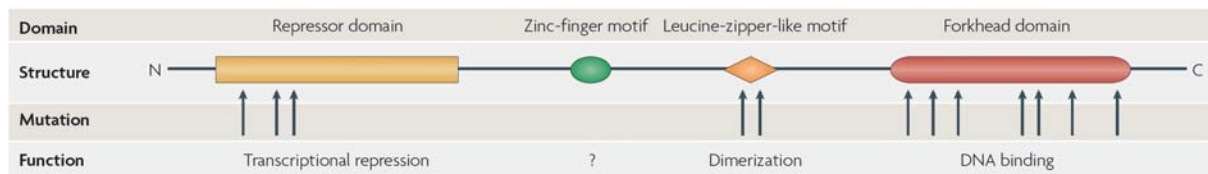


Abb. 1: Funktionelle Domänen von FOXP3. Dargestellt sind die Domänen und ihre Funktion, außerdem Mutationen die in Patienten mit IPEX-Syndrom gefunden wurden (aus ⁵⁵)

1.5 GARP (*glycoprotein-A repetitions predominant*)

Bei GARP handelt es sich um ein Mitglied der Leucin-rich Repeat-containing Proteine. Es liegt in der 11q14-Region auf dem 11-ten Chromosom und besteht aus drei Exons. Diese bilden zwei Transkripte mit 4,4 und 2,8 Kilobasen. Das Gen codiert ein transmembranäres Protein mit 662 Aminosäuren, deren extrazellulärer Teil größtenteils aus 21 Leuzin-reichen Domänen besteht⁵⁶. Das GARP-Protein zeigt damit große strukturelle Homologie mit dem Blutplättchen-Protein GP Ibα oder GP V und Toll-like Rezeptoren⁵⁷. Die Ectodomäne von GARP weist dabei eine große strukturelle Homologie zum humanen Toll-like Rezeptors (TLR-3) auf, dabei lässt sich unter Berücksichtigung der strukturellen Übereinstimmung eine hufeisenförmige Gestalt errechnen. Der größte Teil dieser Struktur ist von Kohlehydraten bedeckt bis auf einen, putativen Glykolyssierungs-freien konvexen Part ähnlich dem TLR3. Dieser Teil könnte eine wichtige Rolle in der Liganten-Bindung und bei der Bildung von Oligomeren spielen. Leuzin-reiche Wiederholungen findet man in einer großen Bandbreite von so unterschiedlichen Spezies wie Hefe und Mensch. Die durchschnittliche Größe einer Leuzin-reichen-Einheit liegt bei 25 Aminosäuren⁵⁸. Sie wird durch eine periodische Verteilung von hydrophoben Aminosäuren wie Leuzin charakterisiert. Diese falten sich in eine amphipathische β-Struktur deren Anzahl von 1 bis 40 Einheiten reichen kann. Proteine, die zur Familie der Leuzin-reichen Wiederholungen gehören, spielen eine wichtige Rolle und übernehmen unterschiedlichsten Aufgaben, bei denen sie oft membrangebunden sind. Zu diesen Aufgaben gehören unter anderen Protein-Protein-Interaktionen z.B. NALP, TLR. Es sind auch Mitglieder bekannt, die sezerniert werden und sowohl im Zytoplasma als auch im Kern gefunden werden. Bei allen Mitgliedern kommt den Leuzin-reichen Strukturen eine entscheidende Funktion bei der Aktivierung von Proteinen zu⁵⁹. Für diese Arbeit erschien die große Homologie von GARP mit den Vertretern der Toll-like Rezeptoren besonders interessant⁶⁰. Es konnte so gezeigt werden, dass die Mitglieder TLR5 und TLR8 eine aktivierende Wirkung auf humane, Regulatorische T-Zellen haben. Dies machte GARP

aufgrund der starken strukturellen Übereinstimmung zu einem interessanten Protein bezüglich seines potentiellen Einflusses und/oder der Kontrolle des regulatorische Phänotyps.

LGALS3 (*Lectin, Galaktoside-binding, soluble, 3*)

LGALS3 gehört zur, bis heute 15 Mitglieder zählende Familie, der β -Galaktoside bindenden Lectine. Diese Familie wird durch ihre Erkennung von β -Galactose und eine übereinstimmende Aminosäuresequenz definiert^{61,62}. Bei LGALS3 handelt es sich um ein 31 kDa schweres Protein dessen Genlocus auf dem 14ten Chromosom in Bereich 14q22.3 liegt. Das Gen selbst ist aus 6 Exons und 4 Introns aufgebaut. Es wird in verschiedensten Gewebe- und Zelltypen exprimiert⁶³⁻⁶⁵. Dort ist es meist im Zytoplasma zu finden. Allerdings wird LGALS3 abhängig von Zelltyp und dessen Proliferationsstatus auch im Kern, auf der Zelloberfläche und sogar im extrazellulären Bereich gefunden^{66,67}. Es wird zusammengesetzt aus einer kleinen, N-terminalen Domäne, welche die innerzellulären Zielstrukturen erkennt, gefolgt von einer repetitiven Kollagen-ähnlichen Struktur, die das Substrat für Matrix-Metalloproteinasen ist, und letztlich eine C-terminale Kohlenhydrat-Erkennungsdomäne⁶⁸. Es ist das das einzige chimäre Galektin dieser Familie⁶⁹. Zu den beschriebenen Aufgaben, die LGALS3 intrazellulär ausübt, gehört die Inhibierung der Apoptose, Steuerung des Zellzyklus, des Zellwachstums und des Überlebens der Zellen⁷⁰. Außerdem ist es beteiligt am prä-m-RNS-splicing⁷¹ und an der Regulation von diversen Genen wie Cyclin D und MUC2⁷². Deren Regulierung steuert LGALS3 über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie NFAT, AP1, SP1 und CREB mittels Protein-Protein-Interaktion⁷³, die wiederum Signalkaskaden innerzellulär verändern können. Daneben kann LGALS3 auch mit der Zelloberfläche und/oder mit der extrazellulären Matrix interagieren. Dies wird jedoch nicht über spezielle Rezeptoren vermittelt, sondern durch Binden an passende Zuckerstrukturen und verschiedene Glycokonjugate⁷⁴. Dadurch moduliert LGALS3 die Zelladhäsion und Zellmigration. Im Immunsystem wird LGALS3 in vielen wichtigen Zelltypen wie Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen, Mastzellen, und Granulozyten. Nach Stimulation auch in CD8 und CD4 T-Zellen⁷⁵. LGALS3 moduliert dort entscheidende Prozesse wie die Thymozyten-Migration, es induziert Immunität gegen bestimmte Formen der Infektion, beeinflusst den Verlauf von Entzündungen und ist beteiligt an der T-Zell-Apoptose. Es bleibt aber zu klären, ob Untersuchungen von LGALS3 auch relevante Informationen zum Verständnis des T_{reg}-Phänotyps beitragen könnten. Einen Hinweis darauf ergab die Beobachtung, dass LGALS3 beim Mensch in regulatorischen CD4⁺CD25^{high}-T-Zellen nach Stimulation mit Antigen stark

exprimiert wurde, aber nur gering in nicht regulatorischen aktivierten naiven CD4⁺CD25⁻ T-Zellen oder Antigen-spezifischen Effektor Th-Zellen beim Menschen⁷⁶. Zumindest an der Suppressor Funktion ist es nicht beteiligt. Somit gilt LGALS3 als ein interessantes Gen bei Untersuchungen zum besseren Verständnis des regulatorischen Phänotyps und als ein potentieller Marker für humane regulatorische CD4⁺CD25^{hi} T-Zellen.

1.6 LGMN (*Legumain*)

Legumain ist eine Cystein-Endopeptidase, deren Funktion die Hydrolyse von Asparagylbindungen ist, weshalb sie auch Asparaginyl-Endopeptidase genannt wird⁷⁷. Die lysosomale Protease gehört zur Familie der C13-Proteasen. Das Legumain-Gen ist auf dem 14. Chromosom lokalisiert in der Region 14q32.1. Es kodiert für ein Protein mit 433 Aminosäuren und einem Gewicht von 49 kDa. Hauptsächlich wird es auf der Zelloberfläche von Makrophagen gefunden und in geringerer Menge in Gewebe von Leber und Niere. Zu seinen Aufgaben gehören die Protein-Degradierung und das Prozessieren von lysosomalen Proteasen⁷⁸. Daneben wurde auch die Aktivierung von Zymogene-Progelatinase-A beschrieben, die eine wichtige Rolle bei der Degradierung der extrazellulären Matrix spielt. Legumain wird oft mit der Tumorbildung in Verbindung gebracht. So wurden hohe Konzentrationen von Legumain in verschiedenen Tumoren, wie Kolon-, Prostata- und Brustkrebs *ex vivo* gemessen. Untersuchungen *in vivo* belegen diese These, da auch hier eine Heraufregulierung von Legumain während der Krebsentwicklung gezeigt werden konnte⁷⁹. Außerdem belegte ein Mausmodell für Kolonkrebs, dass eine erhöhte Legumain Konzentration direkt mit einer erhöhten Migration und Inversion der Tumorzellen korreliert. Gefolgert wurde daraus ein Zusammenhang mit dem Abbau der extrazellulären Matrix durch Legumain⁸⁰. Neuere Untersuchungen bestätigen die Möglichkeit eines prognostischen Potentials von Legumain, da eine direkte Korrelation zwischen erhöhter Konzentration und schlechtem Verlauf der Krankheit, bzw. niedriger Konzentration und einem besseren Verlauf der Krankheit bei Patienten mit Kolonrektalkrebs und Brustkrebs gezeigt werden konnte. Somit kann die Bestimmung der Legumainmenge auch Hilfestellung bei der Vorhersage des Verlaufs einer Krebserkrankung leisten⁸¹. Aus immunologischer Sicht ist bedeutend, dass Legumain an der Antigenprozessierung des MHC-Klasse II beteiligt ist⁸². Neueste Untersuchungen konnten zudem zeigen, dass in mit FOXP3 transduzierten T-Helferzellen Legumain anhaltend und unabhängig von Stimulation mit Antigen hoch reguliert ist wie in Treg Zellen⁸³. Das macht Legumain zu einem interessanten Kandidaten bei der Suche nach

Genen, die, im Rahmen des induzierten regulatorischen/ anergieinduzierten Programs beeinflusst werden bzw. der Kontrolle von FOXP3 als beschriebener/postulierter Masterregulator unterliegen, also downstream von FOXP3 agieren.

2. Material

2.1 Versuchsorganismen

2.1.1 Bakterienstamm

- *Escherichia coli* TOP10 : Klonierungsstamm (Invitrogen)

2.1.2 Zelllinien

- PT67: amphotrope Verpackungszelllinie (zur Verfügung gestellt von Dr. D. Wirth, GBF, Braunschweig)
- GPE86⁺: murine ecotrope Verpackungszelllinie (zur Verfügung gestellt von Dr. S. Weiß, GBF, Braunschweig)
- 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 H₂O, 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-ChromeTM anti-human CD152 (CTLA4), BD, Pharmingen monoclonal, Maus IgG_{2a}, K, cl. BNI3
- CychromeTM Mouse IgG_{2a} K (Isotypkontrolle BD, Pharmingen für anti-human CD152), cl. 6155-178
- PE Anti-Human CD3, monoclonal, BD, Pharmingen Maus IgG_{2a}, K, cl. HIT3a
- FITC anti-human CD4, monoclonal, IgG₁, K, BD, Pharmingen Klon RPA-T4
- PE anti-human CD4, monoclonal, IgG₁, K, BD, Pharmingen Klon RPA-T4
- PE anti-human CD25, monoclonal, IgG₁, K, BD, Pharmingen Klon M-A251
- FITC anti-human CD27, monoclonal, IgG₁, K, BD, Pharmingen cl. M-T271
- PE anti-human CD28, monoclonal, IgG₁, K, BD, Pharmingen cl. CD28.2
- APC anti-human FOXP3, monoclonal, IgG_{2α}, eBioscience Inc. Cl. PCH101

- APC anti-human GITR, monoclonal, IgG₁, K, R&D, Systems Inc. cl. 110416
- PE anti-human LGALS3 monoclonal, IgG₁, K, BD, Pharmingen cl. B2C10
- PE Isotype Mouse monoclonal, IgG₁, K, BD, Pharmingen cl. MOPC-21

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, monoclonal, IgG₁, K, (cl. CD28.2; NA/LE Aufreinigung)

2.4 Primer

2.4.1 Primer semiquantitative PCR (*Hot Start Polymerase, Eppendorf*)

Tabelle 1 : Analysierte Gene in der semiquantitativen PCR

Gen	Oligonukleotide	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
CPE	5'-GGC CAT GTG TGA CCC CAA-3' (s) 5'-GCA ATC TCC AGT AAT CAC CAT CCT-3' (as)	DN991496.1
FOXP3	5'-TCA ACG GTG GAT GCC CAC GC-3' (s) 5'-AGA CTC AGG TTG TGG CGG ATG-3' (as)	NM_014009
GARP	5'-GGC AAT GGC TGG CTG GCA-3' (s) 5'-GGG GCA GGA CTC ACC GCA-3' (as)	NM_005512
HPGD	5'-CGT GAA CGG CAA AGT GGC G-3' (s) 5'-CGC CTT CAC CTC CAT TTT GC-3' (as)	NM_000860.3
IL-2	5'-TGT CTT GCA TTG CAC TAA-3' (s) 5'-GTT GTT TCA GAT CCC TTT-3' (as)	S77834.1
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

IL1R2	5'-AAA TGA CTC TGC TAG GAC GGT CCC-3' (s) 5'-TCT TCC AGG GCC ACA TCG TG-3' (as)	NM_004633
IL7R	5'-AAA GTG CCT GAA TTT CAG G-3' (s) 5'-AAC AGA GCG ACA GAG AAA-3' (as)	NM_002185.2
LGALS3	5'-CCC ATC TTC TGG ACA GCC AAG TGC-3' (s) 5'-GCA TCA TTC ACT GCA ACC-3' (as)	BC001120.1
LGMN	5'-ATC AAC AGG CCC AAT GGC-3' (s) 5'-TTG ATG TTA TCC GGC AGG TG-3' (as)	D55696.1
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

2.4.2 Primer für Klonierung

Tabelle 2: Vollständig amplifizierte Gene für retrovirale Überexpression

Gen	Primersequenz	Genbank
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
GARP	5'-GTG ACT TTG GAG CCA TGA GA-3' (s) 3'-TAT TTC GGA TTT CTT CGG CCC TCT-5' (as)	NM_005512
LGALS3	5'-CAA CGA GCG GAA AAT GGC AG-3' (s) 3'-GAC GGT AAA AGG CGA AC-5'(as)	BC001120.1
LGMN	5'-GGT GCA GAA TGG TTT GGA AAG-3' (s) 3'-GAC TTC TCG ACG GAG GAC-5' (as)	D55696.1

2.4.3 Primer für *Realtime*-RT-PCR

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

Gen	Primersequenz	Genbank
FOXP3	5'-GAA CGC CAT CCG CCA CCT GA-3' (s) 5'-CCC TGC CCC CAC CAC CTC TGC-3' (as)	NM_014009
GARP	5'-GAT GGG GAA ACT GAG GCT TAG GAA-3' (s) 5'-ACC CCC AAT CTC ACC CCA CAA ATA-3' (as)	NM_005512
IL-2	5'-GTC ACA AAC AGT GCA CCT AC-3' (s) 5'-ATG GTT GCT GTC TCA TCA GC-3' (as)	S77834.1
RPS9	5'-CGC AGG CGC AGA CGG TGG AAG-3' (s) 5'-CGA AGG GTC TCC GCG GGG TCA CAT-3' (as)	NM_005214

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 H ₂ O	Gibco, Berlin
DNA-Längenstandart 100 bp	Invitrogen, UK
DNA-Längenstandart 1 kb	Invitrogen, UK
dNTP-Mix 10 mM	Peqlab, UK
dNTP-Mix 2,5 mM	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>Xba I</i>	(10U/μl)	Invitrogen, UK
<i>Xho I</i>	(10U/μl)	Invitrogen, UK

2.10 Vektoren

pcDNA 3 +/-	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. 1)
	(zur Verfügung gestellt von. Dr. W. Hansen, Braunschweig 84)
pMSCV-FOXP3-IRES-GFP	(zur Verfügung gestellt von Frank Ocklenburg, MHH)
pMSCVpuro	Clontech, USA

2.11 cDNA

GARP cDNA	(zur Verfügung gestellt von Dr. Birnbaum ¹)
-----------	---

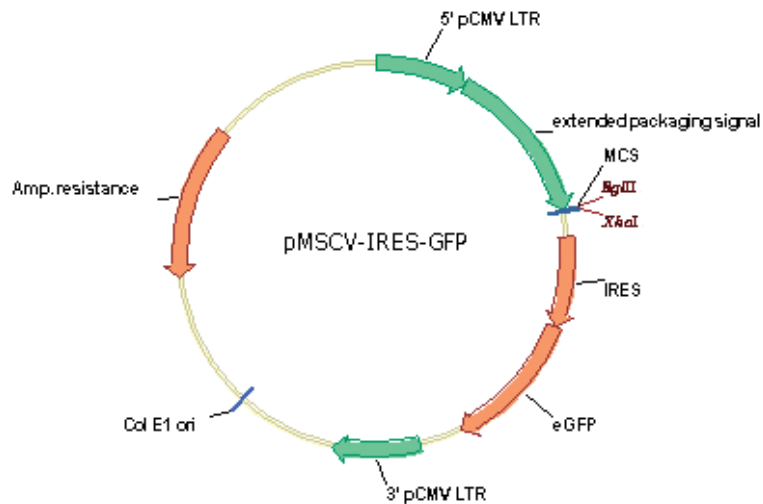


Abb. 2: Schematische Darstellung von pMSCV-IRES-GFP.

