

Aus dem Deutschen Rheuma Forschungszentrum

DISSERTATION

Modulation von regulatorischen T-Zellen durch autokrine Stimulation
des IL-2 Signalweges

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Diplom Biochemiker Ben Hammoud
aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. rer. nat. A. Hamann
2. Prof. Dr. R. Lauster
3. Prof. Dr. med. S. Müller-Lissner

Datum der Promotion: 19.11.2010

1	Einleitung	10
1.1	Das Immunsystem	10
1.1.1	Allgemeine Einführung	10
1.1.2	CD4 ⁺ T-Lymphozyten	12
1.1.3	Regulatorische T-Zellen und Autoimmunerkrankungen	15
1.2	Toleranz und Autoimmunität	17
1.3	CD4⁺CD25⁺ regulatorische T-Zellen (T_{reg})	18
1.3.1	Phänotypisierung der CD4 ⁺ CD25 ⁺ T _{reg}	18
1.3.2	Entwicklung von CD4 ⁺ CD25 ⁺ regulatorischen T-Zellen	18
1.3.3	IL-2 Signaltransduktion in T-Zellen	19
1.3.4	Die Rolle von IL-2 für die CD4 ⁺ CD25 ⁺ T _{reg}	21
1.3.5	Mechanismen der Suppression	23
1.3.5.1	Zell-Zell-Kontaktabhängige Suppression	23
1.3.5.2	Kompetition um IL-2 als ein suppressiver Mechanismus	24
1.3.5.3	Zytokin-vermittelte Suppression	25
1,4	Bedeutung des IL-2 für die Interaktion von T_{resp} und T_{reg}	26
1.5	Aufbau der verwendeten Konstrukte	27
1.6	Ziele der Arbeit	29
2	Material und Methoden	30

2.1	Puffer und Medien	30
2.2	Klonierung, Antikörper und andere Reagenzien	30
2.2.1	Antikörper	30
2.2.2	Reagenzien zur Zellsortierung	31
2.3	Molekularbiologische Arbeiten	31
2.3.1	Retransformation von <i>E. coli</i> und Gewinnung der Plasmid DNA	31
2.3.2	Klonierung des CD25 IL-2 Fusionsprotein	32
2.3.3	Verwendete Vektoren	33
2.4	Mausstämme	34
2.5	Zellisolation und Aufreinigung	34
2.5.1	Gewinnung von Zellsuspensionen aus peripheren lymphatischen Organen	35
2.5.2	Gewinnung von Zellen aus dem Blut	35
2.5.3	Isolation von CD4 ⁺ CD25 ⁺ T _{reg} und CD25 ⁻ Zellen zur Analyse	35
2.5.4	Isolierung von T _{reg} und CD4 ⁺ CD25 ⁻ T-Zellen für den Transfer	35
2.5.5	Isolierung von Zellen für <i>in vitro</i> Kulturen	36
2.6	Transfersystem	36
2.7	Zellkultur	37
2.7.1	Restimulation von Zellen	37
2.7.1.1	Restimulation mit PMA/Ionomycin	37
2.7.2	Generierung des Zellüberstandes	37

2.7.3	Infektion der T-Zellen	38
2.7.4	Fixierung von Zellen	38
2.8	FACS Analyse	38
2.8.1	Oberflächenfärbung	39
2.8.2	Intrazelluläre Färbung	39
2.8.3	FOXP3 Färbung	40
2.9	Statistische Auswertung	40
3	Ergebnisse	41
3.1	Nachweis der biologischen Aktivität der verwendeten Konstrukte	
	<i>in vitro</i>	41
3.1.1	caSTAT5 1*6 und seine biologische Funktionalität	41
	3.1.1.1 Laserscanning Mikroskopie von caSTAT5 1*6	41
	3.1.1.2 CD 25 Präsentation von caSTAT5 1*6 in transfizierten naïven T-Zellen	42
3.1.2	Präsentation des CD25 IL-2 Fusionskonstrukt auf HEK 293 Zellen	44
3.1.3	Biologischen Aktivität der Konstrukte <i>in vitro</i>	44
	3.1.3.1 Überprüfung der Biologischen Aktivität der Konstrukte <i>in vitro</i>	45
3.2	Einfluss der Proliferation von T_{reg} <i>in vivo</i> durch retrovirale Transfektion mit IL-2 Signaltransduktions aktivierenden Konstrukten	46
3.2.1	Einfluss der Konstrukte auf T_{reg} in immundefizienten Mäusen	46

3.2.1.1	Proliferation der transfizierten T _{reg} nach Transfer in SCID Mäuse	47
3.2.1.2	FOXP3 Analyse von ex vivo isolierten T _{reg} aus SCID Mäusen	49
3.2.1.3	IL-10 Produktion der transfizierten T _{reg} nach SCID Transfer	50
3.3	Retroviral transfizierte T_{reg} in immunkompetenten Balb/c Mäusen	51
3.3.1	Transfizierte T _{reg} in immunkompetenten Tieren	51
3.3.2	Kein Selektionsvorteil der Konstrukte bei T _{reg} in immunkompetenten Tieren	52
3.4	Zusammenfassung	53
4	Diskussion	54
4.1	Bedeutung des caSTAT5 1*6 für mature T_{reg}	53
4.1.1	<i>In vitro</i> Untersuchung von caSTAT5 1*6 in T _{reg}	54
4.1.2	caSTAT5 1*6 hat keinen Einfluss auf die Expansion von Zellen <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	55
4.2	Einfluss von IL-2 auf regulatorische T-Zellen	57
4.2.1	Das membrangebundene Fusionsprotein und nicht das lösliche IL-2 führt zu einem Selektionsvorteil <i>in vitro</i>	57
4.3	Das Fusionsprotein führt im <i>in vivo</i> SCID Modell zu einem Selektionsvorteil	58

4.4	Phänotypisierung der CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen aus dem SCID Modell	61
4.4.1	IL-10 Induktion durch die IL-2 Konstrukte	61
4.5	Kein Selektionsvorteil der Konstrukte in Immunkompetenten Mäusen	62
4.6	Therapeutisches Potential von IL-2	63
5	Zusammenfassung	65
6	Literaturverzeichnis	67
7	Anhang	72

Abkürzungen

α	anti
Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
APC	Antigen-präsentierende Zelle
Bref A	Brefeldin A
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
caSTAT5 1*6	konstitutive aktives STAT5
d	Tag
DC	Dendritische Zelle
dLk	drainierende Lymphknoten
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTH	<i>delayed type hypersensitivity</i>
EAE	<i>experimental autoimmune encephalomyelitis</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorter</i>
h	Stunde
hull-2	humanes IL-2
IBD	<i>inflammatory bowel disease</i>
i.c.	intrazellulär
ICOS	<i>inducible costimulator</i>
IFA	Inkomplettes Freund's Adjuvans
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IL-2R	IL-2-Rezeptor
i.m.	intramuskulär
i.p.	intraperitoneal
IPEX	Immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked
i.v.	intravenös

KO	<i>knockout</i>
LCMV	Lymphocytäres Choriomeningitis Virus
LHC	Langerhanszellen
MACS	Magnetische Zellsortierung
MCS	<i>multiple cloning site</i>
mfi	<i>mean fluorescence intensity</i>
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
mIL-2	murines IL-2
min	Minute
OVA/Ova	Ovalbumin
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
pEv pcDNA3.1	(Leervektor)
PI	Propidiumiodid
pIL-2	pcDNA3.1 mit murinem IL-2 Gen
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
pOva	pCI Vektor mit murinem Ovalbumin Gen
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute Medium
RT	Raumtemperatur
s.c.	subkutan
SCID	<i>severe combined immunodeficiency</i>
T1D	Typ-1-Diabetis
Tab.	Tabelle
TCR	T-Zell-Rezeptor
tg	Transgen
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TLR	Toll-like Rezeptor
TNBS	<i>trinitrobenzene sulfonic acid</i>
T _{eff}	T-Effektorzellen
T _{reg}	CD4 ⁺ CD25 ⁺ regulatorische T-Zellen
T _{responder}	Responder T-Zellen
ü.N.	über Nacht
wt	Wildtyp

1 Einleitung

Ziel dieser Dissertation war es die Suppressivität von regulatorischen T-Zellen mit Hilfe von IL-2 zu steigern. Bei regulatorischen T-Zellen handelt es sich um eine Subpopulation der CD4 Lymphozyten, deren Hauptfunktion in der Regulation einer Immunantwort liegt. Kommt es zu einer Störung der Funktion der T_{reg} , kann die Selbsttoleranz durchbrochen werden und es kommt zu einer Vielzahl von autoimmunologischen Manifestationen unterschiedlichster Organsysteme.

Regulatorische T-Zellen produzieren kein Interleukin-2. Interleukin-2 ist ein Schlüsselzytokin, welches für die Homöostase und die Suppressivität der T_{reg} von unerlässlicher Bedeutung ist. IL-2 wird von aktivierten T-Zellen sezerniert und wirkt sowohl auf T-Effektorzellen und T_{reg} . Um die Suppressivität der T_{reg} zu steigern, wurden unterschiedliche genetisch modifizierte IL-2 Moleküle und ein am IL-2 Signaltransduktionsweg beteiligtes Moleküle (STAT5) über retroviralen Transfer in die Zellen eingebracht.

1.1 Das Immunsystem

1.1.1 Allgemeine Einführung

Die Immunologie ist eine verhältnismässig junge Wissenschaft, welche auf die Entdeckungen von Edward Jenner 1796 zurückgeht, der erstmalig die Kuhpocken und die damit verbundene Möglichkeit der Vakzinierung beschrieb. Die grundlegenden Prinzipien der Immunologie bei Wirbeltieren haben einen langen evolutionären Prozess hinter sich, der darauf zurück geht, dass Organismen Abwehrmechanismen gegen Pathogene wie Pilze, Viren und Bakterien entwickeln mussten. Dabei unterscheidet man in eine unspezifische und in eine spezifische Abwehr [1]. Die unspezifische Antwort, wie z.B. das Komplementsystem, gehören zu den immunologisch älteren Mechanismen. Diese bildeten sich früh in der Evolution der Vertebraten heraus [2]. Die

spezifische Abwehr besteht aus einer Vielzahl von Komponenten wie B-Zellen, deren primäre Aufgabe die Bildung von Antikörper ist. T-Zellen stellen eine weitere wichtige Säule der spezifischen Immunantwort dar. Die T-Zellen unterscheidet man in $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen [2]. Die initiale zelluläre Immunantwort beruht primär auf einer Aktivierung des unspezifischen Immunsystems [1, 2]. Es kommt zu einer Aktivierung des Komplementsystems und zur Infiltration von Neutrophilen, Granulozyten und Makrophagen. Im Anschluss hieran erfolgt die Aktivierung und das Einwandern von Lymphozyten. Die Lymphozyten lassen sich in T- (Thymus), B- (Bursa fabricii) und NK- (Natural Killer) Zellen unterteilen. Die Aktivierung der adaptiven Immunantwort beruht auf dem Erkennen bestimmter Molekülstrukturen, die als Antigen bezeichnet werden. Einige Lymphozyten sind in der Lage diese Antigene zu erkennen. Die Lymphozyten werden durch diese Erkennung zur Proliferation angeregt und es kommt somit zu einer klonalen Expansion. Dabei differenzieren die Antigen-selektionierten Lymphozyten in zwei wesentliche Richtungen. Zum einen in Effektorzellen, deren primäre Aufgabe es ist eine sofortige Immunantwort direkt oder indirekt zu generieren und zum anderen in Gedächtniszellen, die im Verlauf der Zeit bei erneutem Antigenkontakt eine schnellere spezifische Immunantwort erzeugen [3]. Neben der zellulären Antwort ist das adaptive Immunsystem in der Lage eine Antigen spezifische humorale Antwort zu generieren. Dies ist die Aufgabe der B-Zellen, die nach Aktivierung Antikörper produzieren und sezernieren [4].

Bei der Aktivierung der adaptiven Immunantwort erfolgt die Präsentation der Antigene über MHC Moleküle. Die Moleküle werden unterteilt in Klasse I und Klasse II. Klasse I MHC Moleküle befinden sich auf allen kernhaltigen Zellen, während sich Klasse II Moleküle nur auf bestimmten phagozytotischen Zellen des Immunsystems befinden. Diese Zellen werden als Antigen-Präsentierende Zellen (APC's) bezeichnet. T-Zellen sind in der Lage die mit antigen-beladenen MHC Moleküle zu erkennen. $CD8^+$ Zellen sind ausschliesslich in der Lage MHC I Moleküle zu erkennen, während $CD4^+$ Zellen nur MHC II Moleküle erkennen. Die Aufgabe der $CD8^+$ Zellen liegt in der Elimination der Zellen, die diese Antigene präsentieren, daher werden diese Zellen auch als zytotoxische T-Zellen bezeichnet. Die Aufgabe der $CD4^+$ Zellen liegt in der Aktivierung von B-Zellen und somit in der Aktivierung der Antikörperbildung und zum anderen in der Initiierung einer zellulären Antwort.

1.1.2 CD4⁺ T-Lymphozyten

Die T-Helfer-Zellen (TH) spielen eine zentrale Rolle bei der Aktivierung der adaptiven Immunantwort, da sie sowohl über Zell-Zell-Kontakte als auch über lösliche Zytokine die Immunantwort beeinflussen [5]. Die Aktivierung der TH-Zellen erfolgt über die Interaktion des T-Zellrezeptors mit dem antigen-beladenen MHC II Molekül, sowie über weitere kostimulatorische Moleküle. Dies bedeutet, dass eine Aktivierung der T-Zelle nur dann erfolgt, wenn eine gewisse Affinität des T-Zellrezeptors zu dem MHC II Antigen Komplex besteht.

Nach der antigen-spezifischen Stimulation produzieren die naiven TH-Zellen den T-Zellwachstumsfaktor Interleukin-2 (IL-2) [6]. Dieser Faktor ist massgeblich für die Proliferation und Differenzierung der naiven TH-Zellen zu T-Effektorzellen verantwortlich.

Effektor-TH-Zellen können in drei Hauptgruppen unterteilt werden, die sich hinsichtlich ihres Phänotyps und ihrer Funktion unterscheiden. Hierzu gehören die TH Typ-1 (TH1)-, TH Typ-2 (TH2)- und TH Typ-17 (TH17)- Zellen (Abb. 1). An der Entstehung dieser TH-Subpopulationen sind jeweils unterschiedliche Zytokine beteiligt, die letztlich zu einer unterschiedlichen Polarisierung der Zellen führen. Für diese einzelnen T-Subpopulationen konnten unterschiedliche Transkriptionsfaktoren identifiziert werden, die für den Phänotyp von entscheidender Bedeutung sind.

So ist die TH1 Differenzierung abhängig von T-bet [7], die TH2 Zellen von Gata3 [8] und TH17 Zelldifferenzierung von ROR γ t [9].

Die Induktion unterschiedlicher T-Helfer Subklassen ist antigen-gesteuert. Dabei können intrazelluläre Erreger antigenpräsentierenden Zellen zur Produktion von IL-12 anregen, welches eine Differenzierung der naiven TH-Zellen in TH1 Zellen fördert [10, 11]. TH1 Zellen haben die Funktion Makrophagen und zytotoxische T-Zellen zu aktivieren, die dann an der Bekämpfung von intrazellulären Infektionen durch Viren, Bakterien und Mikroorganismen beteiligt sind [12, 13]. TH1 Zellen sind auch durch die Sekretion von Zytokinen wie IFN- γ , IL-2 und TNF- α definiert [14]. Diese Zytokine stellen

einen wichtigen Mechanismus zur Interaktion und Aktivierung der zytotoxischen T-Zellen und Makrophagen dar. Diese Form der zellulären Antwort ist auch von besonderer Bedeutung in der Elimination von Tumorzellen [15].

Bei einer Infektion mit extrazellulären Erregern wird IL-4 freigesetzt, welches für die TH2 Differenzierung verantwortlich ist. Die TH2 Zellen bilden ihrerseits IL-4, IL-5 und IL-13, welche die Proliferation und Differenzierung von B-Lymphozyten beeinflussen, diese differenzieren dann zu Plasmazellen und sind in der Lage Antikörper zu produzieren [16, 17].

In den letzten Jahren konnte eine neue Subpopulation identifiziert, die als TH17 Zellen bezeichnet wird. TH17 Zellen sind dadurch charakterisiert, dass sie IL-17 exprimieren und den Schlüsseltranskriptionsfaktor ROR- γ t zur Genregulation besitzen. TH17 Zellen stellen eine Verbindung zu der angeborenen Immunität dar, da sie in der Lage sind Neutrophile Granulozyten durch das Zytokin IL-17 zu aktivieren [9]. TH17 Zellen scheinen ausserdem mit der Genese von Autoimmunerkrankungen in Verbindung zu stehen. Zur Induktion der proinflammatorischen TH17 Zellen bedarf es der beiden Zytokine IL-6 und TGF- β 1, während IL-23 für die Expansion und das Überleben dieser Zellen notwendig ist.

Eine besonders wichtige Untergruppe der T-Helferzellen sind die T_{reg}, die in der Lage sind eine Immunantwort negativ zu regulieren und eine überschüssende Immunantwort zu unterdrücken [18].

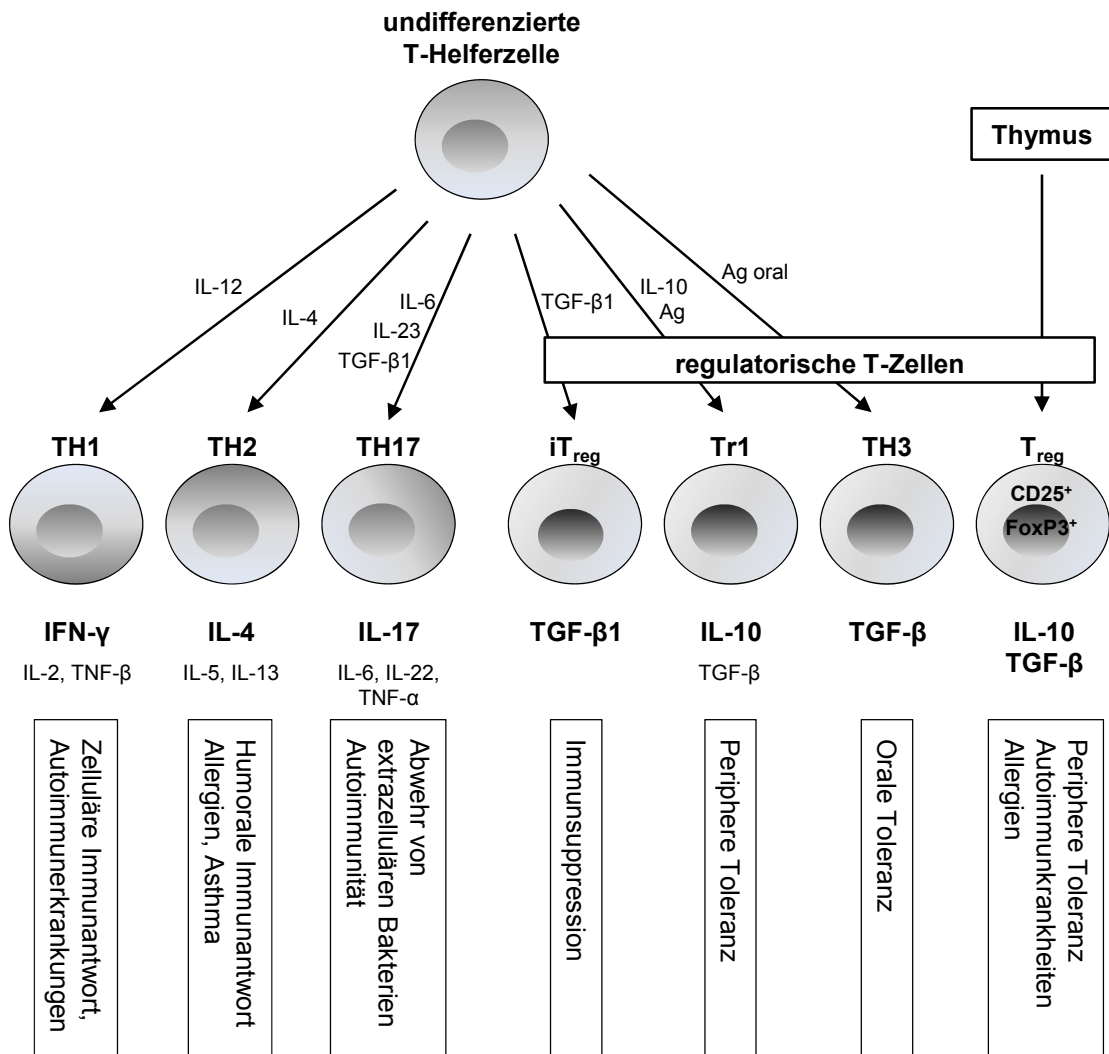


Fig. 1: Differenzierung von T-Helferzellen und regulatorischen T-Zellpopulationen

Abhängig vom Zytokinprofil differenzieren die naiven T-Helferzellen in verschiedene Subpopulationen, die unterschiedliche Aufgaben erfüllen.

