

UNTERSUCHUNG DER EXPRESSION UND  
TRANSLOKATION VON  
TRANSKRIPTIONSFAKTOREN BEI DER  
AKTIVIERUNG VON T-HELFER- UND  
REGULATORISCHEN T-ZELLEN

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des Doktors der  
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von

HANNA BENDFELDT  
aus Neumünster

2010

Die Arbeit wurde vom 01.01.2005 bis 30.05.2010 am  
Deutschen Rheuma-Forschungszentrum in der  
Arbeitsgruppe von PD Dr. Ria Baumgrass angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel
2. Gutachter: PD Dr. Ria Baumgrass

Disputation am 15.11.2010

# Inhalt

1	Einleitung.....	6
1.1	Grundlagen des Immunsystems.....	6
1.2	Grundlagen der T-Zellimmunologie.....	7
1.2.1	Zentrale und periphere Toleranz.....	7
1.2.2	Aktivierung und Differenzierung von Th-Zellen in der Peripherie.....	8
1.3	Die Signalweiterleitung in Th-Zellen.....	12
1.3.1	Initiation der TZR-abhängigen Signaltransduktion.....	13
1.3.2	Der proximale Signalkomplex.....	13
1.3.3	PLC $\gamma$ -Aktivierung und Signaltransduktion.....	16
1.3.4	DAG vermittelte Signalweiterleitung.....	16
1.3.5	Calcium-abhängige Signalwege.....	17
1.3.6	Kostimulation.....	17
1.3.7	In vitro T-Zell-Stimulation.....	18
1.3.8	T-Zell-Rezeptor- und CD28-abhängig aktivierte Transkriptionsfaktoren.....	18
1.4	Die Regulation der Interleukin-2-Expression.....	23
1.4.1	Bedeutung von IL-2 für das Immunsystem.....	24
1.4.2	Transkriptionelle Regulation der IL-2-Expression.....	26
1.5	Die Signalweiterleitung in regulatorischen T-Zellen.....	29
1.5.1	Die TZR-abhängige Signaltransduktion in Treg-Zellen.....	29
1.5.2	Bedeutung des IL-2 Signalwegs für Treg- Zellen.....	31
1.6	Ziel der Arbeit.....	32
2	Material und Methoden.....	33
2.1	Material.....	33
2.1.1	Chemikalien.....	33
2.1.2	Antikörper.....	34
2.1.3	Reaktionskits.....	35
2.1.4	Analyse-Software.....	35
2.1.5	Geräte.....	36
2.1.6	Puffer und Medien.....	36
2.1.7	Oligonukleotide.....	38
2.1.8	Biologisches Material.....	39
2.2	Methoden.....	39
2.2.1	Präparation humaner mononukleärer Zellen.....	39

---

2.2.2	Bestimmung der Zellzahl.....	39
2.3	Durchflusszytometrie.....	40
2.3.1	Färbung von Oberflächenmarkern.....	41
2.3.2	Fixierung mit Formaldehyd.....	41
2.3.3	Permeabilisierung mit Triton X-100 und intrazelluläre Färbung .....	42
2.3.4	Fixierung und Färbung des Transkriptionsfaktors FOXP3 .....	42
2.3.5	Durchflusszytometrische Analyse isolierter Zellkerne.....	42
2.4	Zellsortierung .....	44
2.4.1	Magnetische Zellsortierung .....	44
2.4.2	Fluoreszenzvermittelte Zellsortierung von CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>-</sup> Treg-Zellen und CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> CD127 <sup>+</sup> Gedächtnis-Th-Zellen .....	46
2.5	Stimulation und Kultivierung humaner primärer Th-Zellen .....	47
2.6	Western Blot .....	47
2.6.1	Präparation von Proteinproben für die Gelelektrophoretische Analyse .....	47
2.6.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	47
2.6.3	Blotten auf eine Nitrozellulosemembran .....	48
2.7	Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) .....	49
2.7.1	Quantitative RT-PCR.....	49
3	Ergebnisse .....	51
3.1	Die Abhängigkeit der IL-2-Produktion von der NFATc2 Menge in Th-Zellen....	51
3.1.1	IL-2 <sup>+</sup> Th-Zellen exprimieren mehr NFATc2 als IL-2 <sup>-</sup> Th-Zellen.....	51
3.1.2	Detektion IL-2 produzierender FOXP3 <sup>+</sup> Th-Zellen .....	54
3.1.3	Phänotypische Charakterisierung der IL-2 produzierenden FOXP3 <sup>+</sup> Th- Zellen.....	58
3.1.4	IL-2 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>+</sup> Th-Zellen exprimieren mehr NFATc2 als IL-2 <sup>-</sup> FOXP3 <sup>+</sup> .....	62
3.1.5	FOXP3 <sup>+</sup> Th-Zellen exprimieren unabhängig von ihrem Differentierungsstatus weniger NFATc2 als FOXP3 <sup>-</sup> Th-Zellen.....	64
3.2	FOXP3 bindet an den NFATc2-Promotor in CD25 <sup>+</sup> Th-Zellen .....	66
3.2.1	<i>In silico</i> Analyse von potentiellen FOXP3-Bindestellen im NFATc2 Promoter.....	66
3.2.2	FOXP3-Bindung an den NFATc2-Promotor in unstimulierten CD25 <sup>+</sup> Th- Zellen.....	67
3.3	Expression und Aktivierung der TZR-abhängigen Transkriptionsfaktoren .....	68
3.3.1	Die Expression von NFATc2, NF-κB und AP-1 ist geringer in Treg- als in Gedächtnis-Th-Zellen.....	68
3.3.2	Kein signifikanter Unterschied der NF-κB-Menge zwischen IL-2 <sup>+</sup> und IL-2 <sup>-</sup> Zellen.....	71
3.3.3	P-c-jun ist nicht differentiell exprimiert in IL-2 <sup>+</sup> und IL-2 <sup>-</sup> Zellen.....	72
3.3.4	IL-2 <sup>+</sup> Zellen exprimieren mehr c-fos als IL-2 <sup>-</sup> Zellen.....	72

---

3.3.5	FOXP3 ist in IL-2 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>+</sup> Zellen geringer exprimiert als in IL-2 <sup>-</sup> FOXP3 <sup>+</sup> Zellen .....	73
3.3.6	Die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren in Treg-Zellen ist intakt .....	75
3.3.7	Mathematisches Modell zur IL-2-Expression in Th-Zellen.....	79
3.3.8	Die c-fos- und NFATc2-Mengen sind limitierend für die binäre IL-2-Produktion in Gedächtnis-Th-Zellen .....	81
4	Diskussion .....	83
4.1	Die binäre IL-2-Produktion in Gedächtnis-Th-Zellen.....	83
4.1.1	Die Bedeutung der Transkriptionsfaktor-Mengen für die IL-2-Produktion.....	85
4.2	Die Transkriptionsfaktor-Expression und -Aktivierung in FOXP3 <sup>+</sup> Th-Zellen....	88
4.2.1	Geringe Transkriptionsfaktor-Expression in Treg-Zellen.....	88
4.2.2	Die Abhängigkeit der geringen Transkriptionsfaktor-Expression von FOXP3.....	89
4.2.3	Die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren in FOXP3 <sup>+</sup> Th-Zellen ist intakt.....	93
4.2.4	Die IL-2-Produktion in FOXP3 <sup>+</sup> Th-Zellen.....	95
4.2.5	Die Phänotypische Charakterisierung der IL-2 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>+</sup> Th-Zellen .....	99
5	Ausblick.....	102
6	Literaturverzeichnis.....	103
7	Danksagung .....	114
8	Eidesstattliche Erklärung .....	115

## Zusammenfassung

Die Regulation der IL-2-Expression ist während einer Immunantwort von außerordentlicher Bedeutung für die Balance des Immunsystems, weil IL-2 nicht nur die T-Zell-Aktivierung und die Entwicklung von Effektorfunktionen fördert, sondern zudem grundlegend zur Homöostase und Funktion von regulatorischen T (Treg) -Zellen beiträgt.

Die Transkriptionsfaktoren NFATc2, NF-κB und AP-1 (c-fos und c-jun) müssen nach Stimulation kooperativ an den *IL-2*-Promotor binden, um die Genexpression zu induzieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst die IL-2-Expression in Abhängigkeit der Mengen dieser Transkriptionsfaktoren untersucht. Hier zeigte sich, dass Gedächtnis-Th-Zellen, die IL-2 produzieren, signifikant mehr NFATc2 und c-fos exprimieren als die Gedächtnis-Th-Zellen, die kein IL-2 exprimieren. Die Expression von c-jun und NF-κB hingegen unterscheidet sich nicht signifikant. Die Einzelzellanalyse der Transkriptionsfaktoren zusammen mit IL-2 verdeutlicht zudem, dass die c-fos- und NFATc2-Mengen limitierend für eine binäre Produktion von IL-2 sind.

Treg-Zellen werden anhand des Transkriptionsfaktors FOXP3 charakterisiert. Bislang wurde angenommen, dass sie grundsätzlich kein IL-2 produzieren können. Ob dafür die verminderte Expression oder Defekte in der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFATc2, NF-κB und AP-1 verantwortlich sind, wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

Mit Hilfe der durchflusszytometrischen Detektion aktivierter Transkriptionsfaktoren zusammen mit FOXP3 in isolierten Zellkernen wurde gezeigt, dass NFATc2, AP-1 und NF-κB in Treg-Zellen voll aktivierbar sind. Die Gesamtexpression der Transkriptionsfaktoren hingegen, unabhängig vom Aktivierungsstatus, ist in Treg- deutlich geringer als in Gedächtnis-Th-Zellen. Mit Hilfe von Chromatin-Immunopräzipitationen wurde die direkte Bindung von FOXP3 an den *NFATc2*-Promotor in unstimulierten Treg-Zellen aufgezeigt. Somit scheint FOXP3 selbst zur Hemmung der NFATc2-Expression in Treg-Zellen beizutragen.

Überraschenderweise wurden nach *in vitro* Stimulation Treg-Zellen detektiert, die entgegen der Annahme IL-2 produzieren. Diese wiederum exprimieren mehr NFATc2 und AP-1 (vergleichbar mit der Expression in Gedächtnis-T-Zellen), aber weniger FOXP3 als die IL-2 nichtproduzierenden Treg-Zellen. NF-κB jedoch ist nicht differentiell exprimiert.

Diese Daten unterstützen die Hypothese, dass die IL-2-Produktion von den Mengen und Verhältnissen von NFATc2, c-fos und FOXP3 abhängig ist. Diese Abhängigkeit konnte teilweise mit Hilfe eines mathematischen Modells reproduziert werden.

Da Th-Zellen von Patienten, die an Autoimmunerkrankungen wie Systemischen Lupus Erythematosus (SLE) leiden, kaum IL-2 exprimieren können, ist das Verständnis der

molekularen Mechanismen, die zur Regulation der IL-2-Expression beitragen, von großer Bedeutung für potentielle Therapien z.B. mit exogenem IL-2 oder anti-IL-2 Antikörpern.

## Summary

The regulation of IL-2 expression in Th-cells is of great importance for the balance of the immune system, because IL-2 not only mediates inflammatory responses but also the function and homeostasis of regulatory T (Treg)-cells.

NFATc2, NF- $\kappa$ B and AP-1 (c-fos and c-jun) have to bind to the IL-2 promoter cooperatively to induce IL-2 expression. Here, the dependence of the IL-2 expression in human memory Th-cells on the amounts of these transcription factors was determined. Flow cytometric analysis of the transcription factors and IL-2 in single cells shows a significantly higher expression of NFATc2 and c-fos in IL-2-producing than in –nonproducing memory Th-cells. On the contrary, NF- $\kappa$ B and c-jun are not differentially expressed. Moreover, single-cell analysis and subsequent statistical analysis enabled us to show that the amounts of NFATc2 and c-fos are limiting factors for the binary IL-2 expression in memory th-cells.

Treg-cells characteristically express the master transcription factor FOXP3 and should not be able to express IL-2. Therefore, we investigated whether the lower expression or defects in the activation of NFATc2, NF- $\kappa$ B and AP-1 could account for their inability to produce IL-2.

The activation of all three transcription factors, analyzed by flow cytometric measurement of isolated nuclei, is intact. But their expression, independent of the activation status, is very low in Treg- compared to memory Th-cells. For the low NFATc2 amount, Chromatin-Immunoprecipitation revealed the binding of FOXP3 to the *NFATc2*-promotor in unstimulated Treg-cells, indicating that FOXP3 itself represses the constitutive *NFATc2* expression.

After *in vitro* stimulation we surprisingly found a small population of Treg-cells that produces IL-2. These cells showed a higher expression of NFATc2 and AP-1 (comparable to memory-Th-cells) but lower FOXP3 amounts than IL-2-nonproducing Treg-cells. The expression levels of NF- $\kappa$ B, however, was unchanged. These results favor the hypothesis, that the ratios and amounts of NFATc2, AP-1 and FOXP3 in Treg cells are crucial for the induction of IL-2 expression in Treg-cells, which has also been reproduced by a mathematical model based on the single cell data on transcription factor expression.

Since IL-2 production is highly impaired in Th-cells from patients suffering from autoimmune diseases such as Systemic Lupus Erythematosus (SLE), a better knowledge of the molecular mechanisms and factors regulating IL-2 expression is important for potential therapeutic manipulations such as treatment with exogenous IL-2 or anti-IL-2 antibodies.

# 1 Einleitung

## 1.1 Grundlagen des Immunsystems

Alle Zellen, Gewebe und Moleküle, die zusammen eine Infektion verhindern oder bereits bestehende Infektionen bekämpfen, werden in ihrer Gesamtheit als Immunsystem bezeichnet. Dieses kann in angeborene und erworbene (adaptive) Immunität unterteilt werden.

Die angeborene Immunität stellt dabei die erste Barriere dar, um den Körper vor einer Invasion Pathogener zu schützen. Dazu gehören physikalische Faktoren wie die Haut bzw. Schleimhäute, chemische Faktoren wie proteolytische Enzyme in Körperflüssigkeiten oder ein niedriger pH-Wert, das Komplementsystem sowie die zellulären Bestandteile wie polymorphkernige Granulozyten, natürliche Killerzellen (NK-Zellen), Mastzellen und Makrophagen. Durch sie werden konservierte Strukturen auf Pathogenen erkannt, die innerhalb von Minuten bis weniger Stunden zur Induktion einer lokalen inflammatorischen Antwort führen, bei der eine Vielzahl von Effektormolekülen (Zytokine) freigesetzt wird. Die Zytokine nehmen zudem eine wichtige Rolle bei der adaptiven Immunantwort ein, wodurch die beiden Arten der Immunität eng miteinander verknüpft sind.