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, GARP, LGALS3 oder LGMN). 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 als auch für 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 mit 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, in die Zählkammer pipettiert und die vitalen Zellen gezählt. Tote Zellen erscheinen blau gefärbt, vitale Zellen dagegen ungefärbt, da letztere in der Lage sind, den Farbstoff wieder aktiv mittels ihrer Ionenkanäle aus der Zelle 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-gekoppeltem 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 10^7 $CD4$ -angereicherte Zellen in 1 ml FACS-Puffer resuspendiert. Anschließend erfolgte eine Färbung mit FITC-konjugiertem, anti- $CD4$ - und PE-gekoppeltem, anti- $CD25$ Antikörpern für 15 min im Dunkeln bei 4°C . Nach der Färbung wurden die Zellen zweimal in FACS-Puffer gewaschen, in je 10^8 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 $CD4^+CD25^{hi}$ 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 Prof. Dr. T. Boon, LICR, Brüssel) im Verhältnis 10:1 (T-Zellen/B-Zellen) stimuliert. Die so generierten, allo-reaktiven T_h -Zellen (aus $CD4^+CD25^-$) wurden ab Tag 3 nach Stimulation mit allogenen, bestrahlten B-Zellen (LG2-EBV B-Zellen) mit 20 U/ml rekombinanten, humanen IL-2 (Proleukin, zur Verfügung gestellt von Dr. P. Wagner, Chiron Corporation, CA) supplementiert. Im Vergleich dazu mussten die regulatorischen $CD4^+CD25^{high}$ -T-Zellen wegen ihres anergen Phänotyps jeden zweiten Tag mit 50-100 U/ml IL-2 stimuliert werden. Die Kultivierung der so generierten T-Zelllinien erfolgte, in 24well Platten.

3.3.2 Kultivierung der Maus-Hybridom-Zellen

Die Kultivierung der Maus-Hybridom-Zellen (16.2.11) ist unproblematisch, da diese autonom wachsen. Die Zellen wurden in 6-well Platten kultiviert. Bei Konfluenz wurden die Zellen jeweils in ihrer Kulturplatte verdünnt. Die 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 bestrahltem 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 Transwellssysteme verwendet, bei denen die allogen 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 h 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 h 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° gestreute Licht (SSC = *sideward light scatter*) 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, 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-iodid (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 Waschschrte zugesetzt war.

3.5 Quantitative Zytokinbestimmungen von IL-10, IFN- γ

Die Zytokine IL-10 und IFN- γ wurden mit den jeweiligen BD-OptEIATM-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 üN 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.

3.6 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 dem Überstand freigegeben. Hiermit können nun entsprechende Zielzellen infiziert werden. Da normale Zielzellen die replikationsrelevanten Strukturgene nicht tragen, ist das Virus selber nicht mehr in der Lage, sich zu reproduzieren, wodurch eine unkontrollierte Vermehrung unterbunden wird (Günzburg *et al.*, 1997). 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.

3.6.1 Gentransfer in humane T_h-Zellen

Zunächst wurden die cDNAs, welche für FOXP3, GARP, LGALS3 und LGMN 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-Dann-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 verpackungszellfreien, 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 2 nach Stimulation mit allogeenen, EBV-transformierten B-Zellen in 1,5 ml Eppendorfgefäßen herunterzentrifugiert. 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 positive Zellen über GFP heraussortiert werden. Diese sortierten Zellen wurden für spätere Proliferations- und Hemmtests bzw. zur Expressionsanalyse weiter wie beschrieben kultiviert.

3.6.2 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.

3.7. Molekularbiologische Methoden

3.7.1 Arrayanalysen

Die Arrayanalysen wurde in der Array-Facility der GBF durch Dr. R. Geffers durchgeführt. Verwendung fand der U133A Chip von Affymetrix. 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.

3.7.2 Agarose-Gelektrophoresen

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 Größenzuordnung erreichte man unter Zuhilfenahme eines Längenstandards. Es wurden je nach Fragestellung 1 bis 2%-ige Gele verwendet.

3.7.3 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 H₂O aufgenommen und photometrisch auf Konzentration und Reinheit überprüft. Für die photometrische Messung wurden 5 µl RNA in 95 µl TE-Puffer aufgenommen.

3.7.4 Isolierung von Plasmid-DNA

Für die Plasmidisolation 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 H₂O aufgenommen.

3.7.5 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 H₂O aufgenommen.

3.7.6 Bestimmung von Nukleinsäure mittels 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.

3.7.7 Fällung von RNA

In manchen Fällen war es erforderlich, die gewonnene RNA aufzukonzentrieren, was durch 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.

3.7.8 Reverse Transkription

Für die cDNA-Synthese wurden bis maximal 5 µg Gesamt-RNA und 1 µl Oligo-dT-Primer auf 12,6 µl H₂O aufgefüllt. Es erfolgten 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 von Reverser 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 wurde je nach Anwendung entweder unverdünnt oder in entsprechenden Verdünnungsstufen eingesetzt.

3.7.9 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die von Mullis et al. (1986) vorgestellte Methode ermöglicht *in vitro* die exponentielle Amplifikation einer spezifischen DNA-Sequenz mittels primerabhängiger, hitzestabiler DNA-Polymerase (*Taq*-Polymerase) von *Thermus aquaticus*. Die Primer sind in der Regel zwischen 20 und 30 Nukleotide lang und genspezifisch. 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, soweit möglich keine Dimere und keine *Hairpin*-Strukturen aufweisen sollten und eine Hybridisierungstemperatur zwischen 50 und 60°C haben.

3.7.9.1 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 gleicher 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 Primerspezifität wurde 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 H₂O
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	1 min	
Annealing	50-60°C	1 min	25-35 x Zyklen
Elongation	72°C	2 min	

Terminale Elongation	72°C	10 min	

3.7.9.2 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*), welche 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 H₂O

1 µl Template

total 25 µl

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

Prädenaturierung	95°C	2min	

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

Terminale Elongation	72°C	10 min	

3.7.9.3 *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 Fluoreszenzfarbstoffs wird erneut über ein Filter- und Linsensystem geleitet, 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 semiquantitativen PCR diene hier RPS9 als *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. Die Etablierung der Primermatrix erfolgte mit Hilfe von Tanja Töpfer, an der 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 H₂O

Als Template diente eine Vorverdünnung an cDNA in 10 µl H₂O. 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 bei den 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	10 min	

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

3.7.10 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, 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 H₂O

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

3.7.11 Klonierungen

3.7.11.1 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 20 min, anschließend wurden 2 µl zur Transformation von chemisch kompetenten *E. coli* (TOP10, Invitrogen) eingesetzt.

3.7.11.2 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 H₂O aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte im PCR-Block ün bei 16°C.

3.7.12 Klonierungsstrategien

3.7.12.1 Retrovirale Überexpression

Die *Pfu*-Amplifikate sollten final in die retroviralen Expressionsplasmide kloniert werden. Folgende Zwischenklonierungen waren erforderlich:

GARP: Als Template diente Plasmid cDNA. Das über *Pfu* amplifizierte Produkt wurde zuerst TOPO-kloniert und sequenziert. Aus TOPO wurde das Insert wieder herausgeschnitten in pMSCV-IRES-gfp kloniert welche Schnittstellen.

LGALS3: Als Template diente T_{reg} Zell cDNA. Aus TOPO wurde das Insert nach Sequenzierung herausgeschnitten und in pCDN3- kloniert. Das Fragment wurde dann mit herausgeschnitten und in pMSCV-IRES-gfp kloniert. Wurde wie LGMN über pEGFP umkloniert.

LGMN: Als Template diente T_{reg} Zell cDNA. Das über *Pfu* amplifizierte Produkt wurde zuerst TOPO-kloniert und sequenziert. Aus TOPO wurde das Insert wieder herausgeschnitten und in pMSCV-IRES-gfp kloniert.

3.8 Mikrobiologische Methoden

3.8.1 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 üN bei 37°C inkubiert.

3.8.2 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 üN unter kontinuierlichem Schütteln inkubiert. Am folgenden Tag konnten die Bakteriensuspensionen für eine Plasmidpräparation wie unter 3.9.4 beschrieben verwendet werden.

3.8.3 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 H₂O) gemischt und bei -80°C gelagert.

3.8.4 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.

3.8.4.1 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 Kulturfラスchen 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 H₂O 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 der Überstand gesammelt, über 0.45 µm Filter von residuelken Zellen getrennt und entweder frisch angewendet oder bei -80°C gelagert.

3.8.4.2 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 µl TBS-Puffer (8 g NaCl; 0,2 g KCl; 3 g Tris base ad 800 ml H₂O pH 7,4; Auffüllen auf 1 l H₂O) aufgenommen und in 1,5 ml Eppendorfgefäße vorgelegt. Parallel wurde ein Transfektionsmix bestehend aus folgenden Komponenten angesetzt:

15 µl DEAE-Dextran (15 mg/ml)

12 µl Chloroquine (2 mg/ml)

285 µl TBS-Puffer

Anschließend wurden die Zellen in den Eppendorfgefäßen herunterzentrifugiert. Parallel wurde in 1,5 ml Eppendorfgefäßen ein DNA-Mix hergestellt, indem 1 µg Plasmid-DNA in die Gefäße pipettiert und der Ansatz mit 300 µl TBS aufgefüllt wurde. Danach wurden 300 µl Transfektionsmix hinzupipettiert und die gesamten 600 µl 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 ü.N. bei 37°C, 5% CO₂ und 95% gesättigter Wasserdampf-atmosphäre inkubiert. Je nach Fragestellung wurden die Zellen tags darauf direkt in passivem Lysisbuffer aufgenommen oder vorher mit anti-CD3 Antikörpern stimuliert.

4. Ergebnisse

4.1 Verifizierung der Chip-Analysen

Zur Identifizierung von Genen, die ausschließlich in T_{reg} exprimiert werden wurden eine „whole genome“ Chip Analyse von $CD4^+CD25^{hi}$ im Vergleich mit $CD4^+CD25^-$ T-Zellen unter ruhende Bedingungen und nach Stimulation mit anti-CD3/IL2 bzw. anti-CD3/anti-CD28/IL2 für einen Tag verwendet. Der Rezeptor GARP war eines der Gene, die eine spezifische Heraufregulierung zeigte. Zur Überprüfung der Chip-Analyse wurde eine Quantitative Real-Time PCR für GARP und FOXP3 durchgeführt. Wie in Abb. 3 zu sehen wurde dieser Befund bestätigt. Die GARP Expression in $CD4^+CD25^{hi}$ regulatorischen T-Zellen ist um fast fünffach höher als die in frisch isolierten $CD4^+CD25^-T_h$ -Zellen. Die Expression von FOXP3, die zum Vergleich gemessen wurden, zeigte auch eine um mehr als 16fache erhöhte Expression.

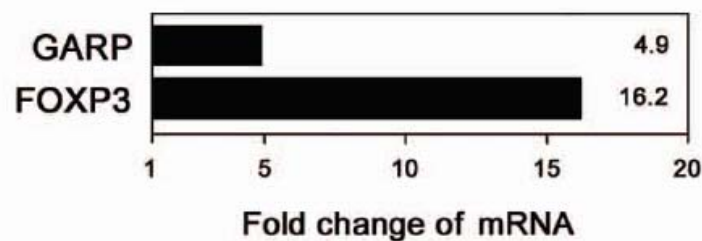


Abb. 3: Quantitative RealTime-PCR von GARP und FOXP3

Dargestellt ist das Verhältnis der mRNS von MACS sortierte humanen $CD4^+CD25^+$ regulatorischen T-Zellen gegen frisch isolierte, MACS sortierte $CD4^+CD25^-$ -Helfer Zellen, dabei wurde die Menge der mRNS von $CD4^+CD25^-$ -Helfer Zellen als 1 gesetzt

4.2 Kontrolle der Transduktionseffizienz nach Re-Expansion 2 bis 3 Wochen Post-Sort

Für die Aufrechterhaltung eines stabilen regulatorischen Phänotyps ist eine konstitutiv hohe Expression von FOXP3 entscheidend. Bei Untersuchungen mittels Chip-Analyse des Transkriptom von $CD4^+CD25^{high}$ Regulatorischen T-Zellen im Vergleich mit $CD4^+CD25^-$ T-Helfer-Zellen wurden neben dem oben schon erwähnten Gen, GARP *glycoprotein A repetitions predominant* die Gene LGALS3 *Lectin Galaktoside-binding, soluble 3*, LGMN *Legumain* als FOXP3 regulierte Gene identifiziert. Um ein besseres Verständnis der

molekularen Mechanismen zu bekommen, die diesen Vorgängen dem zugrunde liegen, wurde ein System der retroviralen Überexpression entwickelt. Dabei wurden T_h Zellen retroviral mit GARP (T_hGARP), LGALS3 (T_hLGALS3), LGMN (T_hLGMN), FOXP3 (T_hFOXP3), und als Kontrolle der leere GFP-Vektor (T_hGFP) transduziert. Zur Kontrolle der Transduktionseffizienz, wurden die positiv transduzierten Zellen, nachdem sie mittels MoFlo-Zell-Sortierer auf GFP-Expression getestet wurden heraussortiert und danach expandiert. Dadurch wurde, wie bei den als Beispiel dargestellten T_hGARP-Zellen 3 Wochen Post-Sort nach Re-Expansion (Abb.4) eine sehr hohe Reinheit von >99% erzielt.

