

**Molekulare Mechanismen der Kontrolle von
T-Helferzellen durch natürlich vorkommende
CD4⁺CD25⁺ regulatorische T-Zellen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Tobias Bopp

Geboren am 28. Juli 1977
in Frankfurt am Main

Mainz, Juni 2006

Aus dem
Institut für Immunologie
Der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Tag der mündlichen Prüfung:

19. Juli 2006

Eigene Publikation

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht

1. Bopp T, Palmetshofer A, Serfling E, Heib V, Schmitt S, Richter C, Klein M, Schild H, Schmitt E, Stassen M. "NFATc2 and NFATc3 transcription factors play a crucial role in suppression of CD4+ T lymphocytes by CD4+ CD25+ regulatory T cells."

J Exp Med. 2005 Jan 17;201(2):181-7.

2. Stassen M, Jonuleit H, Muller C, Klein M, Richter C, Bopp T, Schmitt S, Schmitt E. "Differential regulatory capacity of CD25+ T regulatory cells and preactivated CD25+ T regulatory cells on development, functional activation, and proliferation of Th2 cells."

J Immunol. 2004 Jul 1;173(1):267-74.

Weitere Publikationen

3. Stassen M, Fondel S, Bopp T, Richter C, Muller C, Kubach J, Becker C, Knop J, Enk AH, Schmitt S, Schmitt E, Jonuleit H. "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. 2004 May;34(5):1303-11.

4. Doganci A, Eigenbrod T, Krug N, De Sanctis GT, Hausding M, Erpenbeck VJ, Haddad el-B, Lehr HA, Schmitt E, Bopp T, Kallen KJ, Herz U, Schmitt S, Luft C, Hecht O, Hohlfeld JM, Ito H, Nishimoto N, Yoshizaki K, Kishimoto T, Rose-John S, Renz H, Neurath MF, Galle PR, Finotto S. "The IL-6R alpha chain controls lung CD4+CD25+ Treg development and function during allergic airway inflammation in vivo."

J Clin Invest. 2005 Feb;115(2):313-25. Erratum in: J Clin Invest. 2005 May;115(5):1388. Lehr, Hans A [added].

5. Stassen M, Klein M, Becker M, Bopp T, Neudorfl C, Richter C, Heib V, Klein-Hessling S, Serfling E, Schild H, Schmitt E. "p38 MAP kinase drives the expression of mast cell-derived IL-9 via activation of the transcription factor GATA-1."
Mol Immunol. 2006 Apr 29, in press.
6. Klein M, Klein-Hessling S, Palmetshofer A, Serfling E, Bopp T, Heib V, Becker M, Taube C, Schild H J, Schmitt E, and Stassen M. "Specific and redundant roles for NFAT transcription factors in the expression of mast cell-derived cytokines."
J Immunol; submitted for publication.
7. Christian Becker, Sabine Ohlemacher, Tobias Bopp, Edgar Schmitt, and Helmut Jonuleit. "Regulatory T cells: present facts and future hopes."
Med microbiol Immunol; Review; 2006 May 20; [Epub ahead of print], in press.

1.	EINLEITUNG	1
	Toleranz	1
	Zentrale Toleranz	2
	Periphere Toleranz	5
	Passive/ intrinsische Toleranz-Mechanismen	6
	Ignoranz und Anergie	6
	Apoptose und „Activation induced cell death“ (AICD)	7
	Aktive/extrinsische Toleranz-Mechanismen	9
	Regulatorische T-Zellen	9
	Natürlich vorkommende CD4 ⁺ CD25 ⁺ regulatorische T-Zellen	11
	Mechanismen der Suppression konventioneller CD4 ⁺ T-Zellen durch CD4 ⁺ CD25 ⁺ regulatorische T-Zellen	14
	NFATc2-,NFATc3- doppel-defiziente Mäuse (DKO-Mäuse)	17
	Zielsetzung der Arbeit	23
2.	MATERIAL UND METHODEN	24
	Material	24
	Plastikwaren	24
	Chemikalien	24
	Puffer, Lösungen und Reagentien	24
	Medien für die Zellkultur	28
	Cytokine	29
	Antikörper	30
	Antikörper zur Anreinigung muriner T-Zellpopulationen <i>ex vivo</i>	30
	Antikörper zur Bestimmung von Cytokinkonzentrationen (ELISA)	32
	Antikörper für die FACS-Analyse	32
	Antikörper zur Stimulation von T-Zellen <i>ex vivo</i>	33
	Mäuse	33
	Methoden der Zellkultur	34
	Bestimmung der Lebendzellzahl	34
	Kultur von A20 B-Tumorzellen	34
	Behandlung von A20 mit Mitomycin C	34
	Milzzellpräparation	35
	Anreinigung von T-Zellpopulationen <i>ex vivo</i>	35
	Anreinigung von CD4 ⁺ CD25 ⁺ Tregs	35
	Anreinigung von CD4 ⁺ CD25 ⁻ T-Zellen	43

Färbung von T-Zellen mit CFDASE.....	44
Stimulation von T-Zellen.....	44
Proliferations- und Suppressionsassay.....	45
Voraktivierung von CD4 ⁺ CD25 ⁺ regulatorischen T-Zellen (preTregs).....	46
Differenzierung von Th2-Zellen.....	46
Separation von CD4 ⁺ CD25 ⁻ bzw. Th2-Zellen nach Kokultur mit CD4 ⁺ CD25 ⁺ regulatorischen T-Zellen oder preTregs.....	46
Aufreinigung CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD8 ⁻ Thymozyten.....	46
Aufreinigung von CD4 ⁺ CD25 ⁺⁺ GITR ⁺⁺ T-Zellen.....	47
ELISA.....	47
Analysen mit dem FACS.....	48
Molekularbiologische Methoden.....	48
Oligonucleotide.....	48
Präparation von RNA aus T-Zellen.....	48
Enzyme.....	49
Reverse Transkription der mRNA in cDNA.....	49
Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	50
Chromatin Immuno-Präzipitation (ChIP).....	52
3. ERGEBNISSE.....	54
3.1 Mäuse, welche defizient für die Transkriptionsfaktoren NFATc2 und NFATc3 sind (DKO-Mäuse), zeigen eine gestörte T-Zell-Homöostase.....	54
3.1.1 Charakterisierung der peripheren CD4 ⁺ CD25 ⁻ und CD4 ⁺ CD25 ⁺ T-Zellpopulationen aus DKO-Mäusen.....	54
Die Zahl der peripheren CD4 ⁺ CD25 ⁺ T-Zellen ist in DKO-Mäusen stark erhöht.....	54
CD4 ⁺ CD25 ⁺ T-Zellen aus DKO-Mäusen zeigen keine suppressiven Eigenschaften.....	56
Die Transkriptionsfaktoren NFATc2 und NFATc3 sind essentiell an der Suppression von CD4 ⁺ CD25 ⁻ T-Zellen beteiligt.....	58
Die Proliferation von DKO CD4 ⁺ CD25 ⁻ T-Zellen ist abhängig von endokrin gebildetem Interleukin-2.....	67
DKO CD4 ⁺ CD25 ⁻ T-Zellen produzieren sehr schnell nach Aktivierung große Mengen IL-2.....	70
Das immunsuppressive Cytokin TGF-β inhibiert die IL-2 Produktion von DKO CD4 ⁺ CD25 ⁻ T-Zellen.....	74
Das Fehlen der Transkriptionsfaktoren NFATc2 und NFATc3 beeinflusst die Entwicklung von CD4 ⁺ CD25 ⁺ Tregs nicht.....	77
CD4 ⁺ CD25 ⁺ regulatorischen T-Zellen können <i>in vitro</i> durch die Expressionshöhe von CD25 und GITR von aktivierten konventionellen CD4 ⁺ T-Zellen unterschieden werden.....	81
CD4 ⁺ CD25 ⁺⁺ GITR ⁺⁺ T-Zellen aus der Peripherie von DKO- und Wildtyp-Mäusen zeigen alle Charakteristika CD4 ⁺ CD25 ⁺ regulatorischer T-Zellen.....	83

DKO CD4 ⁺ CD25 ⁺ GITR ⁺ T-Zellen sind kaum in der Lage, ihre autologen konventionellen CD4 ⁺ T-Zellen zu supprimieren	89
3.2 <i>In vitro</i> voraktivierte („pre-activated“) CD4 ⁺ CD25 ⁺ Tregs (preTregs) zeigen ein größeres suppressives Potential als CD4 ⁺ CD25 ⁺ Tregs <i>ex vivo</i>	90
PreTregs sind in der Lage die Proliferation von DKO CD4 ⁺ CD25 ⁻ T-Zellen zu supprimieren	93
3.3 Untersuchung des Transkriptoms supprimierter CD4 ⁺ T-Zellen.....	94
CD4 ⁺ CD25 ⁺ regulatorische T-Zellen induzieren in kokultivierten konventionellen CD4 ⁺ T-Zellen die Expression von FoxP3 mRNA	96
DKO Th2-Zellen exprimieren geringe Mengen FoxP3 mRNA nach Kokultur mit preTregs	99
3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse.....	102
4. DISKUSSION.....	104
4.1 Charakterisierung der peripheren CD4 ⁺ CD25 ⁺ und CD4 ⁺ CD25 ⁻ T-Zellen in DKO-Mäusen	105
4.2 DKO CD4 ⁺ CD25 ⁻ T-Zellen sind gegen eine CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg-vermittelte Suppression resistent.....	106
4.3 DKO CD4 ⁺ CD25 ⁻ T-Zellen sind sensitiv gegenüber einer TGF-β-vermittelten Inhibition.....	110
4.4 Das Fehlen der Transkriptionsfaktoren NFATc2 und NFATc3 hat keinen Einfluss auf die Entstehung und Funktion von CD4 ⁺ CD25 ⁺ regulatorischen T-Zellen	111
4.5 Voraktivierte CD4 ⁺ CD25 ⁺ Tregs (preTregs) zeigen ein wesentlich größeres suppressives Potential als CD4 ⁺ CD25 ⁺ Tregs	113
4.6 Die Resistenz der konventionellen CD4 ⁺ T-Zellen aus DKO-Mäusen gegenüber CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg-vermittelten Suppression geht mit einer stark eingeschränkten Expression des transkriptionellen Repressors FoxP3 einher	114
5. ZUSAMMENFASSUNG	116
6. LITERATURVERZEICHNIS.....	119
7. ABKÜRZUNGEN	141

LEBENS LAUFFEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.

1. Einleitung

Die Aufgabe des Immunsystems besteht darin, den Organismus vor Pathogenen wie Bakterien, Viren, Pilzen oder Parasiten zu schützen. Neben dieser Funktion ist es jedoch auch entscheidend an der Vernichtung entarteter körpereigener Zellen beteiligt. Um diesen Aufgaben gerecht zu werden, steht dem Immunsystem während einer adaptiven Immunantwort ein T-Zellrezeptor Repertoire von ungefähr 25×10^6 verschiedenen Spezifitäten¹, verbunden mit einer hohen Plastizitätⁱ der Antigenerkennung zur Verfügung². Obwohl dieses System im gesunden Individuum scheinbar jedes eindringende Pathogen sehr effizient vernichtet, birgt es dabei jedoch die Gefahr, körpereigene Proteine zu erkennen und so potenziell autoimmune Erkrankungen auszulösen. Um gewährleisten zu können, dass möglichst alle pathogenen Fremdorganismen abgewehrt werden und gleichzeitig körpereigene Zellen nicht angegriffen oder sogar zerstört werden, bedarf es deshalb verschiedener Mechanismen immunologischer Toleranz.

Toleranz

Unter Toleranz versteht man in der Immunologie sämtliche Mechanismen, die eine Reaktion gegen körpereigene Strukturen (Autoantigene) aktiv oder passiv verhindern.

ⁱ Unter der **Plastizität des T-Zellrezeptors** versteht man, dass ein TZR verschiedene Peptid-MHC-Komplexe erkennen kann (Promiskuität des TZR).

Zentrale Toleranz

Damit T-Zellen Ihrer Aufgabe während einer adaptiven Immunantwort nachgehen können, müssen sie zwei zentrale Eigenschaften besitzen: Da alle $\alpha\beta$ -T-Zellenⁱⁱ Antigene als Peptide, assoziiert mit einem MHC-Molekülⁱⁱⁱ erkennen, müssen sie in der Lage sein, an körpereigene MHC-Moleküle mit ihrem T-Zellrezeptor (TZR) zu binden (Selbst-MHC-Restriktion). Auf diese Eigenschaft wird während eines, als „positive Selektion“ bezeichneten Prozesses, im Kortex des Thymus selektiert. Um nun jedoch T-Zellen zu entfernen, welche nach Rearrangement ihrer TZR-codierenden Gene einen TZR mit hoher Affinität^{iv} gegenüber körpereigenen Peptiden besitzen, also potentiell autoreaktiv sind, bedarf es der so genannten „negativen Selektion“. Zwar gibt es Hinweise, dass bereits im Kortex des Thymus $CD4^+CD8^+$ T-Zellvorläufer (DP T-Zellen), welche mit sehr hoher Affinität an Peptid-MHC-Komplexe auf kortikalen Thymusepithelzellen binden, deletiert werden, der eigentliche Mechanismus der „negativen Selektion“ und damit die Depletion von über 98% der entstehenden T-Zellen findet jedoch in der Medulla des Thymus statt³⁻⁵. Um die Depletion von T-Zellen zu gewährleisten, welche körpereigene Peptide in Kombination mit einem MHC-Molekül mit hoher Affinität erkennen, müssen in der Medulla des Thymus Autoantigene^v präsentiert werden. Durch Untersuchungen in verschiedenen Mausmodellen^{6,7} konnte letztlich gezeigt werden, dass besonders von medullären Thymusepithelzellen (mTECs) eine Vielzahl verschiedener Autoantigene, die bis dahin als spezifisch für verschiedene andere Organe galten, exprimiert werden (promiskuitive Antigenexpression)⁷⁻¹². So konnte im Falle des humanen C-reaktiven Proteins

ⁱⁱ Der TZR ist ein Dimer, der entweder aus α - und β -Ketten (ca. 95%) oder aus γ - und δ -Ketten besteht. **$\alpha\beta$ -T-Zellen** besitzen einen TZR aus α - und β -Ketten.

ⁱⁱⁱ Der **major histocompatibility complex (MHC)** stellt eine Gruppe von Genen auf Chromosom 6 des Menschen oder Chromosom 17 der Maus dar, welche für die MHC-Moleküle codieren. Bei den MHC-Molekülen unterscheidet man zwischen zwei verschiedenen Typen, MHC-Klasse I und MHC-Klasse 2. Die verschiedenen MHC-Moleküle unterscheiden sich dabei nicht nur in ihrer Struktur, sondern auch in der Quelle der Peptide, die sie den T-Zellen zu deren Aktivierung präsentieren. MHC-Klasse I Moleküle präsentieren prozessierte Peptide aus dem Cytosol und sind auf nahezu jeder kernhaltigen Zelle zu finden, während MHC-Klasse II Moleküle prozessierte Peptide aus intrazellulären Vesikeln präsentieren. Diese Moleküle werden hauptsächlich von professionellen antigenpräsentierenden Zellen exprimiert (z.B. Dendritischen Zellen).

^{iv} Die **Affinität** eines TZR zu einem Peptid-MHC-Komplex ist ein Maß für die Bindungsstärke. Je höher die Affinität, desto größer die Assoziationskonstante, desto niedriger die Dissoziationskonstante.

^v Unter **Autoantigenen** versteht man körpereigene Peptide, die potenziell eine Immunreaktion auslösen können.

gezeigt werden, dass die Expression dieses Proteins durch mTECs dazu führt, dass T-Zellen gegen Peptide dieses Proteins negativ selektioniert, d.h. depletiert werden^{6;12;13}. Der Ubiquitin-Ligase AIRE (Autoimmune Regulator) kommt in diesem Zusammenhang eine entscheidende Bedeutung zu, da sie die ektopische Expression von Autoantigenen in mTECs fördert. Ihre zentrale Funktion lässt sich in AIRE-defizienten Mäusen, die zahlreiche Autoimmunerkrankungen entwickeln, erkennen.

Bei der Selektion von T-Zellen im Thymus geht man davon aus, dass T-Zellen, deren TZR eine hohe Affinität bzw. Avidität^{vi} gegen das präsentierte Autoantigen aufweist, deletiert werden^{14;15}, während T-Zellen mit einem TZR geringerer Affinität/ Avidität dieser Depletion entgehen und als potenzielle Effektor-T-Zellen den Thymus verlassen¹⁶⁻¹⁹. Aus verschiedenen Gründen kann jedoch der Mechanismus der zentralen Toleranz nicht absolut sein. So müssten für die Depletion jeder autoreaktiven T-Zelle nahezu alle vorhandenen Autoantigene mit denen eine T-Zelle theoretisch in der Peripherie in Kontakt kommen könnte, im Thymus präsentiert werden, was nach bisherigen Erkenntnissen trotz promiskuitiver Genexpression der mTECs nicht der Fall ist⁸. Weiterhin übertrifft die Anzahl möglicher Kombinationen fremder, MHC-assoziiertes Peptide die Anzahl potenzieller T-Zell-Rezeptor-Klonotypen^{vii} mindestens um den Faktor 1000². Um also jedes eindringende Pathogen zu erkennen und effizient zu zerstören, muss ein gegebener TZR eine starke Kreuzreaktivität aufweisen. Mathematische Näherungen gehen davon aus, dass eine T-Zelle mit ihrem TZR bis zu 100 verschiedene MHC-gebundene Peptide erkennen kann. Es wird deshalb angenommen, dass das Immunsystem auch potentiell autoreaktive T-Zellen positiv selektioniert, um das T-Zellrepertoire zu vergrößern. Dieser Vorteil wird mit dem Risiko erkaufte, dass gesunde Individuen in der Peripherie autoreaktive T-Zellen mit einem relativ schwach-affinen Rezeptor gegen verschiedene Autoantigene besitzen²⁰⁻²³. Als Konsequenz kann die zentrale Toleranz nur ein Teil der Mechanismen sein, welche Autoimmunreaktionen verhindern. Die ergänzenden Mechanismen werden unter dem Begriff der „peripheren Toleranz“ zusammengefasst. Bei diesen Mechanismen muss man zwischen passiven oder

^{vi} Unter der **Avidität** versteht man das Produkt aus Affinität und der Anzahl der vorhandenen Bindungsstellen oder Rezeptoren.

^{vii} Unter einem **T-Zell-Rezeptor-Klonotyp** versteht man einen T-Zellklon mit spezifischer Rezeptorspezifität.

intrinsischen Mechanismen unterscheiden und solchen, die durch andere Zellen des Immunsystems aktiv vermittelt werden (extrinsisch) (Abb.1.1).

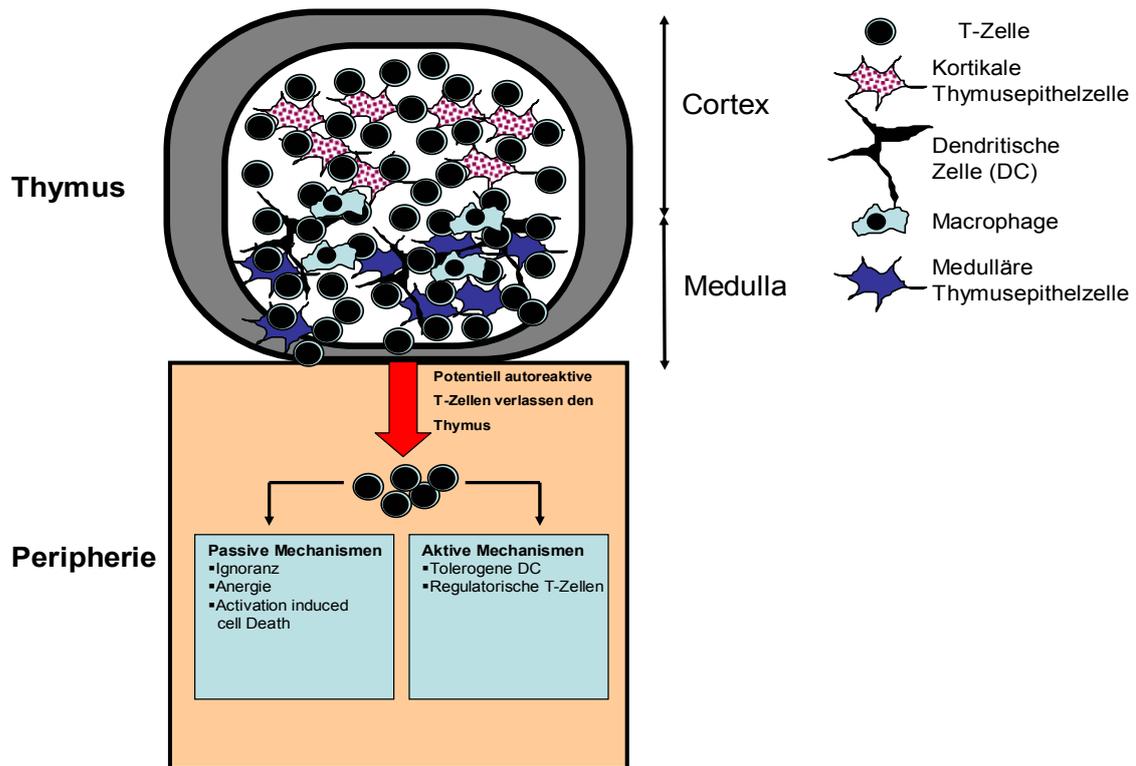


Abb.1.1: Mechanismen immunologischer Toleranz

Periphere Toleranz

Die Mechanismen der peripheren Toleranz sind in Tabelle 1 zusammengefasst und sollen im Folgenden erläutert werden.

Mechanismus	Wirkungsweise
Depletion	Activation induced cell death (AICD); d.h. Apoptose nach Aktivierung.
Immunologische Ignoranz	Autoantigene werden in zu geringen Mengen durch eine antigenpräsentierende Zelle präsentiert bzw. T-Zellen exprimieren eine zu geringe Anzahl an TZR.
Anergie	Funktionelle Ruhigstellung der T-Zelle nach Stimulation in Abwesenheit kostimulatorischer Signale.
Suppression	Hemmung autoagressiver T-Zellen durch T-Suppressorzellen (z.B. CD4 ⁺ CD25 ⁺ regulatorische T-Zellen).

Tab.1.1: Mechanismen der peripheren Toleranz

Passive/ intrinsische Toleranz-Mechanismen

Ignoranz und Anergie

Die theoretisch einfachste Form der peripheren Toleranz stellt die Ignoranz dar. Werden Autoantigene entweder an immunprivilegierten^{viii} Stellen^{24;25} oder in zu geringer Zahl präsentiert, so dass eine T-Zelle nicht ausreichend stimuliert wird, spricht man von Ignoranz (Abb.1.2a)^{26;27}. Ein Beispiel hierfür stellt eine wichtige Hürde bei der Entstehung des murinen Diabetes dar. Werden Autoantigene des Pankreas in jungen Mäusen nicht adäquat präsentiert, so dass die T-Zelle kein ausreichendes TZR-Signal erhält, kommt es auch nicht zur Entstehung von Diabetes^{28;29}. Alternativ dazu kann jedoch die Erkennung von Autoantigenen zu einer funktionellen Inaktivierung der T-Zellen führen. Dieser Zustand, der erstmals als ein Ruhezustand, ausgelöst durch einen TZR-Stimulus ohne kostimulierende Signale^{ix} beschrieben wurde, wird als Anergie bezeichnet^{30;31}.

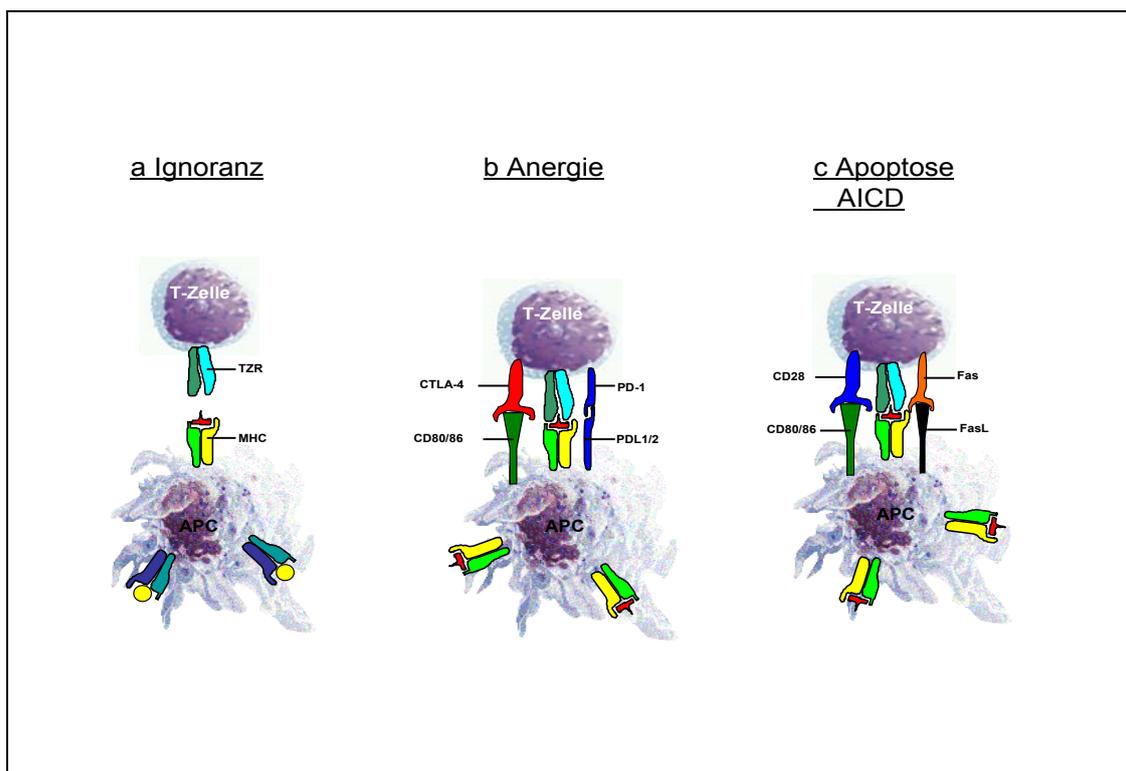


Abb.1.2: Passive Mechanismen der peripheren Toleranz

(AICD = Activation induced cell death)

^{viii} Unter **immunprivilegierten** Stellen des Körpers versteht man Regionen, welche für das Immunsystem nicht oder nur schwer zugänglich sind (z.B. Plazenta, Auge, Hoden).

^{ix} Damit eine T-Zelle aktiviert wird, benötigt sie neben dem Signal über ihren TZR weitere so genannte **kostimulatorische Signale**. Hierunter versteht man z.B. die Bindung von Rezeptoren und Liganden der B7-Familie (z.B. CD80/86 an CD28).

Einige Untersuchungen zeigten jedoch, dass weitere Rezeptoren und deren Signalwege bei der Auslösung von Anergie eine entscheidende Rolle spielen (Abb.1.2b). So konnte die anfangs unerwartete Beobachtung, dass das Blockieren von B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86) nicht wie erwartet Toleranz induzierte, sondern diese durchbrach³², dadurch erklärt werden, dass die Bindung von CD80 und CD86 auf der antigenpräsentierenden Zelle (APC) und CTLA-4^x^{33;34} auf der T-Zelle, für die Induktion der Anergie *in vivo* eine entscheidende Rolle spielt^{35;36}. So entwickeln Mäuse, welche defizient für CTLA-4 sind (CTLA-4 KO Maus) schwere Autoimmunerkrankungen, die zum Tod der Mäuse führen^{37;38}.

Neben CTLA-4 scheint das Molekül PD-1 (programmed cell death 1), welches stark auf anergisierten T-Zellen exprimiert wird, bei diesem Prozess eine wichtige Rolle zu spielen³⁹. Genauso wie CTLA-4 KO Mäuse, entwickeln auch PD-1-defiziente Mäuse autoimmune Erkrankungen⁴⁰. Die Wirkung von PD-1-Interaktionen mit seinem Liganden PDL1/2 scheint entweder die Cytokinproduktion zu unterbinden oder einen Zellzyklusarrest zu induzieren^{41;42}. Da die Anergie mit funktioneller Inaktivierung gleichzusetzen ist, scheint eine rationale Erklärung dafür, dass anergisierte T-Zellen *in vivo* persistieren⁴³ bisher nicht zu existieren. Möglicherweise nehmen diese T-Zellen eine andere als ihnen bisher zugedachte Stellung im Immunsystem ein.

Apoptose und „Activation induced cell death“ (AICD)

Der rigoroseste Mechanismus der peripheren Toleranz ist die Eliminierung autoreaktiver T-Zellen in der Peripherie durch den so genannten Activation induced cell death (AICD) (Abb.1.2c). Ein Schlüsselmechanismus des AICD ist die Ligation von Fas (CD95) auf der T-Zelle und seinem Liganden FasL (CD95L) auf der APC. Dieser Beobachtung lag die Entdeckung zugrunde, dass das „Lymphoproliferative Lupus-ähnliche Syndrom“ in MRL/*lpr* (Fas-defiziente Mäuse) und *gld* Mäusen (Fas-Ligand-defiziente Mäuse) mit natürlich auftretenden Defekten der Gene, welche für Fas (MRL/*lpr*) oder dessen Liganden (*gld*) kodieren, korreliert werden konnte^{44;45}. Weitere Befunde zeigen, dass neben Pten (Phosphatase tensin homolog) das für die Proliferation von T-Zellen wichtige

^x **Cytotoxic T-Lymphocyte-associated antigen-4**; ein Homolog von CD28 mit inhibitorischen Eigenschaften.

Cytokin Interleukin-2 (IL-2) bei AICD eine entscheidende Rolle spielt⁴⁶. So konnte gezeigt werden, dass T-Zellen aus Mäusen, welche defizient für IL-2 oder den hochaffinen IL-2 Rezeptor^{xi} sind, durchaus proliferieren können, jedoch keine Fas-vermittelte Apoptose zeigen⁴⁷. Infolge dieser Defekte entwickeln solche Mäuse schwere Autoimmunerkrankungen, welche zum Tod der Tiere führen⁴⁸. Heute geht man davon aus, dass neben den erwähnten Defekten in diesen Tieren auch das Fehlen von CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen (CD4⁺CD25⁺Tregs) für diese Phänomene mitverantwortlich ist⁴⁹.

^{xi} Der **hochaffine IL-2-Rezeptor** besteht aus den Untereinheiten CD25 (α -Kette), CD122 (β -Kette) und CD132 (γ -Kette).

Aktive/extrinsische Toleranz-Mechanismen

Regulatorische T-Zellen

Unter den CD4⁺ regulatorischen T-Zellen unterscheidet man grundlegend zwischen zwei verschiedenen Subtypen: Natürlich vorkommende CD4⁺CD25⁺ regulatorische T-Zellen (CD4⁺CD25⁺Tregs), welche im Thymus differenzieren und in der Peripherie induzierte regulatorische T-Zellen, die sich aus konventionellen CD4⁺ T-Zellen entwickeln. Im Wesentlichen lassen sich diese beiden Typen regulatorischer T-Zellen durch ihren Entstehungsort (Thymus oder Peripherie) und ihre suppressiven Eigenschaften unterscheiden. CD4⁺CD25⁺Tregs umfassen etwa 5-10% der peripheren CD4⁺ T-Zellen in gesunden, nichtimmunisierten Individuen. Nach Stimulation über ihren TZR proliferieren diese Zellen nicht und sezernieren auch keinerlei Cytokine⁵⁰, sind aber im Stande antigenunabhängig aber zellkontaktabhängig die Proliferation und Cytokinproduktion von aktivierten konventionellen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen zu supprimieren^{51;52}. Obwohl die Grundlage dieses suppressiven Mechanismus bis heute nicht verstanden ist, scheint einer der wichtigsten Prozesse die Inhibition der Expression des Cytokins Interleukin-2 (IL-2) in den supprimierten T-Zellen zu sein⁵³. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass diese Suppression durch Stimulation über verschiedene kostimulatorische Moleküle (z.B. CD28) auf Seiten der konventionellen CD4⁺ T-Zelle durchbrochen werden kann⁵³⁻⁵⁸.

Unter der Vielzahl induzierbarer Tregs, die in den letzten Jahren beschrieben wurden, sind nur zwei Populationen eindeutig definiert, die im Folgenden dargestellt werden. Diese sind T regulatory type 1 (Tr1-) und Th3-Zellen. Sowohl Tr1- als auch Th3-Zellen vermitteln ihre suppressiven Eigenschaften primär über lösliche Faktoren. Tr1-Zellen produzieren nach Aktivierung über ihren TZR Interleukin 10 (IL-10), während Th3-Zellen ihre suppressiven Eigenschaften über das Cytokin transforming growth factor- β (TGF- β) vermitteln⁵⁹. Die wichtigsten Eigenschaften dieser induzierten regulatorischen T-Zellen sind, in Tabelle 1.2 zusammengefasst. Da jedoch nur natürlich vorkommende CD4⁺CD25⁺ regulatorische T-Zellen Gegenstand dieser Arbeit waren, sollen im Folgenden diese Zellen eingehender beschrieben werden.

	CD4+CD25+ regulatorische T-Zellen	Induzierte regulatorische T-Zellen (Tr1, Th3)
Phänotyp	<ul style="list-style-type: none"> - CD25⁺, CTLA-4⁺, GITR⁺ - <i>in vitro</i> anerg - FoxP3⁺ 	<ul style="list-style-type: none"> - CD25, CTLA-4 - meist anerg - sowohl FoxP3⁺ als auch FoxP3⁻
Ort der Entwicklung	Thymus	Peripherie
Entscheidende Entwicklungssignale	<ul style="list-style-type: none"> - CD28-B7 Interaktionen - CD40L-CD40 Interaktionen - IL-2 - Endogene TZR-α-Kette 	<ul style="list-style-type: none"> - Zytokine (TGF-β, IL-4, IL-10) - Unreife DC's - <i>In vivo</i> anti-CD4 - Vitamin D3/ Dexamethason - Komplementrezeptor-Ligation (CD46) - Orale Toleranz-Induktion
Suppressionsmechanismen		
<i>In vitro</i>	Kontaktabhängig	TGF- β / IL-10 (Th3 → Vermittler der oralen Toleranz durch Produktion von TGF- β ; Tr1 → Suppression einer Immunantwort durch die Produktion von IL-10)
<i>In vivo</i>	Kontaktabhängig IL-10- und TGF- β -unabhängig	TGF- β / IL-10

Tab.1.2: Charakteristika regulatorischer T-Zellen

Natürlich vorkommende CD4⁺CD25⁺ regulatorische T-Zellen

Bevor Suppressor T-Zellen (heute: CD4⁺CD25⁺ regulatorische T-Zellen (CD4⁺CD25⁺Tregs)) das erste Mal in der Literatur beschrieben wurden, zeigten 1969 Nishizuka et al., dass die Thymektomie von Mäusen drei Tage nach Geburt (d3Tx) zur Entwicklung verschiedenster Autoimmunerkrankungen führt. Diese Autoimmunerkrankungen traten nicht auf, wenn Mäusen vor Tag zwei oder nach Tag sieben *post partem* der Thymus entfernt wurde. Die Autoimmunerkrankungen thymektomierter Tiere konnten durch Transfer von Milzzellen oder reifen Thymozyten aus adulten Mäusen, spätestens zwei Wochen nach Thymektomie, verhindert werden⁶⁰. Damit wurde der Grundstein für die Idee einer im Thymus entstehenden, natürlich vorkommenden Population von Suppressor T-Zellen gelegt. Bereits ein Jahr später, 1970, beschrieben R.K. Gershon und K. Kondo in *Immunology* eine Subpopulation von T-Zellen, welche in der Lage war, neben B-Zellen und Antigenpräsentierenden Zellen, auch T-Zellen in ihrer Aktivierung zu supprimieren^{61;62}. Nach dieser Publikation folgte in den 1970er und 1980er Jahren eine Flut von Publikationen über Suppressor T-Zellen. Neben der biologischen Funktion dieser T-Zellen wurde auch ein zellkontakt-unabhängiger, auf löslichen Faktoren basierender Wirkmechanismus publiziert. Interessanterweise enthielten die meisten dieser löslichen suppressiven Faktoren Determinanten, welche durch die damals postulierte I-J Region des MHC codiert wurden. Nachdem jedoch durch Klonierung des MHC die Existenz des I-J Locus ausgeschlossen werden konnte⁶³, wurde die gesamte Theorie der Suppressor T-Zellen fallen gelassen. Die Idee der Suppressor T-Zellen geriet so stark in Misskredit, dass viele Wissenschaftler den Terminus „Suppressor T-Zellen“ nicht mehr verwendeten^{64;65} und die bis dato gewonnenen, nicht widerlegten Daten im Wesentlichen als sekundäre Effekte der Th1/Th2 Kreuz-Regulation interpretiert wurden. Erst Mitte der 1990er Jahre erweckte ein von Sakaguchi et al.⁶⁶ publiziertes Experiment erneutes Interesse an diesen Suppressor T-Zellen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das suppressive Potential von den bisher beschriebenen verschiedenen T-Zell-Subpopulationen sich auf diejenigen CD4⁺ T-Zellen in einem naiven Tier beschränken lässt, welche konstitutiv die α -Kette des IL-2-Rezeptors (CD25) auf ihrer Oberfläche exprimieren. Diese, nun als CD4⁺CD25⁺ regulatorische T-Zellen bezeichneten Suppressorzellen, stellen in

einem naiven Tier ca. 5-10% der peripheren CD4⁺ T-Zellen. Ihr suppressives Potential konnte in einem adoptiven T-Zell-Transfermodell gezeigt werden. In diesem Modell wurden Autoimmunerkrankungen durch Transfer von CD25-negativen, konventionellen CD4⁺CD25⁻ T-Zellen in eine T-Zell-lose Maus (athymische „nude-Maus“)^{xii} induziert, die alleine durch den Ko-Transfer von CD4⁺CD25⁺ T-Zellen verhindert werden konnten. Dass diese CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen im Thymus entstehen^{50;67;68} und eine eigenständige Subpopulation von T-Zellen darstellen, zeigten die Wiederholungen der von Nishizuka et al. bereits 1969 durchgeführten Experimente zur Depletion des Thymus an Tag drei nach Geburt (d3Tx-Mäusen). Alleine der Transfer von CD4⁺CD25⁺ T-Zellen aus erwachsenen Mäusen verhinderte bei den d3Tx-Mäusen die Entstehung von schweren Autoimmunerkrankungen⁶⁹. Neben diesen Versuchen sprechen noch weitere Publikationen dafür, dass CD4⁺CD25⁺Tregs im Thymus entstehen: 1. Isoliert man CD4⁺CD25⁺ Thymozyten, so zeigen diese einen sehr ähnlichen Phänotyp wie CD4⁺CD25⁺Tregs. Sie erscheinen anerg und sind im Stande, *in vitro* sowohl konventionelle CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen zu supprimieren⁶⁷. 2. Genauso wie CD4⁺CD25⁺Tregs in der Peripherie, exprimieren CD4⁺CD25⁺ Thymozyten neben CD25 die gleichen Oberflächenmoleküle (z.B. CTLA-4 oder GITR)^{70;71}. 3. Die Depletion von CD4⁺CD25⁺ Thymozyten und der Transfer der resultierenden CD4⁺CD25⁻ Thymozyten in eine nude-Maus führt, genauso wie das von Sakaguchi et al. 1995 publizierte Experiment⁶⁶ zur Entstehung schwerer Autoimmunerkrankungen⁶⁷. Damit grenzen sich CD4⁺CD25⁺ Tregs von den in der Peripherie induzierten regulatorischen T-Zellen klar ab.

Welche Signale im Thymus jedoch darüber entscheiden, ob ein T-Zell-Vorläufer sich zu einer CD4⁺CD25⁺ Treg oder zu einer konventionellen T-Zelle entwickelt sind weitestgehend unbekannt. In Mäusen, deren T-Zellen einen transgenen TZR exprimieren, der mit intermediärer Affinität ein im Thymus exprimiertes Autoantigen, assoziiert mit einem eigenen MHC-II-Molekül erkennt, zeigte sich, dass zwar eine hohe Zahl der T-Zell-Vorläufer im Thymus negativ selektiert wurde, die Zahl der regulatorischen T-Zellen jedoch gleichzeitig exponentiell anstieg^{72;73}. Man nimmt heute also an, dass die TZR von CD4⁺CD25⁺ Tregs während ihrer Entwicklung im Thymus eigene Peptide mit intermediärer Avidität

^{xii} Nacktmäusen, sogenannten (**nude; nu/nu**) fehlt eine Thymusanlage, so dass in diesen Mäusen keine reifen T-Zellen in der Peripherie vorhanden sind.

erkennen, was im Gegensatz zu konventionellen T-Zellen nicht zu ihrer Depletion führt (Abb.1.3).

Deshalb bleibt die Frage offen, ob $CD4^+CD25^+$ Tregs aus einer spezifischen T-Vorläufer-Zelle entstehen, oder ob sich jeder $CD4^+CD8^+$ oder gar jeder $CD4^+CD8^-$ Thymozyt potenziell zu einer $CD4^+CD25^+$ Treg im Thymus entwickeln kann. Dagegen spricht z.B. dass $CD4^+CD25^+$ Tregs ein genauso diverses TZR-Repertoire, wie konventionelle $CD4^+$ T-Zellen besitzen⁷⁴⁻⁷⁸. Verhindert man das Rearrangement einer endogenen α -Kette durch den „Knock-Out“ des „recombinase-activating gene 2“ (RAG-2), entstehen keine $CD4^+CD25^+$ Tregs mehr^{67;74}.

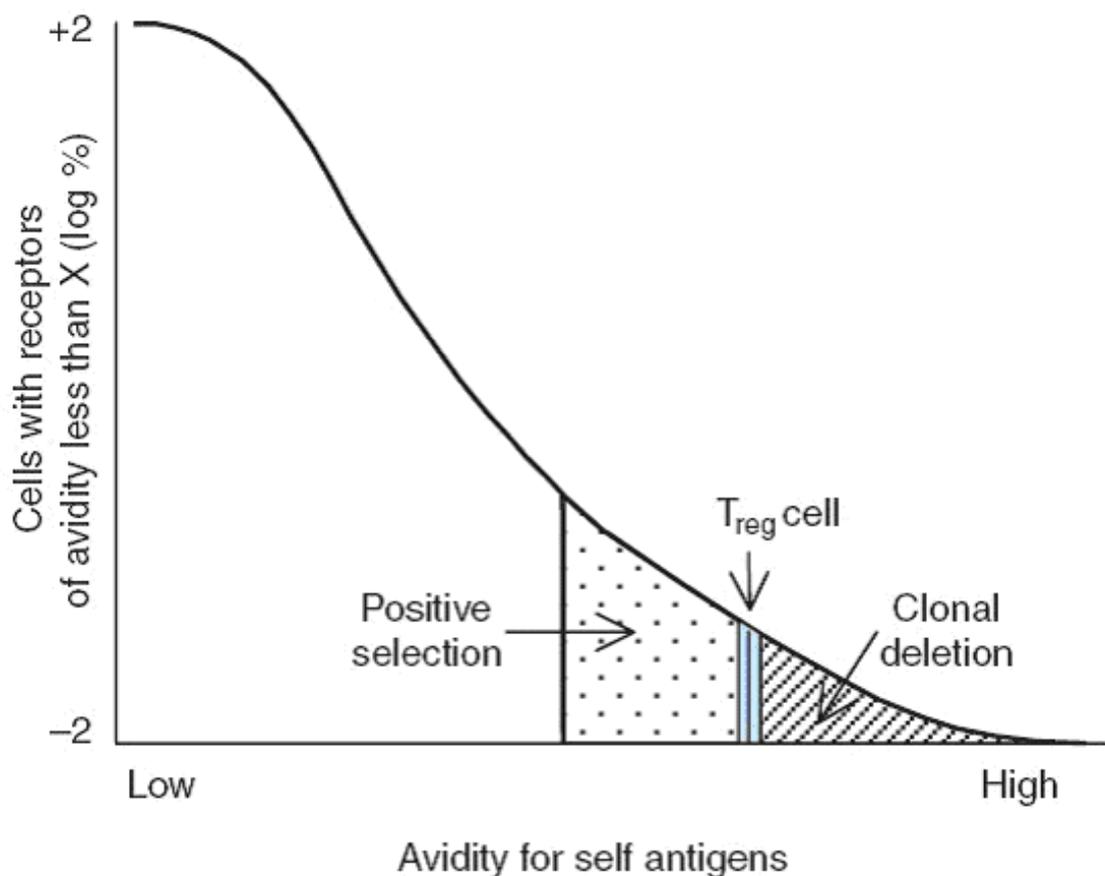


Abb.1.3: Selektion des TZR-Repertoires (Quelle: „Natural regulatory T cells and self-tolerance“ R.H. Schwartz 2005 Nature Immunology, S.327-30)

Ob bei der Entstehung von CD4⁺CD25⁺ Tregs neben der relativ hohen Avidität ihrer TZR gegen eigene Peptide noch weitere Signale eine Rolle spielen, konnte bisher nicht befriedigend beantwortet werden. Jedoch zeigen neuere Studien, dass akzessorische Moleküle bei diesem Prozess beteiligt sind. So konnte durch Versuche mit CD28 Knock-out Mäusen oder der Verwendung von CTLA-4-Immunglobulin (CTLA-4Ig), das die Koaktivierung von T-Zellen über CD28 inhibiert, gezeigt werden, dass Interaktionen zwischen CD28 und B7 aber auch Interaktionen zwischen CD40 und dessen Liganden (CD40L) eine entscheidende Rolle bei der Entstehung im Thymus und/oder der Homeostase von CD4⁺CD25⁺Tregs in der Peripherie spielen⁷⁹⁻⁸¹. Auch CD25 (IL-2 Rezeptor α -Kette) Knock-out Mäuse, CD122 (IL-2 Rezeptor β -Kette) Knock-out Mäuse, IL-2 Knock-out Mäuse oder die Neutralisation von IL-2 durch Antikörper resultiert in schweren Autoimmunerkrankungen, welche durch den adoptiven Transfer von CD4⁺CD25⁺Tregs verhindert werden können⁸²⁻⁸⁴. Dieser Befund zeigt, dass IL-2 entscheidend an der Entwicklung und/oder Expansion von CD4⁺CD25⁺Tregs beteiligt ist.