1.1.3 Regulatorische T-Zellen und Autoimmunerkrankungen

Erkrankungen, die eine autoimmun Genese haben, betreffen ca. 5-6% der Bevölkerung in Deutschland. Allein diese Zahlen verdeutlichen, welche Bedeutung Autoimmunerkrankungen für die Gesellschaft und die Volkswirtschaft besitzen. In den letzten Jahren konnten deutliche Fortschritte in der Entwicklung neuer Therapien gemacht werden, doch noch immer gibt es schwerwiegende therapierefraktäre Verläufe, die neue Strategien in Therapie, Erkennung und Prävention erforderlich machen. Aus diesem Grund ist es nötig die Genese als auch Pathomechanismen dieser Erkrankungen zu verstehen, um neue Therapiekonzepte zu entwickeln.

Autoimmunerkrankungen sind dadurch charakterisiert, dass es sich hierbei um eine Disbalance zwischen autoreaktiven Zellen, die von Natur aus in allen Individuen entstehen, und immunsuppressiven Mechanismen handelt. Ein entscheidender Faktor der immunsuppressiven Mechanismen sind T_{reg} , die durch die Makermoleküle FOXP3, CD4 und CD25 charakterisiert sind. Bei FOXP3 handelt es sich um einen Forkhead Transkriptionsfaktor, der X-chromosomal (Xp11.23-Xp13.3) vererbt wird [19, 20]. Kommt es zu einem Defekt in diesem Gen, führt dies zu einer Vielzahl von Autoimmundefekten wie Typ-1-Diabetes mellitus, Autoimmunthyreoiditis, eine autoimmun-hämolytische, Anämie (positiver direkter Coombs-Test) und diverse Hauterkrankungen u.a. Ekzem, ichthyosiforme Erythrodermie, Psoriasis und Alopecia universalis. Als klinisch vorrangiges Syndrom ist bei diesem Syndrom eine Enteropathie [20, 21].

Diese Erkrankung wird als IPEX bezeichnet, wobei es unterschiedliche Ausprägungen im Schweregrad dieser Erkrankung gibt, die am ehesten mit unterschiedlichen Mutationen im FOXP3-Gen zu erklären sind [19]. T_{reg} besitzen nicht nur, bezogen auf diese Krankheit, eine klinische Relevanz. Bei der rheumatoiden Arthritis konnte gezeigt werden, dass die Patienten eine signifikant verminderte Zahl an T_{reg} im Blut haben, während sich in der Synovialflüssigkeit aktivierte T_{reg} finden liessen [22]. Es konnte aber auch gezeigt werden, dass die Effektor T-Zellen weniger reagibel auf immunsuppressive Mechanismen waren.

Bei der Multiplen Sklerose, als auch beim Typ I Diabetes zeigte sich, dass die Zahl der T_{reg} normal war, während die Suppressivität *in vitro* signifikant vermindert war.

Bei der Sarkoidose zeigen die Patienten eine Anergie bei der delayed Type I Hypersensitivity Reaktion, sowie in der bronchoalveolären Lavage eine erhöhte Anzahl an T_{reg} mit einem maturen Phänotyp und mit den Markern CTLA-4, FOXP3, CCR4 und CXCR3. Unverstanden bei dieser Erkrankung bleibt, warum trotz der starken Suppressivität *in vitro* und dem maturen Phänotyp der Zellen es zu einer Exazerbation der Erkrankung kommt [23].

Bei Lupus Erythematoses zeigen sich häufig verminderte Zellzahlen an T_{reg} im peripheren Blut über deren Funktion aber nicht ausreichend Informationen vorliegen [24].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass T_{reg} nicht ausreichend bei Autoimmunerkrankungen charakterisiert sind, weder im Phänotyp noch in deren Suppressivität. Bei all diesen Studien muss sicherlich auch noch berücksichtigt werden, dass oft nur CD4 und CD25 als Marker für T_{reg} herangezogen worden sind, welche auch bei aktivierten T-Zellen vorkommen. Im Gegensatz zur Maus, ist ausserdem bei Menschen, der Marker FOXP3 nicht auf T_{reg} begrenzt. Es konnte gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor NFAT eine Bindungsstelle im FOXP3 Promoter besitzt, so dass es bei der Aktivierung von naïven T-Zellen auch zu einer Transkription von FOXP3 kommt. Welche Bedeutung dabei FOXP3 in Effektor T-Zellen spielt ist noch unklar.

Daraus ergibt sich das Problem, dass die Analyse von Patientenproben, die unter einer Exazerbation einer Autoimmunerkrankung leiden deutlich schwieriger wird. Auf Grund der fehlenden Datenlage bezüglich der Bedeutung von T_{reg} bei Autoimmunerkrankung besteht weiterer Bedarf der Erforschung. Die Erforschung kann möglicher Weise zu neuen Therapiestrategien führen, denn trotz der Entwicklung von Medikamenten wie Infliximab und Eterncept, welche entscheidend in den Pathomechanismus durch blocken des TNF- α eingreifen, gibt es noch immer therapieresistente Patienten, die selbst unter der Therapie mit den gängigen Basis Therapeutika und TNF- α Inhibitoren schwere Verläufe zeigen. Auch bergen Medikamente wie Infliximab das Risiko von anaphylaktischen Reaktionen, sowie die Gefahr einer Exazerbation bei Infektionen mit bakteriellen Erregern, wie *Mycobacterium Tuberculosis*. Des Weiteren ist zu

berücksichtigen, dass auch zur Vermeidung von Transplantatabstossungen eine Stimulation von T_{reg} von ausserordentlicher Bedeutung sein kann.

1.2 Toleranz und Autoimmunität

Eine zentrale Frage der Immunologie ist, wie Immunantworten terminiert werden können und wie „fremd“ von „selbst“ unterschieden werden kann. Dies fasst man unter dem Begriff Toleranz zusammen. Eine gestörte Toleranz ist bei einer Vielzahl von Erkrankungen von wesentlicher Bedeutung, so richtet sich das Immunsystem bei Autoimmunerkrankungen gegen körpereigene Strukturen. Auf der anderen Seite können das Erkennen und die Elimination körpereigener Zellen bei malignen Erkrankungen gewünscht sein. Umgekehrt handelt es sich bei einem Fetus während einer Schwangerschaft um eine körperfremde Struktur, die von einer Immunantwort nicht beeinflusst werden soll. Toleranz wird durch unterschiedliche Mechanismen erzeugt. Zu Beginn der T-Zell Reifung, die unter anderem im Thymus [25, 26] erfolgt, werden autoreaktive T-Zellen depletiert. Trotz dieses Mechanismus kommt es trotzdem dazu, dass einige Zellen der negativen Selektion entgehen. In ihnen kann dann in der Peripherie Anergie induziert werden [26, 27]. Trotz dieser Mechanismen können autoreaktive T-Zellen aktiviert werden, z.B. im Rahmen eines entzündlichen Prozesses, wenn die T-Zellen mit dem entsprechenden Antigen in Kontakt kommen oder durch einen Prozess, der als molecular mimicry bezeichnet wird, wo Pathogene wie Bakterien (Chlamydien, Streptokokken) und Viren, Antigene präsentieren, die mit körpereigenen Epitopen verwandt sind [28]. T_{reg} $CD4^+$ und $CD25^+$ sind in der Lage, solche autoimmunologischen Reaktionen durch eine Vielzahl von Mechanismen zu unterdrücken [29-31]. Bei dem IPEX Syndrom handelt es sich um einen X-chromosomal vererbten Gendefekt, bei dem die Individuen eine verminderte Anzahl an T_{reg} besitzen, deren Funktion eingeschränkt ist, da das FOXP3 Gen mutiert ist [20]. Bei dieser Krankheit kommt es zu einer mannigfaltigen autoimmun Manifestation, wie Typ-1 Diabetes mellitus, Autoimmunthyreoiditis, autoimmunhämolytische (combs positive) Anämie, ichtyosiforme Erythrodermie, Psoriasis, Alopecia universalis und eine Autoimmun Enteropathie [21, 32]. Hieran lässt sich erkennen, welche

aussergewöhnliche Bedeutung die T_{reg} im Rahmen der Toleranz besitzen und dass die Mechanismen, die diese Zellen hierbei verwenden möglicherweise therapeutisches Potential bergen.

1.3 $CD4^+CD25^+$ regulatorische T-Zellen (T_{reg})

1.3.1 Phänotypisierung der $CD4^+CD25^+$ T_{reg}

T_{reg} sind durch die Oberflächenmoleküle CD4 und CD25 charakterisiert, dabei handelt es sich bei CD25 um die α -Kette des Interleukin-2 Rezeptors [6, 33]. Hieraus lässt sich vermuten, dass es sich bei IL-2 um ein wichtiges Zytokin für diese Zellpopulation handelt. Dabei muss aber auch berücksichtigt werden, dass nicht nur T_{reg} CD25 auf ihrer Oberfläche exprimieren, sondern auch T-Effektorzellen, weshalb CD25 allein kein guter Marker für T_{reg} ist [34]. Viel selektiver für diese Zellen ist der Transkriptionsfaktor FOXP3, der erstmalig im Zusammenhang mit dem IPEX Syndrom beschrieben wurde [19, 20]. Desweiteren exprimieren T_{reg} Marker wie CTLA-4, GITR, CD103 (αE) und CD62L [33, 35, 36]. Insgesamt beträgt der Anteil an FOXP3 positiven T_{reg} an der CD4 Population 5-10% [33, 36-38]. FOXP3 ist der Schlüsseltranskriptionsfaktor für die Entwicklung der T_{reg} [39]. FOXP3 reprimiert dabei die Transkription von IL-2, IL-4 und IFN- γ mittels direkter Interaktion mit NF- κ B und NFAT. Der NFAT-FOXP3 Komplex ist ausserdem verantwortlich für die verstärkte Präsentation von CD25 und CTLA-4 auf der Oberfläche der T_{reg} und ist damit eine der Voraussetzungen für die suppressive Aktivität der T_{reg} [40, 41].

1.3.2 Entwicklung von $CD4^+CD25^+$ regulatorischen T-Zellen

Regulatorische T-Zellen haben als Vorläuferzellen haematopoetische Zellen aus dem Knochenmark. T-Vorläuferzellen aus dem Knochenmark wandern in den Thymus ein und

bilden dort unreife Thymozyten. Im Thymus erfolgt eine Umordnung der T-Zell-Rezeptor-Gene der sich entwickelnden Thymozyten. Die frühesten dieser Thymozyten präsentieren weder CD4 noch CD8 auf ihrer Oberfläche, und werden daher als doppelt negative Zellen bezeichnet [25, 42]. Im Laufe der T-Zellmaturation gehen die Thymozyten in doppelt positive Zellen über und präsentieren auf ihrer Oberfläche CD4 und CD8, bis sie am Ende nur einen dieser Oberflächenmarker präsentieren [26]. Diese einfach positiven Zellen sind dann in der Lage den Thymus zu verlassen. In dieser T-Zellmaturation durchlaufen die Zellen zwei wesentliche Selektionsmechanismen, die als positive und negative Selektion bezeichnet werden [25]. Hierbei fallen ca. 97% der initialen Thymozyten dieser Selektion zum Opfer [26, 42]. Bei den Prozessen liegt die Interaktion Selbstantigen MHC Rezeptor und T-Zellrezeptor zu Grunde. Bei der positiven Selektion werden die Thymozyten selektioniert, die in der Lage sind mit einem Antigen MHC Komplex zu interagieren, alle anderen Thymozyten unterliegen der Apoptose. Bei einer zu starken TCR-Selbstantigen MHC Interaktion werden die T-Zellen deletiert, so dass keine Selbstantigen erkennenden Zellen in die Peripherie gelangen [25, 26].

Auch T_{reg} machen eine Maturation im Thymus durch. Die Besonderheit hier ist, dass sie einer deutlich stärkeren Interaktion mit dem Selbstantigen MHC Komplex bedürfen, als naive T-Zellen, die in die Peripherie übertreten können [43]. Hierbei darf die Interaktion der T_{reg} mit dem Stromazellen aber nicht so stark sein, dass es zur Induktion von Apoptose kommt [44]. Desweiteren können naive T-Zellen durch Antigen Interaktion einen T_{reg} Phänotyp erlangen [39, 42, 45-47].

1.3.3 IL-2 Signaltransduktion in T-Zellen

Der Interleukin-2 Rezeptor ist ein heterotrimeres Protein und besteht aus drei Untereinheiten: IL-2R α (CD25), IL2R β (CD122) und IL2R γ (CD132), die nicht kovalent mit einander verbunden sind [6, 48, 49]. Hierbei ist die α -Untereinheit für eine hochaffine Bindung des IL-2 an dem Rezeptor verantwortlich, während die γ -Untereinheit die Signaltransduktion in die Zelle übernimmt [50]. Ausserdem ist die γ -Untereinheit zusätzlich an der Bildung der Rezeptoren für IL-4, -7, -9 und -15 beteiligt.

Unterhalb des Rezeptors erfolgt, bei Bindung von Interleukin-2, die Aktivierung der Januskinasen JAK1 und JAK3 [50]. Hierdurch kommt es zu einer Phosphorylierung von STAT5, welches in seiner inaktiven Form als Monomer vorliegt und bei Aktivierung durch Phosphorylierung homodimerisiert und in den Zellkern transloziert [51]. Im Nukleus wirkt das homodimerisierte STAT5 als Transkriptionsfaktor, der in die Regulation bestimmter meist für das Zellüberleben verantwortlicher Gene eingreift [50, 52, 53]. Zusätzlich kommt es zu der Aktivierung des MAP Kinase Weges, welcher zur Transkription von Genen führt, die bei der Zellproliferation und dem Zellüberleben von ausserordentlicher Bedeutung sind. Desweiteren kommt es zur Phosphorylierung des IL-2 Rezeptors, wodurch es zur Anlagerung von Adapter Proteinen kommt wie SHP, welche wiederum ihrerseits zur Phosphorylierung der Phosphatidylinositolkinase 3 führen [50, 53, 54]. Als dritter Signaltransduktionsweg wird über die Phospholipase C Inositol-1,4,5-trisphosphat gebildet, welches wiederum die intrazelluläre Calciumkonzentration steigert, was zur Aktivierung der Calcium abhängigen Proteinkinase C führt [50]. Auch die Proteinkinase besitzt eine ausserordentliche Bedeutung bezüglich der Prolifertion von Zellen.

Durch die Bindung des IL-2 an IL-2R kommt es in T-Zellen zur Regulation verschiedenster Gene. Zum einen steigt die Synthese der IL-2 Rezeptoruntereinheiten IL-2R α und IL-2R β an, zum anderen werden Zell-Zyklus-Gene (c-myc, c-jun) moduliert [50, 52, 54]. Ausserdem wird die Transkription der Gene für das Zellüberleben (bcl-2, bcl-xL) hochreguliert, gleichzeitig kommt es aber auch zu einer gesteigerten Synthese proapoptotischer Gene, z.B. (FasL) [55-57].

IL-2 fördert die Proliferation von T-Zellen, erhält die Zelle aber ein starkes TCR Signal, so kommt es nach einigen Tagen zur Apoptose der Zellen (AICD: Acute Induced Cell Death). Paradoxer Weise zeigen IL-2^{-/-} und IL-2R α ^{-/-} Mäuse eine signifikante T-Zell Proliferation, sowie einen Autoimmun-Phänotyp, der als Lymphoproliferative Erkrankung bezeichnet wird [58-61]. Was darauf hinweist, das IL-2 einen negativen Einfluss auf die Proliferation von T-Zellen *in vivo* besitzt bzw. suppressive Zellen unterstützt.

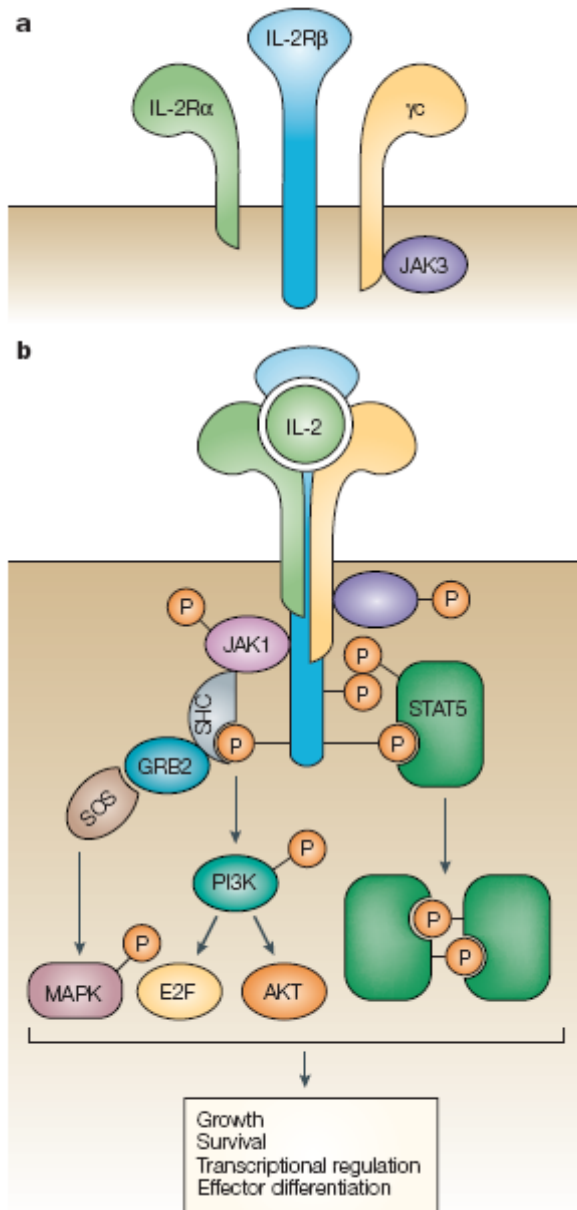


Fig. 2 (a) IL-2 Rezeptor besteht aus drei Untereinheiten α , β , γ . Die γ -Untereinheit ist für die Signaltransduktion essentiell. (b) Nach Bindung von IL-2 werden eine Vielzahl von Signaltransduktionswegen aktiviert.

1.3.4 Die Rolle von IL-2 für die CD4⁺CD25⁺ T_{reg}

T_{reg} sind nicht in der Lage Interleukin-2 nach Stimulation, wie naive T-Zellen zu sezernieren. T_{reg} präsentieren auf ihrer Oberfläche CD25 [62], welches die hochaffine α -Untereinheit des IL-2 Rezeptors ist. IL-2 scheint eine besondere Bedeutung für T_{reg} zu

haben. Initial wurde IL-2 als Wachstumsfaktor für T-Zellen beschrieben. Es konnte an IL-2^{-/-} und IL-2R α ^{-/-} knockout Mäusen gezeigt werden, dass es in diesen Tieren zu einer vermehrten T-Zell Proliferation kommt, die als Lymphoproliferative Disease bezeichnet wird [34, 55]. Demnach ist IL-2 für die T-Zell expansion *in vivo* nicht nötig. Was an diesen knockout Tieren auffiel, war, dass der Anteil an FOXP3 positiven Zellen deutlich vermindert war. IL-2 scheint also weniger für die Genese der T_{reg} verantwortlich zu sein als für deren Proliferation und deren Homöostase. Dies wird unterstützt von der Beobachtung, dass IL-2R γ_c knockout Tiere keine FOXP3 positiven Zellen haben [34, 55]. Da die γ_c Kette des IL-2 Rezeptors bei der Signaltransduktion von unerlässlicher Bedeutung und ausserdem Bestandteil der Rezeptoren von IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 und IL-21 ist, liegt die Schlussfolgerung nahe, dass möglicherweise eines dieser weiteren Zytokine für die Entwicklung von T_{reg} verantwortlich ist [16, 55, 56, 63-68]. Die IL-2 knockout Experimente haben gezeigt, dass das IL-2 ein ausserordentlich wichtiger Faktor in der Homöostase der T_{reg} ist [55]. So konnte auch gezeigt werden, dass durch die Gabe von IL-2 neutralisierenden Antikörpern in Wildtyp Tieren, die Anzahl der T_{reg} deutlich reduziert werden konnte und es so zu Autoimmunerkrankungen führen kann [34, 55, 61, 69, 70]. Auf der anderen Seite haben diese Experimente gezeigt, dass die Quelle für das IL-2 T-Zellen sind. Inwieweit IL-2 die Funktion der T_{reg} beeinflusst ist nicht ganz eindeutig, so konnte sowohl *in vivo* als auch *in vitro* gezeigt werden, dass durch die Zugabe von IL-2 die Suppressivität der T_{reg} gesteigert werden konnte [71, 72]. So konnte *in vitro* die T_{eff} Proliferation nach Antigenstimulation durch die Zugabe von IL-2 durch die T_{reg} signifikant inhibiert werden [72]. In einem *in vivo* Colitis Modell wurde die Colitis durch die Gabe von IL-2 deutlich reduziert. Nebenbefundlich ergab sich in diesen Experimenten eine erhöhte T_{reg} Zellzahl [73]. Eine Hypothese wie die T_{reg} ihre Suppressivität vermitteln ist, dass sie mit den Effektorzellen um Zytokine wie IL-2 kompetieren [74]. Unsere Gruppe konnte ausserdem zeigen, dass sich die Suppressivität durch IL-2 als auch die absolute Zellzahl steigern lässt [71]. Da T_{reg} nicht in der Lage sind IL-2 zu synthetisieren, war es Ziel der Arbeit die T_{reg} mit einem starken autokrinen IL-2 Signal auszustatten um so deren Suppressivität zu steigern.