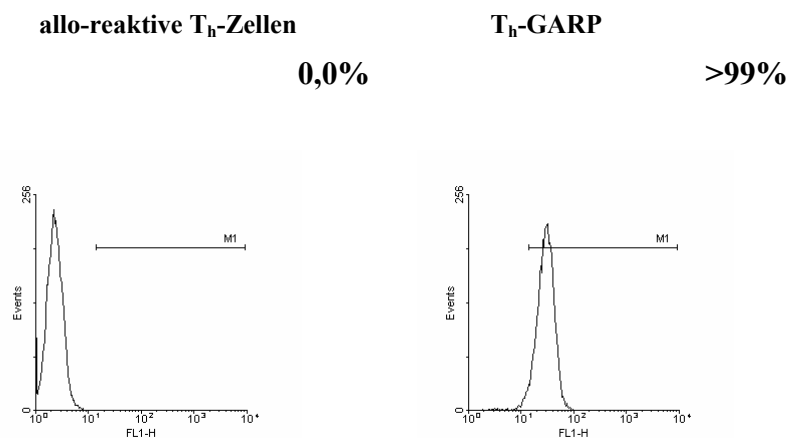


Abb. 4: Re-Analyse transduzierter, sortierte T_h Zellen.

Vergleichende Untersuchung der GFP-Expression von mit GARP transduzierten T_h Zellen (T_hGARP) nach Re-Expansion zu nichttransduzierten Ursprungs-Zellen.

Nachdem bei mit GARP, LGALS3, LGMN, FOXP3 und GFP-Vektor transduzierten Zellen eine gleich hohe Reinheit auch nach Re-Expansion etw. 2 bis 3 Wochen Post-Sort erreicht wurde, konnten die transduzierten Zellen wöchentlich mit bestrahlten LG2-EBV B-Zellen und 50 U/ml IL-2 stimuliert expandiert werden. Dadurch war es möglich sie in einer dauerhaften Kultur zu halten. Diese Zellen wurden für spätere Proliferation-, Hemmtests und auch Expressionsanalysen wie folgt eingesetzt.

4.3 Vergleichende funktionelle Tests von T_hGARP, T_hLGALS3, T_hLGMN, T_hFOXP3 und T_hGFP

Natürliche regulatorische CD4⁺CD25^{hi} T_{reg}-Zellen, zeichnen sich erstens durch Anergie aus und besitzen zweitens die Fähigkeit T_h-Zellen nach Stimulation im Wachstum über einen Zellkontakt-abhängigen Mechanismus zu hemmen. Abb.5 zeigt das die retrovirale Überexpression von GARP einen anergen Phänotyp zu induzieren vermag bei dem eine Antigen-spezifische Proliferation eingeschränkt ist. Dabei erreicht der Effekt die gleiche Stärke, wie die von natürlichen regulatorischen T-Zellen. Dagegen zeigt die retrovirale Überexpression von FOXP3 nur einen partiell anergen Phänotyp, der zwar an den von GARP heranreicht, jedoch weit geringer ist als bei den T_{reg}-Zellen. Im Gegensatz dazu führte die rerovirale Überexpression von LGALS3 und LGMN nur zu einer schwachen Einschränkung der Proliferation. im Vergleich zu Kontrolle T_hGFP.

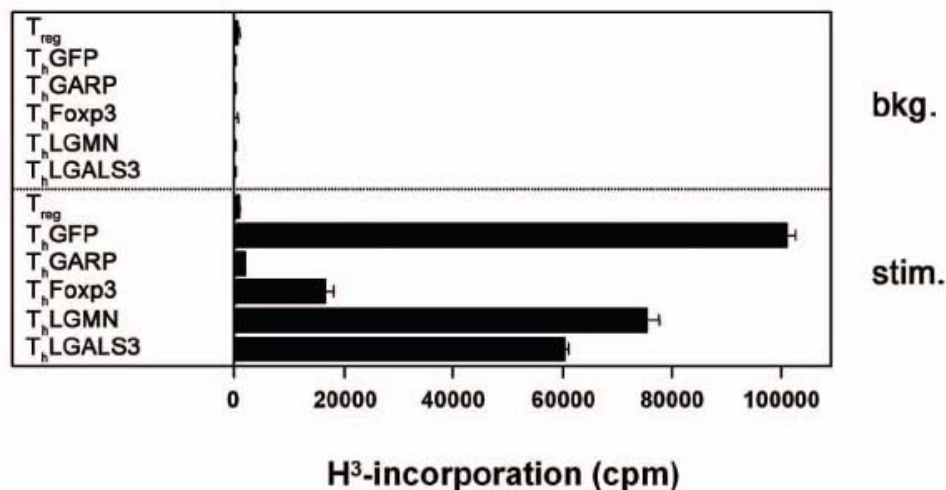


Abb. 5: Vergleichende Proliferations- und Hemmassays der in Abb. 3 beschriebenen retroviral Transduzierten T_h-Zellen im Vergleich mit T_{reg}. Die Messung von H3-Thymidin erfolgte am Tag 3 nach Stimulation mit bestrahlten allogenen EBV B-Zellen (stim.) gegen Zellen ohne Stimulation (bkg.)

4.4 Zellkontaktabhängige Suppressor-Eigenschaft von den transduzierten T_h-Zellen

Das schon erwähnte zweite Charakteristikum von Regulatorische CD4⁺CD25^{high}T_{reg}-Zellen ist die Zellkontakt induzierte Suppression von Helferzellen. In Abb.6 ist zu sehen, dass auch bei den mit GARP, FOXP3, LGALS3 und LGMN transduzierten Zellen die suppressiven Eigenschaften Zellkontakt abhängig sind. Nur bei direktem Zellkontakt mit den zu hemmenden allogen-stimulierten (LG2-EBV's) T_hGFP-Zellen kommt es bei natürlich vorkommenden regulatorischen T-Zellen und mit GARP transduzierten Zellen zu einer fast vollständigen Suppression ihrer Proliferation. Wie auch im funktionellen Test zu beobachten zeigten mit FOXP3 transduzierte Zellen dagegen nur einen partiellen und T_hLGALS3, T_hLGMN sogar nur eine schwache Suppression. Dieses Ergebnis, der nur über Zellkontakt vermittelten Suppression von GARP steht im Einklang mit der *in vitro* zu beobachteten Suppressor-Funktion von natürlichen regulatorischen T-Zellen.

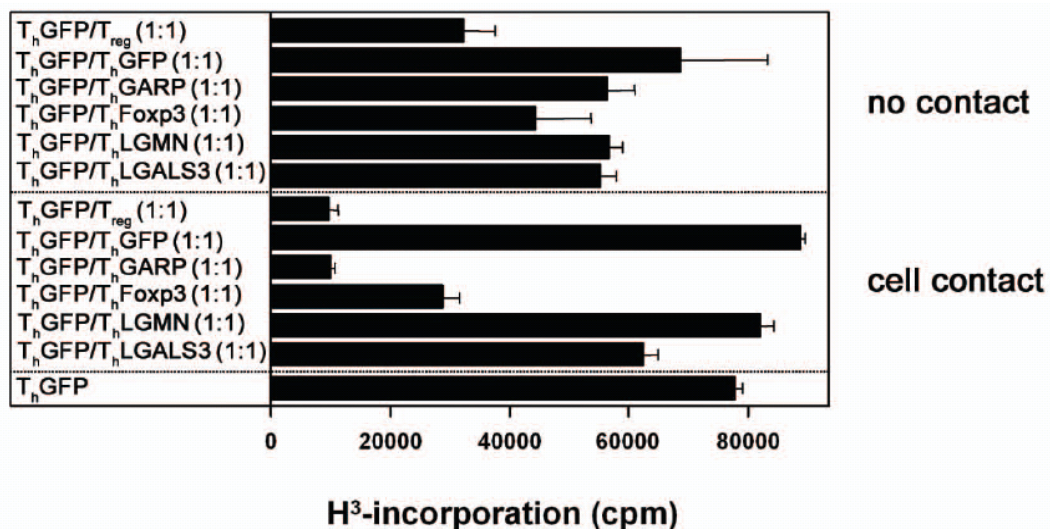


Abb. 6: Vergleichende Proliferations- und Hemmassays der in Abb. 3 beschriebenen retroviral Transduzierten T_h-Zellen. Dabei wurden T_hGFP Zellen im Verhältnis 1:1 mit den zu testenden Zellen Plus bestrahlte EBV-B-Zellen eingesetzt. Im Transwell ohne Kontakt (no contact) im Vergleich ohne Separation über eine Membran (cell contact) . T_hGFP-Zellen ohne potentielle Supressorzellen wurden als Kontrolle eingesetzt. Messung von H3-Thymidin erfolgte am Tag 3

4.5 Expression von Treg spezifischen Markern in T_hGARP, T_hLGALS3, T_hLGMN, T_hFOXP3

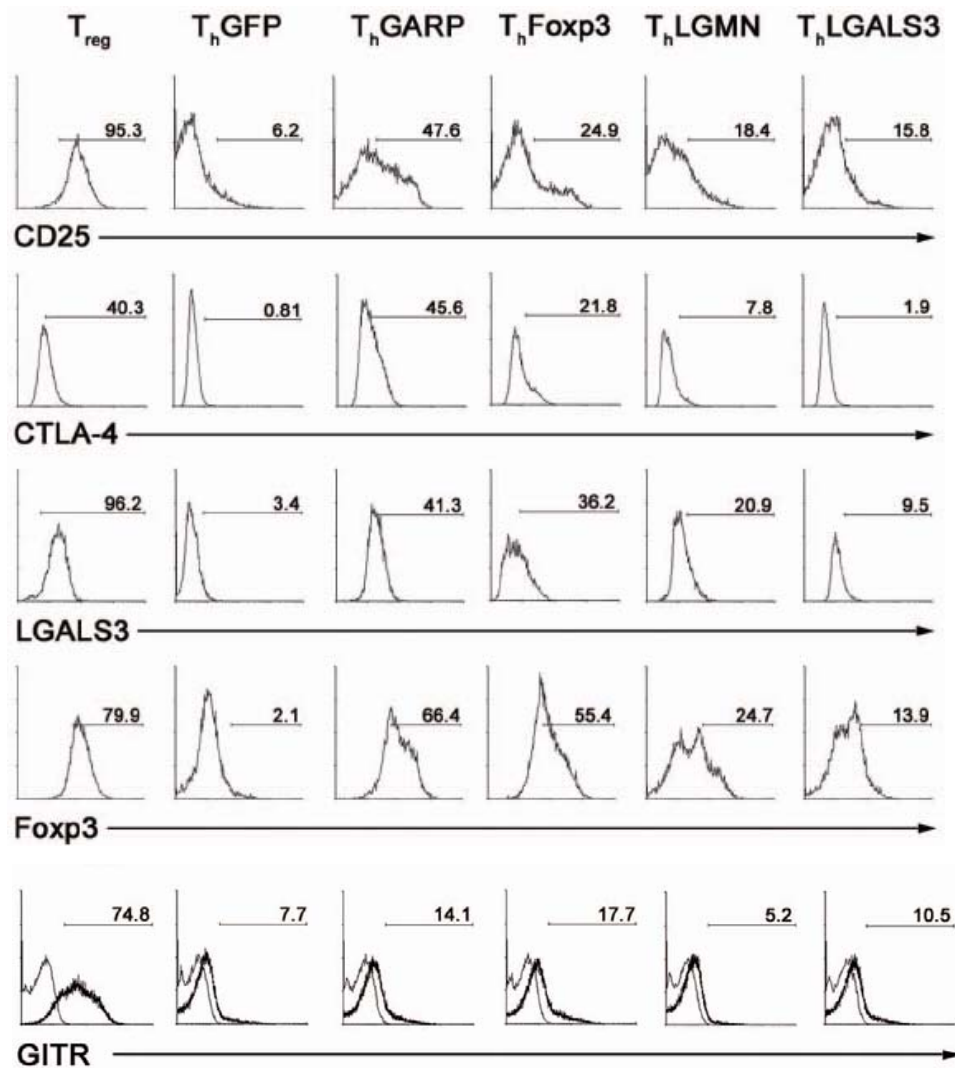


Abb. 7: FACS-Analyse verschiedener T_{reg} spezifischer Oberflächenmarker

T_h Zellen retroviral Transduziert mit GARP (T_hGARP), LGALS3 (T_hLGALS3), LGMN (T_hLGMN), FOXP3 (T_hFOXP3), und als Kontrolle GFP (T_hGFP), wurden auf ihre Zelloberflächen Expression von CD25, GITR (dünne Linie ohne AK, dicke Linie GITR AK) und ihre Innerzelluläre Expression von CTLA-4, LGALS3 und FOXP3 mittels FACS am Tag 10 nach Stimulation durch anti CD3 gemessen. Natürliche T_{reg} Zellen wurden zum Vergleich genommen. Die Gates wurden , mit Ausnahme von GITR, nach Färbung mit Kontrollantikörper gesetzt

Das System der retroviralen Überexpression führt im Fall von GARP zu einem Expressionsmuster, das dem von regulatorischen T-Zellen am nächsten kommt. So zeigen T_hGARP-Zellen eine Heraufregulierung von FOXP3 und CTLA4, die dem Niveau der regulatorischen T-Zellen fast gleichkommt (Abb.7). Anders bei CD25 und LGALS3, wo die Stärke der Expression in etwa die Hälfte dessen entspricht welches bei regulatorischen T-Zellen gemessen wurde. Bei GITR wurde zwar eine Verdopplung der Stärke im Vergleich mit den als Kontrolle eingesetzten T_hGFP erreicht, diese Stärke entspricht aber nur ein Viertel dessen welche in regulatorischen T-Zellen erreicht wird.

Bei der Überexpression von FOXP3 zeigt sich ein ähnliches Expressionsmuster wie bei mit GARP transduzierten Zellen, wenngleich die jeweilige Stärke der zu untersuchten Gene, mit Ausnahme von GITR, immer schwächer als in T_hGARP-Zellen ist. Die Effekte von LGMN und LGALS3 sind nur schwer zu beurteilen. In beiden Fällen ist zwar eine Heraufregulierung der Expression von den hier untersuchten Genen zu sehen, diese ist jedoch schwächer ausgeprägt, als in den regulatorischen T-Zellen.

4.6 LGALS3 als spezifischer Marker für natürliche regulatorische T-Zellen

Bei den Chip-Untersuchungen des regulatorischen Phänotyps von T_{reg}-Zellen, wurde LGALS3 als ein Gen identifiziert, das nur stark in regulatorischen CD4⁺CD25^{high} T-Zellen beim Mensch expremiert wurde, aber nur gering in anderen immunologischen Zellen wie nicht regulatorischen CD4⁺CD25^{low}-T-Zellen¹. Das bestätigten auch anschließende FACS-Analysen. Das führte zu der Theorie, das LGALS3 als ein potentieller Marker für natürliche regulatorische T-Zellen darstellen könnte. Der bisher beschriebene Marker FOXP3 wird nach neueren Untersuchungen nicht wie bisher postuliert, ausschließlich in regulatorischen T-Zellen expremiert, sondern auch in nicht regulatorischen CD4⁺-Zellen². Zur Überprüfung dieser Theorie wurden frisch isolierte Peripheren Blutlymphozyten eines gesunden Spenders wie in Abb.8 zu sehen auf CD4 und CD25 mittel FACS gemessen und in drei Populationen aufgeteilt. Einer in der CD25 nicht expremiert wird, die stellte 94,21% der isolierten Zellen. Einer zweiten, die CD25 mittelstark expremieren und die 1,59 der gesamt Zellen entsprachen. Letztlich einer dritten, die CD25 stark expremieren und die einen Anteil von 0.25 der Gesamtpopulation stellten. Die LGALS3 Expression der drei Zelltypen wurde dann ermittelt. Das Ergebnis war, das eine starke LGALS3 Expression auf die Zellen beschränkt war, die CD25 mittel bis stark expremieren. Diese Zellpopulation stellt einen Anteil von knapp 2% der

Gesamtpopulation, was auch der erwarteten Menge der natürlichen regulatorischen T-Zellen darstellt.