Gelingt einem Erreger die Überwindung dieser ersten, unspezifischen Verteidigungslinie, reagiert das adaptive Immunsystem mit einer spezifischen Abwehrreaktion. Das adaptive Immunsystem wird in zwei Arten der Immunantwort unterteilt. Die humorale Immunität wird durch Antikörper vermittelt, die von B-Zellen produziert werden. Diese werden ins Blut und in die Lumen des Gastrointestinaltraktes und der Atemwege sekretiert, um dort Erreger und mikrobielle Toxine zu beseitigen. Intrazelluläre Pathogene jedoch können nicht durch Antikörper entfernt werden. Sie werden durch die zelluläre Immunität, die durch T-Lymphozyten vermittelt wird, erkannt und beseitigt.

Beide Arten der adaptiven Immunität beruhen auf der Antigenerkennung durch hochspezifische B- und T-Zell-Rezeptoren (BZR bzw. TZR). Die Spezifität der Rezeptoren entsteht in erster Linie durch somatische Rekombination von Gensegmenten während der Lymphozytenreifung und der anschließenden Selektion, klonalen Expansion und Differenzierung zu Gedächtnis-Zellen.

Eine der wichtigsten Eigenschaften der adaptiven Immunantwort ist die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses, das zu einer schnelleren, spezifischen und effektiven Immunantwort führt, wenn ein bereits bekämpfter Erreger erneut in den Organismus eindringt.



## 1.2 Grundlagen der T-Zellimmunologie

T-Zellen lassen sich durch die Expression des CD3 Rezeptors, der zusammen mit dem TZR einen Komplex bildet und der Aktivierung der Zellen dient, von anderen Lymphozyten unterscheiden. Die Mehrheit der T-Zellen (90-95%) exprimieren einen TZR, der sich aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette zusammensetzt, während ca. 10% einen aus  $\gamma$ - und  $\delta$ -Kette bestehenden TZR exprimieren.

Reife, periphere  $\alpha/\beta$  T-Zellen werden in zwei phänotypisch und funktionell verschiedene Subpopulationen eingeteilt, die anhand der Expression der Oberflächenmoleküle CD4 und CD8 unterschieden werden. Die  $CD8^+$  Zellen werden als Zytotoxische T-Zellen bezeichnet und erkennen Antigene, die mit dem Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) I-Molekülen auf infizierten Zellen assoziiert sind. Nach Bindung des TZR an den MHC I/Antigen-Komplex werden sie aktiviert, sezernieren die Proteine Perforin und Granzym und induzieren so Apoptose in den infizierten Ziel-Zellen.

Die CD4 exprimierenden T-Zellen werden auch T-Helfer (Th)-Zellen genannt. Sie erkennen Antigene, die an den MHC II-Komplex auf spezialisierten Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) gebunden sind und helfen B-Zellen dabei, Antikörper zu produzieren, sowie Makrophagen bei der Eliminierung phagozytierter Erreger. Neben Zell-Zell-Kontakt über Rezeptoren und Liganden (z.B. CD40 auf Makrophagen und B-Zellen und CD40L auf Th-Zellen), geschieht dies hauptsächlich über die Produktion von Zytokinen, die der interzellulären Kommunikation dienen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich die  $CD4^+$  Th-Zellen näher betrachtet.

### 1.2.1 Zentrale und periphere Toleranz

Ein gesundes Immunsystem ist in der Lage, auf eine enorme Vielzahl von Erregern zu reagieren ohne dabei körpereigene (Selbst-) Antigene anzugreifen. Dieses Phänomen wird immunologische Toleranz genannt.

Dies wird durch einen Hauptmechanismus der zentralen Toleranz, der als negative Selektion bezeichnet wird, ermöglicht. Dabei erhalten unreife T-Lymphozyten im Thymus, die Rezeptoren mit einer hohen Affinität für Selbst-Antigene exprimieren, Signale, die die Zellen sterben lassen bevor sie den Reifungsprozess beenden und den Thymus verlassen können. Neben der zentralen Toleranz existieren zusätzliche Mechanismen, die in der Peripherie autoreaktive Zellen kontrollieren. Wenn reife T-Zellen in peripheren Geweben Selbst-Antigene ohne ein zweites Signal, den sogenannten Ko-Stimulus, erkennen, führt das zu einer funktionellen Inaktivierung der Zellen (Anergie). Eine wiederholte Aktivierung reifer

T-Zellen ohne Kostimulus führt schließlich zum aktivierungsbedingtem Zelltod. Einen großen Beitrag zur peripheren Toleranz gegenüber Selbst-Antigenen leisten auch spezifische immunsuppressive T-Zellen, die regulatorischen T (Treg)-Zellen (siehe 1.2.2.4).

### 1.2.2 Aktivierung und Differenzierung von Th-Zellen in der Peripherie

Nach der Entwicklung der Thymozyten und abgeschlossener Selektion im Thymus wandern die reifen CD4<sup>+</sup> T-Zellen in die Peripherie und zirkulieren dort bis zu ihrem Tod kontinuierlich über den Blutkreislauf durch die sekundären lymphatischen Organe. Treffen sie schließlich auf ihr spezifisches Antigen, werden sie aktiviert und differenzieren zu Effektorzellen. Die aus peripherem Blut isolierten CD4<sup>+</sup> Th-Zellen, die in dieser Arbeit verwendet wurden, enthalten daher sowohl naive, antigen-unerfahrene als auch antigen-erfahrene Effektor- und Gedächtnis-Th-Zellen. Die verschiedenen Th-Zell-Subpopulationen lassen sich hinsichtlich der von ihnen sekretierten Zytokine sowie durch charakteristische Oberflächenmoleküle unterscheiden [1, 2]. Ein wichtiger Marker zur Diskriminierung humaner naiver und Gedächtnis-T-Zellen ist die Expression der Protein-Tyrosinphosphatase CD45 [3]. Das Transmembranmolekül wird durch alternatives Splicing als CD45RA und als CD45RO Isoform auf Th-Zellen exprimiert. CD45RA exprimierende Th-Zellen produzieren nach Antigen-Stimulation ausschließlich das Zytokin Interleukin-2 (IL-2) (siehe 1.4.1), während die CD45RO<sup>+</sup> Th-Zellen nach Stimulation sensibler und schneller aktiviert werden und neben IL-2 eine Vielzahl anderer Zytokine sekretieren. Zudem sind CD45RO<sup>+</sup> Th-Zellen in der Lage, B-Zellen bei der Antikörper-Produktion zu unterstützen [4, 5]. Aufgrund dieser funktionellen Merkmale werden die CD45RO<sup>+</sup> Th-Zellen den Gedächtnis- und die CD45RA<sup>+</sup> Zellen den naiven Th-Zellen zugeordnet [6].

Nachdem naive Th-Zellen also auf ihr spezifisches Antigen gestoßen und aktiviert worden sind, produzieren sie IL-2. Dieses Zytokin ist ein Wachstumsfaktor, der die Immunantwort verstärkt, indem es zur autokrinen T-Zell-Aktivierung beiträgt, die klonale Expansion aktivierter T-Zellen bewirkt, aber auch die Toleranz durch die Induktion und Homöostase von Treg-Zellen fördert [7, 8]. Abhängig von der Art der Infektion, der Stärke der TZR-Stimulation, dem Kostimulus, sowie dem Zytokin-Milieu differenzieren die aktivierten Th-Zellen in spezialisierte Effektor-Th-Zellen [9-11]. Die Bedingungen für die Differenzierung sowie die Aufgaben und Charakteristika der einzelnen Th-Zelllinien werden im Folgenden näher erläutert.

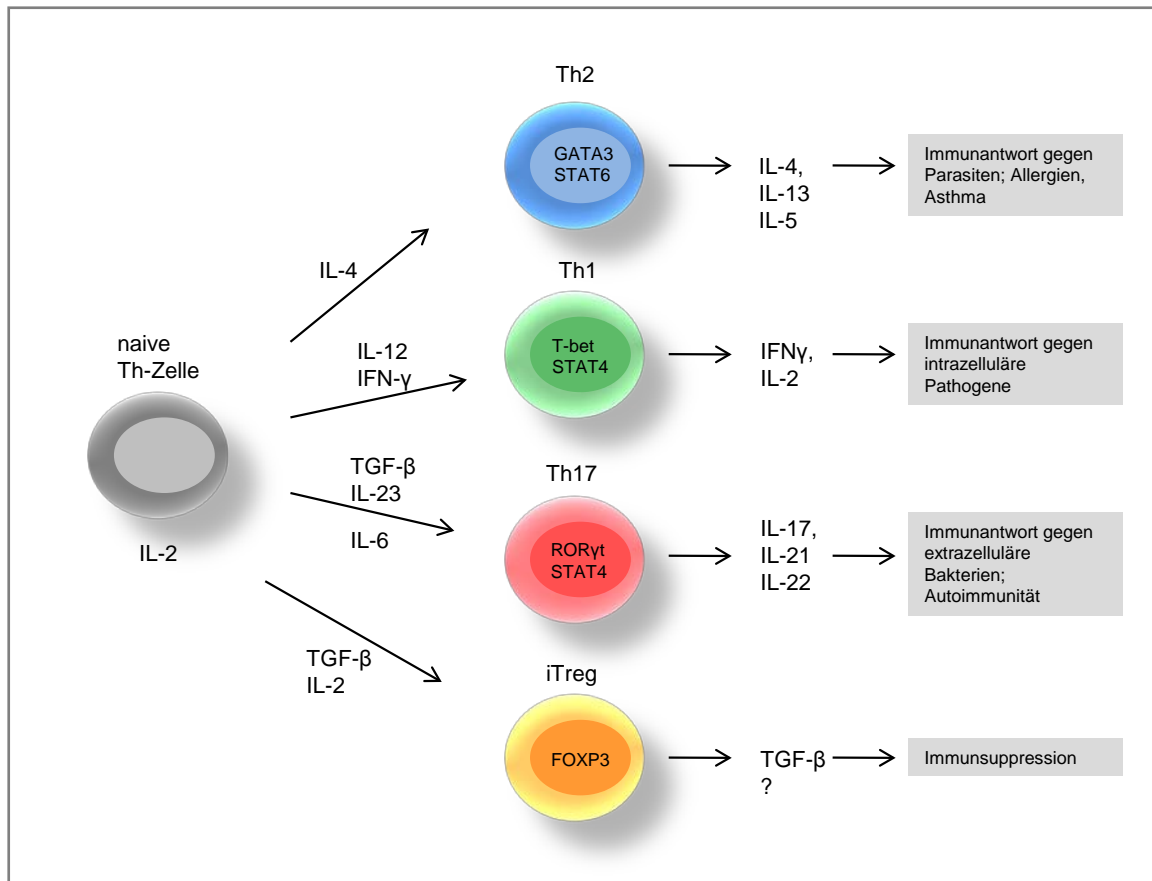


Abb. 1.1 Schematische Darstellung der Th-Zell-Differenzierung. Erläuterungen im Text Abschnitt 1.2.2.

### 1.2.2.1 Th1-Zellen

Th1-Zellen werden anhand der Produktion der Zytokine IL-2, Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) sowie den Tumor Necrose Faktoren (TNF)- $\alpha$  und - $\beta$  definiert [2]. Sie schützen den Wirt vor der Ausbreitung intrazellulärer Pathogene, zu denen z.B. *Leishmania major*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* sowie Viren wie das Herpes simplex Virus und Influenza A gehören [12-15]. Naive Th-Zellen differenzieren in Th1-Zellen, wenn in ihrer Umgebung die Zytokine IFN- $\gamma$  und IL-12 durch Zellen des angeborenen Immunsystems ausgeschüttet wurden und die Zellen einer starken Antigen-Stimulation ausgesetzt sind. Während der Differenzierung wird durch die Bindung von IL-12 an seinen Rezeptor die Aktivierung des Transkriptionsfaktors „Signal Transducer and Activator of Transcription“ 4 (STAT4) ausgelöst. STAT4 ist in der Lage die IFN- $\gamma$  und IL12-Rezeptor (IL-12R $\beta$ 2) Synthese sowie die Expression des Th-1 spezifischen Transkriptionsfaktors T-bet zu induzieren [16]. Die STAT4-Expression wird zusätzlich durch IFN- $\gamma$  verstärkt, während das Th2- spezifische Zytokin IL-4 die STAT4-Expression unterdrückt und somit die Th1-Differenzierung hemmt

[17, 18]. Die T-bet-Expression ist für den Erhalt des Th1 Phänotyps unerlässlich und vermittelt die IFN- $\gamma$ -Produktion in diesen Zellen [19].

#### 1.2.2.2 Th2-Zellen

IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 sind die charakteristischen Zytokine, die von Th2-Zellen sekretiert werden [2]. Im Gegensatz zu einer Th1-Immunantwort wird die Th2 Antwort in der Regel mit der humoralen Immunität und damit der Antikörperproduktion durch B-Zellen assoziiert. Th2-Zellen bekämpfen extrazelluläre Pathogene wie Helminthen und Nematoden [20]. Eine ungezügelter Th2-Immunantwort kann zu pathologischen Veränderungen im Körper wie Allergien und Asthma führen [21]. IL-4 wird nicht nur durch Th2-Zellen produziert sondern fördert neben einer schwachen Antigen-Stimulation (im Gegensatz zu Th1-Zellen) auch die Differenzierung naiver Th-Zellen zu Th2-Zellen [22]. IL-4 bindet an den IL-4 Rezeptor alpha (IL-4R $\alpha$ ) und löst damit die Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT6 aus, der wiederum die Expression des „Master Regulators“ für Th2-Zellen, GATA3, induziert. GATA3 setzt schließlich den Differenzierungsprozess in Gang und unterdrückt gleichzeitig die Th1-Differenzierung [23].

#### 1.2.2.3 Th17-Zellen

Bei den Th17-Zellen handelt es sich um eine erst kürzlich identifizierte Th-Zellpopulation, die sich durch die Produktion von IL-17A, E und F sowie IL-21 und IL-22 auszeichnet [24, 25]. IL-17 ist ein wirkungsvolles inflammatorisches Zytokin, das die Proliferation, Reifung und Chemotaxis von Neutrophilen bewirkt, so dass Th17-Zellen eine protektive Rolle besonders bei bakteriellen Infektionen der Lunge durch Rekrutierung von Neutrophilen einnehmen [26]. Neben der protektiven Rolle im Immunsystem wurden Th17-Zellen aber auch mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht. So sind IL-17 defiziente Mäuse u.a. resistent gegen die adjuvant-induzierte Arthritis und zeigen eine verzögerte, mildere Ausprägung der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) [27, 28]. „Transforming Growth Factor- $\beta$ “ (TGF- $\beta$ ) und IL-6 fördern kooperativ die Differenzierung naiver Th-Zellen in IL-17 produzierende Th17-Zellen [29], während IL-23, ein Zytokin, das von Zellen des angeborenen Immunsystems produziert wird, kritisch für das Überleben und die Proliferation der Zellen ist. Alle drei Faktoren bewirken die Induktion der Th17-spezifischen Transkriptionsfaktoren „retinoic acid-related orphan receptors“ (ROR)- $\gamma$  und ROR- $\alpha$ , die unerlässlich für die IL-17-Expression sind [30, 31].