1.3.5 Mechanismen der Suppression

T_{reg} sind in der Lage Immunantworten zu unterdrücken. Das konnte in einer Vielzahl von unterschiedlichen tierexperimentellen Modellen gezeigt werden [28]. Dabei erfolgt die Suppression auf einer Vielzahl von unterschiedlichen Ebenen und beeinflusst eine Vielzahl von Zellen, die bei einer Immunantwort beteiligt sind [75, 76].

T_{reg} sind in der Lage die Proliferation von T-Effektorzellen zu unterdrücken, gleichzeitig haben sie aber auch Einfluss auf B-Zellen und inhibieren deren Proliferation und Immunglobulinproduktion [77, 78]. Die Aktivität von NK-Zellen und die Maturation und Funktion von Dendritischen Zellen werden auch von T_{reg} inhibiert [79, 80]. Damit T_{reg} aktiviert werden und einen inflammatorischen Prozess inhibieren bzw. terminieren können, benötigen sie ein TCR Signal. Interessanterweise ist dann die Suppression der T_{eff} Zellen Antigen unspezifisch [81-83].

Die Mechanismen, die der Suppression von T_{reg} zu Grunde liegen, sind Gegenstand der aktuellen Forschung. Zurzeit geht man davon aus, dass die Suppressivität der $CD4^+ CD25^+ T_{reg}$ auf mehreren Mechanismen beruht. Hierzu gehört die Zell-zellkontaktabhängige Suppression, wodurch direkte Interaktion der Zellen miteinander die Proliferation und die Funktion der Effektorzellen inhibiert werden. Ein weiterer Mechanismus liegt in der Sezernierung von antiinflammatorischen Zytokinen, wie z.B. IL-10.

1.3.5.1 Zell-Zell-Kontaktabhängige Suppression

In den ersten Suppressions-Untersuchungen wurden T_{reg} mit $T_{responder}$ in Ko-Kultur gehalten und im Anschluss die Proliferation der Zellen mit und ohne T_{reg} verglichen. In diesen Untersuchungen waren die antiinflammatorischen Zytokine wie IL-10 und TGF- β nicht wesentlich erhöht, aber die Proliferation der T_{eff} war signifikant vermindert [29]. Führt man diese Experimente durch und trennt die $T_{responder}$ und T_{reg} durch eine

semipermeable Membran, ist die Hemmung der Proliferation der $T_{\text{responder}}$ signifikant erniedrigt [48, 83]. Dies deutet auf eine Kontaktabhängigkeit zwischen den T_{reg} und den $T_{\text{responder}}$ für die Suppression *in vitro* hin. Bei den Ergebnissen dieser Experimente ist zu berücksichtigen, dass die Distanz zwischen den Zellen um den Faktor 100 grösser ist als der Durchmesser einer T-Zelle und somit eine Wirkung über lösliche Mediatoren auf Grund der Distanz als eher gering einzuordnen ist. Letztlich sind die Ergebnisse so zu werten, dass es zur Suppression eine relative Nähe der T_{reg} mit den $T_{\text{responder}}$ Zellen bedarf [40, 84]. Ein weiteres Indiz für eine Zell-Zell-kontaktabhängige Suppression ist die Präsentation von CTLA-4 auf der Oberfläche von T_{reg} . CTLA-4 bindet an CD80 und übt ein inhibitorisches Signal auf T-Zellen aus, so dass möglicherweise CTLA-4 an einer Zell-Zell abhängigen Suppression der T_{reg} beteiligt ist [74, 84-87].

1.3.5.2 Konkurrenz um IL-2 als ein suppressiver Mechanismus

Als ein neu diskutierter Ansatz der Suppression gibt es Hinweise, dass es zu einer Konkurrenz um den Wachstumsfaktor IL-2 zwischen T_{reg} und $T_{\text{responder}}$ kommt. Aktivierte Zellen sezernieren IL-2, welches in einem autokrinen Feedback Loop die Oberflächenpräsentation des eigenen Rezeptors CD25 induziert und so zur Proliferation der T-Zellen führt. Durch die Fähigkeit der CD25 CD4 T_{reg} IL-2 aufzunehmen, kommt es zu einer Konkurrenz um IL-2, in der die T_{reg} den $T_{\text{responder}}$ einen wichtigen Wachstumsfaktor entziehen. Dieser Mangel an IL-2 führt letztlich zu einer verminderten Immunantwort und somit zur Suppression. Für diese Hypothese spricht, dass zum einen *in vitro* gezeigt wurde, dass alle durch T_{reg} vermittelten suppressiven Eigenschaften durch einen anti IL-2 Antikörper, der den Zugang der $T_{\text{responder}}$ zu IL-2 in der Kultur verhindert, imitiert werden konnte [72]. Setzt man bei diesem Ansatz IL-2 wieder im Überschuss ein, kann diese Art der Suppression durchbrochen werden [72, 88, 89]. Aber nicht nur IL-2 scheint in diesem Prozess von ausserordentlicher Bedeutung zu sein. So konnte gezeigt werden, dass durch zusätzliche Konkurrenz um weitere Zytokine wie IL-4, IL-7 und IL-15 Apoptose in den $T_{\text{responder}}$ Zellen ausgelöst wird, was auch zu einer verminderten Immunantwort führt [79]. So ist davon auszugehen, dass nicht nur die Aufnahme von IL-2, sondern auch von weiteren Zytokinen einen wesentlichen Mechanismus der Suppression darstellt [79].

1.3.5.3 Zytokin-vermittelte Suppression

T_{reg} sezernieren als wichtigste antiinflammatorische Zytokine IL-10 und TGF- β . Es konnte gezeigt werden, dass diese Zytokine *in vivo* eine nicht unerhebliche Rolle in der Immunsuppression spielen. Hierbei ist TGF- β ausserdem ein wichtiger Faktor in der Genese von T_{reg} .

In RAG2^{-/-} Mäusen, in denen eine Kolitis durch einen Transfer von naiven T-Zellen erzeugt wurde, konnten T_{reg} aus IL-10 knockout Tieren keine signifikante Reduktion der Krankheit hervorrufen [90]. In einem durch B-Zellen induzierten EAE Modell zeigte sich eine deutliche Reduktion der zerebralen Läsionen durch IL-10 sezernierende T_{reg} [29]. Wenn man umgekehrt ein Mausmodell betrachtet, bei dem ein IL-10 knockout in T_{reg} vorliegt, zeigt sich keine spontane systemische Autoimmunität. Man findet in adulten Tieren eine Inflammation des Kolons, sowie eine Hypersensitivität der Lungen [91]. Was den Schluss nahe legt, dass T_{reg} sezerniertes IL-10 zur Kontrolle von Entzündungen von Bedeutung ist, deren Ursprung in einem Pathogen oder in einem Umwelteinfluss liegen. Ein weiterer Faktor ist TGF- β , welches von T_{reg} sezerniert wird [83, 92]. Frühe *in vitro* Studien mit TGF- β neutralisierenden Antikörpern oder TGF- β defizienten T_{reg} haben keinen Hinweis darauf ergeben, dass TGF- β die Funktion der T_{reg} beeinflusst. Andere Experimente haben einen Hinweis darauf gegeben, dass membrangebundenes TGF- β einen Einfluss auf die Suppression ausübt [93, 94]. TGF- β ist ein wesentlicher Faktor in der Genese und Aufrechterhaltung eines T_{reg} Pools, was Hauptbestandteil der Arbeiten in den letzten Jahren war [47, 95]. Trotzdem gibt es Hinweise dass T_{reg} sezerniertes TGF- β auch Bestandteil von Immunsuppression der T_{reg} ist. So können T_{eff} , die nicht in der Lage sind auf TGF- β zu reagieren, nicht in Ihrer Proliferation von T_{reg} gehemmt werden. Auch das membrangebundene TGF- β konnte in einem Diabetes Modell eine weitere CD8 Infiltration der β -Zellen des Pankreas inhibieren und ein Fortschreiten des Diabetes mellitus verhindern [94].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass T_{reg} über eine Vielzahl von Mechanismen eine Immunantwort kontrollieren, die je nach Aktivierungsstatus des Immunsystems zur Inhibition führen können. Ein wesentlicher Faktor hierfür ist das IL-2, welches in einer Immunantwort von grosser Bedeutung ist. In einer nicht entzündlichen Situation scheint es so zu sein, dass eine Basalsekretion von IL-2 durch naive CD4 Zellen zu einem

Gleichgewicht zwischen T_{reg} und naiven T-Zellen führt. Im Rahmen einer Entzündung kommt es zu einer exzessiven Produktion von IL-2, was dann dazu führt, dass das Gleichgewicht durchbrochen wird und die T-Zellen proliferieren, was zu einer Immunantwort führt.

1.4 Bedeutung des IL-2 für die Interaktion von T_{resp} und T_{reg}

T_{reg} sind im Gegensatz zu naiven CD4 T-Zellen nicht in der Lage IL-2 zu produzieren. IL-2 ist ein Schlüsselfaktor für die Homöostase, Proliferation und Suppressivität der regulatorischen T-Zellen. In der nicht inflammatorischen Situation, *in vivo*, sind naive T-Zellen für eine basale IL-2 Produktion hauptverantwortlich. Dieses basale Level ist für ein homöostatisches Gleichgewicht zwischen $T_{responder}$ und T_{reg} verantwortlich.

Im Fall einer Entzündung kommt es zu einer deutlich gesteigerten IL-2 Sekretion der aktivierten T-Zellen, was dazu führt, dass auch die T_{reg} aktiviert werden. Die T_{reg} werden durch das IL-2 der naiven T-Zellen zur Proliferation und zur Suppression angeregt. Die Aufgabe der T_{reg} in einer inflammatorischen Situation liegt in der Begrenzung und Terminierung der Immunantwort. Vermutlich ist IL-2 bezüglich der Homöostase, aber auch der Funktion im Sinne der Termination einer Immunantwort von zentraler Bedeutung [29, 72].

Der Entzug des IL-2 durch die T_{reg} führt bei den $T_{responder}$ zu einem Mangel dieses Wachstumsfaktors in ihrer Umgebung, so dass die T_{resp} in ihrer Proliferation proinflammatorischen Funktion inhibiert werden.

Für diese Hypothese spricht, dass zum einen *in vitro* gezeigt wurde, dass alle durch T_{reg} vermittelten antiinflammatorischen Effekte auch durch Zugabe eines anti-IL-2 Antikörpers nachgeahmt werden konnten. Bei der Zugabe von IL-2 zu dieser Kokultur liessen sich die initiale anti-IL-2 Negativregulation aufheben [90].

Zusätzlich konnte die Aufnahme des IL-2 durch die T_{reg} über ihren hochaffinen IL-2R dargestellt werden [90;93], was auf den Konsum des IL-2, das von den Responder-T-Zellen sekretiert wird, hindeutet.

T_{reg} sind für ihre Funktion und Proliferation auf IL-2 angewiesen. Um die suppressive Kapazität der T_{reg} zu steigern, war es unser Ziel T_{reg} die Fähigkeit zur eigenen Synthese

von IL-2 zu vermitteln. Um die T_{reg} unabhängig von externen IL-2 zu machen, transfizierten wir ein membrangebundenes, an CD25 gekoppeltes humanes IL-2, ein lösliches murines IL-2 sowie ein an der Signaltransduktionskaskade beteiligtes konstitutiv aktives STAT5 retroviral. Das Ziel war es, die Proliferation und die Suppressivität der T_{reg} durch Synthese ihres eigenen Wachstumsfaktors zu steigern. Dabei war es ausserdem das Ziel, dass die Moleküle nicht parakrin oder systemisch Wirken, sondern ausschliesslich autokrin auf die transfizierten T_{reg} .

1.5 Aufbau der verwendeten Konstrukte

IL-2 ist ein essentieller Faktor für die Homöostase von T_{reg} . Ziel dieser Arbeit war es T_{reg} durch autokrine Stimulation mit unterschiedlichen Ansätzen so zu stimulieren, dass es zu einer gesteigerten Proliferation und zu einem deutlichen Anstieg der suppressiven Eigenschaften der Zellen kommt. Um dieses Ziel zu erreichen verwendeten wir verschiedene Wege einer autokrinen IL-2 Stimulation. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Konstrukten transfiziert, die an der Signaltransduktion des IL-2 Rezeptor beteiligt sind. Als Marker für die mit diesen Molekülen transfizierten Zellen wurde eGFP (enhanced Green Fluorescent Protein) verwendet. Es wurde ein konstitutiv aktives STAT5 verwendet, welches an der Signaltransduktionskaskade des IL-2 Rezeptors beteiligt ist. Das konstitutiv aktive STAT5 besitzt zwei Punktmutationen. Eine Punktmutation liegt in der DNA Bindungsdomäne und die zweite in der Transaktivierungsdomäne. Am Carboxy-terminalen Ende besitzt das STAT5 ein GFP Molekül als Selektionsmarker siehe Fig. 3a. Des Weiteren transfizierten wir die $CD4^+ CD25^+$ Zellen mit einem löslichem murinem IL-2. Als neuen Ansatz zur Stimulation von T_{reg} wurde ein neu generiertes IL-2 Fusionsprotein zur selektiven autokrinen Aktivierung der T_{reg} kloniert. Das Molekül besteht aus der α -Untereinheit des IL-2 Rezeptors, was über einen Peptidlinker mit dem humanen IL-2 verbunden ist siehe Fig. 3b.

Fig.

3a,b

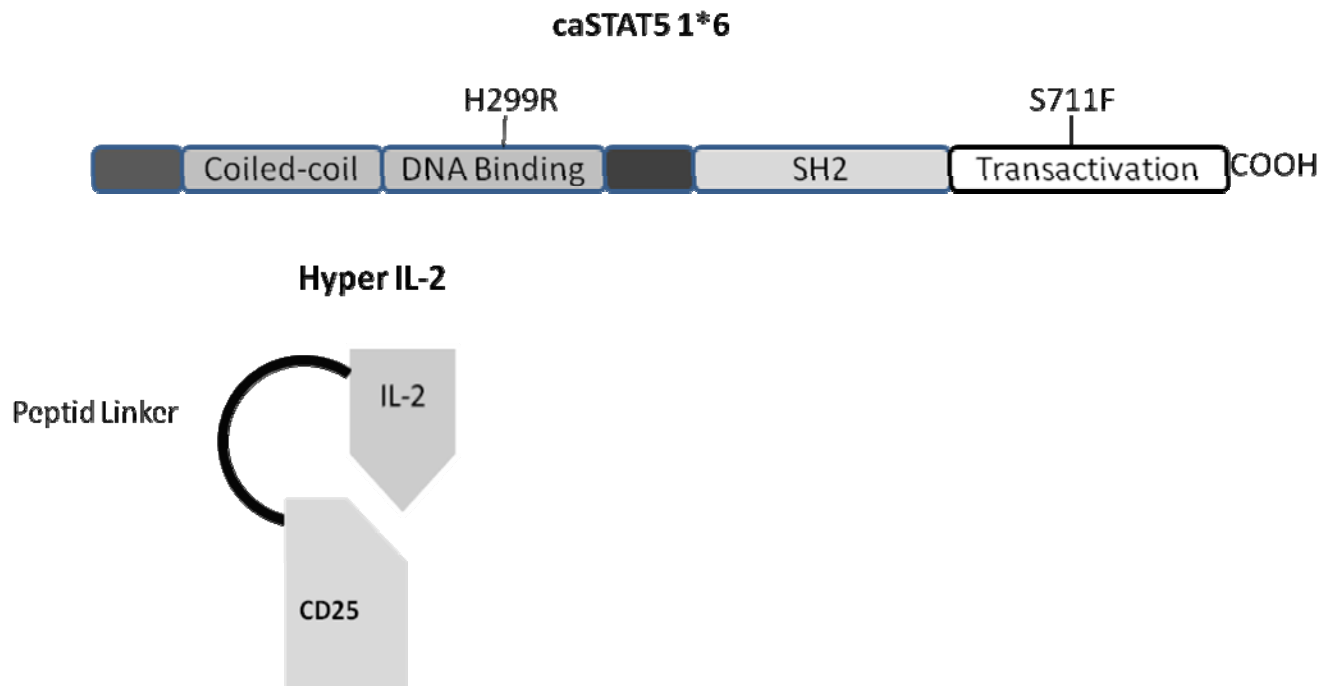


Fig. 1 Schematische Darstellung der zwei verwendeten Signalmoleküle.

- (A) Das konstitutiv aktive STAT5 besitzt zwei Punktmutationen, eine befindet sich oberhalb der DNA Bindungsdomäne (H299R), die andere Punktmutation befindet sich in der Transaktivierungsdomäne (S711F).
- (B) Das Fusionsprotein ist ein artifizielles Protein bestehend aus IL-2 und der α -Untereinheit seines Rezeptors (CD25) verbunden mit einem Peptid-Linker.

1.6 Ziel der Arbeit

Da IL-2 zu den Schlüssel Zytokinen für T_{reg} gehört, haben wir versucht über ein autokrines Signal des IL-2 Signaltransduktionsweges die T_{reg} zu stimulieren und so die suppressive Kapazität der Zellen zu erhöhen. Wir verwendeten dafür murines IL-2, ein konstitutiv aktives STAT5 (caSTAT5 1*6) und ein von uns generiertes IL-2 CD25 Fusionsprotein.

Mit diesen Konstrukten transfizierten wir ex vivo isolierte T_{reg} und transferierten die Zellen in SCID Mäuse. Im Anschluss analysierten wir die Zellen, bezüglich der Zellzahlen, der Präsentation der Oberflächenmarker CD4 und CD25 sowie des T_{reg} Markers FOXP3 sowie der Zytokinproduktion nach Stimulation.

2 Material und Methoden

2.1 Puffer und Medien

PBS:	8 g/L NaCl; 0,2 g/L KCl; 0,2 g/L KH ₂ PO ₄ ; 1,4 g/L Na ₂ HPO ₄ ·H ₂ O
PBS/BSA:	PBS + 2 g/L Rinderserumalbumin
PBA:	PBS/BSA + 0,05% NaN ₃
Saponinpuffer:	PBS/BSA + 5 g/L Saponin
MACS-Puffer:	PBS/BSA + 2 mM EDTA
Erythrozyten-Lysepuffer:	10 mM KHCO ₃ ; 155 mM NH ₄ Cl; 0,1 mM EDTA; pH 7,5
Medium: "RPMI+":	RPMI + 10% FCS hitzeinaktiviert + 100 U/mL Penicillin + 100 U/mL Streptomycin + Glutamax-I (0,3 mg/mL Glutamin) + 10 µg/mL 2-Mercaptoethanol

2.2.1 Antikörper

Für durchflusszytometrische Analysen, verschiedene Färbungen, *in vitro* Kultivierungen und *in vivo* Applikationen wurden die angegebenen Antikörper verwendet (Tab. 1).

Tab. 1: Verwendete Antikörper

Epitop-Fluorochrom	Klon	Herkunft	Verwendung
CD4-FITC/PE/PerCP/APC	GK1.4	DRFZ/BD Biosciences	Oberflächenfärbung

CD25-Bio/APC	7D4/PC61	BD Biosciences	Oberflächenfärbung
CD103 (αE)-PE	M290	BD Biosciences	Oberflächenfärbung
IL-10-PE/APC	JES5-16E3	BD Biosciences	intrazelluläre Färbung
IFN-γ-FITC/APC	AN18.17.23	DRFZ/BD Biosciences	intrazelluläre Färbung
FOXP3-FITC/PE	FJK-16s	eBioscience	intrazelluläre Färbung
CD3	145-2C11	BD Biosciences	<i>in vitro</i> Kultur

BD-PharMingen, San Diego, CA; eBioscience, San Diego, CA; Rockland, Gilbertsville, PA

2.2.3 Reagenzien zur Zellsortierung

Benötigte Zellpopulationen wurden mittels magnetischer Zellsortierung aufgereinigt, wofür Microbeads der Firma Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland) nach Protokoll eingesetzt wurden (Tab. 2).

Tab. 2: Verwendete Microbeads zur Zellaufreinigung

Microbeads	Zielzellen der Beads
αCD4	CD4 ⁺ T-Zellen
αBiotin	Zellen, die zuvor mit anti-Biotin Antikörper markiert wurden
CD4 ⁺ T cell isolation kit	Depletion von CD4 negativen Zellen (Negativselektion); CD4 ⁺ Zellen befinden sich in nicht markierter Fraktion

2.3 Molekularbiologische Arbeiten

2.3.1 Retransformation von *E. coli* und Gewinnung der Plasmid DNA

Die in dieser Arbeit durchgeführten molekularbiologischen Arbeiten erfolgten nach Standardprotokollen und sind daher nicht im Detail beschrieben.

Zur Vervielfältigung der benutzten Plasmide wurde der kompetente Bakterienstamm *Escherichia coli* (*E. coli*) TOP10 verwendet. Zuerst wurde die DNA durch Hitze-schocktransformation in die Bakterien eingebracht, die dann auf Luria Bertani (LB)-Platten angezogen und anschliessend in LB-Flüssigmedium unter Zusatz von 100 µg/mL Ampicillin vermehrt wurden. Für die Gewinnung der Plasmide aus den *E. coli* wurde der Endo Free Maxi Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet, um grosse Mengen an DNA zu erhalten.