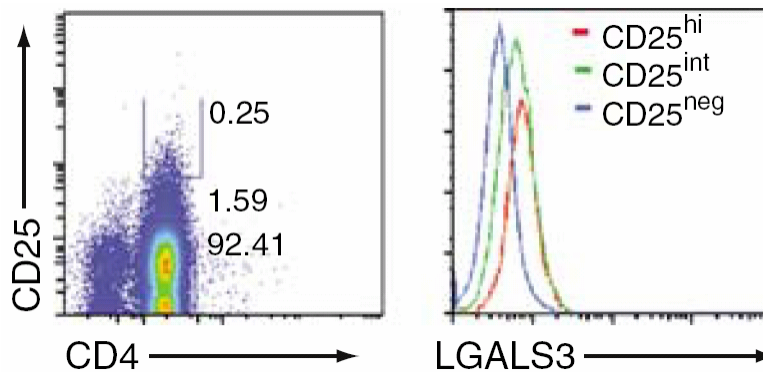


Abb. 8: FACS Färbung von CD4 und CD25 von Zellen aus Peripheren Blutlymphozyten eines gesunden Spenders (Linke Seite). Aufgegliedert in Bereiche mit Prozentangabe von CD4⁺T-Zellen die CD25 hoch, mittel und nicht exprimieren. Dazu korrespondierend die Farben der rechten Seite CD25^{hi}=rot, CD25^{int}=grün, CD25^{neg}=blau) für die intrazelluläre Färbung von LGALS3

4.7 Untersuchungen der Expression von FOXP3 und CD25 nach Stimulation anti CD3/IL-2

Wie in Abb.9 dargestellt ist nach Stimulation mit anti CD3/IL-2 eine stark erhöhte FOXP3 Expression in den mit GARP und FOXP3 transduzierten Zellen zu beobachten. Sie ist sogar stärker als bei natürlichen regulatorischen T-Zellen. Dagegen zeigen mit LGALS3 und LGMN transduzierten Zellen eine viel schwächere Expression und in der GFP-Kontrolle fast gar kein FOXP3. Der Aktivierungsmarker CD25 hingegen wurde in allen transduzierten Zellen stark heraufreguliert. Am deutlichsten wieder in den T_h-GARP Zellen, dort wieder gleichstark wie in den natürlichen regulatorischen T-Zellen.

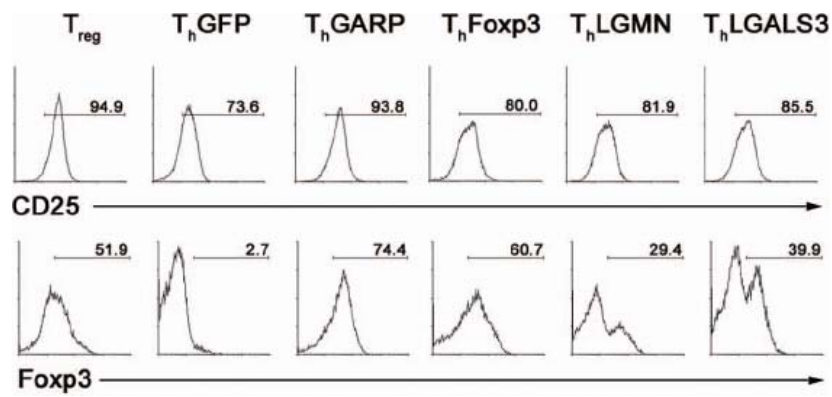


Abb. 9: FACS-Analyse nach anti CD3 Stimulation

T_h Zellen retroviral Transduziert wie in Abb. 3 wurden auf ihren Zelloberflächen Expression von CD25 und Innerzelluläre Expression FOXP3 analysiert. Messung erfolgt am Tag 3 nach Stimulation mit Platten gebundenen anti CD3 und 100U/ml IL-2

4.7.1 Real-Time PCR für IL-2, FOXP3 und GARP nach Stimulation mit anti CD3 und exogenen IL-2

Da die Zugabe von IL-2 die Expression von den für T_{reg} spezifischen Genen CD25 und FOXP3 auf Protein-Ebene beeinflusste, sollte mittels Real-Time PCR untersucht werden, inwieweit IL-2 auch auf transkriptioneller Ebene Einfluss auf die Gene IL-2 selbst, FOXP3 und GARP (Es wurden Primer verwendet, die das endogene GARP detektieren) hat. Dabei wurde die Stärke des Signals von ruhenden T_h GFP Zellen gleich 1 gesetzt. Wie in Abb.10 zu sehen ist, hat exogenes IL-2 nach Stimulation nur eine geringe Wirkung auf die Expression von IL-2, bei den mit FOXP3, GARP, LGALS3 und LGMN transduzierten Zellen. Die Signalstärke weicht nur gering von den ruhenden Zellen ab. Anders bei der GFP Kontrolle, hier verstärkte sich das Signal von 1 auf 32,8. Die Signalstärke von aktivierten regulatorischen Zellen konnte nicht bestimmt werden. Bei der Signalstärke von GARP kann man zusammenfassend sagen, dass IL-2 eine Verstärkung bei den untersuchten transduzierten Zellen hervorruft. Diese ist besonders ausgeprägt bei den mit GARP (von 10,5 auf 28,5) und FOXP3 (38,0 auf 74,5) zu beobachten. Die natürlichen regulatorischen T-Zellen und mit LGMN transduzierten Zellen zeigen eine um ein Drittel verstärktes Signal. Bei T_h LGALS-Zellen zeigt sich keine Veränderung der Signalstärke. Die Signalstärke von T_h GFP konnte für GARP nicht ermittelt werden. Auch bei der Signalstärke von FOXP3 konnte eine Erhöhung der Expression bei T_{reg} , GARP und FOXP3 gemessen werden. Dabei war bei T_h GARP die stärkste Erhöhung des Signals zu messen (9,3 auf 21,8). Auch bei den T_{reg} und den mit FOXP3 transduzierten Zellen ist eine leichte Verstärkung des Signals sichtbar. Bei T_h LGALS und T_h LGMN wurde hingegen keine Veränderung der Signalstärke gemessen.

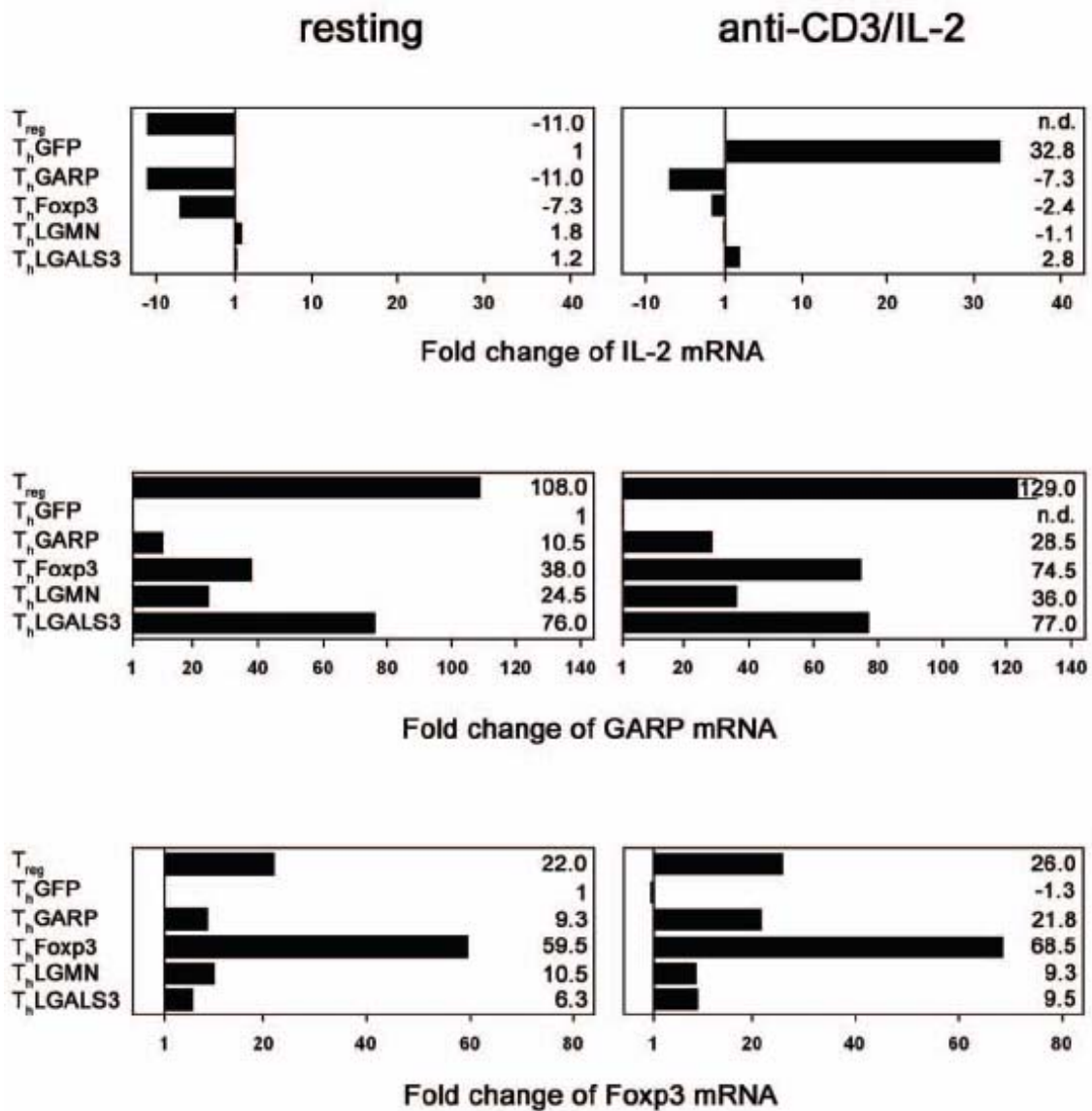


Abb.10: Real-Time RT-PCR von ruhenden (resting) im Verhältnis zu stimulierten (anti CD3/IL-2)-T-Zellen

Dabei wurde die Stärke des Signals von ruhenden T_h GFP Zellen als 1 gesetzt, und mit den Signalen der transduzierten Zellen ins relative Verhältnis gesetzt (n.d. = not detected). Es wurden GARP-Primer benutzt, die das endogene GARP detektieren.

4.8 Semiquantitative RT-PCR von FOXP3 regulierten Genen

Bei vorherigen Untersuchungen zeigte sich, dass GARP auf Transkriptioneller Ebene in der Lage ist die Transskription von IL-2 herunterzuregulieren, welche nach vollständiger Stimulierung durch anti CD3/IL-2, wie in der GFP-Kontrolle (Abb.11) zu sehen, induziert wird. Dies könnte bedeuten, dass GARP entweder in der Lage ist FOXP3 direkt zu beeinflussen oder die Signalkaskade von FOXP3 zu modellieren. Deshalb sollten weitere potentielle durch FOXP3 regulierte Gene untersucht werden um zu Überprüfen, ob GARP auch einen Einfluss, auf deren Expression/Funktion ausübt.. Dafür wurden neben GARP und IL-2 noch die FOXP3 abhängigen Gene LGMN, IL1R2 und Diubiquitin (UBD) mittels semiquantitativer RT-PCR untersucht. Es zeigt sich dabei, dass GARP auf transkriptioneller Ebene in der Lage ist, wie FOXP3 die Expression von IL-2 zu unterdrücken. T_hLGMN und T_hLGALS3 zeigten auch eine stark herabregulierte Expression von IL-2, die allerdings nicht vollständig war wie bei GARP und FOXP3. Auch bei dem FOXP3 regulierten Gen LGMN konnte man eine vergleichbare Heraufregulierung beobachtet werden, allerdings ist der Effekt auch bei T_hLGMN und T_hLGALS3 zu sehen. Am deutlichsten ist die Ähnlichkeit zwischen der Expressionsstärke bei IL1R2, dort ist zu sehen, dass im Verhältnis zur GFP-Kontrolle, die Expression bei T_hGARP und T_hFOXP3 stark heraufreguliert ist, wohingegen sie bei T_hLGMN und T_hLGALS3 nur leicht erhöht ist. Das Gen UBD ist bei GARP transduzierten Zellen im Verhältnis zu T_hFOXP3, T_hLGMN und T_hLGALS3, leicht Heraufreguliert dabei aber sehr viel stärker als bei der GFP-Kontrolle.

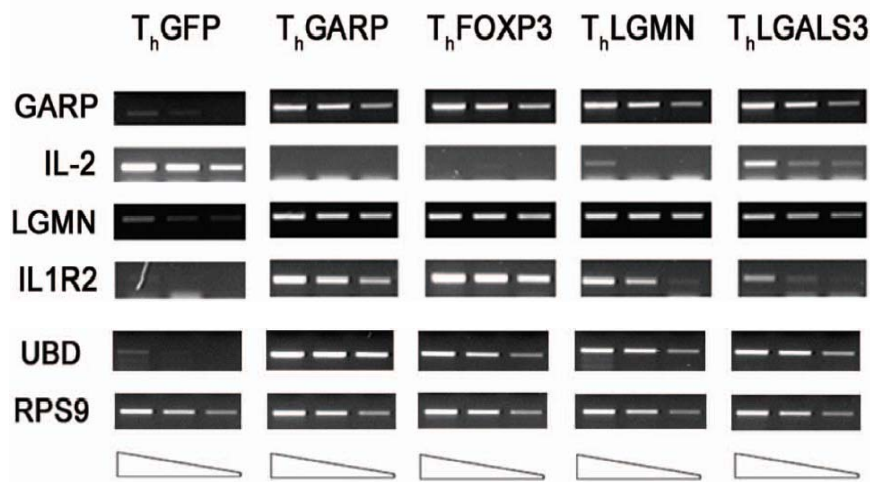


Abb. 11: Semiquantitative RT-PCR Analyse der mRNA Expression

T_h Zellen retroviral Transduziert wie Abb. 3 wurden auf ihre mRNA Expression von GARP, IL-2, LGMN, IL1R2 und UBD untersucht. Gemessen wurde am Tag 3 der Stimulation mit Platten gebundene anti CD3 und 100u/IL-2 Es wurden Primer benutzt, die das endogene GARP detektieren

4.9 Zytokin Freisetzung nach Stimulation und exogenem IL-2

Ein Teil der Untersuchungen bezüglich des regulatorischen Phänotyps innerhalb des Systems der retroviralen Überexpression von FOXP3, GARP, LGALS3 und LGMN war die Produktion von Zytokinen wie IFN- γ und IL-10. IFN- γ wird als Teil der adaptiven Immun-Antwort von T_H1-Zellen und auch NK-Zellen gebildet und eignet sich deshalb, als Teil der Kontrolle, des regulatorischen Phänotyps. IL-10 ist ein sog. anti-inflammatorischen Zytokin welches überschießende Entzündungsreaktionen unterbinden kann, expremiert wird es vor allem von T_H2-Zellen und Monozyten. Beiden Zytokinen, ist gemein, dass sie dem Zytokinexpressionsmuster „anderer“ regulatorischen T-Zell-Populationen entsprechen. Dabei handelt es sich um T_r1 regulatorische Zellen, für die IFN- γ als ein Marker Zytokin beschrieben ist und die T_h3 regulatorische T-Zellen bei denen die Ausschüttung von IL-10, IFN- γ und TGF- β als Markerzytokine beschrieben werden. Wie in Abb.12 zu sehen, zeigen T_hGARP Zellen nur eine sehr gering Freisetzung von IFN- γ , die mit der von T_{reg}-Zellen vergleichbar ist. Dagegen konnte man bei den anderen transduzierten Zellen, insbesondere bei den, mit FOXP3 und der GFP-Kontrolle eine induzierte Sekretion von IFN- γ beobachtet werden. T_hLGMN und T_hLGALS3 Zellen produzierten nur gering Mengen von IFN- γ , lagen allerdings über dem, der T_{reg}-Zellen. Bei der Untersuchung bezüglich der IL-10 Synthetisierung zeigen T_hGARP-Zellen nach Stimulation eine stark erhöhte IL-10

Freisetzung, sie wird noch übertroffen von T_hLG MN und T_hLG ALS3 Zellen- Dagegen zeigen die mit FOXP3 transduzierten Zellen eine nur geringe IL-10 Freisetzung. Die Geringste Freisetzung ist bei der GFP-Kontrolle zu beobachten.