#### 1.2.2.4 Treg-Zellen

Treg-Zellen tragen zentral zur Erhaltung der peripheren Toleranz bei (siehe 1.2.1). Eine Störung in ihrer Entwicklung oder Funktion hat fatale Konsequenzen für das Immunsystem und äußert sich in der Ausbildung systemischer Autoimmunerkrankungen. Sie können anhand ihres anergen Phänotyps charakterisiert werden, d.h. sie können nach Aktivierung keine Effektor-Zytokine wie IL-2, IL-4, IFN- $\gamma$  oder IL-17 exprimieren und proliferieren nur schwach. Ihre Funktion besteht u.a. in der aktiven Unterdrückung von Immunzell-Funktionen. Aber auch der Schutz des Körpers vor ungezügelter Immunantworten und chronischen oder irrtümlichen Immunreaktionen, z.B. im Falle von Allergien, werden durch Treg-Zellen vermittelt [32, 33].

In der Peripherie existieren zwei Arten von Treg-Zellen. Die natürlichen Treg (nTreg)-Zellen sind eine im Thymus generierte T-Zell-Population. Induzierte regulatorische T (iTreg)-Zellen hingegen entstehen durch Differenzierung naiver Th-Zellen in den peripheren lymphatischen Organen bei suboptimaler TZR-Stimulation oder starker Stimulation in Kombination mit hohen Konzentrationen TGF- $\beta$  und IL-2 [34]. Der Phänotyp der iTreg-Zellen gleicht dem der nTreg-Zellen. Beide exprimieren konstitutiv große Mengen der  $\alpha$ -Kette des IL-2 Rezeptors (CD25), „Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4“ (CTLA-4), „glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor“ (GITR) und den charakteristischen Transkriptionsfaktor FOXP3. Bis zu 90% der gesamten humanen peripheren Treg-Zellen exprimieren den Gedächtnis-Zell-Marker CD45RO (siehe 1.2.2). Die Anzahl naiver CD45RA<sup>+</sup> Treg-Zellen nimmt mit zunehmendem Alter stark ab. [35, 36]. Um humane Treg- und Effektor-T-Zellen anhand von Oberflächenmarkern zu diskriminieren, wird zum einen die hohe CD25 und zum anderen die geringe IL-7 (CD127) Rezeptor-Expression genutzt, die stark mit der Expression des Treg-spezifischen Transkriptionsfaktors FOXP3 korrelieren (siehe 3.1.4.2).

Eine anhaltende Expression des Transkriptionsfaktors FOXP3 ist sowohl für die Ausprägung des Treg-Zell Phänotyps als auch für die suppressive Funktion unerlässlich, denn der Verlust oder eine verminderte Expression von FOXP3 führt zum Erwerb von Effektor-Zell-Eigenschaften einschließlich der Zytokin-Produktion [37]. So konnte man das IPEX („immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked“) -Syndrom, das zu verheerenden Autoimmunreaktionen gegen eine Vielzahl von Organen und Geweben führt, auf eine Mutation im *foxp3* Gen zurückführen, was die Wichtigkeit einer intakten FOXP3-Expression für die Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz unterstreicht [38]. Allerdings ist noch nicht geklärt, welche Mechanismen zur Inhibierung der Effektorzellen durch Treg-Zellen beitragen. Diskutiert werden Zell-Zell-Kontakt spezifische Mechanismen, wie die Produktion von Perforin und Granzym oder Inhibierung der Effektor-Zellen mit Hilfe

des auf Treg-Zellen hoch exprimierten CTLA-4, [39]. Genauso könnten lösliche Faktoren wie die Zytokine IL-10, und TGF- $\beta$  oder Galectin-1 eine Rolle spielen. Zudem wird spekuliert, dass das Binden von IL-2 an die stark exprimierten, hochaffinen IL-2 Rezeptoren (CD25) auf Treg-Zellen zu einem Mangel an löslichem IL-2, das zur Proliferation und Aktivierung von Effektor-T-Zellen beiträgt, führt. Dies hätte eine Konkurrenz zwischen Treg- und Effektor-Zellen um IL-2 und damit eine Inhibierung der Immunreaktion zur Folge [40].

### **1.3 Die Signalweiterleitung in Th-Zellen**

Zellphysiologische Entwicklungen und Differenzierungsprozesse in Th-Zellen werden durch Signalprozesse ausgelöst und bestimmt. Aktivierte T-Zell-Rezeptoren sowie kostimulatorische Rezeptoren, die durch Liganden auf aktivierten APC oder durch Zytokine aktiviert werden, leiten Signale von der Zelloberfläche ins Zellinnere, indem sie nachgeschaltete Reaktionskaskaden aktivieren. Am Ende derartiger Kaskaden erreichen die Signale den Zellkern, wo die entsprechend der eingegangenen Signale spezifische Transkription von Zielgenen ausgelöst wird und bestimmte zelluläre Programme ausgeführt werden.

Defekte in den TZR-abhängigen Signalwegen ziehen oft folgenschwere Konsequenzen nach sich. T-Zellen mit einer verminderten Expression und Aktivierung der Signalmoleküle Protein Kinase C (PKC)  $\theta$  und „nuclear factor-kappa B“ (NF- $\kappa$ B) tragen z.B. zentral zur Pathogenese der Autoimmunkrankheit Systemischer Lupus Erythematoses (SLE) bei [41]. Mutationen in Signalproteinen, die zu sogenannten Onkogenen gehören, wie das kleine G-Protein Ras, können weiterhin zu einem entgleisten Zellzyklus und damit zur Tumorentstehung beitragen [42]. Zudem greifen viele der in der Klinik verwendeten Immunsuppressiva, wie z.B. Cyclosporin A (CsA), direkt in den TZR-Signalweg ein, indem sie die Calcineurin-Aktivität (siehe 1.3.5) inhibieren. Dies führt zu einer verminderten Zytokin-Produktion und T-Zell-Proliferation und damit zu einer Entzündungshemmung. Solche immunsuppressiven Substanzen werden u.a. zur Prävention von Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantationen, bei Autoimmunerkrankungen oder bei allergischen Reaktionen wie atopischer Dermatitis eingesetzt [43, 44].

Im folgenden Abschnitt werden die Signaltransduktionswege näher beschrieben, die zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren „nuclear factor of activated T cells“ (NFAT), NF- $\kappa$ B und „activator protein-1“ (AP-1) und somit zur Produktion von Zytokinen wie IL-2, zur Proliferation und Differenzierung führen.

### 1.3.1 Initiation der TZR-abhängigen Signaltransduktion

Der membranständige TZR an der Zelloberfläche besteht aus einer ligandenbindenden Untereinheit, die sich aus einer  $\alpha$ - und  $\beta$ - Kette zusammensetzt. Diese ist in der Lage zusammen mit dem CD4 Korezeptor das an einen MHC II-Komplex gebundene Antigenpeptid spezifisch zu erkennen und zu binden. Eine weitere Untereinheit des TZR, der CD3-Komplex, dient der Signalgebung. Er besteht aus  $\gamma$ -,  $\delta$ - und  $\epsilon$ -Ketten sowie einem Homodimer aus  $\zeta$ -Ketten. Diese haben in ihrem zytoplasmatischen Teil tyrosinreiche Motive, sogenannte „immunoreceptor tyrosine-based activation motifs“ (ITAMs). Bei der Antigenerkennung werden die T-Zell-Rezeptoren und Korezeptoren CD4 und CD28 sowie Integrine zur Kontaktstelle zwischen APC und Th-Zelle rekrutiert und bilden dort die immunologische Synapse aus. Die Bindung des CD28 Korezeptors auf der Th-Zelle an die CD80/CD86 Moleküle auf der APC ist zusätzlich für eine Amplifizierung des TCR-Signals und damit für die vollständige Aktivierung der T-Zelle nötig.

Die Protein Tyrosinkinase (PTK) Lck ist im zytoplasmatischen Teil des CD4 Korezeptors gebunden und phosphoryliert zusammen mit Lck nach Bindung des TZR an den Antigen-MHC II-Komplex die ITAMs in den zytoplasmatischen Domänen der CD3- und  $\zeta$ -Ketten [45].

### 1.3.2 Der proximale Signalkomplex

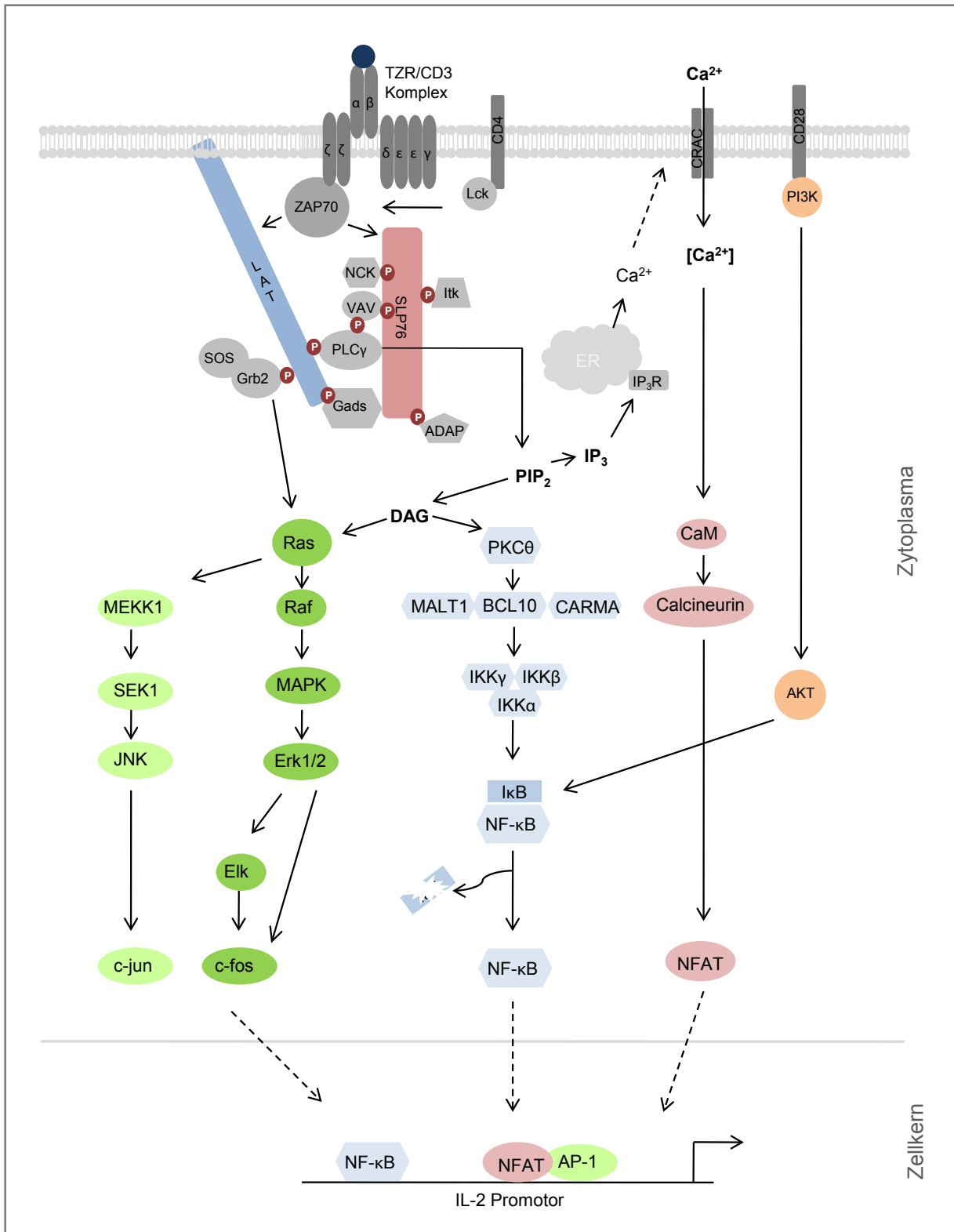
Durch die Phosphorylierung der ITAMs wird die PTK ZAP-70 rekrutiert, durch Lck phosphoryliert und aktiviert [46]. Dies führt zu einer Kaskade von Phosphorylierungsereignissen, die schließlich in der Ausbildung eines Signalkomplexes mündet, der für die Übersetzung des TZR/PTK Signals in viele verschiedene Signalwege verantwortlich ist.

Die wichtigsten Targets von ZAP-70 sind das transmembrane Adapterprotein „linker for the activation of T cells“ (LAT) und das zytosolische Adapterprotein „Src homology 2 (SH2) domain-containing leukocyte phosphoprotein of 76 kDa“ (SLP-76) [47]. Sie bilden das Rückgrat des proximalen Signalkomplexes und sorgen für die Organisation von Effektormolekülen in der richtigen zeitlichen und räumlichen Abfolge. LAT besitzt neun Tyrosinreste, die nach TZR-Stimulation phosphoryliert werden und an die C-terminale SH2-Domäne der Phospholipase C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ), die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und die Adapterproteine „growth factor receptor-bound protein 2“ (GRB2) und „GRB2-related adapter downstream of Shc“ (Gads) binden [47]. GRB2 bindet das Protein „Son of Sevenless“ (SOS), das wiederum zur Aktivierung der GTPase Ras führt [48].

Durch Bindung an ihren gemeinsamen Bindungspartner Gads wird auch SLP-76 zu LAT rekrutiert. SLP-76 besitzt drei Domänen. Zum einen die N-terminale mit drei Tyrosinresten, die mit den SH2 Domänen von Vav1, Nck und der „IL-2-induced tyrosine kinase“ (Itk) interagieren. Des Weiteren eine, die konstitutiv Gads und PLC $\gamma$  bindet sowie eine dritte, C-terminale Domäne, die mit dem „adhesion and degranulation-promoting adapter protein“ (ADAP) und der „hematopoietic progenitor kinase 1“ (HPK1) assoziiert ist [49].

Der proximale Signalkomplex führt zur Aktivierung des PLC $\gamma$  Signalweges, einschließlich der Diacylglycerol (DAG) vermittelten und Calcium-abhängigen Prozesse, sowie Rearrangements des Zytoskeletts und der Aktivierung von Integrinen [50].