Mechanismen der Suppression konventioneller CD4⁺ T-Zellen durch CD4⁺CD25⁺ regulatorische T-Zellen

Da auch aktivierte konventionelle CD4⁺ T-Zellen CD25 exprimieren und bis heute für CD4⁺CD25⁺Tregs kein spezifisches Oberflächenmolekül beschrieben wurde, können diese Zellen nur durch ihre funktionellen Eigenschaften charakterisiert werden. Die charakteristische Eigenschaft dieser Zellen ist, dass sie *in vitro* nach TZR-Stimulus weder IL-2 produzieren noch proliferieren^{50;85}. Jedoch sind sie in der Lage, nach Aktivierung über ihren TZR antigen-unabhängig⁵¹, in einem Zellkontakt-abhängigen Prozess konventionelle CD4⁺ T-Zellen und CD8⁺ T-Zellen zu supprimieren⁸⁶. Neben CTLA-4 wurden verschiedene Moleküle wie LAG-3, cbl-b (eine E3-Ubiquitin Ligase) oder OX-40 beschrieben, die an den suppressiven Eigenschaften von CD4⁺CD25⁺Tregs beteiligt sein sollen. Alleine die Rolle des immunsuppressiven Cytokins TGF- β wurde lange Zeit kontrovers diskutiert. Es konnte jedoch eindeutig gezeigt werden, dass *in vitro* TGF- β nicht an der kontaktabhängigen Suppression von CD4⁺ T-Zellen durch CD4⁺CD25⁺ Tregs beteiligt ist⁸⁷. Neueste Arbeiten konnten in einem Colitis-Transfermodell zeigen, dass TGF- β zwar entscheidend an der Hemmung colitogener

Effektor-T-Zellen beteiligt ist, dieses jedoch nicht durch CD4⁺CD25⁺ Tregs produziert wird⁸⁸. Weiterhin konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass CD4⁺CD25⁺ Tregs aus TGF- β -defizienten Mäusen mit wildtyp CD4⁺CD25⁺ Tregs vergleichbare suppressive Eigenschaften besitzen, so dass eine Rolle von TGF- β bei der CD4⁺CD25⁺ Treg-vermittelten Suppression *in vitro* und *in vivo* ausgeschlossen werden kann. Nichts desto trotz ist TGF- β ein entscheidendes immunmodulatorisches Cytokin, welches neben seinen direkten immunsuppressiven Eigenschaften eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Funktion von Tr1- und Th3-Zellen einnimmt^{89;90}.

Der genaue Mechanismus durch den CD4⁺CD25⁺Tregs konventionelle CD4⁺ T-Zellen supprimieren ist also bisher völlig unverstanden^{50;57;58;91;92}.

Dagegen konnten kürzlich Faktoren identifiziert werden, die eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung und Homeostase von CD4⁺CD25⁺ Tregs *in vivo* spielen. So scheint das Cytokin Interleukin-2 (IL-2) für die Homeostase von CD4⁺CD25⁺Tregs in der Peripherie essentiell zu sein. Zwar wurde auch eine Rolle von IL-2 bei der Aktivierung von CD4⁺CD25⁺ Tregs und ihrer Entstehung im Thymus diskutiert, dies konnte jedoch durch Verwendung verschiedener Mäuse, welche Defizienzen in der IL-2 Produktion oder in der Expression des hochaffinen IL-2 Rezeptors tragen, ausgeschlossen werden⁹³. Daneben ist IL-2 jedoch ein wichtiger autokriner Wachstumsfaktor aktivierter konventioneller CD4⁺ T-Zellen und ein kritischer Schritt der Suppression durch CD4⁺CD25⁺ Tregs scheint die Hemmung der endogenen IL-2 Produktion in aktivierten, konventionellen T-Zellen zu sein^{49;53;94;95}. Im Einklang mit diesen Ergebnissen steht, dass alle bisher beschriebenen Mechanismen zur Durchbrechung der CD4⁺CD25⁺Treg-vermittelten Suppression, wie etwa Kostimulation über CD28, 4-1BB oder GITR, eine starke IL-2 Produktion in konventionellen CD4⁺ T-Zellen auch in Gegenwart von Tregs induzieren^{54 53;55;56}.

Obwohl in gesunden, nicht-immunisierten Tieren CD25 immer noch ein sehr guter Marker für CD4⁺CD25⁺Tregs ist, bleibt eines der größten Probleme bei der Erforschung dieser Zellen die genaue Identifizierung aufgrund von Molekülen, welche exklusiv auf ihrer Zelloberfläche exprimiert werden. Zwar wurden neben CD25 verschiedene Oberflächenmoleküle mit CD4⁺CD25⁺Tregs assoziiert (siehe Tab.1.3), jedoch findet man alle diese Moleküle auch auf verschiedenen

Aktivierungs-, Differenzierungs- und Entwicklungsstadien von konventionellen CD4⁺ T-Zellen wieder^{57;58;70;71;92;96-102}.

Oberflächenmolekül	Quelle
GITR	McHugh et al. 2002 <i>Immunity</i> ⁷⁰ ; Shimizu et al. 2002 <i>Nature Immunology</i> ⁷¹
CD103	Lehmann et al. 2002 <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> ¹⁰³
CTLA-4	Sakaguchi 2004 <i>Annu Rev Immunol</i> ¹⁰⁴
LAG-3	Huang et al. 2004 <i>Immunity</i> ⁹²
CD45RB ^{low}	Read et al 1998 <i>Eur J Immunol</i> ⁹⁷
CD38	Read et al 1998 <i>Eur J Immunol</i> ⁹⁷
CD62L ^{high}	Ermann et al. 2004 <i>Blood</i> ; Herbelin et al. 1998 <i>J Immunol</i> ⁹⁶
DX5	Gonzalez et al 2001 <i>Nat Immunol</i> ¹⁰⁰
Galectin-1	McHugh et al. 2002 <i>Immunity</i> ⁷⁰
OX-40	Valzasina et al. 2004 <i>Blood</i> ⁵⁷ ; Takeda et al. 2004 <i>J Immunol</i> ⁵⁸
4-1BB	Zheng et al 2004 <i>J Immunol</i> ⁵⁶
TNFR2	Annunziato et al. 2002 <i>J Exp Med</i> ¹⁰⁵
PD1	Greenwald et al. 2005 <i>Annu. Rev. Immunol</i> ¹⁰⁶
Neuropilin	Bruder et al. 2004 <i>Eur. J. Immunology</i> ¹⁰²

Tab.1.3: Literaturverzeichnis scheinbar differenziell auf CD4⁺CD25⁺ Tregs exprimierter Oberflächenmoleküle

Alleine der Transkriptionsfaktor FoxP3 wird, verglichen mit konventionellen CD4⁺ T-Zellen, sehr stark von CD4⁺CD25⁺Tregs exprimiert. Mäuse, welche eine natürlich auftretende Mutation im Gen, das für FoxP3 codiert, tragen (*scurfy*-Maus), entwickeln schwere Autoimmunerkrankungen, die sogar verheerender verlaufen, als nach Depletion von CD4⁺CD25⁺Tregs in naiven Mäusen¹⁰⁷. Das entsprechende Analogon beim Menschen wird IPEX-Syndrom (immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome) genannt und führt, genau wie bei der *scurfy*-Maus, zum raschen Tod Neugeborener¹⁰⁸⁻¹¹¹. FoxP3, auch *scurfin* genannt, gehört zur Familie der Forkhead/winged-helix Transkriptionsfaktoren¹⁰⁷. Konventionelle CD4⁺ T-Zellen aus *scurfy*-Mäusen zeigen eine Hyperresponsivität auf TZR-Stimulus, benötigen zu ihrer Aktivierung keine Costimulatorischen Signale und produzieren sehr große Mengen an Interleukin-2 und anderen Cytokinen nach Aktivierung¹¹². Jedoch scheinen, aufgrund des verheerenden Verlaufs der Autoimmunerkrankungen dieser Mäuse, noch weitere Defekte vorzuliegen. Zwar zeigt die *scurfy*-Maus eine stark erhöhte Zahl CD4⁺CD25⁺ T-Zellen, man kann jedoch annehmen, dass diese aktivierte konventionelle CD4⁺ T-Zellen darstellen. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass konventionelle CD4⁺ T-Zellen nach Transduktion mit FoxP3, neben dem anergen Phänotyp und den bisher beschriebenen Oberflächenmolekülen von CD4⁺CD25⁺Tregs, CD4⁺CD25⁺Treg-spezifische regulatorische Eigenschaften *in vitro* und *in vivo* zeigen¹¹³⁻¹¹⁵. Somit scheint FoxP3 ein wichtiger molekularer Schalter für die Entwicklung und Funktion von CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen zu sein.

NFATc2-,NFATc3- doppel-defiziente Mäuse (DKO-Mäuse)

Einen ähnlichen Phenotyp wie *Scurfy*-Mäuse zeigen Mäuse, welche defizient für die Transkriptionsfaktoren NFATc2 und NFATc3 sind (DKO-Mäuse) (siehe Tab.1.4). Diese Mäuse zeigen eine massive Vergrößerung der Milz und Lymphknoten und entwickeln schwere allergische und autoimmune Erkrankungen, darunter Blepharitis und Pneumonitis, an denen sie im Alter von 8-10 Wochen sterben¹¹⁶. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass naive CD4⁺ T-Zellen dieser Mäuse spontan nach Aktivierung große Mengen Th2-spezifischer Cytokine bilden und spontan zu Th2-Zellen differenzieren^{116;117}.

	Scurfy Maus	DKO-Maus
Reaktivität auf TZR-Stimulus	Hyperresponsiv	Hyperresponsiv
Abhängigkeit von Kostimulus	unabhängig	unabhängig
Cytokinexpression nach TZR-Stimulus	Überexpression von IL-2, IL-4, IFN- γ , etc.	Überexpression von TH2-Cytokinen
Phänotyp	Schwere multiple Autoimmunerkrankungen	Schwere multiple Autoimmunerkrankungen
Lebenserwartung	ca. 3-5 Wochen	ca. 7-9 Wochen
Bekannte Defekte	Keine CD4 ⁺ CD25 ⁺ Tregs	Defekte FasL Expression

Tab.1.4: Vergleich der Phänotypen von Scurfy- und DKO-Maus

NFATc2 und NFATc3 (NFAT = Nuclear factor of activated T cell) gehören zur Familie der nuclear factor of activated T cells (NFAT) Transkriptionsfaktoren. Diese Familie wurde das erste mal durch einen induzierbaren Transkriptionsfaktor beschrieben, der in aktivierten T-Zellen an den IL-2 Promoter bindet und besteht mittlerweile aus fünf Mitgliedern: NFATc1 (NFAT2, NFATc), NFATc2 (NFAT1, NFATp), NFATc3 (NFAT4, NFATx), NFATc4 (NFAT3) und NFAT5 (TonEBP), von denen bis auf NFAT5 verschiedene Isoformen bekannt sind (Abb.1.4)¹¹⁸⁻¹²⁰. Bis auf NFATc4 werden alle Mitglieder dieser Familie in Zellen des Immunsystems exprimiert. NFAT-Transkriptionsfaktoren zeigen eine sehr stark konservierte DNA-bindende Domäne (Abb.1.4; RSD), die strukturell eine Verwandtschaft zur DNA-bindenden Domäne der Familie der REL-Transkriptionsfaktoren aufweist. Neben dieser DNA-bindenden Domäne zeigen zumindest alle NFATc-Formen eine Regulationsdomäne. In dieser liegt neben der Transaktivierungsdomäne^{xiii} ein Abschnitt mit mehreren Serin-Resten, welche in ruhenden T-Zellen phosphoryliert sind. Weiterhin enthält dieser Bereich auch die Bindestellen für die aktivierende Phosphatase Calcineurin und weitere Kinasen, die an der Regulation von NFAT beteiligt sind.

^{xiii} Die **Transaktivierungsdomäne** eines Transkriptionsfaktors bindet an den Promoter des Zielgens/ der Zielgene und induziert so deren Transkription.

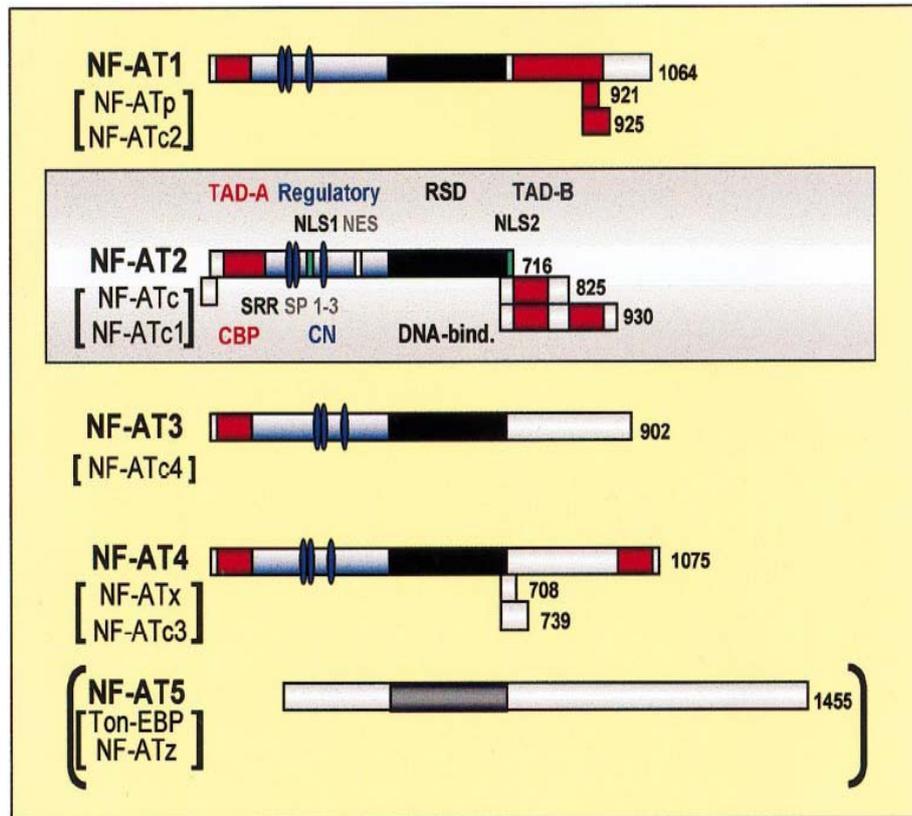


Abb.1.4: Die Familie der NFAT-Transkriptionsfaktoren (Quelle: Serfling et al. 2000 *Biochim Biophys Acta*)

Bis auf NFAT5, welches durch osmotischen Stress aktiviert wird, werden alle vier NFATc-Formen durch Calcium-Influx und dessen Signale aktiviert (Abb.1.5)¹²¹. Wie in Abb.1.5 dargestellt wird nach Stimulation über den TZR die Phospholipase C- γ (PLC- γ) aktiviert. Aktive PLC- γ ist nun in der Lage Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PtdIns(4,5)P₂) zu Inositol-1,4,5-trisphosphat (InsP₃) und diacylglycerol (DAG) zu hydrolysieren. InsP₃ wiederum steuert die Freisetzung und den Influx von Calcium, welches an Calmodulin bindet. Calcium-gebundenes Calmodulin ist in der Lage die Phosphatase Calcineurin zu aktivieren, die durch Dephosphorylierung von NFAT dessen Translokation in den Kern ermöglicht und schließlich zur Transkription NFAT-abhängiger Gene führt¹²²⁻¹²⁶.

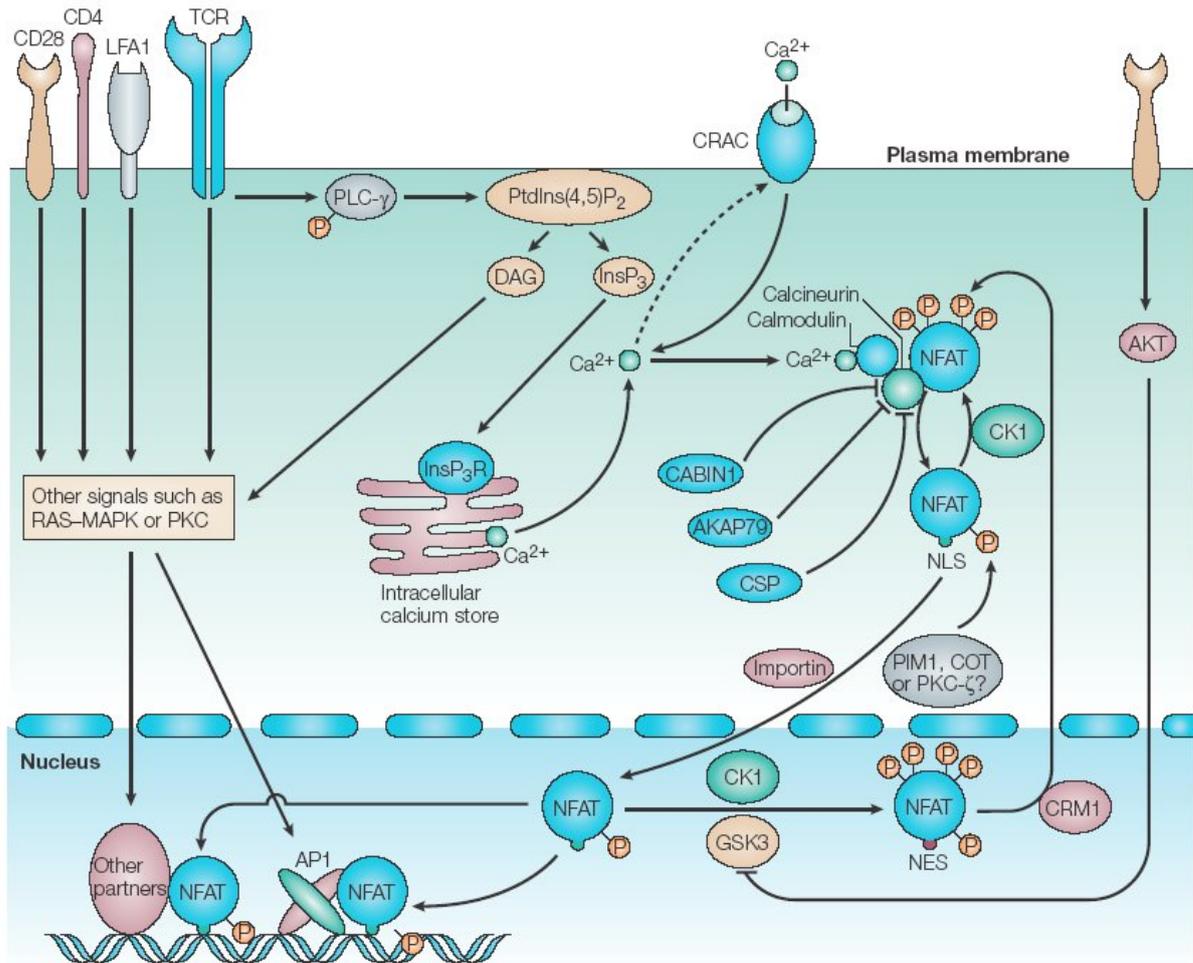


Abb.1.5: Regulation der Aktivierung von NFAT Transkriptionsfaktoren (Quelle: Macian Nature Reviews in Immunology 2005)

Einmal im Kern interagieren NFAT-Transkriptionsfaktoren mit einer Fülle weiterer Transkriptionsfaktoren. Diese Interaktionen zeigen, indem sie verschiedenste Signaltransduktionswege miteinander verbinden, die Komplexität der Genregulation in Zellen des Immunsystems. Die bis heute bekannten Interaktionspartner und deren Zielpromotoren sind in Tab.1.5 zusammengefasst

Interaktionspartner	Promoter	Auswirkung
AP1 (cFOS, cJUN)	Verschiedene Cytokingen-Promotoren	Transaktivierung
C/EBP	PPAR-γPromoter	Transaktivierung
MAF	IL-4 Promoter	Transaktivierung
EGR1 und EGR4	TNF Promoter	Transaktivierung
GATA3	IL-4 3'-Enhancer	Transaktivierung
ICER	Verschiedene Cytokingen-Promotoren	Inhibition
IRF4	IL-4 Promoter	Transaktivierung
MEF2	NUR77 Promoter	Transaktivierung
OCT	IL-3 Enhancer	Transaktivierung
P21 ^{SNFT}	IL-2 Promoter	Inhibition
PPAR-γ	IL-2 Promoter	Inhibition
T-bet	IFN-γ 5'-Enhancer	Transaktivierung

Tab.1.5: Transkriptionelle Interaktionspartner von NFAT-Transkriptionsfaktoren (Quelle: Macian, Nature Reviews in Immunology, June 2005 Volume 5)

Neben der Aktivierung der NFAT-Transkriptionsfaktoren durch einen Calcium-abhängigen Signaltransduktionsweg kennt man heute verschiedene Stufen auf der diese unterbunden werden kann. So wirken Inhibitoren für die Phosphatase Calcineurin inhibitorisch auf die Translokation von NFAT. Zu diesen Inhibitoren zählen das calcineurin-binding-protein1 (CABIN1), das A-Kinase Ankerprotein AKAP79, sowie Mitglieder der sogenannten Calcipressine (z.B. MCIP) ¹²⁷⁻¹³¹. Bei den Kinasen, welche NFAT Phosphorylieren, muss man zwei verschiedene Typen unterscheiden: 1. Erhaltungskinasen, welche im Cytosol die Phosphorylierung von NFAT aufrechterhalten und so dessen Translokation in den Kern in ruhenden Zellen verhindern (z.B. CK1) und 2. Export-Kinasen, die durch Phosphorylierung von NFAT im Kern dessen Translokation ins Cytosol regulieren (z.B. GSK3, CK1) ¹²¹.

Da der größte Teil des Wissens über Transkriptionsfaktoren der NFAT-Familie in verschiedenen Zelllinien generiert wurde, weiß man über deren Funktion in primären murinen und humanen T-Zellen nur sehr wenig. Jedoch konnten Hinweise auf die Bedeutung einzelner NFAT-Transkriptionsfaktoren bei der T-Zellentwicklung, Aktivierung und deren Effektorfunktionen von primären T-Zellen durch Knock-out Mäuse gewonnen werden. Neben der bereits eingangs erwähnten Rolle von NFATc2 und NFATc3 bei der Aktivierung von T-Zellen und der Expression Th2-assoziiierter Gene konnte für weitere NFAT-Faktoren gezeigt werden, dass sie aktiv am Prozess der Anergie beteiligt sind. Man weiß heute, dass eine Stimulation über den TZR in Abwesenheit kostimulatorischer Signale (CD28, GITR, 4-1BB, etc.) zur Anergie von naiven T-Zellen führt^{31;132}. Da die Aktivierung alleine über den TZR zu einem calcium-abhängigen Signaltransduktionsweg führt, der primär in einer NFAT dephosphorylierung (= Aktivierung) resultiert stellt sich die Frage, ob NFAT-Faktoren aktiv an der Induktion von Anergie beteiligt sind¹³³. In diesem Zusammenhang ist eine Arbeit von Macian et al. zu erwähnen, welche eine von NFAT gesteuerte Transkription Anergie-assoziiierter Gene in Abwesenheit von AP1 zeigt¹³³. Im Gegensatz dazu stehen Ergebnisse die eine eindeutige Beteiligung der Phosphatase Calcineurin und damit der Aktivierung von NFAT-Faktoren bei der T-Zellentwicklung im Thymus zeigen¹³⁴⁻¹³⁷. Aufgrund der Redundanz der einzelnen NFAT-Faktoren untereinander bleibt es jedoch schwierig eine exakte Rolle der einzelnen Faktoren bei der T-Zellentwicklung im Thymus auszumachen^{138;139}. Weitere Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Funktion von NFAT-Transkriptionsfaktoren entscheidend durch ihre Interaktionspartner beeinflusst wird¹²¹. So könnte je nach Interaktionspartner die Rolle der verschiedenen NFAT-Faktoren bei so gegensätzlichen Prozessen wie der T-Zellaktivierung und Anergisierung erklärt werden¹²¹. Weshalb jedoch besonders die Transkriptionsfaktoren NFATc2 und NFATc3 eine scheinbar hemmende Funktion auf die Expression verschiedener Gene besitzen und ob dies zumindest teilweise durch verschiedene Bindungspartner bestimmt wird, bleibt unklar.

Interessanterweise zeigen bereits T-Zellen aus Mäusen, welche defizient für NFATc2 sind (NFATc2^{-/-} T-Zellen), eine entkoppelte IL-4 Produktion^{140,141}, wohingegen T-Zellen, welche für NFATc3 defizient sind, dieses Phänomen nicht zeigen. Jedoch zeigen auch diese T-Zellen, genauso wie NFATc2^{-/-} T-Zellen, einen aktivierten Phänotyp¹³⁸. Der Knock-out beider Transkriptionsfaktoren (NFATc2 und NFATc3) resultiert jedoch in einer erheblichen Verstärkung des Phänotyps der NFATc2^{-/-} Mäuse. Zusammengenommen zeigen alle diese Publikationen nicht nur die essentielle Bedeutung von Transkriptionsfaktoren der NFATc-Familie an der T-Zell-Homeostase, sondern implizieren eine mögliche Rolle der Transkriptionsfaktoren NFATc2 und NFATc3 an der Suppression von autoreaktiven CD4⁺ T-Zellen und/oder der Entstehung und Funktion von CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen.

Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war es die molekularbiologischen Mechanismen, welche in konventionellen CD4⁺ T-Zellen nach Kontakt mit CD4⁺CD25⁺Tregs zur Hemmung von Proliferation und Cytokinproduktion führen, näher zu untersuchen. Hierbei sollte neben der Rolle von FoxP3 eine mögliche Beteiligung der Transkriptionsfaktoren NFATc2 und NFATc3 untersucht werden.

2. Material und Methoden

Material

Plastikwaren

Alle Plastikwaren wurden steril bezogen.

Chemikalien

Die hier verwendeten Chemikalien wurden, falls nicht anders angegeben, bei den Firmen Merck (Darmstadt, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland) und Sigma (Steinheim, Deutschland) in p.a. Qualität bezogen.

Puffer, Lösungen und Reagentien

Physiologische Trypanblaulösung

Trypanblau ist ein so genannter Vitalfarbstoff. Tote Zellen werden angefärbt, während lebende Zellen mit intakter Membran den Farbstoff nicht aufnehmen. Mit diesem Farbstoff wurde die Lebendzellzahl in Zellsuspensionen bestimmt. Zu seiner Herstellung wurden die folgenden Lösungen A und B im Verhältnis 5:1 gemischt:

Lösung A: 0,2% Trypanblau (Fa. Roth, Karlsruhe) in VE-Wasser

Lösung B: 4,25% NaCl in VE-Wasser

Rinderserumalbumin (BSA)

BSA-Pulver [Fraktion 5] (Fa. Roche, Mannheim) wurde je nach Anwendung mit PBS [1x] als 0,1-5%ige Lösung angesetzt, sterilfiltriert und bei 4°C aufbewahrt.

Fötiales Kälberserum (FCS):

Das verwendete FCS stammte von der Firma GIBCO (Charge 50G9993X). Es wurde zur Inaktivierung der Komplementkomponenten 45 min bei 56°C im Wasserbad erhitzt und anschließend in 100 ml Aliquoten bei 4°C bis zum Gebrauch aufbewahrt.

PBS (phosphate buffered saline):

Es wurde eine 10-fach konzentrierte Stammlösung in VE-Wasser hergestellt:

1,4M NaCl (81,8 g/l)

0,1M NaH₂PO₄ (15,6 g/l)

Der pH-Wert wurde mit 10N NaOH auf 6,6 eingestellt. Der gebrauchsfertige Puffer [1x] wurde durch Verdünnung (1:10) dieser Stammlösung hergestellt, der pH-Wert betrug dann 7,2. Für die Färbung der Zellen mit CFSE wurde PBS [1x] auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

Gey's Lösung:

Zur Lyse von Erythrozyten durch osmotischen Schock wurde eine 0,83%ige Ammoniumchlorid-Lösung folgender Zusammensetzung verwendet:

8,28g/l NH₄Cl

1g/l KHCO₃

0,037g/l EDTA

DEPC-Wasser

Deionisiertes Wasser wurde über Nacht mit 0,1% (v/v) DEPC gerührt und anschließend autoklaviert.

TRI-Reagent

TRI-Reagent wurde von der Firma MBI-Fermentas bezogen und diente zur Anreinigung gesamter RNA aus T-Zellen. TRI-Reagent wurde hierbei nach den Vorschriften des Herstellers verwendet.

Mitomycin C

Das Mitomycin C wurde von Sigma bezogen und zur Behandlung von A20 Zellen eingesetzt.

TE-Puffer

TE-Puffer dient zum Aufbewahren der DNA. Der hohe pH-Wert verbessert die Löslichkeit der DNA und das EDTA schützt die DNA vor DNase.

10 mM Tris/ HCl (Stammlösung 1/500)
1 mM EDTA pH 8 (Stammlösung 1/200)

dNTP (2'-Desoxynucleosid-5'-Triphosphate) wurden als Set von je 25µmol dATP, dCTP, dGTP und dTTP in einer Konzentration von 100mM (Gibco, Rockville, MD, USA oder MBI Fermentas, Vilnius, Litauen) bezogen. Es wurde eine Stammlösung mit 10mM in H₂O angesetzt und bei -20°C aufbewahrt.

EDTA („disodium ethylenediamine tetraacetic acid“) wurde als 0,5M Stammlösung angesetzt. Der pH wurde mit 10M NaOH auf pH 8 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung autoklaviert.

Hexanukleotide p(dN₆) (Roche Mannheim): 50 OD₂₆₀-Einheiten (=2mg) wurden in 1ml des folgenden Puffers angesetzt:

0,5M Tris/ HCl
0,1M MgCl₂
1 mM DTT
pH 7,5

Die resultierende Stammlösung (2µg/µl) wurde aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt. Die Arbeitslösung hatte eine Konzentration von 20ng/µl.

Oligo(dT)_n wurde von Roche Mannheim bezogen und in einer Konzentration von 100ng/ml verwendet.

CFDASE (CFSE)

5-(und-6)-Carboxyfluoreszein Diacetat, Succinimidyl Ester (5(6)-CFDASE; CFSE) wurde von Molecular Probes Europe BV, Niederlande (C-1157) bezogen und in einer Konzentration von 10 mM in DMSO gelöst. Die Stocklösungen wurden bei -20 °C aufbewahrt.

Reagentien für die Anreinigung von T-Zellpopulationen *ex vivo*

MACS-Puffer

Die MACS-Puffer dienen zur Anreinigung verschiedener T-Zellpopulationen *ex vivo* über das von Miltenyi patentierte MACS-System.

<u>Puffer A</u>	<u>Puffer B</u>
0,5% BSA	0,5% Bsa
0,01% NaN ₃	5mM EDTA
5mM EDTA	
in PBS (1x)	

Streptavidin-Phycoeritrin (SA-PE)

SA-PE wurde von der Firma Pharmingen bezogen und nach den Angaben des Herstellers zur PE-Markierung biotnylierter Antikörper eingesetzt.

Anti-PE-beads

Anti-PE-beads (130-048-801) wurden von der Firma Miltenyi bezogen und nach den Herstellerangaben zur Aufreinigung PE-markierter Zellen über das MACS-System eingesetzt.

Dyna-Beads

Alle folgenden Dyna-Beads wurden von der Firma Dynal bezogen.

Zur Bestimmung der benötigten Dyna-beads Zahlen wurde folgendermaßen vorgegangen: Nach Zellzahlbestimmung wurden 60% der Zellzahl an pan B-Beads und 30% der Zellzahl sowohl von anti MAC 1-Beads, als auch von CD8-Beads zugegeben. Die Markierung erfolgte in einem Endvolumen von 1 ml 0,5% BSA in PBS (1x). Die Depletion wurde in einem 15ml Reaktionsgefäß in einem Dynal-Magneten durchgeführt.

CD8 (Lyt2)-Beads (Prod.Nr. 114.07)

pan B (B220)-Beads (Prod.Nr. 114.01)

anti MAC 1-Beads (CD11b)

Die folgenden Puffer wurden für die Durchführung von ELISAs verwendet:

Kopplungspuffer

0,1M Na₂HPO₄ pH 9,2

Blockpuffer

PBS (1x) + 0,1% BSA

ELISA-Waschpuffer

0,1% Tween 20 (Sigma, Nr.P-1379) in PBS [1x]

BSA-Puffer

PBS (1x) + 0,1% BSA

Gelatine-Puffer

PBS (1x) + 1% Gelatine

Substratpuffer

40mM Zitronensäure

60mM Na₂HPO₄ pH 4,4

Medien für die Zellkultur

Die Medien wurden als Trockensubstanz von der Firma Gibco (Grand Island, USA) bezogen. Alle Medien und Puffer wurden mit voll entsalztem (Millipore-Entmineralisierungsanlage, Millipore, Molsheim, Deutschland) und durch Aktivkohle gereinigtem Wasser (VE-Wasser) angesetzt, sterilfiltriert (0,2 µm Sterilfilter) und bei 4°C aufbewahrt.

IMDM (Iscove's modified Dulbecco's medium):

17,67 g/l IMDM Trockenpulver

3,02 g/l NaHCO₃

1% Penicillin/Streptomycinlösung

5x10⁻⁵M 2-Mercaptoethanol (Serva, Heidelberg, Nr. 28625)

Phenolrot als Indikator

MEM (minimal essential medium):

10,58 g/l MEM-Trockenpulver

4,77 g/l HEPES

Testmedium

IMDM

5% fötales Kälberserum (FCS)

1mM Natrium-pyruvatlösung

2mM Glutaminlösung

Phosphate buffered saline (PBS)

Siehe 2.1.3 Puffer, Lösungen und Reagentien.

Sort-Puffer

PBS (1x) + 4% FCS

Cytokine

Die aufgeführten Cytokine wurden als Standards in den Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) und als Zusätze zu den Stimulationsansätzen naiver CD4⁺ T-Zellen, sowie für deren Differenzierung eingesetzt.

Murines rekombinantes Interleukin-4 (mrIL-4)

Aus transformierten X63Ag8-653 Myelomzellen wurde mrIL-4 gewonnen (Karasuyama, H. and Melchers, F. (1988): Establishment of mouse cell lines which constitutively secrete large quantities of interleukin 2, 3, 4 or 5, using modified cDNA expression vectors. *Eur. J. Immunol.* **18**(1): 97-104) und von Dr. E. Schmitt über Affinitätschromatographie gereinigt. Eine Unit ist als Konzentration definiert, die zur halbmaximalen Proliferationssteigerung der Zell-Linie F4/4K.6 führt.

Murines rekombinantes Interleukin-2

IL-2 wurde als murines rekombinantes IL-2 aus dem Kulturüberstand des mit IL-2-cDNA transfizierten Myeloms X63Ag.653 gewonnen¹⁴². Die Zellen wurden von Dr. F. Melchers zur Verfügung gestellt und die Kulturüberstände von Dr. E. Schmitt bis zur Homogenität gereinigt.

Proleukin

Murines rekombinantes Interferon- γ

IFN- γ wurde von Dr. G. R. Adolf (Ernst-Boehringer-Institut für Arzneimittelforschung, Wien, Österreich) zur Verfügung gestellt.

Antikörper

Antikörper zur Anreinigung muriner T-Zellpopulationen *ex vivo*

H129.19-bio (Ratte-anti-Maus-CD4-biotinyliert)

Der Klon H129.19 wurde von Dr.H.Huber (Hautklinik Mainz) zur Verfügung gestellt [Pierres et al. 1984] und der Antikörper (entsprechend Abschnitt 2.2.7) biotinyliert.

7D4-bio (Ratte-anti-Maus-CD25 biotinyliert)

Der Antikörper 7D4-bio zur Anreinigung CD25+ T-Zellen wurde von der Firma Becton Dickinson bezogen.

DTA-1-FITC (Ziege-anti-Maus-GITR-FITC)

Siehe 2.1.6.3

53-6.7-APC (Ratte-anti-Maus-CD8alpha-APC)

Der Antikörper 53-6.7 wurde von der Firma Becton Dickinson bezogen und diente zur FACS-basierten Aufreinigung von $CD4^+CD25^+CD8^-$ Thymozyten und $CD4^+CD25^{++}GITR^{++}$ T-Zellen. Er wurde zum Färben in einer Konzentration von 0.5µg/ml eingesetzt.

H2Kb-bio (Ratte-anti-Maus H-2K^b)

Der Antikörper wurde von Becton Dickinson bezogen und wurde biotinyliert verwendet. Dazu wurden Zellen in PBS (1x) gefärbt. Die Konzentration des Antikörpers betrug 1µg/ml. Dieser Antikörper wurde zur Bestimmung der Reinheit supprimierter $CD4^+$ T-Zellen nach FACS-basierter Separation von $CD4^+CD25^+$ regulatorischen T-Zellen verwendet.

H2Kd-FITC (Ratte-anti-Maus H-2K^d)

Der Klon H2Kd mit FITC gekoppelt verwendet. Dazu wurden Zellen in PBS (1x) gefärbt. Die Konzentration des Antikörpers betrug 1µg/ml. Dieser Antikörper wurde zur Bestimmung der Reinheit supprimierter $CD4^+$ T-Zellen nach FACS-basierter Separation von $CD4^+CD25^+$ regulatorischen T-Zellen verwendet.

GK1.5-FITC (Ratte-anti-Maus-CD4)

Der Klon GK1.5 wurde von der American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA, TIB 207) bezogen ¹³. Der Antikörper wurde FITC-markiert in einer Konzentration von 1µg/ml eingesetzt.

Antikörper zur Bestimmung von Cytokinkonzentrationen (ELISA)

IL-4-ELISA

BVD4-1D11 und BVD6-24G2 (Ratte-anti-Maus IL-4)

Beide Antikörper wurden von Dr. Anne O'Garra (DNAX Research Institute, Palo Alto, CA, USA) zur Verfügung gestellt. BVD6-24G2 wurde in biotinylierter Form als Sekundärantikörper eingesetzt.

IL-2-ELISA

JES-1A12, JES-5H4 und 90.2 (Ratte-anti-Maus IL-2)

JES6-1A12 sowie JES-5H4 wurden von Dr. A. O'Garra (DNAX Research Institute, Palo Alto, CA, USA) zur Verfügung gestellt. BVD6-24G2 wurde in biotinylierter Form eingesetzt.

Antikörper für die FACS-Analyse

PC61-PerCp (Ratte-anti-Maus-CD25-PerCp)

Der Antikörper PC61 wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff PerCp gekoppelt von der Firma Becton Dickinson bezogen und in einer Konzentration von 0,2µg/ml in PBS (1x) zur Färbung eingesetzt. Bei der Färbung wurden 1×10^6 Zellen pro 50µl PBS (1x) gefärbt. Der Fluoreszenzfarbstoff PerCp ist in der FL-3 detektierbar.

DTA-1-FITC (Ziege-anti-Maus-GITR-FITC)

Der Klon DTA-1 wurde von S.Sakaguchi bezogen und mit Fluoreporter Oregon Green der Firma Molecular Probes mit dem Farbstoff FITC gekoppelt. DTA-1 wurde zur Färbung von Zellen in einer Konzentration von 5µg/ml in PBS (1x) eingesetzt. Bei der Färbung wurden 1×10^6 Zellen pro 50µl PBS (1x) gefärbt. Der Fluoreszenzfarbstoff FITC wird in der FL-1 detektiert.

L3T4-APC (Ratte-anti-Maus-CD4)

Der Antikörper L3T4 wurde mit dem Farbstoff APC gekoppelt von der Firma Becton Dickinson bezogen. Zur Färbung von Zellen wurde der Antikörper in einer Konzentration von 0,5µg/ml in PBS (1x) eingesetzt. Bei der Färbung wurden 1×10^6 Zellen pro 50µl PBS (1x) gefärbt. Der Fluoreszenzfarbstoff APC kann im Kanal FL-4 detektiert werden.

Antikörper zur Stimulation von T-Zellen *ex vivo*

37.51 (Hamster-anti-Maus CD28)

Der Klon 37.51 wurde von Dr. J.P. Allison durch Dr. G. Leclercq (Universität Gent, Belgien) zur Verfügung gestellt. Die Kulturüberstände wurden mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – gefällt. Dann wurde der Antikörper Protein G gereinigt.

145-2C11 (Ratte anti Maus CD3ε)

Der Klon 145-C211 wurde von Dr. J. A. Bluestone (Ben May Institute, Department of Pathology, Chicago, IL, USA) zur Verfügung gestellt.

XMG1.2 (Ratte-anti-Maus IFN-γ)

Der Klon XMG1.2 wurde von Dr. A. O'Garra (DNAX Research Institute, Palo Alto, CA, USA) zur Verfügung gestellt und zur Neutralisierung von endogen gebildetem IFN-γ zur Zellkultur gegeben.

Mäuse

Alle verwendeten Tiere hatten, wenn nicht anders angegeben, den genetischen Hintergrund des Balb/c Stammes. Die NFATc2 und NFATc3 Einzel-Knockout Tiere stammten von L. Glimcher (Harvard University, Boston, MA) und wurden zum Erhalt von NFATc2, NFATc3 Doppel-Knockout Tieren (DKO) verpaart. Die verwendeten Tiere waren im Fall der DKO Tiere bzw. deren Vergleichstiere (WT) zwischen 5 und 6 Wochen alt. Allgemein wurden Tiere zwischen 5 und 10 Wochen Alter verwendet.

Methoden der Zellkultur

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden an einer sterilen Wekbank (Vertikalflow) und mit sterilen Glas- bzw. Plastikmaterialien und Geräten durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem CO₂-Inkubator bei 37°C und 10% CO₂-Gehalt.

Bestimmung der Lebendzellzahl

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurde ein Aliquot der Zellsuspension mit physiologischer Trypanblau-Lösung verdünnt. Dabei färben sich die toten Zellen blau an, während lebende Zellen den Farbstoff aufgrund ihrer intakten Membran nicht aufnehmen. Mittels einer Neubaurzählkammer (Kammertiefe 0,1mm) wurde die Zahl der lebenden Zellen bestimmt. Nach Auszählen von 16 Einzelquadraten ergibt die ermittelte Zahl (N) durch Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor (V) und dem Kammerfaktor (10^4) die Anzahl der lebenden Zellen pro Milliliter ($N \times V \times 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$).

Kultur von A20 B-Tumorzellen

Die Zelllinie A20 ist eine B-Zell-Tumorlinie und diente nach Behandlung mit dem Zellgift Mitomycin C als Antigenpräsentierende Zelle (APC). A20 Zellen wurden in TM 5% FCS bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

Behandlung von A20 mit Mitomycin C

Um die sehr starke Proliferation der B-Tumorzelllinie A20 in Proliferationsassays und anderen Tests zu Verhindern, wurden diese Zellen mit Mitomycin C behandelt. Dazu wurden 2×10^7 A20 Zellen/ ml MEM + 2% FCS mit 60µg Mitomycin C (Endkonzentration 60µg/ml) in einem 50ml Reaktionsgefäß versetzt und 30min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen fünf mal mit je 10ml MEM 2% FCS durch Zentrifugation bei 300xg und Abnahme des Überstandes gewaschen. Schließlich wurde die Zellzahl bestimmt und die gewünschte Zellzahl/ml in TM 5% FCS eingestellt.

Milzzellpräparation

Die Mäuse wurden je nach Anzahl durch Genickbruch oder Vergasung mit CO₂ getötet. Alle folgenden Präparationsschritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Nach der Entnahme der Milz wurde das Organ in kaltem MEM aufbewahrt, dann durch ein feines Metallsieb (60 gauge) gedrückt und die so entstandene Zellsuspension gründlich resuspendiert. Bindegewebsaggregate wurden durch zehninütige Sedimentation und Abziehen des Überstandes mit den nicht sedimentierten Zellen entfernt. Diese wurden 10 min bei 300xg und 4°C zentrifugiert. Das Zellsediment wurde zur Lyse der Erythrocyten für 1min in 1ml Gey's Lösung /1x10⁸ Zellen resuspendiert. Die Lyse wurde durch die Zugabe von doppeltem Volumen MEM + 2% FCS gestoppt, um eine Schädigung anderer Zellen zu verhindern. Nach einer weiteren Zentrifugation wurden die Zellen in MEM + 2% FCS aufgenommen.