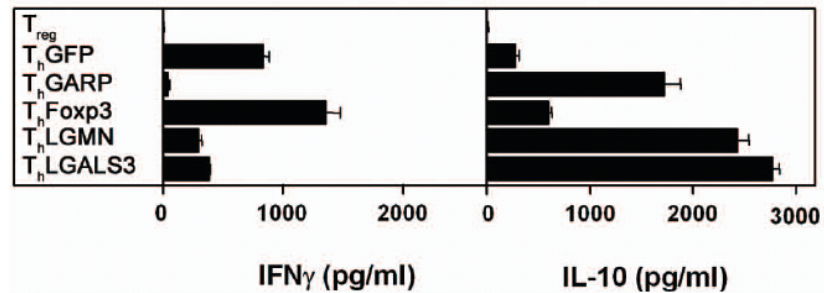


Abb. 12: ELISA der in Abb. 3 beschriebenen retroviral Tansduzierten T_h-Zellen und T_{reg}-Zellen auf IFN γ und IL-10. Die Messung erfolgte am Tag 3 der Stimulation mit Plattegebundenen anti CD3 plus 100U/ml IL-2. Die sezernierte Menge wurde mittels Standard berechnet

4.10 Identifizierung weiterer T_{reg} spezifischer Gene

Nachdem bisherigen Untersuchungen zeigte sich, dass in dem System der retroviralen Überexpression regulatorische Eigenschaften, wie Anergie und Suppression, auf T-Helfer-Zellen übertragen werden konnten. Da es jedoch noch Unterschiede im Expressionsmuster von z.B. CD25 GTR, FOXP3 zwischen den natürlichen regulatorischen T-Zellen und den künstlich geschaffenen Zelllinien gab, sollten weitere Untersuchungen ein besseres Verständnis, über die, am regulatorischen Phänotyp beteiligten Genen, erreicht werden. Um dem Ziel näher zu kommen, wurden in Kooperation mit der GBF in Braunschweig T_{reg}-Zellen und den transduzierten T_h-Zelllinien mit anti CD3/IL-2 drei Tagen stimuliert und deren Transkripte auf unterschiedliche Expressionsmuster hin untersucht. Dabei wurden 2419 Transkripte, die zu 2074 Genen gehören, identifiziert. Zu den identifizierten Genen gehörten bekannte T_{reg}-Marker wie FOXP3, GARP, LGMN, LGALS3, CTLA-4, LAG3, SOCS2, CD28, CD27. Es waren jedoch auch einige neue Gene darunter, die möglicherweise einen genaueren Einblick in die Prozesse erlaube, die den regulatorischen Phänotyp der natürlich vorkommenden T_{reg} Zugrundeliegen. Darunter befanden sich unter anderen der intrazelluläre *Ca²⁺-Kanal Ryanodine Rezeptor-1* (RYR1), die *NAD⁺-linked 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase* (HPGD), der *IL-7R* (CD127) und die nur in Treg-Zellen expremierte *carboxypeptidase E* (CPE).

4.10.1 Expression von CD27 und CD28 in transduzierten T_h-Zelllinien

Zur Überprüfung, der in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Jan Buer an der GBF in Braunschweig gewonnenen Daten, und zu ihrer Verifizierung, wurde die Expression der beiden Oberflächenrezeptoren CD27⁸⁵ und CD28⁸⁶ mittels FACS-Analyse gemessen. Die Messung fand am Tag drei nach Stimulation mit anti CD3/IL2 statt. Dabei wird CD27, das in T_{reg} auf 75,8% der Zellen expremiert wird, in den transduzierten Zellen nicht so stark synthetisiert (Abb.13). So zeigen T_hFOXP3 und T_hLGALS mit 26,9% und 25,9 nur wenig mehr, wie die GFP-Kontrolle mit 22,8%. Bei den T_hGARP, ist die Expression zwar etwas höher, mit 39,2 aber nur halb so stark wie bei den T_{reg}. T_hLGMN zeigt hier die Stärkste Expression mit 49,3

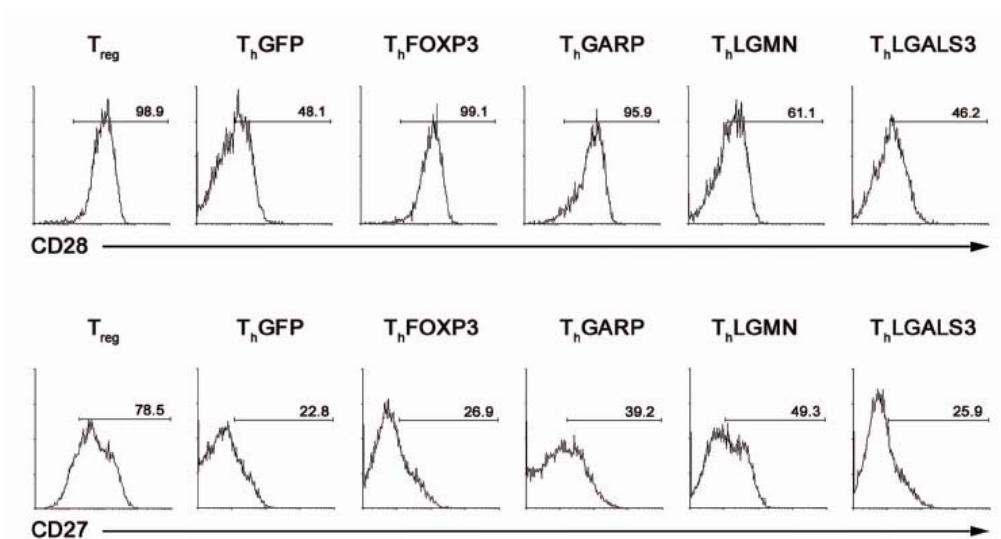


Abb. 13: FACS-Analyse nach anti CD3 Stimulation

T_h-Zellen retroviral Transduziert wie in Abb. 3 wurden auf ihren Zelloberflächen Expression von CD28 (obere Reihe) und CD27 (untere Reihe). Messung erfolgt am Tag 3 nach Stimulation mit Platten gebundenen anti CD3 und 100U/ml IL-2

4.10.2 Semiquantitative RT-PCR der neu identifizierten Gene vor und nach Stimulation mit anti CD3/IL-2

Die hier untersuchten Gene sollten auch die an der GBF generierten Daten bestätigen und dadurch ein besseres Verständnis bezüglich des regulatorischen Phänotyps erreichen. Dafür wurden die zu untersuchenden Zelllinien drei Tage mit anti CD3/IL-2 stimuliert und danach auf ihre Genexpression hin untersucht. Dabei zeigte sich, dass der Oberflächenrezeptor *IL-7R* (CD127) nur in T_hLGMN stark expremiert wird (Abb.14). Er wird etwas in T_hGARP und T_hLGALS gebildet. Durch Stimulation mit anti CD3/IL-2 verringert sich die Stärke sogar noch in den T_hGARP-Zellen. Anders, die im ruhenden Zustand nur stark in T_{reg}-Zellen und schwach in T_hGARP expremierte *carboxypeptidase E* (CPE). Diese wird nach Stimulation in allen Zelllinien, bis auf T_hLGALS3 expremiert und dessen Stärke ist in den T_hGARP Zellen etwas erhöht. Der intrazelluläre Ca^{2+} -Kanal *Ryanodine Rezeptor-1* (RYR1) wird am stärksten in T_{reg} und T_hGARP gebildet, mittelstark in T_hFOXP3, T_hLGMN und T_hLGALS3 und am schwächsten in den T_hGFP, die als Kontrolle dienten. Bei keiner Zelllinie zeigte sich eine Veränderung der Signalstärke nach Stimulation. Die *NAD⁺-linked 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase* (HPGD) wurde in T_{reg}, T_hFOXP3 mittelstark, in T_hLGMN und T_hLGALS3 schwach expremiert, nicht dagegen in T_hGFP. Nach Stimulation verstärkte sich bei allen

Zelllinien die Genexpression und sogar in der GFP-Kontrolle war eine Expression zu beobachten.

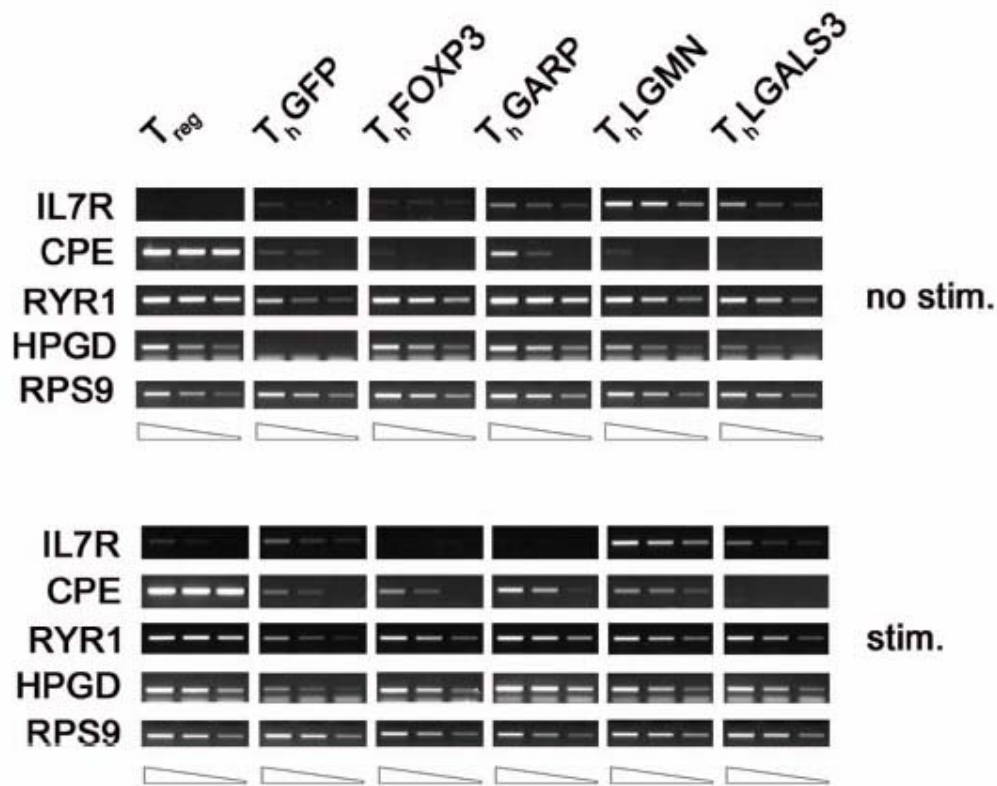


Abb. 14: Semiquantitative RT-PCR Analyse der mRNA Expression

T_h -Zellen retroviral Transduziert wie Abb. 3 wurden auf ihre mRNA Expression von IL-7R, CPE, RYR1, HPGD untersucht. Gemessen wurde am Tag 3 der Stimulation mit Platten gebundene anti CD3 und 100u/IL-2 (stim.) und als Kontrolle im Ruhenden Zustand am Tag 12 (no stim.)

4.11 TGFβ-1 induziert einen regulatorischen Zelltyp

TGFβ-1 ist ein stark konserviertes, 25,0 kDa schweres Protein, das als Homodimer vorliegt. Es ist in der Lage Zellproliferation und Zelldifferenzierung zu beeinflussen. Es wird unter anderen von T_H3-Zellen und T_R1-Zellen gebildet. Diese schütten Zytokine wie TGFβ-1 aus und hemmt damit andere, nicht regulatorische T-Zellen, in ihrer Umgebung. Zu dieser Hemmwirkung ist ebenfalls ein direkter zellulärer Kontakt nötig. TGFβ-1 hat außerdem einen heraufregulierenden Effekt auf die FOXP3 Expression. Daraus ergab sich die Theorie, das TGFβ-1 einen regulatorischen Phänotyp induzieren kann. Es ist weiter bekannt, das FOXP3 nach Stimulation auch durch z.B. anti-CD3 in CD4⁺CD25⁻ nicht regulatorischen T-Zellen heraufreguliert wird⁸⁷.

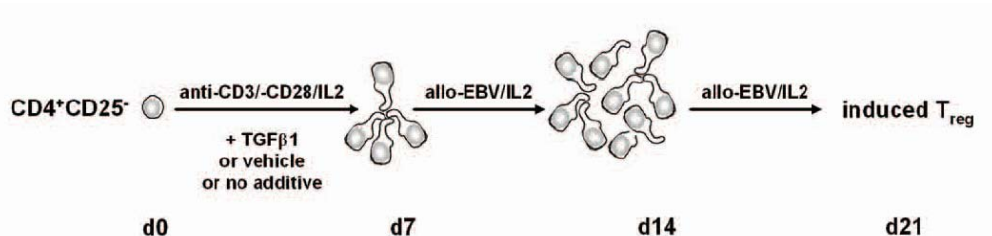


Abb. 15: Theoretisches Modell, wie durch TGFβ-1 Zugabe ein regulatorischer Phänotyp oder regulatorische Zellpopulation *in vitro* induziert wird.

4.11.1 Real-Time PCR für GARP und FOXP3 nach TGFβ-1 Zugabe

Um zu überprüfen, ob GRAP demselben Mechanismus, der Induktion durch TGFβ-1 wie FOXP3 unterliegt, wurden CD4⁺CD25⁻ T-Zellen mit anti CD3/CD28IL-2 Stimuliert und am Tag 6 mit und ohne TGFβ-1 auf die GARP- und FOXP3-mRNS Expression mittels quantitative *RealTime*-PCR untersucht. Dabei wurde die Signalstärke vom GARP und FOXP3 in T_H-Zellen als 1 gesetzt. Wie in Abb.16: zu sehen, zeigt FOXP3 die, beschriebene Heraufregulierung. In Anwesenheit von TGFβ-1 ist sogar eine leichte Verstärkung dieses Effektes zu beobachten. Im Gegensatz dazu ist bei GARP eine starke Herabregulierung der Signalstärke zu beobachten.