**Abb. 1.2 Schematischer Überblick über TZR-abhängige Signalwege.** Nähere Erläuterungen: siehe Abschnitt 1.3. Dargestellt sind die Signalmoleküle des proximalen Signalkomplexes in grau (1.3.2), die DAG-abhängigen Signalwege in grün und hellblau (1.3.4), die Ca<sup>2+</sup>-vermittelte Signweiterleitung in rosa (1.3.5) sowie der CD28 kostimulatorische Signalweg in orange (1.3.6).

### 1.3.3 PLC $\gamma$ -Aktivierung und Signaltransduktion

Nach der TZR-Aktivierung befindet sich die PLC $\gamma$  im proximalen Signalkomplex an SLP-76, Vav1 und LAT gebunden. Dort wird sie durch Itk phosphoryliert und damit aktiviert. Aktive PLC $\gamma$  hydrolisiert das Membranlipid Phosphatidylinositol-4,5-Diphosphat (PIP<sub>2</sub>), woraus zwei für die T-Zell-Funktion essentielle Sekundärbotenstoffe, Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP<sub>3</sub>) und DAG, entstehen [51].

### 1.3.4 DAG vermittelte Signalweiterleitung

Die TZR-abhängige Produktion von DAG resultiert in der Aktivierung zweier Haupt-Signaltransduktionswege, die zum einen durch Ras und zum anderen durch die PKC $\theta$  vermittelt werden.

Die GTPase Ras wird für die Aktivierung der Serin-Threonin Kinase Raf-1 benötigt. Diese wiederum leitet eine „mitogen-associated protein“ (MAPK) Phosphorylierungs- und Aktivierungskaskade ein, die schließlich in der Aktivierung der extracellular signal-regulated kinase 1 (Erk1) und Erk2 mündet. Dadurch wird der Transkriptionsfaktor Elk1 aktiviert, der die c-fos-Expression reguliert. Zudem wirkt Erk auf die Phosphorylierung und damit Aktivierung von c-fos. So steht die Erk Aktivität in direktem Zusammenhang mit der Bildung von AP-1, das aus einem Heterodimer aus aktiviertem jun und fos besteht [52].

Ras aktiviert zudem im Zusammenspiel mit Vav1 die „c-jun-N-terminal kinase“ (JNK)-Kaskade, indem beide die Serin/Threonin-Kinase Rac aktivieren. Die JNK-Kaskade führt von Rac weiter über die Kinasen Mekk1 und SAP/ERK-Kinase1 (SEK1) zur Aktivierung von JNK. Die JNK phosphoryliert schließlich den anderen Teil von AP-1, den Transkriptionsfaktor c-jun [53, 54].

Der zweite DAG-aktivierte Signalweg wird durch die PKC $\theta$  vermittelt. Diese wird nach TZR-Aktivierung zur Plasmamembran rekrutiert. Sie besitzt eine DAG-spezifische Lipid-Bindedomäne. Die DAG-Bindung führt schließlich zur Aktivierung der PKC $\theta$  [55].

Ein essentieller Signalweg, der durch die PKC $\theta$  reguliert wird, ist die NF- $\kappa$ B-Aktivierung (siehe 1.3.8.3). In unstimulierten Zellen befindet sich NF- $\kappa$ B im Zytosol an den Inhibitor of NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B) gebunden, der es davon abhält, in den Kern zu translozieren. Nach TZR-Stimulation phosphoryliert die PKC $\theta$  das membrangebundene „Scaffold“ Protein CARMA1. Daraufhin bildet CARMA1 einen Komplex mit BCL10, das wiederum von „mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1“ (MALT1) gebunden wird. Das hat die Phosphorylierung von I $\kappa$ B durch den I $\kappa$ B Kinase (IKK) Komplex zur Folge, wodurch I $\kappa$ B ubiquitinyliert und degradiert wird. So wird NF- $\kappa$ B schließlich von seinem Inhibitor befreit und kann in den Kern translozieren [53].

### 1.3.5 Calcium-abhängige Signalwege

Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) Ionen sind wichtige sekundäre Botenstoffe in eukaryotischen Zellen. Das  $\text{IP}_3$ , das nach der Stimulation des TZR durch die PLC $\gamma$  gebildet wird (siehe 1.3.3), stimuliert  $\text{Ca}^{2+}$  permeable Ionenkanal Rezeptoren ( $\text{IP}_3\text{R}$ ) auf der Membran des Endoplasmatischen Reticulums (ER). Die führt zu einer Öffnung der ER  $\text{Ca}^{2+}$  Speicher und damit zur Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  in das Zytoplasma. Dadurch werden die  $\text{Ca}^{2+}$  release-activated  $\text{Ca}^{2+}$  (CRAC) Kanäle in der Plasmamembran aktiviert und ein anhaltender Einstrom von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  hervorgerufen [56]. Daraufhin werden diverse  $\text{Ca}^{2+}$ - und Calmodulin-abhängige Transkriptionsfaktoren und Signalproteine aktiviert. Dazu gehört auch die  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Ser/Thr Phosphatase Calcineurin, die nach Stimulation die Mitglieder der NFAT Familie (siehe 1.3.8.1) dephosphoryliert. Die Dephosphorylierung führt zur Aktivierung und Translokation der Transkriptionsfaktoren in den Zellkern. Dort formt NFAT kooperativ Komplexe mit einer Vielzahl unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren, wodurch verschiedene Signalwege integriert werden und je nach NFAT-Bindungspartner in unterschiedlichen Genexpressionsmustern resultieren. Der am besten charakterisierte Transkriptionsfaktor-Komplex ist NFAT/AP-1, der die  $\text{Ca}^{2+}$ - und Ras-Signale integriert und die Expression vieler wichtiger Gene für die T-Zell-Aktivierung, wie z.B. IL-2 (siehe 1.4), initiiert. Eine Aktivierung von NFAT in Abwesenheit von AP-1 hingegen führt zur Expression von Genen, die einen anergen Zustand der Zellen fördern [56, 57].

### 1.3.6 Kostimulation

Um Anergie zu vermeiden und eine produktive T-Zell-Aktivierung zu erreichen, benötigt die Zelle neben der Ligation des TZR zusätzliche Stimuli durch andere Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Der Rezeptor CD28, der durch Bindung seiner Liganden CD80 und CD86 auf APC stimuliert wird, liefert dabei die stabilsten und stärksten kostimulatorischen Signale. Aber auch Ox40, ICOS, CTLA-4 und 4-1BB gehören zu den kostimulatorischen Rezeptoren. Der CD28 Signalweg fördert die T-Zell-Proliferation, Zytokin-Produktion, das Überleben und den zellulären Metabolismus [58]. Ein Schlüsselereignis nach Stimulation des CD28 Rezeptors ist die PI3K-Aktivierung, die zur anschließenden Aktivierung der Serin/Threonin Kinase AKT führt. AKT ist in der Lage, ein großes Spektrum an Proteinen zu phosphorylieren und somit Einfluss auf viele unterschiedliche zelluläre Prozesse zu nehmen. So wird durch AKT die nukleare Translokation von NF- $\kappa$ B verstärkt und damit auch die Transkription anti-apoptotischer Gene (z.B. Bcl-xl). Die Glykogensynthase Kinase 3 (GSK-3), die NFAT im

Kern phosphoryliert und aus dem Kern exportiert, ist auch ein Target von AKT. GSK-3 wird durch AKT inaktiviert, so dass NFAT nicht phosphoryliert wird und länger aktiv im Kern zur Gentranskription beitragen kann [59, 60].

Viele der CD28-abhängigen Signalwege werden auch durch die Ligation des TZR allein aktiviert, die T-Zell-Antwort wird jedoch durch die zusätzliche CD28 Stimulation erheblich verstärkt. Daraus lässt sich schließen, dass die CD28-Aktivierung in erster Linie quantitative statt qualitative Auswirkungen auf die T-Zell-Aktivierung ausübt. Allerdings können auch quantitative Unterschiede in der Signalweiterleitung zu qualitativ unterschiedlichen T-Zell-Antworten führen [58].

### 1.3.7 In vitro T-Zell-Stimulation

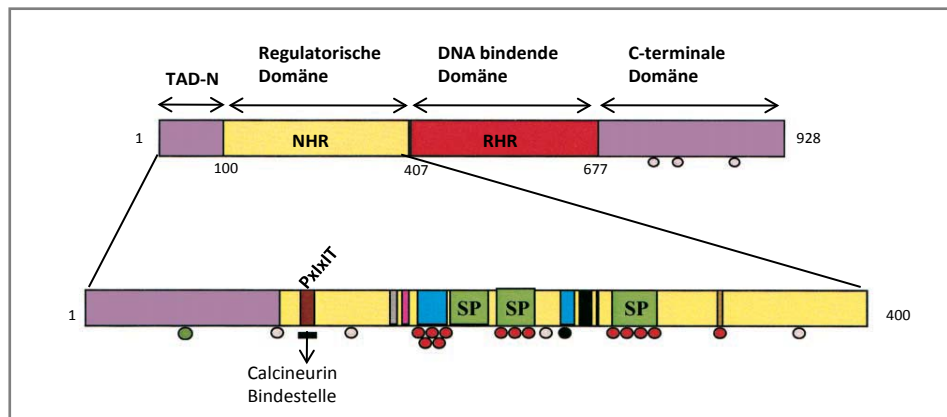
Für die *in vitro* Stimulation von Th-Zellen in dieser Arbeit wurden entweder an magnetische Kügelchen gekoppelte Antikörper gegen CD28 und CD3 verwendet, die alle unter 1.3 beschriebenen Signalmoleküle und Kaskaden aktivieren oder die pharmakologischen Substanzen Ionomycin und Phorbol-12-myristyl-13-acetat (PMA). Ionomycin ist ein Calciumionophor, das einen Calciumeinstrom bewirkt, der die  $Ca^{2+}$ -abhängigen Signalwege, wie den Calcineurin/NFAT Weg, aktiviert [61]. Ionomycin-Behandlung führt zu einem gesättigten intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Spiegel, der durch Stimulation mit Antigenen nicht erreicht wird. Die Behandlung der Zellen mit PMA simuliert den Kostimulus, indem es direkt die PKCs bindet und aktiviert [62]. Durch die Verwendung von PMA und Ionomycin werden die Zellen vollständig stimuliert, jedoch werden der proximale Signalkomplex (siehe 1.3.2) sowie die PLC $\gamma$  Aktivität (siehe 1.3.3) dabei umgangen, da sie im Signalweg oberhalb der PKCs und des  $Ca^{2+}$ -Einstroms liegen und deshalb nicht aktiviert werden.

### 1.3.8 T-Zell-Rezeptor- und CD28-abhängig aktivierte Transkriptionsfaktoren

Am Ende der unter 1.3 beschriebenen Signalwege steht die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren. Die drei am besten untersuchten und für die initialen T-Zell-Antworten entscheidenden Transkriptionsfaktoren sind NFAT, AP-1 und NF- $\kappa$ B. Da sie essentiell für die in dieser Arbeit behandelte Induktion der IL-2-Expression sind, werden sie in den folgenden Punkten näher betrachtet.

## 1.3.8.1 NFAT

Ursprünglich wurde NFAT als induzierter, nukleärer Faktor beschrieben, der an den *IL-2*-Promotor in T-Zellen bindet [63]. Im Laufe der Zeit wurden fünf verschiedene Mitglieder der NFAT Familie charakterisiert: NFATc2, NFATc1, NFATc3, NFATc4 und NFAT5. Dabei nimmt NFAT5 eine Sonderstellung ein, weil es als einzige Isoform nicht von Calcineurin



**Abb. 1.3 Allgemeine Struktur der NFAT Proteinsequenz.** Dargestellt sind die N-terminale Transaktivierungsdomäne (TAD-N), die regulatorische Domäne (RHR) und die C-Terminale Domäne der NFAT Proteine. Einige NFAT Isoformen oder Splice-Varianten besitzen veränderte N- oder C-Termini. Der Vergrößerungsausschnitt zeigt die regulatorische Domäne. Konservierte Sequenzmotive sind als farbige Kästchen dargestellt: zwei Serinreiche Regionen (SRR-1 und 2), drei SPxx repeat Motive (SP-1 bis 3), die Calcineurin-Bindestelle (PxlIT) und die Kernlokalisierungssequenz (NLS). Phosphorylierungsstellen sind durch gefüllte Kreise markiert [64]. Phosphoserine, die nach Aktivierung dephosphoryliert werden sind rot, nicht-konservierte Phosphoserine in grau, die konservierten Phosphoserine, die N-terminal der NLS liegen, in schwarz und die induzierbare Phosphorylierungsstelle in der TAD-N ist grün dargestellt. Abbildung modifiziert nach [65].

aktiviert wird und die zelluläre Antwort auf osmotischen Stress kontrolliert. NFAT5, das bei der antigenspezifischen Aktivierung von T-Zellen keine Rolle spielt, wird im Folgenden nicht näher betrachtet.

Die Expression der NFAT Transkriptionsfaktoren ist nicht auf T-Zellen beschränkt, vielmehr konnten sie in fast allen Zellarten auch außerhalb des Immunsystems detektiert werden, wo sie eine Vielzahl regulatorischer Funktionen übernehmen [63, 66]. Jedes der NFAT Proteine besteht aus zwei oder mehr alternativen Splice-Varianten mit unterschiedlichen Amino (N)- und Carboxyl (C)-Termini, wobei die Kernregion konserviert ist [67]. Diese Kernregion der NFAT Proteine setzt sich aus einer regulatorischen Domäne, die auch „NFAT-homology region“ (NHR) genannt wird, und einer DNA-bindenden Domäne, der „Rel homology region“ (RHR), zusammen. Die NHR besteht aus einer starken Transaktivierungsdomäne und dreizehn konservierten Serin-Resten, die in ruhenden T-Zellen phosphoryliert sind. In der NHR befinden sich zudem Bindedomänen sowohl für die Phosphatase Calcineurin als auch für die NFAT Kinasen (siehe Abbildung 1.3). Nach Stimulation der T-Zellen bindet das

aktivierte Calcineurin an spezifische Bindestellen und dephosphoryliert alle 13 Serin-Phosphorylierungsstellen der NHR [64]. Dadurch entsteht eine Konformationsänderung des Proteins, woraufhin die Kernlokalisierungssequenz (NLS) demaskiert wird. Mit Hilfe der Importrezeptoren Importin- $\alpha$  und  $-\beta$  wird das aktivierte NFAT in den Kern transportiert [68, 69]. Kommt es zu einem Abfall der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration oder wird die Calcineurin-Aktivität gehemmt, wird NFAT durch die konstitutiv aktiven Kinasen PKA, GSK3 oder Casein Kinase 1 (CK1) wieder rephosphoryliert. Das führt zum Export von NFAT aus dem Nukleus und damit zum Abbruch der NFAT-induzierten Gentranskription [60, 70].