Anreinigung von T-Zellpopulationen *ex vivo*

Anreinigung von CD4⁺CD25⁺ Tregs

Materialien/ Reagenzien

MEM

(eagle modified, w/Eagle's satls w/L-Glutamin, W/o NEAA, w/o Na Bicarbonate
Cat. No.: P0451 Batch No.: MO3786P0451 Fa. Vitromex

Vitromex Dulbecco's MEM-DMEM

(w. 4500mg D-Glycose/L, w. L-Glutamin, w/o NaHCO₃ Na-Pyruvat
Cat.No.: 3600010 Ch.-B: MO113

Albumin Bovine Fraktion V

Solution (10%) sterile filtered Fa. Biowest (kat.-Nr., sowie Ch.-Bez. unbekannt)

Serva Pyruvic acid Na-salt

research grade/c₃H₃O₃ Na Art.nr. 15220 Fa. Serva

L(+)-Glutamin puriss.

C₅H₁₀N₂O₃ Art.Nr.: 3772.1 Fa. Roth

PBS 1x 0,2µm

Ansatz aus 10x PBS 1x: 1/10 in H₂O dest

PBS 10x autoklaviert

402g NaCl + 78g NaH₂PO₄ x 2H₂O

Aqua dest (Millipore)

FCS

Fa. Vitromex, Art.Nr.: 9070011 Vh-Bez.: unbekannt

0,1M Na-Pyruvat

in A. dest 0,2µm (siehe unter Serva Pyruvic acid Na-salt)

2-Propanol reinst

Fa. Merck Art.Nr.: 100995 Zum Spülen der Sep.säulen

Testmedium

Isc. + 5% FCS + 1%Gln + 1% Na-Pyruvat

GM-Puffer ("Großer MACSpuffer!") 6°C gekühlt, bzw. RT

PBS 1x 0,2µm + 0,5% BSA + 5mM EDTA + 0,01% NaN₃

PBS1x + 0,5% BSA

PBS 1x + 10% FCS

Natriumazid reinst(NaN₃)

Fa. Merck, Art.Nr.: 2668730

EDTA Dinatriumsalz Dihydrat (Titrierkomplex III)

Fa. Roth Art. Nr. 8043.2

Gey's Lysepuffer

8,29g NH₄Cl + 1,0g KHCO₃ + 0,037 EDTA (s.o.) ad 1l H₂O dest

NH₄Cl p.A.

Fa. Fluka AG Art.Nr. 09700

KHCO₃

A863654 Art.Nr.: 4854 Fa. Merck

Biotin anti mouse CD25 IL2-R alpha-chain, p55

(7D4) 0,5mg/ml Mat.No.: 553070

Batch: 0000045510 Fa. BD

Sa-PE

R-Phycoerythrin-conjugated Steptavidin

Code: 016-110-084 Lot: 58498 1,0ml Jackson ImmunoResearch

anti PE Mikrobeads

2ml Code: 5030707080, Order-Nr.: 130-048-801

Fa. Miltenyi Biotec

Dynabeads Mouse pan B (B220)

2ml ~ 4x10⁸B/ml, Prod.No.: 114.01 LOT:E82100

Dynabeads Mouse CD8 (Lyt2)

2ml~ 4x10⁸B/ml, Prod.No.: 114.07 LOT:E81500

anti MAC 1 Beads Kopplung mit Epoxy Dynalbeads

in 0,1% BSA + PBS 1x 17.06.03 0,474mg/ml

~ 4x10⁸B/ml selbst gekoppelt!

Dynalbeads M-450 Epoxy

2ml ~4x10⁸B/ml Prod.No.: 140.01 LOT: FO8310

MEM + 2% FCS

PBS 1x 0,2µm zum Spülen der Separationssäulen

PBS 1x + 1/1000 Tween 20 zum Spülen der Sep.säulen

Tween 20 Fa. Roth Art-Nr.

Präparierbesteck

Petrischale (größe 94/16) (633102) Fa. Greiner

Einmalspritze Fa. ERSTA PP 1ml Tuberkulin UN Nr. 8410001(bez. über VWR)

Zellsiebe (Fa. Waltraut Steiger)

Pasteurpipetten (ungestopft und gestopft) VWR RI1823 150mm

14ml Röhrchen (188271, 17,0/120mm) Fa. Greiner

50ml Röhrchen (227261, 30,0/115mm) fa. Greiner

Laminar flow hood

CO₂-Inkubator (Fa.Heraeus)

Cell counter system (Neubauer Improved) Fa. Brand0,0025mm²

Pipettboy (Fa. Integra Biosciences) + Pumpe, bzw. akkubetrieben

Pipetten und Spitzen (blau Fa. Roth (2679.1), gelb Fa. Sarstedt(70760002), weiß

Kristallsp. (Fa. Roth)

Zellsiebe der Fa. Falcon Art.Nr.: 352350 70µm Nylon (bez. über VWR)

Pasteurpipetten (ungestopft und gestopft) VWR RI1823 150mm

14ml Röhrchen (188271, 17,0/120mm) Fa. Greiner, blau

50ml Röhrchen (227261, 30,0/115mm) Fa. Greiner, blau

24 well Platten (662160) Fa. Greiner

48 well Platten (3548) Fa. Costar
96 well Platten Flachboden (3598) Fa. Costar
96 well Rundboden (650161) Fa. Greiner
Deckel für 96 well Rundbodenplatte (656161) Fa. Greiner
6 well Platten (657102) Fa. Greiner
FACS-Röhrchen (3502052) Fa. Falcon
Facs Gerät FACScan (Fa. Becton Dickinson)
Schüttler Labor 1042: KS 500 Kika Werk Fa. Janke + Kunkel
Schüttler Labor 1043:KS 250 basic Kika Labortechnik
Zentrifugen:
1042: Multifuge 3 S-R Fa.Heraeus
1043: Multifuge 1.0 R Fa. Hereaus
Wasserbad 37°C Fa. GFL
MIDI MACS der Fa. Miltenyi Biotec
MACS Separation Columns
Art.Nr.: 130-042-401 LOT: 50302 14012, Fa. Miltenyi Biotec
Dynalmagnet

**Vorbereitung der Separationssäulen für die Präparation von
CD4⁺CD25⁺ Tregs**

mit Hilfe der Wasserstrahlpumpe:

Separationssäulen mit 20ml PBS 1x +1/1000 Tween 20spülen

Separationssäulen mit 20ml PBS 1x +spülen

Separationssäulen mit 20ml Isopropanol

Separationssäulen im Flow mit sterilem Stempel und Isopropanol spülen

auf 14ml Röhrchen setzen und mit 5ml PBS 1x + 0,5% BSA spülen

Milzzellpräparation und Herstellung einer Suspension von Zellen aus der Milz

1. Zentrifuge auf 4°C kühlen
2. Maus/Mäuse durch CO₂-Begasung abtöten
3. Vorlegen von x ml (je nach Anzahl der Milzen verschieden) gekühltes MEM + 2% FCS
4. Milz entnehmen und in Milzsieb + Petrischale (94mm) geben
5. Milz vorsichtig mit dem Stempel einer Einmalspritze (1,0ml) in dem Milzsieb zerreiben
6. mit gestopfter Pasteurpipette (150mm) gut resuspendieren, Milzsieb gut spülen und in 14ml Greinerröhrchen überführen, Petrischale mit ca. 2ml MEM + 2% FCS spülen und ebenfalls in 14ml Greinerröhrchen überführen
7. 10'-12' Inkubation im Kühlschrank Bindegewebsstücke absetzen lassen
8. nach der Inkubationszeit Überführen des Überstandes in ein neues 14ml Röhrchen
9. Zentrifugation 1770Upm (ca. 600xg) für 10' zentrifugieren
10. Vorbereiten eines 50ml Greiner Röhrchens mit einem Zellsieb, vorbenetzen des Zellsiebs mit 1,0ml MEM + 2% FCS
11. Absaugen des Überstandes mit Hilfe einer ungestopften Pasteurpipette (150mm)
12. Zugabe von 1ml 37°C vorgewärmten Gey's Lysepuffer/Milz
13. Inkubation für 2'
14. Abstoppen durch Zugabe von MEM + 2% FCS (4-faches Volumen)
15. Aufgeben der Milzzellsuspension über Zellsieb, Spülen des Röhrchens mit 2ml MEM + 2% FCS und ebenfalls über Zellsieb geben, Zellsieb mit 1ml MEM + 2% FCS spülen
16. Zellzahl bestimmen
17. Zentrifugation (600xg) 10', 4°C und abschließendes Absaugen des Überstandes
18. Einstellen der Milzzellen mit GM-Puffer auf 1×10^8 Zellen/ml

Markierung und Anreinigung der CD4⁺CD25⁺ Tregs

1. Zugabe von 7D4bio 5µg/ml in 6°C kalten GM-Puffer, Resuspension mit blauer Eppendorfpipette, Aufbewahren der Spitze.
2. Inkubation im Kühlschrank bei 6°C, 20'.
3. Wegwaschen des nichtgebundenen 7D4bio durch Zugabe von mindestens doppeltem Volumen kalten (6°C) GM-Puffers, mischen.
4. Zentrifugation (600xg) 10', 4°C und abschließendes Absaugen des Überstandes.
5. Wiederholtes Waschen der Milzzellen, mischen.
6. Zentrifugation (600xg) 10', 4°C und abschließendes Absaugen des Überstandes.
7. Zugabe von Sa-PE (1x10⁸ Zellen/ml) in einer Konzentration von 1/400, mischen.
8. Inkubation im Kühlschrank bei 6°C für 20'.
9. In der Zwischenzeit Vorbereitung der Separationssäulen siehe unter 1.2.1.
10. Wegwaschen des nicht-gebundenen 7D4-bio durch Zugabe von x ml kalten (6°C) GM-Puffer, mischen.
11. Zentrifugation (600xg) 10', 4°C und abschließendes Absaugen des Überstandes.
12. Wiederholtes Waschen der Milzzellen, resuspendieren.
13. Zentrifugation (600xg) 10', 4°C und abschließendes Absaugen des Überstandes.
14. Zugabe von 50µl anti PE-Mikrobeads auf 5x10⁸ Zellen in einem Volumen zwischen 1,0-2,0ml kalten GM.-Puffer.
15. Inkubation bei RT für 30', Schüttler.
16. Zugabe von GM-Puffer (je nach Säulenanzahl) EV: 5ml pro Säule/max 5x10⁸ Zellen/Säule.
17. Durchführung eines Zellsiebs (siehe unter 10. und 15., allerdings Durchführung mit GM-Puffer).
18. Aufgeben der markierten Zellen (ml-weise) über LS- Separationssäulen der Fa.Miltenyi (max. 5x10⁸Zellen/Säule/5ml).
19. Spülen des Zellröhrchens mit 2ml RT GM-Puffer und komplett auf Säule aufgeben.

20. Spülen der Separationssäulen mit 3ml RT GM-Puffer 2x, Durchlauf zur Aufreinigung der CD4⁺ Zellen verwenden.
21. Säule aus Magnetfeld nehmen und auf ein 14ml Röhrchen setzen.
22. Aufgeben von 5ml RT GM-Puffer und Elution der gebundenen Zellen mit einem sterilen Stempel, Eluate vereinigen und erneut über neue Säulen geben (18.-21.).
23. Zellzahl bestimmen.

Entfernen der CD8⁺ T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen mit Hilfe von Dynalbeads

1. mit 30%iger Verunreinigung, davon 50 % B-Zellen- 4fache Menge an anti B220 Beads, doppelte Menge an anti-MAC1 Beads und dreifache Menge an anti-CD8 Beads zugeben in einem Endvolumen von 1ml in 0,5%BSA/1xPBS zugeben.
2. 20min auf Rüttler.
3. Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von 8ml 1xPBS/10% FCS.
4. Röhrchen in Magneten stellen und zwei Minuten warten.
5. Vorsichtiges Abziehen der sauberen CD25⁺ mit steriler Pasteurpipette und in neues Röhrchen überführen.
6. Röhrchen erneut mit 8ml 1x PBS/10% FCS füllen und resuspendieren.
7. Röhrchen in Magneten stellen und 2 Minuten warten.
8. Vorsichtiges Abziehen der sauberen CD25⁺ mit steriler Pasteurpipette .
9. Zentrifugation (600xg) 10', 4°C und abschließendes Absaugen des Überstandes.
10. Zugabe von Testmedium (abhängig von Zellzahl), resuspendieren, Zellzahlbestimmung.
11. Zentrifugation (600xg) 10', 4°C.
12. Je nach weiterer Verwendung Zellzahl in TM 5% FCS eingestellt.

Anreinigung von CD4⁺CD25⁻ T-Zellen

Die Anreinigung der CD4⁺ T-Zellen erfolgt aus dem 1. Durchlauf der Anreinigung der CD25⁺ T-Zellen.

Vorbereitung der Separationssäulen für den CD4⁺ Sort

mit Hilfe der Wasserstrahlpumpe:

1. Separationssäulen mit 20ml PBS 1x +1/1000 Tween 20 spülen
2. Separationssäulen mit 20ml PBS 1x spülen
3. Separationssäulen mit 20ml Isopropanol spülen
4. Separationssäulen im Flow mit sterilem Stempel und Isopropanol spülen
5. auf 14ml Röhrchen setzen und mit 5ml PBS 1x + 0,5% BSA spülen

Aufreinigung der CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus dem 1. Durchlauf der CD4⁺CD25⁺ Treg-Präparation

1. Zellen mit kaltem GM-Puffer auf 1×10^8 Zellen/ml einstellen
2. Zugabe von Antikörper H129.19 bio, so dass Konzentration $0,5 \mu\text{g/ml}$
3. 12 min. Inkubation bei 4°C im Kühlschrank
4. 2x waschen mit GM-Puffer
5. Zellen wieder auf 1×10^8 Zellen/ml einstellen (s. 1)
6. Zugabe von Streptavidin-Beads 1/40
7. 10 min Inkubation im Kühlschrank
8. Zellen mit GM-Puffer so einstellen, daß maximal 5×10^8 Zellen/5ml
9. Zellsuspension ml-weiße über Säule geben
10. Spülen des Zellröhrchens mit 2ml RT GM-Puffer und komplett auf Säule aufgeben
11. Spülen der Separationssäulen mit 3ml RT GM-Puffer 2x
12. Säule aus Magnetfeld nehmen und auf ein 14ml Röhrchen setzen
13. Aufgeben von 5ml RT GM-Puffer und Elution der gebundenen Zellen mit einem sterilen Stempel, Eluate vereinigen, zentrifugieren und in GM-Puffer aufnehmen (5ml/Säule, 1 Säule weniger als beim ersten Lauf) und erneut über neue Säulen geben
14. Ein Aliquot (2×10^5 Zellen mit GK1.5FITC färben und 3C7-PE facsen → CD25-Verunreinigung bestimmen!

15. Zugabe von Testmedium (abhängig von Zellzahl), resuspendieren, Zellzahlbestimmung
16. Zentrifugation (600xg) 10', 4°C.
17. Zellzahl in TM 5% FCS einstellen.

Färbung von T-Zellen mit CFDASE

Um sowohl die Proliferation durch Abnahme des Vitalfarbstoff CFSE im FACS zu bestimmen, als auch Zellen für eine folgende FACS-basierte Separation zu markieren, wurden CD4⁺CD25⁻ T-Zellen nach folgendem Protokoll mit CFDASE gefärbt:

1. Zellen 2 x in PBS 1x pH 7,4 waschen.
2. Bestimmung der Zellzahl
3. Maximal 4x10⁷ Zellen in 2ml (2x10⁷/ ml) in PBS 1x pH 7,4 aufnehmen
4. CFSE (Stocklösung 10mM) auf 5µM in 2ml PBS pH 7,4 einstellen.
5. Die CFSE-Arbeitslösung (5µM; 2ml) 1:1 mit den Zellen in PBS 1x pH 7,4 (2ml) mischen (Endkonz._{CFSE} 2,5µM; 4ml)
6. 4 min 37°C, 5%CO₂ (Brutschrank).
7. Mit mind. 2-fachem Volumen (8ml) TM 10% FCS abstoppen/ resuspendieren.
8. 1 x waschen der Zellen in TM 10% FCS.
9. 1x waschen der Zellen mit TM 5% FCS
10. Bestimmung der Zellzahl.

Stimulation von T-Zellen

In vitro können T-Zellen durch Quervernetzung der T-Zell-Rezeptor-assoziierten CD3-Komplexe mittels Antikörper stimuliert werden. Die Kostimulation über CD28 spielt dabei eine wichtige Rolle. Für eine antigenspezifische Stimulation der verwendeten BALB/c CD4⁺ T-Zellen oder CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T- Zellen wurde der anti-CD3-Antikörper (145-2C11) in einer Konzentration von 3 µg/ ml und Mytomycin C-behandelte A20 im Verhältnis 1/ 10 zur Zellzahl der CD4⁺CD25⁻ T-Zellen in 1 ml Testmedium (24 well-plate) oder 200µl Testmedium (96 well-plate) eingesetzt. Bei der Stimulation unter Th2- Bedingungen wurden 300 U/ ml Interleukin- 4 und 20 µg/ ml α- IFN- γ zugegeben. Die Zellen wurden in einer

Gesamtzellzahl von 2×10^6 in den Wells einer 24-well-Platte bzw. 4×10^5 (96 well-plate Flachboden) und 4×10^4 (96 well-plate Rundboden) stimuliert.

Im Falle eines Proliferationsassays wurde nach 96 Stunden Stimulation $0,5 \mu\text{Ci}/\text{Well}$ ^3H -Thymidin zugegeben. Nach weiteren 18 Stunden Stimulation wurde die Proliferation anhand des ^3H -Thymidin-Einbaus durch Beta-Scintillationszählung gemessen.

Proliferations- und Suppressionsassay

Um die Hemmung der Proliferation aktivierter CD4^+ T-Zellen durch $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ regulatorische T-Zellen zu untersuchen, wurden die CD4^+ T-Zellen (je 1×10^5) in Gegenwart von $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ regulatorischen T-Zellen (1×10^5) bzw. alleine (2×10^5) mit $3 \mu\text{g}/\text{ml}$ anti-CD3-Antikörper und $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ anti-CD28 in einer 96-well-Platte, je nach Proliferation über 3 bis 4 Tage in einem Gesamtvolumen von $200 \mu\text{l}$ Testmedium stimuliert. Die Proliferation wurde direkt über den Einbau von radioaktivem ^3H -Thymidin in die DNA der sich teilenden Zellen bestimmt. Dazu wurden die Zellen in den letzten 18 Stunden der Stimulation mit $0,2 \mu\text{Ci}$ ^3H -Thymidin/Well versetzt. Anschließend wurde die 96-well-Platte eingefroren, um einen weiteren Einbau von ^3H -Thymidin zu verhindern. Zum Messen der Proliferationsrate wurden die Platten wieder aufgetaut und der Inhalt der einzelnen Wells mit Hilfe eines speziellen Erntegerätes (Cell Harvester 1295-001, LKB, Freiburg) durch einen Glasfilter gesaugt, wobei die DNA auf dem Filter zurückgehalten wurde. Der Glasfaserfilter wurde 2 min in einer Mikrowelle (850 W) getrocknet und zusammen mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit in einem Plastikbeutel eingeschweißt. Die Messung der Radioaktivität erfolgte in einem beta-Szintillationszähler (LKB, Freiburg). Dabei wird die vom radioaktiven Präparat ausgesandte β -Strahlung über die Anregung von Lösungsmittelmolekülen auf einem primären Szintillator übertragen, der die Energie in Form von elektromagnetischer Strahlung freigibt. Diese wiederum wird vom Szintillationszähler über eine Photozelle elektrisch als Lichtimpuls verarbeitet und als Impuls pro Minute (cpm)n angegeben.

Voraktivierung von CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen (preTregs)

Um CD4⁺CD25⁺ regulatorische T-Zellen in vitro vor zu aktivieren wurden 24-well-Platten mit einer Mischung aus anti-CD3-Antikörper (145-2C11, 3 µg/ ml) und anti-CD28-Antikörper (37.51, 10 µg/ ml) beschichtet und 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Platten zweimal mit PBS [1x] gewaschen und die Zellen (Endkonzentration 1 x 10⁶) eingesetzt.

Differenzierung von Th2-Zellen

Zur Differenzierung von Th2 Zellen wurden 24-well-Platten mit einer Mischung aus anti-CD3-Antikörper (145-2C11, 3 µg/ ml) und anti- CD28-Antikörper (37.51, 10 µg/ ml) beschichtet und 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Platten zweimal mit PBS [1x] gewaschen. Die frisch isolierten naiven CD4⁺CD25⁻ T-Zellen wurden in Gegenwart von 300 U/ml rekombinatem murinen IL-4 und 10µg/ml XMG1.2 (anti-IFN-gamma) für 6 Tage stimuliert. An Tag drei wurden die Zellen vom Stimulus genommen und mit Th2-Medium gefüttert. An Tag 6 wurden die Zellen als Th2-Zellen eingesetzt.

Separation von CD4⁺CD25⁻ bzw. Th2-Zellen nach Kokultur mit CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen oder preTregs

Nach Kokultur mit CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen oder preTregs wurden die Zellen bei 600 x g abzentrifugiert und in PBS (1x) + 4 % FCS resuspendiert. Die Separation der Zellen wurde, wie im Ergebnisteil beschrieben, mit einem FACScan mit Sortereinheit durchgeführt.

Aufreinigung CD4⁺CD25⁺CD8⁻ Thymozyten

Nach Aufreinigung von CD25⁺ Zellen aus den Thymi von Mäusen nach „Anreinigung von CD25⁺ Zellen“ wurden diese Zellen mit einem Antikörper gegen das CD4 Molekül (GK1.5-FITC) und mit einem Antikörper gegen das Molekül CD8 (Lyt2-APC) gefärbt und die CD4⁺CD25⁺CD8⁻ Thymozyten mittels eines FACS-Vantage aufgereinigt.

Aufreinigung von CD4⁺CD25⁺GITR⁺ T-Zellen

Nach Aufreinigung von CD25⁺ Zellen aus den Milzen von Mäusen nach „Anreinigung von CD25⁺ Zellen“ wurden diese Zellen mit einem Antikörper gegen das Molekül GITR (DTA-1-FITC) gefärbt und die CD4⁺CD25⁺GITR⁺ entsprechend der Angaben im Ergebnisteil auf einem FACS-Vantage aufgereinigt.

ELISA

Der quantitative Nachweis sezernierter Cytokine (IL-4 und IL-2) in Kulturüberständen erfolgte durch spezifische ELISA. Die ELISA wurden nach der Sandwichmethode (indirekt) durchgeführt. Alle Proben wurden als Verdünnungsreihe auf die ELISA-Platten aufgegeben und auf jeder Platte wurde ein bekannter Standard als Referenz zum Einstellen einer Eichgeraden mitgeführt. Die Auswertung der photometrischen Messung erfolgte im Tabellenkalkulationsprogramm Excel (Microsoft Corp., Redmont, WA, USA) mit Hilfe eines Makros, für dessen Entwicklung wesentlich S. Jin (Institut für Immunologie, Uni-Mainz) verantwortlich war.

ELISAs zur Bestimmung von Cytokinen

Die Beschichtung der Mikrotiterplatten mit dem Primärantikörper erfolgte durch eine 24-stündige Inkubation bei 4°C (50µl/well). Im Fall von ELISAs zur Bestimmung von IL-4 dauerte die Inkubation mit dem Primärantikörper nur eine Stunde bei 37°C. Nach Ausklopfen der Lösung wurden freie Bindungsstellen der Mikrotiterplatten durch Zugabe von Blockpuffer (50µl/ml) für eine Stunde bei 37°C abgesättigt. Nach dreimaligem Waschen mit ELISA-Waschpuffer wurden die Überstände und eine definierte Cytokin-Positivkontrolle in BSA-Puffer 1:2 titriert (50µl/well) und für eine Stunde bei 37°C in den antikörperbeschichteten Wells inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten folgte eine einstündige Inkubation mit dem biotinyliertem Sekundärantikörper (50µl/well). Die überschüssigen Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen entfernt und das mit Peroxidase gekoppelte Streptavidin (Boehringer Mannheim, Nr. 10890153) in einer Verdünnung von 1:10.000 in BSA-Puffer zugegeben (50µl/well). Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C und drei weiteren Waschschrritten wurde die

Substratlösung (ABTS=2,2-Azino-bis(3-Ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)) 1mg/ml + 0,0075% H₂O₂ in Citratpuffer, 50µl/well) zugegeben.

Cytokin	Primärantikörper	Sekundärantikörper	Positivkontrolle
IL-2	JES-1A12	JES-5H4-bio 90.2	mrIL-2
IL-4	BVD4-1D11	BVD6-24G2-bio	mrIL-4

Analysen mit dem FACS

Die Bestimmung der Reinheit separierter CD4⁺ T-Zellen wurde mit dem FACScan durchgeführt. Dazu wurden die CD4⁺ T-Zellen mit spezifischen Antikörpern, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt waren, gefärbt. Die Separation CFSE- markierter CD4⁺ T- Zellen erfolgte durch einen FACS-Vantage mit „Sortvorrichtung“ (Fluorescence Activated Cell Sorter).

Zur Bestimmung der CD4⁺CD25⁺⁺GITR⁺⁺ wurden Milzzellen mit den Antikörpern DTA-1, L3T4, Lyt2 und PC61 oder 7D4 gefärbt.

Molekularbiologische Methoden

Oligonucleotide

Oligonucleotide zum Nachweis verschiedener cDNAs in der PCR (Primer) wurden, wenn nicht anders angegeben, von der Firma Roth (Karlsruhe) bezogen, in einer Konzentration von 100 pmol/ µl in TE-Puffer gelöst und bei -20°C aufbewahrt. Die Primer wurden in einer Konzentration von 5 pmol/ µl in die PCR eingesetzt. Die Primersequenzen sind unter den jeweiligen Punkten aufgeführt.

Präparation von RNA aus T-Zellen

Zur Anreinigung der gesamten RNA aus Zellen wurde TRI-Reagent der Firma MBI Fermentas verwendet. Dabei wurde genau nach den Herstellerangaben vorgegangen.

Enzyme

Alle Enzyme wurden, falls nicht anders erwähnt, in den entsprechenden Puffern der Firma New England Biolabs (Schwalbach) bezogen und bei -20°C aufbewahrt.

Taq (*Thermus aquaticus*) DNA-Polymerase (PanScript DNA-Polymerase) wurde als natives Enzym, isoliert aus *Thermus aquaticus*YT1, von PanSystems (Nürnberg) in einer Konzentration von $5\text{U}/\mu\text{l}$ bezogen.

Reverse Transkription der mRNA in cDNA

Beim Oligo(dT)_n -Priming entsteht durch die Reaktion des Oligo(dT)_n mit dem Poly(A)-Schwanz des mRNA-Moleküls ein kurzer doppelsträngiger Nucleinsäurebereich, der von der reversen Transkriptase als Starter für die Erststrangsynthese benötigt wird. Diese Vorgehensweise garantiert, dass die Synthese der cDNA in der Nähe des 3`-Endes der mRNA beginnt. Ein Nachteil dieser Methode ist jedoch, dass die Effizienz mit zunehmendem Abstand des zu amplifizierenden Bereichs vom 3`-Ende der mRNA abnimmt. Beim Random-Priming hingegen verwendet man ein Gemisch aus Hexanucleotiden aller theoretisch denkbaren Sequenzabfolgen. Die Verwendung dieser p(dN)_6 -Mischung bewirkt, daß die Einzelstrangsynthese an vielen Stellen der zu kopierenden mRNA initiiert wird. Dadurch wird garantiert, dass alle mRNA-Sequenzen aus einer heterologen Population gleichmäßig in der erhaltenen Mischung von cDNA-Molekülen repräsentiert sind, weil Sequenzen vom 3`-Ende nicht, wie beim Oligo(dT)_n -Priming, begünstigt werden. Ein Nachteil ist jedoch, daß meist der Anteil vollständig kopierter mRNA-Moleküle sinkt. Um die Vorteile beider Verfahren zu nutzen, wurde eine Mischung aus Oligo(dT)_n - und p(dN)_6 -Primern verwendet:

3 μg RNA
3 μl p(dN)_6 [20ng/ μl]
1 μl Oligo(dT)_n [100ng/ μl]
mit DEPC-Wasser auf 15 μl auffüllen

Zur Denaturierung der RNA wurde diese Mischung bei 70°C für 5 min im Thermocycler inkubiert und anschließend die folgenden Reagentien hinzugefügt:

- 1,5µl dNTP [10mM]
- 3 µl DTT [0,1M]
- 6 µl Puffer [5x]
- 3,5µl DEPC-H₂O
- 1 µl M-MLV (RTase)

Optional wurden 0,5ml Ribonuclease-Inhibitor [40U/µl] zugegeben. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für eine Stunde im Wasserbad.

Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Bei der Polymerase-Kettenreaktion kommt es durch Wiederholung der Reaktionsfolge aus DNA-Denaturierung, Hybridisierung der Primer und der Auffüllreaktion nach jedem Reaktionsschritt zu einer Verdopplung der DNA und damit in einer Kettenreaktion zu einer exponentiellen, selektiven, etwa 10⁶-10⁷-fachen Anreicherung der durch die Oligonucleotide flankierenden DNA-Sequenzen. In dieser Arbeit wurden ausschließlich semiquantitative Realtime-PCRs durchgeführt. Hierzu wurden in Triplikaten die mRNAs von IL-2, IL-4, FoxP3 und TGF-βRII unter Verwendung von IQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad) auf einem iCycler (Bio-Rad) durchgeführt. Nach Normalisierung der erhaltenen Werte für IL-2, IL-4, FoxP3 und TGF-βRII entsprechend der erhaltenen Werte für EF1a wurden die relativen Expressionslevel berechnet.

Zum Nachweis von IL-2 mRNA, IL-4 mRNA, TGF-beta Rezeptor II mRNA (TGF-bRII mRNA), FoxP3 mRNA und Elongationsfaktor 1 alpha mRNA (EF1a mRNA) wurden folgende Oligonukleotide verwendet. Diese Oligonukleotide wurden so ausgewählt, dass sie zumindest ein Intron auf Ebene genomischer DNA umspannen, um die Amplifikation genomischer DNA auszuschließen:

mFoxP3.for	5'-CAGCTGCCTACAGTGCCCCTAG-3'
mFoxP3.rev	5'-CATTTGCCAGCAGTGGGTAG-3'
mIL- 2.for	5'-ATGTACAGGATGCAACTCCTGTCTT-3'
mIL-2.rev	5'-GTCAGTGTTGAGATGATGCTTTGAC-3'
mIL- 4.for	5'-GCATGGTGGCTCAGTACTACGAGTA-3'
mIL-4.rev	5'-GAATGTACCAGGAGCCATATCCACG-3'
mTGF-bRII.for	5'-CTCCAAGTGTGTCATGAAG-3'
mTGF-bRII.rev	5'-TGGACACGGTAGCAGTAGAA-3'
EF1a.for	5'-GATTACAGGGACATCTCAGGCTG-3'
EF1a.rev	5'-TATCTCTTCTGGCTGTAGGGTGG-3'

Chromatin Immuno-Präzipitation (ChIP)

Frisch isolierte und aktivierte CD4⁺CD25⁺ regulatorische T-Zellen und konventionelle CD4⁺ T-Zellen wurden für 7 min bei Raumtemperatur mit einer 1%igen Formaldehyd-Lösung fixiert. Um überschüssiges Formaldehyd zu neutralisieren, wurde Glycin bis zu einer Endkonzentration von 125mM zugegeben und 5 min inkubiert. Nach zwei Waschschrinen mit kaltem PBS (1x) wurden die Zellen in Lyse-Puffer (25 mM HEPES, pH 7.8, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.5% NP-40 und Protease-inhibitoren) für 15 min auf Eis inkubiert. Die so erhaltenen Zellkerne wurden pelletiert und in „Sonification-buffer“ (50 mM HEPES, pH 7.9, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1 % SDS, 0.1 % sodium deoxycholat und Protease-inhibitoren) resuspendiert. Zur Degradierung des Chromatins wurde die Suspension 15- bis 18-mal durch einen Bandelin SONOPLUS UW2070 (bei 20%) sonifiziert. Dabei wurde nach jedem Schritt die Probe für eine Minute auf Eis gekühlt. Um eine unspezifische Präzipitation zu vermeiden wurden die so erhaltenen Proben mit Protein-A-Sepharose und „salmon sperm DNA“ (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) inkubiert. Vor Zugabe der spezifischen Antikörper wurde ein Aliquot des Chromatin als so genannte „Input control“ genommen. 100µg Chromatin wurden in einem Endvolumen von 300µl mit 10µg eines, in unserem Labor generierten, polyklonalen Kanninchen Antikörpers gegen murines FoxP3 inkubiert und die so entstandenen Immunkomplexe wurden mittels Protein-A-Sepharose. Nach zweimaligem Waschen mit „sonification buffer“, „high salt buffer“ (50 mM HEPES, pH 7.9, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % Triton X-100, 0.1 % sodium deoxycholate and 0.1 % SDS), „LiCl buffer“ (20 mM Tris, pH 8, 250 mM LiCl, 1 mM EDTA, 0.5 % NP-40, 0.5 % sodium deoxycholate) und TE (20 mM Tris, pH 8, 1 mM EDTA) wurden die Komplexe mit 1% SDS in TE eluiert. Die Formaldehyd-Fixierung wurde anschließend durch Inkubation in 200mM NaCl über Nacht entfernt. Nach Proteinase K- und RNase A-Behandlung bei 55°C wurde die DNA mittels Phenol/ Chloroform-Extraktion gereinigt und durch Zugabe von Ethanol präzipitiert.

Ungefähr ein Zehntel der so erhaltenen DNA und der „input control“ wurde in der PCR unter Verwendung folgender Oligonucleotide auf das Vorhandensein von IL-4 Promoter, IL-4 Enhancer und IL-2 Promoter untersucht:

IL-4Promoter: forward 5'-CAATAGCTCTGTGCCGTCAGTG-3'
reverse 5'-AAAGGCCGATTATGGTGTAATTTTC-3'

IL-4 Enhancer: forward 5'-AGGGCACTTAAACATTGC-3'
reverse 5'-ACGCCTAAGCACAATTCC-3'

IL-2 Promoter: forward 5'-CCTGTGTGCAATTAGCTCA-3'
reverse 5'-CTCTTCTGATGACTCTCTGGA-3'

Zur Detektion der PCR-Produkte wurde die Reaktion in Gegenwart von 2 μ Ci [α -32]dCTP durchgeführt. Nach Separation der PCR-Produkte mittels PAGE, wurden die einzelnen Produkte durch Autoradiographie detektiert.

3. Ergebnisse

3.1 Mäuse, welche defizient für die Transkriptionsfaktoren NFATc2 und NFATc3 sind (DKO-Mäuse), zeigen eine gestörte T-Zell-Homöostase

Fehlen Mäusen die Transkriptionsfaktoren NFATc2 und NFATc3, so entwickeln diese Mäuse schwere Autoimmunerkrankungen, die durch eine massive Lymphadenopathie, schwere Blepharitis, Pneumonitis und Splenomegalie charakterisiert sind und letztendlich zum Tod dieser Mäuse im Alter von acht bis zehn Wochen führen. Bei diesen Erkrankungen scheinen besonders T-Zellen eine wesentliche Rolle zu spielen, da sowohl die CD4⁺ T-Zellen, als auch die CD8⁺ T-Zellen dieser Mäuse einen aktivierten Phänotyp (CD25⁺, CD69⁺, CD44⁺) zeigen und auf T-Zellrezeptor(TZR)-vermittelte Stimulation hyperresponsiv reagieren. Diese Hyperreaktivität äußert sich darin, dass sie alleine über ihren TZR, kostimulus-unabhängig, aktiviert werden können und dann große Mengen verschiedener Cytokine produzieren.

3.1.1 Charakterisierung der peripheren CD4⁺CD25⁻ und CD4⁺CD25⁺ T-Zellpopulationen aus DKO-Mäusen

Die Zahl der peripheren CD4⁺CD25⁺ T-Zellen ist in DKO-Mäusen stark erhöht

In gesunden, unter SPF-Bedingungen^{xiv} gehaltenen Wildtyp Mäusen (genetischer Hintergrund: BALB/c) umfassen CD4⁺CD25⁺ T-Zellen zwischen 5-10% der peripheren CD4⁺ T-Zellen. Isoliert man diese CD4⁺CD25⁺ T-Zellen, so zeigen sie gegenüber konventionellen CD4⁺CD25⁻ T-Zellen nach Aktivierung über ihren TZR suppressive Eigenschaften und werden deshalb auch als CD4⁺CD25⁺ regulatorische T-Zellen (CD4⁺CD25⁺ Tregs) bezeichnet. Da jedoch CD25 auch nach Aktivierung auf konventionellen CD4⁺ T-Zellen exprimiert wird, können CD4⁺CD25⁺ T-Zellen nicht *per definitionem* als CD4⁺CD25⁺ Tregs bezeichnet werden. Bis heute kennt man keinen exklusiven Oberflächenmarker für CD4⁺CD25⁺ Tregs, so dass diese Zellen alleine aufgrund ihrer suppressiven Eigenschaften charakterisiert und identifiziert werden können. In einer ersten, quantitativen Untersuchung der peripheren CD4⁺CD25⁻ und CD4⁺CD25⁺

^{xiv} Unter **SPF-Bedingungen** versteht man die Haltung von Versuchstieren unter definierten, pathogenfreien (**s**pecial **p**athogen **f**ree)Bedingungen. Hierbei wird standardisiert auf eine eingeschränkte Zahl spezieller Pathogene getestet.

T-Zellpopulationen wurden Milzzellen von Mäusen, welche defizient für die Transkriptionsfaktoren NFATc2 und NFATc3 waren (DKO-Mäuse) und von Wildtyp Mäusen (WT-Mäuse) mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen CD4 und CD25 gefärbt und mittels FACS analysiert.

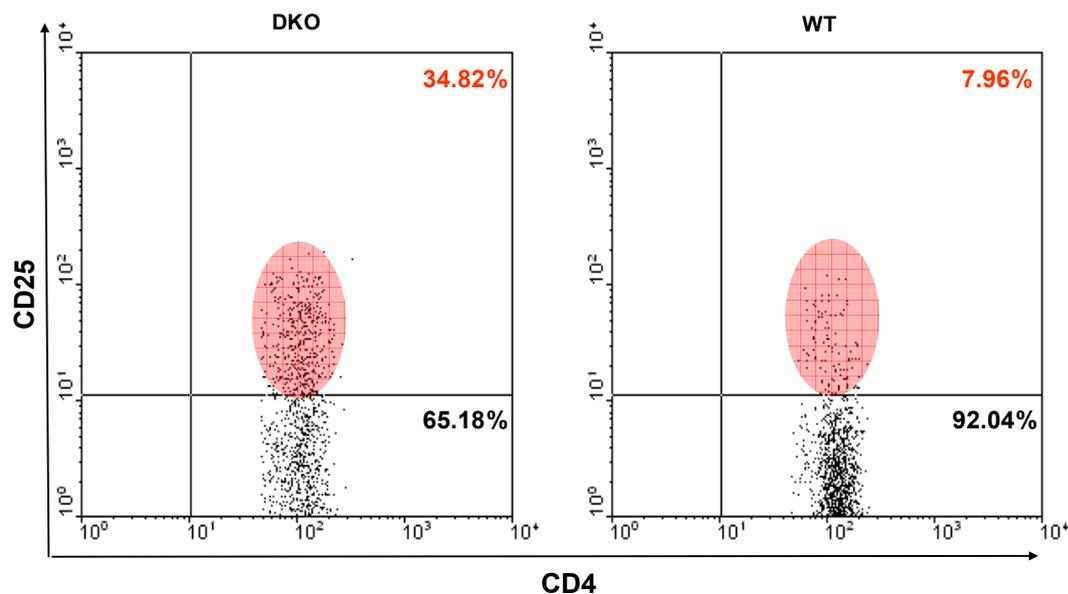


Abb.3.1: Die Zahl der peripheren CD4⁺CD25⁺ T-Zellen ist in DKO Mäusen stark erhöht.

Um die Zahl der peripheren CD4⁺CD25⁺ T-Zellen zu bestimmen, wurden FACS-Analysen von Milzzellen sowohl aus 6 Wochen alten DKO-Mäusen, als auch aus gleichaltrigen WT-Mäusen durchgeführt. Verglichen mit den CD4⁺ T-Zellen aus WT-Mäusen (WT), bei denen die Zahl der CD25⁺ T-Zellen bei ca. 8% liegt, zeigen die DKO-Mäuse eine deutliche erhöhte Zahl an peripheren CD4⁺CD25⁺ T-Zellen (DKO).

Wie in Abb. 3.1 gezeigt, ist die Zahl der CD4⁺CD25⁺ T-Zellen in 6 Wochen alten DKO-Mäusen im Vergleich zu gleichaltrigen WT-Mäusen stark erhöht. Die Zahl der CD25⁺ T-Zellen steigt in diesen Tieren mit Zunahme des Alters bis zu ihrem Tod im Alter von 8-10 Wochen kontinuierlich auf ca. 60% an (nicht gezeigte Daten). Da diese Zunahme mit der Ausprägung des autoimmunen Phänotyps der DKO-Mäuse einhergeht, kann angenommen werden, dass zumindest ein Großteil dieser Zellen aktivierte konventionelle CD4⁺ T-Zellen darstellen, die ebenfalls CD25 exprimieren. Um nun diese Vermutung zu prüfen, wurden von

DKO-Mäusen $CD4^+CD25^+$ T-Zellen mittels MACS isoliert und ihre Fähigkeit untersucht, die Proliferation kokultivierter autologer $CD4^+CD25^-$ T-Zellen zu supprimieren. Als Positivkontrolle dienten die entsprechenden T-Zell-Präparationen von WT-Mäusen.

$CD4^+CD25^+$ T-Zellen aus DKO-Mäusen zeigen keine suppressiven Eigenschaften

Um das suppressive Potenzial einer Population regulatorischer T-Zellen zu bestimmen, kann man durch Veränderung des Verhältnisses von regulatorischer T-Zelle zu konventioneller T-Zelle das Verhältnis bestimmen, bei der eine halbmaximale Suppression vorliegt. Um also das suppressive Potenzial von $CD4^+CD25^+$ Tregs aus Wildtyp-Mäusen zu testen, wurden diese Zellen in abnehmender Zellzahl in einem Proliferations-Test alleine und in Gegenwart einer konstanten Anzahl von konventionellen $CD4^+CD25^-$ T-Zellen stimuliert.

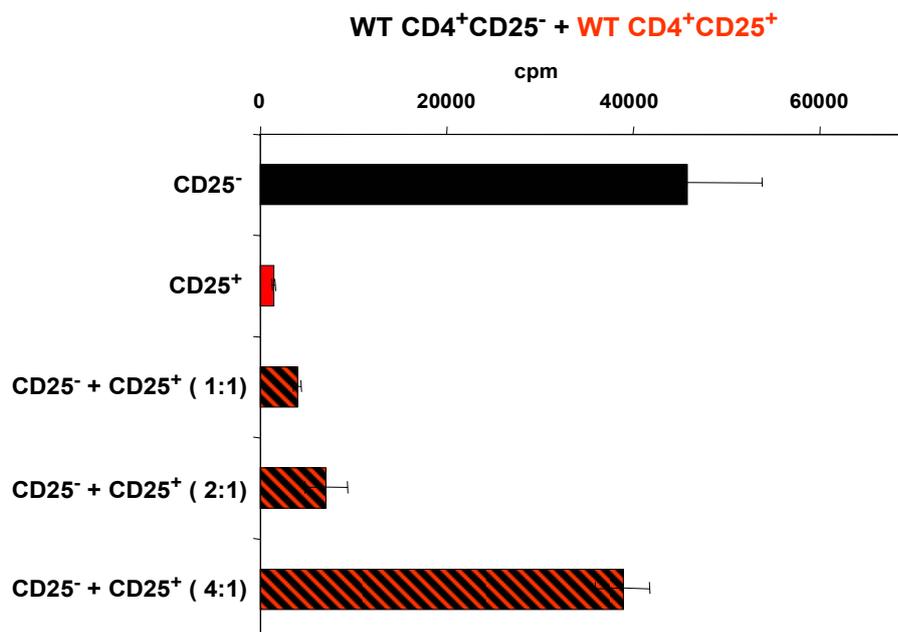


Abb.3.2: $CD4^+CD25^+$ regulatorische T-Zellen aus WT-Mäusen inhibieren autologe $CD4^+CD25^-$ T-Zellen in ihrer Proliferation.

$CD4^+CD25^+$ ($CD25^+$) und $CD4^+CD25^-$ ($CD25^-$) T-Zellen wurden aus Milzen von WT-Mäusen isoliert und alleine oder in Kokultur in den angegebenen Verhältnissen stimuliert. Als Stimulus dienten anti-CD3-Antikörper und Mitomycin-C behandelte A20-Zellen als akzessorische Zellen. Vier Tage nach Aktivierung wurde 3H -Thymidin zugegeben und nach weiteren 18 Stunden die Proliferation mittels eines β -Scintillationszählers bestimmt.