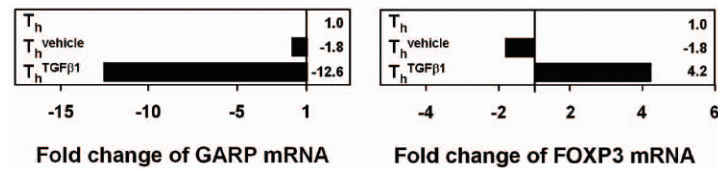


Abb. 16: Quantitative RealTime-PCR von GARP und FOXP3 aus sortierten $CD4^+CD25^+$ -T-Zellen. Gemessen wurde am Tag 6 nach Stimulation mit anti CD3/anti CD28/IL-2, mit Lösungsmittel (vehicle) und 10ng/ml TGF β -1. Die Signalstärke in T-Helfer-Zellen ohne Stimulation wurden als 1 gesetzt und zu relativen Berechnung der Signalkstärke der anderen eingesetzt

4.11.2 Semiquantitative RT-PCR von GARP und FOXP3 nach TGF β -1 Zugabe

Zur Verifizierung, der durch *Real-Time* PCR gewonnenen Daten sollte eine Semiquantitative-PCR unter denselben Bedingungen durchgeführt werden (Abb.17). Dafür wurde cDNS von Stimulierten $CD4^+CD25^+$ -T_h-Zellen ohne, mit Lösungsmittel und mit TGF β -1 eingesetzt. Zur weiteren Kontrolle wurde cDNS von Treg genutzt. Dabei zeigt sich das gleiche Bild wie in der *Real-Time* PCR (Abb. 16). FOXP3 wird durch die Wirkung von TGF β -1 heraufreguliert wohingegen es auf GARP eine herunterregulierende Wirkung hat. Die Expression geht dabei sogar über die in T_{reg} gemessene Expression hinaus.

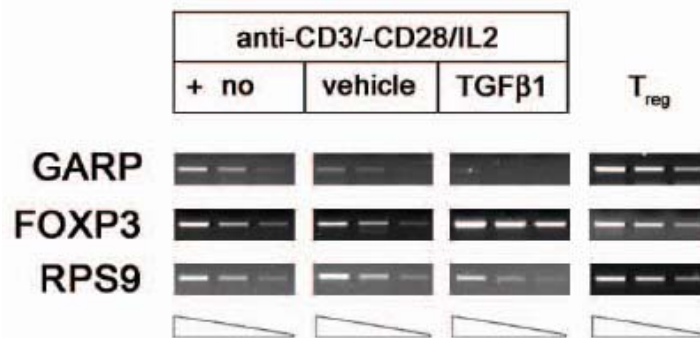


Abb. 17: Semiquantitative RT-PCR Analyse der mRNS Expression von GARP und FOXP3 aus sortierten $CD4^+CD25^+$ -T-Zellen. Gemessen wurde am Tag 6 nach Stimulation mit anti CD3/anti CD28/IL-2, ohne (no), mit Lösungsmittel (vehicle) und 10ng/ml TGF β -1. Treg-Zellen wurden als Vergleich eingesetzt. Die cDNA-Menge wurde mittels RPS9 abgeglichen

4.11.3 FACS-Analyse der Marker für natürlich vorkommende T_{reg}-Zellen

Nachdem auf molekularer Ebene gezeigt werden konnte, das GARP im Gegensatz zu FOXP3 nicht durch Stimulation mit anti CD3/anti CD28/IL-2 herauf reguliert werden kann und auch durch die Zugabe von TGFβ-1 der Effekt der Herunterregulation sich eher vergrößert, sollte nun auf der Protein-Ebene untersucht werden, ob sich dieselbe Wirkung, bei FOXP3 und CD25 beobachten lässt. Dabei wurde durch eine FACS-Analyse gemessen, wie sich die Stimulation von CD4⁺CD25⁻ T_h-Zellen durch anti CD3/CD28/IL-2 in Anwesenheit von TGFβ-1 auf die FOXP3 Expression und die von CD25 auswirkt. Wie in Abb.18 zu sehen verstärkt die Zugabe von TGFβ-1 die FOXP3 Protein Expression von 6,1% auf 30,1% hat aber den Gegenteiligen Effekt auf die CD25-Expression. Die Expression von CD25 geht von 93,3% auf 88,3%, nach Stimulation durch anti CD3/CD28/IL-2 in Anwesenheit von TGFβ-1 herunter.

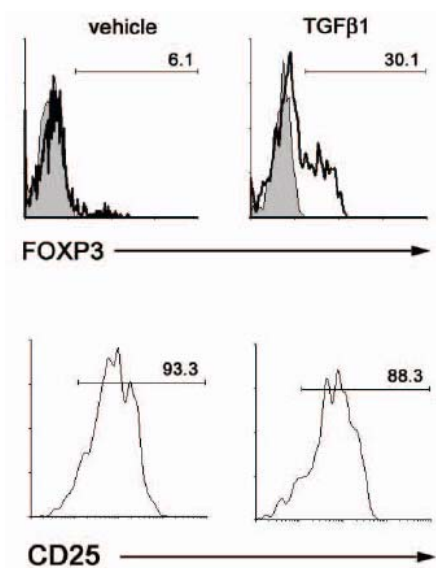


Abb. 18: FACS Färbung von FOXP3 und CD25 aus sortierten CD4⁺CD25⁻-T-Zellen. Gemessen wurde am Tag 6 nach Stimulation mit anti CD3/anti CD28/IL-2, mit Lösungsmittel (vehicle) und 10ng/ml TGFβ-1.

4.11.4 Vergleichende funktionelle Tests auf die hemmende Wirkung von TGFβ-1

Abb.19 zeigt, dass TGFβ-1 in der Lage ist die Proliferation von CD4⁺CD25⁻T-Helfer-Zellen zu hemmen und einen anergen Phänotyp, vergleichbar mit T_{reg} zu induzieren vermag. So zeigen die mit TGFβ-1 behandelten Zellen, nach Stimulation mit anti CD3/anti CD28, eine fast komplette Suppression der Proliferation. Dagegen ist bei der Lösungsmittelkontrolle und vor allem bei den unbehandelten T_h-Zellen ein normales Wachstum zu beobachten. Was die Suppressorfunktion von TGFβ-1 behandelten Zellen betrifft, zeigt sich im Hemmtest, dass auch hier ein partiell regulatorischen Phänotyp bei den mit TGFβ-1 behandelten Zellen induziert. Diese Suppressive Eigenschaft lässt sich auch durch die Zugabe von IL-2 nicht aufheben, auch wenn bei dem im Hemmtest mit IL-2 eingesetzten Zellen, eine Abschwächung der supressiven Eigenschaften zu beobachten ist. Dadurch wurde eine mehr als Verdoppelung des Wachstums ermöglicht.

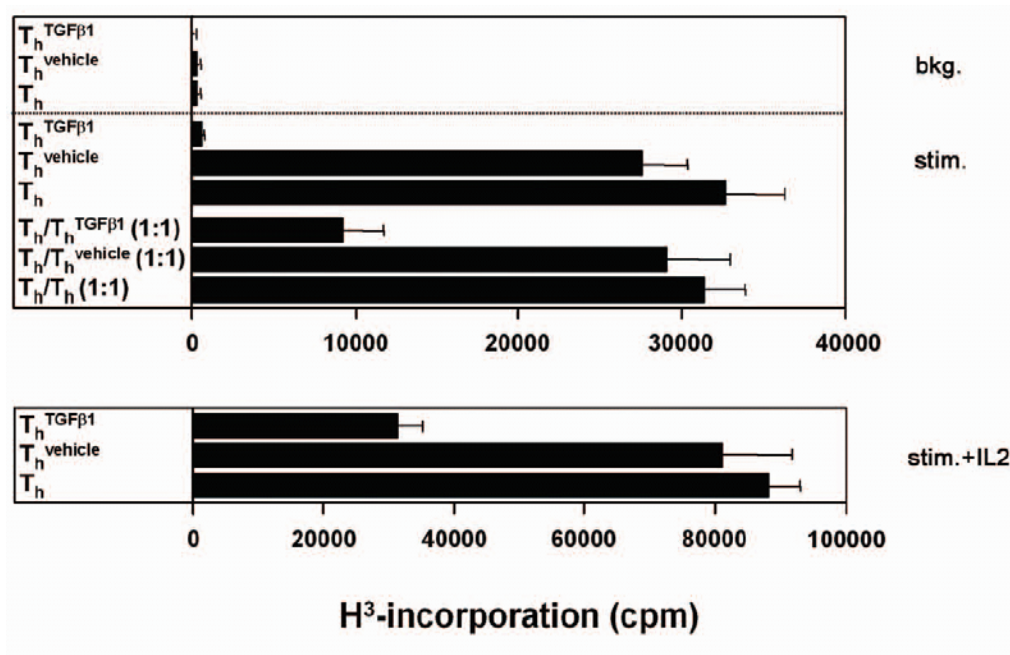


Abb. 19: Vergleichende Proliferations- und Hemmassays zur Bestätigung der Wirkung von TGFβ-1 auf CD4⁺CD25⁻T-Helfer-Zellen

Gemessen wurde H₃-Thymidin am Tag 7 ohne Stimulation als Kontrolle(bkg.) und nach Stimulation mit anti CD3/anti CD28 (stim.) und als Hemmassay, dabei wurden T_h-Zellen im Verhältnis 1:1 mit den zu testenden Zellen mit Lösungsmittel (vehicle) und 10ng/ml TGFβ-1 eingesetzt. Als Vergleich dazu plus IL-2 (stim.+IL-2). T-Helfer-Zellen ohne Lsg oder TGFβ-1 wurden jeweils als Vergleich eingesetzt.

5. Diskussion

Die an der Aufrechterhaltung der immunologischen Hoemeostase beteiligten regulatorischen $CD4^+CD25^+$ T-Zellen sind in ihrer Entwicklung und Funktion abhängig von dem Transkriptionsfaktor FOXP3. Im Gegensatz zu Mäusen ist bei Menschen jedoch die Expression von FOXP3 allein nicht spezifisch für regulatorische T-Zellen, sondern ist auch in aktivierten Effektor $CD4^+$ T-Zellen nach T-Zellrezeptor Stimulation nachweisbar. Der Unterschied zwischen regulatorischen und nicht-regulatorischen $CD4^+$ T-Zellen ist somit durch die qualitativen und quantitativen Unterschiede der FOXP3 Expression gegeben: eine konstitutiv, hohe (*sustained high*) Expression ist charakteristisch für Treg Zellen; im Gegensatz dazu kennzeichnet eine stark regulierte, eingeschränkte Expression von FOXP3 in Abhängigkeit der T-Zell-Rezeptor Stimulation nicht-regulatorische Effektor Zellen.. Aufgrund des wachsenden Interesses am klinischen Einsatz von regulatorischen T-Zellen zur Behandlung bei Transplantatabstoßung und Autoimmunkrankheiten bedarf es eines tieferen Verständnisses der an der Kontrolle der FOXP3 Expression verantwortlichen molekularen Mechanismen und der daran beteiligten Genen bzw. ihrer Genprodukte.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Auswirkung des Toll-ähnlichen Rezeptors *glycoprotein A repetitions predominant* (GARP; oder *Leucin-rich-repeat-containing protein 32 precursor*, LRRC32), des β -Galaktosid-bindenden Galektins LGALS3 (*lectin, galactoside-binding, soluble, 3*) und der Cysteinprotease Legumain (LGMN) auf die Unterschiede der Expression von FOXP3 in alloreaktiven $CD4^+$ T_H -Zellen zu untersuchen. Dabei wurden das System der retroviralen Überexpression mit einem bi-cistronischen Konstrukt gewählt⁸⁸, welches durch eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) die Koexpression des *green fluorescent protein* (GFP) und damit die Identifizierung und Zell-Sortierung der transduzierten T-Zellen erlaubt. Diese T-Zellen können dann auf funktionellen Veränderungen in Proliferations- und Hemmassays phänotypische Veränderungen in der Durchflusszytometrie, als auch molekularbiologisch näher charakterisiert werden.

Es konnte gezeigt werden, das GARP als ein wichtiger Teil des regulatorischen Programms fungiert und die FOXP3 Expression kontrolliert. Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine hohe konstitutive Expression von LGALS3 und LGMN Marker für natürlich vorkommende, aktivierte Treg's darstellen. Beide Genprodukte haben ebenfalls eine FOXP3 regulierende Funktion. Im folgendem wird zunächst auf das in den Analysen genutzte System der retroviralen Überexpression eingegangen. Es werden zuerst die retroviralen Konstrukte

beschrieben und die funktionellen und molekularbiologischen Eigenschaften der Genprodukte diskutiert. Daran schließt sich eine Bewertung der daraus gewonnen Erkenntnisse an, welche dann mit dem System der durch TGFβ-1 vermittelten Induktion von regulatorischen Eigenschaften auf CD4⁺ T_h-Zellen verglichen werden.

5.1 Generierung eines System der retroviralen Überexpression in allo-reaktiven CD4⁺ T_h-Zellen

Um eine reproduzierbare und kohärente Analyse der zu untersuchenden Gene zu gewährleisten wurde das System der retroviralen Überexpression in etablierten, Alloantigen-spezifischen Th-Zell-Linien gewählt. Die dafür verwendeten Th-Zell-Linien wurden aus sortierten CD4⁺CD25⁻ T-Zellen durch Stimulation mit bestrahlten allogenen EBV-transformierten B-Zellen (LG2-EBV) und 50 U/ml IL-2 generiert. Durch das Ihre abhängige Koppeln der zu untersuchenden Gene an das Marker-Gen GFP und die sich anschließende FACS-Sortierung nach erfolgter Transduktion, gelangten wir zu einer reinen und längerfristig zur Verfügung stehenden Zell-Kultur-Linie. Auch nach mehreren Wochen der Kultur zeigten keine der transduzierten Zelllinien eine Veränderung der GFP-Expression (Abb.4).

5.1.1 Funktionelle Untersuchungen der transduzierten CD4⁺-T_h-Zellen

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob durch retrovirale Transduktion der Gene GARP, LGALS3 oder LGMN in allo-reaktive CD4⁺-T_h-Zellen das bestehende Effektorprogramm in ein für regulatorisches T-Zellen charakteristisches Suppressorprogramm „umzuprogrammieren“. Es zeigte sich, dass nur die mit GARP transduzierten CD4⁺-T_h-Zellen in der Lage sind, eine nahezu vollständige Hemmung von Effektor Th-Zellen zu erzeugen. Dieser Effekt war ausgeprägter als bei FOXP3-transduzierten T_h-Zellen und erreichte fast die Stärke der als Kontrolle eingesetzten CD4⁺CD25^{hi}-abstammendenregulatorischen T-Zelllinie. Dabei zeigten die transduzierten Zellen eine Zellkontakt abhängige Suppression auf, wie es für Treg Zellen bekannt ist⁸⁹. Durch eine Transwellsystem, welches Effektor von potentiell hemmenden T Zellen durch eine semipermeable Membran trennt, wurde die Suppression fast vollständig aufgehoben.

Die in Abb.6 zu beobachtende unvollständige Hemmung der mit LGALS3 und LGMN transduzierten Th-Zellen lässt vermuten, dass beide Genprodukte nicht in der Lage sind, das regulatorische Programm in den CD4⁺-T_h-Zellen zu induzieren, weil sie z.B. eine weniger

dominante Funktion im regulatorischen Programm ausüben. Andererseits kann die durch die Transduktion erreichte Expressions-Stärke des Genproduktes nicht ausreichen, um den gewünschten Effekt auf FOXP3 zu gewährleisten. Um diese Frage zu klären wurden im Anschluss die Expressionsmuster der transduzierten T-Zellen untersucht und mit dem von regulatorischen T-Zellen verglichen.

5.1.2 Analyse des Expressionsmuster T_{reg} -spezifischer Marker

Neben den funktionellen Untersuchungen lag ein weiterer Focus auf den für regulatorische T-Zellen spezifischen Markern. Dabei wurde das Expressionsmuster von FOXP3, CD25, CTLA4⁹⁰, GITR und LGALS3 von T_{reg} mit dem der transduzierten T_h GARP, T_h FOXP3, T_h LGALS3 und T_h LGMN Zellen mittels FACS-Analyse verglichen.