2.3.2 Klonierung des CD25 IL-2 Fusionsprotein

Zielsetzung war die Klonierung eines membrangebundenen IL-2 Fusionsproteins. Um dies zu erreichen, wurde die α -Untereinheit des IL-2 Rezeptors (CD25) verwendet und an das humane IL-2 kloniert. Dazwischen setzten wir eine Peptidlinkersequenz, bestehend aus Glycin und Serin um eine maximale Flexibilität des IL-2 zu erreichen, so dass es in die Bindungstasche binden kann. Dies benötigte die Deletion des Stopcodon des CD25 und des Startcodons des IL-2. An das 5' Ende des CD25 fügten wir mit Hilfe des reversen Primers die halbe Sequenz des Peptidlinkers hinzu. Bei dem IL-2 Primer fügten wir am 5' Ende die halbe Sequenz des Peptidlinkers ein. Nach Amplifikation der Fragmente für CD25 und IL-2 erfolgte das Zusammenfügen über Restriktionsschnittstellen. Dies war uns möglich, da wir am Anfang des CD25 zwischen CD25 und IL-2 und am 3' Ende Restriktionsschnittstellen mittels Primer einfügten. Für dieses Konstrukt wurden zwei Selektionsmarker verwendet. Zum einen humanes IL-2, welches in einem murinen Model zur Unterscheidung dienen sollte. Zum anderen besass der retrovirale Expressionsvektor eine GFP Molekül.

IL-2 Forward primer: 5'ATGCAGGTACCATGTACAGGATGCAACTCCTG3'

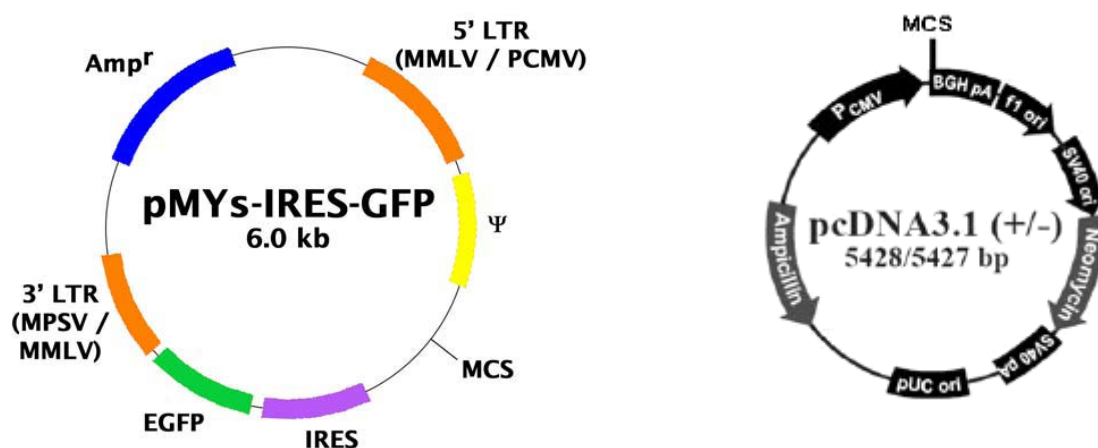
IL-2 backward primer:
5'ACCGGATCCCCCGCCACCAGAGCCACCGCCACCGAGAGTCAGTGTTGAGATG
ATGCTT3'

CD25 forward primer: 5'GGGGGATCCGGTGGCGGTGGC
GCTGCAGCCGAGCCACGCTTGCTGATGTT

CD25 backward primer: 5'CAATGAGAATTCTCATGAGAGGGAGCCTCTGG3'

Nach der Polymeraseketten-Reaktion und der Gel-Elution verwendeten wir den pcDNA3.1 cloning kit (Invitrogen™ life technologies). Beide Fragmente wurden aus dem pcDNA 3.1 ausgeschnitten und in den GFP tragenden Vector 101 kloniert. Danach wurde das Fusionsprotein über die Restriktionsschnittstellen Kpn1 und EcoR1 linearisiert. Im Anschluss wurde das Fusionsprotein in den retroviral Vektor PMY kloniert, welcher als Selektionsmarker ein IRES EGFP besitzt überführt.

2.3.3 Verwendete Vektoren



2.4 Mäusstämme

In den meisten Fällen wurden Wildtyp Mäuse der Inzuchtstämme Balb/c und CB17.SCID als Rezipienten verwendet.

Alle aufgeführten Mäusstämme wurden in der Versuchstierzucht des Bundesinstituts für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV) in Berlin Marienfelde unter spezifisch-pathogenfreien (SPF) Bedingungen gezüchtet. Es wurden männliche und weibliche Tiere im Alter zwischen 6-12 Wochen verwendet, wobei bei *in vivo* Transferexperimenten die Donor- und Rezipiententiere stets in Geschlecht und genetischen Hintergrund übereinstimmten, um eine Abstossungsreaktion zu vermeiden. Die Tötung erfolgte durch zervikale Dislokation.

2.5 Zellisolation und Aufreinigung

2.5.1 Gewinnung von Zellsuspensionen aus peripheren lymphatischen Organen

Den Mäusen wurden Milzen, Lymphknoten oder nur drainierende Lymphknoten (dLk) entnommen und zusammen oder getrennt durch ein Sieb passiert. Suspensionen mit Milzzellen wurden zusätzlich einer Erythrozyten-Lyse unterzogen (3 min auf Eis; 1 mL/Milz). Die Reaktion wurde mit PBS/BSA abgestoppt, die Zellen mit Puffer gewaschen und verbleibende Aggregate mit Hilfe eines Nylonsiebs (70 µm Porengröße) entfernt. Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Einzelzellsuspensionen konnten dann direkt für Färbungen verwendet werden oder standen für die Isolierung bestimmter Zellpopulationen zur Verfügung.

2.5.2 Gewinnung von Zellen aus dem Blut

Die Tiere wurden unter Rotlicht erwärmt und anschliessend in einer entsprechenden Haltevorrichtung untergebracht. Dann wurde ein Schnitt in die Schwanzvene durchgeführt und 5-8 Tropfen Blut entnommen. Wenn Zellen gewonnen werden sollten, wurde das Blut in RPMI-Medium mit Heparin (Gibco) aufgenommen, um die Gerinnung zu verhindern. Nach einem Waschschrift erfolgte die Erythrozyten-Lyse für 10 min auf Eis, woraufhin die Reaktion durch PBS/BSA Zugabe beendet wurde. Die Zellen wurden resuspendiert und konnten gefärbt werden.

2.5.3 Isolation von $CD4^+CD25^+$ T_{reg} und $CD25^-$ Zellen zur Analyse

Es wurden getrennte Zellsuspensionen aus Milzen und drainierenden Lymphknoten hergestellt, wobei die Organe mehrerer Tiere einer Gruppe gepoolt wurden. Anschliessend wurden die Zellsuspensionen für 10 min auf Eis mit einem $\alpha CD25$ -Biotin Antikörper gefärbt. Nach dem Waschen erfolgten die Zugabe von anti-Biotin-Microbeads zur magnetischen Markierung der $CD25$ positiven Zellen und eine Inkubationszeit von 15 min bei $8^\circ C$. Nach erneutem Waschen, Aufnahme der Zellen in PBS/BSA und deren Filtern („Pre-Separation Filter“, Miltenyi Biotec) wurden die magnetisch markierten Zellen über das AutoMACS™-System (Miltenyi Biotec) mit einer Reinheit von bis zu 97% isoliert. Die erhaltenen Positiv-Fractionen stellten dann die $CD4^+CD25^+$ T_{reg} und die Negativ-Fractionen die $CD4^+CD25^-$ T-Zellen dar. Diese Zellpopulationen wurden dann direkt gefärbt oder restimuliert.

2.5.4 Isolierung von T_{reg} und $CD4^+CD25^-$ T-Zellen für den Transfer

Es wurden Zellsuspensionen aus Milzen und Lymphknoten mehrerer Wildtyp Mäuse (antigen-unspezifische T-Zellen) oder TCR-transgener Tiere (antigen-spezifische T-Zellen) hergestellt. Zuerst erfolgte die Antikörper Färbung mit anti- $CD25$ -Bio und dann die Inkubation mit anti-Bio-Microbeads, um die $CD25^+$ Zellen magnetisch zu markieren. Die Aufreinigung wurde mit dem AutoMACS™ durchgeführt. Die Positiv-Fraktion war dann die $CD4^+CD25^+$ T_{reg} Population. Die Negativ-Fraktion wurde mit

α CD4-Microbeads inkubiert und die CD4⁺ Zellen ebenfalls mittels magnetischer Zellseparation isoliert, so dass eine Population von CD4⁺CD25⁻ T-Zellen erhalten wurde

2.5.5 Isolierung von Zellen für *in vitro* Kulturen

Hierfür wurden Balb/c Mäuse verwendet, deren Milzen und Lymphknoten zur Herstellung der Zellsuspensionen dienten. In diesem Fall wurde zur Aufreinigung der CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen anti CD25 Fab Fragment Biotin gekoppelt für 5 min auf Eis und im Anschluss mit einem α CD25-Bio Antikörper inkubiert. Nach der AutoMACS™ Sortierung befanden sich dann in der magnetisch markierten Fraktion die CD4⁺CD25⁺ T-Zellen in einer Reinheit von grösser 95%, welche im Anschluss in Kultur genommen worden sind. Die CD25 negativ Fraktion wurde im Anschluss für 20 min. bei 30 gy bestrahlt um sie im Anschluss für die Zellkultur als APC's zu verwenden.

2.6 Transfersystem

Für den *in vivo* Transfer wurden die verschiedensten Zellpopulationen verwendet (wt-T_{reg}, T_{reg} Funktionsprotein⁺, T_{reg} caSTAT5⁺, T_{reg} mIL-2⁺, T_{reg} GFP⁺). So weit nicht anders angegeben, wurden die zu transferierenden Zellen nach Aufreinigung in PBS gewaschen und in stets 1x10⁶ Zielzellen je 150 μ L PBS aufgenommen. Diese Zellen wurden dann nach Erwärmen der Rezipienten unter Rotlicht durch intravenöse Injektion in die Schwanzvene transferiert.

2.7 Zellkultur

Sämtliche Zellkultivierungen oder Stimulationen fanden in RPMI+ Medium (2.1) statt. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt kultiviert.

2.7.1 Restimulation von Zellen

2.7.1.1 Restimulation mit PMA/Ionomycin

Durch fünfstündige Restimulation der Zellen in RPMI+ Medium unter Zusatz von 5 nM Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) und 1 µg/mL Ionomycin (Sigma) kann das erworbene Zytokinprofil von Zellen abgerufen werden. Dabei führt das PMA zur Stimulation des TCR durch Aktivierung des Signaltransduktionsweges und das Ionomycin zur Calciumfreisetzung, wodurch alle T-Zellen aktiviert und zur Zytokinproduktion angeregt werden. Dies hätte die Sekretion der Zytokine zur Folge. Da jedoch intrazelluläre Färbungen durchgeführt werden sollten, wurde Brefeldin A (5 µg/mL) zum Restimulationsansatz hinzugefügt, wobei es sich um einen Sekretionsinhibitor handelt. Anschliessend wurden die Zellen gewaschen und fixiert.

2.7.2 Generierung des Virusüberstandes

HEK293T-Zellen wurden in einer Dichte von 5x10⁶/ml in 10 ml DMEM Medium mit 10% FCS in 10 cm Zellkulturschalen ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen nach der Ca₂PO₄-Methode transfiziert. Hierzu wurden in FACS-Röhrchen 5 µg des Pseudotyping- Plasmids, 10 µg des Verpackungsplasmids und 15 µg des retroviralen Expressionsplasmids mit 200 µl 1,25 M CaCl₂-Lösung und 750 µl Wasser vermischt. Alle Plasmide lagen in einer Konzentration von 0,5 mg/ml in Wasser vor. Unter ständigem Vortexen wurde tropfenweise 1 ml 2x HBS-Puffer zugegeben. Es wurde für einige Minuten bei RT inkubiert. Anschliessend wurde der Transfektionsansatz tropfenweise auf die Zellen gegeben. Nach 4 h wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen und mit neuem Medium versehen. Nach 48 h wurde der Virusüberstand abgenommen, filtriert (0,45 µm) und mit 10 mM HEPES gepuffert. Der so generierte Überstand kann bis zu einer Woche bei 4°C aufbewahrt werden.

2.7.3 Infektion der T-Zellen

Zwischen 24 h und 30 h nach der Stimulation wurden die T-Zell-Kulturen infiziert. Hierzu wurde der Kulturüberstand grösstenteils abgenommen und aufbewahrt. Dem Virusüberstand wurde Polybren (8 µg/ml) zugesetzt und der Überstand auf die Zellen gegeben (1,5 ml für 12 well; 1 ml für 24 well). Es folgte eine Zentrifugation bei 700x g für 75 min bei ca. 32°C. Anschliessend wurde der Virusüberstand abgenommen und durch den aufbewahrten Kulturüberstand ersetzt.

2.7.4 Fixierung von Zellen

Um die restimulierten Zellen zu fixieren, wurden sie zuerst in PBS gewaschen, um Fremdproteine zu entfernen. Anschliessend wurden die Zellen in 2%iger Formaldehydlösung für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert, mit PBA gewaschen und dann in diesem Puffer bei 8°C gelagert. Diese Proben wurden für intrazelluläre Färbungen verwendet.

2.8 FACS Analyse

Die Durchflusszytometrie erlaubt es, Zellen auf Einzelzellebene zu analysieren, die zuvor mit Fluorochrom-Antikörperkonjugaten markiert worden sind [96]. Hierbei werden die einzeln markierten Zellen nacheinander in einem hydrodynamisch fokussierten Flüssigkeitsstrom durch zwei Laserstrahlen, einen Argonlaser (488 nm) und einen Diodenlaser (635 nm) geführt. Dabei werden die Fluorochrome zur Emission von Fluoreszenzlicht angeregt und die Zellen streuen das auftreffende Licht. Die Streueigenschaften werden durch die Parameter FSC (Vorwärtsstreulicht) und SSC (Seitwärtsstreulicht) beschrieben. Das in einem geringen Winkel von 3°-10° gestreute Licht wird als Vorwärtsstreulicht bezeichnet, während das um 90° reflektierte Licht Seitwärtsstreulicht genannt wird. Das Vorwärtsstreulicht korreliert mit der Zellgrösse und das SSC stellt ein Mass für die Granularität der Zelle dar. Gleichzeitig wird parallel durch vier verschiedene Photodetektoren gemessen, ob die Zelle mit fluoreszenten Molekülen markiert ist und aufgrund der Anregung durch den Argon- bzw. Diodenlaser Licht emittiert. Die Detektoren messen das emittierte Licht unterschiedlicher Farbstoffe:

FL-1 (530 nm) FITC/CFSE

FL-2 (585 nm) PE/PI

FL-3 (670 nm) PerCP/PI

FL-4 (661 nm) APC/Cy5

Propidiumiodid (PI) wird verwendet, um tote und lebende Zellen voneinander zu unterscheiden. Hierbei färbt PI nur Zellen an, deren Membran permeabel geworden ist und das PI in den Kern eindringen konnte. Das Propidiumiodid wird sowohl in FL-2 als auch in FL-3 detektiert, so dass angefärbte Zellen als Diagonale erscheinen und damit leicht ausgeschlossen werden können. Bei der Messung wurden FSC- und SSC-Signale mit linearer und Fluoreszenzsignale mit logarithmischer Verstärkung aufgenommen. Durch das Setzen von Analysefenstern konnten die gewünschten Zellpopulationen analysiert werden. Die Messungen wurden am FACS Calibur (Becton Dickinson) oder am LSR-II (Becton Dickinson) durchgeführt und die Analyse der Daten erfolgte mit der FlowJo Software (Tree Star Inc. Ashland).

2.8.1 Oberflächenfärbung

Zum Färben von Oberflächenantigenen wurden die Zellen für 10 min auf Eis in PBS/BSA mit den entsprechenden Antikörperkonjugaten inkubiert. Anschliessend wurden die Zellen mit PBS/BSA gewaschen und in 300-600 μ L Puffer aufgenommen, um am FACS analysiert werden zu können. Kurz vor der Messung wurde PI hinzugegeben, um die lebenden von den toten Zellen unterscheiden zu können.

2.8.2 Intrazelluläre Färbung

Die Färbung von intrazellulären Molekülen erfordert die Permeabilisierung der Zellmembranen

mit dem Detergenz Saponin, damit der Antikörper in die Zelle gelangen

kann. Somit wurden die restimulierten und fixierten Zellen mit Saponinpuffer gewaschen

und anschliessend mit der Antikörper-Saponinlösung für 20 min bei RT inkubiert.

Dann folgte ein erneuter Waschschrift mit dem Saponinpuffer, woraufhin die

Zellen in 300-700 μ L PBA aufgenommen wurden und für die FACS Analyse zur

Verfügung standen. Dabei ist zu beachten, dass in diesem Fall die Zelltrümmer nur durch das Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht ausgeschlossen werden konnten.

2.8.3 FOXP3 Färbung

Für die Analyse des Transkriptionsfaktors FOXP3 wurde ein spezielles Färbeprotokoll der Firma eBioscience verwendet. Hierbei wurden die Zellen bei 8°C für 3-18 h in einem speziellen Fix/Permpuffer fixiert, dann mehrmals gewaschen (PBS und Permpuffer) und im Permpuffer mit den entsprechenden Antikörperkonjugaten (inkl. FOXP3 Antikörper) für 30 min auf Eis gefärbt. Nach nochmaligem Waschen wurden die Zellen in 300-500 µL PBS/BSA aufgenommen und am FACS analysiert.

2.14 Statistische Auswertung

Zur Bestimmung der Signifikanzen wurde der zweiseitige ungepaarte Student's *t*-Test verwendet, wobei die Berechnung mittels Excel (Microsoft) erfolgte. Werte mit $P < 0,05$ wurden als signifikant betrachtet.

3. Ergebnisse

3.1 Nachweis der biologischen Aktivität der verwendeten Konstrukte

in vitro

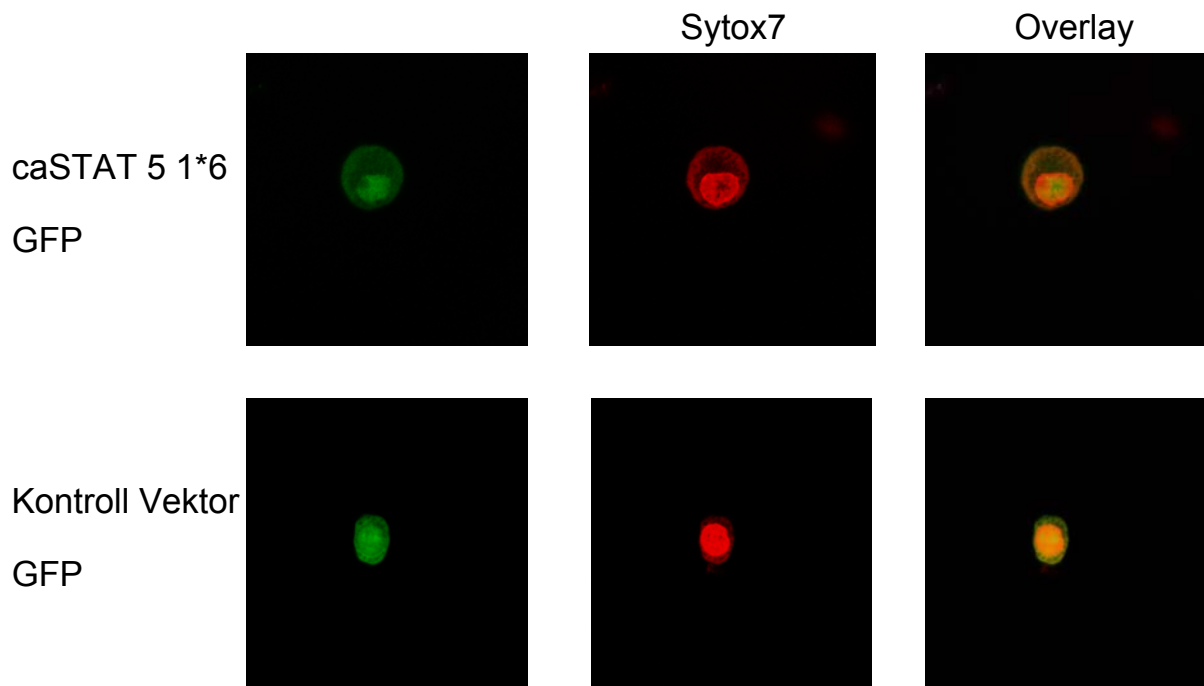
3.1.1 caSTAT5 1*6 und seine biologische Funktionalität

caSTAT5 1*6 wurde initial an murinen IL-3 abhängigen Zellen (Ba/F3) beschrieben, wo es die Proliferation nach Transfektion steigerte. STAT5 ist ein dem IL-2 Rezeptor nachgeschaltetes Moleküle, dass nach seiner Aktivierung in den Nukleus transloziert und dort Gene des Zellzyklus reguliert. Da T_{reg} IL-2 als einen wichtigen Wachstumsfaktor benötigen, haben wir versucht den Zellen durch die retrovirale Transfektion mit caSTAT5 1*6 einen Selektionsvorteil zu verschaffen. In diesem experimentellen Ansatz ging es darum diesen Transkriptionsfaktor auf seine Funktion in murinen T-Zellen zu testen. Zu diesem Zweck haben wir T_{reg} mit dem caSTAT5 1*6 GFP transfiziert und mithilfe Laserscanning Mikroskopie untersucht, ob er in der Lage ist in den Zellkern zu translozieren. Zusätzlich galt es zu untersuchen, ob diese Mutante in der Lage ist in humanen CD4⁺ Zellen STAT5 typische Gene hoch zu regulieren. Zu diesem Zweck analysierten wir durchflusszytometrisch die CD25 Präsentation auf der Oberfläche der transfizierten Zellen.