Wie zu erwarten war, zeigen $CD4^+CD25^+$ Tregs aus Wildtyp-Mäusen nach TZR-Stimulus *in vitro* keine eigene Proliferation. Sie sind jedoch in der Lage, die Proliferation kokultivierter $CD4^+CD25^-$ T-Zellen sehr effizient zu inhibieren (Abb.3.2)

Um nun die Frage zu klären, ob es sich bei den $CD4^+CD25^+$ T-Zellen der DKO-Mäuse auch um $CD4^+CD25^+$ Tregs handelt, wurden auch diese aus Milzzellen von sechs Wochen alten DKO-Mäusen mittels MACS isoliert und auf ihre Eigenschaft getestet, die Proliferation kokultivierter $CD4^+CD25^-$ T-Zellen zu supprimieren.

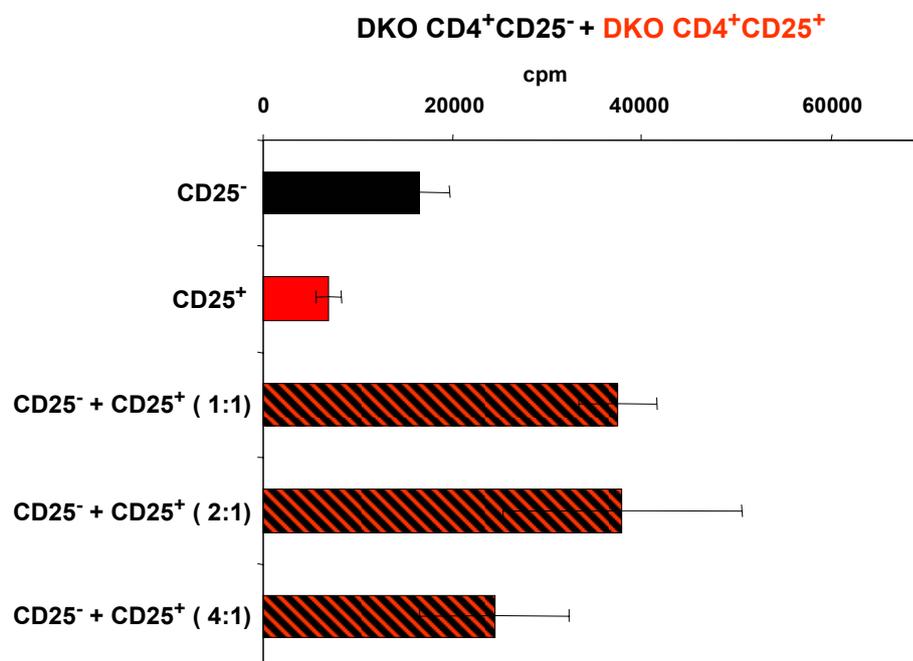


Abb.3.3: $CD4^+CD25^+$ T-Zellen aus DKO Mäusen sind nicht in der Lage autologe DKO $CD4^+CD25^-$ T-Zellen zu inhibieren.

Um die suppressiven Eigenschaften der peripheren $CD4^+CD25^+$ T-Zellpopulation aus DKO-Mäusen zu testen, wurden sowohl $CD4^+CD25^-$ ($CD25^-$) als auch $CD4^+CD25^+$ ($CD25^+$), wie unter Abb.3.2 beschrieben, aus Milzen von DKO-Mäusen isoliert und stimuliert. Die Standardabweichung wurde aus den Werten einer Dreifachbestimmung errechnet.

Betrachtet man Abb.3.3 so fällt auf, dass die $CD4^+CD25^+$ T-Zellen aus DKO-Mäusen, im Gegensatz zu $CD4^+CD25^+$ T-Zellen aus WT-Mäusen (Abb.3.2), relativ stark proliferieren und scheinbar nicht in der Lage sind, die Proliferation von kokultivierten autologen $CD4^+CD25^-$ T-Zellen zu supprimieren (Abb.3.3). Vielmehr lässt der stark erhöhte 3H -Thymidin-Einbau auf eine sehr starke Proliferation der DKO $CD4^+CD25^+$ T-Zellen in Kokultur mit ihren autologen $CD4^+CD25^-$ T-Zellen schließen. Ob nun das Fehlen der Transkriptionsfaktoren NFATc2 und NFATc3 die Entwicklung oder Funktion von $CD4^+CD25^+$ Tregs beeinträchtigt, oder konventionelle $CD4^+CD25^-$ T-Zellen unempfindlich für die $CD4^+CD25^+$ Treg-vermittelte Suppression macht, wurde im Folgenden eingehender untersucht.

Die Transkriptionsfaktoren NFATc2 und NFATc3 sind essentiell an der Suppression von $CD4^+CD25^-$ T-Zellen beteiligt

Um zu untersuchen, ob die Transkriptionsfaktoren NFATc2 und NFATc3 für die Entstehung und Funktion von $CD4^+CD25^+$ Tregs notwendig sind wurden $CD4^+CD25^+$ T-Zellen aus der Peripherie von DKO-Mäusen isoliert und mit konventionellen $CD4^+$ T-Zellen aus WT-Mäusen kokultiviert. Abb.3.4 zeigt, dass die peripheren $CD4^+CD25^+$ T-Zellen aus DKO-Mäusen nicht in der Lage sind, WT $CD4^+CD25^-$ T-Zellen in ihrer Proliferation zu unterdrücken. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass diese Zellen zumindest in ihrer Gesamtheit nicht als $CD4^+CD25^+$ regulatorische T-Zellen angesprochen werden können. Da wir bis heute keinen spezifischen Oberflächenmarker für $CD4^+CD25^+$ Tregs kennen, kann man nicht ausschließen, dass in der gesamten $CD4^+CD25^+$ T-Zell-Population $CD4^+CD25^+$ Tregs enthalten sind, deren suppressives Potential durch eine hohe Zahl aktivierter konventioneller $CD4^+$ T-Zellen maskiert ist.

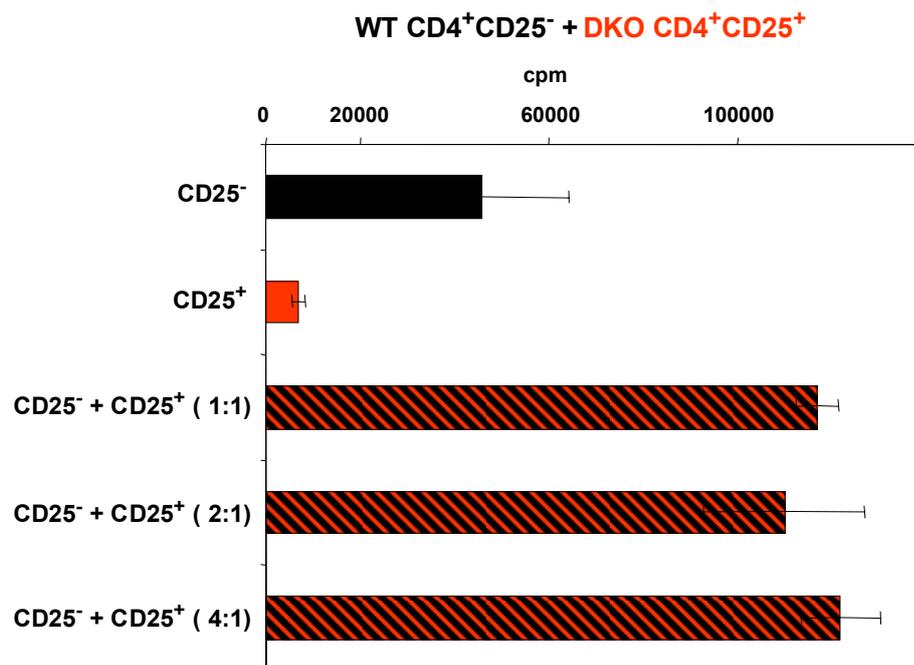


Abb.3.4: CD4⁺CD25⁺ T-Zellen aus DKO-Mäusen können die Proliferation konventioneller CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus Wildtyp-Mäusen nicht supprimieren.

Um die suppressiven Eigenschaften der peripheren CD4⁺CD25⁺ T-Zellen aus DKO-Mäusen (CD25⁺) zu bestimmen, wurden sie mit CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus WT-Mäusen kokultiviert. Nach 4 Tagen Stimulation mit anti-CD3-Antikörpern [3µg/ml] und Mitomycin-C-behandelten A20 Zellen als akzessorische Zellen (Verhältnis 1/10), wurde ³H-Thymidin zugegeben und nach weiteren 18 Stunden die Proliferation der Zellen in einem β-Scintillationszähler bestimmt. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von insgesamt fünf. Aus den Werten einer Dreifachbestimmung wurden die Standardabweichungen berechnet.

Um jedoch zweifelsfrei sagen zu können, ob die Defizienz in NFATc2 und NFATc3 konventionelle CD4⁺ T-Zellen resistent gegen eine CD4⁺CD25⁺ Treg-vermittelte Suppression macht, wurden diese Zellen mit CD4⁺CD25⁺ Tregs aus WT-Mäusen in Kokultur stimuliert. Abb.3.5 zeigt, dass naive CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus DKO-Mäusen in ihrer Proliferation nicht durch CD4⁺CD25⁺ Tregs supprimiert werden.

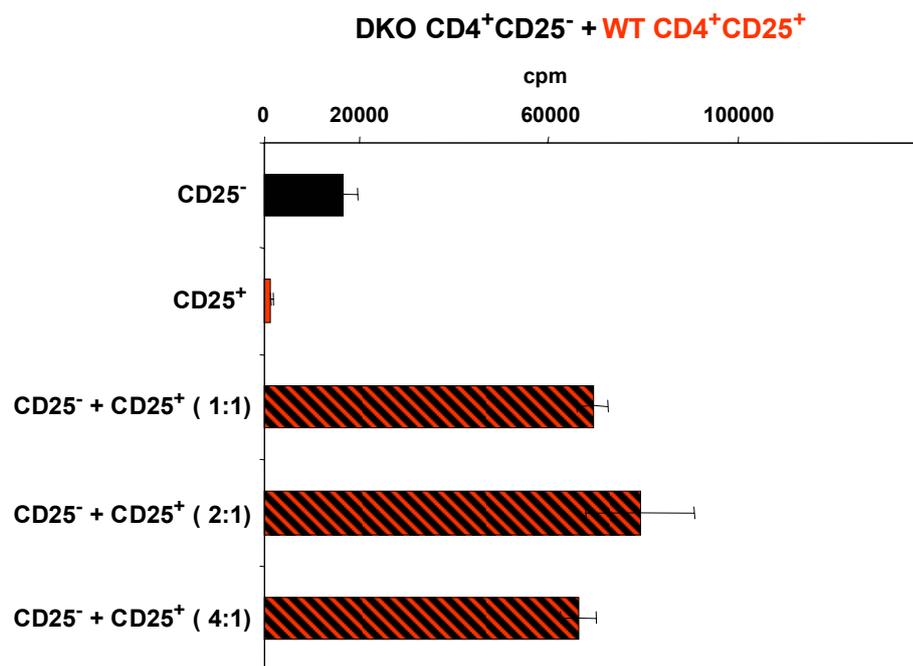


Abb.3.5: CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus DKO-Mäusen sind resistent gegen CD4⁺CD25⁺ Treg-vermittelte Suppression.

Als Maß für die Suppression von konventionellen CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus DKO-Mäusen (CD25⁻) wurde die Proliferation dieser Zellen vier Tage nach Kokultur mit CD4⁺CD25⁺ Tregs (CD25⁺) aus WT-Mäusen durch Zugabe von ³H-Thymidin bestimmt. Die Zellen wurden, wie unter Abb.3.2 beschrieben, stimuliert. Nach Dreifachbestimmung wurde die Standardabweichung berechnet.

Diese Ergebnisse lassen zwar keinen Schluss darüber zu, ob NFATc2 und NFATc3 bei der Entstehung und Funktion von CD4⁺CD25⁺ Tregs beteiligt sind, zeigen jedoch eindeutig, dass das Fehlen dieser Transkriptionsfaktoren konventionelle CD4⁺ T-Zellen (DKO CD4⁺CD25⁻) scheinbar unzugänglich für CD4⁺CD25⁺ Treg-vermittelte Suppression werden lässt.

Betrachtet man Abb.3.5 eingehender, so erkennt man, ähnlich wie in Abb.3.3, eine stark erhöhte Proliferation in der Kokultur (DKO CD25⁻ + WT CD25⁺). Dieser vergleichsweise hohe ³H-Thymidin Einbau in den Kokulturen (verglichen mit der Einzelkultur der DKO CD4⁺CD25⁻) weist auf eine ungewöhnlich starke Proliferation der WT CD4⁺CD25⁺ Tregs und damit auf eine Aufhebung ihres anergen Phänotyps durch die Kokultur mit DKO CD4⁺CD25⁻ T-Zellen hin.

Obwohl die Bestimmung der Proliferation von Zellen seit vielen Jahren standardisiert über den Einbau von ³H-Thymidin während der DNA-Neusynthese bestimmt wird, kann dieses Testverfahren nicht klären, ob bei der Kokultur von DKO CD4⁺CD25⁻ T-Zellen mit WT CD4⁺CD25⁺ Tregs eine stärkere Proliferation der CD4⁺CD25⁻ oder sogar eine starke Proliferation der normalerweise als anerg charakterisierten CD4⁺CD25⁺ Tregs vorliegt. Um nun die Proliferation sowohl der DKO CD4⁺CD25⁻ T-Zellen, als auch der WT CD4⁺CD25⁺ Tregs zu bestimmen, wurden Versuche mit dem Vitalfarbstoff Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester (CFSE) durchgeführt. Dieser Farbstoff passiert als Diacetat (Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFDASE)) die Zellmembran und wird in der Zelle durch Abspaltung der zwei Acetatgruppen zu Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) umgewandelt, welches im Bereich von 510 bis 550 nm grün fluoresziert. Das so entstandene CFSE kann zum Teil innerhalb der ersten 12 bis 24 Stunden aktiv ausgeschleust werden oder aber es geht innerhalb der Zelle mit freien Aminogruppen Amidbindungen ein und bleibt dann über Wochen und Monate stabil in der Zelle erhalten (Abb.3.6).

Da durch die Teilung der gefärbten Zellen die Hälfte der mit CFSE gekoppelten Moleküle an jede Tochterzelle weitergegeben wird, kann die Proliferation durch die lineare Abnahme der CFSE-Fluoreszenzintensität um den Faktor zwei im FACS bestimmt werden (Abb.3.7).

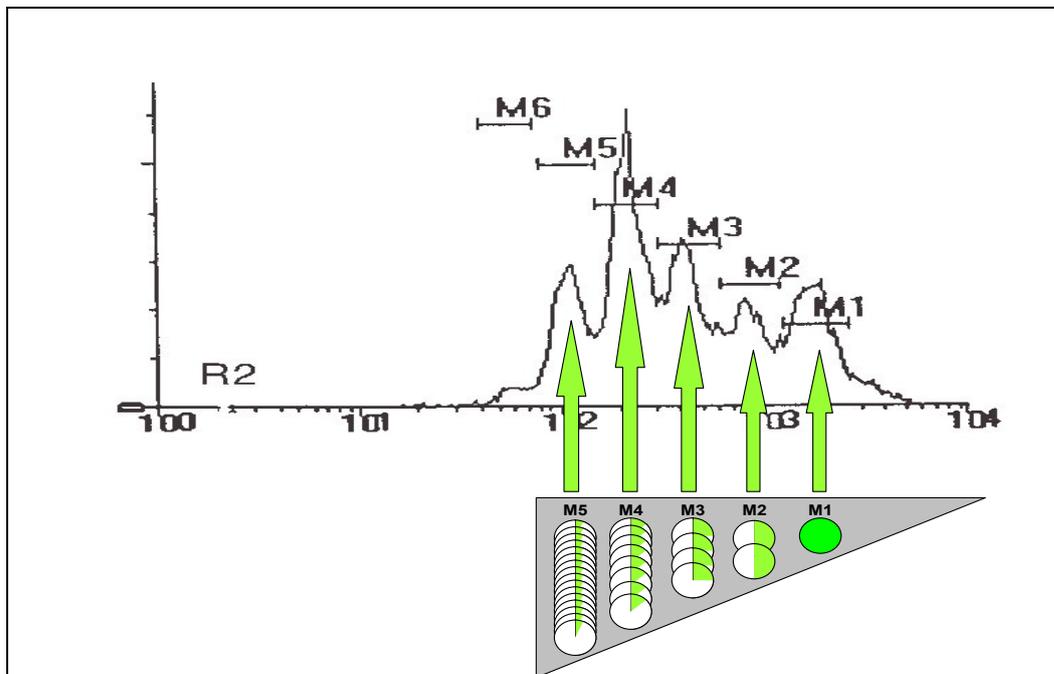


Abb.3.7: Proliferation CFSE-markierter Zellen

Durch die Teilung einer CFSE-markierten Zelle (M1) in zwei Tochterzellen wird die mittlere Fluoreszenzintensität halbiert (M1 → M2). Jede weitere Zellteilung bringt eine Abnahme der Intensität des CFSE um den Faktor zwei mit sich. Diese Abnahme kann als Proliferation im FACS dargestellt werden.

Abb.3.8 zeigt das Proliferations-Verhalten von konventionellen CD4⁺ T-Zellen (Abb.3.8 B) und CD4⁺CD25⁺ Tregs (Abb.3.8 A) nach Aktivierung in Einzel- und Kokultur (Abb.3.8 C und D). Während konventionelle CD4⁺ T-Zellen aus WT-Mäusen 3 Tage nach Stimulation ca. 3 Teilungen vorgenommen haben (Abb.3.8 B), zeigen sowohl CD4⁺CD25⁺Tregs in Einzel- als auch in Kokultur mit konventionellen CD4⁺ T-Zellen (Abb.3.8 A und D) keine Proliferation. Vielmehr sind sie in der Lage die Proliferation der kokultivierten konventionellen CD4⁺ T-Zellen vollständig zu unterbinden (Abb.3.8 C).

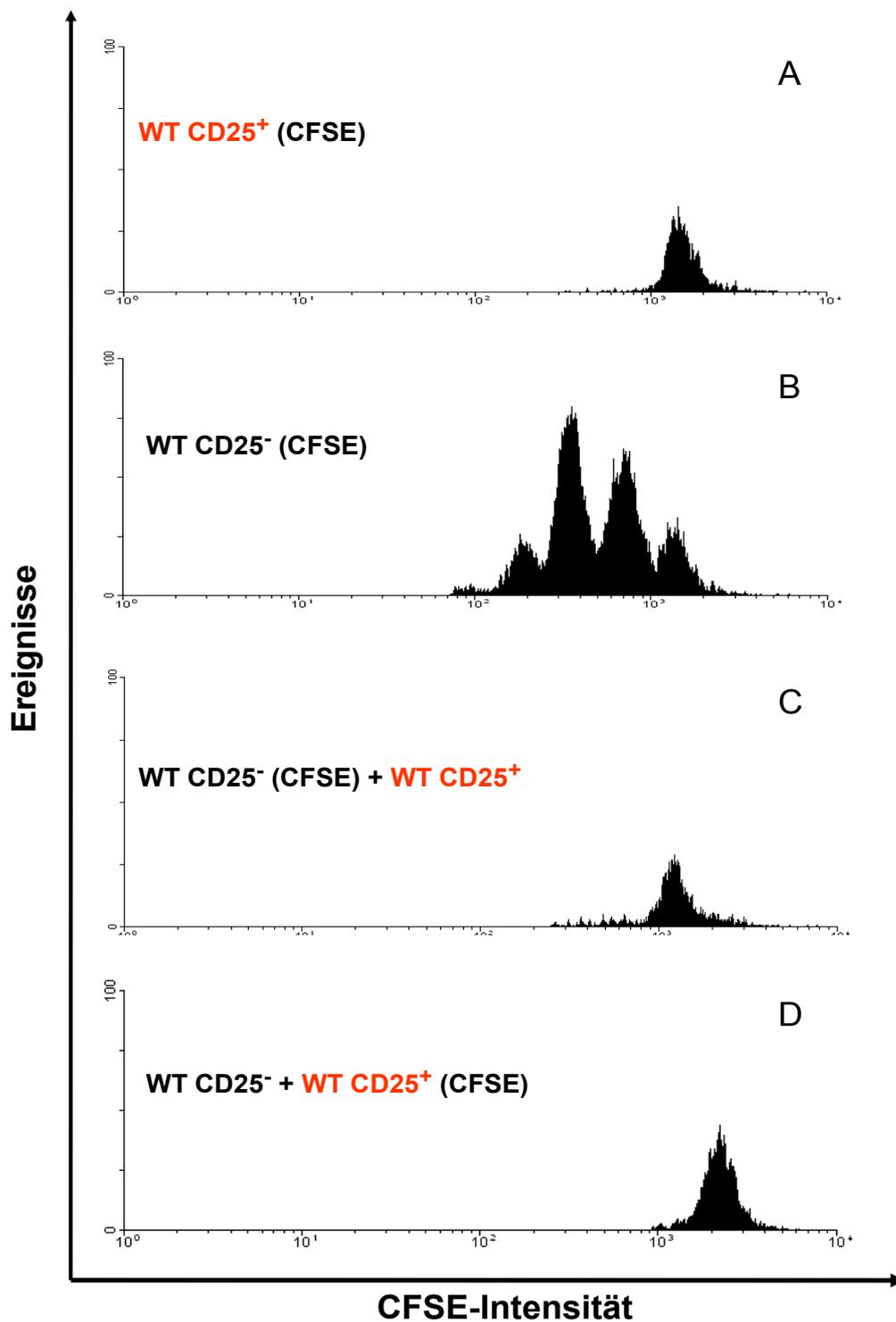


Abb.3.8: WT CD4⁺CD25⁺ regulatorische T-Zellen proliferieren nicht und hemmen die Proliferation von konventionellen CD4⁺ T-Zellen

Um die Proliferation sowohl der konventionellen CD4⁺ T-Zellen (WT CD25⁻) als auch der CD4⁺CD25⁺ Tregs (WT CD25⁺) in Kokultur (Verhältnis 1:1) zu bestimmen, wurde jeweils ein Zelltyp mit CFSE gefärbt und alleine oder in Kokultur mit ungefärbten Zellen aktiviert. Vier Tage nach Stimulation wurde die CFSE-Intensität in einem FACS bestimmt.

Um nun den in Abb.3.5 beobachteten, gesteigerten ^3H -Thymidin-Einbau bei Kokultivierung von DKO $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ und WT $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ Tregs näher zu untersuchen, wurden auch diese Zellen mit dem Vitalfarbstoff CFSE gefärbt und deren Proliferation in Einzel- und Kokultur 3 Tage nach Stimulation mittels FACS-Analyse bestimmt. Abb.3.9 A zeigt, wie in Abb.3.8 A, dass WT $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ Tregs nach Stimualtion keinerlei Proliferation zeigen. Die Stimulation von DKO $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ T-Zellen führt, verglichen mit WT $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ T-Zellen in Einzelkultur zu keiner gesteigerten Proliferation (vgl. Abb.3.8 B und Abb.3.9 B). Auch diese Zellen führen ca. drei Teilungen in einem Stimulationszeitraum von drei Tagen durch. Jedoch zeigen WT $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ Tregs in der Kokultur mit DKO $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ T-Zellen keinen Einfluss auf das Proliferations-Verhalten der letzteren und bestätigen somit die schon gewonnenen Daten durch Messung des ^3H -Thymidin-Einbaus (Abb.3.5 und Abb.3.9 C). Erstaunlicherweise führte jedoch die Kokultur von konventionellen CD4^+ T-Zellen aus DKO-Mäusen (DKO CD25^-) zu einer ungewöhnlich starken Proliferation der kokultivierten WT $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ Tregs (Abb.3.9 D).

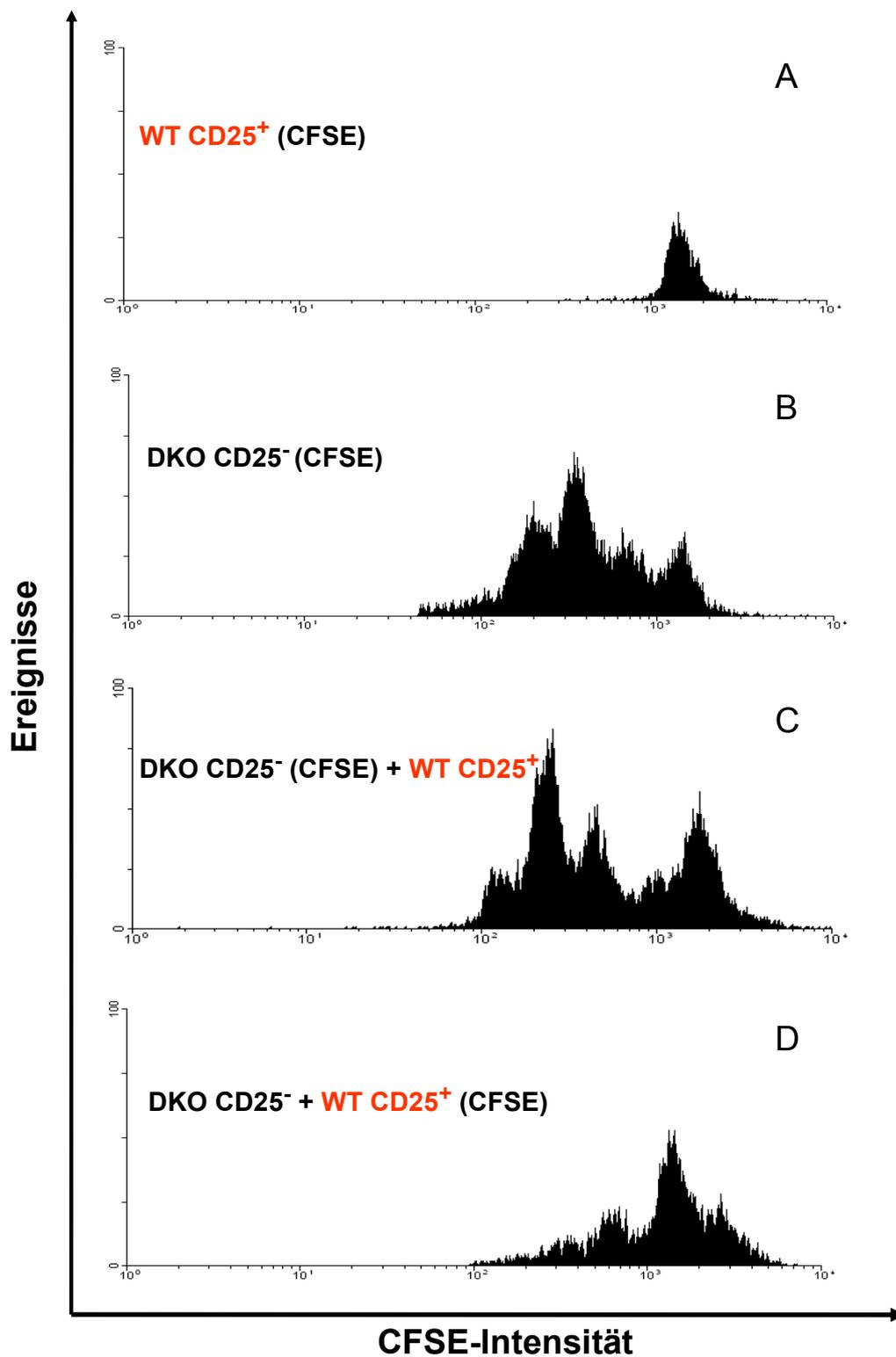


Abb.3.9: WT CD4⁺CD25⁺ Tregs proliferieren nach Kokultur mit DKO CD4⁺CD25⁻ T-Zellen.

CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus DKO-Mäusen (DKO CD25⁻), sowie CD4⁺CD25⁺ Tregs (WT CD25⁺) wurden mit CFSE gefärbt und, wie unter Abb.3.8 beschrieben, alleine oder im Verhältnis 1:1 stimuliert. Die Proliferation der CFSE-gefärbten Zellen wurde vier Tage nach Stimulation im FACS bestimmt.

Ein wesentliches Merkmal der CD4⁺CD25⁺ Treg-vermittelten Suppression ist die Inhibition der IL-2 Produktion in den supprimierten T-Zellen und damit erst sekundär die Inhibition ihrer Proliferation. Die in Abb.3.5 und 3.9 C fehlgeschlagene Inhibition der konventionellen CD4⁺ T-Zellen aus DKO-Mäusen weist deshalb darauf hin, dass diese T-Zellen entweder unabhängig von IL-2 proliferieren können, oder dass sich deren IL-2 Produktion durch WT CD4⁺CD25⁺ Tregs nicht supprimieren lässt. Die in Abb.3.9 D beobachtete ungewöhnlich starke Proliferation der kokultivierten WT CD4⁺CD25⁺ Tregs deutet jedoch auf die letztere Möglichkeit und damit auf eine sehr starke IL-2 Produktion durch DKO CD4⁺CD25⁻ selbst in Gegenwart von CD4⁺CD25⁺ Tregs hin. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass große Mengen IL-2 in Kombination mit einem TZR-Stimulus den anergen Phänotyp von CD4⁺CD25⁺ Tregs aufheben und deren Proliferation induzieren (eigene Daten und Zitate^{94;95}). Um nun zu analysieren, ob die Proliferation von DKO CD4⁺CD25⁻ T-Zellen von IL-2 abhängig ist, wurde versucht, diese durch neutralisierende anti-IL-2 Antikörper zu inhibieren. Dabei dienten konventionelle CD4⁺ T-Zellen aus WT-Mäusen als Positivkontrolle.

Die Proliferation von DKO CD4⁺CD25⁻ T-Zellen ist abhängig von endokrin gebildetem Interleukin-2

Da die Inhibition der IL-2 Produktion von CD4⁺CD25⁻ T-Zellen ein Schlüsselmechanismus bei der CD4⁺CD25⁺ Treg-vermittelten Suppression ist, und CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus DKO-Mäusen scheinbar resistent gegen diese Suppression sind, sollte überprüft werden, ob diese Zellen für ihre Proliferation endokrin-gebildetes IL-2 benötigen. Um diese Frage zu beantworten, wurde ein monoklonaler Antikörper gegen murines IL-2 (anti-mIL-2) verwendet, der die biologische Wirkung von murinem IL-2 neutralisiert. Die spezifische Wirkung dieses Antikörpers konnte durch Zugabe von rekombinantem humanem IL-2 (hrIL-2), welches durch den Antikörper nicht neutralisiert wird, bestätigt werden. Durch Zugabe von hrIL-2 wurde die Inhibition der Proliferation aufgehoben (Abb.3.10 und Abb.3.11).

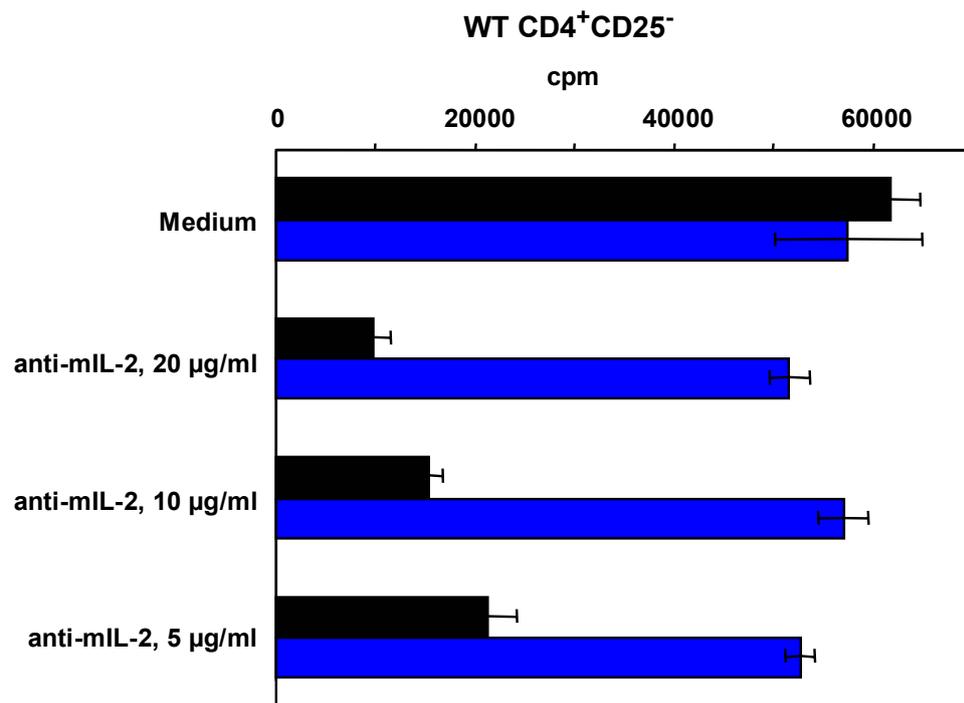


Abb.3.10: Konventionelle WT CD4⁺ T-Zellen proliferieren IL-2-abhängig

Um die Abhängigkeit der Proliferation konventioneller CD4⁺ T-Zellen von endokrin gebildetem IL-2 zu zeigen, wurden diese Zellen in Gegenwart steigender Mengen eines anti-mIL-2 Antikörpers stimuliert. Da der Antikörper nur murines IL-2 blockiert, die murinen T-Zellen jedoch auch auf humanes rekombinantes IL-2 (hrIL-2) reagieren, konnte der Effekt des anti-mIL-2 (schwarze Balken) durch Zugabe von 100 U/ml hrIL-2 aufgehoben werden (blaue Balken). Die Standardabweichung wurde aus einer Dreifachbestimmung jedes Wertes errechnet.

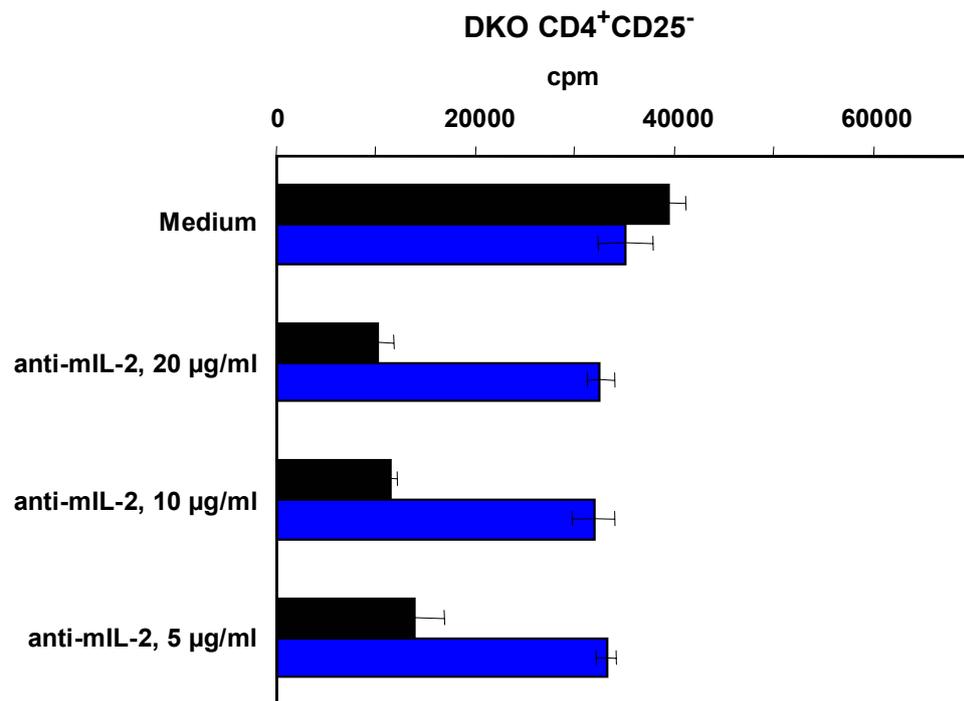


Abb.3.11: DKO CD4⁺CD25⁻ T-Zellen benötigen endokrin gebildetes IL-2 zur Proliferation

Durch Aktivierung von konventionellen CD4⁺CD25⁻ T-Zellen in Gegenwart und Abwesenheit unterschiedlicher Mengen eines Antikörpers gegen murines IL-2 (anti-mIL-2) konnte gezeigt werden, dass DKO CD4⁺CD25⁻ T-Zellen abhängig von ihrem endokrin gebildeten IL-2 proliferieren. Die durch das Blockieren des endokrin gebildeten IL-2 eingeschränkte Proliferation (schwarze Balken) konnte durch Zugabe von 100 U/ml rekombinantem humanem IL-2 (rhIL-2) (blaue Balken) vollständig wieder hergestellt werden.

Vergleicht man Abb.3.10 und 3.11 so zeigt sich, dass die Blockade von IL-2 durch anti-mIL-2 Antikörper dosisabhängig zu einer Einschränkung der Proliferation sowohl von DKO CD4⁺CD25⁻ T-Zellen als auch von konventionellen CD4⁺ T-Zellen aus Wildtyp-Mäusen führt. Dass dieser Effekt alleine auf die Blockade des endokrin gebildeten IL-2 zurückzuführen ist und dass diese Zellen überhaupt auf IL-2 reagieren können, konnte durch die Zugabe von humanem rekombinanten IL-2 (rhIL-2) gezeigt werden. Gibt man dieses in Anwesenheit des anti-mIL-2 Antikörpers hinzu, so kann die Proliferation sowohl von WT CD4⁺CD25⁻ als auch von DKO CD4⁺CD25⁻ T-Zellen vollständig wieder hergestellt werden.

Dies zeigt, dass auch DKO CD4⁺CD25⁻ T-Zellen nach TZR-Stimulus auf endokrin gebildetes IL-2 für ihre Proliferation angewiesen sind und erhärtet die Vermutung, dass CD4⁺CD25⁺ Tregs nicht im Stande sind, die IL-2 Produktion von DKO CD4⁺CD25⁻ T-Zellen zu inhibieren. Um diese These zu beweisen, wurde die IL-2 Produktion von DKO CD4⁺CD25⁻ und WT CD4⁺CD25⁻ in Abwesenheit und Gegenwart von CD4⁺CD25⁺ Tregs im Folgenden untersucht.

DKO CD4⁺CD25⁻ T-Zellen produzieren sehr schnell nach Aktivierung große Mengen IL-2

Einer der essentiellsten Prozesse bei der Suppression von konventionellen CD4⁺ T-Zellen durch CD4⁺CD25⁺ Tregs ist die Inhibition der IL-2-Produktion. Da die Proliferation von DKO CD4⁺CD25⁻ T-Zellen stark von IL-2 abhängig ist (siehe Abb.3.11), sollten CD4⁺CD25⁺ Tregs nicht in der Lage sein, die IL-2-Produktion von CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus DKO-Mäusen zu supprimieren. Um das primär gebildete IL-2 nachweisen zu können, wurden neben ELISAs (Abb.3.12) auch Realtime PCR durchgeführt (Abb.3.13).

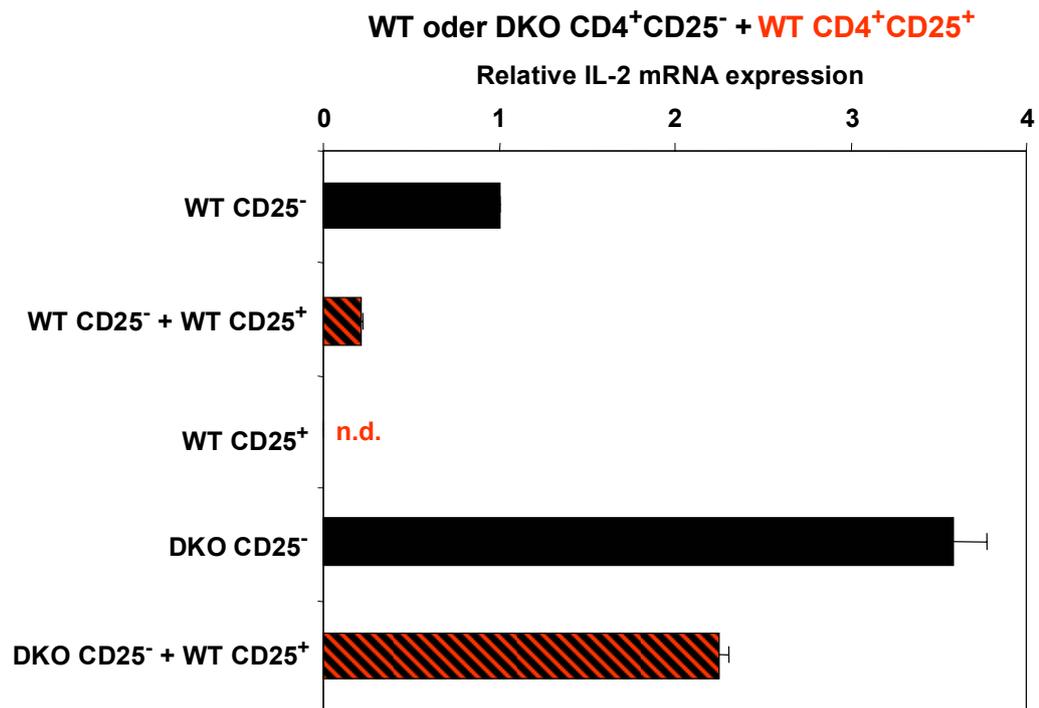


Abb.3.12: WT CD4⁺CD25⁺ Tregs sind nicht in der Lage die IL-2 Transkription in kokultivierten DKO CD4⁺CD25⁻ T-Zellen wirkungsvoll zu inhibieren.

CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus Wildtyp-Mäusen und DKO CD4⁺CD25⁻ T-Zellen wurden alleine oder in Gegenwart von CD4⁺CD25⁺ Tregs (WT CD4⁺CD25⁺; WT CD25⁺; (Verhältnis 1:1)) stimuliert. 18 Stunden nach Aktivierung wurde die RNA der Zellen präpariert und nach reverser Transkription eine Realtime-PCR zum Nachweis von IL-2 mRNA und Elongationsfaktor-1alpha (EF1alpha) mRNA durchgeführt. Die gewonnenen Werte für IL-2 wurden auf die Expression des „Housekeeping gene“ EF1alpha normalisiert. N.d. = nicht nachweisbar.

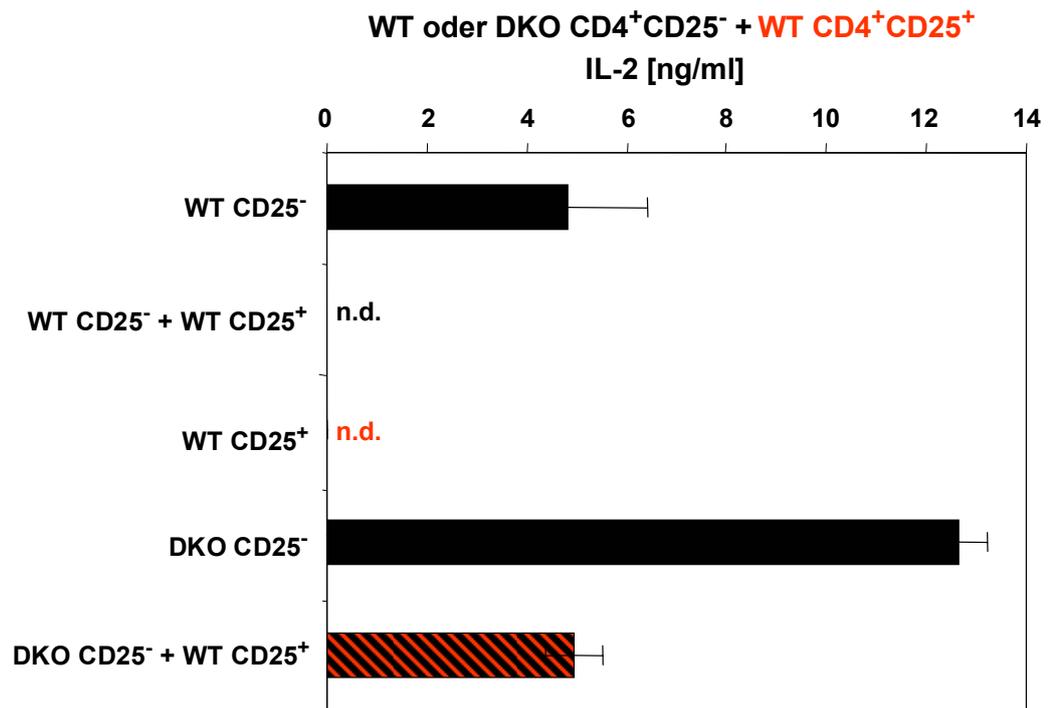


Abb.3.13: DKO CD4⁺CD25⁻ T-Zellen sezernieren trotz Kokultivierung mit WT CD4⁺CD25⁺ Tregs relativ große Mengen des für die Proliferation essentiellen Cytokins IL-2.

Kulturüberstände von WT und DKO CD4⁺CD25⁻ T-Zellen, welche alleine oder in Kokultur mit WT CD4⁺CD25⁺ Tregs (Verhältnis 1:1) 18 Stunden stimuliert wurden, wurden in einem für das Cytokin IL-2 spezifischen ELISA auf sezerniertes IL-2 untersucht. N.d. = nicht nachweisbar. Die Standardabweichung wurde durch die jeweilige Dreifachbestimmung errechnet.