Hierbei zeigten T_h GARP Zellen die größte Übereinstimmung mit dem Expressionsmuster von T_{reg} Zellen. Auch hier war, wie schon für die Suppressorfunktion beschrieben, der Effekt durch GARP-Transduktion größer als der durch FOXP3 in T_h -Zellen induzierte. In den mit FOXP3 transduzierten T_h FOXP3 Zellen war wiederum GARP auch hoch reguliert, was auf einen sich gegenseitig verstärkenden Kreislauf schließen lässt. In jeden Fall ist GARP bedeutend an der Regulation der FOXP3 Expression beteiligt und steuert so direkt den regulatorischen Phänotyp. Das belegte die Treg-ähnliche Heraufregulierung der Treg-spezifischen Marker CD25, CTLA4 und FOXP3. Besonders die Tatsache, dass FOXP3 in T_h GARP Zellen sogar stärker expremiert wird als in den T_h FOXP3 Zellen, unterstützt die These, dass GARP die Expression von FOXP3 dominant kontrolliert und daher eine wichtige Rolle für die Treg-spezifische konsitutiv hohe FOXP3 Expression übernehmen kann. Die Expression von GITR reichte bei keiner der transduzierten Zellen an die in Treg Zellen zu beobachtende heran. Eine Ursache hierfür könnte in dem Fehlen von anderen wichtigen Treg-Regulatoren liegen, welche nicht durch das entsprechende Transgen allein bzw. FOXP3 induziert werden. Bei den anderen beiden transduzierten Zelllinien T_h LGALS3 und T_h LGMN zeigten sich zwar Veränderungen in der Expression der Treg-spezifischen Marker, jedoch waren diese nur gering, so dass sie keine dominante Funktion im regulatorischen Programm ausüben dürften und eine wohl eher untergeordnete Funktion einnehmen.

5.1.3 Untersuchungen über die transkriptionelle Kontrolle der transduzierten Gene mittels Real-Time und semiquantitative RT-PCR

Da der Transkriptionsfaktor FOXP3 eine Vielzahl von Genen in ihrer Regulation beeinflusst⁹¹, wurde nun nach der funktionellen und phänotypischen Charakterisierung die transkriptionellen Kontrolle untersucht. Dafür wurde die Regulation der Gene GARP, FOXP3, IL-2, IL-1R2 und UBD^{92,93} in den transduzierten Zellen unter ruhenden Bedingungen

und nach Stimulation mit anti-CD-3 Antikörpern und IL-2 durch quantitative und semi-quantitative RT-PCR untersucht.

Auch hier zeigten die mit GARP transduzierten T_h-Zellen die größte Übereinstimmung in der transkriptionellen Kontrolle der GARP, FOXP3, IL-2, IL-1R2 und UBD Expression mit der in Treg Zellen zu beobachtenden. So war eine Repression der IL-2 Signalstärke vergleichbar mit der von Treg (-11%) nur in den mit GARP (-11%) transduzierten zu beobachten. In T_hFOXP3 Zellen konnte auch eine Reduzierung gemessen werden, diese war jedoch nicht so stark (-7,3%). Das spricht wiederum für die Übergeordnete Position von GARP. Da für die Real-Time RT-PCR Primer verwendet wurden, die nur das endogene GARP detektieren, war es nicht möglich die Gesamtmenge von GARP zu bestimmen. In der semiquantitativen RT-PCR konnte die Hemmung der IL-2 mRNA Induktion bestätigt werden. Das gleiche gilt für IL1R2 und UBD⁹⁴.

5.1.4 Das Zytokinprofil der transduzierten T_h-Zellen

Zur näheren Bestimmung des Phänotyps der transduzierten T_h-Zellen wurde mittels ELISA die Sezernierung von den Zytokinen IFN γ und IL-10 untersucht. T_hGARP Zellen wiesen eine Hemmung der IFN γ Sekretion wie bei Treg Zellen auf. Dagegen konnte eine verstärkte IL-10 Sekretion der T_hGARP Zellen nachgewiesen werden, welche bei den Treg Zellen nicht zu beobachten war. IL10 wurde zwar auch in Treg Zellen nachgewiesen, wird aber hauptsächlich von sog. Tr1 Zellen gebildet, die sich mittels exogenen IL-10 aus CD4⁺T_h-Zellen induzieren lassen⁹⁵. Bei den anderen transduzierten T_h-Zellen waren die Ergebnisse noch weniger aussagekräftig. Die jeweilige Menge von IFN γ und IL-10 entsprach sowohl beim den T_hLGMN, T_hLGALS3 und auch den T_hFOXP3 weder dem typischen Sekretionsmuster von Treg Zellen, noch dem der T_hGFP Kontrollzellen. Über die Ursachen dafür kann hier nur spekuliert werden; am ehesten ist dies durch einen FOXP3-Effekt auf die IL10 Induktion auf dem Boden des bestehenden Effektorprogramms der verwendeten T_h-Zelllinie zu sehen.

5.2 Differentielle Untersuchungen weiterer Treg spezifischer Gene

Während der Untersuchungen bezüglich der Expression von T_{reg} spezifischen Gene wurde durch GenChip Analysen eine Reihe von weiteren Genen identifiziert⁹³. Diese stellen potentielle Marker dar und sollten hier für eine genauere phänotypische Einordnung der transduzierten T_h-Zellen untersucht werden. Wie sich zeigte, erreichte bei CD27 keine der

transduzierten Zellen die bei T_{reg} gemessene Stärke. Das lässt den Schluss zu, dass bei der Transduktion, wie schon in den vorhergegangenen Abschnitten spekuliert, eine nicht vollständige „Umprogrammierung“ erreicht werden konnte. Die gemessenen 78,5% Signalstärke lassen jedoch auch Raum für die Möglichkeit, dass es sich bei CD27⁸⁵ nicht um den besten T_{reg} -Marker handelt, bei dem man ein 100% Signalstärke erwarten würde. Dagegen zeichnete sich bei CD28 ein ganz anderes Bild. Hier gibt es eine gute Korrelation zwischen regulatorischen T-Zellen und FOXP3 und GARP transduzierten T_h -Zellen. Bei dem Gen für den IL-7 Rezeptor (IL-7R)⁹⁶ zeigen sich hingegen widersprüchliche Ergebnisse. Bei T_{reg} Zellen ist IL7-R normaler Weise herunterreguliert. Dagegen zeigen sowohl die T_h GFP als auch die transduzierten T-Zellen geringe Mengen an IL-7R- mRNA im nicht aktivierten Zustand, welche bei den FOXP3- und GARP-transduzierten T_h -Zellen bei Aktivierung dann aber unterdrückt erschienen. Die *carboxypeptidase E* (CPE) wird unabhängig von ihren Aktivierungszustand konsitutive in aktivierten T_{reg} Zellen expremiert. Da CPE nur schwach in T-Helfer Zellen nachzuweisen ist, eignet es sich dadurch gut als relativer Marker von T_{reg} -Zellen. Bei den untersuchten transduzierten T_h -Zellen waren die Ergebnisse jedoch widersprüchlich und lassen wieder den Rückschluss zu, dass offensichtlich die gewünschte „Umprogrammierung“ vom bestehenden Effektorprogramm zu einem regulatorischen Programm nur unvollständig war und in diesem Fall andere FOXP3-unabhängige Regulatorgene zur Komplettierung des regulatorischen Phänotyps fehlen. Das gleiche gilt für den intrazelluläre Ca^{2+} -Kanal *Ryanodine Rezeptor-1* (RYR1)⁹⁷ und die *NAD⁺-linked 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase* (HPGD).

5.3 Untersuchungen über die Wirkung von TGFβ-1 auf FOXP3 und GARP

Es ist bekannt, dass T-Zell Rezeptor Stimulation von CD4⁺CD25⁻ T_h Zellen in der Anwesenheit von TGFβ-1 einen transienten regulatorischen Phänotyp induziert^{98,99}. Dies wird durch die verstärkte FOXP3 Induktion¹⁰⁰ bewirkt. Um zu überprüfen, ob GRAP demselben Mechanismus, der Induktion durch TGFβ-1 wie FOXP3 unterliegt, wurde die Expression von FOXP3 und GARP nach T-Zell Rezeptor Stimulation von CD4⁺CD25⁻ T_h Zellen in der Anwesenheit von TGFβ-1 gemessen. Die in dieser Dissertation erarbeiteten Ergebnisse zeigen, dass GARP offensichtlich einer anderen, noch zu klärenden Regulation unterliegt, die alternativ zu dem beschreibenden regulatorischen Programm von natürlichen und/oder mittels TGFβ-1 induzierten T_{reg} abläuft. Denn bei der Untersuchung der RNS mittel *Real-Time* PCR

(Abb. 16) konnten gezeigt werden, dass GARP nicht wie vermutet induziert, sondern im Gegenteil supprimiert wurde. Das Ergebnis konnte danach noch mittel Semiquantitativer RT-PCR bestätigt werden (Abb. 17).

Interessanterweise zeigen die TGF β -1 behandelten Zellen jedoch die Charakteristika von induzierten regulatorischen T-Zellen. So war eine verstärkte Induktion von CD25 nachzuweisen, die der von den natürlichen regulatorischen T-Zellen vergleichbar war. Auch zeigten die Zellen im Proliferations-/Hemmassay, dass sie anerge Eigenschaften haben und Effektor Zellen hemmen könnten.

6. Literatur

1. Zheng, Y. & Rudensky, A.Y. Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. *Nat. Immunol.* **8**, 457-462 (2007).
2. Pfoertner, S. *et al.* Signatures of human regulatory T cells: an encounter with old friends and new players. *Genome Biol.* **7**, R54 (2006).
3. 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).
4. Ziegler, S.F. FOXP3: of mice and men. *Annu. Rev. Immunol.* **24**, 209-226 (2006).
5. 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* **105**, 735-741 (2005).
6. 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).
7. Lindley, S. *et al.* Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes* **54**, 92-99 (2005).
8. Marshall, N.A. *et al.* Immunosuppressive regulatory T cells are abundant in the reactive lymphocytes of Hodgkin lymphoma. *Blood* **103**, 1755-1762 (2004).
9. Miura, Y. *et al.* Association of Foxp3 regulatory gene expression with graft-versus-host disease. *Blood* **104**, 2187-2193 (2004).
10. 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).
11. 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).
12. Viguier, M. *et al.* Foxp3 expressing CD4+CD25(high) 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).
13. Allan, S.E. *et al.* Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *Int. Immunol.* **19**, 345-354 (2007).
14. Gershon, R.K. & Kondo, K. Infectious immunological tolerance. *Immunology* **21**, 903-914 (1971).
15. 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).
16. Hori, S., Nomura, T. & Sakaguchi, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* **299**, 1057-1061 (2003).

17. 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).
18. Stassen,M. *et al.* Human CD25+ regulatory T cells: two subsets defined by the integrins alpha 4 beta 7 or alpha 4 beta 1 confer distinct suppressive properties upon CD4+ T helper cells. *Eur. J. Immunol.* **34**, 1303-1311 (2004).
19. 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).
20. 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).
21. Cosmi,L. *et al.* Human CD8+CD25+ thymocytes share phenotypic and functional features with CD4+CD25+ regulatory thymocytes. *Blood* **102**, 4107-4114 (2003).
22. von Boehmer,H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat. Immunol.* **6**, 338-344 (2005).
23. Takahashi,S. *et al.* In vivo overexpression of CTLA-4 suppresses lymphoproliferative diseases and thymic negative selection. *Eur. J. Immunol.* **35**, 399-407 (2005).
24. Ochs,H.D., Ziegler,S.F. & Torgerson,T.R. FOXP3 acts as a rheostat of the immune response. *Immunol. Rev.* **203**, 156-164 (2005).
25. Bennett,C.L. *et al.* The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat. Genet.* **27**, 20-21 (2001).
26. Wildin,R.S. *et al.* X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat. Genet.* **27**, 18-20 (2001).
27. Marshall,N.A. *et al.* Immunosuppressive regulatory T cells are abundant in the reactive lymphocytes of Hodgkin lymphoma. *Blood* **103**, 1755-1762 (2004).
28. 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* **105**, 735-741 (2005).
29. 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).
30. Viglietta,V., Baecher-Allan,C., Weiner,H.L. & Hafler,D.A. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J. Exp. Med.* **199**, 971-979 (2004).
31. Lindley,S. *et al.* Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes* **54**, 92-99 (2005).

32. Miura,Y. *et al.* Association of Foxp3 regulatory gene expression with graft-versus-host disease. *Blood* **104**, 2187-2193 (2004).
33. 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).
34. Walther,M. *et al.* Upregulation of TGF-beta, FOXP3, and CD4+CD25+ regulatory T cells correlates with more rapid parasite growth in human malaria infection. *Immunity.* **23**, 287-296 (2005).
35. Andersson,J. *et al.* The prevalence of regulatory T cells in lymphoid tissue is correlated with viral load in HIV-infected patients. *J. Immunol.* **174**, 3143-3147 (2005).
36. 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).
37. Weigel,D., Jurgens,G., Kuttner,F., Seifert,E. & Jackle,H. The homeotic gene fork head encodes a nuclear protein and is expressed in the terminal regions of the Drosophila embryo. *Cell* **57**, 645-658 (1989).
38. Weigel,D. & Jackle,H. The fork head domain: a novel DNA binding motif of eukaryotic transcription factors? *Cell* **63**, 455-456 (1990).
39. Kaestner,K.H., Knochel,W. & Martinez,D.E. Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. *Genes Dev.* **14**, 142-146 (2000).
40. Liu,P.P. *et al.* Solution structure of the DNA-binding domain of interleukin enhancer binding factor 1 (FOXK1a). *Proteins* **49**, 543-553 (2002).
41. Stroud,J.C. *et al.* Structure of the forkhead domain of FOXP2 bound to DNA. *Structure.* **14**, 159-166 (2006).
42. Wijchers,P.J., Burbach,J.P. & Smidt,M.P. In control of biology: of mice, men and Foxes. *Biochem. J.* **397**, 233-246 (2006).
43. Bettelli,E., Dastrange,M. & Oukka,M. Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**, 5138-5143 (2005).
44. 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).
45. 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).
46. Wu,Y. *et al.* FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell* **126**, 375-387 (2006).

47. Brunkow,M.E. *et al.* Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat. Genet.* **27**, 68-73 (2001).
48. Bennett,C.L. *et al.* The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat. Genet.* **27**, 20-21 (2001).
49. Wildin,R.S. *et al.* X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat. Genet.* **27**, 18-20 (2001).
50. Chatila,T.A. *et al.* JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome. *J. Clin. Invest* **106**, R75-R81 (2000).
51. Walker,M.R. *et al.* Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+. *J. Clin. Invest* **112**, 1437-1443 (2003).
52. 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).
53. Zheng,Y. & Rudensky,A.Y. Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. *Nat. Immunol.* **8**, 457-462 (2007).
54. Ocklenburg,F. *et al.* UBD, a downstream element of FOXP3, allows the identification of LGALS3, a new marker of human regulatory T cells. *Lab Invest* **86**, 724-737 (2006).
55. Campbell,D.J. & Ziegler,S.F. FOXP3 modifies the phenotypic and functional properties of regulatory T cells. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 305-310 (2007).
56. Ollendorff,V., Noguchi,T., deLapeyriere,O. & Birnbaum,D. The GARP gene encodes a new member of the family of leucine-rich repeat-containing proteins. *Cell Growth Differ.* **5**, 213-219 (1994).
57. Roubin,R. *et al.* Structure and developmental expression of mouse Garp, a gene encoding a new leucine-rich repeat-containing protein. *Int. J. Dev. Biol.* **40**, 545-555 (1996).
58. Ollendorff,V., Noguchi,T., deLapeyriere,O. & Birnbaum,D. The GARP gene encodes a new member of the family of leucine-rich repeat-containing proteins. *Cell Growth Differ.* **5**, 213-219 (1994).
59. Rothberg,J.M., Jacobs,J.R., Goodman,C.S. & Artavanis-Tsakonas,S. slit: an extracellular protein necessary for development of midline glia and commissural axon pathways contains both EGF and LRR domains. *Genes Dev.* **4**, 2169-2187 (1990).
60. Roubin,R. *et al.* Structure and developmental expression of mouse Garp, a gene encoding a new leucine-rich repeat-containing protein. *Int. J. Dev. Biol.* **40**, 545-555 (1996).
61. Barondes,S.H. *et al.* Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. *Cell* **76**, 597-598 (1994).
62. Liu,F.T. Regulatory roles of galectins in the immune response. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **136**, 385-400 (2005).