3.1.1.1 Laserscanning Mikroskopie von caSTAT5 1*6

Um die biologische Aktivität der verwendeten Moleküle zu testen, wählten wir unterschiedliche Ansätze. Wir transfizierten T_{reg} mit caSTAT5 1*6 und führten im Anschluss eine konfokale Lasermikroskopie durch. Dabei verwendeten wir Sytox7 als DNA Farbstoff. Hierbei zeigte sich das caSTAT5 1*6 in den Nukleus transloziert. Es zeigte sich in den mit caSTAT5 1*6 transfizierten Zellen eine Interaktion mit GFP und Sytox7. Der GFP Kontrollvektor zeigte keine Translokation des GFP in den Nukleus. Das GFP war in den Kontrollzellen zytosolisch lokalisiert.

Fig. 2

Fig. 2 Funktion von caSTAT5 auf T_{reg}

(A) caSTAT5 1*6 GFP und ein Kontrollvektor mit einem GFP in T_{reg}. Zu sehen sind die GFP transfizierten T_{reg} Zellen. Im grünen Fluoreszenzkanal zeigt sich das GFP. Im roten Fluoreszenzkanal gibt der DNA Farbstoff Sytox7 ein Signal. Im Overlay zeigt sich die zelluläre Lokalisation der GFP Moleküle.

3.1.1.2 CD25 Präsentation von caSTAT5 1*6 in transfizierten naiven T-Zellen

Im Anschluss an die Untersuchung bezüglich der Translokationsfähigkeit des caSTAT5 1*6 war es nötig zu testen, ob caSTAT5 1*6 auch zur Regulation von einem klassischen STAT5 Ziel Gen führt. Hierfür erfolgte die Färbung von CD25 auf den transfizierten T_{reg}. Es ist schon länger beschrieben, dass STAT5 nach Aktivierung zu einer vermehrten Synthese der α -Untereinheit des IL-2 Rezeptors (CD25) führt. Die mit dem caSTAT5 1*6 transfizierten naiven CD4⁺ T-Zellen zeigten bezüglich der CD25 Oberflächenpräsentation nach 3 Tagen in Zellkultur einen

deutlich höheren GEO Mean von 941 im Vergleich zu einem Geo Mean von 557,2 bei den CD4⁺ Zellen, die mit dem Kontrollvektor transfiziert waren.

Analoge Ergebnisse zeigten sich bei naiven CD4⁺ Zellen nach 8 Tagen in Kultur, die mit dem caSTAT5 1*6 und dem Kontrollvektor transfiziert wurden. Die Transfektion mit caSTAT5 1*6 führte zu einem Geo Mean von 88,3 in Kontrast zu 7,5 bei den kontroll-transfizierten CD4⁺ Zellen. Zusätzlich zeigten die Zellen, die mit dem caSTAT5 1*6 transfiziert waren, einen blastischen Phänotyp.

Fig. 3

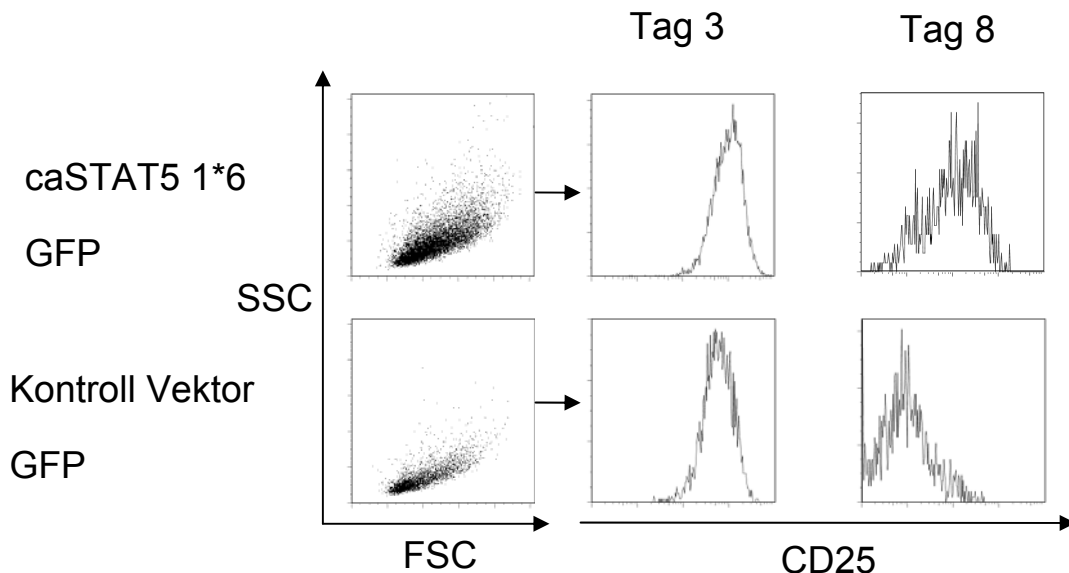


Fig. (3) Durchflusszytometrische Darstellung der Zellgrösse und Zellgranularität als auch der CD25 Oberflächenpräsentation nach Transfektion von naiven CD4⁺ T-Zellen mit caSTAT5 1*6 und dem Kontrollvektor. Die Oberflächenpräsentation der CD25 Moleküle ist über die Zeit (Tag 3 und Tag 8) in einem Fluoreszenz Histogramm wiedergegeben.

3.1.2 Präsentation des CD25 IL-2 Fusionskonstrukt auf HEK 293 Zellen

Im nächsten Schritt testeten wir, ob das von uns generierte Fusionsprotein an die Plasmamembran transportiert wird und das huIL-2 des Konstrukts an dem Rezeptor gebunden bleibt und durch eine Oberflächenfärbung nachweisbar ist. Zu diesem Ziel transfizierten wir HEK293 Zellen mit dem Fusionsprotein und führten im Anschluss eine durchflusszytometrische Darstellung der Zellen durch. Hierfür wurden die Zellen mit CD25 und IL-2 Antikörpern markiert. Es konnten IL-2 und CD25 gemeinsam auf der Oberfläche der HEK293 Zellen mit Hilfe der FACS Analyse bestimmt werden.

Fig 4.

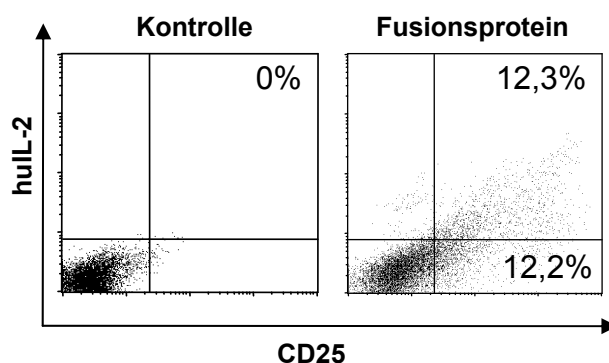


Fig. (4) Transfektion von HEK293 Zellen mit dem Kontrollvektor und dem IL-2 Fusionsprotein. Es erfolgte eine einfache Oberflächenfärbung von humanem IL-2 und murinem CD25.

3.1.3 Biologische Aktivität der Konstrukte *in vitro*

IL-2 ist für viele unterschiedliche Zellen ein starkes Proliferationssignal. Um diese Tatsache für unsere Konstrukte zu zeigen und somit deren biologische Funktionalität zu überprüfen, transfizierten wir IL-2 abhängige murine CTLL-2 Zellen mit unseren Konstrukten. Der Experimentelle Ansatz zielte nicht nur darauf ab zu zeigen, dass

die unterschiedlichen Konstrukte biologisch aktiv sind, sondern es sollte auch die Frage beantwortet werden, ob die Zellen, die mit diesen Konstrukten transfiziert wurden einen biologischen Selektionsvorteil bezüglich dem Überleben und der Proliferation erhalten. Hierzu wurden die Zellen mit den unterschiedlichen Konstrukten retroviral transfiziert und anschliessend ohne externe Gabe von IL-2 kultiviert und nach einer Woche, bei Farbumschlag des Mediums, passagiert. Die Zellen wurden zu Beginn des Experimentes und nach 10 Wochen bezüglich des Anteils der GFP positiven Zellen (positiv transfizierten Zellen) analysiert.

3.1.3.1 Überprüfung der biologischen Aktivität der Konstrukte *in vitro* an transfizierten CTLL-2 Zellen

Zur Testung der biologischen Aktivität verwendeten wir IL-2 abhängige CTLL-2 Zellen und transfizierten diese mit mIL-2 und unserem Fusionskonstrukt. Die Zielsetzung in diesem Experiment bestand darin, bei dem Fusionsprotein einen deutlichen autokrinen Effekt im Gegensatz zu dem erwarteten parakrinen Effekt des murinen löslichen IL-2 nachzuweisen. Nach retroviraler Transfektion zeigten sich initial gleiche Transfektionsraten von mIL-2 und dem Fusionsprotein (Fig. 5 1. Passage). Nach 10 Wochen in Kultur zeigte sich ein signifikanter Rückgang der GFP⁺ Zellen in der mit mIL-2 transfizierten Kultur (Fig. 5 10. Passage). Im Gegensatz hierzu waren in der Kultur mit unserem Fusionskonstrukt über 90% der Zellen GFP⁺. In einem weiteren Ansatz führten wir über 10 Wochen zu der Kultur mit unserem Fusionsprotein exogenes murines IL-2 hinzu. Es zeigte sich, dass der Selektionsvorteil durch das exogen zugeführte IL-2 unterdrückbar war.

Fig 5.

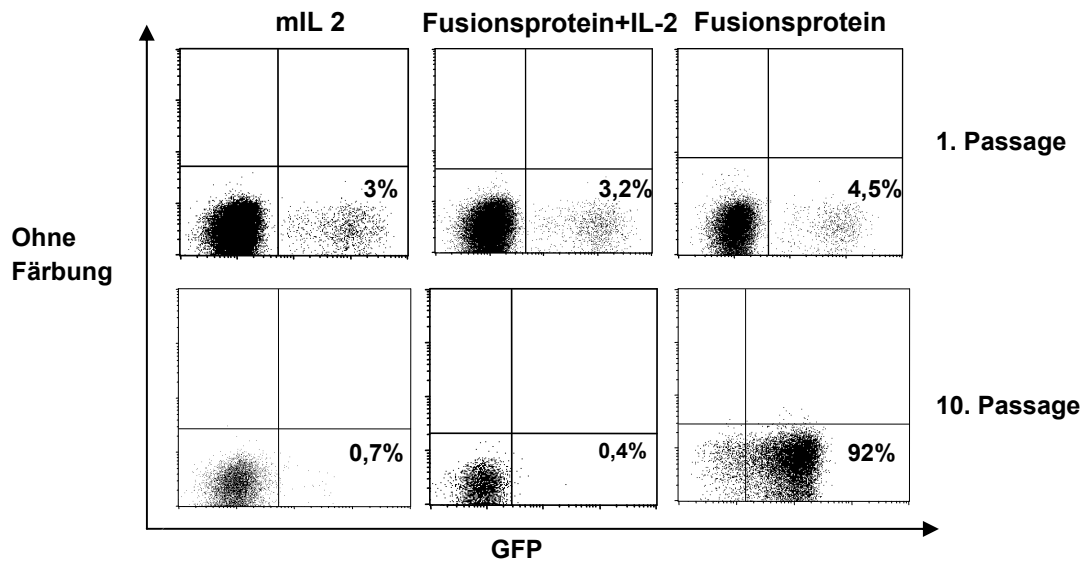


Fig. (5) Testung der Konstrukte an CTLL-2 Zellen bezüglich eines Selektionsvorteiles *in vitro*. Die Zellen wurden mit GFP Kontrollvektor, caSTAT5 1*6, murinem IL-2 und IL-2 Fusionsprotein transfiziert. Der Kontrollvektor und caSTAT5 1*6 sind hier nicht dargestellt. mIL-2 und das Fusionsprotein wurden in Kultur über mehrere Wochen kultiviert. Jede Woche erfolgte eine Passage. Eine weitere Kontrollgruppe war das IL-2 Fusionsprotein mit externem IL-2.

3.2 Einfluss der Proliferation von T_{reg} *in vivo* durch retrovirale Transfektion mit IL-2 Signaltransduktions aktivierenden Konstrukten

3.2.1 Einfluss der Konstrukte auf T_{reg} in immundefizienten Mäusen

In den vorangegangenen Experimenten konnten wir zeigen, dass sowohl das caSTAT5 1*6 als auch das Fusionsprotein und das murine IL-2 biologische Aktivität besitzen. Desweiteren konnten wir nachweisen, dass das Fusionsprotein einen starken autokrinen Effekt *in vitro* besitzt. *In vivo* stellt sich eine komplett andere Situation als *in vitro* dar. *In vivo* findet sich eine Kompartimentierung in lymphatische Organe, so dass es dazu kommt das die Zellen sich nicht frei in der Zirkulation befinden. Desweiteren finden sich weitere Komponenten wie z.B. Hepatozyten und

Makrophagen, die zu einer Reduktion der IL-2 Konzentration führen können. So liegt die Halbwertszeit bei IL-2 *in vivo* bei nur 30 min. In den seltensten Fällen lassen sich *in vitro* Ergebnisse in ein *in vivo* Modell übertragen, daher war es nötig dies zu überprüfen. Es wurde initial eine lymphopenische Maus gewählt, da GFP eine immunogene Komponente besitzt. Die Zellen wurden bezüglich des Prozentsatzes an GFP positiven Zellen sowie der gesamten Zellzahl analysiert. Desweiteren wurden der FOXP3 Anteil in den einzelnen Gruppen bestimmt.

3.2.1.1 Proliferation der transfizierten T_{reg} nach Transfer in SCID Mäuse

Um nun den Einfluss von murinem IL-2, dem konstitutiv aktivem STAT5 und unserem Fusionsprotein an T_{reg} zu untersuchen, wurden naive T_{reg} aus Balb/C Mäusen isoliert und mit den unterschiedlichen Konstrukten transfizierten, nach einigen Tagen Expansion in der Zellkultur transferierten wir die Zellen in immundefizienten (SCID) Mäusen. Bei den transferierten Zellen handelte es sich um eine Mischung aus transfizierten GFP⁺ T-Zellen und untransfizierten T-Zellen, wobei der Hauptanteil der Zellen (CD25 MACS sortiert) regulatorische T-Zellen waren. Um den Einfluss dieser Moleküle auf die transferierten Zellpopulationen zu untersuchen, erfolgte die Analyse der Zellen an Tag 10 und an Tag 21 (Fig. 6a und b). Es zeigte sich, dass caSTAT5 1*6 und mIL-2 sich bezüglich des Anteils an GFP⁺ Zellen im Verlauf kaum von denen des Kontrollvektors unterschieden (Fig 6a). Dies zeigte sich sowohl im Prozentsatz der GFP⁺ Zellen (Fig. 6a) als auch in den absoluten Zellzahlen (Fig. 6b) für GFP positive Zellen. Interessanterweise war der Aktivierungsstatus, der mit mIL-2 transfizierten Zellen geringer, als der Zellen, die mit caSTAT5 1*6 transfiziert waren (Fig. 5a). Dies zeigt sich durch die verminderte Expression von CD25 auf dem mit mIL-2 transfizierten Zellen.

Das Fusionsprotein war das einzige Molekül, was in der Lage war selektiv die mit ihm transfizierten Zellen zur Expansion *in vivo* anzuregen. Das Fusionsprotein führte zu einem deutlichen Anstieg der GFP⁺ Zellen, sowohl in Prozentzahlen als auch in absoluten Zellzahlen (Fig. 6a,b).

Fig 6a,b

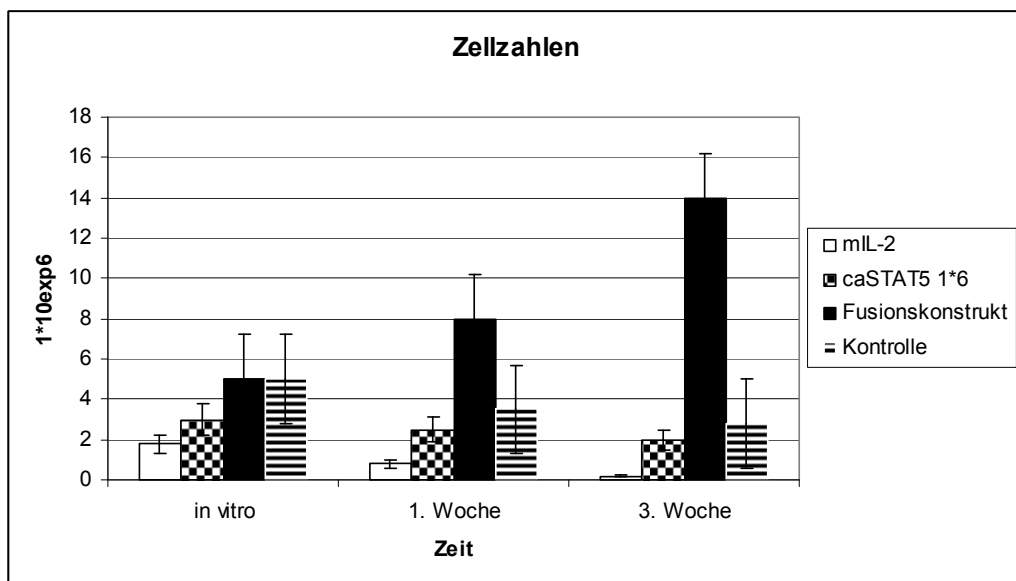
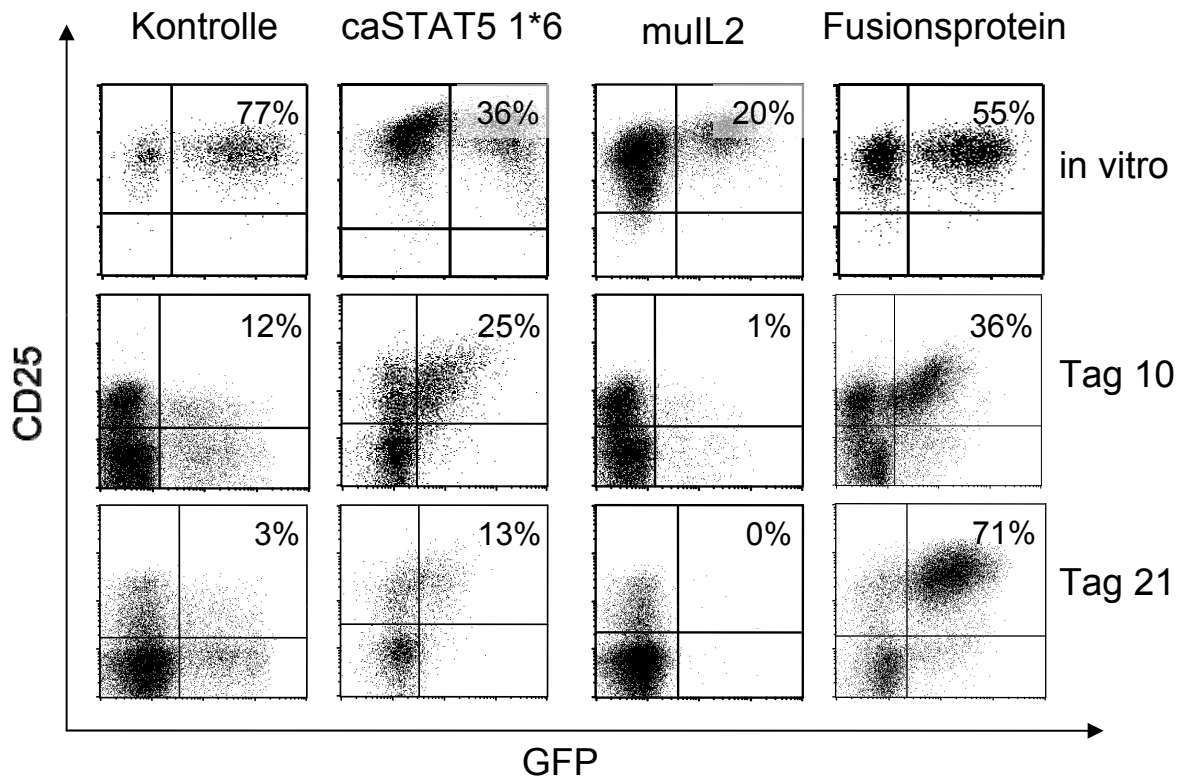


Fig. 5(A) Das Fusionsprotein stimuliert selektiv die Proliferation von T_{reg} *in vivo*.