In peripheren Th-Zellen scheinen NFATc1 und NFATc2 eine herausragende Rolle für die Differenzierung und Zytokinproduktion zu spielen [71]. NFATc3 dagegen wird überwiegend in Thymozyten exprimiert und kontrolliert die  $\text{CD8}^+\text{CD4}^+$  Thymozytenentwicklung (siehe Tabelle 1). In unstimulierten, reifen Th-Zellen macht das konstitutiv exprimierte NFATc2 80-90% des gesamten NFATs aus, so dass es eine prominente Rolle für die initialen TZR Ereignisse einnimmt [72, 73]. NFATc1 liegt in 3 Isoformen vor, von denen zwei (NFATc1/B und NFATc1/C) konstitutiv exprimiert werden. Die kleine Isoform, NFATc1/A, wird erst nach TZR-Stimulation in einer positiven autoregulatorischen Rückkopplungsschleife stark hochreguliert [74, 75]. Die Funktionen der einzelnen NFAT Proteine in Th-Zellen sind nicht klar abzugrenzen. Versuche mit NFAT defizienten Mäusen zeigten, dass die Deletion von NFATc1 oder NFATc2 zu einem gemäßigten Phänotyp führt, wohingegen eine Defizienz in beiden NFAT Proteinen zum völligen Verlust der Zytokinproduktion und dramatisch eingeschränkten Effektor-Zell-Funktionen führt (Tabelle 1).

Das spricht dafür, dass die NFATc1- und NFATc2-Funktionen teilweise redundant sind, so dass es schwer ist, den einzelnen NFAT Proteinen streng definierte Funktionen zuzuschreiben.

Zudem sind die NFAT-induzierten Genexpressions-Programme stark davon abhängig, mit welchen Transkriptionsfaktor-Partnern NFAT interagiert. Zu diesen Partnern gehören u.a. AP-1, GATA3, T-bet oder Maf [91]. Von besonderer Bedeutung ist dabei AP-1 (siehe 1.3.8.2), das mit NFAT als Heterodimer an spezielle konservierte Bereiche in den Promotoren einer Vielzahl aktivierungsabhängig induzierter Gene bindet (z.B. IL-2, IL-4, IFN- $\gamma$ , FasL, CD25) [76-81]. Ein weiterer wichtiger Transkriptionsfaktor-Partner ist FOXP3. In Treg-Zellen konnte gezeigt werden, dass NFAT als Heterodimer mit FOXP3 an die NFAT/AP-1 -Bindestellen im IL-2 Promoter bindet und auf diese Weise die *IL-2* Transkription inhibiert (siehe 1.5.2) [82].

Somit ist NFAT ein wichtiger Faktor, um die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale mit anderen Signalwegen, die NFAT Partner aktivieren, zu verbinden.

Aufgrund der Rel DNA Bindedomäne, die zwischen NFAT und NF-κB stark homolog ist, sind die NFAT Proteine aber auch in der Lage, ohne Partner als Homodimere an NF-κB-Bindemotive zu binden. Kürzlich wurde diesen Homodimeren eine besondere Rolle in

**Tabelle 1 Übersicht über den Phänotyp NFAT defizienter Mäuse.** Modifiziert nach Macian et.al., 2001 [65].

NFAT Protein	Synonyme	Regulation	Phänotyp bei Defizienz im Immunsystem	Referenz
NFATc2	NFAT1 NFATp	Ca <sup>2+</sup> / Calcineurin	Gemäßigte Hyperproliferation mit Splenomegalie, mäßig gesteigerte B- und T-Zell Antworten mit Tendenz zur Th2 Immunität, anhaltende IL-4 und gesenkte IFNγ und IL-2-Expression nach TZR Stimulation	[83-85]
NFATc1	NFAT2 NFATc	Ca <sup>2+</sup> / Calcineurin	Verminderte Th2-Antwort und IL-4-Produktion, reduzierte T-Zellproliferation, eingeschränkte Migration in lymphatische Organe	[86, 87]
NFATc4	NFAT3	Ca <sup>2+</sup> / Calcineurin	NFATc4 wird nicht im Immunsystem exprimiert	
NFATc3	NFAT4 NFATx	Ca <sup>2+</sup> / Calcineurin	Eingeschränkte Entwicklung von CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> Zellen aufgrund verstärkter Apoptose doppelt positiver CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> Zellen	[88, 89]
NFAT5	TonEBP, NFATz, NFATL1	Osmotischer Stress	Eingeschränkte T-Zell Funktion unter hyperosmotischen Bedingungen, degenerierte Struktur von Thymus und Nieren	[90]
NFATc2 und NFATc1			Eingeschränkte T-Zell Effektorfunktionen, kaum Zytokinproduktion oder zytolytische Aktivität, B-Zell Hyperaktivität	[91, 92]
NFATc2 Und NFATc3			TZR Hyperaktivität und schwere lymphoproliferative Störung, verstärkte Th2 Antwort, Allergien, Pneumonitis	[89]

der Genexpression von Anergie-assoziierten Genen zugesprochen. Es wird spekuliert, dass aufgrund des fehlenden Kostimulus und damit fehlender AP-1-Aktivierung NFAT vermehrt Homodimere bildet und die Transkription von Genen fördert, die Anergie auslösen [93, 94]. Aber auch in anderen Genen wie IL-8 konnte die Bindung von NFAT Dimeren an den Promotor gezeigt werden.

Aufgrund der bedeutenden Rolle, die den Mitgliedern der NFAT-Familie bei der Kontrolle der T-Zell-Aktivierung und -Differenzierung zukommt, werden sie weitverbreitet als Ziel für therapeutische Ansätze zur Regulation der Immunantwort genutzt. Die meisten in der klinischen Praxis genutzten Immunsuppressiva wie FK406 oder CsA hemmen allerdings die Aktivität der Phosphatase Calcineurin und nicht direkt die NFAT Dephosphorylierung, so dass auch die Dephosphorylierung aller anderen Substrate von Calcineurin gehemmt wird. Dies trägt unmittelbar zu den gefährlichen Nebenwirkungen dieser Therapien, z.B. Nephrotoxizität, bei [95].

#### 1.3.8.2 AP-1

Der Transkriptionsfaktor AP-1, der zusammen mit NFAT an kombinierten DNA-Bindestellen starke kooperative Komplexe bildet, setzt sich aus Homo- oder Heterodimeren der Fos (c-fos, fra-1, fra-2)- und Jun (c-jun, junB, junD)- Familie zusammen [96]. Die Dimerbildung erfolgt über ein Leucin-Zipper-Motiv, das die Helices der beiden Monomere über eine hydrophobe Wechselwirkung der Leucinreste verbindet. Dabei besitzen die individuellen Jun und Fos Proteine unterschiedliche Transaktivierungs-Potentiale. Während c-fos, c-jun und FosB starke Aktivatoren sind, weisen JunB, JunD, Fra-1 und Fra-2 nur schwache Transaktivierungs-Potentiale auf. Unter bestimmten Umständen agieren die schwachen Aktivatoren sogar als Repressoren der AP-1 Aktivität, indem sie mit den aktiven AP-1 Dimeren um die Bindung an AP-1 -Bindestellen konkurrieren oder inaktive Dimere mit c-fos, c-jun oder FosB bilden [97]. So wirkt der c-jun/c-fos Komplex stimulierend auf die IL-2-Expression, wohingegen JunB/c-fos Komplexe oder die Substitution von c-fos durch Fra-1 oder Fra-2 inhibierend auf die Gentranskription wirken [98].

Für die Bildung der AP-1 Komplexe ist nach TZR-Stimulation die ERK-abhängige *de novo* Synthese und Phosphorylierung der Fos-Komponenten sowie die Phosphorylierung von c-jun durch die JNK (siehe 1.3.4) erforderlich [99, 100]. Die maximale AP-1 vermittelte Transaktivierung wird nur nach Stimulation des TZR und des CD28 Kostimulus, bzw. nach kombinierter Stimulation mit Ca<sup>2+</sup> Ionophoren und Phorbolestern erreicht [101].



### 1.3.8.3 NF- $\kappa$ B

Die NF- $\kappa$ B Transkriptionsfaktor-Familie besteht aus NF- $\kappa$ B1 (p50/p105), NF- $\kappa$ B2 (p52/p100), RelA (p65), c-Rel und RelB. NF- $\kappa$ B1 und NF- $\kappa$ B2 werden als lange Vorprodukte p105 bzw. p100 synthetisiert, die dann posttranslational in die DNA-bindenden Untereinheiten p50 und p52 prozessiert werden [102].

Alle NF- $\kappa$ B Proteine besitzen eine N-terminale Rel homology Domain (RHD). Diese besteht aus einer Kernlokalisierungssequenz (NLS) und ist verantwortlich für die Bildung von Hetero- und Homodimeren sowie die sequenzspezifische Bindung an die DNA. P65, c-Rel und RelB besitzen zudem eine C-terminale Transaktivierungsdomäne (TAD), die den p52 und p50 Untereinheiten fehlt. Daher müssen p52 und p50 mit anderen Mitgliedern der NF- $\kappa$ B Familie interagieren, um die Transkription von Target-Genen zu regulieren. P50 dimerisiert bevorzugt mit p65 und c-Rel, während p52 mit RelB Heterodimere bildet [103]. Nach initialer NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch TZR-Stimulation (unter 1.3.4 beschrieben) werden hauptsächlich p65/p50 Dimere gebildet, die bei anhaltender Stimulation durch p50/c-Rel Dimere ersetzt werden [104]. So ist p65 bereits 30 min nach Stimulation im Zellkern detektierbar, während c-Rel erst einige Stunden später im Kern nachweisbar ist. Es wird spekuliert, dass p65 und p105/p50 in ruhenden Zellen konstitutiv exprimiert und nach Stimulation sofort aktiviert werden, wohingegen c-Rel erst nach Stimulation NFAT-abhängig *de novo* synthetisiert wird [105]. P65 im Komplex mit p50 gilt daher als initialer Transkriptionsfaktor bei der T-Zell-Aktivierung bzw. IL-2-Expression, während c-Rel für die Aufrechterhaltung der IL-2-Produktion zu späteren Zeitpunkten verantwortlich ist [98, 104].

Neben der TZR-abhängigen Aktivierung kann NF- $\kappa$ B auch durch Bindung des proinflammatorische Zytokins TNF- $\alpha$  an den TNF-Rezeptor 1 (TNFR1) aktiviert werden. Dies führt zur NF- $\kappa$ B vermittelten Expression einer Reihe von Genen, die für das Überleben der Zelle von Bedeutung sind [106].

## 1.4 Die Regulation der Interleukin-2-Expression

In den vorhergehenden Kapiteln wurden die Signalwege betrachtet, die zur Initiation der IL-2-Expression in Th-Zellen führen sowie die wichtigsten TZR-abhängigen Transkriptionsfaktoren, deren Expression und Aktivierung für die IL-2-Produktion unerlässlich sind. Im Folgenden soll sowohl die Funktion von IL-2 für die Regulation der Immunantwort näher beschrieben werden, als auch die von vielen Faktoren beeinflusste transkriptionelle Regulation der IL-2-Expression.

### 1.4.1 Bedeutung von IL-2 für das Immunsystem

IL-2 ist ein  $\alpha$ -helikales Zytokin, das in großen Mengen von CD4<sup>+</sup> T-Zellen und weniger von CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach TZR- und Kostimulation produziert wird. Auch aktivierte Dendritische Zellen (DC), NK- und NKT-Zellen können IL-2 exprimieren, es ist jedoch unklar, inwiefern dies biologisch relevant ist [107-109]. Der hochspezifische IL-2 Rezeptor (IL-2R) besteht aus drei Untereinheiten, IL-2R $\alpha$  (CD25), IL-2R $\beta$  (CD122) und dem gemeinsamen gamma chain ( $\gamma$ c) Rezeptor (CD132). Zur Assoziation der einzelnen Untereinheiten kommt es erst, wenn IL-2 an CD25 bindet. CD122 und CD132 werden konstitutiv auf den Zellen exprimiert. CD25 hingegen wird nach TZR-Stimulation durch die Aktivierung von NF- $\kappa$ B, AP-1 und NFAT transient stark hochreguliert. Bindet IL-2 an seinen Rezeptor, kommt es durch einen positiven Rückkopplungsmechanismus zu einer weiteren Erhöhung der initialen CD25-Expression. Dieser Mechanismus verstärkt die IL-2 Bindung und die damit verbundene Signalweiterleitung in aktivierten Th-Zellen [110].

IL-2 wurde vor mehr als 30 Jahren als Wachstumsfaktor in Überständen aktivierter T-Zellkulturen entdeckt [111]. In den folgenden Jahrzehnten haben *in vitro* Studien gezeigt, dass die IL-2-Produktion und die IL-2/IL-2R Interaktion in Th-Zellen ausschlaggebend für die Aktivierung, klonale Expansion und Effektor-Zell-Entwicklung ist [112]. Spätere *in vivo* Studien mit IL-2-, CD25- oder CD122-defizienten Mäusen führten jedoch nicht wie erwartet zu einem immundefizienten Phänotyp, sondern vielmehr zu Hyperproliferation und autoimmunen Funktionsstörungen [113, 114].

Inzwischen deutet einiges darauf hin, dass der Grund für die Autoimmunität, die durch IL-2/IL-2R-Defizienz entsteht, ein Defekt in der Produktion und Funktion von regulatorischen T-Zellen ist. So konnte durch Zugabe von IL-2 oder adoptivem Transfer von IL-2 produzierenden Zellen die Treg-Entwicklung und T-Zell-Homöostase in IL-2 defizienten Mäusen wieder hergestellt werden [115]. Zudem war der adoptive Transfer von Wildtyp Treg-Zellen in IL-2/IL-2R-defiziente Mäuse ausreichend, um die Entstehung von Autoimmunerkrankungen zu verhindern. Diese Versuche verdeutlichen, dass das Hauptproblem IL-2 defizienter Mäuse tatsächlich der Mangel an funktionsfähigen Treg-Zellen ist [115, 116].

Ein weiterer interessanter Aspekt der Funktion von IL-2 ist die inhibitorische Wirkung auf die Th17-Zell-Differenzierung. Stimulierte naive, periphere Th-Zellen können in Anwesenheit von TGF- $\beta$  und IL-2 zu induzierten Treg Zellen differenzieren (siehe 1.2.2.4). TGF- $\beta$  in Kombination mit IL-6 hingegen bewirkt die Differenzierung in Th17-Zellen, die teilweise zur Immunreaktion gegen Autoantigene beitragen. Durch die Zugabe von IL-2 kann die Th17-Entwicklung reduziert werden [117]. Folgerichtig führt die Blockierung des IL-2R Signalweges zu einer erhöhten Th17-Zell-Differenzierung. Aufgrund dieser Beobachtungen

wurde postuliert, dass zwei IL-2 vermittelte Mechanismen autoimmune Entzündungsreaktionen verhindern können: Die Induktion und Expansion von iTreg-Zellen in der Peripherie und die Inhibierung der Th17-Zell-Differenzierung. Somit könnten Veränderungen der IL-2 Konzentration sowohl pathogene als auch therapeutische Konsequenzen nach sich ziehen.