Abbildungen 3.12 und 3.13 zeigen deutlich, dass CD4⁺CD25⁺ Tregs aus Wildtyp-Mäusen zwar selbst kein IL-2 produzieren und in der Lage sind WT CD4⁺CD25⁻ T-Zellen (WT CD25⁻) in ihrer IL-2-Produktion zu supprimieren, jedoch beeinflussen sie die IL-2-Produktion von DKO CD4⁺CD25⁻ T-Zellen (DKO CD25⁻) nur partiell. Die IL-2-Produktion von DKO CD4⁺CD25⁻ T-Zellen nach Kokultur mit CD4⁺CD25⁺ Tregs ist noch immer vergleichbar oder sogar höher als die von alleine stimulierten WT CD4⁺CD25⁻ T-Zellen; d.h. diese IL-2 Menge genügt offensichtlich um die Proliferation der konventionellen CD4⁺ T-Zellen aus DKO-Mäusen, als auch der kokultivierten WT CD4⁺CD25⁺ Tregs zu induzieren (siehe Abb.3.9 C und D).

Betrachtet man die Kinetik der IL-2 mRNA Expression von DKO CD4⁺CD25⁻ T-Zellen (Abb.3.14), so ist deutlich zu erkennen, dass diese Zellen nach TZR-Stimulation sehr schnell große Mengen des zur Proliferation benötigten IL-2 exprimieren (rote Linie). Trotz Kokultur mit CD4⁺CD25⁺ Tregs exprimieren diese Zellen nach 18h Stimulation (graue Linie) immer noch mehr IL-2 mRNA als alleine aktivierte WT CD4⁺CD25⁻ T-Zellen (blaue Linie). Während die IL-2 mRNA Expression von WT CD4⁺CD25⁻ T-Zellen nach Kokultur mit CD4⁺CD25⁺ Tregs schon nach 42 Stunden nicht mehr messbar ist (hellblaue Linie), exprimieren DKO CD4⁺CD25⁻ T-Zellen 66 Stunden nach Kokultur mit CD4⁺CD25⁺ Tregs noch signifikante Mengen IL-2 mRNA.

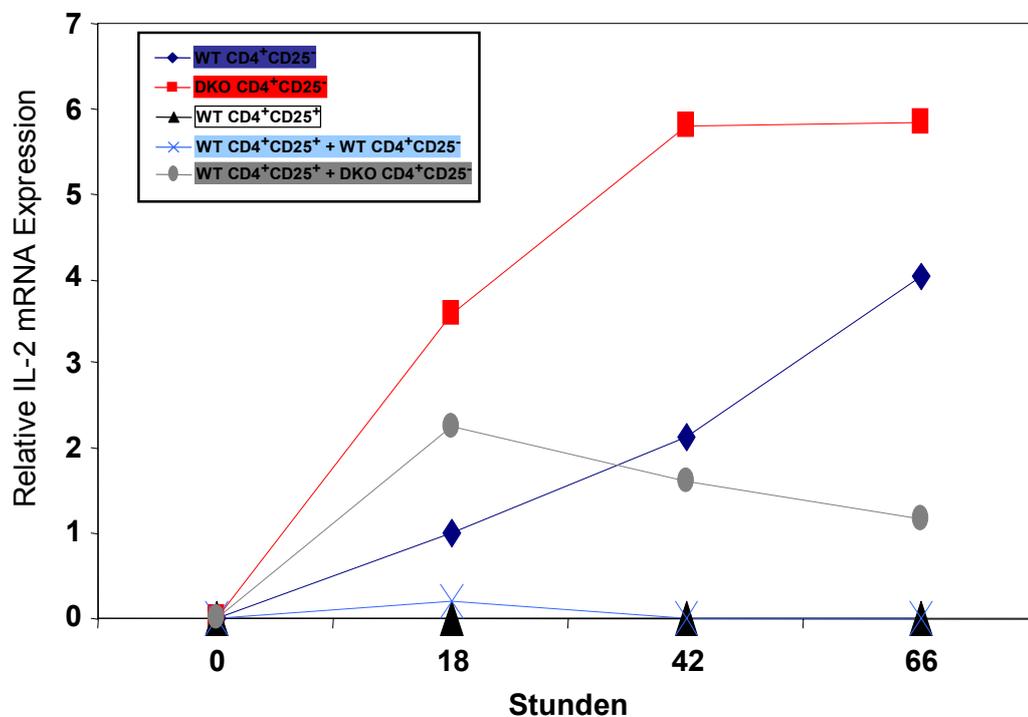


Abb.3.14: Kinetik der IL-2 mRNA Expression von DKO CD4⁺CD25⁻ T-Zellen.

Um einen Eindruck über den zeitlichen Verlauf der IL-2 mRNA Expression von DKO und WT CD4⁺CD25⁻ T-Zelle zu bekommen, wurden diese alleine oder in Kokultur (Verhältnis 1:1) mit CD4⁺CD25⁺ Tregs (WT CD4⁺CD25⁺) stimuliert und zu den angegebenen Zeitpunkten die RNA isoliert. Nach Gewinnung von cDNA wurden Relative-PCRs mit spezifischen Oligonucleotiden zum Nachweis von IL-2 und EF1alpha mRNA durchgeführt. Die für IL-2 gewonnenen Zyklenzahlen wurden mit denen von EF1alpha normalisiert. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis von insgesamt vier Versuchen.

Ein wichtiger Grund für die Resistenz von DKO CD4⁺CD25⁻ T-Zellen gegen die CD4⁺CD25⁺ Treg-vermittelte Suppression scheint die nach TZR-Stimulus sehr schnelle Produktion großer Mengen des proliferationsfördernden Cytokins Interleukin-2 zu sein.

Neben der Suppression von autoaggressiven CD4⁺ T-Zellen durch CD4⁺CD25⁺ Tregs kennt man weitere Mechanismen, die zur Aufrechterhaltung peripherer Toleranz beitragen. Neben den in Tab.1.1 dargestellten Mechanismen nimmt das Cytokin TGF- β eine zentrale Rolle bei der Ruhigstellung von T-Zellen ein. So vermitteln z.B. Th3-Zellen, eine zu den induzierten regulatorischen T-Zellen gehörende Subklasse, ihre inhibitorische Funktion über die Sekretion von TGF- β . Ob die Resistenz der DKO CD4⁺CD25⁻ T-Zellen spezifisch auf die CD4⁺CD25⁺ Treg-vermittelte Suppression beschränkt ist, oder ob auch weitere allgemeine periphere Toleranzmechanismen davon betroffen sind, sollte im Folgenden eingehender untersucht werden.

Das immunsuppressive Cytokin TGF- β inhibiert die IL-2 Produktion von DKO CD4⁺CD25⁻ T-Zellen

Obwohl viele Jahre die Rolle von TGF- β bei der CD4⁺CD25⁺ Treg-vermittelten Suppression kontrovers diskutiert wurde, ist man sich heute weitestgehend einig, dass TGF- β *in vitro* keine Rolle bei diesem Prozeß zu spielen scheint. Anders ist dies allerdings *in vivo*. So konnte in verschiedenen Maus-Modellen gezeigt werden, dass Autoimmunerkrankungen, wie die „inflammatory bowel disease“ (IBD) oder die „experimentelle autoimmune Encephalomyelitis“ (EAE) zwar durch CD4⁺CD25⁺ Tregs aus TGF- β defizienten Mäusen verhindert und sogar geheilt werden können, dass dies aber in einer Maus, welche defizient für TGF- β oder für den hochaffinen Rezeptor für TGF- β ist, nicht funktioniert⁸⁸. Dies spricht dafür, dass CD4⁺CD25⁺ Tregs keine Bedeutung als Produzenten von TGF- β *in vivo* haben, TGF- β aber dennoch entscheidend an der Vermeidung autoimmuner Phänomene beteiligt ist. Um zu untersuchen, ob der Phänotyp der DKO-Mäuse auch auf einer Resistenz gegen TGF- β beruht, wurde zuerst in der Realtime-PCR überprüft, ob die Expression des hochaffinen Rezeptors für TGF- β (TGF- β RII) durch das Fehlen von NFATc2 und NFATc3 beeinträchtigt ist.

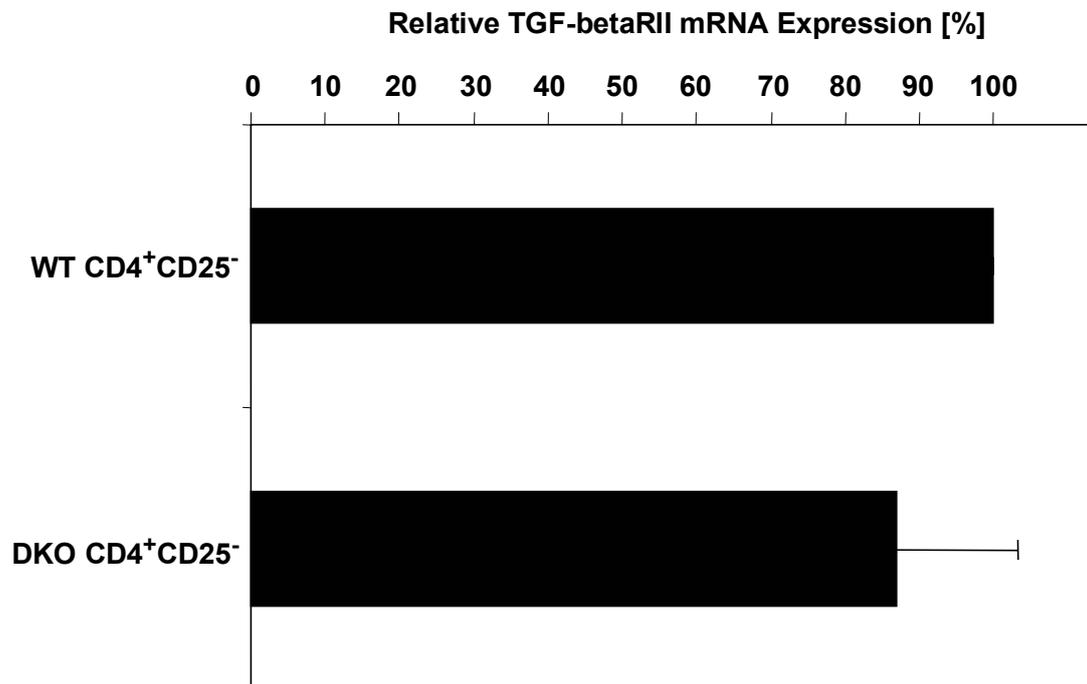


Abb.3.15: Das Fehlen der Transkriptionsfaktoren NFATc2 und NFATc3 hat keinen Einfluß auf die Expression der TGF- β Rezeptor II (TGF- β RII) mRNA.

Um die Expression von TGF- β RII mRNA in naiven CD4⁺ T-Zellen aus DKO-Mäusen zu prüfen, wurden sowohl CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus WT- und DKO-Mäusen isoliert und deren RNA präpariert. Nach Synthese von cDNA wurde eine Realtime-PCR mit Oligonukleotiden zum spezifischen Nachweis von TGF- β RII und EF1alpha mRNA durchgeführt. Die gewonnenen Werte für TGF- β RII mRNA wurden auf die Expression von EF1alpha normalisiert. Die Abbildung zeigt die Zusammenfassung aus sechs verschiedenen Experimenten inklusive der daraus resultierenden Standardabweichung.

Das Fehlen der Transkriptionsfaktoren NFATc2 und NFATc3 hat keinen Einfluss auf die Expression der TGF- β Rezeptor II (TGF- β RII) mRNA. Somit sind DKO CD4⁺CD25⁻ T-Zellen potentiell in der Lage, genau wie WT CD4⁺CD25⁻ T-Zellen auf TGF- β zu reagieren. Um dies zu testen, wurden naive CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus Wildtyp-Mäusen und DKO-Mäusen isoliert und in Gegenwart von TGF- β stimuliert. Die optimale Konzentration an TGF- β wurde in Vorversuchen mit Wildtyp-Zellen ermittelt.

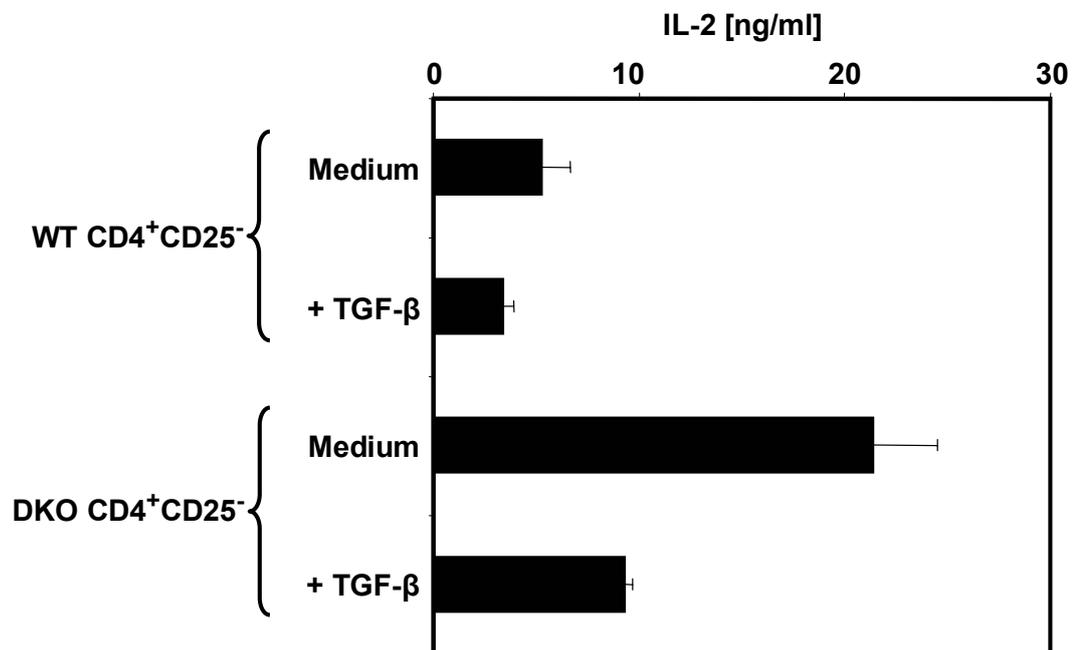


Abb.3.16: TGF-β hemmt die Produktion von IL-2 durch DKO CD4⁺CD25⁻ T-Zellen.

Um den suppressiven Einfluss von TGF-β auf die Aktivierung von DKO CD4⁺CD25⁻ T-Zellen zu untersuchen, wurden diese Zellen aus der Milz isoliert und in Gegenwart (+TGF-β) und Abwesenheit (Medium) von 20ng/ml TGF-β stimuliert. Nach 18h wurden die Kulturüberstände auf Interleukin-2 untersucht und mit den Werten für WT CD4⁺CD25⁻ T-Zellen verglichen. Ein representatives Experiment von drei Experimenten ist gezeigt. Durch Dreifachbestimmung wurde die Standardabweichung der jeweiligen Werte berechnet.

Wie in Abbildung 3.16 dargestellt, hemmt TGF-β die IL-2- Produktion sowohl auf Protein-, als auch auf mRNA-Ebene (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis bestärkt die Annahme, dass der Phänotyp der DKO-Mäuse alleine durch die Resistenz der konventionellen CD4⁺ T-Zellen gegenüber CD4⁺CD25⁺ Treg-vermittelter Suppression, unabhängig von TGF-β, bedingt ist.

Ob jedoch neben der Treg-vermittelten Suppression konventioneller T-Zellen auch die Funktionen der CD4⁺CD25⁺ Tregs durch das Fehlen der Transkriptionsfaktoren NFATc2 und NFATc3 beeinträchtigt sind, sollte im Folgenden untersucht werden.

Das Fehlen der Transkriptionsfaktoren NFATc2 und NFATc3 beeinflusst die Entwicklung von CD4⁺CD25⁺ Tregs nicht

Nach Antigenkontakt in der Peripherie ist es bisher unmöglich, alleine aufgrund verschiedener Oberflächenmoleküle zwischen CD4⁺CD25⁺ Tregs und konventionellen CD4⁺ T-Zellen zu unterscheiden, da auch letztere nach Aktivierung CD25 auf ihrer Oberfläche exprimieren. Bezogen auf die DKO-Mäuse, deren konventionelle CD4⁺ T-Zellen sich nicht durch CD4⁺CD25⁺ Tregs inhibieren lassen, könnte dies bedeuten, dass aktivierte, konventionelle CD4⁺CD25⁺ T-Zellen potentiell vorhandene CD4⁺CD25⁺ Tregs funktionell maskieren. Allerdings sollten sich CD4⁺CD25⁺ Tregs im Thymus von DKO-Mäusen nachweisen lassen, da gezeigt wurde, dass CD4⁺CD25⁺ Thymozyten bereits ein hohes suppressives Potential besitzen. Deshalb wurden CD4⁺CD8⁻CD25⁺ Thymozyten aus DKO-Mäusen mittels FACS-Sort isoliert und auf ihre suppressiven Eigenschaften gegenüber WT CD4⁺CD25⁻ T-Zellen untersucht.

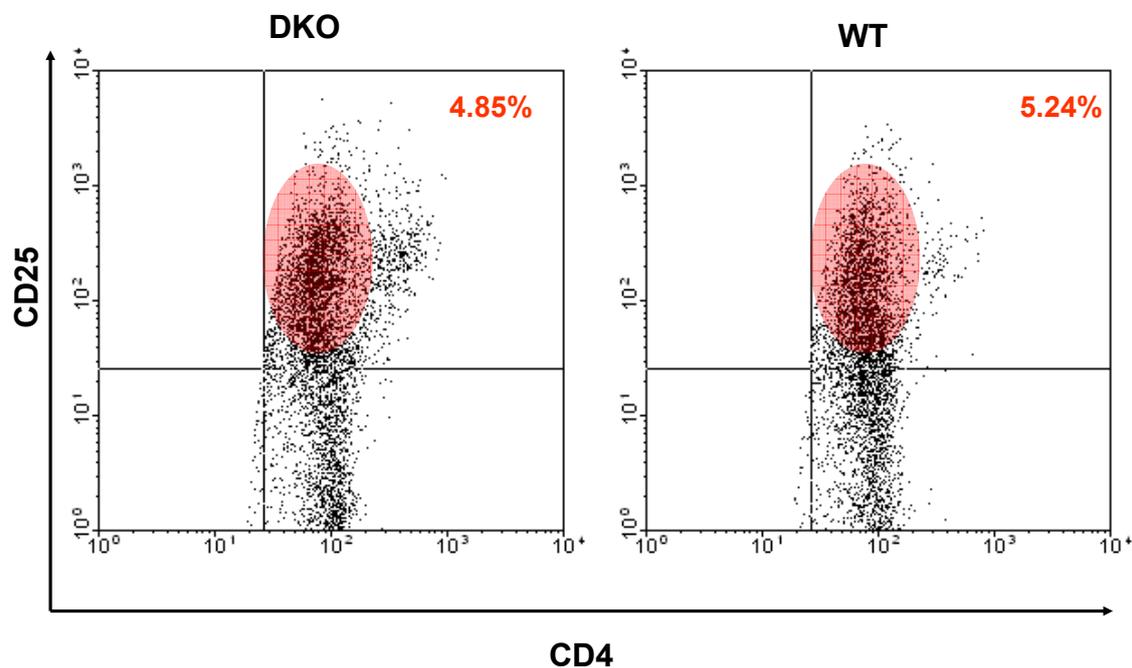


Abb.3.17: DKO und WT-Mäuse zeigen die gleiche Anzahl CD4⁺CD8⁻CD25⁺ Thymozyten.

Um CD4⁺CD8⁻CD25⁺ Thymozyten zu isolieren und auf ihre suppressiven Eigenschaften zu testen, wurden die Thymi aus sechs Wochen alten Mäusen präpariert, CD25⁺ Zellen durch MACS angereichert und dann CD4⁺CD8⁻CD25⁺ Thymozyten im FACS dargestellt und durch FACS-Sort isoliert. Die in der Abbildung angegebenen Prozentzahlen zeigen den Anteil CD4⁺CD8⁻CD25⁺ Thymozyten an der Gesamtzahl der CD4⁺CD8⁻ Thymozyten.

Im Gegensatz zur Zahl der CD4⁺CD25⁺ T-Zellen in der Peripherie (Abb.3.1) ist die Zahl der CD4⁺CD8⁻CD25⁺ Thymozyten in sechs Wochen alten DKO-Mäusen nicht erhöht (Abb.3.17). Dies spricht dafür, dass diese Zellen nicht wie in der Peripherie aktivierte konventionelle CD4⁺ T-Zellen, sondern CD4⁺CD25⁺ regulatorische T-Zellen darstellen. Um nun zu untersuchen ob diese DKO CD4⁺CD8⁻CD25⁺ Thymozyten auch CD4⁺CD25⁺ Treg-spezifische suppressive Eigenschaften besitzen, wurden sie mit konventionellen CD4⁺ T-Zellen aus WT-Mäusen kokultiviert. Als Maß für die suppressiven Eigenschaften der DKO CD4⁺CD8⁻CD25⁺ Thymozyten wurde der ³H-Thymidin-Einbau der Kokultur bestimmt.

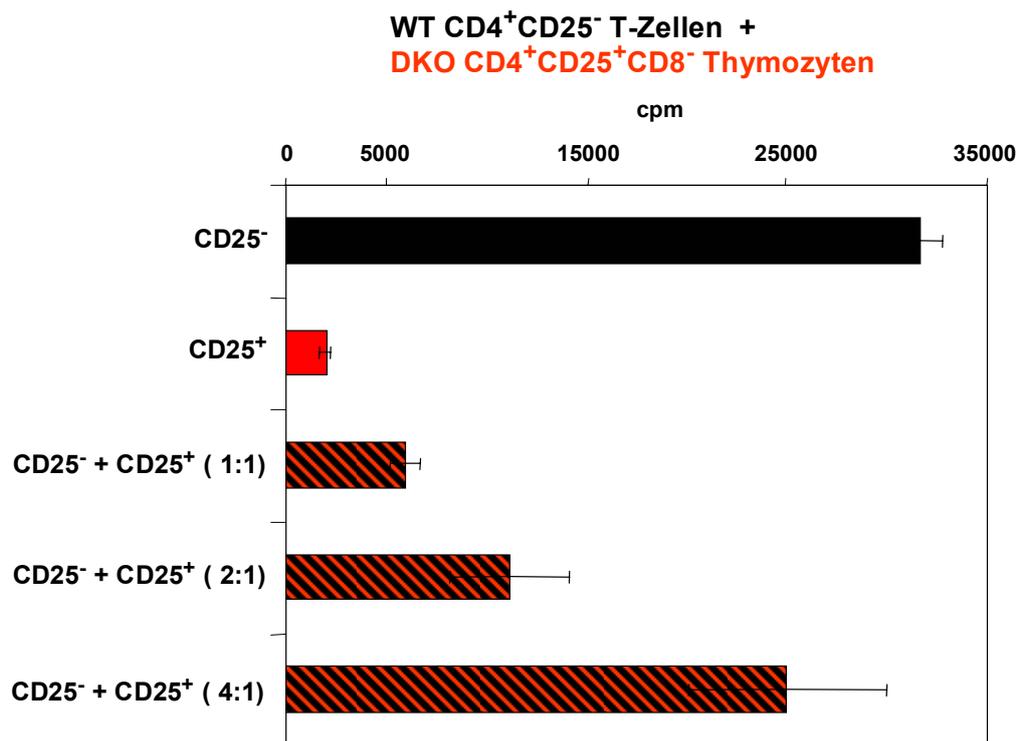


Abb.3.18: DKO CD4⁺CD8⁻CD25⁺ Thymozyten zeigen regulatorische Eigenschaften.

Aus sechs Wochen alten DKO-Mäusen wurden die Thymi präpariert und CD25⁺ Thymozyten mittels MACS angereichert. Aus diesen CD25⁺ Thymozyten wurden CD4⁺CD8⁻CD25⁺ Thymozyten (CD25⁺) mittels FACS-Sort isoliert und in unterschiedlichen Verhältnissen mit WT CD4⁺CD25⁻ T-Zellen kokultiviert. Nach 4 Tagen Stimulation wurde ³H-Thymidin zugegeben und nach weiteren 18 Stunden die Proliferation durch β -Scintillation gemessen. Durch Dreifachbestimmung wurden die jeweiligen Standardabweichungen berechnet.

Wie in Abbildung 3.18 gezeigt, sind CD4⁺CD8⁻CD25⁺ Thymozyten aus DKO-Mäusen in der Lage, die Proliferation von WT CD4⁺CD25⁻ T-Zellen zu supprimieren. Jedoch waren diese CD4⁺CD8⁻CD25⁺ regulatorischen Thymozyten, in Analogie zu WT CD4⁺CD25⁺ Tregs, nicht in der Lage, die Proliferation ihrer autologen CD4⁺CD25⁻ T-Zellen zu unterbinden (Abb.3.19). Auch hier scheint die Kokultivierung von regulatorischen T-Zellen mit CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus DKO-Mäusen den anergen Phänotyp der CD4⁺CD8⁻CD25⁺ Thymozyten zu durchbrechen und diese Zellen zur Proliferation anzuregen (siehe Abb. 3.19), da der ³H-Thymidin-Einbau der Kokultur wesentlich höher ist als derjenige der Einzelkultur. Die starke Abnahme des ³H-Thymidin-Einbaus mit sinkender Zahl an CD4⁺CD25⁺CD8⁻ Thymozyten ist ein eindeutiger Hinweis, dass auch hier in der

Kokultur die $CD4^+CD25^-$ regulatorischen Thymozyten proliferieren (vgl. Abb. 3.9 und Abb.3.19).

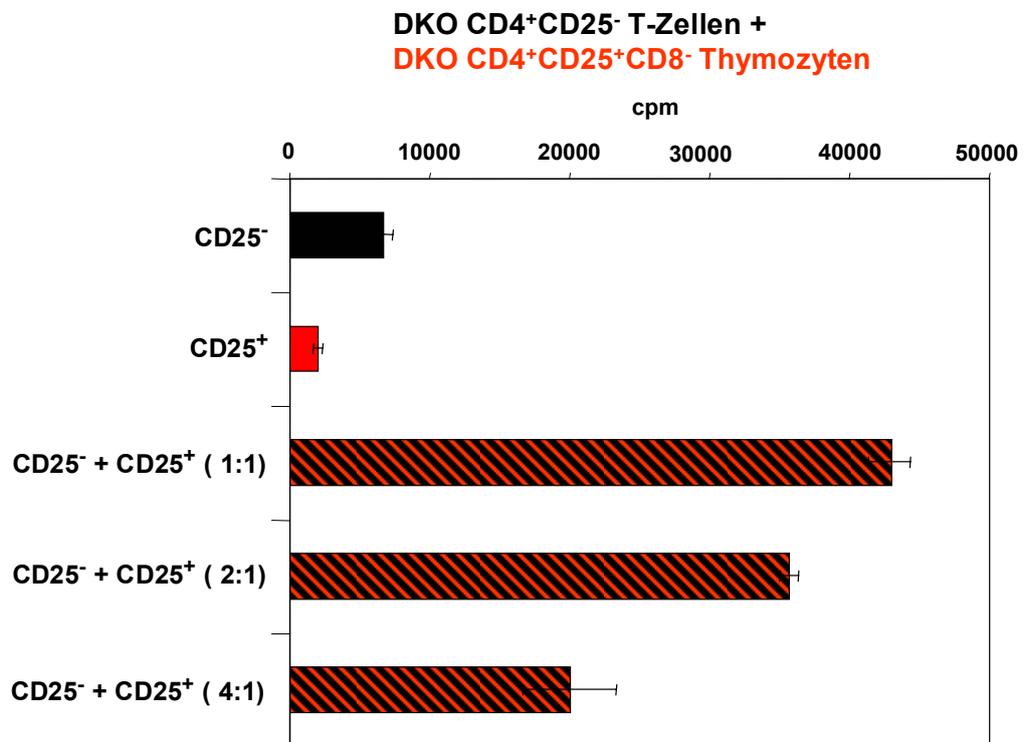


Abb.3.19: DKO $CD4^+CD8^-CD25^+$ Thymozyten sind nicht in der Lage ihre autologen $CD4^+CD25^-$ T-Zellen zu supprimieren.

Um zu testen, ob $CD4^+CD8^-CD25^+$ Thymozyten in der Lage sind ihre autologen peripheren $CD4^+CD25^-$ T-Zellen zu supprimieren, wurden konventionelle $CD4^+CD25^-$ T-Zellen aus DKO-Mäusen isoliert und mit $CD4^+CD8^-CD25^+$ Thymozyten aus DKO-Mäusen kokultiviert. Als Maß für die Suppression wurde die Proliferation der konventionellen $CD4^+CD25^-$ T-Zellen vier Tage nach Stimulation gemessen. Abbildung 3.18 und 3.19 zeigen je einen repräsentativen Versuch.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Transkriptionsfaktoren NFATc2 und NFATc3 sowohl bei der Entstehung von $CD4^+CD25^+$ regulatorischen T-Zellen im Thymus als auch für deren suppressiven Eigenschaften keine Rolle spielen. Im Gegenteil, diese Resultate unterstreichen sogar den Befund, dass alleine die konventionellen $CD4^+CD25^-$ T-Zellen der DKO-Mäuse für den autoaggressiven Phänotyp dieser Mäuse verantwortlich sind. Da die $CD4^+CD25^+CD8^-$ Thymozyten aus DKO-Mäusen einen suppressiven Phänotyp zeigen, kann angenommen werden, dass diese auch den Thymus verlassen und deren Funktion in der Peripherie durch aktivierte konventionelle $CD4^+CD25^+$ T-Zellen maskiert wird. Ob es generell möglich ist $CD4^+CD25^+$ Tregs in der Peripherie dieser Mäuse zu

identifizieren und zu isolieren wurde unter Verwendung eines „FACS-Sorters“ im Folgenden analysiert.

CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen können *in vitro* durch die Expressionshöhe von CD25 und GITR von aktivierten konventionellen CD4⁺ T-Zellen unterschieden werden

Da bis heute kein Oberflächenmolekül beschrieben wurde, das exklusiv von CD4⁺CD25⁺ Tregs exprimiert wird, schien es unmöglich diese Zellen von aktivierten konventionellen CD4⁺ T-Zellen (Teff) zu unterscheiden. Zwar exprimieren CD4⁺CD25⁺ Tregs neben CD25 auch glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor family related gene (GITR) sehr stark auf ihrer Oberfläche, jedoch wird dieses Molekül, genauso wie CD25, auch auf aktivierten konventionellen CD4⁺ T-Zellen exprimiert. Aus dem humanen System gab es jedoch Hinweise, dass die Isolation von CD4⁺ T-Zellen, welche sehr stark CD25 exprimieren, zur Anreicherung von Zellen mit hohen suppressiven Eigenschaften führte¹⁴³. Analog zu CD25 sollte deshalb getestet werden, ob auch CD4⁺ T-Zellen, welche GITR sehr stark exprimieren, suppressive Eigenschaften besitzen und sich von aktivierten konventionellen CD4⁺ T-Zellen trennen lassen. Hierzu wurden anfangs *in vitro* Vorversuche durchgeführt in denen konventionelle CD4⁺ T-Zellen und CD4⁺CD25⁺ Tregs aus Mausstämmen mit verschiedenen MHC-I Haplotypen isoliert wurden. Dies ermöglicht nach Aktivierung die Identifikation von konventionellen CD4⁺ T-Zellen und CD4⁺CD25⁺ Tregs durch spezifische Antikörper gegen den entsprechenden MHC-I Haplotyp (siehe Abb.3.20 A und 3.20 B). Hierzu wurden CD4⁺CD25⁺ Tregs aus BL/6 Mäusen, welche das MHC-I-Allel H2-K^b tragen, und konventionelle CD4⁺ T-Zellen aus Balb/c Mäusen, die das Allel H2-K^d tragen, isoliert und 48 Stunden in Kokultur stimuliert. Für die Stimulation wurden nicht nur Bedingungen gewählt, die eine Suppression zulassen, sondern auch anstelle von A20, anti-CD28-Antikörper zur Kostimulation eingesetzt. Die Koaktivierung mit einem anti-CD28-Antikörper führt zu einer sehr starken endogenen IL-2 Produktion durch die konventionellen CD4⁺ T-Zellen, was sekundär die Treg-vermittelte Suppression aufhebt (Abb.3.20 B: aCD3/28).

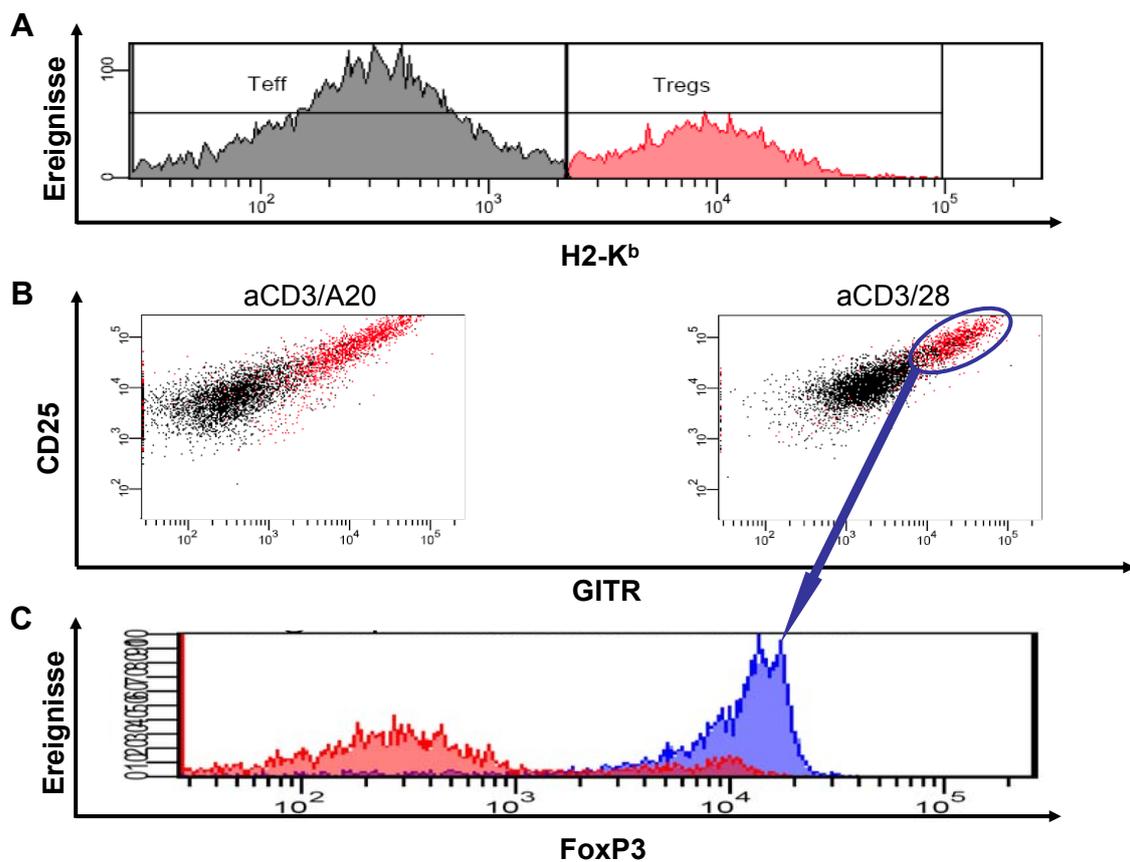


Abb.3.20: Die Expression von CD25 und GITR ist auf CD4⁺CD25⁺ Tregs höher als auf aktivierten konventionellen CD4⁺ T-Zellen *in vitro*.

Zur Bestimmung der Expression von CD25 und GITR auf konventionellen CD4⁺CD25⁻ und CD4⁺CD25⁺ Tregs wurden diese aus unterschiedlichen Mausstämmen isoliert. So wurden H2-K^b⁺ CD4⁺CD25⁺ Tregs aus BL/6 Mäusen (A+B rot dargestellt, C blau dargestellt) und konventionelle CD4⁺ T-Zellen aus Balb/c Mäusen (H2-K^b⁻, H2-K^d⁺) (schwarz dargestellt, in C rot) kokultiviert. Durch Färbung mit einem fluorochrommarkierten monoklonalen Antikörper gegen H2-K^b können im FACS sowohl die CD4⁺CD25⁺ Tregs als auch aktivierte konventionelle CD4⁺ T-Zellen voneinander unterschieden werden (A). 48 Stunden nach Stimulation unter verschiedenen Bedingungen wurden die Zellen mit Antikörpern auf CD25, GITR, H2-K^b und FoxP3 gefärbt und im FACS analysiert. In C sind H2-K^b-positive CD4⁺CD25⁺ Tregs blau und H2-K^d-positive, konventionelle CD4⁺ T-Zellen rot dargestellt.

Sowohl unter Stimulationsbedingungen, die eine Suppression durch CD4⁺CD25⁺ Tregs zulassen (z.B. lösliches anti-CD3 und A20 als akzessorische Zellen), als auch unter Bedingungen, welche bekannt dafür sind, die CD4⁺CD25⁺ Treg-vermittelte Suppression zu durchbrechen (z.B. anti-CD3 + anti-CD28, anti-CD3 und aktivierte Dendritische Zellen), zeigen CD4⁺CD25⁺ Tregs (Abb.3.20 B: rot dargestellt) 48 Stunden nach Stimulation eine stärkere CD25- und GITR-Expression als aktivierte konventionelle CD4⁺ T-Zellen (Abb.3.20 B: schwarz dargestellt). Dies trifft auch für weitere Stimuli, wie z.B. durch verschiedene TLR-Liganden^{xv} aktivierte Dendritische Zellen zu (Daten nicht gezeigt). Die Färbung mit einem Antikörper gegen FoxP3 zeigte eindeutig, dass nahezu alle FoxP3-positiven, also CD4⁺CD25⁺ Tregs unter den CD4⁺CD25⁺⁺GITR⁺⁺ T-Zellen waren (Abb.3.20 C) Da für diese Färbung die Zellen fixiert und permeabilisiert werden müssen, kann man mittels Facs-Sorter keine vitalen, funktionellen FoxP3-positiven T-Zellen isolieren. Dennoch scheint es möglich, alleine durch die Stärke der Expression von CD25 und GITR spezifisch CD4⁺CD25⁺ Tregs von aktivierten konventionellen CD4⁺ T-Zellen *ex vivo* zu unterscheiden.

CD4⁺CD25⁺⁺GITR⁺⁺ T-Zellen aus der Peripherie von DKO- und Wildtyp-Mäusen zeigen alle Charakteristika CD4⁺CD25⁺ regulatorischer T-Zellen

Da in den Thymi von DKO-Mäusen CD4⁺CD25⁺ Tregs zu finden sind, ist anzunehmen, dass die CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen in der Peripherie durch aktivierte (CD4⁺CD25⁺) konventionelle CD4⁺ T-Zellen maskiert sind. Um zu testen, ob auch in DKO-Mäusen CD4⁺CD25⁺ Tregs durch Isolation der peripheren CD4⁺CD25⁺⁺GITR⁺⁺ T-Zellen von den aktivierten konventionellen CD4⁺CD25⁺ T-Zellen getrennt werden können, wurden diese T-Zellen aus Milzen von DKO-Mäusen und WT-Mäusen isoliert, und auf Eigenschaften regulatorischer T-Zellen getestet.

^{xv} Sogenannte Toll-ähnliche Rezeptoren (Toll-like Receptors“ = **TLR**) dienen dem angeborenen Immunsystem zur Erkennung nicht-varianter mikrobieller Strukturen (pathogen associated molecular patterns = PAMPS) um früh eine erste antimikrobielle Immunantwort zu induzieren.

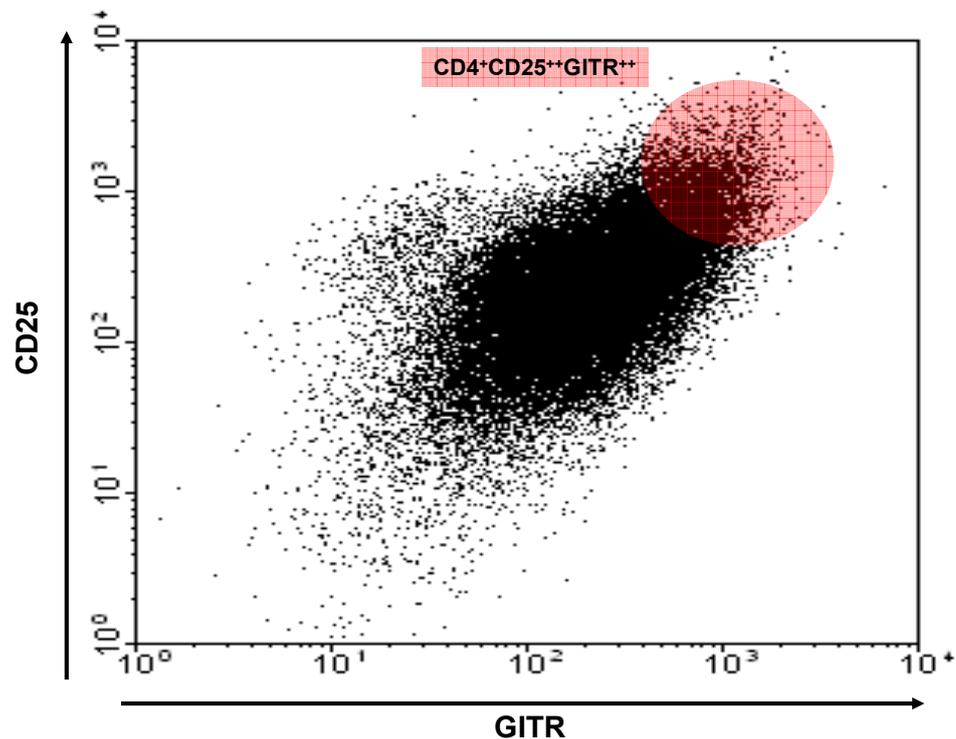


Abb.3.21: Isolation von CD4⁺CD25⁺⁺GITR⁺⁺ aus der Peripherie von DKO-Mäusen.

Aus Milzen von sechs Wochen alten DKO-Mäusen wurden mittels MACS CD25⁺ T-Zellen angereichert und nach Färbung mit Antikörpern gegen GITR, CD25, CD4 und CD8 die CD4⁺CD25⁺⁺GITR⁺⁺ (CD8⁻) T-Zellen durch FACS-Anreinigung isoliert. Der Bereich, welcher im FACS angereinigt wurde ist rot markiert und stellt ca. 15-20% der CD4⁺CD25⁺ T-Zellen dar. Dargestellt sind lebende periphere CD4⁺ T-Zellen.

Dazu wurden die isolierten CD4⁺CD25⁺⁺GITR⁺⁺ T-Zellen zunächst in der Realtime-PCR auf die Expression der mRNA des nukleären CD4⁺CD25⁺ Treg-Markers FoxP3, sowie auf die Expression von IL-2 mRNA nach Stimulation untersucht (siehe Abb. 3.22).

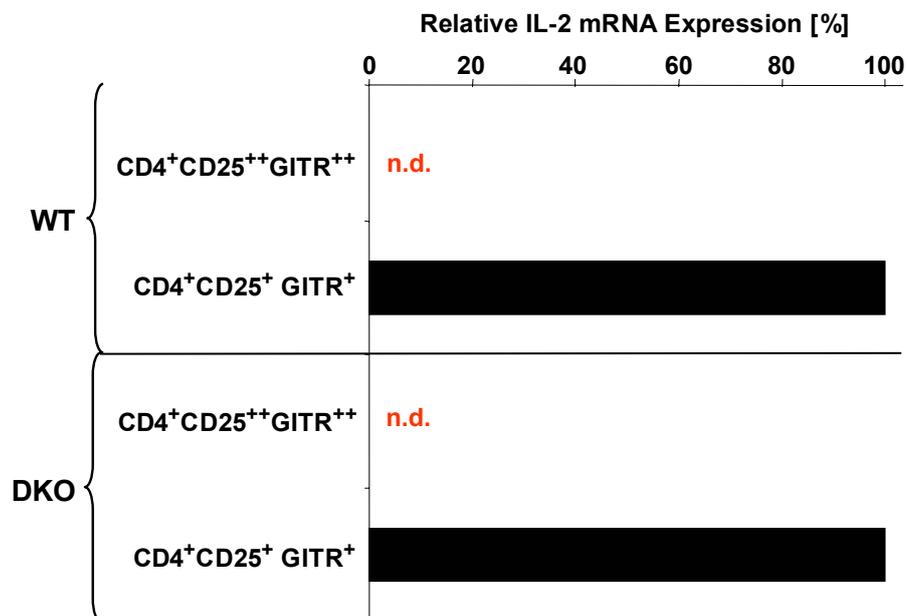


Abb.3.22: DKO CD4⁺CD25⁺⁺GITR⁺⁺ T-Zellen exprimieren nach Stimulation keine mRNA für Interleukin-2.

Nach Reinigung von CD4⁺CD25⁺⁺GITR⁺⁺ T-Zellen aus Milzen von sechs Wochen alten WT- und DKO-Mäusen wurden diese mit plattengebundenen anti-CD3- und anti-CD28-Antikörper stimuliert. 24 Stunden nach Stimulation wurde die RNA isoliert, cDNA transkribiert und eine Realtime-PCR zur Detektion von IL-2 mRNA durchgeführt. Die Expression von EF1alpha mRNA diente zur Normalisierung der gewonnenen Werte.