Regulatorische T-Zellen wurden mit einem GFP Kontrollvektor, einem murinem IL-2, unserem IL-2 Fusionsprotein und caSTAT5 retroviral transfiziert. Im Anschluss wurden die Zellen in SCID Mäuse i.v. injiziert. Der Anteil an GFP⁺ Zellen wurde vor dem i.v. Transfer, nach 10 Tagen und nach 21 Tagen bestimmt.

(B) Darstellung der absoluten Zellzahlen (GFP⁺ Zellen). Aufgetragen sind die Absolutzellzahlen in Million zu den unterschiedlichen Analyse Zeitpunkten. Auch hier wurden die Zeitpunkte *in vitro* vor dem Transfer, nach Tag 10 und Tag 21 dargestellt.

3.2.1.2 FOXP3 Analyse von ex vivo isolierten T_{reg} aus SCID Mäusen

Aus den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass das Fusionsprotein einen autokrinen Effekt besitzt und die Proliferation der mit ihm transfizierten Zellen selektiv stimulieren kann. Um zu zeigen, dass es sich bei den Zellen die aus den SCID Mäusen isoliert wurden auch um T_{reg} handelt, wurde eine FOXP3 Färbung der Zellen durchgeführt.

Es zeigte sich, dass fast alle isolierten CD4⁺ Zellen aus den SCID Mäusen, welche mit dem Fusionskonstrukt transfiziert waren, FOXP3⁺ waren (Fig. 7). Im Gegensatz zu den anderen Ansätzen mit mIL-2 und caSTAT51*6 waren deren Ergebnisse mit denen des Kontrollvektors vergleichbar. In diesen Gruppen war eine signifikante Reduktion aller FOXP3⁺ Zellen im Vergleich zum Ausgangswert zu verzeichnen (Fig. 7).

Fig.7

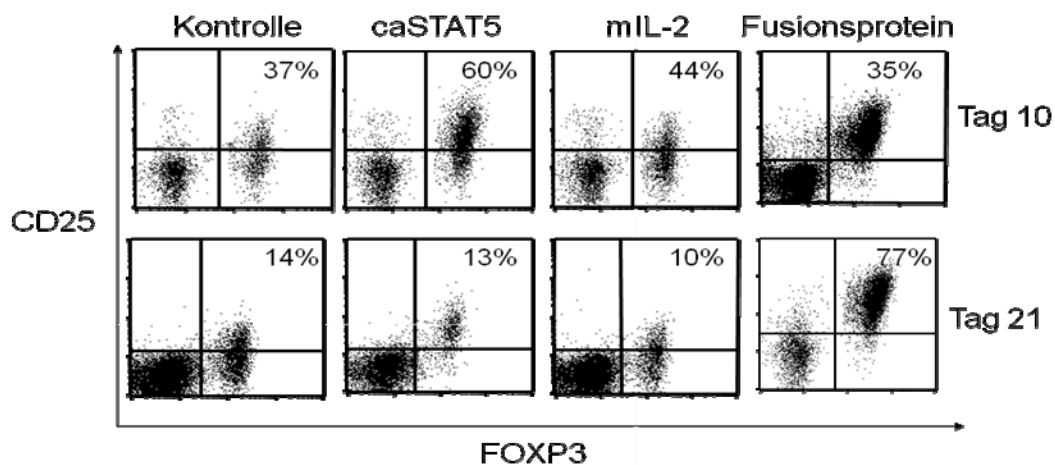


Fig. (7) Expansion von FOXP3 positiven Zellen *in vivo* durch das Fusionsprotein.

Um nachzuweisen, dass es sich bei den transferierten Zellen um regulatorische T-Zellen handelt, wurde eine FOXP3 Färbung durchgeführt. Gegen FOXP3 wurde CD25 dargestellt. Dabei wurden die Veränderungen der Prozentwerte mit der Zeit *in vivo* betrachtet.

3.2.1.3 IL-10 Produktion der transfizierten T_{reg} nach SCID Transfer

Um die IL-10 Sekretionskapazität der transfizierten T_{reg} nach dem *in vivo* Transfer zu untersuchen, wurden die Zellen mit PMA/Ionomycin stimuliert. Hierbei zeigte sich, dass nur die T_{reg} , die mit dem Fusionskonstrukt transfiziert waren, einen höheren Anteil an IL-10 Produzenten aufwiesen. caSTAT5 1*6 und das murine lösliche IL-2 konnten zu keiner deutlichen Steigerung der IL-10 Sekretion in murenen T_{reg} im Vergleich zum Kontrollvektor führen.

Fig.8

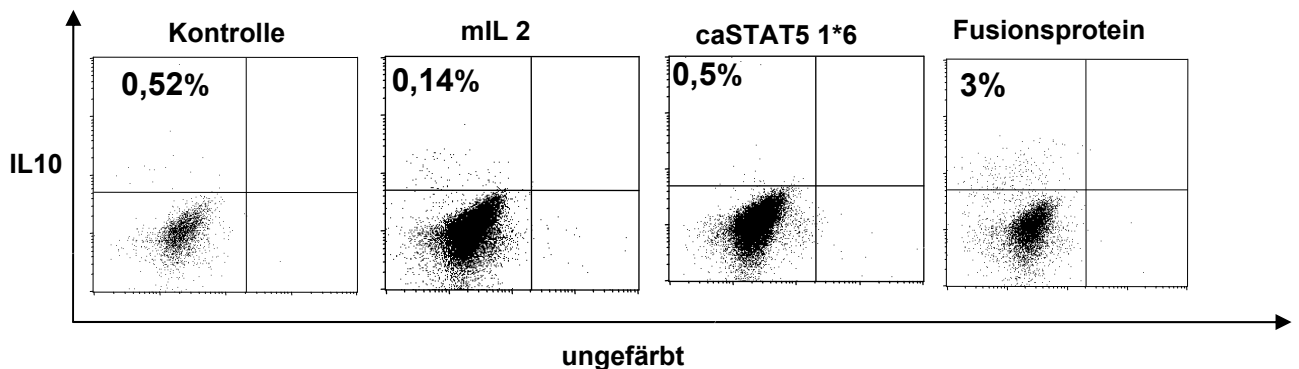


Fig. (8)

Reanalyse der in SCID transferierten T_{reg} nach 3 Wochen. Stimulation mit PMA/Ionomycin und Nachweis von IL-10 produzierenden Zellen.

3.3 Retroviral transfizierte T_{reg} in immunkompetenten Balb/c Mäusen

3.3.1 Transfizierte T_{reg} in immunkompetenten Tieren

Um zu überprüfen ob die Ergebnisse, die sich signifikant bei dem Fusionsprotein zeigten auch auf ein Modell mit immunkompetenten Mäusen übertragen lassen, transfizierten wir erneut ex vivo isolierte T_{reg} aus Balb/C Tieren. Wir transfizierten die T_{reg} und die Zellen in Balb/c Mäuse. In diesem Experiment ging es darum zu zeigen, dass die T_{reg} mit den transfizierten Konstrukten einen Selektionsvorteil gegenüber endogenen T_{reg} besitzen.

3.3.2 Kein Selektionsvorteil der Konstrukte bei T_{reg} in immunkompetenten Tieren

Ein weiterer Ansatz war, zu sehen, ob T_{reg} transfiziert mit dem von uns neu generierten Fusionsprotein, den Zellen auch in nicht lymphopenischen Tieren einen Selektionsvorteil verschaffen. Auch hier wurden die Zellen wieder mit allen 4 Konstrukten transfiziert. In den Balb/C Mäusen erfolgte eine deutliche Reduktion aller GFP positiven Zellen nach einer Woche. Nach zwei Wochen waren die Zellen nicht mehr nachweisbar.

Fig. 9

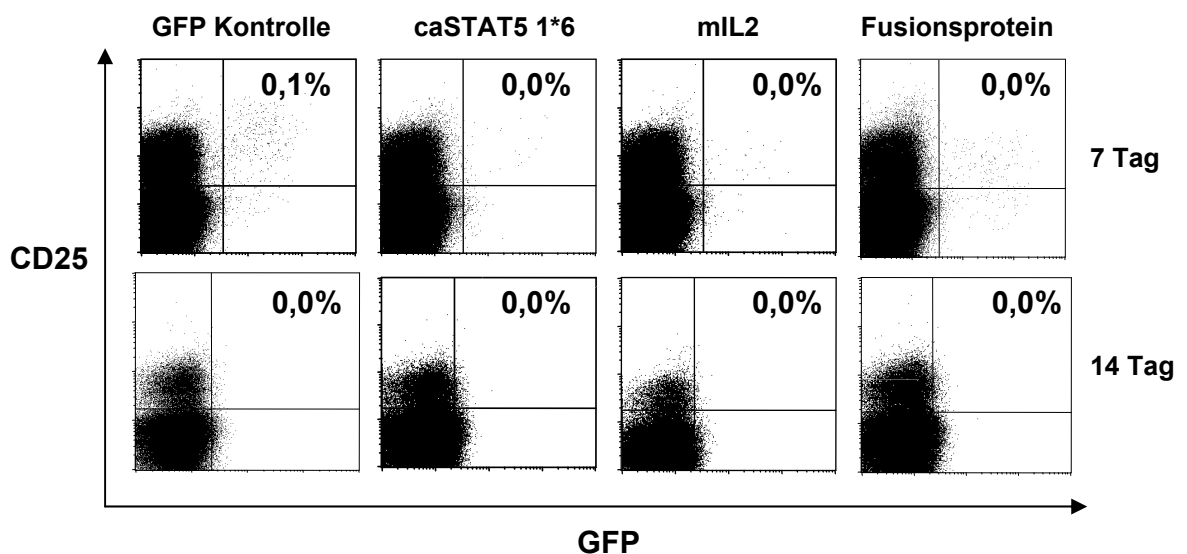


Fig. (9) Regulatorische T-Zellen aus Balb/C Mäusen wurden isoliert und mit den unterschiedlichen Konstrukten transfiziert und in Balb/C Mäuse transferiert. Da es sich bei den transferierten Zellen um GFP⁺ Zellen handelt und damit die Gefahr einer Rejektion erhöht ist, wurden die Zeitintervalle für die Analyse kürzer gewählt.

3.4 Zusammenfassung

In dem ersten Teil der Experimente ging es darum die Funktionalität der Konstrukte zu testen. Das caSTAT51*6 war in der Lage in murinen T_{reg} in den Zellkern zu translozieren und führte in den transfizierten Zellen zu einer vermehrten Präsentation von CD25 auf der Oberfläche dieser Zellen. CD25 ist ein typisches Zielgen für STAT5. Im Anschluss testeten wir das von uns neu generierte Fusionsprotein, bestehend aus humanen IL-2 gebunden an murines CD25. In HEK 293 Zellen führte eine Transfektion mit dem Konstrukt zu einer Präsentation von CD25 und humanem IL-2 auf der Oberfläche dieser Zellen. Um zu zeigen, dass auch das Fusionsprotein eine biologische Aktivität besitzt transfizierten wir IL-2 abhängige CTLL-2 Zellen mit murinem IL-2 (nicht membrangebunden) und unserem Fusionsprotein. Es zeigte sich, dass beide Konstrukte in der Lage waren die Zellen zur Proliferation zu bringen. Nur das Fusionsprotein zeigte aber einen zusätzlichen autokrinen Effekt, so dass die Zellen selektioniert wurden, die mit dem Fusionsprotein transfiziert waren. Dieser Effekt liess sich mit extern hinzugefügten IL-2 unterdrücken.

In einem nächsten Schritt wurden ex vivo isolierte T_{reg} mit mIL-2, caSTAT5 1*6 und dem Fusionsprotein transfiziert und i.v. in SCID Mäuse injiziert. Hierbei zeigte sich, dass allein das Fusionsprotein die Proliferation der T_{reg} in lymphopenischen Mäusen fördert. Die aus den Tieren isolierten Zellen waren zum grössten Teil FOXP3 positiv. Zusätzlich zeigte sich ein leichter Anstieg in der Zahl der IL-10 produzierenden T_{reg}.

4 Diskussion

4.1 Bedeutung des caSTAT5 1*6 für mature T_{reg}

4.1.1 *In vitro* Untersuchung von caSTAT5 1*6 in T_{reg}

Mit dem retroviralen caSTAT5 1*6 GFP (Fig. 1a) Vektor wurden HEK 293 Zellen transient transfiziert um im Anschluss eine konfokale Laserscanning Mikroskopie durchzuführen (Fig.2). Hierbei zeigte sich eine Translokation von caSTAT5 1*6 GFP in den Zellkern sowie eine Interaktion mit der DNA [97]. Die DNA war mit SYTOX 7 markiert. Das war der Beweis dafür, dass die Mutation in der Translokationsdomäne ohne externes IL-2 Signal dazu führt, dass das caSTAT5 1*6 aus dem Zytosol in den Zellkern transloziert. Um zu überprüfen, ob es durch das caSTAT5 1*6 zu einer vermehrten Regulation von typischen STAT5 Zielgenen kommt, wurden ex vivo isolierte naiven T-Zellen mit einem GFP Kontrollvektor und caSTAT5 1*6 transfiziert (Fig. 3). Als klassisches STAT5 Zielgen, erfolgte die Analyse der Oberflächenpräsentation von CD25 bei naiven CD4⁺ Zellen. Es zeigte sich nach 8 Tagen ohne IL-2 eine deutliche Abnahme der CD25 Präsentation in den GFP⁺ Kontroll-Zellen (Geo Mean 7,5). Bei den T-Zellen, die mit dem caSTAT5 1*6 transfiziert waren, lag nach 8 Tagen der Geo Mean bezüglich der CD25 Oberflächenpräsentation bei 88,3.

Zwar ist auch bei den Zellen, die mit dem caSTAT5 1*6 transfiziert waren eine Reduktion im Geo Mean zu verzeichnen, doch bezüglich des CD25 Geo Mean liegt der Wert für die caSTAT5 1*6 transfizierten Zellen noch immer höher als bei den Zellen, die mit den Kontrollvektor transfiziert worden sind.

Das ist vermutlich mit der initial starken Proliferation der Zellen und den sich daraus verschlechternden Kulturbedingungen zu erklären.

Desweiteren hatten die mit dem konstitutiv aktiven STAT5 transfizierten Zellen bezüglich der Zellgrösse ein blastisches Erscheinungsbild im Gegensatz zu den Kontroll-Zellen.

Somit kann man davon ausgehen, dass das caSTAT5 1*6 ohne externes IL-2 Signal in den Zellkern transloziert und dort zur Transkription seiner Zielgene führt. Das von uns verwendete STAT5 wurde initial an Ba/F3 Zellen beschrieben. caSTAT5 1*6 ist in der Lage die IL-3 Abhängigkeit dieser Zellen aufzuheben. Wir konnten hier zeigen, dass es auch an STAT5 typische Zielgene in T_{reg} bindet und so zu deren Hochregulation führt. Es konnte auch gezeigt werden, dass caSTAT5 1*6 hinsichtlich der Genese des T_{reg} Pools von entscheidender Bedeutung ist [60]. Mäuse, deren T_{reg} caSTAT5 1*6 konstitutiv exprimieren, zeigen einen deutlich höheren Anteil an T_{reg} als Wildtypiere. Unser Ziel war es mature T_{reg} mit dem caSTAT5 1*6 zu transfizieren und das proliferative Verhalten der T_{reg} in lymphopenischen Mäusen zu untersuchen.

4.1.2 caSTAT5 1*6 hat keinen Einfluss auf die Expansion von Zellen *in vitro* und *in vivo*

Ein wichtiges Ziel war es zu untersuchen, welchen Einfluss caSTAT5 1*6 auf die Expansion von Zellen besitzt. Hierzu untersuchten wir zum einen den Einfluss von STAT5 auf CTLL-2 Zellen. Zur Überprüfung der Funktionalität von STAT5 *in vivo* an T_{reg}, transfizierten wir die T_{reg} und injizierten die Zellen in SCID Mäuse.

Es war schon vorher beschrieben worden, dass STAT5 alleine CTLL-2 Zellen nicht IL-2 unabhängig machen kann [98]. In unseren Experimenten konnten wir diese Daten bestätigen (die Daten sind hier nicht gezeigt). Ein weiterer Ansatz bestand darin zu untersuchen, wie sich caSTAT5 1*6 in einem *in vivo* Modell bezüglich der T_{reg} verhält. Im Gegensatz zu den anderen von uns verwendeten Konstrukten ist bei diesem experimentellen Ansatz eine parakrine Wirkung auf anderen Zellen ausgeschlossen, da es sich hier um ein intrazelluläres Molekül handelt, welches ausschliesslich auf die Zellen wirkt, mit denen es transfiziert ist. In den Figuren 6 a, b ist deutlich zu erkennen, dass der Anteil der caSTAT5 1*6 transfizierten Zellen im zeitlichen Verlauf prozentual, aber auch in der Gesamtzellzahl deutlich abnimmt.

Das caSTAT5 1*6 war weder in der Lage die mit ihm transfizierten T_{reg} zur Proliferation anzuregen, noch diesen Zellen einen Selektionsvorteil hinsichtlich des

Überlebens zu verschaffen. Im Verlauf zeigte sich eine deutliche Abnahme der GFP⁺ Zellen sowohl prozentual als auch in der Gesamtzellzahl (Fig. 6b). Bezüglich des caSTAT5 konnte gezeigt werden, dass in transgenen caSTAT5 Mäusen der Anteil an T_{reg} deutlich höher ist als in Wildtyp Mäusen [60]. Da es sich bei unserem Modell um einen gänzlich anderen Ansatz handelt, sind diese Daten nicht zwangsläufig gegensätzlich. In diesem Modell wurden T_{reg} verwendet, die ihre Maturation im Thymus schon vollzogen haben und zusätzlich noch eine starke TCR Stimulation *in vitro* erfahren haben, während in einem transgenen Modell auch Früh-Formen von T_{reg} das caSTAT5 Signal sehen und das vermutlich die Ursache dafür ist, dass in den transgenen Tieren der Anteil an T_{reg} höher ist [99, 100].

Im Gegensatz zu der bisher in der Literatur beschriebenen Bedeutung von STAT5 für T_{reg} ist für mature T_{reg} ein vollständiges IL-2 Signal nötig, welches zumindest nicht von STAT5 substituiert werden kann. Die Signaltransduktionskaskade, die durch Interleukin 2 aktiviert wird, beinhaltet nicht nur das Signal über STAT5, welches durch die Januskinase 1 und 3 phosphoryliert und aktiviert wird, sondern es werden zusätzlich noch der MAP-Kinase-Weg sowie der Signaltransduktionsweg über die Phosphoinositolkaskade aktiviert. Diese Wege sind starke proliferative Signale. Sie fungieren auf unterschiedlichen Ebenen. STAT5 als auch der MAP-Kinase-Weg führen zu einer veränderten Transkription und zu einer verstärkten Expression an Genen, die für die Zellteilung nötig sind wie z.B. bcl-2 und c-fos. Durch die Bindung von IL-2 kommt es zur Phosphorylierung der Phosphoinositid-3-Kinase, die wiederum Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat an der Position 3 phosphoryliert. Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP3) wirkt als second messenger und es kommt zur Rekrutierung der Proteinkinase B (AKT). Durch Phosphorylierung des Tuberos Sclerosis Complex (TSC) durch AKT, wird die inhibierend Wirkung von TCS auf mTor aufgehoben. Durch mTor kommt es zu einer Initiation der Translation. Diese weiteren durch IL-2 aktivierten Signale sind wahrscheinlich unerlässlich für eine Expansion der T_{reg}. Inwieweit die Suppressivität der T_{reg} durch das caSTAT5 1*6 beeinflusst wird, konnte hier nicht abschliessend geklärt werden. Bezüglich der IL-10 Sekretion gibt es keinen wesentlichen Unterschied zu den Zellen, die mit dem Kontrollvektor transfiziert wurden. Es gibt aber Hinweise, dass IL-2 für die Synthese von IL-10 in T_{reg} verantwortlich ist [71]. Ausserdem konnte gezeigt werden, dass STAT5 an den IL-10 Promoter bindet [101]. Wir konnten hier aber nicht nachweisen,

dass das von uns verwendete caSTAT5 1*6 signifikant die Synthese von IL-10 beeinflusst.

4.2 Einfluss von IL-2 auf regulatorische T-Zellen

Ziel dieser Arbeit war es die Proliferation und die Suppressivität der T_{reg} durch autokrine IL-2 Stimulation zu steigern. Da T_{reg} nicht in der Lage sind IL-2 zu synthetisieren, war es unser Ziel die T_{reg} in die Lage zu bringen, IL-2 zu synthetisieren und so die eigene Proliferation als auch die Suppressivität zu steigern. Hierzu wurde das konstitutive aktive STAT5, das murine IL-2 und ein von uns generiertes Fusionsprotein bestehend aus CD25 und humanem IL-2 verwendet. An diesen genetisch veränderten Zellen untersuchten wir den Phänotyp.