63. Wang,J.L., Laing,J.G. & Anderson,R.L. Lectins in the cell nucleus. *Glycobiology* **1**, 243-252 (1991).
64. Hughes,R.C. Mac-2: a versatile galactose-binding protein of mammalian tissues. *Glycobiology* **4**, 5-12 (1994).
65. Birdsall,B. *et al.* NMR solution studies of hamster galectin-3 and electron microscopic visualization of surface-adsorbed complexes: evidence for interactions between the N- and C-terminal domains. *Biochemistry* **40**, 4859-4866 (2001).
66. Davidson,P.J. *et al.* Shuttling of galectin-3 between the nucleus and cytoplasm. *Glycobiology* **12**, 329-337 (2002).
67. Yu,F., Finley,R.L., Jr., Raz,A. & Kim,H.R. Galectin-3 translocates to the perinuclear membranes and inhibits cytochrome c release from the mitochondria. A role for synexin in galectin-3 translocation. *J. Biol. Chem.* **277**, 15819-15827 (2002).
68. Ochieng,J., Furtak,V. & Lukyanov,P. Extracellular functions of galectin-3. *Glycoconj. J.* **19**, 527-535 (2004).
69. Krzeslak,A. & Lipinska,A. Galectin-3 as a multifunctional protein. *Cell Mol. Biol. Lett.* **9**, 305-328 (2004).
70. Akahani,S., Nangia-Makker,P., Inohara,H., Kim,H.R. & Raz,A. Galectin-3: a novel antiapoptotic molecule with a functional BH1 (NWGR) domain of Bcl-2 family. *Cancer Res.* **57**, 5272-5276 (1997).
71. Vyakarnam,A., Dagher,S.F., Wang,J.L. & Patterson,R.J. Evidence for a role for galectin-1 in pre-mRNA splicing. *Mol. Cell Biol.* **17**, 4730-4737 (1997).
72. Kim,H.R., Lin,H.M., Biliran,H. & Raz,A. Cell cycle arrest and inhibition of anoikis by galectin-3 in human breast epithelial cells. *Cancer Res.* **59**, 4148-4154 (1999).
73. Lin,H.M., Pestell,R.G., Raz,A. & Kim,H.R. Galectin-3 enhances cyclin D(1) promoter activity through SP1 and a cAMP-responsive element in human breast epithelial cells. *Oncogene* **21**, 8001-8010 (2002).
74. Ochieng,J., Leite-Browning,M.L. & Warfield,P. Regulation of cellular adhesion to extracellular matrix proteins by galectin-3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **246**, 788-791 (1998).
75. Liu,F.T. Regulatory roles of galectins in the immune response. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **136**, 385-400 (2005).
76. Ocklenburg,F. *et al.* UBD, a downstream element of FOXP3, allows the identification of LGALS3, a new marker of human regulatory T cells. *Lab Invest* **86**, 724-737 (2006).
77. Chen,J.M. *et al.* Cloning, isolation, and characterization of mammalian legumain, an asparaginyl endopeptidase. *J. Biol. Chem.* **272**, 8090-8098 (1997).
78. Gawenda,J., Traub,F., Luck,H.J., Kreipe,H. & von Wasielewski,R. Legumain expression as a prognostic factor in breast cancer patients. *Breast Cancer Res. Treat.* **102**, 1-6 (2007).

79. Murthy,R.V., Arbman,G., Gao,J., Roodman,G.D. & Sun,X.F. Legumain expression in relation to clinicopathologic and biological variables in colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* **11**, 2293-2299 (2005).
80. Liu,C., Sun,C., Huang,H., Janda,K. & Edgington,T. Overexpression of legumain in tumors is significant for invasion/metastasis and a candidate enzymatic target for prodrug therapy. *Cancer Res.* **63**, 2957-2964 (2003).
81. Gawenda,J., Traub,F., Luck,H.J., Kreipe,H. & von Wasielewski,R. Legumain expression as a prognostic factor in breast cancer patients. *Breast Cancer Res. Treat.* **102**, 1-6 (2007).
82. Watts,C., Matthews,S.P., Mazzeo,D., Manoury,B. & Moss,C.X. Asparaginyl endopeptidase: case history of a class II MHC compartment protease. *Immunol. Rev.* **207**, 218-228 (2005).
83. Ocklenburg,F. *et al.* UBD, a downstream element of FOXP3, allows the identification of LGALS3, a new marker of human regulatory T cells. *Lab Invest* **86**, 724-737 (2006).
84. Bruder,D. *et al.* Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells. *Eur. J. Immunol.* **34**, 623-630 (2004).
85. Ruprecht,C.R. *et al.* Coexpression of CD25 and CD27 identifies FoxP3⁺ regulatory T cells in inflamed synovia. *J. Exp. Med.* **201**, 1793-1803 (2005).
86. Ocklenburg,F. *et al.* UBD, a downstream element of FOXP3, allows the identification of LGALS3, a new marker of human regulatory T cells. *Lab Invest* **86**, 724-737 (2006).
87. Chen,W. *et al.* Conversion of peripheral CD4⁺. *J. Exp. Med.* **198**, 1875-1886 (2003).
88. Ocklenburg,F. *et al.* UBD, a downstream element of FOXP3, allows the identification of LGALS3, a new marker of human regulatory T cells. *Lab Invest* **86**, 724-737 (2006).
89. Ocklenburg,F. *et al.* UBD, a downstream element of FOXP3, allows the identification of LGALS3, a new marker of human regulatory T cells. *Lab Invest* **86**, 724-737 (2006).
90. 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).
91. 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).
92. Ocklenburg,F. *et al.* UBD, a downstream element of FOXP3, allows the identification of LGALS3, a new marker of human regulatory T cells. *Lab Invest* **86**, 724-737 (2006).
93. Pfoertner,S. *et al.* Signatures of human regulatory T cells: an encounter with old friends and new players. *Genome Biol.* **7**, R54 (2006).
94. Ocklenburg,F. *et al.* UBD, a downstream element of FOXP3, allows the identification of LGALS3, a new marker of human regulatory T cells. *Lab Invest* **86**, 724-737 (2006).
95. Cottrez,F. & Groux,H. Specialization in tolerance: innate CD(4⁺)CD(25⁺) versus acquired TR1 and TH3 regulatory T cells. *Transplantation* **77**, S12-S15 (2004).

96. Liu, W. *et al.* CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells. *J. Exp. Med.* **203**, 1701-1711 (2006).
97. Ocklenburg, F. *et al.* UBD, a downstream element of FOXP3, allows the identification of LGALS3, a new marker of human regulatory T cells. *Lab Invest* **86**, 724-737 (2006).
98. Chen, W. *et al.* Conversion of peripheral CD4⁺. *J. Exp. Med.* **198**, 1875-1886 (2003).
99. Mahic, M., Yaqub, S., Johansson, C.C., Tasken, K. & Aandahl, E.M. FOXP3⁺CD4⁺CD25⁺ adaptive regulatory T cells express cyclooxygenase-2 and suppress effector T cells by a prostaglandin E2-dependent mechanism. *J. Immunol.* **177**, 246-254 (2006).
100. Fantini, M.C. *et al.* Transforming growth factor beta induced FoxP3⁺ regulatory T cells suppress Th1 mediated experimental colitis. *Gut* **55**, 671-680 (2006).

7. Veröffentlichungen

Frank Ocklenburg, **Darius Moharreggh-Khiabani**, Robert Geffers, Viktoria Janke, Susanne Pfoertner, Hank Garritsen, Lothar Groebe, Juergen Klempnauer, Kurt EJ Dittmar, Siegfried Weiss, Jan Buer and Michael Probst-Kepper. „UBD, a downstream element of FOXP3, allows the identification of LGALS, a new marker of human regulatory T cells” *Laboratory Investigation* 2006; 86 (7): 724-737.

8. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Funktionelle Domänen von FOXP3	6
Abb. 2: Schematische Darstellung von pMSCV-IRES-GFP	20
Abb. 3: Quantitative RealTime-PCR von GARP und FOXP3	41
Abb. 4: Re-Analyse transduzierter, sortierte T _h Zellen.	42
Abb. 5: Vergleichende Proliferations- und Hemmassays der in Abb. 3 beschriebenen retroviral Transduzierten T _h -Zellen im Vergleich mit T _{reg}	43
Abb. 6: Vergleichende Proliferations- und Hemmassays der in Abb. 3 beschriebenen retroviral Transduzierten T _h -Zellen	44
Abb. 7: FACS-Analyse verschiedener T _{reg} spezifischer Oberflächenmarker	45
Abb. 8: FACS Färbung von CD4 und CD25 von Zellen aus Peripheren Blutlymphozyten eines gesunden Spenders	47
Abb. 9: FACS-Analyse nach anti CD3 Stimulation	48
Abb. 10: Real-Time RT-PCR von ruhenden (resting) im Verhältnis zu stimulierten (anti CD3/IL-2)-T-Zellen	50
Abb. 11: Semiquantitative RT-PCR Analyse der mRNS Expression	52
Abb. 12: ELISA der in Abb. 3 beschriebenen retroviral Tansduzierten T _h -Zellen und T _{reg} -Zellen auf IFN γ und IL-10	53
Abb. 13: FACS-Analyse nach anti CD3 Stimulation	55
Abb. 14: Semiquantitative RT-PCR Analyse der mRNS Expression	56
Abb. 15: Theoretisches Modell, wie durch TGF- β 1 Zugabe ein regulatorischer Phänotyp oder regulatorische Zellpopulation <i>in vitro</i> induziert wird	57
Abb. 16: Quantitative RealTime-PCR von GARP und FOXP3 aus sortierten CD4 ⁺ CD25 ⁻ -T-Zellen	58
Abb. 17: Semiquantitative RT-PCR Analyse der mRNS Expression von GARP und FOXP3 aus sortierten CD4 ⁺ CD25 ⁻ -T-Zellen	58
Abb. 18: FACS Färbung von FOXP3 und CD25 aus sortierten CD4 ⁺ CD25 ⁻ -T-Zellen	59
Abb. 19: Vergleichende Proliferations- und Hemmassays zur Bestätigung der Wirkung von TGF- β 1 auf CD4 ⁺ CD25 ⁻ T-Helfer-Zellen	60

9. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Analysierte Gene in der semiquantitativen PCR	12
Tab. 2: Vollständig amplifizierte Gene für retrovirale Überexpression	13
Tab. 3: Analysierte Gene in der <i>Real-Time</i> -PCR	14

10. Lebenslauf

Name: Moharregh-Khiabani

Vorname: Darius

Wohnort: Pfalzstr. 4, 30173 Hannover

Telefon: 0511/5422623

Geburtsdatum: 30.05.1973

Geburtsort: Neustadt a. Rbge.

Staatsangehörigkeit: deutsch

Eltern: Marianne Moharregh-Khiabani, geb. de Buhr
Verwaltungsangestellte
Djavad Moharregh-Khiabani

Geschwister: Zwei Brüder in Alter von 36 und 33 Jahren

Schulbildung: 1979 bis 1983 Besuch der Grundschule in Wunstorf
1983 bis 1992 Besuch der Integrierten Gesamtschule
in Garbsen
03.06.1992 Abschluss mit dem Abitur

Zivildienst: Vom 01.10.1992 bis 31.12 1993
Zivildienst in der Behindertenwerkstatt der
Lebenshilfe Seelze

Studium: 01.10.1994 bis 18.09.02 Studium der Biologie an
der Universität Hannover
18.09.02 Abschluss mit dem Diplom
Note: Sehr gut

Promotion: Seit 15.09.03 Promotion an der MHH in der
Abteilung für Viszeral- und Transplantationschirurgie
(Direktor: Prof. Dr. med. J. Klempnauer),
Nachwuchsgruppe Xenotransplantation der
VolkswagenStiftung
(Leiter: Dr. med. Michael Probst-Kepper)

Auslandsaufenthalt: Vom 01.09.1997 bis 31.07.1998 Teilnahme am IAS-
Programm (Integriertes Auslandsstudium) zwischen der
Tierärztlichen Hochschule Hannover und der
Universidad Nacional Heredia, Costa Rica

Sprachkenntnisse: Deutsch: Muttersprache
Englisch: fließend
Spanisch: Grundkenntnisse

EDV: Windows/Office, CorelDRAW

Nebentätigkeiten: 1994-1997 Marley Werke GmbH
08/1999 Volkswagen AG
04/2000 WABCO Fahrzeugbremsen
08-10/2000 Deutsche Post AG
06/2001-08/2002 Institut für Pathologie der MHH
11-12/2002 Deutsche Expert Zentrale GmbH

11. Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Dr. med. M. Probst-Kepper für die Überlassung des interessanten Dissertationsthemas, die gewährte Unterstützung und für sein Verständnis in wissenschaftlichen Belangen bedanken.

Prof. Dr. med. K. Wonigeit und Prof. Dr. med. J. Klempnauer danke ich für die Initiative aufgrund dessen die Nachwuchsgruppe für Xenotransplantation in der Abteilung Viszeral- und Transplantationschirurgie der Medizinischen Hochschule Hannover durch die Förderung aus Mitteln der *VolkswagenStiftung* in Leben gerufen wurde

Bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. W. Müller möchte ich mich für die Übernahme des Referats und seine freundliche und kompetente Beratung bei der Durchführung der Promotion bedanken. Herrn Prof. Dr. rer. nat. B. Otto danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Prof. Dr. rer. nat. R. Schwinzer und seinen Mitarbeitern möchte ich für die Nutzungsmöglichkeiten des Heißlabors und die freundliche Arbeitsatmosphäre bedanken.

Unserer BTA Frau K. Wagner sowie Frau Dr. rer. nat. V. Janke möchte ich für die Unterstützung und ihre unermüdliche Mitarbeit in unserem Labor sehr herzlich bedanken

Mein besonderer Dank gilt Dr. rer. nat. F. Ocklenburg und Dr. rer. nat. A. Hundrieser die im Laufe der Jahre immer motivierende Kollegen waren und darüber hinaus auch zu echten Freunden wurden.

Am meisten möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden für ihre moralischen Unterstützung, ihren Humor und das Verständnis bedanken. Genannt seien: Kai, Kathrin, Bernd, Jens, Katrin, Tarik, Kais, Wolfgang und Wolf. Birka danke ich für die Durchsicht des Manuskriptes.

Tausend Dank an Tamara, die mit Geduld und Verständnis auf meine Monologe über Ergebnisse und das Auf und Ab im Labor reagierte, sowie ihre Bereitschaft mich während der Dissertation jederzeit liebevoll zu unterstützen.

12. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die der Fakultät für Naturwissenschaften der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover vorgelegte Dissertation mit dem Titel

„Regulation der Expression von FOXP3 in humanen CD4⁺T-Zellen“

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 14.03.2008

Darius Moharreggh-Khiabani