Trotz der Verwendung eines sehr starken Stimulus, welcher potenziell eine CD4⁺CD25⁺ Treg-vermittelte Suppression durchbricht und somit zur IL-2 Produktion von konventionellen CD4⁺ T-Zellen führen würde, konnte in der durchgeführten Realtime-PCR keine IL-2 mRNA 24 Stunden nach Stimulation nachgewiesen werden (Abb.3.22). Alleine dieses Ergebnis zeigt, dass durch Isolation von CD4⁺CD25⁺⁺GITR⁺⁺ eine Verunreinigung mit konventionellen CD4⁺ T-Zellen ausgeschlossen werden kann.

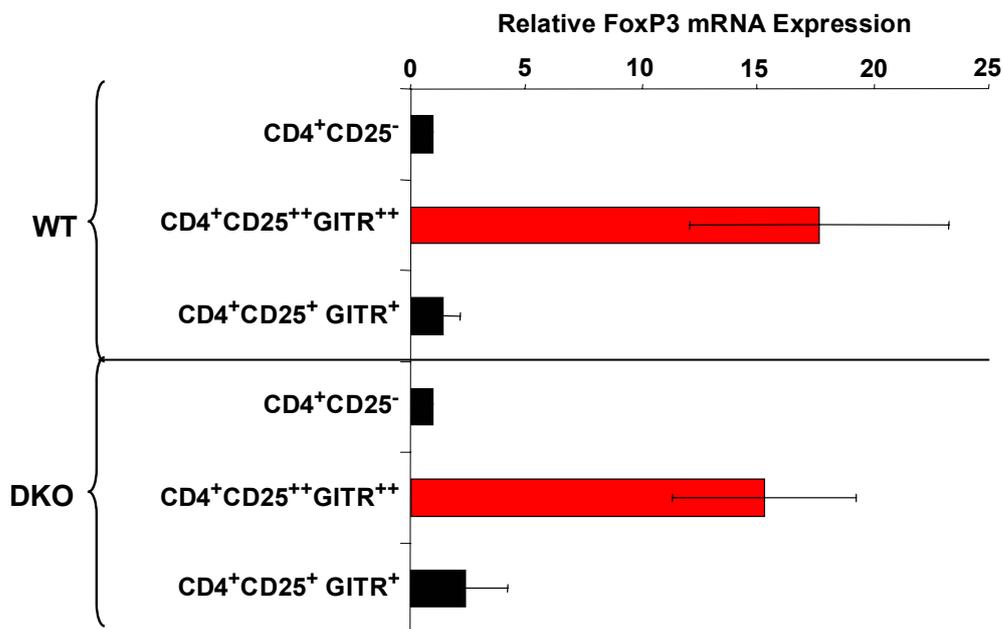


Abb.3.23: DKO CD4⁺CD25⁺⁺GITR⁺⁺ T-Zellen exprimieren große Mengen FoxP3 mRNA.

Aus Milzen von sechs Wochen alten DKO- und WT-Mäusen wurden CD4⁺CD25⁺⁺GITR⁺⁺, CD4⁺CD25⁺GITR⁺ und CD4⁺CD25⁻ T-Zellen isoliert und nach RNA Präparation und cDNA-Synthese eine Realtime-PCR zum Nachweis von FoxP3 mRNA durchgeführt.

Ein weiteres Indiz dafür, dass DKO CD4⁺CD25⁺⁺GITR⁺⁺ T-Zellen CD4⁺CD25⁺ Tregs darstellen, ist ihre besonders starke Expression von FoxP3 mRNA verglichen mit konventionellen CD4⁺ T-Zellen (Abb.3.23).

Zwar ist die sehr starke Expression von Foxp3 mRNA und die ausbleibende IL-2 mRNA Produktion selbst nach einem sehr starken Stimulus ein erstes Indiz dafür, dass periphere CD4⁺CD25⁺⁺GITR⁺⁺ aus DKO-Mäusen als CD4⁺CD25⁺ Tregs angesprochen werden können, da diese Zellen jedoch bis heute alleine über ihre suppressiven Eigenschaften beschrieben sind, wurde das suppressive Potenzial von DKO CD4⁺CD25⁺⁺GITR⁺⁺ T-Zellen in einem Proliferationsassay mit konventionellen CD4⁺ T-Zellen aus WT-Mäusen untersucht.

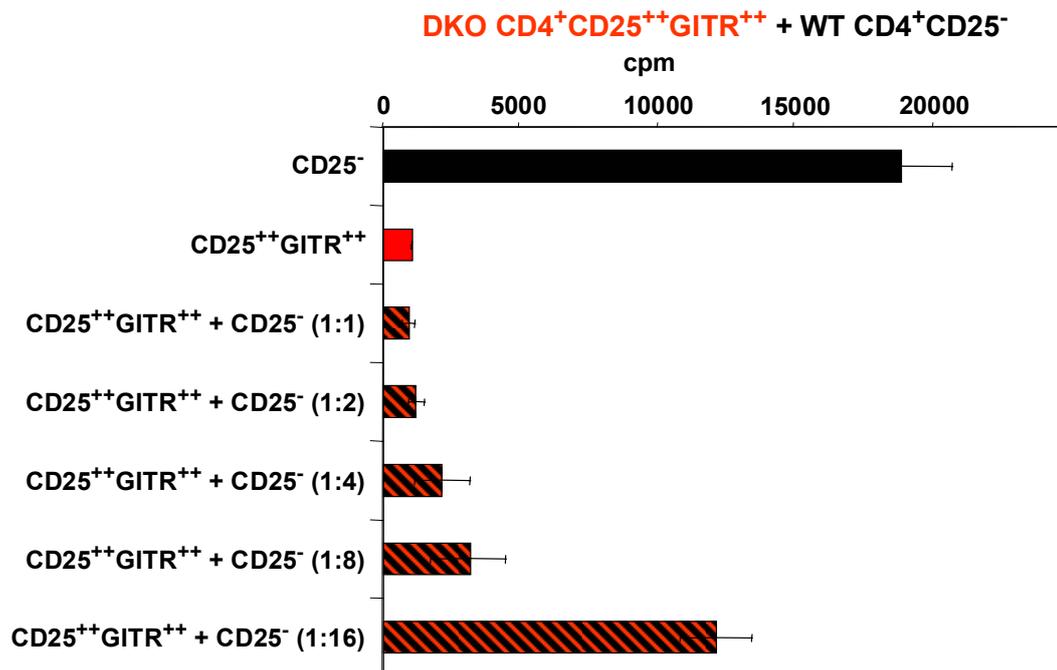


Abb.3.24: DKO CD4⁺CD25⁺⁺GITR⁺⁺ besitzen sehr starke suppressive Eigenschaften.

Nach Isolation von CD4⁺CD25⁺⁺GITR⁺⁺ T-Zellen aus Milzen von sechs Wochen alten DKO-Mäusen, wurden diese alleine oder in Kokultur mit konventionellen CD4⁺ T-Zellen aus WT Mäusen (CD25⁻) stimuliert. Als Maß für die suppressiven Fähigkeiten der DKO CD4⁺CD25⁺⁺GITR⁺⁺ wurde die Proliferation mittels ³H-Thymidin vier Tage nach Stimulation gemessen.

Der Vergleich der Abbildungen 3.24 und Abb.3.4 verdeutlicht sehr eindrucksvoll, dass CD25 alleine nicht als Marker für CD4⁺CD25⁺ Tregs benutzt werden kann, die Isolation von peripheren CD4⁺CD25⁺⁺GITR⁺⁺ scheint jedoch zur Anreicherung von CD4⁺CD25⁺ Tregs mit einem sehr grossen suppressiven Potential zu führen.

DKO CD4⁺CD25⁺⁺GITR⁺⁺ T-Zellen besitzen anscheinend ein sehr hohes Potential, WT CD4⁺CD25⁻ T-Zellen in ihrer Proliferation zu supprimieren (Vergleich: Abb.3.2 mit Abb.3.24). Deshalb sollten sie in einem weiteren Versuch mit CD4⁺CD25⁺⁺GITR⁺⁺ T-Zellen aus sechs Wochen alten WT-Mäusen verglichen werden. An dieser Stelle sollte erwähnt werden, dass die absolute Zahl der CD4⁺CD25⁺⁺GITR⁺⁺ T-Zellen in DKO-Mäusen doppelt so hoch war, wie in WT-Mäusen.

Abb.3.13 und 3.14 lassen vermuten, dass auch *in vivo* in DKO-Mäusen große Mengen IL-2 vorhanden sind, welche die starke Expansion der CD4⁺CD25⁺Tregs bedingen könnten.

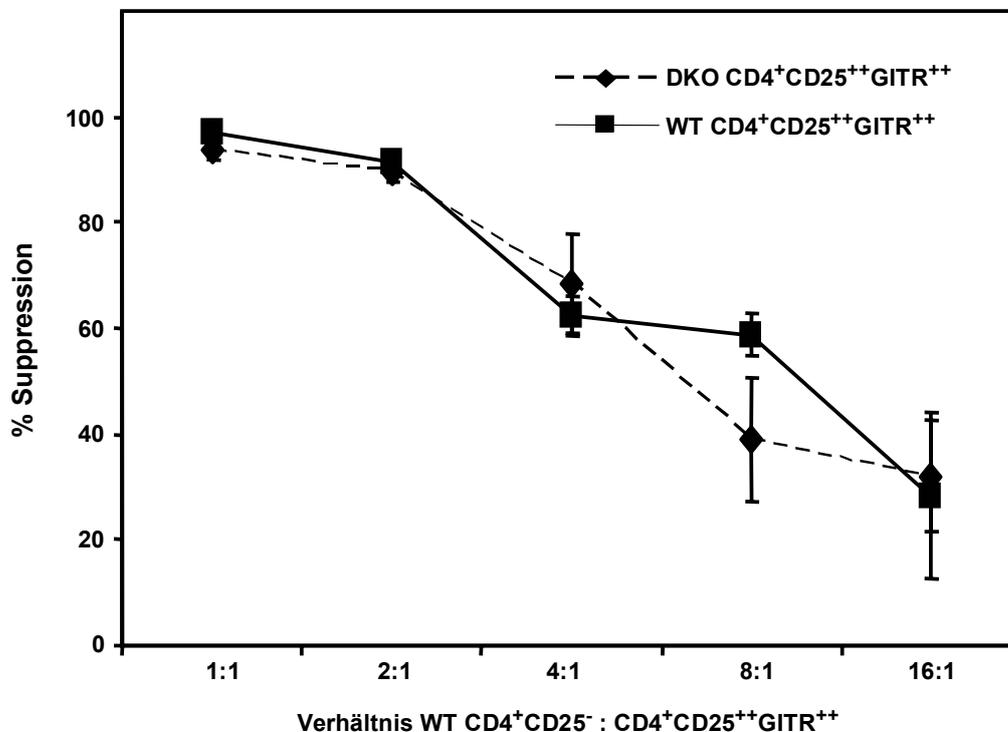


Abb.3.25: WT und DKO CD4⁺CD25⁺GITR⁺ T-Zellen zeigen vergleichbare suppressive Eigenschaften.

Um das suppressive Potential von DKO und WT CD4⁺CD25⁺GITR⁺ T-Zellen zu vergleichen, wurden diese Zellen mit konventionellen CD4⁺ T-Zellen aus WT-Mäusen in verschiedenen Verhältnissen (von 1:1 bis 16:1; konventionelle CD4⁺ T-Zelle: CD4⁺CD25⁺GITR⁺) kokultiviert. Vier Tage nach Stimulation wurde durch ³H-Thymidin und β -Scintillation die Proliferation der Zellen gemessen. Dargestellt ist anhand der Prozentzahl Suppression (bezogen auf die Proliferation der alleine stimulierten konventionellen WT CD4⁺ T-Zellen), die Fähigkeit der CD4⁺CD25⁺GITR⁺ T-Zellen, konventionelle CD4⁺ T-Zellen aus WT-Mäusen in ihrer Proliferation zu supprimieren.

Die Ergebnisse aus Abb.3.25 zeigen, dass das Fehlen der Transkriptionsfaktoren NFATc2 und NFATc3 keinen Einfluss auf die Entstehung und Funktion von CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen hat und die Entwicklung von Autoimmunerkrankungen in DKO-Mäusen alleine auf die Resistenz der CD4⁺CD25⁻ T-Zellen gegenüber CD4⁺CD25⁺ Treg-vermittelter Suppression zurückzuführen ist.

DKO $CD4^+CD25^{++}GITR^{++}$ T-Zellen sind kaum in der Lage, ihre autologen konventionellen $CD4^+$ T-Zellen zu supprimieren

Da $CD4^+CD25^{++}GITR^{++}$ T-Zellen aus DKO- und Wildtyp-Mäusen ein vergleichbar hohes suppressives Potential zeigen (Abb.3.24, 3.25 Vergleich mit Abb.3.2), sollte getestet werden, ob DKO $CD4^+CD25^{++}GITR^{++}$ T-Zellen im Stande sind, konventionelle $CD4^+$ T-Zellen aus DKO-Mäusen in ihrer Proliferation zu inhibieren.

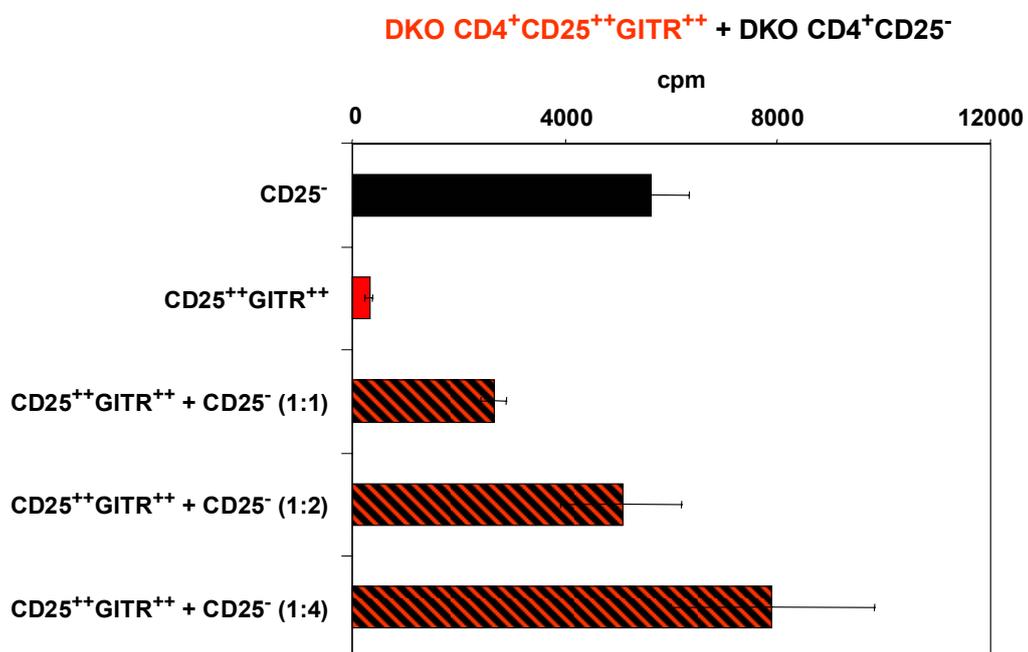


Abb.3.26: DKO $CD4^+CD25^{++}GITR^{++}$ T-Zellen sind praktisch nicht in der Lage DKO $CD4^+CD25^-$ T-Zellen effizient zu supprimieren.

DKO $CD4^+CD25^{++}GITR^{++}$ T-Zellen wurden, wie unter Abb.3.21 beschrieben, isoliert und in verschiedenen Verhältnissen mit ihren autologen $CD4^+CD25^-$ T-Zellen für vier Tage kokultiviert. Die Proliferation der Zellen wurde durch Zugabe von 3H -Thymidin und β -Scintillation gemessen.

Zwar sind $CD4^+CD25^{++}GITR^{++}$ T-Zellen aus DKO-Mäusen bei gleicher Zellzahl in der Lage DKO $CD4^+CD25^-$ T-Zellen moderat zu hemmen (40% Suppression bei einem Verhältnis von 1:1), jedoch stellt dieses Verhältnis in keiner Weise physiologische Bedingungen dar. Somit unterstreicht auch dieses Ergebnis die These, dass der autoaggressive Phänotyp der DKO-Mäuse alleine durch die Resistenz der konventionellen $CD4^+$ T-Zellen gegenüber $CD4^+CD25^+$ Treg-vermittelter Suppression begründet ist und zeigt die essentielle Rolle dieser Transkriptionsfaktoren am Mechanismus der Suppression auf Seiten der supprimierten konventionellen $CD4^+$ T-Zellen.

3.2 *In vitro* voraktivierte („pre-activated“) $CD4^+CD25^+$ Tregs (preTregs) zeigen ein größeres suppressives Potential als $CD4^+CD25^+$ Tregs *ex vivo*.

Ein wesentlicher Grund für die mangelnde Suppressierbarkeit der konventionellen DKO $CD4^+CD25^-$ T-Zellen könnte sein, dass sie nicht nur mehr IL-2 produzieren, sondern dieses auch, wie in Abb. 3.14 gezeigt, mit einer erheblich schnelleren Kinetik produzieren. Da jedoch auch $CD4^+CD25^+$ Tregs über ihren TZR aktiviert werden müssen, um ihr suppressives Potential zu entfalten, könnte dies dazu führen, dass schon ausreichend große Mengen IL-2 von DKO $CD4^+CD25^-$ T-Zellen gebildet wurden, bevor $CD4^+CD25^+$ Tregs ihr suppressives Potential ausschöpfen können. Diese sehr schnelle IL-2 Produktion könnte somit maßgeblich für die Resistenz der DKO $CD4^+CD25^-$ T-Zellen gegenüber einer $CD4^+CD25^+$ Treg-vermittelten Suppression verantwortlich sein.

Durch das Labor von E. Shevach konnte gezeigt werden, dass $CD4^+CD25^+$ Tregs *in vitro* voraktiviert werden können und dann antigenunspezifisch kokultivierte konventionelle $CD4^+CD25^-$ T-Zellen supprimieren. Dabei weisen diese preTregs ein wesentlich größeres suppressives Potential als frisch isolierte $CD4^+CD25^+$ Tregs auf. Da von konventionellen $CD4^+$ T-Zellen bekannt ist, dass sie nach Voraktivierung ihre Effektorfunktionen (z.B. Cytokinproduktion) mit einer viel schnelleren Kinetik ausüben können, sollten auch preTregs in Analogie hierzu wesentlich schneller ihr suppressives Potential entfalten können.

Um zu testen, ob diese preTregs somit auch in der Lage sind kokultivierte konventionelle DKO $CD4^+CD25^-$ T-Zellen zu inhibieren, wurden $CD4^+CD25^+$ Tregs aus WT-Mäusen isoliert und polyklonal mit einer Kombination von anti-CD3- und anti-CD28-Antikörpern über 48 Stunden voraktiviert. Diese preTregs wurden dann mit konventionellen $CD4^+CD25^-$ T-Zellen aus DKO-Mäusen kokultiviert. In einem ersten Kontrollversuch sollte jedoch das suppressive Potential dieser preTregs durch Kokultur mit bereits differenzierten Th2-Zellen, einer T-Helferzell-Linie welche mit sehr schneller Kinetik ihre Effektorfunktionen ausübt, getestet werden. Aus weiteren Vorversuchen war bekannt, dass auch Th2-Zellen sich nicht durch frisch isolierte $CD4^+CD25^+$ Tregs inhibieren lassen.

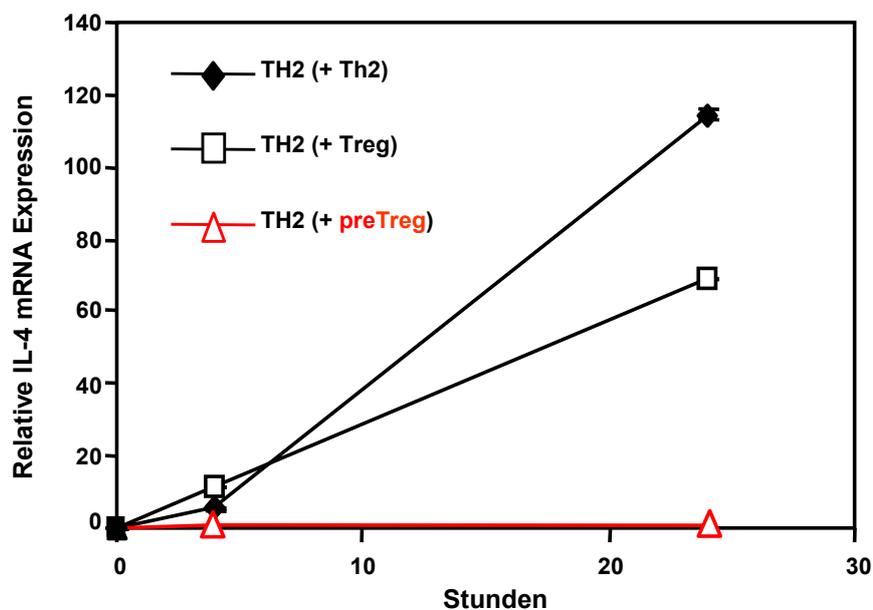


Abb.3.27: PreTregs und nicht $CD4^+CD25^+$ Tregs sind in der Lage die IL-4 Produktion von Th2 Zellen aus Wildtyp-Mäusen zu supprimieren.

Sowohl $CD4^+CD25^+$ Tregs als auch preTregs wurden in einem Verhältnis von 1:1 mit Th2-Zellen stimuliert. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden RNA-Proben genommen und diese nach reverser Transkription zum Nachweis von IL-4 mRNA in einer Realtime-PCR eingesetzt.

Abb.3.27 zeigt, dass alleine preTregs in der Lage sind die sehr schnelle IL-4 mRNA Produktion durch Th2-Zellen zu inhibieren.

Ob preTregs jedoch auch einen kinetischen Vorteil gegenüber naiven $CD4^+$ T-Zellen aus DKO-Mäusen besitzen, sollte im Folgenden getestet werden. Als Positivkontrolle für dieses Experiment wurden konventionelle $CD4^+CD25^-$ T-Zellen aus WT-Mäusen mit preTregs kokultiviert und deren Suppression in einem Proliferations-Assay untersucht.

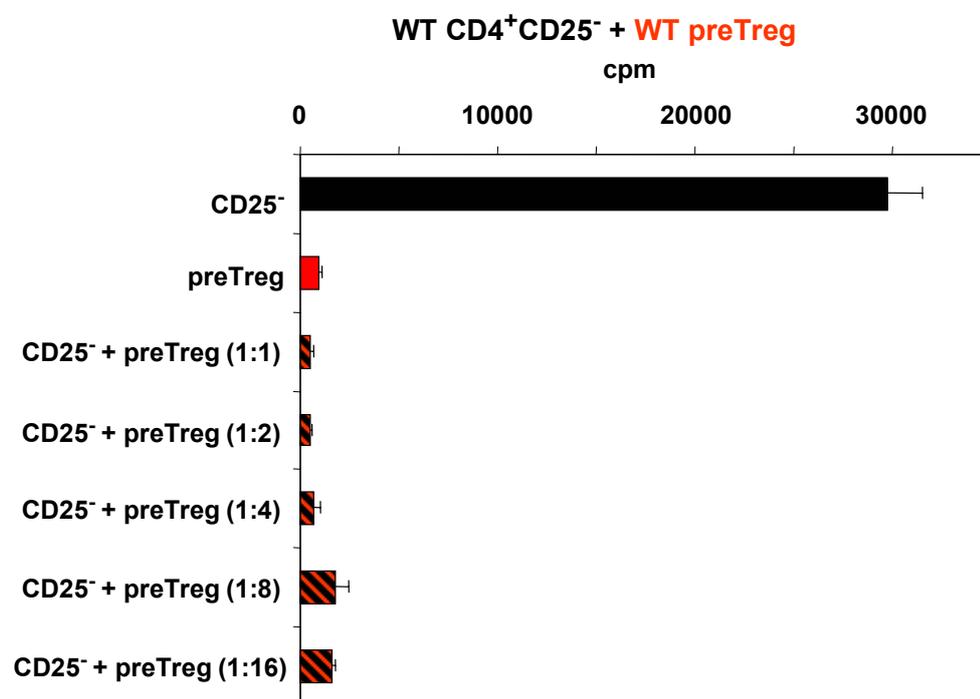


Abb.3.28: preTregs hemmen sehr effizient die Proliferation von WT $CD4^+CD25^-$.

Um das suppressive Potential von voraktivierten $CD4^+CD25^+$ regulatorischen T-Zellen (preTreg) zu testen, wurden $CD4^+CD25^+$ Tregs in Gegenwart von anti-CD3- und anti-CD28-Antikörpern 48 Stunden stimuliert und für weitere Tests mit WT $CD4^+CD25^-$ T-Zellen ($CD25^-$) kokultiviert. Vier Tage nach Kokultur wurde durch Einbau von 3H -Thymidin die Proliferation in einem β -Scintillationszähler gemessen. Zur Berechnung der Standardabweichung wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment.

PreTregs sind in der Lage die Proliferation von DKO CD4⁺CD25⁻ T-Zellen zu supprimieren

Wie aus Abb.3.28 ersichtlich, haben preTregs ein sehr hohes suppressives Potential. Zwar wird in Abb. 3.28 nur ein Verhältnis von 16 konventionellen CD4⁺CD25⁻ T-Zellen zu einer preTreg gezeigt (1:16), jedoch hemmen diese Zellen bis zu einem Verhältnis von 1:50 bis 1:100 (Vergleiche Abb.3.2 mit 3.28).

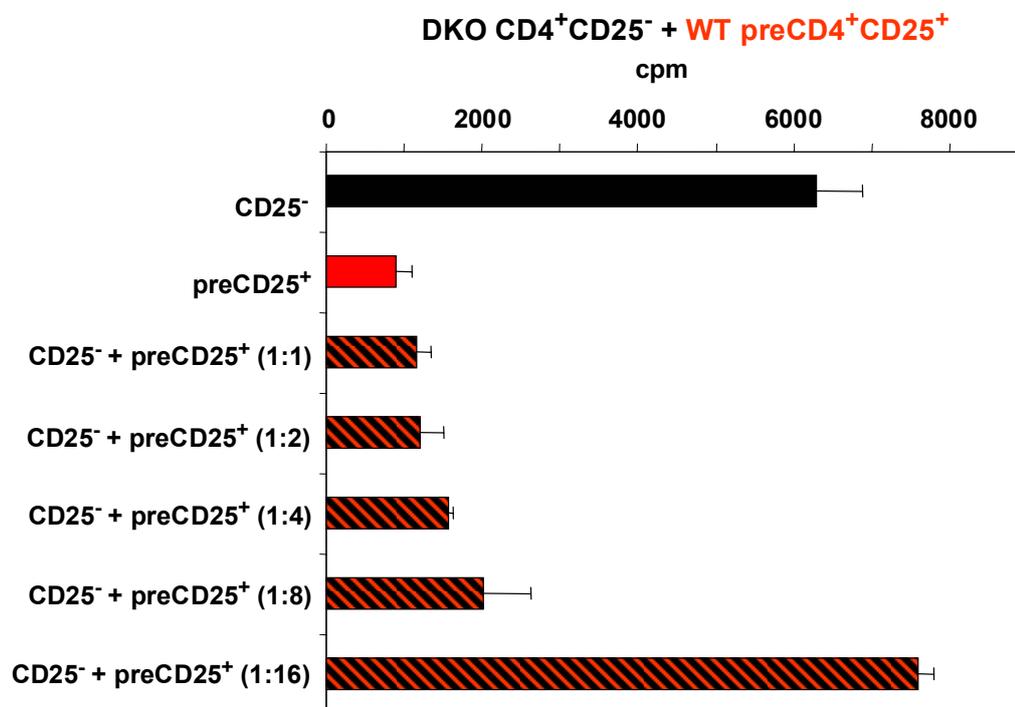


Abb.3.29: PreTregs sind in der Lage DKO CD4⁺CD25⁻ T-Zellen in ihrer Proliferation zu supprimieren.

Um die Frage zu beantworten, ob DKO CD4⁺CD25⁻ T-Zellen durch preTregs supprimiert werden können, wurden periphere DKO CD4⁺CD25⁻ T-Zellen mit zuvor 48 Stunden aktivierten CD4⁺CD25⁺ Tregs (preTregs) aus Wildtyp-Mäusen für vier Tage kokultiviert. Die Proliferation als Maß für die Suppression wurde nach ³H-Thymidineinbau durch β -Scintillation gemessen.

Schließlich zeigte die Kokultur von preTregs aus WT-Mäusen mit DKO $CD4^+CD25^-$ T-Zellen, dass diese alleine durch preTregs gehemmt werden können (Abb.3.29). Im Vergleich zu Abb.3.28 sieht man jedoch auch hier das Potential der DKO $CD4^+CD25^-$ T-Zellen, selbst eine preTreg-vermittelte Suppression, zumindest bei einem Verhältnis von 16:1, vollständig zu durchbrechen (Vergleiche Abb 3.28 mit Abb. 3.29). Ob NFATc2 und NFATc3 nach Kokultur mit $CD4^+CD25^+$ Tregs in supprimierten T-Zellen aktiviert werden und so direkt an der Inhibition der IL-2 Produktion und Proliferation beteiligt sind, oder ob sie andere Moleküle induzieren bzw. mit diesen interagieren bleibt Gegenstand der folgenden Untersuchungen.

3.3 Untersuchung des Transkriptoms supprimierter $CD4^+$ T-Zellen

Der Mechanismus der kontaktabhängigen Suppression von T-Zellen durch $CD4^+CD25^+$ Tregs ist immer noch völlig unklar. Parallel zu den bisherigen Experimenten wurden deshalb supprimierte $CD4^+$ T-Zellen nach Kokultur mit $CD4^+CD25^+$ Tregs analysiert. Zu diesem Zweck musste ein System etabliert werden, diese Zellen von kokultivierten $CD4^+CD25^+$ Tregs zu trennen. Hierbei war entscheidend, eine sehr hohe Reinheit der supprimierten $CD4^+$ T-Zellen und damit eine möglichst geringe Kontamination mit $CD4^+CD25^+$ Tregs zu erhalten. Da das MACS-System^{xvi} lediglich Reinheiten zwischen 85 und 95 % liefert, stellte die FACS-basierte Trennung fluoreszenzmarkierter Zellen eine attraktive Alternative dar. Neben dem Vorteil, dass die Proliferation CFSE-markierter Zellen sehr einfach und effizient im FACS dargestellt werden kann (Abb.3.7), erlaubt die Färbung mit dem Vitalfarbstoff CFSE eine FACS-basierte Trennung dieser Zellen nach Kokultur mit ungefärbten Zellen. Um ausschließen zu können, dass bei der FACS-basierten Anreinigung von CFSE-markierten supprimierten $CD4^+$ T-Zellen auch Aggregate aus CFSE-gefärbten und ungefärbten Zellen (diese würden im FACS als CFSE-positive Zellen dargestellt) angereinigt werden, wurden CFSE-markierte $CD4^+$ T-Zellen und $CD4^+CD25^+$ Tregs kokultiviert, die unterschiedliche MHC-I Haplotypen exprimieren, um nach Anreinigung der CFSE-positiven Zellen eine Verunreinigung mit $CD4^+CD25^+$ Tregs durch entsprechende Antikörper gegen den jeweiligen MHC-I Haplotyp nachzuweisen (siehe Abb.3.30).

^{xvi} Das **MACS**-System (Magnetic cell separation/sorting) basiert auf der Benutzung magnetischer "Beads", die gekoppelt an Antikörper zur Aufreinigung verschiedenster Zellen benutzt werden können (siehe Material und Methoden).

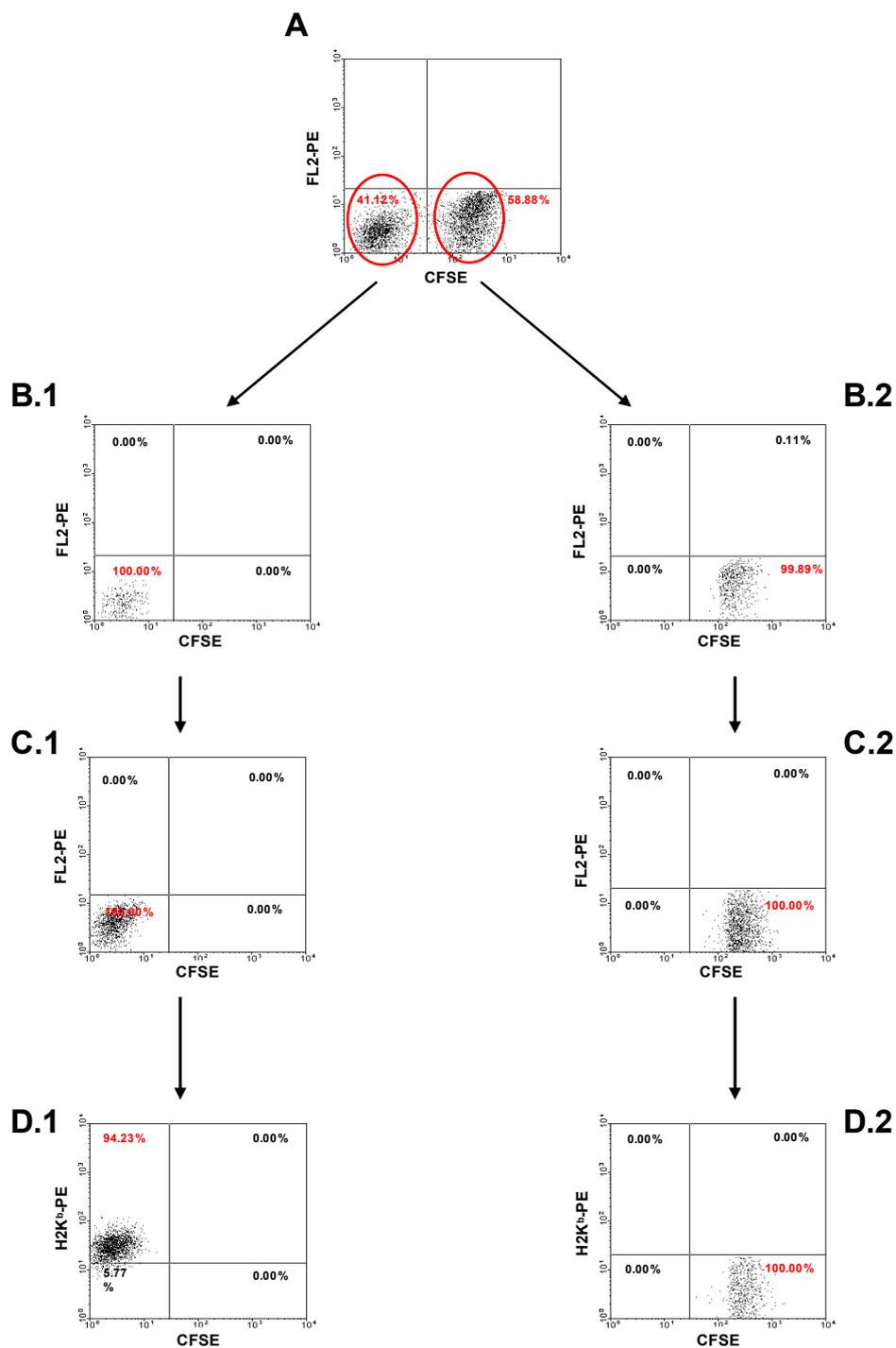


Abb.3.30: FACS-basierte Trennung CFSE-markierter T-Zellen

Um $CD4^+$ T-Zellen oder auch Th2-Zellen nach Kokultur mit $CD4^+CD25^+$ Tregs bzw. preTregs zu reinigen, wurden diese Zellen mit dem Vitalfarbstoff CFSE markiert und in einem Verhältnis von 1:1 kokultiviert (A).

Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden beide Zellpopulationen (CFSE-negative $CD4^+CD25^+$ Tregs und CFSE-positive supprimierte $CD4^+$ T-Zellen) durch FACS-Sort bis zu einer Reinheit von 100% voneinander getrennt (B.1: CFSE-negative Zellen und B.2: CFSE-positive Zellen). Um die absolute Reinheit der beiden Zellpopulationen zu bestimmen, wurden $CD4^+CD25^+$ Tregs von BL6 Mäusen und $CD4^+CD25^-$ T-Zellen von Balb/c Mäusen eingesetzt. Da BL6 und Balb/c Mäuse sich in ihrem MHC-I-Haplotyp unterscheiden (BL/6 = H-2k^b, Balb/c = H-2k^d), kann nach FACS-Sort der Zellen die Reinheit durch Färbung mit einem, gegen H-2k^b gerichteten Antikörper (D.1 und D.2) bzw. mit der entsprechenden Isotyp-Kontrolle (C.1 und C.2) bestimmt werden. Die Reinheit der supprimierten $CD4^+$ T-Zellen betrug ~ 100% (D.2).

Nachdem es möglich war supprimierte T-Zellen bis zu einer Reinheit von annähernd 100% aufzureinigen (Abb.3.30), konnten sensitive molekularbiologische Methoden, wie etwa Realtime-PCR zur Identifizierung von Molekülen, welche an der Suppression beteiligt sind, durchgeführt werden.

Ein wesentliches Charakteristikum supprimierter $CD4^+$ T-Zellen ist, dass sie weder proliferieren noch Cytokine produzieren. Welche Transkriptionsfaktoren jedoch nach Kokultur mit $CD4^+CD25^+$ Tregs an der Inhibition proliferationsfördernder Cytokine, wie IL-2 oder IL-4 beteiligt sind, ist bisher unbekannt. Neben der Tatsache, dass sogenannte scurfy-Mäuse keine $CD4^+CD25^+$ Tregs besitzen fällt auf, dass deren konventionelle $CD4^+$ T-Zellen nach Aktivierung große Mengen verschiedenster proliferationsfördernder Cytokine (u.a. IL-2 und IL-4) produzieren. Aufgrund dieses Phänotyps lag es nahe die Beteiligung von FoxP3 an der Suppression von konventionellen $CD4^+$ T-Zellen durch $CD4^+CD25^+$ Tregs eingehender zu untersuchen.

$CD4^+CD25^+$ regulatorische T-Zellen induzieren in kokultivierten konventionellen $CD4^+$ T-Zellen die Expression von FoxP3 mRNA

Während meiner Diplomarbeit und in einer weiteren Publikation¹⁴⁴ konnten wir zeigen, dass $CD4^+CD25^+$ Tregs in konventionellen $CD4^+$ T-Zellen bzw. voraktivierte $CD4^+CD25^+$ Tregs (preTregs) in Th2-Zellen die Expression von FoxP3 induzieren (siehe Abb. 3.31). FoxP3 scheint als Transkriptionsrepressor an die Promotoren verschiedener Cytokingene zu binden und so deren Expression zu verhindern. Dies konnten wir für den IL-4 Promoter und den IL-4 Enhancer durch einen „Chromatin Immuno Precipitation Assay“ (ChIP) zeigen (Abb.3.32).

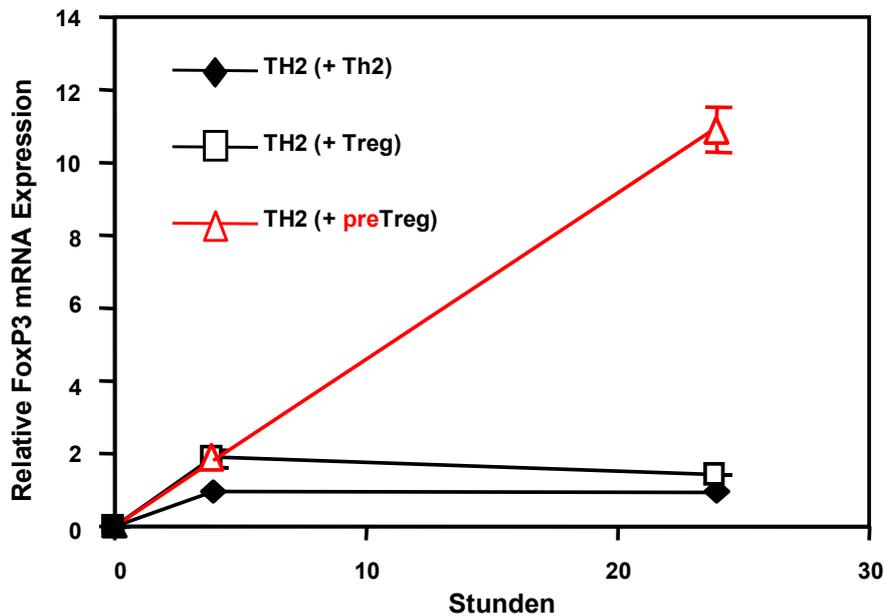


Abb.3.31: preTregs induzieren in Th2-Zellen die Expression von FoxP3 mRNA.

Um die Expression des transkriptionellen Repressors FoxP3 in supprimierten Th2-Zellen nachzuweisen, wurden diese mit dem Vitalfarbstoff CFSE gefärbt und anschließend für die angegebenen Zeitpunkte mit $CD4^+CD25^+$ Tregs oder preTregs kokultiviert. Durch FACS-Sort wurden die CFSE-positiven Th2-Zellen von den CFSE-negativen $CD4^+CD25^+$ Tregs oder preTregs getrennt und die RNA wurde präpariert. Nach reverser Transkription wurde eine Realtime PCR für FoxP3 und EF1alpha durchgeführt. Die erhaltenen Werte der FoxP3 mRNA wurden durch die Werte für EF1alpha normalisiert. Gezeigt ist ein representatives Experiment. Die Standardabweichung wurde durch Dreifachbestimmung berechnet.

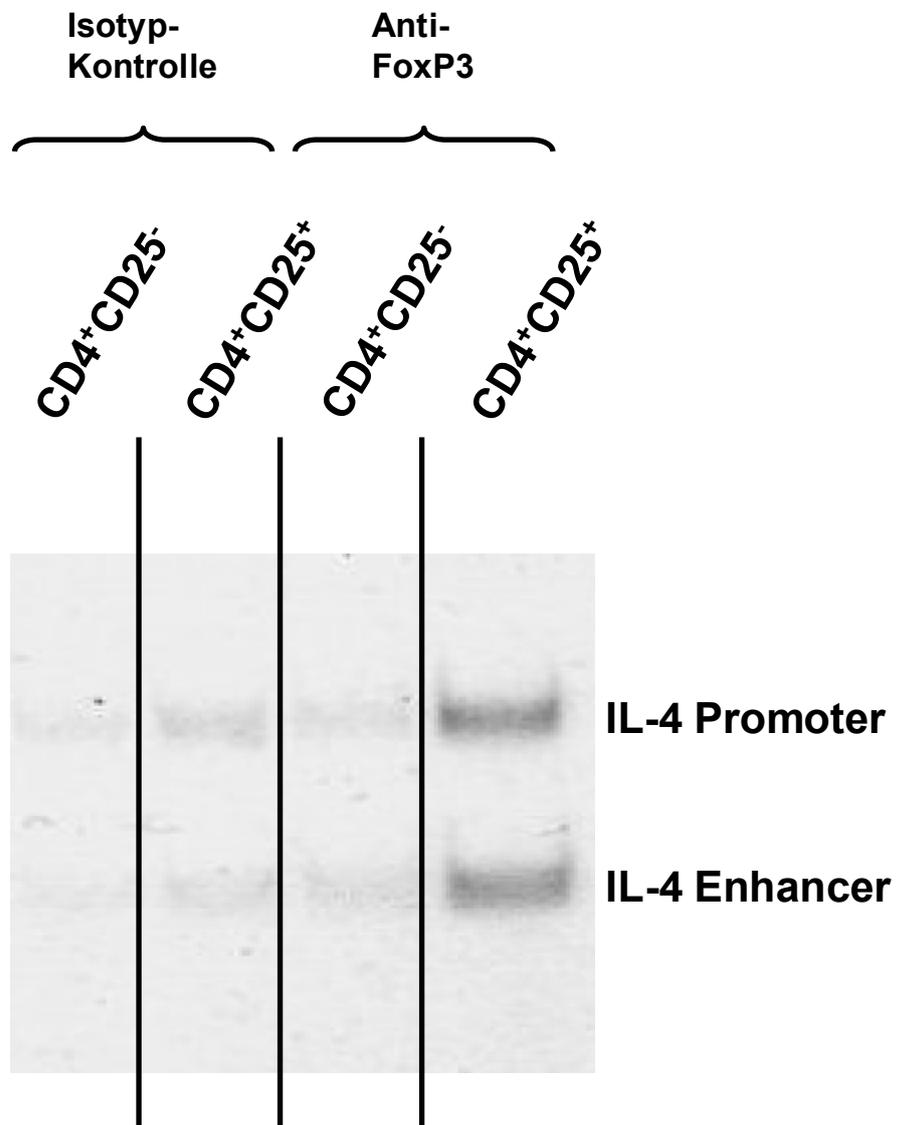


Abb.3.32: FoxP3 bindet in CD4⁺CD25⁺ Tregs an den IL-4 Promoter und IL-4 Enhancer

Nach Präparation der Zellkerne von CD4⁺CD25⁻ und CD4⁺CD25⁺ Tregs (CD4⁺CD25⁺) wurde eine Chromatin-Immunopräzipitation mit einem Antikörper gegen FoxP3 und der entsprechenden Isotypkontrolle durchgeführt. Nach Präzipitation wurde zum Nachweis des IL-4 Promoters und des IL-4 Enhancers eine PCR mit entsprechenden Oligonukleotiden durchgeführt. Alleine in CD4⁺CD25⁺ Tregs bindet FoxP3 spezifisch an den IL-4 Promoter und IL-4 Enhancer.