4.2.1 Das membrangebundene Fusionsprotein und nicht das lösliche IL-2 führt zu einem Selektionsvorteil *in vitro*

Im nächsten Schritt ging es darum das murine IL-2 und das Fusionsprotein (Fig. 1b) bezüglich der Expansion von IL-2 abhängigen Zellen zu untersuchen. Dabei sollte auch untersucht werden, inwieweit die Wirkung autokrin bzw. wie stark die parakrine Wirkung ist. Hierfür wurden CTLL-2 Zellen ausgewählt. Bei diesen Zellen handelt es sich um IL-2 abhängige murine Zellen. Die CTLL-2 Zellen wurden mit den unterschiedlichen Konstrukten retroviral transfiziert. Zur Testung der Funktionalität erfolgten regelmässige Passagen der Zellen ohne die Zugabe von IL-2. Ziel war es durch das regelmässige Passagieren einen Selektionsdruck zu erzeugen (Fig. 5). Zu Beginn dieses Experimentes waren die Transfektionsraten für die einzelnen Konstrukte in derselben Grössenordnung. Nach 10 Passagen zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Konstrukten. Der Ansatz mit dem murinem IL-2 zeigte sich eine deutliche Abnahme der GFP^+ IL-2 produzierenden Zellen, während der Anteil der $IL-2^- GFP^-$ nach 10 Passagen weiter zunahm. Im Kontrast hierzu steht das IL-2 CD25 Fusionsprotein. Nach 10 Passagen waren nahezu alle Zellen GFP^+ mit einem Anteil von über 90%. Dieser deutliche Selektionsvorteil der Fusionsprotein-transfizierten Zellen liess sich bei demselben experimentellen Ansatz mit externen IL-2 unterdrücken.

Dieses Experiment zeigte, dass das Fusionsprotein den Zellen, die damit transfiziert waren, unter IL-2 Mangelbedingungen, einen deutlichen proliferativen Selektionsvorteil verschaffte (Fig.5). Die Zellen, die Fusionsprotein positiv waren, waren nach 10 Passagen die dominante Population. Ein weiterer Ansatz bestand darin, den Selektionsvorteil des Fusionsproteins durch exogen zugeführtes IL-2 zu unterdrücken. Nach 10 Passagen sank der Anteil an dem mit dem Fusionskonstrukt transfizierten Zellen deutlich ab.

Zellen, die lösliches IL-2 produzierten und sezernierten, erlangten hierdurch keinen Selektionsvorteil. Diese Zellen produzierten so viel IL-2, dass sie trotz der IL-2 Mangelbedingungen in der Lage waren, auch die Proliferation der untransfizierten Zellen in Ko-Kultur zu gewährleisten. So kam es dazu, dass der Anteil der IL-2 produzierenden Zellen mit der Zeit abnahm und sich bei einer Prozentzahl von 0,7% stabilisierte. Da die 0,7% der IL-2 produzierenden Zellen bei der Fortführung der Kultur stabil blieb, ist davon auszugehen, dass sich in der Zellkultur ein dynamisches Gleichgewicht, zwischen IL-2 produzierenden und IL-2 konsumierenden Zellen, entwickelte. Diese stabile Ratio an CTLL-2 Zellen die IL-2 synthetisieren und Zellen die IL-2 konsumieren, spricht für die parakrine Wirkung des nicht membrangebundenen IL-2.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass *in vitro* nur die Zellen die IL-2 membrangebunden präsentierten, einen Selektionsvorteil hatten. Im Gegensatz dazu zeigten die Zellen, die mit dem löslichen murinen IL-2 transfiziert waren, keinen Selektionsvorteil. Es zeigte sich sogar eine Abnahme des initialen Anteils von 3% auf 0,4%, was für einen starken parakrinen Effekt in der Zellkultur spricht. Hiermit beschreiben wir erstmalig ein IL-2 CD25 Fusionsprotein, welches in der Lage ist den transfizierten Zellen einen signifikanten Selektionsvorteil *in vitro* zu verschaffen.

4.3 Das Fusionsprotein führt im *in vivo* SCID Modell zu einem Selektionsvorteil

Um einen Selektionsvorteil der Konstrukte bei T_{reg} *in vivo* zu untersuchen, isolierten wir T_{reg} aus Balb/C Mäusen und transfizierten die Zellen retroviral mit caSTAT5 1*6, murinem IL-2, dem Fusionsprotein und einem GFP Kontrollvektor. Im Anschluss injizierten wir die GFP⁺ und GFP⁻ Zellen i.v. in SCID Mäuse. Diese Mäuse besitzen

ein leeres T-Zellkompartiment und ermöglichen so eine genaue Betrachtung der von uns transferierten Zellen. Da SCID Mäuse kein adaptives Immunsystem besitzen, sind sie nicht in der Lage eine Immunantwort gegen den von uns gewählten Selektionsmarker GFP (Green Fluorescent Protein) zu bilden. In diesen Experimenten bestätigten sich die Ergebnisse aus den *in vitro* Experimenten. Die T_{reg} , die mit unserem Fusionsprotein transfiziert waren, erlangten einen Selektionsvorteil hinsichtlich der Expansion (Fig 6a).

Das zweite verwendete Konstrukt war das lösliche IL-2. Über die Zeit nahm die Zellzahl der GFP⁺ Zellen deutlich ab (Fig. 6b) und nach drei Wochen waren keine IL-2 sezernierenden Zellen mehr zu detektieren. Die Ursache hierfür setzt sich vermutlich aus mehreren Faktoren zusammen. Die lokale Konzentration von IL-2 hat bei diesem Ansatz nicht ausgereicht einen stabilen Pool an T_{regs} zu erhalten. Dies zeigte sich auch in der Analyse des T_{reg} Markers FOXP3. Der Anteil der FOXP3 positiven Zellen nahm mit der Zeit deutlich ab, von Initial 44% auf 10% (Fig. 7). Diese Werte korrelierten auch mit der Absolutzellzahl, in der sich auch ein signifikanter Rückgang zeigte.

Dies liegt möglicherweise darin, dass IL-2 eine kurze Halbwertszeit [6] hat und das zusätzlich ein Grossteil von dem sezernierten löslichen IL-2 von anderen Zellen, z.B. Dendritischenzellen, konsumiert oder in der Leber metabolisiert wird. Wie das *in vitro* Experiment gezeigt hat, besitzt das lösliche IL-2 eine starke parakrine Wirkung.

Eine weitere mögliche Erklärung wäre eine verminderte Synthese von IL-2. Da aber das GFP Signal nicht schwächer ist, als das der Kontrollvektor transfiziert T_{reg} , ist diese Erklärung weniger wahrscheinlich. Sowohl IL-2 als auch GFP stehen unter der Kontrolle desselben CMV Promoters.

Im Gegensatz hierzu steht das Fusionsprotein mit seinem membrangebundenen IL-2. Das Fusionsprotein war nicht nur in der Lage den transferierten Pool an T_{reg} hinsichtlich des Überlebens zu stabilisieren, sondern es führte auch zu einer deutlichen Proliferation der T_{reg} . Im Laufe der drei Wochen nahm der Anteil an T_{reg} deutlich zu, sowohl prozentual als auch in der Gesamtzellzahl (Fig6 a,b). Es handelte sich hierbei tatsächlich um T_{reg} , welches die Analyse von FOXP3 bestätigt. Es zeigte sich ein deutlicher Anstieg der FOXP3 positiven Zellen von 35% auf 77% innerhalb von drei Wochen (Fig. 7).

Die Ursache hierfür ist wahrscheinlich ein starke autokrine IL-2 Wirkung des Fusionsproteins. Das lösliche IL-2 ist auf Grund seiner parakrinen Wirkung, wie im initial *in vitro* Experiment gezeigt (Fig.5), nicht in der Lage, in SCID Mäusen einen T_{reg} Pool zu erhalten. Es zeigte sich ausserdem, dass ein komplettes IL-2 Signal nötig ist, dass nicht durch ein konstitutiv aktives STAT5 substituiert werden kann.

Mit diesem Experiment ist es gelungen zu zeigen, dass für die Expansion von ausgereiften T_{reg} ein starkes und vollständiges IL-2 Signal nötig ist. In diesen Experimenten unterstreichen wir die besondere Bedeutung des IL-2 für die T_{reg} . Es konnte ein von unserer Gruppe entwickeltes Modell, welches von der Annahme ausgeht, dass die natürliche IL-2 Quelle naive T-Zellen sind, die durch einen geringen Antigenstimulus IL-2 produzieren und so ein Gleichgewicht zwischen T-Effektorzellen und T_{reg} generieren, durch diese Experimente weiter unterstützt werden.

Das Modell geht ausserdem davon aus, dass im Fall eines starken Antigenstimulus IL-2 in einer deutlich höheren Konzentration freigesetzt wird und so die T_{reg} stimuliert und aktiviert werden. In diesem Kontext sind auch diese Ergebnisse zu sehen. Das Fusionsprotein simuliert eine hohe lokale IL-2 Konzentration und somit einen starken Antigenstimulus, welcher zu einer starken Proliferation der T_{reg} führt. Was gegensätzlich zu dem Modell in unseren experimentellen Setup wirkt, ist die Rolle des nicht membrangebunden IL-2, was nicht in der Lage war, einen stabilen T_{reg} Pool aufrecht zu erhalten. Die Ursache liegt möglicher Weise darin, dass die Konzentration des IL-2 nicht gross genug war um ausreichend T_{reg} mit IL-2 zu versorgen. IL-2 alleine scheint für die Expansion maturer T_{reg} von essentieller Bedeutung zu sein.

Fig.10

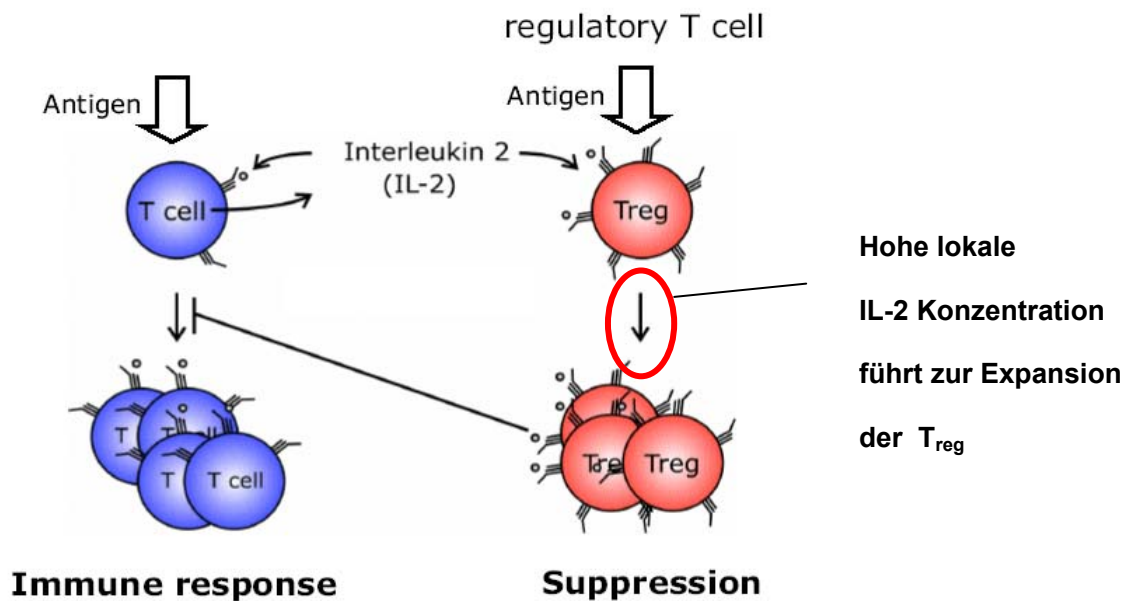


Fig. (10) IL-2 führt zur Expansion der T_{reg} . Niedrige Konzentrationen sorgen für ein Gleichgewicht zwischen T-Effektorzellen und T_{reg} . Hohe IL-2 Konzentrationen führen zu einer Expansion der T_{reg} und so letztlich zu einer Suppression der Effektorzellen.

4.4 Phänotypisierung der $CD4^+CD25^+$ regulatorische T-Zellen aus dem SCID Modell

4.4.1 IL-10 Induktion durch die IL-2 Konstrukte

Ein wesentliches Zytokin, welches im Zusammenhang mit der T_{reg} vermittelten Immunsuppression steht, ist IL-10 [91]. Bei IL-10 handelt es sich um ein Homodimer, welches die Signaltransduktion von CD28 und die Bildung von $TNF-\alpha$ und IL-1 inhibiert [102, 103]. IL-10 ist ausserdem in der Lage NF- κB Aktivität zu blockieren.

Bei der Analyse der IL-10 produzierenden Zellen zeigte sich ein leichter Unterschied (Fig. 8) in der Zellpopulation, die mit unserem Fusionsprotein transfiziert war. Der Anteil der IL-10 Produzenten in der Fusionsproteinprobe war höher als in den

anderen Gruppen. Bei dem löslichen IL-2 zeigte sich keine vermehrte IL-10 Produktion, welches mit der ungenügenden Stimulation des sezernierten löslichen IL-2 im Zusammenhang zu sehen ist.

Das verwendete Fusionsprotein ist sowohl in der Lage die transfizierten T_{reg} selektiv zu expandieren aber auch die IL-10 Produktion leicht zu steigern. Die Suppressivität der T_{reg} hat mehrere Mechanismen zur Grundlage. Zum einen konnte gezeigt werden, dass ein Suppressionsmechanismus auf der Konkurrenz um Zytokine u.a. auf IL-2 beruht. Des Weiteren ist ein bedeutender Mechanismus die Ausschüttung antiinflammatorischer Zytokine wie IL-10 und TGF- β [46, 84, 91]. Nach diesen Daten ist es nicht unwahrscheinlich, dass das neue Fusionsprotein einen Suppressivität steigernden der T_{reg} Effekt besitzt.

4.5 Kein Selektionsvorteil der Konstrukte in immunkompetenten Mäusen

Der nächste Schritt bestand darin zu testen, ob die mit dem Fusionsprotein transfizierten T_{reg} in Ballb/C Mäusen einen proliferativen Vorteil haben. Problematisch in diesem Fall war, dass das Fusionsprotein als Marker ein GFP besitzt, welches als Antigen wirkt und eine $CD8^+$ Antwort des endogenen Immunsystems verursachen kann. Auf Grund dieser Tatsache fiel die Wahl der Monitoringintervalle auf deutlich engere Zeitabschnitte als in dem SCID Transfermodell. Hierbei zeigte sich in unserem experimentellen Ansatz, dass die transfizierten T_{reg} keinen Selektionsvorteil bezüglich Proliferation oder des Überlebens in immunkompetenten Tieren besitzen (Fig.9). Auch die anderen Konstrukte führten zu keinem Selektionsvorteil. Nach zwei Wochen waren kaum GFP positive Zellen in allen Gruppen nachweisbar. Dies spricht für eine Depletion der Zellen. Die Ursachen hierin sind in der Immuninkompatibilität zu suchen. Es konnte gezeigt werden, dass selbst bei nicht transfizierten Zellen Minor-Antigene zur Depletion von transfizierten Zellen führen. Es konnte weiter gezeigt werden, dass GFP einen starken immunogenen Effekt hat. GFP induziert eine $CD8^+$ Antwort, die nach zwei Wochen zu einer fast vollständigen Depletion der GFP positiven Zellen führte [104]. Für weitere Experimente sollte der Antigen Effekt deutlich minimiert werden. Dafür sollte ein anderer Selektionsmarker als GFP gewählt werden, z.B. Thy

Eine weitere mögliche Erklärung kann darin liegen, dass durch die *ex vivo* Behandlung der Zellen, die T_{reg} nach dem Transfer nicht mehr in der Lage sind, sich in einem intakten T-Zellkompartiment eine Nische zu sichern, da diese durch endogene T_{reg} schon besetzt wird.

Die Methodik der *ex vivo* Stimulation mit Expansion und retroviraler Transduktion kann eine überdurchschnittliche Belastung für die Zellen darstellen, was dazu führt, dass die Zellen nicht in der Lage sind in einem immunkompetenten Organismus zu proliferieren und sich gegen die endogenen T_{reg} durchzusetzen.

Ein weiteres Argument für den nicht vorhandenen Selektionsvorteil ist, dass in Balb/C Mäusen ausreichend IL-2 zu Verfügung steht und so der Effekt der autokrinen Wirkung des Fusionsproteins nicht zum Tragen kommt. Eine ausreichende Konzentration an IL-2 kann den Effekt des Fusionsproteins unterdrücken, wie *in vitro* an CTLL-2 Zellen gezeigt werden konnte, siehe Fig.5. Wie sich die IL-2 Dynamik *in vivo* darstellt, wäre ein weiterer interessanter Aspekt den man untersuchen müsste.

Die Untersuchung des Gleichgewichtes zwischen IL-2 Produzenten und T_{reg} *in vivo* gilt als äusserst komplex, da die IL-2 Konzentration im Blut sehr gering ist und IL-2 nur eine Halbwertszeit von ca. 38 min. besitzt. Desweiteren sind die wahrscheinlichsten Orte der Hauptinteraktion die peripheren Lymphatischen Organe, was eine Messung verkompliziert.

4.6 Therapeutisches Potential von IL-2

Interleukin-2 befindet sich seit einigen Jahren in der klinischen Anwendung bei Tumorerkrankungen wie dem Hypernephrom und zusätzlich bei dem malignem Melanom (nur in den USA) [105]. Hierbei handelt es sich um maligne Erkrankungen, die häufig zu einer Immunantwort führen [106]. Ziel der IL-2 Therapie ist es, die Immunantwort gegen den Tumor zu amplifizieren. Bei 21% der Patienten mit einem metastasierten Nierenzellkarzinom, konnte ein Ansprechen auf die Therapie beobachtet werden [105]. Dabei muss aber berücksichtigt werden, dass es sich hierbei um eine kleine Gruppe von Patienten handelt, die sich in einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium befinden.

Im Rahmen der HIV-Therapie gab es eine Vielzahl von Studien, die die Patienten zusätzlich mit IL-2 zur Verbesserung der CD4 Zellzahl behandelt haben. Dabei zeigte sich der erwartete Anstieg der CD4 Zellzahl. In dieser Patientengruppe kam es aber zu keiner Verbesserung bei den Endpunkten Morbidität im Sinne opportunistischer Infektionen oder Letalität. Es konnte zusätzlich gezeigt werden, dass ein nicht unerheblicher Anteil der expandierten T-Zellen regulatorische T-Zellen waren [107]. In Anbetracht des nicht unerheblichen Nebenwirkungsspektrums einer IL-2 Therapie wie Ödembildung, Tachykardie, Hypothyreose und Reaktivierung von Autoimmunerkrankungen und der verhältnismässig geringen Ansprechrate, sind neue Therapiestrategien nötig [108].

In diesem Sinne könnte möglicherweise das Fusionsprotein eine Rolle spielen. Es gibt neue therapeutische Strategien, bei denen T-Zellen mit einem für ein tumorantigen-spezifischen T-Zell-Rezeptor transfiziert werden, um eine Immunantwort gegen den Tumor zu induzieren [107]. Es wäre denkbar, dass man im Rahmen eines adoptiven T-Zelltransfers eine Ko-Transfektion mit einem induzierbaren Fusionsprotein durchführt, so dass man verhältnismässig wenig Zellen transferieren braucht, um mithilfe des Fusionsproteins deren Induktion zur Proliferation steuern kann. Das Fusionsprotein ist nicht nur in der Lage T_{reg} selektiv zur Proliferation zu stimulieren, sondern auch antigenspezifische naive T-Zellen. Dieses therapeutische Modell der Expansion antigenspezifischer T-Zellen, lässt sich nicht nur auf maligne Erkrankungen anwenden, sondern auch auf Infektionskrankheiten und in diesem Sinne, könnte das Fusionsprotein ein weiteres Mittel in der Induktion und Expansion antigenspezifischer T-Zellen bieten.

5. Zusammenfassung

T_{reg} gehören zu einer Subpopulation der CD4 positiven Lymphozyten, die dadurch charakterisiert sind, dass sie CD25 und FOXP3 konstitutiv exprimieren. Bei CD25 handelt es sich um die α -Untereinheit des Interleukin-2 Rezeptors, was darauf hinweist, dass es sich hier um ein Schlüssel Zytokin für die T_{reg} handelt. Es konnte gezeigt werden, dass Interleukin-2 von entscheidender Bedeutung für die Genese, die Proliferation und für die Suppressivität der T_{reg} ist.

Zielsetzung: Das Ziel dieser Arbeit war es mit molekulargenetischen Methoden regulatorische T-Zellen über den IL-2 Signaltransduktionsweg autokrin zu stimulieren, um sowohl Proliferation, als auch die Suppressivität dieser Zellen zu steigern.

Durchführung / Ergebnisse: Um dieses Ziel zu erreichen, wurde ein konstitutiv aktives STAT5 (Signaltransduktionsmolekül nachgeschaltet im IL-2 Weg), ein murines IL-2 und ein von uns neu generiertes IL-2 Fusionsprotein, bestehend aus IL-2 und der alpha Untereinheit seines Rezeptors verwendet. Diese Konstrukte wurden zur retroviralen Transduktion von T_{reg} verwendet, um die Zellen unabhängig von externem IL-2 zu machen.