Neben der Wirkung von IL-2 auf die Treg- und Th17-Zell-Population konnten auch die *in vitro* generierten Daten zur Stimulation der Th-Zell-Antwort durch IL-2 teilweise *in vivo* reproduziert werden. So ermöglichen IL-2 Signale während der primären Immunantwort sowohl eine optimale CD4<sup>+</sup> T-Zell-Antwort als auch die Erzeugung langlebiger Gedächtnis-Th-Zellen [118, 119]. Zudem sorgt das IL-2 Signal während der Th2 Differenzierung für die Induktion und den Erhalt der IL-4R $\alpha$ -Expression und damit Stabilität des Th2 Phänotyps [120]. Bei Zytotoxischen T-Zellen induziert ein starker IL-2 Stimulus die Proliferation naiver CD8<sup>+</sup> T-Zellen und ihre Differenzierung in Gedächtnis-CD8<sup>+</sup> Zellen [121].

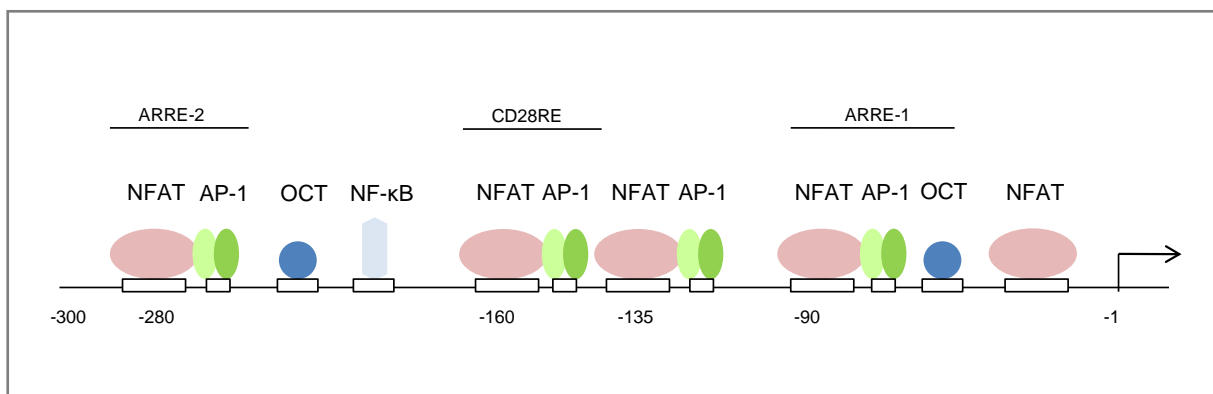
**Tabelle 2 Die Wirkung von IL-2 *in vivo*.**

<b>Wirkung von IL-2 auf</b>	
<b>Immunantwort</b>	<b>Toleranz</b>
Differenzierung und Überleben langlebiger CD4 <sup>+</sup> T-Zellen	Inhibierung der Th17-Zell Induktion
T-Zell Proliferation	Induktion von Treg-Zellen in der Peripherie
Stabilität des Th2 Phänotyps	Differenzierung von Treg-Zellen im Thymus
Differenzierung naiver CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in Gedächtnis-Zellen	Homöostase und Funktion von Treg-Zellen in der Peripherie

IL-2 scheint somit *in vivo* gegenläufige Effekte zu erzielen. Auf der einen Seite dient es der T-Zell-Aktivierung und der Entwicklung von Effektorfunktionen sowie dem immunologischen Gedächtnis, auf der anderen Seite der Aufrechterhaltung der zentralen Toleranz durch die Vermittlung der Treg-Zell-Homöostase und -Funktion. Damit ist die Regulation der IL-2-Expression von außerordentlicher Bedeutung für die Balance zwischen Effektorfunktionen und Toleranz während einer Immunantwort.

### 1.4.2 Transkriptionelle Regulation der IL-2-Expression

Die *IL-2* Gen-Aktivität hängt von einer kontinuierlichen, simultanen Stimulation des TZR und des CD28 Korezeptors ab [122]. Unter diesen Bedingungen ist bereits nach 30 min *IL-2* mRNA detektierbar, wobei die maximale Expression nach 4-8 h erreicht wird. Der *IL-2*-Promotor besteht aus einem hoch konservierten, 300 bp umfassenden minimalen regulatorischen Element, das direkt vor dem Transkriptionsstart liegt. Dieser proximale Promotorbereich besitzt eine hohe Dichte an Transkriptionsfaktor-Bindestellen (siehe Abbildung 1.4). So wurden in dieser Region zwei TZR-abhängige Regulationselemente, die ARRE-1 und ARRE-2 („antigen regulatory response element“) Elemente, sowie das CD28-abhängige Regulationselement CD28RE (CD28 response element) beschrieben [123]. Das distale Regulationselement ARRE-2 beinhaltet eine gemeinsame Bindestelle, die nach Stimulation von NFAT und AP-1 gebunden wird. Das proximale ARRE-1 Element bindet den NFAT/AP-1 Komplex zusammen mit OCT [124, 125].



**Abb. 1.4 Übersicht über regulatorische Transkriptionsfaktor-Bindestellen am proximalen *IL-2*-Promotor.** Dargestellt ist der 300 bp vor dem Transkriptionsstartpunkt gelegene proximale *IL-2* Promoter mit den ARRE-1 und ARRE-2 (antigen response elements), dem CD28-abhängigen Regulationselement CD28RE (CD28 response element) sowie den DNA-Bindestellen für die aktivierungsabhängigen Transkriptionsfaktoren NFAT, AP-1 und NF-κB. Die Aktivierung von OCT erfolgt stimulationsunabhängig [126].

Das CD28-abhängige Regulationselement CD28RE (CD28 response element) wurde zunächst als NF-κB bindendes Element beschrieben [127]. Neuere Studien zeigen allerdings, dass die Bindestelle während der initialen Stimulation durch einen weiteren NFAT/AP-1 Komplex gebunden wird. Erst zu einem späteren Zeitpunkt nach Stimulation bindet schließlich NF-κB an das CD28RE [126, 128]. Die initiale Integration des TZR- und CD28-Stimulus wird somit hauptsächlich durch die kooperative Bindung des  $Ca^{2+}$ -abhängig aktivierten NFAT und des durch Kostimulation stark induzierten AP-1 erreicht. Neben diesen Elementen enthält der minimale *IL-2*-Promotorbereich weitere funktionell relevante *cis*-

regulatorische Elemente, wie einzelnen NF- $\kappa$ B-, OCT- und NFAT-Bindestellen sowie einer zusätzlichen gemeinsamen NFAT/AP-1-Bindestelle [126].

*In vivo* Footprinting Experimente zeigen, dass die Bindung aller Transkriptionsfaktoren mit Ausnahme von OCT stimulationsabhängig ist [129]. Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass die Bindung der einzelnen Transkriptionsfaktoren an die DNA nur möglich ist, wenn alle Faktoren gleichermaßen aktiviert sind. So verhindert die Behandlung der Zellen mit CsA nicht nur die Dephosphorylierung und DNA-Bindung von NFAT, sondern die Bindung aller Transkriptionsfaktoren am *IL-2*-Promoter. Folglich wird die Induktion der *IL-2*-Expression inhibiert. Aber nicht nur die Induktion der Genexpression kann durch CsA unterbunden werden. Dem Zusatz von CsA zu einem späteren Zeitpunkt nach Stimulation folgt ebenfalls ein sofortiger Abbruch der *IL-2*-Expression. Das deutet darauf hin, dass der DNA-Transkriptionsfaktor-Komplex keinesfalls statisch ist, sondern sich in einem dynamischen Gleichgewicht aus Zerfall und Neubildung befindet [129]. So sind neben der Aktivierung auch die Konzentrationen der einzelnen Transkriptionsfaktoren, die der Komplexbildung zur Verfügung stehen, von großer Bedeutung für eine stabile *IL-2*-Produktion [130].

Die Untersuchung der *IL-2*-Expression auf Einzelzellebene belegte, dass sie einer Alles-oder-nichts-Entscheidung unterliegt, also binär reguliert wird [131]. Somit muss es innerhalb der TZR-Signalweiterleitung Schalter-Mechanismen geben, die ein graduelles Signal (die Stärke des Stimulus) in eine binäre Th-Zellantwort (*IL-2*-Expression) umwandeln.

Es wurden drei potentielle Mechanismen beschrieben, die nach TZR-Stimulation als molekularer Schalter fungieren können:

1. Die NFATc2-Aktivierung nach TZR-Stimulation ist binär. In Einzelzell-Studien wurde gezeigt, dass NFATc2, aber nicht NF- $\kappa$ B, binär in den Kern transloziert und maßgeblich als Schalter für die *IL-2*-Expression dient [131].
2. Positve- und negative-Rückkopplungsmechanismen in der TZR-Signalkaskade führen zu bimodalem Verhalten. Eine positive Rückkopplungsschleife über das Signalmolekül SOS, das die GTPase Ras aktiviert sowie ein doppelt-negativer-Rückkopplungsmechanismus, der durch die „SH2-domain-containing tyrosine phosphatase“ (SHIP-1) vermittelt wird, führen zu einer binären Phosphorylierung und damit Aktivierung von ERK [132, 133]. Erk ist u.a. verantwortlich für die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Elk1, der die Expression von *c-fos* induziert [52]. Da *c-fos* als Komponente des AP-1 Heterodimers ein wesentlicher Faktor für die *IL-2*-Expression ist, könnte auch die *c-fos*-Expression als Schalter für die *IL-2*-Produktion dienen. Ob die digitale Erk-Aktivierung tatsächlich eine binäre *c-fos*-Expression nach sich zieht, wurde jedoch noch nicht experimentell nachgewiesen.

3. Ein gradueller Anstieg der Transkriptionsfaktor-Mengen wird in ein Alles-oder-nichts-Signal übersetzt, wenn die Faktoren kooperativ an benachbarte Bindestelle in Promotoren binden [134, 135]. Sollten also alle Transkriptionsfaktoren aktiv im Kern vorliegen, würde zusätzlich die Menge der Proteine als Entscheidungsebene für die IL-2-Produktion fungieren (siehe Abb. 4.1).

Da die Untersuchung der Binarität der IL-2-Expression in Gedächtnis-Th-Zellen nur auf Einzelzellebene möglich ist, wurden im Rahmen dieser Arbeit Färbungen der Transkriptionsfaktoren mit IL-2 für die durchflusszytometrischen Analysen etabliert.

Zusätzlich zu den bereits beschriebenen Entscheidungsebenen wurde in den letzten Jahren gezeigt, dass die Erreichbarkeit der DNA für die Bindung der Transkriptionsfaktoren an den *IL-2*-Promotor auch durch posttranslationale Histon-Modifikationen reguliert wird. In der 1,3 kb umspannenden Region vor dem *IL-2*-Transkriptionsstart sind sechs CpGs lokalisiert, die in naiven Th-Zellen stark methyliert sind und so die Erreichbarkeit des Promotors verhindern. Nach Stimulation werden sie demethyliert, die Transkriptionsfaktoren binden und die IL-2-Expression wird induziert. Lässt man die Zellen nach der Aktivierung ruhen, dauert die Demethylierung der CpGs an, und der nicht stimulationsabhängig aktivierte Transkriptionsfaktor OCT bleibt an der DNA gebunden. Dies könnte dazu beitragen, dass Th-Zellen nach Restimulation schneller IL-2 exprimieren [136]. Zudem besitzt der *IL-2*-Promotor zwei Ikaros-Bindestellen. Ikaros ist ein Zink-Finger DNA-bindendes Protein, das am Umbau des Nukleosoms und des DNA Methylierungs-Komplexes beteiligt ist. Die Nukleosomen im *IL-2*-Promotor sind in naiven Th-Zellen hypoacetyliert. Durch Stimulation wird eine starke H3 und H4 Acetylierung bis 4,3 kb vor dem Transkriptionsstart induziert. In Abwesenheit des Kostimulus jedoch bleiben sie hypoacetyliert. Dieser Phänotyp ist abhängig von Ikaros. Naive Zellen, die ein mutiertes Ikaros exprimieren, das nicht an die DNA binden kann, verlieren ihren charakteristischen hypoacetylierten Zustand. Sie können auch ohne Kostimulus IL-2 produzieren. Somit ist es wahrscheinlich, dass die Ikaros vermittelte Hypoacetylierung auch eine Rolle bei der Unterdrückung der IL-2-Produktion in anergen Th-Zellen spielt [137, 138].

Die IL-2-Produktion in Th-Zellen wird demnach durch eine Vielzahl von Faktoren und Regulationsebenen beeinflusst, die entweder direkt die Transkription stimulieren oder die IL-2-Expression durch die Modifikation des lokalen Chromatins beeinflussen.

## 1.5 Die Signalweiterleitung in regulatorischen T-Zellen

Sowohl die TZR-abhängigen Signalwege als auch die Signalweiterleitung über den IL-2R sind von grundlegender Bedeutung für die Entwicklung und Homöostase von Treg-Zellen. Die Kombination beider Signale ist unerlässlich für die Expression des Transkriptionsfaktors FOXP3, der wiederum entscheidend für die Ausprägung des Treg-spezifischen Phänotyps ist [139]. Nachfolgend werden daher die Bedeutung der Signalwege für periphere Treg-Zellen sowie Unterschiede in der Signaltransduktion zwischen FOXP3<sup>+</sup> und FOXP3<sup>-</sup> Th-Zellen kurz dargestellt.