Die Abbildung 3.31 zeigt, dass nur preTregs in der Lage sind, die Expression von FoxP3 mRNA in Th2-Zellen zu induzieren und damit die IL-4-Produktion dieser Zellen zu supprimieren. Es kann also angenommen werden, dass die Suppression von konventionellen CD4⁺ T-Zellen und Th2 Zellen durch CD4⁺CD25⁺ Tregs mit einer Induktion der FoxP3 Expression einhergeht und das FoxP3 nach Bindung an verschiedene Promotoren in den supprimierten T-Zellen schließlich zur Inhibition der Cytokinproduktion (IL-2 und IL-4) beiträgt (Abb.3.32). Da CD4⁺ T-Zellen aus DKO-Mäusen trotz Kokultivierung mit CD4⁺CD25⁺Tregs nur gering in ihrer IL-2 Produktion eingeschränkt sind (Abb.3.12, 3.13 und 3.14), sollte im Folgenden untersucht werden, ob auch in diesen Zellen nach Stimulation mit CD4⁺CD25⁺ Tregs, FoxP3 mRNA nachzuweisen ist.

DKO Th2-Zellen exprimieren geringe Mengen FoxP3 mRNA nach Kokultur mit preTregs

Da die Expression von FoxP3 mRNA in supprimierten CD4⁺ T-Zellen und Th2-Zellen mit der Inhibition ihrer Effektorfunktionen zu korrelieren scheint, wurden nachfolgend DKO CD4⁺CD25⁻ T-Zellen nach Kokultur mit pre Tregs, auf die Expression von FoxP3 mRNA untersucht. Hierzu wurden sowohl Th2-Zellen von WT CD4⁺CD25⁻ T-Zellen, als auch von DKO CD4⁺CD25⁻ T-Zellen generiert und mit preTregs kokultiviert. Nach Trennung der Zellen durch FACS-Sort wurde die Expression der IL-4 mRNA und FoxP3 mRNA durch Realtime-PCR bestimmt.

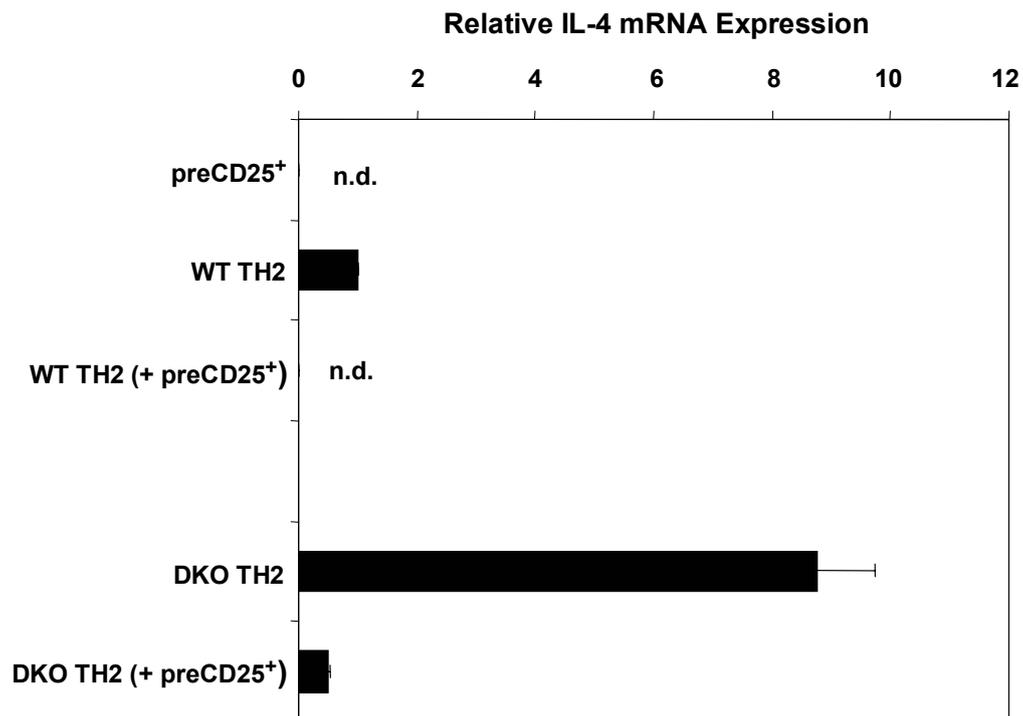


Abb.3.33: PreTregs sind nicht in der Lage die IL-4-Produktion von DKO Th2-Zellen vollständig zu inhibieren.

CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus WT- und DKO-Mäusen wurden für sechs Tage unter Th2-induzierenden Bedingungen (siehe Material und Methoden) stimuliert, mit CFSE markiert und an Tag 6 für weitere 24 Stunden mit preTregs mittels 1µg/ml anti-CD3-Antikörper und A20 als akzessorische Zellen stimuliert. Nach 24 Stunden Stimulation wurden die jeweiligen Th2-Zellen durch FACS-Anreinigung von den preTregs getrennt und nach Präparation der RNA eine Realtime-PCR zum Nachweis von IL-4 mRNA unter Abgleich mit EF1alpha mRNA durchgeführt. N.d. = nicht nachweisbar.

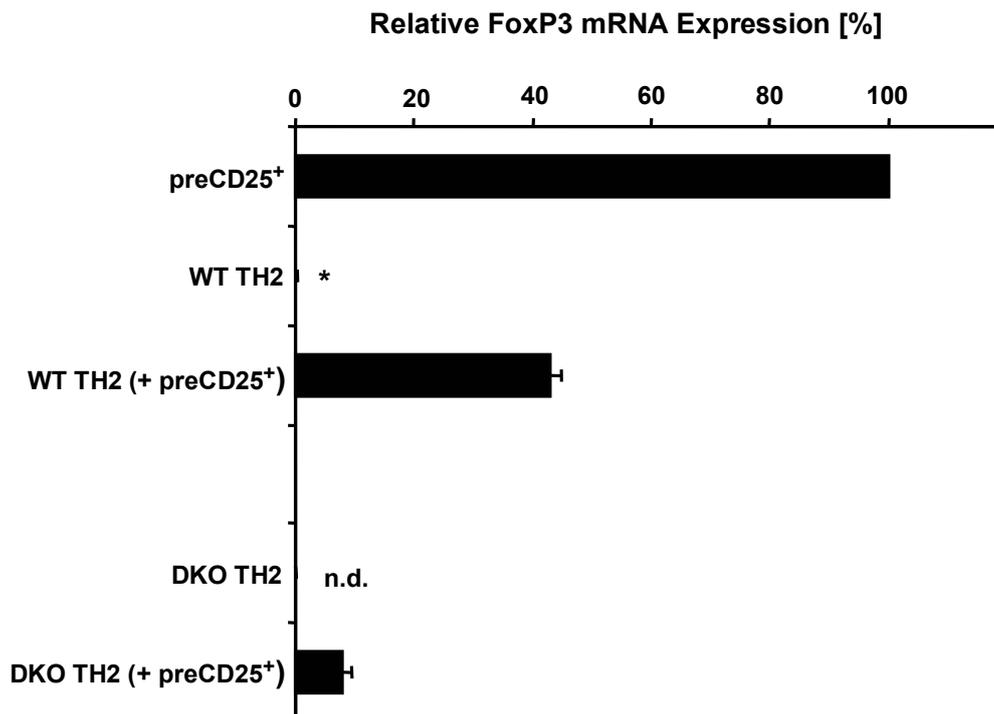


Abb.3.34: PreTregs induzieren nur geringe Mengen FoxP3 mRNA in DKO Th2-Zellen.

24 Stunden nach der unter 3.33 beschriebenen Stimulation wurde die RNA der o.g. Zellen präpariert und eine reverse Transkription in cDNA (komplementäre DNA) durchgeführt. Die relative Expression der FoxP3 mRNA wurde durch eine Realtime-PCR in Triplikaten bestimmt. Die erhaltenen Werte für FoxP3 mRNA wurden auf die Expression von EF1alpha mRNA normalisiert. Die Standardabweichung wurde durch die jeweilige Dreifachbestimmung errechnet.

*= >0.5.; n.d. = nicht nachweisbar.

Wie aus Abbildung 3.33 ersichtlich, unterbinden preTregs die IL-4 mRNA Expression von WT Th2-Zellen vollständig. Dagegen wird die IL-4 mRNA Produktion der DKO Th2-Zellen zwar auch beträchtlich reduziert, erreicht aber immer noch in etwa das Niveau von nicht supprimierten WT Th2-Zellen. Diese partielle Inhibition der IL-4 mRNA Produktion geht mit einer stark reduzierten Induktion der Expression von FoxP3 mRNA in DKO Th2 Zellen nach Kokultur mit preTregs einher (Abb.3.34).

3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Nachfolgend sind die Ergebnisse dieser Arbeit in Stichpunkten zusammengefasst:

- Der autoaggressive Phänotyp der NFATc2/ NFATc3-doppeldefizienten Mäuse (DKO-Mäuse) ist auf der Resistenz ihrer konventionellen CD4⁺ T-Zellen gegenüber CD4⁺CD25⁺ Treg-vermittelten Suppression begründet.
- Diese Resistenz beruht u.a. auf der sehr schnellen Produktion des proliferationsfördernden Cytokins Interleukin-2 durch die konventionellen CD4⁺ T-Zellen.
- Andere Mechanismen der peripheren Toleranz sind durch das Fehlen von NFATc2 und NFATc3 nicht beeinflusst. Das immunsuppressive Cytokin TGF-β ist im Stande die Proliferation und IL-2 Produktion der konventionellen CD4⁺ T-Zellen aus DKO-Mäusen zu inhibieren.
- Das Fehlen der Transkriptionsfaktoren NFATc2 und NFATc3 beeinflusst die Entstehung von CD4⁺CD25⁺ Tregs im Thymus nicht.
- CD4⁺CD25⁺ Tregs können eindeutig von aktivierten konventionellen CD4⁺ T-Zellen durch die Stärke der CD25- und GITR-Expression unterschieden werden.
- Das Fehlen der Transkriptionsfaktoren NFATc2 und NFATc3 beeinflusst die suppressiven Eigenschaften von CD4⁺CD25⁺ Tregs nicht. Jedoch sind auch die endogenen CD4⁺CD25⁺ Tregs dieser Mäuse nicht in der Lage ihre autologen konventionellen CD4⁺ T-Zellen zu supprimieren.
- *In vitro* voraktivierte CD4⁺CD25⁺ Tregs (preTregs) zeigen ein deutlich höheres suppressives Potential als frisch isolierte CD4⁺CD25⁺ Tregs.
- PreTregs sind in der Lage die Proliferation von kokultivierten DKO CD4⁺CD25⁻ T-Zellen zu supprimieren.

- CD4⁺CD25⁺ Tregs und preTregs induzieren in kokultivierten (supprimierten) T-Zellen die Expression des transkriptionellen Repressors FoxP3.
- DKO CD4⁺CD25⁻ und DKO Th2-Zellen zeigen nach Kokultur mit CD4⁺CD25⁺ Tregs oder preTregs eine wesentlich geringere Expression des transkriptionellen Repressors FoxP3 als T-Zellen aus Wildtyp-Tieren.

4. Diskussion

„Dem adaptiven Immunsystem höherer Vertebraten steht zur Abwehr sich ständig evolvierender, neuer Pathogene eine Vielzahl von Mechanismen zur Verfügung. Damit jedoch diese Systeme effizient Krankheitserreger erkennen und bekämpfen können und gleichzeitig körpereigene Strukturen verschonen, bedarf es verschiedenster komplexer und hochspezialisierter Mechanismen, die unter dem Begriff immunologischer Toleranz zusammengefasst werden“¹⁴⁵. Dabei müssen diese Mechanismen in einem „gesunden“ Individuum autoaggressive Zellen in ihren Effektorfunktionen inhibieren und gleichzeitig effiziente Immunantworten gegen eindringende Pathogene zulassen. Um diese Toleranz zu gewährleisten, stehen dem Immunsystem neben den Mechanismen der zentralen Toleranz, sowohl passive als auch aktive Mechanismen der peripheren Toleranz zur Verfügung^{145;146}. Die wahrscheinlich wichtigste Komponente dieses „Immun-Toleranz-Netzwerks“ sind im Thymus entstehende, so genannte natürlich vorkommende CD4⁺CD25⁺ regulatorische T-Zellen (CD4⁺CD25⁺ Tregs)⁵⁰. Ein wesentliches Problem bei der Erforschung von CD4⁺CD25⁺ Tregs ist, das Fehlen eines Oberflächenmoleküls, welches alleine auf diesen Zellen exprimiert wird. Allerdings können murine CD4⁺CD25⁺ Tregs nur unter Verwendung naiver^{xvii} Mäuse durch die Expression der α -Kette des Interleukin-2 Rezeptors (CD25) charakterisiert und isoliert werden. In solchen Mäusen exprimieren 5-10% aller peripheren CD4⁺ T-Zellen CD25 und werden somit als CD4⁺CD25⁺ Tregs angesehen⁶⁶.

Mäuse, welche defizient für die Transkriptionsfaktoren NFATc2 und NFATc3 sind, entwickeln verschiedenste Autoimmunerkrankungen, charakterisiert durch massive Lymphadenopathie, Splenomegalie und eine starke Erhöhung der IgE und IgG1 Serum-Spiegel. Weiterhin zeigen diese Mäuse mit zunehmendem Alter eine starke Erhöhung der peripheren T-Zellzahlen mit aktiviertem Phänotyp, d.h. unter anderem einer Expression von CD25¹¹⁶. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass CD4⁺ T-Zellen dieser Mäuse hyperresponsiv sind und nach TZR-Stimulation spontan, d.h. in Abwesenheit von endogenem IL-4, zu Th2-Zellen differenzieren¹¹⁷.

^{xvii} Man bezeichnet eine Maus als „naiv“, wenn sie unter SPF-Bedingungen gehalten wurde und bisher nicht in Kontakt mit einem Antigen war.

Diese Ergebnisse weisen daraufhin, dass die Transkriptionsfaktoren NFATc2 und NFATc3 ungleich der anderen NFATc-Familienmitglieder¹²⁴⁻¹²⁶ inhibitorische Funktionen besitzen^{140;141} und möglicherweise entscheidend an der Induktion und/oder Aufrechterhaltung von immunologischer Toleranz beteiligt sind.

Ziel dieser Arbeit war es die immunologischen Dysfunktionen von NFATc2, NFATc3 doppeldefizienten Mäusen (DKO-Mäuse) unter besonderer Berücksichtigung der CD4⁺CD25⁻ und CD4⁺CD25⁺ T-Zell-Populationen zu untersuchen. Hierbei sollte eine Beteiligung dieser Transkriptionsfaktoren an der Entstehung und Funktion von CD4⁺CD25⁺ Tregs oder aber am Mechanismus der CD4⁺CD25⁺ Treg-vermittelten Suppression von konventionellen CD4⁺ T-Zellen eingehend analysiert werden.

4.1 Charakterisierung der peripheren CD4⁺CD25⁺ und CD4⁺CD25⁻ T-Zellen in DKO-Mäusen

Betrachtet man das zahlenmäßige Verhältnis von CD4⁺CD25⁻ und CD4⁺CD25⁺ T-Zellen in der Peripherie von Mäusen, welche defizient in den Transkriptionsfaktoren NFATc2 und NFATc3 (DKO-Mäuse) sind, so fällt auf, dass hier der Anteil der CD4⁺CD25⁺ T-Zellen im Alter von sechs Wochen stark erhöht ist (Abb. 3.1) und kontinuierlich bis zum Tod der Mäuse ansteigt (Daten nicht gezeigt). Da diese Mäuse schwere autoimmune Erkrankungen entwickeln, konnte angenommen werden, dass die erhöhte Zahl der CD4⁺CD25⁺ T-Zellen durch aktivierte, autoreaktive konventionelle CD4⁺ T-Zellen erklärt werden kann. Um diese Hypothese zu belegen, wurden sowohl CD4⁺CD25⁺ als auch CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus der Peripherie von DKO-Mäusen isoliert. Ein wichtiges Charakteristikum von CD4⁺CD25⁺ Tregs ist ihr aneurer Phänotyp. D.h. diese Zellen proliferieren *in vitro* nach TZR-Stimulation nicht und bilden auch keinerlei Cytokine. Vielmehr sind diese Zellen in der Lage kokultivierte konventionelle CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in ihren Effektorfunktionen (Proliferation und Cytokinproduktion) in einem kontaktabhängigen Prozess zu supprimieren (Zitat⁵⁰ und Abb. 3.2). Untersucht man diese Eigenschaften bei CD4⁺CD25⁺ T-Zellen aus DKO-Mäusen, so zeigt sich, dass diese nicht in der Lage sind kokultivierte autologe konventionelle CD4⁺ T-Zellen in ihrer Proliferation zu supprimieren (Abb. 3.3).

Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass der autoimmune Phänotyp der DKO-Mäuse entweder darauf beruht, dass diese Mäuse keine funktionellen

CD4⁺CD25⁺ Tregs in ihrer Peripherie besitzen oder dass konventionelle CD4⁺ T-Zellen aus diesen Mäusen nicht durch CD4⁺CD25⁺ Tregs supprimiert werden können. Da alleine die Kokultur von konventionellen CD4⁺ T-Zellen aus Wildtyp-Tieren und CD4⁺CD25⁺ T-Zellen aus DKO-Mäusen bzw. die Kokultur von konventionellen CD4⁺ T-Zellen aus DKO-Mäusen mit CD4⁺CD25⁺ Tregs aus Wildtyp-Tieren diese Frage beantworten kann, wurden die entsprechenden T-Zellpopulationen isoliert und in einem Proliferationstest eingesetzt.

4.2 DKO CD4⁺CD25⁻ T-Zellen sind gegen eine CD4⁺CD25⁺ Treg-vermittelte Suppression resistent

Die Kokultur von konventionellen CD4⁺ T-Zellen aus DKO-Mäusen mit WT CD4⁺CD25⁺ Tregs zeigte, dass diese nicht in der Lage sind die Proliferation der konventionellen CD4⁺ T-Zellen aus DKO-Mäusen zu inhibieren (Abb. 3.5). Auffällig ist hierbei der stark erhöhte ³H-Thymidin Einbau in der Kokultur von DKO CD4⁺CD25⁻ und WT CD4⁺CD25⁺ Tregs. Obwohl CD4⁺CD25⁺ Tregs *in vitro* weder proliferieren, noch Cytokine nach TZR-Stimulation produzieren, weiß man, dass diese Zellen sehr wohl in der Lage sind zu proliferieren. So konnte gezeigt werden, dass CD4⁺CD25⁺ Tregs nach adoptivem Transfer in eine T-Zelllose Maus oder nach Antigenkontakt *in vivo* sehr intensiv proliferieren ¹⁰¹. *In vitro* können CD4⁺CD25⁺ Tregs nur in Gegenwart großer Mengen IL-2 zur Proliferation nach TZR-Stimulus angeregt werden. Entscheidend dabei ist, dass sie trotz ihrer Proliferation die suppressiven Eigenschaften behalten und weiterhin ausüben können ⁹⁴. Durchbricht man diese Suppression durch starke Kostimulation der konventionellen CD4⁺ T-Zelle über CD28 so führt dies zu einer starken IL-2 Produktion der konventionellen CD4⁺ T-Zellen und auch zur Proliferation der kokultivierten CD4⁺CD25⁺ Tregs ^{53;86;95;147;148}. Um zu prüfen, ob der stark erhöhte ³H-Thymidin Einbau in Abb. 3.5 durch die Proliferation der CD4⁺CD25⁺ Tregs erklärt werden kann, wurden sowohl konventionelle CD4⁺ T-Zellen aus DKO-Mäusen, als auch CD4⁺CD25⁺ Tregs aus Wildtyp-Tieren mit dem Vitalfarbstoff CFSE (Abb.3.6) gefärbt und anschließend alleine oder in Kokultur mit jeweils ungefärbten Zellen stimuliert.

Eine Analyse der Proliferation von WT $CD4^+CD25^+$ Tregs in Kokultur mit WT $CD4^+CD25^-$ zeigt, dass diese Zellen zwar in der Lage sind, die Proliferation der letztgenannten zu unterbinden (Abb.3.8C), selbst jedoch nicht proliferieren (Abb. 3.8D). Die Kokultur mit konventionellen $CD4^+$ T-Zellen aus DKO-Mäusen dagegen zeigt, dass WT $CD4^+CD25^+$ Tregs nicht in der Lage sind diese T-Zellen zu inhibieren (Abb. 3.9C). Färbt man WT $CD4^+CD25^+$ Tregs mit CFSE, so sieht man, dass sie unter diesen Bedingungen sogar intensiv anfangen zu proliferieren (Abb. 3.9D). Obgleich man über die molekularen Mechanismen der $CD4^+CD25^+$ Treg-vermittelten Suppression nur sehr wenig weiß, konnten Thornton et al. 1998 ein primäres Ziel dieser Suppression erklären. So scheint die Inhibition der Proliferation sekundär, da bereits 16 bis 18 Stunden nach Kokultur von WT $CD4^+CD25^+$ Tregs mit konventionellen $CD4^+$ T-Zellen eine Inhibition der IL-2 Produktion erkennbar ist⁵³. Vergleicht man die IL-2 Produktion von konventionellen $CD4^+$ T-Zellen aus Wildtyp-Tieren und DKO-Mäusen, so zeigt sich nicht nur, dass Letztere nach TZR-Stimulus sehr schnell große Mengen dieses Cytokins produzieren (Abb. 3.12, 3.13 und 3.14) sondern auch, dass $CD4^+CD25^+$ Tregs nicht in der Lage sind die Produktion dieses Cytokins in DKO $CD4^+$ T-Zellen effizient zu inhibieren. Dieser Befund lässt die in Abb. 4.1 dargestellte Hypothese der IL-2-Gen-Regulation bei Aktivierung und $CD4^+CD25^+$ Treg-vermittelter Suppression von konventionellen $CD4^+$ T-Zellen zu. In diesem Zusammenhang ist eine Veröffentlichung zu erwähnen in der gezeigt werden konnte, dass konventionelle $CD4^+$ T-Zellen aus DKO-Mäusen hyperresponsiv sind. Das heißt, dass diese Zellen nach Stimulation über ihren TZR, in Abwesenheit kostimulatorischer Signale (ein Stimulus der normalerweise Anergie induziert) stark proliferieren und besonders große Mengen Th2-spezifischer Cytokine (IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13) produzieren¹¹⁷. Da auch $CD4^+CD25^+$ Tregs erst nach Aktivierung über ihren T-Zellrezeptor ihre suppressiven Eigenschaften entfalten⁵⁰, kann angenommen werden, dass DKO $CD4^+CD25^-$ T-Zellen gegenüber $CD4^+CD25^+$ Tregs einen kinetischen Vorsprung besitzen und so diese Suppression durch eine rapide Produktion großer Mengen IL-2 durchbrechen (Abb. 3.14).

Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass konventionelle CD4⁺ T-Zellen aus Mäusen, welche defizient für die Ubiquitin-3-Ligase cbl-b sind (cbl-b^{-/-}-Mäuse) sich *in vitro* scheinbar auch nicht von CD4⁺CD25⁺ Tregs supprimieren lassen⁹¹. Vergleicht man jedoch DKO-Mäuse mit cbl-b^{-/-}-Mäusen, so fällt auf, dass letztere keine erhöhten Zahlen konventioneller CD4⁺ T-Zellen mit aktiviertem Phänotyp (CD25⁺,CD69⁺,CD44⁺) zeigen und spontan auch keine autoimmunen Erkrankungen entwickeln. Um jedoch ausschließen zu können, dass die Transkriptionsfaktoren NFATc2 und NFATc3 an der Regulation der Expression von cbl-b beteiligt sind, wurde eine Realtime-PCR zum Nachweis von cbl-b mRNA durchgeführt. Dies zeigte, dass in DKO-Mäusen die Expression von cbl-b mRNA nicht gestört ist (Daten nicht gezeigt). Es kann also eine Beteiligung von cbl-b bei der Resistenz von konventionellen CD4⁺ T-Zellen aus DKO-Mäusen gegenüber CD4⁺CD25⁺ Treg-vermittelter Suppression ausgeschlossen werden.

Neben cbl-b findet man jedoch weitere Beispiele bei denen nicht die Entwicklung oder Funktion von CD4⁺CD25⁺Tregs gestört zu sein scheint, sondern die konventionellen CD4⁺ T-Zellen resistent gegen eine CD4⁺CD25⁺ Treg-vermittelte Suppression sind, was letztendlich auch zur Ausprägung eines starken autoimmunen Phänotyps führt. Zum Beispiel konnte im Falle der MRL/lpr Mäuse gezeigt werden, dass ein genetischer Defekt im Gen, welches für CD95 codiert, nicht nur zur Beeinträchtigung der CD95 (Fas) / CD95L (FasLigand) induzierten Apoptose führt, sondern dass auch hier die konventionellen CD4⁺ T-Zellen eine stark reduzierte Sensitivität gegenüber CD4⁺CD25⁺ Treg-vermittelter Suppression zeigen¹⁴⁹. Zusammengefasst zeigen diese Veröffentlichungen also, dass ein augenscheinlich ähnlicher Phänotyp völlig unterschiedliche Ursachen haben kann.

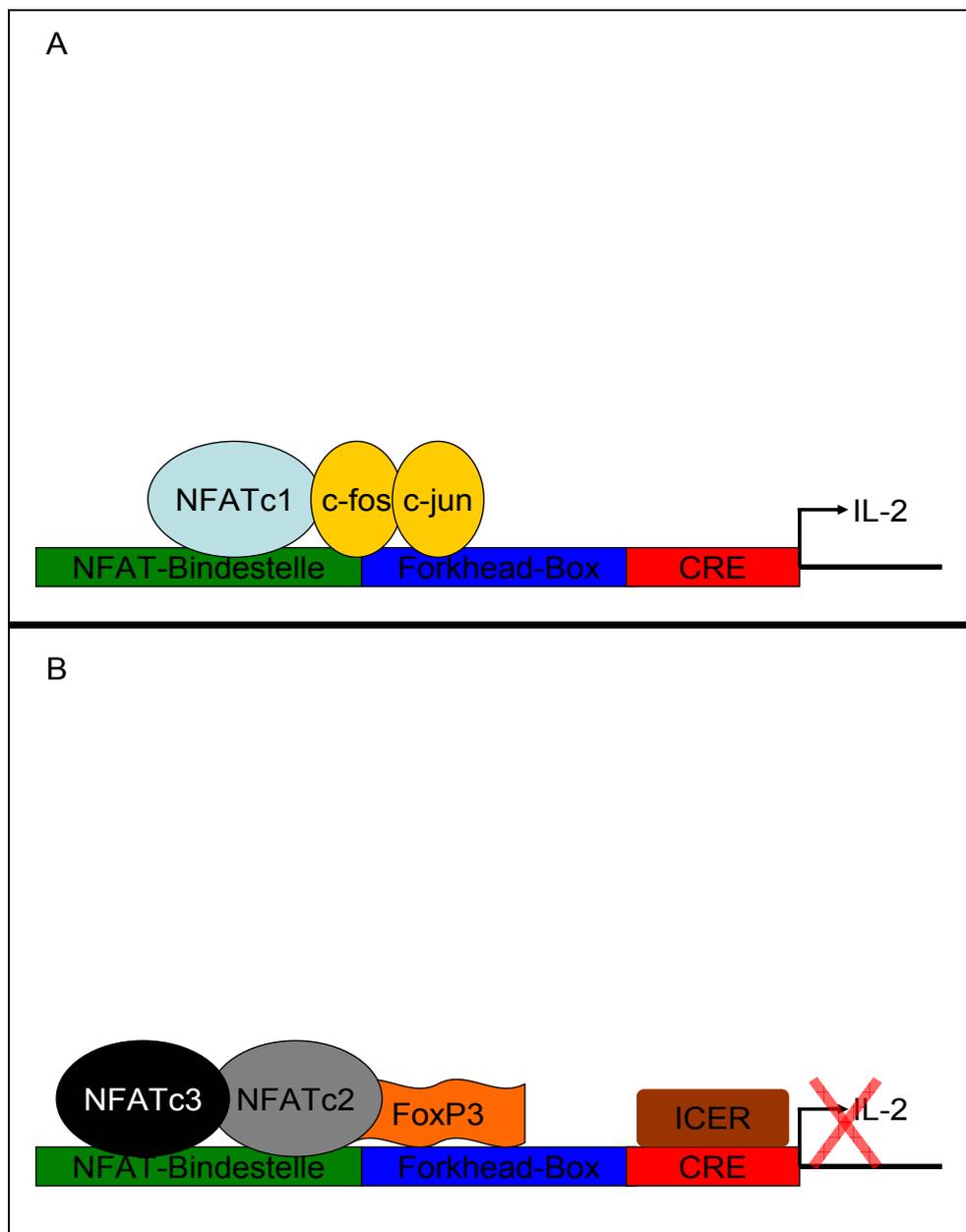


Abb. 4.1: Regulation der IL-2 Produktion

Die Regulation der IL-2 Produktion bei Aktivierung konventioneller $CD4^+$ T-Zellen (A) scheint neben dem Transkriptionsfaktor NF κ B entscheidend von NFATc1 sowie dem Ko-Transkriptionsfaktor AP1 (c-fos und c-jun) abhängig zu sein. Dabei scheint es entscheidend, dass weder NFATc2 und/oder NFATc3, sowie FoxP3 als transkriptionelle Repressoren im Zellkern aktiv vorliegen. Ein entgegengesetztes Bild zeichnet sich bei der Suppression konventioneller $CD4^+$ T-Zellen durch $CD4^+CD25^+$ Tregs ab (B). Hier scheint die Induktion der Transkriptionsfaktoren FoxP3, sowie NFATc2 und NFATc3 eine entscheidende Rolle bei der initialen Inhibition der IL-2 Produktion einzunehmen. Neuere Befunde, die jedoch nicht in dieser Arbeit aufgenommen wurden, deuten auf ein konzertiertes Zusammenspiel dieser Transkriptionsfaktoren sowie Transkriptionsfaktoren, welche durch hohe Konzentrationen von zyklischem AMP (cyclic AMP; cAMP) induziert werden (z.B. ICER) bei der $CD4^+CD25^+$ Treg-vermittelten Suppression hin.

4.3 DKO CD4⁺CD25⁻ T-Zellen sind sensitiv gegenüber einer TGF- β -vermittelten Inhibition

Obwohl heute allgemein akzeptiert ist, dass das immunsuppressive Cytokin TGF- β bei verschiedenen Krankheitsmodellen eine entscheidende Rolle bei der Suppression von autoaggressiven CD4⁺ T-Zellen *in vivo* einnimmt⁸⁸, wurde lange kontrovers diskutiert, ob dieses Cytokin möglicherweise membrangebunden eine essentielle Rolle bei der CD4⁺CD25⁺ Treg-vermittelten Suppression besitzt^{87;88;150-152}. Nicht zuletzt durch Versuche mit CD4⁺CD25⁺ Tregs aus TGF- β -defizienten Mäusen weiß man jedoch, dass TGF- β sowohl *in vitro* als auch *in vivo* keine unmittelbare Funktion bei der CD4⁺CD25⁺ Treg-vermittelten Suppression ausübt. So konnte gezeigt werden, dass TGF- β -defiziente CD4⁺CD25⁺ Tregs *in vivo* eine TGF- β -abhängige Suppression induzieren⁸⁸. Dies lässt den Schluss zu, dass zwar TGF- β nicht unmittelbar an der CD4⁺CD25⁺ Treg-vermittelten Suppression beteiligt ist, CD4⁺CD25⁺ Tregs aber scheinbar andere Zellen zur Produktion von TGF- β instruieren können. Um ausschließen zu können, dass der Phänotyp der DKO-Mäuse auf solchen Defekten bei der Induktion von peripherer Toleranz beruht, wurde im Folgenden untersucht, ob die Defizienz in den Transkriptionsfaktoren NFATc2 und NFATc3 auch Einfluss auf eine Inhibition durch das immunsuppressive Cytokin TGF- β nimmt. Diese Versuche zeigten jedoch, dass konventionelle CD4⁺ T-Zellen aus DKO-Mäusen nicht nur in gleicher Weise, wie ihre Analoga aus Wildtyp-Tieren den Rezeptor für TGF- β exprimieren (Abb. 3.15), sondern auch durch TGF- β in ihrer IL-2-Produktion gehemmt werden können (Abb. 3.16). So kann angenommen werden, dass der Phänotyp der DKO-Mäuse primär auf der Resistenz ihrer konventionellen CD4⁺ T-Zellen gegenüber CD4⁺CD25⁺ Treg-vermittelter Suppression beruht.

4.4 Das Fehlen der Transkriptionsfaktoren NFATc2 und NFATc3 hat keinen Einfluss auf die Entstehung und Funktion von CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen

Da, wie in Abb 3.4 gezeigt, auch CD4⁺CD25⁺ T-Zellen aus DKO-Mäusen nicht in der Lage sind, die Proliferation von kokultivierten konventionellen CD4⁺ T-Zellen aus Wildtyp-Tieren zu supprimieren, sollte im Folgenden untersucht werden, ob das Fehlen der Transkriptionsfaktoren NFATc2 und NFATc3 auch einen Einfluss auf die Entstehung von CD4⁺CD25⁺ Tregs im Thymus oder deren Funktion in der Peripherie nimmt. Da allgemein akzeptiert ist, dass CD4⁺CD25⁺ Tregs, genauso wie konventionelle T-Zellen im Thymus entstehen⁶⁷, sollte die Isolation von CD4⁺CD8⁻CD25⁺ Thymozyten aus DKO-Mäusen zeigen, ob in diesen Tieren die Entwicklung von CD4⁺CD25⁺ Tregs während der T-Zellentwicklung im Thymus gestört ist. Um diese Frage zu beantworten wurden CD4⁺CD8⁻CD25⁺ Thymozyten aus den Thymi von DKO-Mäusen isoliert und auf ihre Fähigkeit hin getestet, die Proliferation von peripheren CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus WT-Mäusen zu supprimieren. Abb. 3.18 zeigt, dass DKO CD4⁺CD8⁻CD25⁺ Thymozyten ähnlich wie CD4⁺CD25⁺ Tregs aus der Peripherie von Wildtyp-Mäusen, in der Lage sind WT CD4⁺CD25⁻ T-Zellen in ihrer Proliferation zu inhibieren. Allerdings waren auch diese Zellen nicht in der Lage, ihre autologen CD4⁺CD25⁻ T-Zellen zu supprimieren (Abb. 3.19). Diese Befunde unterstreichen somit das Ergebnis, dass DKO CD4⁺CD25⁻ T-Zellen resistent gegen eine CD4⁺CD25⁺ Treg-vermittelte Suppression sind und zeigen weiterhin, dass das Fehlen der Transkriptionsfaktoren NFATc2 und NFATc3 keinen Einfluß auf die Entstehung und Funktion von CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen im Thymus hat.

Obwohl in der Vergangenheit einige Oberflächenmoleküle mit CD4⁺CD25⁺ Tregs in Verbindung gebracht werden konnten, zeigte sich jedoch, dass auch diese nach Aktivierung auf konventionellen CD4⁺ T-Zellen exprimiert werden. Zu diesen Oberflächenmolekülen gehört auch ein Mitglied der Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Familie (TNFR-Familie), das „Glucocorticoid-induced TNF-Receptor family related gene“ (GITR oder TNFRSF18)^{54;70;71}.

Im Einklang mit Publikationen über humane CD4⁺CD25⁺ Tregs, in denen gezeigt werden konnte, dass diese Zellen die α -Kette des IL-2 Rezeptors (CD25) stärker als aktivierte konventionelle CD4⁺ T-Zellen exprimieren¹⁴³, zeigten erste *in vitro* Versuche mit konventionellen CD4⁺ T-Zellen und CD4⁺CD25⁺ Tregs aus Wildtyp-Tieren, dass nach verschiedensten Stimulationen die Expression von CD25 und GITR auf CD4⁺CD25⁺ Tregs wesentlich höher als auf konventionellen CD4⁺ T-Zellen ist (Abb. 3.20). Um zu prüfen, ob auch in der Peripherie von DKO-Tieren, in Anwesenheit konventioneller CD4⁺ T-Zellen mit aktiviertem Phänotyp (CD25⁺, CD44⁺, CD69⁺, GITR⁺) CD4⁺CD25⁺ Tregs aufgrund der Stärke der Expression von CD25 und GITR isoliert werden können, wurden diese Zellen mittels FACS-Sort aufgereinigt (Abb. 3.21) und auf verschiedene Charakteristika von CD4⁺CD25⁺ Tregs getestet. Es zeigte sich, dass diese Zellen, im Vergleich zu CD4⁺ T-Zellen aus diesen Tieren, welche schwächer CD25 und GITR exprimieren (CD4⁺CD25⁺GITR⁺) oder DKO CD4⁺CD25⁻ T-Zellen sehr stark FoxP3 mRNA exprimierten (Abb. 3.23). Ein weiteres Charakteristikum CD4⁺CD25⁺ regulatorischer T-Zellen ist, dass sie nach polyklonaler Stimulation kein IL-2 und somit auch keine IL-2 mRNA produzieren⁵⁰. Betrachtet man die IL-2 mRNA Produktion nach Stimulation in diesen Zellen, so zeigte sich, dass DKO CD4⁺CD25⁺⁺GITR⁺⁺ auch nach Aktivierung keine IL-2 mRNA produzieren (Abb. 3.22). Zwar zählt man diese Eigenschaften zu den Charakteristika von CD4⁺CD25⁺ Tregs, jedoch sind die bisher genannten Eigenschaften auch für anergisierte T-Zellen oder verschiedene, in der Peripherie induzierte regulatorische T-Zellen beschrieben worden^{31;155}. Das einzige Charakteristikum, welches CD4⁺CD25⁺ Tregs beschreibt, ist demnach ihre Funktion: in einem zellkontaktabhängigen Prozess die Proliferation und besonders die IL-2 Produktion von konventionellen CD4⁺ T-Zellen zu supprimieren^{53;94;95}. Um die suppressiven Eigenschaften von WT und DKO CD4⁺CD25⁺⁺GITR⁺⁺ T-Zellen zu untersuchen, wurden Kokulturrexperimente mit WT CD4⁺CD25⁻ T-Zellen durchgeführt. Diese Experimente zeigten, dass DKO CD4⁺CD25⁺⁺GITR⁺⁺ T-Zellen, genauso wie WT CD4⁺CD25⁺⁺GITR⁺⁺ T-Zellen (Abb. 3.25) in der Lage waren, die Proliferation von konventionellen CD4⁺ T-Zellen sehr effektiv zu inhibieren (Abb. 3.24). Obgleich diese Zellen also ein sehr hohes suppressives Potential gegenüber WT CD4⁺CD25⁻ T-Zellen zeigen, sind auch sie nicht in der Lage die Proliferation der autologen DKO CD4⁺CD25⁻ T-Zellen zu unterbinden (Abb. 3.26).

Wie essentiell $CD4^+CD25^+$ Tregs für die Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz sind, zeigen neben den scurfy-Mäusen¹¹³⁻¹¹⁵ und IPEX-Patienten auch viele andere autoimmune Erkrankungen beim Menschen, welche auf eine gestörte Entwicklung und/ oder Funktion dieser Zellen hindeuten^{108;143;143;156;157}. Jedoch zeigt nicht zuletzt der Phänotyp der DKO-Mäuse, dass auch Defekte, welche eine Resistenz der konventionellen $CD4^+$ T-Zellen gegenüber $CD4^+CD25^+$ Treg-vermittelter Suppression zur Folge haben, verherrend für den Organismus sind. Zusammenfassend erlauben die Ergebnisse dieser Arbeit einen ersten Einblick in die komplexen molekularbiologischen Mechanismen, welche der Suppression von konventionellen $CD4^+$ T-Zellen durch $CD4^+CD25^+$ regulatorische T-Zellen und damit der Aufrechterhaltung von immunologischer Toleranz und Homeostase zugrunde liegen.

4.5 Voraktivierte $CD4^+CD25^+$ Tregs (preTregs) zeigen ein wesentlich größeres suppressives Potential als $CD4^+CD25^+$ Tregs

Obwohl in einem gesunden Individuum täglich viele autoreaktive T-Zellklone aktiviert und damit auch durch $CD4^+CD25^+$ Tregs supprimiert werden, konnten bisher keine $CD4^+CD25^+$ Tregs identifiziert werden, welche *ex vivo* ohne weiteren TZR-Stimulus ihre suppressiven Eigenschaften zeigen^{51;153}. Aktiviert man $CD4^+CD25^+$ Tregs *in vitro* über ihren TZR in Gegenwart großer Mengen IL-2 so zeigen diese preTregs ein sehr hohes suppressives Potential^{94;144;154}. Ob jedoch diese preTregs andere Mechanismen zur Suppression kokultivierter konventioneller $CD4^+$ T-Zellen und/oder Th2-Zellen anwenden, oder ob diese Zellen einen kinetischen Vorsprung gegenüber diesen besitzen, konnte bisher nicht geklärt werden. Für letztere These spricht, dass alleine preTregs im Stande sind, die Proliferation der konventionellen $CD4^+$ T-Zellen aus DKO-Mäusen zu inhibieren (Abb. 3.29). Jedoch muss auch hier wiederum eingeräumt werden, dass selbst preTregs die bis zu einem Verhältnis von 1:128 sehr effektiv die Proliferation von konventionellen $CD4^+$ T-Zellen aus WT-Mäusen supprimieren, bereits bei einem Verhältnis von 1:16 nicht mehr in der Lage sind, die Proliferation der DKO $CD4^+CD25^-$ T-Zellen zu unterbinden (Abb. 3.29).

4.6 Die Resistenz der konventionellen CD4⁺ T-Zellen aus DKO-Mäusen gegenüber CD4⁺CD25⁺ Treg-vermittelten Suppression geht mit einer stark eingeschränkten Expression des transkriptionellen Repressors FoxP3 einher

Da man bis heute weder ein Oberflächenmolekül kennt, das exklusiv auf CD4⁺CD25⁺ Tregs exprimiert wird, noch den Mechanismus dieser Suppression kennt, ist auch entsprechend wenig über die molekularen Mechanismen dieses Prozesses in den supprimierten CD4⁺ T-Zellen bekannt.

Das einzige anerkannte Molekül, welches differentiell in CD4⁺CD25⁺ Tregs exprimiert wird ist ein im Zellkern lokalisierter Transkriptionsrepressor, genannt FoxP3. Dieser gehört zur Familie der Forkhead-box Transkriptionsfaktoren¹¹³⁻¹¹⁵. Ob FoxP3 jedoch eine Funktion in konventionellen CD4⁺ T-Zellen einnimmt ist bis heute nicht genau geklärt.

In weiteren Studien während meiner Doktorarbeit, die jedoch in dieser Arbeit nicht im Detail dargestellt werden, konnten wir zeigen, dass die Suppression sowohl von konventionellen CD4⁺ T-Zellen durch CD4⁺CD25⁺ Tregs als auch von Th2-Zellen durch voraktivierte CD4⁺CD25⁺ Tregs (preTregs) mit der Induktion des transkriptionellen Repressors FoxP3 einher geht (Abb. 3.31 und Zitat¹⁴⁴). Dabei scheint FoxP3 nach Bindung an Promotoren verschiedener Cytokingene (wie IL-2 oder IL-4) die Transkription dieser, für die Proliferation wichtigen Cytokine zu unterbinden¹¹². So konnten wir durch einen ChIP-Assay zeigen, dass FoxP3 z.B. an den Promoter und einen Enhancer des Gens, welches für IL-4 codiert, bindet (Abb. 3.32). Ausgehend von der Annahme, dass eine gestörte Expression von FoxP3 in den konventionellen CD4⁺ T-Zellen aus DKO-Mäusen zur Resistenz dieser Zellen gegenüber CD4⁺CD25⁺ Treg-vermittelter Suppression führt, wurden Th2-Zellen aus konventionellen CD4⁺ T-Zellen von DKO-Mäusen generiert und mit preTregs kokultiviert.

Verglichen mit der Suppression von Th2-Zellen aus Wildtyp-Tieren konnte auch hier wiederum keine vergleichbare Suppression festgestellt werden. Die Produktion der IL-4 mRNA in diesen Th2-Zellen konnte durch preTregs nicht vollständig inhibiert werden (Abb. 3.33). Dieses Ergebnis geht mit dem Befund einher, dass verglichen mit supprimierten Wildtyp Th2-Zellen kaum FoxP3 mRNA in den kokultivierten DKO Th2-Zellen detektierbar ist (Abb. 3.34).