Initial erfolgte die Testung der Konstrukte auf Funktionalität *in vitro*. Dabei zeigte sich, dass alle Konstrukte eine biologische Aktivität hatten. Nur das Fusionsprotein war in der Lage den transfizierten Zellen, bezüglich der Proliferation, einen Selektionsvorteil zu verschaffen. Um diese neu gewonnen Erkenntnisse in einem *in vivo* Modell zu überprüfen, erfolgte die Transfektion *ex vivo* isolierter T_{reg} mit diesen Konstrukten und anschliessend der Transfer der T_{reg} in SCID Mäuse. Hierbei bestätigten sich die *in vivo* Ergebnisse. Weder das murine lösliche IL-2, noch das konstitutive aktive STAT5 waren in der Lage, die transfizierten T_{reg} zur Proliferation anzuregen. Bei beiden Konstrukten (caSTAT5 1*6 und mL-2) liess sich, wie am Beispiel des Kontrollvektors, eine Abnahme der Zellzahlen über die Zeit beobachten. Im Gegensatz dazu stand das Fusionsprotein, welches die Zellzahl der transfizierten T_{reg} deutlich steigerte.

Zusammenfassung:

Fokus dieser Arbeit war die Bedeutung von IL-2 für regulatorische T-Zellen zu untersuchen. In dieser Arbeit beschreiben wir erstmals ein IL-2-CD25 Fusionsprotein, das in der Lage ist T-Zellen, die damit transfiziert sind, *in vivo* und *in vitro* einem starken proliferativen Selektionsvorteil zu verschaffen. Die Lokalisierung des IL-2 an der Zellmembran scheint dabei wichtig zu sein, da Transfektion mit einem Vektor für sezerniertes IL-2 keinen vergleichbaren Vorteil *in vivo* bringt. Auch regulatorische T-Zellen die mit einem konstitutiv aktiven STAT5 transfiziert waren, zeigten keinen Selektionsvorteil hinsichtlich der Proliferation in einem SCID Transfer-Modell, was zeigt, dass zusätzliche Signalwege durch IL-2 angeschaltet werden müssen. Durch das IL-2-CD25 Fusionsprotein haben wir also eine Möglichkeit geschaffen, T-Zellen mit einem autokrinen und starken IL-2 Signal auszustatten. Diese Technik kann es ermöglichen beispielsweise hochaktive T-Zelltransplantate, z.B. regulatorische oder auch Tumor-spezifische T-Zellen, für die adoptive T-Zelltherapie zu generieren, ohne die starken Nebenwirkungen einer systemischen IL-2 Gabe.

5 Literaturverzeichnis

1. Janeway, C.A., Jr. and R. Medzhitov, *Innate immune recognition*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 197-216.
2. Delves, P.J. and I.M. Roitt, *The immune system. First of two parts*. N Engl J Med, 2000. **343**(1): p. 37-49.
3. Sallusto, F., J. Geginat, and A. Lanzavecchia, *Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance*. Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 745-63.
4. Lanzavecchia, A., *Receptor-mediated antigen uptake and its effect on antigen presentation to class II-restricted T lymphocytes*. Annu Rev Immunol, 1990. **8**: p. 773-93.
5. Abbas, A.K., K.M. Murphy, and A. Sher, *Functional diversity of helper T lymphocytes*. Nature, 1996. **383**(6603): p. 787-93.
6. Smith, K.A., *Interleukin-2: inception, impact, and implications*. Science, 1988. **240**(4856): p. 1169-76.
7. Szabo, S.J., et al., *A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment*. Cell, 2000. **100**(6): p. 655-69.
8. Zheng, W. and R.A. Flavell, *The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells*. Cell, 1997. **89**(4): p. 587-96.
9. Ivanov, I.I., et al., *The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells*. Cell, 2006. **126**(6): p. 1121-33.
10. Macatonia, S.E., et al., *Dendritic cells and macrophages are required for Th1 development of CD4+ T cells from alpha beta TCR transgenic mice: IL-12 substitution for macrophages to stimulate IFN-gamma production is IFN-gamma-dependent*. Int Immunol, 1993. **5**(9): p. 1119-28.
11. Moser, M. and K.M. Murphy, *Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development*. Nat Immunol, 2000. **1**(3): p. 199-205.
12. Dighe, A.S., et al., *Tissue-specific targeting of cytokine unresponsiveness in transgenic mice*. Immunity, 1995. **3**(5): p. 657-66.
13. Flesch, I.E., et al., *Early interleukin 12 production by macrophages in response to mycobacterial infection depends on interferon gamma and tumor necrosis factor alpha*. J Exp Med, 1995. **181**(5): p. 1615-21.
14. Mosmann, T.R., et al., *Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins*. J Immunol, 1986. **136**(7): p. 2348-57.
15. Kidd, P., *Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease*. Altern Med Rev, 2003. **8**(3): p. 223-46.
16. Zheng, L., et al., *T cell growth cytokines cause the superinduction of molecules mediating antigen-induced T lymphocyte death*. J Immunol, 1998. **160**(2): p. 763-9.
17. Minty, A., et al., *Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses*. Nature, 1993. **362**(6417): p. 248-50.
18. Kawahata, K., et al., *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, 2002. **168**(9): p. 4399-405.

19. Brunkow, M.E., et al., *Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse*. Nat Genet, 2001. **27**(1): p. 68-73.
20. Wildin, R.S., et al., *X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy*. Nat Genet, 2001. **27**(1): p. 18-20.
21. Bennett, C.L., et al., *The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3*. Nat Genet, 2001. **27**(1): p. 20-1.
22. Nistala, K. and L.R. Wedderburn, *Th17 and regulatory T cells: rebalancing pro- and anti-inflammatory forces in autoimmune arthritis*. Rheumatology (Oxford), 2009. **48**(6): p. 602-6.
23. Tafliin, C., et al., *FoxP3+ regulatory T cells suppress early stages of granuloma formation but have little impact on sarcoidosis lesions*. Am J Pathol, 2009. **174**(2): p. 497-508.
24. Horwitz, D.A., *Regulatory T cells in systemic lupus erythematosus: past, present and future*. Arthritis Res Ther, 2008. **10**(6): p. 227.
25. Sprent, J. and H. Kishimoto, *The thymus and negative selection*. Immunol Rev, 2002. **185**: p. 126-35.
26. Sprent, J. and S.R. Webb, *Intrathymic and extrathymic clonal deletion of T cells*. Curr Opin Immunol, 1995. **7**(2): p. 196-205.
27. Schwartz, R.H., *T cell clonal anergy*. Curr Opin Immunol, 1997. **9**(3): p. 351-7.
28. Wucherpfennig, K.W. and J.L. Strominger, *Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein*. Cell, 1995. **80**(5): p. 695-705.
29. Sakaguchi, S., *Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses*. Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 531-62.
30. Shevach, E.M., *Regulatory T cells in autoimmunity**. Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 423-49.
31. Maloy, K.J. and F. Powrie, *Regulatory T cells in the control of immune pathology*. Nat Immunol, 2001. **2**(9): p. 816-22.
32. Khattri, R., et al., *An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells*. Nat Immunol, 2003. **4**(4): p. 337-42.
33. Sakaguchi, S., et al., *Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance*. Immunol Rev, 2001. **182**: p. 18-32.
34. Willerford, D.M., et al., *Interleukin-2 receptor alpha chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment*. Immunity, 1995. **3**(4): p. 521-30.
35. Zheng, Y. and A.Y. Rudensky, *Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage*. Nat Immunol, 2007. **8**(5): p. 457-62.
36. Jiang, S. and R.I. Lechler, *Regulatory T cells in the control of transplantation tolerance and autoimmunity*. Am J Transplant, 2003. **3**(5): p. 516-24.
37. Singh, B., et al., *Control of intestinal inflammation by regulatory T cells*. Immunol Rev, 2001. **182**: p. 190-200.
38. Sakaguchi, S., *Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self*. Nat Immunol, 2005. **6**(4): p. 345-52.
39. Ziegler, S.F., *FOXP3: of mice and men*. Annu Rev Immunol, 2006. **24**: p. 209-26.
40. Bettelli, E., M. Dastrange, and M. Oukka, *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, 2005. **102**(14): p. 5138-43.
41. Wu, Y., et al., *FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT*. Cell, 2006. **126**(2): p. 375-87.
42. Vignali, D.A., L.W. Collison, and C.J. Workman, *How regulatory T cells work*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(7): p. 523-32.
43. Jordan, M.S., et al., *Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide*. Nat Immunol, 2001. **2**(4): p. 301-6.

44. D'Cruz, L.M. and L. Klein, *Development and function of agonist-induced CD25+Foxp3+ regulatory T cells in the absence of interleukin 2 signaling*. Nat Immunol, 2005. **6**(11): p. 1152-9.
45. Zheng, S.G., et al., *IL-2 is essential for TGF-beta to convert naive CD4+CD25- cells to CD25+Foxp3+ regulatory T cells and for expansion of these cells*. J Immunol, 2007. **178**(4): p. 2018-27.
46. DiPaolo, R.J., et al., *Autoantigen-specific TGFbeta-induced Foxp3+ regulatory T cells prevent autoimmunity by inhibiting dendritic cells from activating autoreactive T cells*. J Immunol, 2007. **179**(7): p. 4685-93.
47. Chen, W., et al., *Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3*. J Exp Med, 2003. **198**(12): p. 1875-86.
48. Thornton, A.M. and E.M. Shevach, *CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production*. J Exp Med, 1998. **188**(2): p. 287-96.
49. Stauber, D.J., et al., *Crystal structure of the IL-2 signaling complex: paradigm for a heterotrimeric cytokine receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(8): p. 2788-93.
50. Malek, T.R., *The biology of interleukin-2*. Annu Rev Immunol, 2008. **26**: p. 453-79.
51. Lin, J.X. and W.J. Leonard, *The role of Stat5a and Stat5b in signaling by IL-2 family cytokines*. Oncogene, 2000. **19**(21): p. 2566-76.
52. Nosaka, T., et al., *STAT5 as a molecular regulator of proliferation, differentiation and apoptosis in hematopoietic cells*. Embo J, 1999. **18**(17): p. 4754-65.
53. Malek, T.R. and A.L. Bayer, *Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(9): p. 665-74.
54. Malek, T.R. and J.D. Ashwell, *Interleukin 2 upregulates expression of its receptor on a T cell clone*. J Exp Med, 1985. **161**(6): p. 1575-80.
55. Lenardo, M., et al., *Mature T lymphocyte apoptosis--immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment*. Annu Rev Immunol, 1999. **17**: p. 221-53.
56. Refaeli, Y., et al., *Biochemical mechanisms of IL-2-regulated Fas-mediated T cell apoptosis*. Immunity, 1998. **8**(5): p. 615-23.
57. Van Parijs, L., et al., *Uncoupling IL-2 signals that regulate T cell proliferation, survival, and Fas-mediated activation-induced cell death*. Immunity, 1999. **11**(3): p. 281-8.
58. Horak, I., *Immunodeficiency in IL-2-knockout mice*. Clin Immunol Immunopathol, 1995. **76**(3 Pt 2): p. S172-3.
59. Furtado, G.C., et al., *Interleukin 2 signaling is required for CD4(+) regulatory T cell function*. J Exp Med, 2002. **196**(6): p. 851-7.
60. Antov, A., et al., *Essential role for STAT5 signaling in CD25+CD4+ regulatory T cell homeostasis and the maintenance of self-tolerance*. J Immunol, 2003. **171**(7): p. 3435-41.
61. Setoguchi, R., et al., *Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization*. J Exp Med, 2005. **201**(5): p. 723-35.
62. Sakaguchi, S., et al., *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, 1995. **155**(3): p. 1151-64.
63. Paul, W.E., *Pleiotropy and redundancy: T cell-derived lymphokines in the immune response*. Cell, 1989. **57**(4): p. 521-4.
64. Shibuya, H., et al., *IL-2 and EGF receptors stimulate the hematopoietic cell cycle via different signaling pathways: demonstration of a novel role for c-myc*. Cell, 1992. **70**(1): p. 57-67.
65. Reed, J.C., et al., *Recombinant interleukin 2 regulates levels of c-myc mRNA in a cloned murine T lymphocyte*. Mol Cell Biol, 1985. **5**(12): p. 3361-8.
66. Pauza, C.D., *Regulation of human T-lymphocyte gene expression by interleukin 2: immediate-response genes include the proto-oncogene c-myc*. Mol Cell Biol, 1987. **7**(1): p. 342-8.

67. Miyazaki, T., et al., *Three distinct IL-2 signaling pathways mediated by bcl-2, c-myc, and lck cooperate in hematopoietic cell proliferation*. Cell, 1995. **81**(2): p. 223-31.
68. Broome, H.E., et al., *Expression of Bcl-2, Bcl-x, and Bax after T cell activation and IL-2 withdrawal*. J Immunol, 1995. **155**(5): p. 2311-7.
69. Fontenot, J.D., et al., *A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells*. Nat Immunol, 2005. **6**(11): p. 1142-51.
70. Sadlack, B., et al., *Generalized autoimmune disease in interleukin-2-deficient mice is triggered by an uncontrolled activation and proliferation of CD4+ T cells*. Eur J Immunol, 1995. **25**(11): p. 3053-9.
71. Brandenburg, S., et al., *IL-2 induces in vivo suppression by CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells*. Eur J Immunol, 2008. **38**(6): p. 1643-1653.
72. de la Rosa, M., et al., *Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function*. Eur J Immunol, 2004. **34**(9): p. 2480-8.
73. Stallmach, A., et al., *Protection of trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis by an interleukin 2-IgG2b fusion protein in mice*. Gastroenterology, 1999. **117**(4): p. 866-76.
74. Pandiyan, P., et al., *CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells*. Nat Immunol, 2007. **8**(12): p. 1353-62.
75. Ruckert, R., et al., *IL-2-IgG2b fusion protein suppresses murine contact hypersensitivity in vivo*. J Invest Dermatol, 2002. **119**(2): p. 370-6.
76. Suvas, S., et al., *CD4+CD25+ T cells regulate virus-specific primary and memory CD8+ T cell responses*. J Exp Med, 2003. **198**(6): p. 889-901.
77. Lim, H.W., et al., *Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4+ CD25+ regulatory T cells*. J Immunol, 2005. **175**(7): p. 4180-3.
78. Nakamura, K., et al., *TGF-beta 1 plays an important role in the mechanism of CD4+CD25+ regulatory T cell activity in both humans and mice*. J Immunol, 2004. **172**(2): p. 834-42.
79. Ghiringhelli, F., et al., *CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner*. J Exp Med, 2005. **202**(8): p. 1075-85.
80. Misra, N., et al., *Cutting edge: human CD4+CD25+ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells*. J Immunol, 2004. **172**(8): p. 4676-80.
81. Thornton, A.M. and E.M. Shevach, *Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific*. J Immunol, 2000. **164**(1): p. 183-90.
82. Karim, M., et al., *CD25+CD4+ regulatory T cells generated by exposure to a model protein antigen prevent allograft rejection: antigen-specific reactivation in vivo is critical for bystander regulation*. Blood, 2005. **105**(12): p. 4871-7.
83. Takahashi, T., et al., *Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state*. Int Immunol, 1998. **10**(12): p. 1969-80.
84. Scheffold, A., J. Huhn, and T. Hofer, *Regulation of CD4+CD25+ regulatory T cell activity: it takes (IL-)two to tango*. Eur J Immunol, 2005. **35**(5): p. 1336-41.
85. Tadokoro, C.E., et al., *Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4+ T cells and dendritic cells in vivo*. J Exp Med, 2006. **203**(3): p. 505-11.
86. Tang, Q., et al., *Visualizing regulatory T cell control of autoimmune responses in nonobese diabetic mice*. Nat Immunol, 2006. **7**(1): p. 83-92.
87. Mempel, T.R., et al., *Regulatory T cells reversibly suppress cytotoxic T cell function independent of effector differentiation*. Immunity, 2006. **25**(1): p. 129-41.
88. Thornton, A.M., et al., *Cutting edge: IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4+CD25+ T cell suppressor function*. J Immunol, 2004. **172**(11): p. 6519-23.
89. Thornton, A.M., C.A. Piccirillo, and E.M. Shevach, *Activation requirements for the induction of CD4+CD25+ T cell suppressor function*. Eur J Immunol, 2004. **34**(2): p. 366-76.
90. Annacker, O., et al., *CD25+ CD4+ T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10*. J Immunol, 2001. **166**(5): p. 3008-18.
91. Rubtsov, Y.P., et al., *Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces*. Immunity, 2008. **28**(4): p. 546-58.

92. Piccirillo, C.A., et al., *CD4(+)CD25(+) regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor beta1 production and responsiveness.* J Exp Med, 2002. **196**(2): p. 237-46.
93. Nakamura, K., A. Kitani, and W. Strober, *Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta.* J Exp Med, 2001. **194**(5): p. 629-44.
94. Green, E.A., et al., *CD4+CD25+ T regulatory cells control anti-islet CD8+ T cells through TGF-beta-TGF-beta receptor interactions in type 1 diabetes.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(19): p. 10878-83.
95. Coombes, J.L., et al., *A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism.* J Exp Med, 2007. **204**(8): p. 1757-64.
96. Weston, S.A. and C.R. Parish, *New fluorescent dyes for lymphocyte migration studies. Analysis by flow cytometry and fluorescence microscopy.* J Immunol Methods, 1990. **133**(1): p. 87-97.
97. Ariyoshi, K., et al., *Constitutive activation of STAT5 by a point mutation in the SH2 domain.* J Biol Chem, 2000. **275**(32): p. 24407-13.
98. Lord, J.D., et al., *The IL-2 receptor promotes lymphocyte proliferation and induction of the c-myc, bcl-2, and bcl-x genes through the trans-activation domain of Stat5.* J Immunol, 2000. **164**(5): p. 2533-41.
99. Tai, X., et al., *CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2.* Nat Immunol, 2005. **6**(2): p. 152-62.
100. Fontenot, J.D. and A.Y. Rudensky, *Molecular aspects of regulatory T cell development.* Semin Immunol, 2004. **16**(2): p. 73-80.
101. Tsuji-Takayama, K., et al., *IL-2 activation of STAT5 enhances production of IL-10 from human cytotoxic regulatory T cells, HOZOT.* Exp Hematol, 2008. **36**(2): p. 181-92.
102. Fiorentino, D.F., et al., *IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells.* J Immunol, 1991. **146**(10): p. 3444-51.
103. Fiorentino, D.F., et al., *IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages.* J Immunol, 1991. **147**(11): p. 3815-22.
104. Duffy, D., et al., *Transgenic CD4 T cells (DO11.10) are destroyed in MHC-compatible hosts by NK cells and CD8 T cells.* J Immunol, 2008. **180**(2): p. 747-53.
105. Cohen, H.T. and F.J. McGovern, *Renal-cell carcinoma.* N Engl J Med, 2005. **353**(23): p. 2477-90.
106. Finn, O.J., *Cancer immunology.* N Engl J Med, 2008. **358**(25): p. 2704-15.
107. Abrams, D., et al., *Interleukin-2 therapy in patients with HIV infection.* N Engl J Med, 2009. **361**(16): p. 1548-59.
108. Zhang, H., et al., *Lymphopenia and interleukin-2 therapy alter homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells.* Nat Med, 2005. **11**(11): p. 1238-43.

Veröffentlichungen

- **Schefold JC, Zeden JP, Pschowski R, Hammoud B, Fotopoulou C, Hasper D, Fusch G, Von Haehling S, Volk HD, Meisel C, Schütt C, Reinke P. (2009):** Treatment with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is associated with reduced indoleamine 2,3-dioxygenase activity and kynurenine pathway catabolites in patients with severe sepsis and septic shock. *Scand J Infect Dis. 2010 Mar;42(3):164-71*

- **Nadine Unterwalder, Christian Meisel, Konstantinos Savvatis, Ben Hammoud, Christina Fotopoulou, Hans D. Volk, Petra Reinke and Joerg C. Schefold (2010):** High-mobility group box (HMGB)- 1 protein serum levels do not reflect monocytic function in patients with sepsis-induced immunosuppression," *Plos one (accepted)*

Berlin, Mai 2010

.....
Ben Hammoud

Erklärung

„Ich, Ben Hammoud erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Modulation von regulatorischen T-Zellen durch autokrine Stimulation des Interleukin-2 Signaltransduktionsweges“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

Berlin, Mai 2010

.....

Danksagung

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Dr. Alexander Scheffold für die hervorragende Betreuung, die sich durch viele Anregungen, Diskussionen und die Ansprechbarkeit bei allen Problemen auszeichnete.

Bei Prof. Dr. Alf Hamann möchte ich mich für die Übernahme der Betreuung meiner Arbeit bedanken. Mein Dank gilt ausserdem Prof. Dr. Radbruch der ein ausgezeichnetes wissenschaftliches Klima am DRFZ geschaffen hat.

Insbesondere gilt mein Dank meiner Arbeitsgruppe für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre. Mein ausserordentlicher Dank gilt Thordis Hohnstein die mir immer helfend bei grösseren Experimenten zur Seite stand.

Auch möchte ich mich bei Manuela Krüger bedanken, die mich bei meinem molekularbiologischen Arbeiten unterstützt hat. Susan Brandenburg und Maurus de la Rosa gilt mein Dank für die anregenden Diskussionen.

Nicht zu letzt gilt mein Dank allen Menschen die mich auf meinem Weg all die Jahre unterstützt haben.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Mutter, ohne Ihre Hingabe und Unterstützung wäre mir dieser berufliche Werdegang verschlossen geblieben.