### 1.5.1 Die TZR-abhängige Signaltransduktion in Treg-Zellen

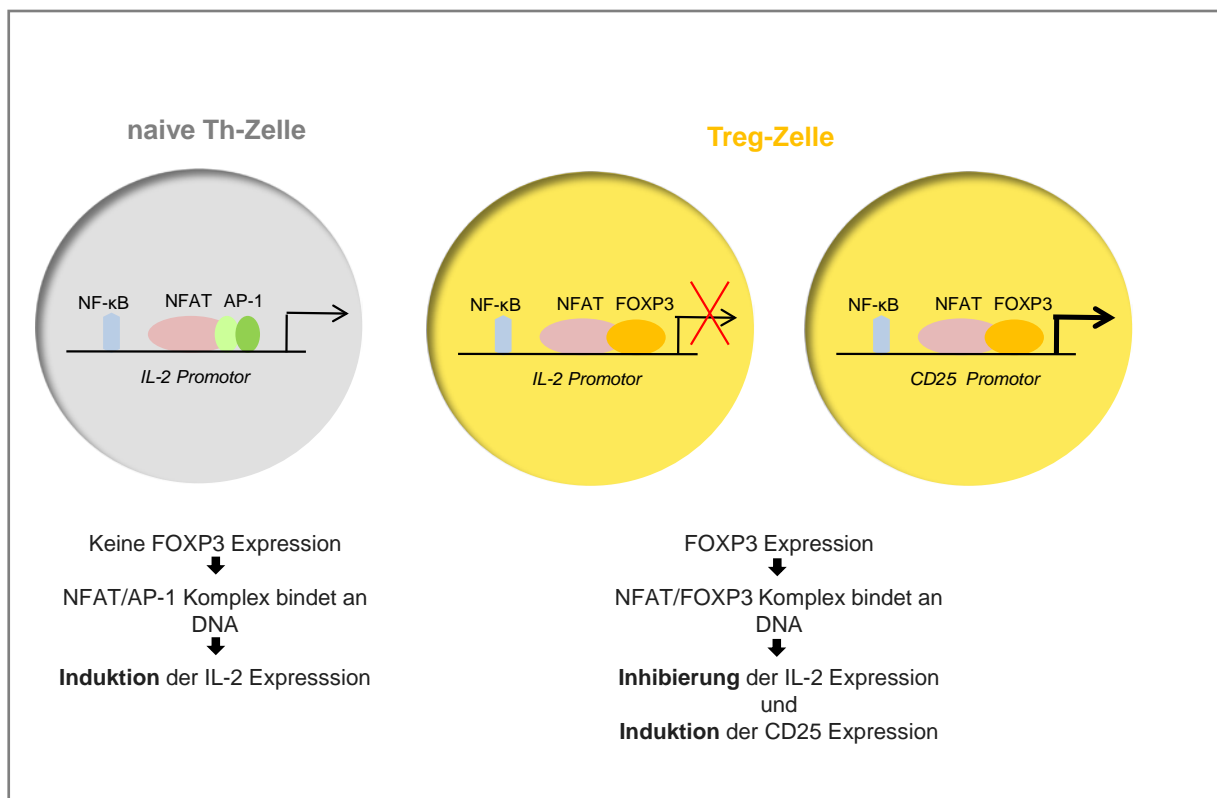
Im Gegensatz zu Effektor Th-Zellen führt die *in vitro* Stimulation des TZR und CD28 in Treg-Zellen weder zur Proliferation noch zur Produktion von Zytokinen [140]. Das bedeutet jedoch keinesfalls, dass Treg-Zellen nicht in der Lage sind, auf TZR-Signale zu reagieren. So benötigen sie die Signalweiterleitung über den TZR, um ihren spezifischen Phänotyp aufrechterhalten zu können [141].

Biochemische Untersuchungen in Treg-Zellen deckten spezifische Defekte in der Expression und Aktivierung einiger Signalmoleküle des TZR-Signalweges auf. Die Aktivierung der PKC- und Ras-ERK-Signalwege stellte sich als unzureichend für die Induktion der IL-2-Expression in Treg-Zellen heraus [142]. Darüber hinaus konnten Defekte im proximalen Signalkomplex gezeigt werden (siehe 1.3.2). So ist die Phosphorylierung der CD3 $\zeta$  Ketten und die anschließende Rekrutierung von ZAP70 gestört. Auch der Ca<sup>2+</sup>-Einstrom sowie die Aktivierung der PLC $\gamma$  (siehe 1.3.3) sind in Treg-Zellen deutlich reduziert [143, 144].

Da der Hauptunterschied zwischen Treg- und Effektor-Zellen in der Expression des Transkriptionsfaktors FOXP3 liegt, wird spekuliert, dass die aufgezeigten Defekte im TZR-Signalweg direkt durch FOXP3 vermittelt werden [145]. Tatsächlich zeigten „ChIP-on-ChIP“ Versuche mit FOXP3 transfizierten, murinen T-Zell-Hybridoma, dass FOXP3 direkt an Genbereiche vieler TZR-Signalmoleküle bindet (z.B. CD3 $\zeta$ , ZAP70, SLP-76, BCL-10). Dies könnte eine geringere Expression dieser Proteine und damit veränderte Signalweiterleitung zur Folge haben [146].

Die Regulation der Genexpression vieler FOXP3 Zielgene wird durch die Stimulation des TZR verstärkt. Darunter sind vor allem Gene, die in Effektor Th-Zellen vom NFAT/AP-1 Komplex reguliert werden, wie CD25, CTLA-4, GITR und IL-2 [65, 146, 147]. Wu *et al.* zeigten in FOXP3 transduzierten Th-Zellen, dass dies auf eine gemeinsame Bindung von FOXP3 und NFAT an die DNA in Treg-Zellen zurückzuführen ist. Dabei bilden NFAT und

FOXP3 ein Heterodimer und binden kooperativ an die Bindestellen, die in FOXP3<sup>-</sup> Th-Zellen von NFAT/AP-1 Komplexen gebunden werden. So wurde beispielsweise die Bindung des NFAT/FOXP3 Komplexes an die ARRE2-Bindestelle im *IL-2*-Promotor nachgewiesen (siehe 1.4.2). Die funktionelle Bedeutung der NFAT/FOXP3 Bindung am *IL-2*-Promotor wurde in Experimenten deutlich, in denen FOXP3 eine Mutation in der Forkhead-Domäne aufweist, die für die Interaktion mit NFAT verantwortlich ist. In Zellen, die das mutierte FOXP3 exprimieren, kommt es nicht zur Bindung des NFAT/FOXP3 Komplexes an die DNA und es findet keine Hemmung der *IL-2*-Expression statt. In diesem Fall agiert FOXP3 TZR-abhängig als Repressor der Genexpression. Die Bindung des NFAT/FOXP3 Komplexes an die Promotoren von *CD25* und *CTLA-4* führt jedoch zu einer gesteigerten Genexpression. Infolgedessen kann FOXP3 sowohl als Repressor als auch als Aktivator (siehe Abb. 1.5) der Genexpression in Treg-Zellen funktionieren [82].



**Abb. 1.5 NFAT im Komplex mit FOXP3 wirkt als transkriptioneller Repressor und Aktivator in Treg-Zellen.** In naiven Th-Zellen bindet NFAT im Komplex mit AP-1 an den *IL-2*-Promotor und induziert die Transkription des *IL-2* Gens. Treg-Zellen exprimieren große Mengen des Transkriptionsfaktors FOXP3. Hier bindet NFAT im Komplex mit FOXP3 an die gemeinsamen NFAT-AP-1 -Bindestellen in den Promotoren der Gene für *IL-2* und *CD25*. Der NFAT/FOXP3 Komplex wirkt als Repressor oder Aktivator der Genexpression in Treg-Zellen.

Die TZR-abhängige Aktivierung von NFAT ist zudem für die Expression von FOXP3 selbst von Bedeutung. Tone *et al.* zeigten, dass die Bindung von NFAT an eine Enhancer-Region des *FOXP3* Gens für die Aufrechterhaltung der FOXP3-Expression in Treg-Zellen benötigt



wird. Darüberhinaus wurden weitere NFAT und AP-1-Bindestellen im proximalen *FOXP3-Promotor* beschrieben [148].

Aus diesen Versuchen lässt sich schließen, dass die TZR-abhängige NFAT-Aktivierung zur Induktion und Aufrechterhaltung der FOXP3-Expression führt. FOXP3 wiederum setzt ein Treg-spezifisches Genexpressionsprogramm in Gang, das für die suppressiven Funktionen sowie die Erhaltung des Treg-Phänotyps sorgt.

In anderen Arbeiten jedoch wurde eine defekte NFAT-Aktivierung und Expression in Treg-Zellen im Vergleich zu Th-Zellen gezeigt [149, 150]. Ob die TZR-Stimulation in Treg-Zellen trotz der oben beschriebenen Defekte in der Signalweiterleitung schließlich zur kompletten Aktivierung der TZR-abhängigen Transkriptionsfaktoren führt, konnte noch nicht eindeutig geklärt werden und ist Gegenstand der Untersuchungen in dieser Arbeit.

### **1.5.2 Bedeutung des IL-2 Signalwegs für Treg- Zellen**

Obwohl IL-2 nicht für die FOXP3-Expression in Thymozyten verantwortlich zu sein scheint, ist die FOXP3-Expression in peripheren Treg-Zellen stark IL-2-abhängig reguliert [151]. So bindet der durch den IL-2 Signalweg aktivierte Transkriptionsfaktor Signal transducer and activator of T cells 5 (STAT5) in Treg-Zellen an den *FOXP3*-Promotor [152]. Dies trägt nicht redundant zur FOXP3-Expression und somit zum Erhalt des Treg-Phänotyps bei [153]. Auch die Induktion von FOXP3 in naiven Th-Zellen in der Peripherie ist abhängig von IL-2 [154]. Wie in Abschnitt 1.4.1 bereits dargelegt, führt eine Defizienz in IL-2 oder CD25 zu schweren Autoimmunerkrankungen aufgrund fehlender Treg-Zell-Funktionen. Das macht die drastische Abhängigkeit der Treg-Zellen von der Aktivierung des IL-2 Signalwegs deutlich. Paradoxerweise benötigen Treg-Zellen die Signalweiterleitung über den IL-2R zur Expansion und Aufrechterhaltung ihrer suppressiven Funktion, aber hemmen gleichzeitig die T-Zell-Antwort, indem sie die IL-2-Synthese in Effektor-Zellen blockieren [155]. Demzufolge scheint ein ausgewogenes Gleichgewicht zwischen aktivierten, IL-2 produzierenden Th-Zellen und suppressiven Treg-Zellen von großer Bedeutung für ein funktionierendes Immunsystem zu sein.

## 1.6 Ziel der Arbeit

Die IL-2-Produktion in Th-Zellen wird induziert, wenn ein breites Netzwerk aus Transkriptionsfaktoren aktiviert wird. Dadurch werden unterschiedliche Signale, die auf die Zelle einwirken, integriert, was schließlich in einer Alles-oder-nichts-Entscheidung zur IL-2-Expression führt. Die Untersuchung, ob sich die Aktivierung und Expression der einzelnen Transkriptionsfaktoren dieses Netzwerkes graduell oder binär auf die IL-2-Produktion in Th-Subpopulationen auswirken, ist nur durch Einzelzell-Analysen möglich. Die Einzelzell-Messung mit Hilfe der Durchflusszytometrie lässt zudem Aussagen zur Abhängigkeit der IL-2-Expression von den Quantitäten der Transkriptionsfaktoren zu.

Die Daten zur Aktivierung und Menge der Transkriptionsfaktoren NFATc2, NF- $\kappa$ B, c-fos und c-jun und deren Auswirkung auf die IL-2-Produktion sollen schließlich als Grundlage für ein mathematisches Modell dienen, das die Relevanz der Transkriptionsfaktor-Konzentrationen und Verhältnisse für die binäre IL-2-Produktion abbildet.

Dazu sollten:

1. die Kofärbungen von IL-2, FOXP3 und NFATc2, c-jun, c-fos bzw. NF- $\kappa$ B in primären, humanen Th-Zellen für die durchflusszytometrische Einzelzell-Analyse etabliert werden. Das ermöglicht die relative Quantifizierung der Transkriptionsfaktoren und die direkte Korrelation mit IL-2. So sollten innerhalb einer Probe verschiedene Th-Zell-Subpopulationen hinsichtlich ihrer Transkriptionsfaktor-Mengen miteinander verglichen werden (z.B. Treg- und Gedächtnis-Th-Zellen, IL-2<sup>+</sup> und IL-2<sup>-</sup> Th-Zellen).
2. Färbungen der Transkriptionsfaktoren zusammen mit FOXP3 in isolierten Zellkernen etabliert werden, um die Aktivierbarkeit der Faktoren in Treg- und Gedächtnis-Th-Zellen auf Einzelzellebene zu vergleichen. So sollte ermittelt werden, ob Treg-Zellen aufgrund einer defekten Aktivierbarkeit der Transkriptionsfaktoren nicht in der Lage sind, IL-2 zu produzieren.
3. die FOXP3-Expression mit der Menge der Transkriptionsfaktoren korreliert werden. Um zu untersuchen, ob FOXP3 in Treg-Zellen einen direkten Einfluss auf die Expression der Transkriptionsfaktoren ausübt, sollte eine zusätzlich eine Chromatin-Immunopräzipitationen mit einem Antikörper gegen FOXP3 etabliert werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Tabelle 3 Chemikalien und Hersteller

Chemikalien	Hersteller
Ammoniumpersulfat (APS)	Carl Roth, Karlsruhe
Beriglobin	ZLB Behring, Marburg
Brefeldin A	Sigma, Taufkirchen
Complete Proteaseinhibitor (EDTA-free)	Roche Diagnostics, Mannheim
Cyclosporin A (CsA)	MPI für Enzymologie, Halle/Saale
APC Mikropartikel	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
CD4 Multisort Mikropartikel	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
CD45RA Mikropartikel	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
CD45RO Mikropartikel	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Taufkirchen
Ficoll-Plaque™ PLUS	Amersham Biosciences, Uppsala, SW
Fixierungs-/Permeabilisierungskonzentrat	eBioscience, San Diego (USA)
Fixierungs-/Permeabilisierungsverdünnung	eBioscience, San Diego (USA)
Ionomycin	Sigma, Taufkirchen
Multisort Freisetzungsreagenz	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Multisort Stopreagenz	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
NP-40	Merck, Darmstadt
Odyssey Blockpuffer	LI-COR, Bad Homburg
Permeabilisierungspuffer (10x)	eBioscience, San Diego (USA)
Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA)	Sigma, Taufkirchen
Propidiumiodid (PI)	Sigma, Taufkirchen
RPMI 1640 Medium	Invitrogen, Karlsruhe
Rotiphorese Gel 30	Carl Roth, Karlsruhe
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Temed	Carl Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Merck, Darmstadt

### 2.1.2 Antikörper

Tabelle 4 Verwendete Antikörper für die Durchflusszytometrie

Antigen	Klon	Konjugat	Hersteller
FoxP3	PCH101	FITC,PE,APC	eBioscience, San Diego (USA)
IFN $\gamma$			DRFZ, hauseigen
IL-2	MQ1-17H12	APC	Becton Dickinson, Heidelberg
CD45RO	UCHL1	FITC	DRFZ, hauseigen
CD45RA	L48	PE-Cy7	Becton Dickinson, Heidelberg
CD127	hIL-7R-M21	PE	Becton Dickinson, Heidelberg
CD25	2A3	APC	Becton Dickinson, Heidelberg
CD3	UCHT1	FITC	DRFZ, hauseigen
CD4	TT1	PE,Cy5	DRFZ, hauseigen
NF- $\kappa$ Bp65	F-6	FITC	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz (USA)
p-c-jun	KM-1	AF488	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz (USA)
c-jun	H-79	AF488,PE	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz (USA)
c-fos	4	PE	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz (USA)
c-fos	K-25	AF488	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz (USA)
T-bet	eBio4B10	AF647	eBioscience, San Diego (USA)
IL-17A	eBio64CAP17	PE,FITC,APC	eBioscience, San Diego (USA)
Gata-3	TWAJ	AF647	eBioscience, San Diego (USA)
rat IgG <sub>2a</sub> - Isotyp	eBR2a	PE	eBioscience, San Diego (USA)
m IgG- Isotyp	P3	AF647, AF488	eBioscience, San Diego (USA)
M IgG- Isotyp		FITC	Becton Dickinson, Heidelberg