Ob nun jedoch die Transkriptionsfaktoren NFATc2 und NFATc3 an der Regulation der FoxP3 Expression in supprimierten T-Zellen beteiligt sind, bleibt zu klären. In diesem Zusammenhang ist eine Publikation von 1998 im Journal of Biological Chemistry zu erwähnen, in der die Autoren eine FoxP3-Bindungsstelle (forkhead-box) in direkter Nachbarschaft zu einer NFAT-Bindungsstelle (purine-rich box) im Promoter des IL-2 Gens postulieren^{112;158}. Die Hypothese, dass NFATc2 und/oder NFATc3 kooperativ mit FoxP3 an den Promotoren verschiedenster Gene binden um deren Transkription zu verhindern, konnte jedoch bisher nicht bewiesen werden. Trotzdem scheint diese Theorie nicht minder attraktiv, da den NFAT-Faktoren nicht nur eine wichtige Funktion bei der Regulation der IL-2 Produktion zugesprochen wird^{159;160}, sondern besonders den Familienmitgliedern NFATc2 und NFATc3 eine eher reprimierende Funktion bei der Genregulation zugesprochen wird^{116;117}. So wird heute für die Transkriptionsfaktoren NFATc2 und NFATc3 sogar eine Rolle bei der Regulation von Genen diskutiert, welche direkt an der Aufrechterhaltung peripherer Toleranz beteiligt sind^{121;133}.

5. Zusammenfassung

In gesunden Individuen exprimiert eine Subpopulation von 5 bis 10% aller peripheren CD4⁺ T-Zellen konstitutiv die α -Kette des Interleukin-2-Rezeptors (CD25). Diese CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen (CD4⁺CD25⁺ Tregs) sind essentiell an der Aufrechterhaltung peripherer Toleranz gegenüber „Selbst“ beteiligt. Man weiß jedoch heute, dass diese Zellen sowohl adaptive, als auch angeborene Immunantworten regulieren können und so entscheidend jede Immunreaktion kontrollieren. Da somit diesen Zellen neben der Aufrechterhaltung peripherer Toleranz, also der Kontrolle von Autoimmunerkrankungen, auch eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle von Allergien, allen Infektionskrankheiten und sogar Krebs zugesprochen wird, stehen sie seit längerem im Interesse der immunologischen Forschung. CD4⁺CD25⁺ Tregs werden als hyperresponsiv bezeichnet, da sie *in vitro* nach T-Zellrezeptor (TZR) Stimulation weder Cytokine produzieren noch proliferieren. Allerdings sind sie nach Aktivierung über ihren TZR in der Lage die Effektorfunktionen sowohl primärer konventioneller CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, als auch differenzierten Th1- und Th2-Effektorzellen in einem zellkontakt-abhängigen Prozeß zu supprimieren. Obwohl ein entscheidender Prozess bei dieser Suppression die Inhibition der IL-2 Produktion in der Zielzelle ist, sind die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen bisher völlig unverstanden. Alleine der Transkriptionsfaktor FoxP3 scheint essentiell sowohl für den Phänotyp, als auch für die Funktion von CD4⁺CD25⁺ Tregs zu sein, da Mäuse, welche eine natürlich vorkommende Mutation im Gen für FoxP3 tragen (*scurfy*-Mäuse), keine CD4⁺CD25⁺ Tregs besitzen und dadurch schwere Autoimmunerkrankungen entwickeln, die letztendlich zum Tod der Tiere führen. Gegenstand dieser Arbeit war es, die molekularbiologischen Mechanismen, welche in supprimierten T-Zellen zu ihrer Ruhigstellung nach Kontakt mit CD4⁺CD25⁺ Tregs führen, zu untersuchen. Hierbei sollte neben der Rolle des Transkriptionsfaktors FoxP3 insbesondere die Rolle der Transkriptionsfaktoren NFATc2 und NFATc3 untersucht werden.

Mäuse, welche defizient in den Transkriptionsfaktoren NFATc2 und NFATc3 sind (DKO-Mäuse) zeigen mit zunehmendem Alter, ähnlich wie *scurfy*-Mäuse, schwere Autoimmunerkrankungen. Einhergehend mit diesen Erkrankungen nimmt die Zahl der aktivierten konventionellen CD4⁺ T-Zellen in der Peripherie dieser Mäuse stark zu. Da jedoch auch aktivierte konventionelle CD4⁺ T-Zellen CD25 exprimieren, war es anfangs nicht möglich CD4⁺CD25⁺ Tregs zu isolieren und so eine Rolle von NFATc2 und NFATc3 bei der Entstehung und Funktion dieser Zellen auszuschließen. Jedoch zeigten Untersuchungen mit CD4⁺CD25⁺ Tregs aus Wildtyp-Tieren und konventionellen CD4⁺ T-Zellen aus DKO-Mäusen, dass das Fehlen dieser Transkriptionsfaktoren zu einer Resistenz der konventionellen CD4⁺ T-Zellen gegenüber einer CD4⁺CD25⁺ Treg-vermittelten Suppression führt. Dabei scheint diese Resistenz zumindest teilweise auf einer sehr schnellen und unkontrollierten Produktion des Cytokins Interleukin-2 (IL-2) zu beruhen.

Obwohl die gesamte Population der peripheren CD4⁺CD25⁺ T-Zellen aus DKO-Mäusen keine suppressiven Eigenschaften aufwies, zeigte die Isolation von CD4⁺CD8⁻CD25⁺ Thymozyten jedoch eindeutig, dass das Fehlen der Transkriptionsfaktoren NFATc2 und NFATc3 keinerlei Einfluß auf die Entstehung von CD4⁺CD25⁺ Tregs im Thymus und deren suppressive Funktion einnimmt. Alleine die Isolation von CD4⁺ T-Zellen aus der Gesamtheit der peripheren CD4⁺CD25⁺, welche sehr hoch CD25 und GITR exprimiert (CD4⁺CD25⁺⁺GITR⁺⁺), ermöglichte es auch in der Peripherie dieser Mäuse, CD4⁺CD25⁺ Tregs zu identifizieren und zu charakterisieren.

Weitere Teile dieser Doktorarbeit, die jedoch nicht im Einzelnen gezeigt wurden, weisen auf eine Rolle des Transkriptionsfaktors FoxP3 auch in supprimierten CD4⁺ T-Zellen hin. So konnte gezeigt werden, dass nach Kokultur mit CD4⁺CD25⁺ Tregs in konventionellen CD4⁺ T-Zellen und Th2-Zellen die Expression dieses Transkriptionsfaktors induziert wird. Weiterhin konnte bewiesen werden, dass FoxP3 an den Promoter und den Enhancer des IL-4-Gens bindet. Einhergehend mit der Resistenz der konventionellen CD4⁺ T-Zellen aus DKO-Mäusen gegenüber der CD4⁺CD25⁺ Treg-vermittelten Suppression zeigte sich, dass diese Zellen auch nur geringe Mengen FoxP3 mRNA nach Kokultur mit CD4⁺CD25⁺ Tregs exprimieren.

Zusammenfassend konnte durch diese Arbeit dargestellt werden, dass der Phänotyp der DKO-Mäuse auf einer Resistenz der konventionellen CD4⁺ T-Zellen gegenüber CD4⁺CD25⁺ Treg-vermittelten Suppression begründet ist und somit sowohl FoxP3, als auch die Transkriptionsfaktoren NFATc2 und NFATc3 entscheidend an dem Prozess der Suppression von konventionellen CD4⁺ T-Zellen durch CD4⁺CD25⁺ Tregs beteiligt sind.

Diese Ergebnisse weisen eindeutig daraufhin, dass eine Dysfunktion der peripheren Toleranz sowohl auf Seiten der CD4⁺CD25⁺ Tregs, als auch auf Seiten ihrer Zielzellen verherende Auswirkungen auf den Gesundheitszustand jedes Individuums ausübt.

6. Literaturverzeichnis

1. Arstila, T.P., A. Casrouge, V. Baron, J. Even, J. Kanellopoulos, and P. Kourilsky. 1999. A direct estimate of the human alpha beta T cell receptor diversity. *Science* 286:958-961.
2. Mason, D. 1998. A very high level of crossreactivity is an essential feature of the T-cell receptor. *Immunol. Today* 19:395-404.
3. Stockinger, B. 1999. T lymphocyte tolerance: from thymic deletion to peripheral control mechanisms. *Adv. Immunol.* 71:229-265.
4. Kappler, J.W., N. Roehm, and P. Marrack. 1987. T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell* 49:273-280.
5. Hoffmann, M.W., J. Allison, and J.F. Miller. 1992. Tolerance induction by thymic medullary epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 89:2526-2530.
6. Klein, L., M. Klugmann, K.A. Nave, V.K. Tuohy, and B. Kyewski. 2000. Shaping of the autoreactive T-cell repertoire by a splice variant of self protein expressed in thymic epithelial cells. *Nat. Med.* 6:56-61.
7. Doffinger, R., T.C. Klein, M.B. Pepys, J.L. Casanova, and B.A. Kyewski. 1997. The MHC class II-restricted T cell response of C57BL/6 mice to human C-reactive protein: homology to self and the selection of T cell epitopes and T cell receptors. *Mol. Immunol.* 34:115-124.
8. Derbinski, J., A. Schulte, B. Kyewski, and L. Klein. 2001. Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nat. Immunol.* 2:1032-1039.

9. Hanahan,D. 1998. Peripheral-antigen-expressing cells in thymic medulla: factors in self-tolerance and autoimmunity. *Curr.Opin.Immunol.* 10:656-662.
10. Smith,K.M., D.C.Olson, R.Hirose, and D.Hanahan. 1997. Pancreatic gene expression in rare cells of thymic medulla: evidence for functional contribution to T cell tolerance. *Int.Immunol.* 9:1355-1365.
11. Kojima,K., M.Reindl, H.Lassmann, H.Wekerle, and C.Linington. 1997. The thymus and self-tolerance: co-existence of encephalitogenic S100 beta-specific T cells and their nominal autoantigen in the normal adult rat thymus. *Int.Immunol.* 9:897-904.
12. Klein,L., T.Klein, U.Ruther, and B.Kyewski. 1998. CD4 T cell tolerance to human C-reactive protein, an inducible serum protein, is mediated by medullary thymic epithelium. *J.Exp.Med.* 188:5-16.
13. Klein,T.C., R.Doffinger, M.B.Pepys, U.Ruther, and B.Kyewski. 1995. Tolerance and immunity to the inducible self antigen C-reactive protein in transgenic mice. *Eur.J.Immunol.* 25:3489-3495.
14. Mariathan,S., R.G.Jones, and P.S.Ohashi. 1999. Signals involved in thymocyte positive and negative selection. *Semin.Immunol.* 11:263-272.
15. Lerman,M.A., J.Larkin, III, C.Cozzo, M.S.Jordan, and A.J.Caton. 2004. CD4+ CD25+ regulatory T cell repertoire formation in response to varying expression of a neo-self-antigen. *J.Immunol.* 173:236-244.
16. Jameson,S.C. and M.J.Bevan. 1998. T-cell selection. *Curr.Opin.Immunol.* 10:214-219.

17. Mariathasan,S., S.S.Ho, A.Zakarian, and P.S.Ohashi. 2000. Degree of ERK activation influences both positive and negative thymocyte selection. *Eur.J.Immunol.* 30:1060-1068.
18. Stefanski,H.E., D.Mayerova, S.C.Jameson, and K.A.Hogquist. 2001. A low affinity TCR ligand restores positive selection of CD8+ T cells in vivo. *J.Immunol.* 166:6602-6607.
19. Utting,O., S.J.Teh, and H.S.Teh. 1998. T cells expressing receptors of different affinity for antigen ligands reveal a unique role for p59fyn in T cell development and optimal stimulation of T cells by antigen. *J.Immunol.* 160:5410-5419.
20. Lohmann,T., R.D.Leslie, and M.Londei. 1996. T cell clones to epitopes of glutamic acid decarboxylase 65 raised from normal subjects and patients with insulin-dependent diabetes. *J.Autoimmun.* 9:385-389.
21. Semana,G., R.Gausling, R.A.Jackson, and D.A.Hafler. 1999. T cell autoreactivity to proinsulin epitopes in diabetic patients and healthy subjects. *J.Autoimmun.* 12:259-267.
22. Bouneaud,C., P.Kourilsky, and P.Bousso. 2000. Impact of negative selection on the T cell repertoire reactive to a self-peptide: a large fraction of T cell clones escapes clonal deletion. *Immunity.* 13:829-840.
23. Mason,D. 2001. Some quantitative aspects of T-cell repertoire selection: the requirement for regulatory T cells. *Immunol.Rev.* 182:80-88.

24. Alferink, J., A. Tafuri, D. Vestweber, R. Hallmann, G. J. Hammerling, and B. Arnold. 1998. Control of neonatal tolerance to tissue antigens by peripheral T cell trafficking. *Science* 282:1338-1341.
25. Zinkernagel, R. M. 1996. Immunology taught by viruses. *Science* 271:173-178.
26. Kurts, C., J. F. Miller, R. M. Subramaniam, F. R. Carbone, and W. R. Heath. 1998. Major histocompatibility complex class I-restricted cross-presentation is biased towards high dose antigens and those released during cellular destruction. *J. Exp. Med.* 188:409-414.
27. Kurts, C., R. M. Sutherland, G. Davey, M. Li, A. M. Lew, E. Blanas, F. R. Carbone, J. F. Miller, and W. R. Heath. 1999. CD8 T cell ignorance or tolerance to islet antigens depends on antigen dose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 96:12703-12707.
28. Hoglund, P., J. Mintern, C. Waltzinger, W. Heath, C. Benoist, and D. Mathis. 1999. Initiation of autoimmune diabetes by developmentally regulated presentation of islet cell antigens in the pancreatic lymph nodes. *J. Exp. Med.* 189:331-339.
29. Andre, I., A. Gonzalez, B. Wang, J. Katz, C. Benoist, and D. Mathis. 1996. Checkpoints in the progression of autoimmune disease: lessons from diabetes models. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 93:2260-2263.
30. Jenkins, M. K. and R. H. Schwartz. 1987. Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo. *J. Exp. Med.* 165:302-319.
31. Schwartz, R. H. 2003. T cell anergy. *Annu. Rev. Immunol.* 21:305-334.

32. Lane, P., C. Haller, and F. McConnell. 1996. Evidence that induction of tolerance in vivo involves active signaling via a B7 ligand-dependent mechanism: CTLA4-Ig protects V beta 8+ T cells from tolerance induction by the superantigen staphylococcal enterotoxin B. *Eur.J.Immunol.* 26:858-862.
33. Krummel, M.F. and J.P. Allison. 1995. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J.Exp.Med.* 182:459-465.
34. Walunas, T.L., C.Y. Bakker, and J.A. Bluestone. 1996. CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation. *J.Exp.Med.* 183:2541-2550.
35. Walunas, T.L. and J.A. Bluestone. 1998. CTLA-4 regulates tolerance induction and T cell differentiation in vivo. *J.Immunol.* 160:3855-3860.
36. Perez, V.L., L. Van Parijs, A. Biuckians, X.X. Zheng, T.B. Strom, and A.K. Abbas. 1997. Induction of peripheral T cell tolerance in vivo requires CTLA-4 engagement. *Immunity.* 6:411-417.
37. Tivol, E.A., F. Borriello, A.N. Schweitzer, W.P. Lynch, J.A. Bluestone, and A.H. Sharpe. 1995. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity.* 3:541-547.
38. Waterhouse, P., J.M. Penninger, E. Timms, A. Wakeham, A. Shahinian, K.P. Lee, C.B. Thompson, H. Griesser, and T.W. Mak. 1995. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctl4-4. *Science* 270:985-988.
39. Lechner, O., J. Lauber, A. Franzke, A. Sarukhan, H. von Boehmer, and J. Buer. 2001. Fingerprints of anergic T cells. *Curr.Biol.* 11:587-595.

40. Nishimura,H., T.Okazaki, Y.Tanaka, K.Nakatani, M.Hara, A.Matsumori, S.Sasayama, A.Mizoguchi, H.Hiai, N.Minato, and T.Honjo. 2001. Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science* 291:319-322.
41. Freeman,G.J., A.J.Long, Y.Iwai, K.Bourque, T.Chernova, H.Nishimura, L.J.Fitz, N.Malenkovich, T.Okazaki, M.C.Byrne, H.F.Horton, L.Fouser, L.Carter, V.Ling, M.R.Bowman, B.M.Carreno, M.Collins, C.R.Wood, and T.Honjo. 2000. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J.Exp.Med.* 192:1027-1034.
42. Latchman,Y., C.R.Wood, T.Chernova, D.Chaudhary, M.Borde, I.Chernova, Y.Iwai, A.J.Long, J.A.Brown, R.Nunes, E.A.Greenfield, K.Bourque, V.A.Boussiotis, L.L.Carter, B.M.Carreno, N.Malenkovich, H.Nishimura, T.Okazaki, T.Honjo, A.H.Sharpe, and G.J.Freeman. 2001. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat.Immunol.* 2:261-268.
43. Pape,K.A., R.Merica, A.Mondino, A.Khoruts, and M.K.Jenkins. 1998. Direct evidence that functionally impaired CD4+ T cells persist in vivo following induction of peripheral tolerance. *J.Immunol.* 160:4719-4729.
44. Watanabe-Fukunaga,R., C.I.Brannan, N.G.Copeland, N.A.Jenkins, and S.Nagata. 1992. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 356:314-317.
45. Suda,T., T.Takahashi, P.Golstein, and S.Nagata. 1993. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 75:1169-1178.

46. Suzuki,A., M.T.Yamaguchi, T.Ohteki, T.Sasaki, T.Kaisho, Y.Kimura, R.Yoshida, A.Wakeham, T.Higuchi, M.Fukumoto, T.Tsubata, P.S.Ohashi, S.Koyasu, J.M.Penninger, T.Nakano, and T.W.Mak. 2001. T cell-specific loss of Pten leads to defects in central and peripheral tolerance. *Immunity*. 14:523-534.
47. Van Parijs,L., A.Biuckians, A.Ibragimov, F.W.Alt, D.M.Willerford, and A.K.Abbas. 1997. Functional responses and apoptosis of CD25 (IL-2R alpha)-deficient T cells expressing a transgenic antigen receptor. *J.Immunol*. 158:3738-3745.
48. Willerford,D.M., J.Chen, J.A.Ferry, L.Davidson, A.Ma, and F.W.Alt. 1995. Interleukin-2 receptor alpha chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment. *Immunity*. 3:521-530.
49. Malek,T.R. and A.L.Bayer. 2004. Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2. *Nat.Rev.Immunol*. 4:665-674.
50. Shevach,E.M. 2002. CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat.Rev.Immunol*. 2:389-400.
51. Thornton,A.M. and E.M.Shevach. 2000. Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J.Immunol*. 164:183-190.
52. Piccirillo,C.A. and E.M.Shevach. 2001. Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells. *J.Immunol*. 167:1137-1140.

53. Thornton, A.M. and E.M. Shevach. 1998. CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J. Exp. Med.* 188:287-296.
54. Stephens, G.L., R.S. McHugh, M.J. Whitters, D.A. Young, D. Luxenberg, B.M. Carreno, M. Collins, and E.M. Shevach. 2004. Engagement of glucocorticoid-induced TNFR family-related receptor on effector T cells by its ligand mediates resistance to suppression by CD4⁺CD25⁺ T cells. *J. Immunol.* 173:5008-5020.
55. Ji, H.B., G. Liao, W.A. Faubion, A.C. Abadia-Molina, C. Cozzo, F.S. Laroux, A. Caton, and C. Terhorst. 2004. Cutting edge: the natural ligand for glucocorticoid-induced TNF receptor-related protein abrogates regulatory T cell suppression. *J. Immunol.* 172:5823-5827.
56. Zheng, Y., C.N. Manzotti, M. Liu, F. Burke, K.I. Mead, and D.M. Sansom. 2004. CD86 and CD80 differentially modulate the suppressive function of human regulatory T cells. *J. Immunol.* 172:2778-2784.
57. Valzasina, B., C. Guiducci, H. Dislich, N. Killeen, A.D. Weinberg, and M.P. Colombo. 2005. Triggering of OX40 (CD134) on CD4⁽⁺⁾CD25⁺ T cells blocks their inhibitory activity: a novel regulatory role for OX40 and its comparison with GITR. *Blood* 105:2845-2851.
58. Takeda, I., S. Ine, N. Killeen, L.C. Ndhlovu, K. Murata, S. Satomi, K. Sugamura, and N. Ishii. 2004. Distinct roles for the OX40-OX40 ligand interaction in regulatory and nonregulatory T cells. *J. Immunol.* 172:3580-3589.

59. Chen, Y., V.K. Kuchroo, J. Inobe, D.A. Hafler, and H.L. Weiner. 1994. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* 265:1237-1240.
60. Nishizuka, Y. and T. Sakakura. 1969. Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. *Science* 166:753-755.
61. Gershon, R.K. and K. Kondo. 1970. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* 18:723-737.
62. Gershon, R.K. and K. Kondo. 1971. Infectious immunological tolerance. *Immunology* 21:903-914.
63. Kronenberg, M., M. Steinmetz, J. Kobori, E. Kraig, J.A. Kapp, C.W. Pierce, C.M. Sorensen, G. Suzuki, T. Tada, and L. Hood. 1983. RNA transcripts for I-J polypeptides are apparently not encoded between the I-A and I-E subregions of the murine major histocompatibility complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 80:5704-5708.
64. Moller, G. 1988. Do suppressor T cells exist? *Scand. J. Immunol.* 27:247-250.
65. Green, D.R. and D.R. Webb. 1993. Saying the 'S' word in public. *Immunol. Today* 14:523-525.
66. Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, and M. Toda. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* 155:1151-1164.

-
67. Itoh,M., T.Takahashi, N.Sakaguchi, Y.Kuniyasu, J.Shimizu, F.Otsuka, and S.Sakaguchi. 1999. Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J.Immunol.* 162:5317-5326.
68. Seddon,B. and D.Mason. 2000. The third function of the thymus. *Immunol.Today* 21:95-99.
69. Asano,M., M.Toda, N.Sakaguchi, and S.Sakaguchi. 1996. Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *J.Exp.Med.* 184:387-396.
70. McHugh,R.S., M.J.Whitters, C.A.Piccirillo, D.A.Young, E.M.Shevach, M.Collins, and M.C.Byrne. 2002. CD4(+)/CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity.* 16:311-323.
71. Shimizu,J., S.Yamazaki, T.Takahashi, Y.Ishida, and S.Sakaguchi. 2002. Stimulation of CD25(+)/CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat.Immunol.* 3:135-142.
72. Jordan,M.S., A.Boesteanu, A.J.Reed, A.L.Petrone, A.E.Holenbeck, M.A.Lerman, A.Naji, and A.J.Caton. 2001. Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat.Immunol.* 2:301-306.
73. Kawahata,K., Y.Misaki, M.Yamauchi, S.Tsunekawa, K.Setoguchi, J.Miyazaki, and K.Yamamoto. 2002. Generation of CD4(+)/CD25(+) regulatory T cells from autoreactive T cells simultaneously with their negative selection in the thymus

- and from nonautoreactive T cells by endogenous TCR expression. *J.Immunol.* 168:4399-4405.
74. Hori,S., M.Haury, A.Coutinho, and J.Demengeot. 2002. Specificity requirements for selection and effector functions of CD25+4+ regulatory T cells in anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99:8213-8218.
75. Seddon,B. and D.Mason. 1999. Peripheral autoantigen induces regulatory T cells that prevent autoimmunity. *J.Exp.Med.* 189:877-882.
76. Taguchi,O. and Y.Nishizuka. 1987. Self tolerance and localized autoimmunity. Mouse models of autoimmune disease that suggest tissue-specific suppressor T cells are involved in self tolerance. *J.Exp.Med.* 165:146-156.
77. Taguchi,O., K.Kontani, H.Ikeda, T.Kezuka, M.Takeuchi, T.Takahashi, and T.Takahashi. 1994. Tissue-specific suppressor T cells involved in self-tolerance are activated extrathymically by self-antigens. *Immunology* 82:365-369.
78. Garza,K.M., S.S.Agersborg, E.Baker, and K.S.Tung. 2000. Persistence of physiological self antigen is required for the regulation of self tolerance. *J.Immunol.* 164:3982-3989.
79. Tang,Q., K.J.Henriksen, E.K.Boden, A.J.Tooley, J.Ye, S.K.Subudhi, X.X.Zheng, T.B.Strom, and J.A.Bluestone. 2003. Cutting edge: CD28 controls peripheral homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J.Immunol.* 171:3348-3352.

-
80. Kumanogoh,A., X.Wang, I.Lee, C.Watanabe, M.Kamanaka, W.Shi, K.Yoshida, T.Sato, S.Habu, M.Itoh, N.Sakaguchi, S.Sakaguchi, and H.Kikutani. 2001. Increased T cell autoreactivity in the absence of CD40-CD40 ligand interactions: a role of CD40 in regulatory T cell development. *J.Immunol.* 166:353-360.
81. Salomon,B., D.J.Lenschow, L.Rhee, N.Ashourian, B.Singh, A.Sharpe, and J.A.Bluestone. 2000. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity.* 12:431-440.
82. Malek,T.R., A.Yu, V.Vincek, P.Scibelli, and L.Kong. 2002. CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2Rbeta-deficient mice. Implications for the nonredundant function of IL-2. *Immunity.* 17:167-178.
83. Almeida,A.R., N.Legrand, M.Papiernik, and A.A.Freitas. 2002. Homeostasis of peripheral CD4+ T cells: IL-2R alpha and IL-2 shape a population of regulatory cells that controls CD4+ T cell numbers. *J.Immunol.* 169:4850-4860.
84. Papiernik,M., M.L.de Moraes, C.Pontoux, F.Vasseur, and C.Penit. 1998. Regulatory CD4 T cells: expression of IL-2R alpha chain, resistance to clonal deletion and IL-2 dependency. *Int.Immunol.* 10:371-378.
85. Su,L., R.J.Creusot, E.M.Gallo, S.M.Chan, P.J.Utz, C.G.Fathman, and J.Ermann. 2004. Murine CD4+CD25+ regulatory T cells fail to undergo chromatin remodeling across the proximal promoter region of the IL-2 gene. *J.Immunol.* 173:4994-5001.

86. Shevach, E.M., R.S. McHugh, C.A. Piccirillo, and A.M. Thornton. 2001. Control of T-cell activation by CD4⁺ CD25⁺ suppressor T cells. *Immunol.Rev.* 182:58-67.
87. Piccirillo, C.A., J.J. Letterio, A.M. Thornton, R.S. McHugh, M. Mamura, H. Mizuhara, and E.M. Shevach. 2002. CD4(+)CD25(+) regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor beta1 production and responsiveness. *J.Exp.Med.* 196:237-246.
88. Fahlen, L., S. Read, L. Gorelik, S.D. Hurst, R.L. Coffman, R.A. Flavell, and F. Powrie. 2005. T cells that cannot respond to TGF-beta escape control by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *J.Exp.Med.* 201:737-746.
89. Roncarolo, M.G., R. Bacchetta, C. Bordignon, S. Narula, and M.K. Levings. 2001. Type 1 T regulatory cells. *Immunol.Rev.* 182:68-79.
90. Weiner, H.L. 2001. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol.Rev.* 182:207-214.
91. Wohlfert, E.A., M.K. Callahan, and R.B. Clark. 2004. Resistance to CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells and TGF-beta in Cbl-b^{-/-} mice. *J.Immunol.* 173:1059-1065.
92. Huang, C.T., C.J. Workman, D. Flies, X. Pan, A.L. Marson, G. Zhou, E.L. Hipkiss, S. Ravi, J. Kowalski, H.I. Levitsky, J.D. Powell, D.M. Pardoll, C.G. Drake, and D.A. Vignali. 2004. Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity.* 21:503-513.
93. Fontenot, J.D., J.P. Rasmussen, M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky. 2005. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat.Immunol.* 6:1142-1151.

94. Thornton,A.M., E.E.Donovan, C.A.Piccirillo, and E.M.Shevach. 2004. Cutting edge: IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4+CD25+ T cell suppressor function. *J.Immunol.* 172:6519-6523.
95. Thornton,A.M., C.A.Piccirillo, and E.M.Shevach. 2004. Activation requirements for the induction of CD4+CD25+ T cell suppressor function. *Eur.J.Immunol.* 34:366-376.
96. Ermann,J., P.Hoffmann, M.Edinger, S.Dutt, F.G.Blankenber, J.P.Higgins, R.S.Negrin, C.G.Fathman, and S.Strober. 2005. Only the CD62L+ subpopulation of CD4+CD25+ regulatory T cells protects from lethal acute GVHD. *Blood* 105:2220-2226.
97. Read,S., S.Mauze, C.Asseman, A.Bean, R.Coffman, and F.Powrie. 1998. CD38+ CD45RB(low) CD4+ T cells: a population of T cells with immune regulatory activities in vitro. *Eur.J.Immunol.* 28:3435-3447.
98. Singh,B., S.Read, C.Asseman, V.Malmstrom, C.Mottet, L.A.Stephens, R.Stepankova, H.Tlaskalova, and F.Powrie. 2001. Control of intestinal inflammation by regulatory T cells. *Immunol.Rev.* 182:190-200.
99. Herbelin,A., J.M.Gombert, F.Lepault, J.F.Bach, and L.Chatenoud. 1998. Mature mainstream TCR alpha beta+CD4+ thymocytes expressing L-selectin mediate "active tolerance" in the nonobese diabetic mouse. *J.Immunol.* 161:2620-2628.
100. Gonzalez,A., I.Andre-Schmutz, C.Carnaud, D.Mathis, and C.Benoist. 2001. Damage control, rather than unresponsiveness, effected by protective DX5+ T cells in autoimmune diabetes. *Nat.Immunol.* 2:1117-1125.

101. Gavin, M.A., S.R. Clarke, E. Negrou, A. Gallegos, and A. Rudensky. 2002. Homeostasis and anergy of CD4(+)CD25(+) suppressor T cells in vivo. *Nat. Immunol.* 3:33-41.
102. Bruder, D., M. Probst-Kepper, A.M. Westendorf, R. Geffers, S. Beissert, K. Loser, H. von Boehmer, J. Buer, and W. Hansen. 2004. Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells. *Eur. J. Immunol.* 34:623-630.
103. Lehmann, J., J. Huehn, R.M. de la, F. Maszyna, U. Kretschmer, V. Krenn, M. Brunner, A. Scheffold, and A. Hamann. 2002. Expression of the integrin alpha Ebeta 7 identifies unique subsets of CD25+ as well as. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 99:13031-13036.
104. Sakaguchi, S. 2004. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 22:531-562.
105. Annunziato, F., L. Cosmi, F. Liotta, E. Lazzeri, R. Manetti, V. Vanini, P. Romagnani, E. Maggi, and S. Romagnani. 2002. Phenotype, localization, and mechanism of suppression of CD4(+)CD25(+) human thymocytes. *J. Exp. Med.* 196:379-387.
106. Greenwald, R.J., G.J. Freeman, and A.H. Sharpe. 2005. The B7 family revisited. *Annu. Rev. Immunol.* 23:515-548.
107. Brunkow, M.E., E.W. Jeffery, K.A. Hjerrild, B. Paeper, L.B. Clark, S.A. Yasayko, J.E. Wilkinson, D. Galas, S.F. Ziegler, and F. Ramsdell. 2001. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat. Genet.* 27:68-73.

108. Wildin,R.S., S.Smyk-Pearson, and A.H.Filipovich. 2002. Clinical and molecular features of the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome. *J.Med.Genet.* 39:537-545.
109. Lyon,M.F., J.Peters, P.H.Glenister, S.Ball, and E.Wright. 1990. The scurfy mouse mutant has previously unrecognized hematological abnormalities and resembles Wiskott-Aldrich syndrome. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 87:2433-2437.
110. Blair,P.J., S.J.Bultman, J.C.Haas, B.T.Rouse, J.E.Wilkinson, and V.L.Godfrey. 1994. CD4+CD8- T cells are the effector cells in disease pathogenesis in the scurfy (sf) mouse. *J.Immunol.* 153:3764-3774.
111. Godfrey,V.L., J.E.Wilkinson, E.M.Rinchik, and L.B.Russell. 1991. Fatal lymphoreticular disease in the scurfy (sf) mouse requires T cells that mature in a sf thymic environment: potential model for thymic education. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 88:5528-5532.
112. Schubert,L.A., E.Jeffery, Y.Zhang, F.Ramsdell, and S.F.Ziegler. 2001. Scurfin (FOXP3) acts as a repressor of transcription and regulates T cell activation. *J.Biol.Chem.* 276:37672-37679.
113. Hori,S., T.Nomura, and S.Sakaguchi. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299:1057-1061.
114. Khattri,R., T.Cox, S.A.Yasayko, and F.Ramsdell. 2003. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat.Immunol.* 4:337-342.
115. Fontenot,J.D., M.A.Gavin, and A.Y.Rudensky. 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat.Immunol.* 4:330-336.

116. Ranger,A.M., M.Oukka, J.Rengarajan, and L.H.Glimcher. 1998. Inhibitory function of two NFAT family members in lymphoid homeostasis and Th2 development. *Immunity*. 9:627-635.
117. Rengarajan,J., B.Tang, and L.H.Glimcher. 2002. NFATc2 and NFATc3 regulate T(H)2 differentiation and modulate TCR-responsiveness of naive T(H)cells. *Nat.Immunol.* 3:48-54.
118. Imamura,R., E.S.Masuda, Y.Naito, S.Imai, T.Fujino, T.Takano, K.Arai, and N.Arai. 1998. Carboxyl-terminal 15-amino acid sequence of NFATx1 is possibly created by tissue-specific splicing and is essential for transactivation activity in T cells. *J.Immunol.* 161:3455-3463.
119. Park,J., A.Takeuchi, and S.Sharma. 1996. Characterization of a new isoform of the NFAT (nuclear factor of activated T cells) gene family member NFATc. *J.Biol.Chem.* 271:20914-20921.
120. Chuvpilo,S., A.Avots, F.Berberich-Siebelt, J.Glockner, C.Fischer, A.Kerstan, C.Escher, I.Inashkina, F.Hlubek, E.Jankevics, T.Brabletz, and E.Serfling. 1999. Multiple NF-ATc isoforms with individual transcriptional properties are synthesized in T lymphocytes. *J.Immunol.* 162:7294-7301.
121. Macian,F. 2005. NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat.Rev.Immunol.* 5:472-484.
122. Klee,C.B., H.Ren, and X.Wang. 1998. Regulation of the calmodulin-stimulated protein phosphatase, calcineurin. *J.Biol.Chem.* 273:13367-13370.
123. Clipstone,N.A. and G.R.Crabtree. 1992. Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature* 357:695-697.

-
124. Serfling, E., F. Berberich-Siebelt, S. Chuvpilo, E. Jankevics, S. Klein-Hessling, T. Twardzik, and A. Avots. 2000. The role of NF-AT transcription factors in T cell activation and differentiation. *Biochim. Biophys. Acta* 1498:1-18.
 125. Crabtree, G.R. and E.N. Olson. 2002. NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell* 109 Suppl:S67-S79.
 126. Hogan, P.G., L. Chen, J. Nardone, and A. Rao. 2003. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev.* 17:2205-2232.
 127. Coghlan, V.M., B.A. Perrino, M. Howard, L.K. Langeberg, J.B. Hicks, W.M. Gallatin, and J.D. Scott. 1995. Association of protein kinase A and protein phosphatase 2B with a common anchoring protein. *Science* 267:108-111.
 128. Sun, L., H.D. Youn, C. Loh, M. Stolow, W. He, and J.O. Liu. 1998. Cabin 1, a negative regulator for calcineurin signaling in T lymphocytes. *Immunity*. 8:703-711.
 129. Klauck, T.M., M.C. Faux, K. Labudda, L.K. Langeberg, S. Jaken, and J.D. Scott. 1996. Coordination of three signaling enzymes by AKAP79, a mammalian scaffold protein. *Science* 271:1589-1592.
 130. Kashishian, A., M. Howard, C. Loh, W.M. Gallatin, M.F. Hoekstra, and Y. Lai. 1998. AKAP79 inhibits calcineurin through a site distinct from the immunophilin-binding region. *J. Biol. Chem.* 273:27412-27419.
 131. Esau, C., M. Boes, H.D. Youn, L. Tatterson, J.O. Liu, and J. Chen. 2001. Deletion of calcineurin and myocyte enhancer factor 2 (MEF2) binding domain of Cabin1 results in enhanced cytokine gene expression in T cells. *J. Exp. Med.* 194:1449-1459.

-
132. Macian,F., S.H.Im, F.J.Garcia-Cozar, and A.Rao. 2004. T-cell anergy.
Curr.Opin.Immunol. 16:209-216.
133. Macian,F., F.Garcia-Cozar, S.H.Im, H.F.Horton, M.C.Byrne, and A.Rao. 2002.
Transcriptional mechanisms underlying lymphocyte tolerance. *Cell* 109:719-
731.
134. Aifantis,I., F.Gounari, L.Scorrano, C.Borowski, and H.von Boehmer. 2001.
Constitutive pre-TCR signaling promotes differentiation through Ca²⁺
mobilization and activation of NF-kappaB and NFAT. *Nat.Immunol.* 2:403-409.
135. Jenkins,M.K., R.H.Schwartz, and D.M.Pardoll. 1988. Effects of cyclosporine A
on T cell development and clonal deletion. *Science* 241:1655-1658.
136. Gao,E.K., D.Lo, R.Cheney, O.Kanagawa, and J.Sprent. 1988. Abnormal
differentiation of thymocytes in mice treated with cyclosporin A. *Nature*
336:176-179.
137. Bueno,O.F., E.B.Brandt, M.E.Rothenberg, and J.D.Molkentin. 2002. Defective
T cell development and function in calcineurin A beta -deficient mice.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 99:9398-9403.
138. Oukka,M., I.C.Ho, F.C.de la Brousse, T.Hoey, M.J.Grusby, and L.H.Glimcher.
1998. The transcription factor NFAT4 is involved in the generation and survival
of T cells. *Immunity.* 9:295-304.
139. Amasaki,Y., S.Adachi, Y.Ishida, M.Iwata, N.Arai, K.Arai, and S.Miyatake.
2002. A constitutively nuclear form of NFATx shows efficient transactivation
activity and induces differentiation of CD4(+)CD8(+) T cells. *J.Biol.Chem.*
277:25640-25648.

-
140. Xanthoudakis,S., J.P.Viola, K.T.Shaw, C.Luo, J.D.Wallace, P.T.Bozza, D.C.Luk, T.Curran, and A.Rao. 1996. An enhanced immune response in mice lacking the transcription factor NFAT1. *Science* 272:892-895.
141. Hodge,M.R., H.J.Chun, J.Rengarajan, A.Alt, R.Lieberson, and L.H.Glimcher. 1996. NF-AT-Driven interleukin-4 transcription potentiated by NIP45. *Science* 274:1903-1905.
142. Karasuyama,H. and F.Melchers. 1988. Establishment of mouse cell lines which constitutively secrete large quantities of interleukin 2, 3, 4 or 5, using modified cDNA expression vectors. *Eur.J.Immunol.* 18:97-104.
143. Viglietta,V., C.Baecher-Allan, H.L.Weiner, and D.A.Hafler. 2004. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J.Exp.Med.* 199:971-979.
144. Stassen,M., H.Jonuleit, C.Muller, M.Klein, C.Richter, T.Bopp, S.Schmitt, and E.Schmitt. 2004. Differential regulatory capacity of CD25+ T regulatory cells and preactivated CD25+ T regulatory cells on development, functional activation, and proliferation of Th2 cells. *J.Immunol.* 173:267-274.
145. Walker,L.S. and A.K.Abbas. 2002. The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery. *Nat.Rev.Immunol.* 2:11-19.
146. Kyewski,B. and L.Klein. 2006. A central role for central tolerance. *Annu.Rev.Immunol.* 24:571-606.
147. Baecher-Allan,C., V.Viglietta, and D.A.Hafler. 2002. Inhibition of human CD4(+)/CD25(+high) regulatory T cell function. *J.Immunol.* 169:6210-6217.

-
148. George, T.C., J. Bilsborough, J.L. Viney, and A.M. Norment. 2003. High antigen dose and activated dendritic cells enable Th cells to escape regulatory T cell-mediated suppression in vitro. *Eur.J.Immunol.* 33:502-511.
149. Monk, C.R., M. Spachidou, F. Rovis, E. Leung, M. Botto, R.I. Lechler, and O.A. Garden. 2005. MRL/Mp CD4+. *Arthritis Rheum.* 52:1180-1184.
150. Marie, J.C., J.J. Letterio, M. Gavin, and A.Y. Rudensky. 2005. TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells. *J.Exp.Med.* 201:1061-1067.
151. Nakamura, K., A. Kitani, I. Fuss, A. Pedersen, N. Harada, H. Nawata, and W. Strober. 2004. TGF-beta 1 plays an important role in the mechanism of CD4+CD25+ regulatory T cell activity in both humans and mice. *J.Immunol.* 172:834-842.
152. Nakamura, K., A. Kitani, and W. Strober. 2001. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J.Exp.Med.* 194:629-644.
153. Piccirillo, C.A. and E.M. Shevach. 2004. Naturally-occurring CD4+CD25+ immunoregulatory T cells: central players in the arena of peripheral tolerance. *Semin.Immunol.* 16:81-88.
154. Joffre, O., N. Gorse, P. Romagnoli, D. Hudrisier, and J.P. van Meerwijk. 2004. Induction of antigen-specific tolerance to bone marrow allografts with CD4+CD25+ T lymphocytes. *Blood* 103:4216-4221.
155. Jonuleit, H. and E. Schmitt. 2003. The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. *J.Immunol.* 171:6323-6327.

156. Pop, S.M., C.P. Wong, D.A. Culton, S.H. Clarke, and R. Tisch. 2005. Single cell analysis shows decreasing FoxP3 and TGFbeta1 coexpressing CD4+CD25+ regulatory T cells during autoimmune diabetes. *J. Exp. Med.* 201:1333-1346.
157. Poussier, P., T. Ning, T. Murphy, D. Dabrowski, and S. Ramanathan. 2005. Impaired post-thymic development of regulatory CD4+25+ T cells contributes to diabetes pathogenesis in BB rats. *J. Immunol.* 174:4081-4089.
158. Bettelli, E., M. Dastrange, and M. Oukka. 2005. 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.
159. Rao, A., C. Luo, and P.G. Hogan. 1997. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu. Rev. Immunol.* 15:707-747.
160. Rooney, J.W., Y.L. Sun, L.H. Glimcher, and T. Hoey. 1995. Novel NFAT sites that mediate activation of the interleukin-2 promoter in response to T-cell receptor stimulation. *Mol. Cell Biol.* 15:6299-6310.

7. Abkürzungen

Ag Antigen

AIRE Autoimmune Regulator

AICD Activation induced cell death

Ak Antikörper

AKAP79 A-Kinase Ankerprotein

APC Antigenpräsentierende Zelle

APS Ammoniumpersulfat

bio biotinyliert

bp Basenpaare

BSA bovine serum albumin

B7-1 CD80

B7-2 CD86

CABIN1 Calcineurin-binding-protein1

CD cluster of differentiation

CD4⁺CD25⁺ Tregs regulatorische T-Zellen

cDNA complementary DNA

CFDASE/CFSE Carboxyfluoreszein Diazetat Succinimidyl Ester

CTLA-4 Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4

DEPC Diethylpyrocarbonat

DAG Diacylglycerol

DKO-Mäuse NFATc2, NFATc3 doppel-defiziente Mäuse

DMSO Dimethylsulfoxid

DNA Desoxyribonukleinsäure

dNTP 2'-Desoxynukleosid-5'-Triphosphat

DP doppelt positiv

d3Tx Tag 3 (nach Geburt) thymektomierte Mäuse

E.coli Echerischia coli

EAE experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis

EDTA disodium ethylenediamine tetraacetic acid

EF-1a Elongations-Faktor-1alpha

ELISA Enzyme Linked Immuno Sorbend Assay

FACS Fluorescence Activated Cell Sort/Scan

FCS Fetal Calf Serum

FITC Fluorescein-5-isothiocyanat

FoxP3 Forkhead box protein 3

g Erdbeschleunigung

GITR Glucocorticoid induced tumor necrosis factor receptor-related Protein

gld Mäuse Fas-Ligand-defiziente Mäuse

HGPRT Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase

His Histidin

hr human rekombinant

IFN- γ Interferon- γ

Ig Immunglobulin

IL Interleukin

IMDM Iscove´s modified Dulbecco´s medium

InsP₃ Inositol-1,4,5-trisphosphat

kD Kilodalton

LAG-3 Lymphocyte activating gene 3

LPS Lipopolysaccharid

M Molar

m murin

MACS magnetic activated cell sorter
MEM minimal essential medium
MHC major histocompatibility complex
min Minute
mr murin rekombinant
MRL/*lpr* Fas-defiziente Mäuse
mRNA messenger RNA
mTECs medulläre Thymusepithel Zelle
NFAT Nuclear factor of activated T cell
N6 Hexanukleotide
NTA nitrilotriacetic acid
OD optische Dichte
PAGE Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS phosphate buffered saline
PCR polymerase chain reaction
PD 1 programmed cell death 1
PE Phycoerythrin
PLC- γ Phospholipase C- γ
PtdIns(4,5)P₂ Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
qRT-PCR quantitativ reverse transcription PCR
RAG recombinase activatin gene
RNA Ribonukleinsäure
RT reverse transcription
SA Streptavidin
SDS sodium dodecyl sulfat
TGF- β transforming growth factor- β

Th T-Helferzeller

TNFR Tumor Nekrose Faktor-Rezeptor

Tregs regulatorische T-Zellen

Tris Tris(Hydroxymethyl)-Aminomethan

TZR T-Zellrezeptor

U Unit