Tabelle 5 Antikörper für die Chromatin-Immunopräzipitation

Antigen	Klon	Hersteller
FOXP3	polyklonal	Abcam, Cambridge (UK)
IgG-Kontrolle (Goat IgG)	polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz (USA)

Tabelle 6 Antikörper für den Western Blot

Antigen	Klon	Hersteller
c-fos	9F6	Cell Signaling, Danvers (USA)
c-fos pSer <sup>374</sup>	34E4	Calbiochem, Nottingham (UK)
c-jun	60A8	Cell Signaling, Danvers (USA)
c-jun pSer <sup>63</sup>	Y172	Epitomics, Burlingame (USA)
NFATc2	IG209	Immunoglobe, Himmelstadt
NF-κBp65	polyklonal	Cell Signaling, Danvers (USA)
NF-κBp65 pSer <sup>536</sup>	93H1	Cell Signaling, Danvers (USA)
NF-κBp105/50	E381	Epitomics, Burlingame (USA)
beta-Actin	C4	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz (USA)
m IgG AF800	polyklonal	Molecular Probes, Invitrogen
r IgG AF700	polyklonal	Molecular Probes, Invitrogen

Tabelle 7 Antikörper für die T-Zell-Stimulation

Antigen	Hersteller
Dynabeads human T-Activator CD3/CD28	Invitrogen Dynal AS, Oslo (Norwegen)

### 2.1.3 Reaktionskits

Tabelle 8 Verwendete Reaktionskits

Bezeichnung	Hersteller
LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I (qRT-PCR)	Roche, Mannheim
Nucleo Spin Extract II (DNA Aufreinigungskit)+ NEB-Puffer	Macherey und Nagel, Düren

### 2.1.4 Analyse-Software

Tabelle 9 Verwendete Software zur Analyse experimenteller Daten

Name	Hersteller
FlowJo-FACS-Analysesoftware	Tree Star, Inc., Ashland (USA)
Odyssey®Software	LI-COR Biosciences, Bad Homburg

GraphPad Prism	GraphPad Software, Inc., La Jolla (USA)
RelQuant	Roche, Mannheim

### 2.1.5 Geräte

Tabelle 10 Verwendete Geräte

Geräte	Hersteller
AutoMACS	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Blotapparatur	Bio-Rad, München
CASY Zellzählgerät	Schärfe System, Reutlingen
FACS Aria Zellsortiersystem	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS Calibur System	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS LSRII System	Becton Dickinson, Heidelberg
MultiMACS M96 Separator	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Gelapparatur	Biometra, Göttingen
Heizblock Thermomixer Kompakt	Eppendorf, Hamburg
Heraeus BIOFUGE fresco	Thermo, Waltham (USA)
Lichtmikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss, Jena
LightCycler® Real time PCR	Roche, Mannheim
MACS Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Glasdbach
Multifuge 3 S-R	Thermo, Waltham (USA)
Megafuge 1.0 R	Thermo, Waltham (USA)
Spannungsquelle PowerPac HC	Bio-Rad, München

### 2.1.6 Puffer und Medien

Tabelle 11 Verwendete Puffer mit Rezepten

Puffer	Zusammensetzung
Laemmli Puffer (6x)	300 mM Tris 600 mM DTT 12 % SDS 60 % Glycerin 0,3 % Trypan Blau

Laufpuffer (pH 8,3; 10x)	3,03 % Tris 14,4 % Glycin 1 % SDS
PBS (pH 7,4)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 1,4 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 4,3 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
PBS/BSA (pH 7,4)	PBS 0,5 % BSA (w/v)
PBS/BSA/Azid (pH 7,4)	PBS/BSA 0,2 % $\text{NaN}_3$ (v/v)
PBS/BSA/EDTA (pH 7,4)	PBS/BSA 2 mM EDTA
PBS/BSA/20 mM EDTA (pH 7,4)	PBS/BSA 20 mM EDTA
Sammelgelpuffer (pH6,8)	0,5 M Tris-HCl
Blotpuffer (10x)	160 mM Tris 1,2 M Glycin
Blotpuffer (1x)	10% 10x Blotpuffer 20% MetOH
Trenngelpuffer (pH 8,8)	1,5 M Tris-HCl
Waschpuffer	PBS 0,1 % Tween 20
Zellkulturmedium	RPMI 1640 10 % Fötale Kälberserum 10 mM L-Glutamat 10 $\mu\text{g/ml}$ 2-Mercaptoethanol 100 U/ml Penicillin 100 ml Streptomycin
Nuklei Waschpuffer (pH7,6)	320 mM Sucrose 10 mM Hepes 8 mM $\text{MgCl}_2$ 1 Tabelette EDTA freie Protease Inhibitor/50ml
Nuklei Lysepuffer	Nuklei Waschpuffer + 0,5% Triton X-100
Low Salt Puffer (pH 8,1)	20 mM Tris-HCl 0,1% SDS 1% Triton X-100 2 mM EDTA 150 mM NaCl

SDS-Lysepuffer (pH 8,5)	1 % SDS 10mM EDTA 50 mM Tris + 1 Tablette EDTA freier Protease Inhibitor/50 ml
ChIP-Verdünnungspuffer (pH 8,1)	0,01 %SDS 1,1 % Triton X-100 1,2 mM EDTA 16,7 mM Tris-HCl 167 mM NaCl + 1 Tablette EDTA freier Protease Inhibitor +100 µg/ml Hering Sperm DNA
High Salt Puffer (pH 8,1)	0,1% SDS 1% Triton X-100 2 mM EDTA 20 mM Tris-HCl 500 mM NaCl
LiCl Puffer (pH 8,1)	0,25 M LiCl 1% IGEPAL-CA630 1 % Natriumdeoxycholat 1 mM EDTA 10 mM Tris
TE-Puffer (pH 8,0)	10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA
Elutionspuffer	0,1 M NaHCO <sub>3</sub> 1 % SDS

### 2.1.7 Oligonukleotide

Tabelle 12 Sequenzen der verwendeten Oligonucleotide

Name	Gen	Sequenz
NFATc2R2 for	<i>NFATc2</i> - Promotor	GTATTCAGACTTATGGAATCAGAAGC
NFATc2R2 rev		GCCAGAACACACTTCCCCAAGATCG
hARRE2 for	<i>IL-2</i> -Promotor	CCACCACAATATGCTATTCACA
hARRE2 rev		ATTCATGCAATTAACGCCTTCT



## **2.1.8 Biologisches Material**

### *2.1.8.1 Buffy Coats*

Für die Isolation von humanen primären mononukleären Zellen wurden Buffy Coats von gesunden, anonymen Spendern verwendet. Buffy Coats fallen als Nebenprodukt bei der Erythrozyten- und Blutplasmagewinnung aus Vollblutspenden an. Neben Thrombozyten und Leukozyten sind geringe Mengen an Erythrozyten und Plasma enthalten. Die in dieser Arbeit verwendeten Buffy Coats wurden über den DRK Blutspendedienst Ost GmbH, Berlin bezogen.

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Präparation humaner mononukleärer Zellen**

Zur Isolation humaner peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMC) wurde eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt.

Dazu wurde der Inhalt eines Buffy Coats 1:1 mit PBS/BSA verdünnt und vorsichtig über 12 ml Lymphozytenseparationsmedium (1,077 g/ml) geschichtet. Entsprechend der unterschiedlichen Dichten der Blutbestandteile passierten während der Zentrifugation bei 836x g und RT für 20 min und ohne Bremse Erythrozytenaggreagete und tote Zellen das Lymphozytenseparationsmedium. Die mononukleären Zellen reicherten sich in einer Interphase zwischen Separationsmedium und Plasma an. Die Interphase mit den enthaltenen Lymphozyten wurde vorsichtig abgenommen und anschließend zweimal mit PBS/BSA gewaschen. Die Zentrifugationschritte erfolgten bei 304x g bei 4 °C für 10 min. Die PBMC wurden bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert.

### **2.2.2 Bestimmung der Zellzahl**

#### *2.2.2.1 Automatische Zellzählung*

Zur Bestimmung der Zellzahl in Suspensionen wurde das vollautomatische CASY DT System (Schärfe Systems, Deutschland) eingesetzt. Es basiert auf der elektronischen

Pulsflächenanalyse und erlaubt die Messung von Zellzahl sowie tot/lebend-Unterscheidung anhand der Zellgröße mit einer Messgenauigkeit von  $0.1 \mu\text{M}$ . Die zu messende Probe wurde zunächst 1:1000 in PBS verdünnt, der zu erwartende Größenbereich gewählt (für lebende PBMC:  $7\text{-}30 \mu\text{m}$ ) und die gemessene Zellkonzentration (pro ml) über das LCD-Display ausgegeben.

### 2.2.2.2 Zellzählung mittels Neubauer Zählkammer

Zur genaueren Bestimmung kleiner Zellzahlen wurde die Neubauer Zählkammer verwendet.  $10 \mu\text{l}$  Zellsuspension wurden 1:1 mit einer Trypanblau Lösung verdünnt und auf die Zählkammer aufgetragen. Trypanblau färbte die toten, deformierten Zellen auf Grund ihrer permeablen Membran an. Das lichtmikroskopische Bild ermöglichte so die Unterscheidung in vitale und tote Zellen. Die Zellkonzentration pro ml berechnet sich nach folgender Formel:

$$A = B \times 10^4 \times VF \times V$$

A = Zellzahl [1/ml]

B = Mittelwert der 4 Großquadrate

V = Gesamtvolumen der Zellsuspension [ml]

VF = Verdünnungsfaktor, 2

## 2.3 Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können Zellen anhand ihrer Lichtstreuungseigenschaften und, je nach verwendetem Gerät, derzeit bis zu 13 weiteren Parametern (LSRII, 4-Laser-Version, BD) anhand emittierter Fluoreszenzstrahlung auf Einzelzellebene charakterisiert werden. Die Zellen werden hierbei mit monoklonalen Antikörpern, die direkt oder über sekundäre Antikörper an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt sind, markiert und passieren in einem Flüssigkeitsstrom hydrodynamisch fokussiert nacheinander einen Laserstrahl. Dabei werden die Fluorophore zur Emission von Fluoreszenzlicht angeregt; zusätzlich streuen die Zellen das auftreffende Licht. Das in einem geringen Winkel ( $3\text{-}10^\circ$ ) gestreute Licht wird als Vorwärtsstreulicht (FSC) bezeichnet und korreliert in erster Näherung mit der Zellgröße. Das um  $90^\circ$  reflektierte Licht wird als Seitwärtsstreulicht (SSC) bezeichnet und korreliert mit der Granularität und der Membranfaltung der Zelle. Das von den verschiedenen Fluorochrophoren emittierte Fluoreszenzlicht wird durch Teilerspiegel und farbselektive Bandpassfilter in Fluoreszenzspektren aufgetrennt und gelangt dann auf photosensitive Detektoren, sog. Photomultiplier. Im verwendeten Analysegerät FACSCalibur stehen drei Sensoren für  $530\text{nm}$  (Fluoreszenzkanal FL1),  $585\text{nm}$  (FL2) und  $>650\text{nm}$  (FL3) über den

ersten Laser (Argon, 488nm) zur Verfügung. Über einen zweiten Dioden-Laser (635nm) kann ein weiteres Fluoreszenzparameter mit einer anderen Anregungswellenlänge zur Verfügung gestellt werden (FL4: 670nm). Nach Verstärkung wird das optische Signal zunächst in elektrische Ströme und schließlich in ein digitales Signal umgewandelt. FSC- und SSC-Signale wurden in linearer, die Fluoreszenz-Signale in logarithmischer Verstärkung aufgenommen. Die Auswertung der Messungen erfolgte mit der FlowJo Software. Die Daten wurden als zweidimensionale „Punkt-Diagramme“ („dot-plots“) oder als eindimensionale Histogramme dargestellt. In den Punktdiagrammen repräsentiert jeder Punkt eine Zelle. Durch das setzen von Analysefenstern („gates“) kann die Expressionsanalyse auf bestimmte Zellpopulationen beschränkt werden.

### 2.3.1 Färbung von Oberflächenmarkern

Lymphozyten lassen sich entsprechend ihrer Expression von Oberflächenstrukturen in verschiedene Untergruppen einteilen. Um diese mit Fluorophor-gekoppelten Antikörpern anzufärben und anschließend durchflusszytometrisch zu analysieren, wurden die isolierten Zellen (jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen pro Ansatz) mit PBS/BSA gewaschen (Zentrifugation bei 400x g, 10 min, 4 °C) und mit 100 µl Färbelösung für 20 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Die Färbelösung bestand aus PBS/BSA, 1 mg/ml Beriglobin zur Absättigung der Fcγ Rezeptoren und den konjugierten Antikörpern. Die Reaktion wurde mit eiskaltem PBS/BSA abgestoppt (Zentrifugation bei 400x g, 10 min, 4 °C) und die Zellen wurden bis zur Weiterverarbeitung oder durchflusszytometrischen Messung in PBS/BSA bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

### 2.3.2 Fixierung mit Formaldehyd

Um die Zellen zu konservieren und eine intrazelluläre Färbung zu ermöglichen, werden die Aminogruppen zwischen verschiedenen Molekülen durch Formaldehyd kreuzvernetzt. Diese Vernetzung bewahrt die Zellstruktur, erfordert aber einen zusätzlichen Permeabilisierungsschritt, der dem Antikörper den Zugang zum Antigen ermöglicht.

Die zu fixierenden Zellen ( $1 \times 10^6$  Zellen pro Ansatz) wurden zunächst mit PBS gewaschen (Zentrifugation bei 400x g, 10 min, 4 °C) und mit 500 µl einer 2 % Formaldehyd/PBS Lösung für 20 min bei RT fixiert. Abschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen (Zentrifugation bei 400x g, 10 min, 4 °C). In PBS/BSA/Azid können die fixierten Zellen bei 4 °C über Nacht gelagert werden.

### 2.3.3 Permeabilisierung mit Triton X-100 und intrazelluläre Färbung

Die Permeabilisierung erfolgte mit Triton X-100. Die Zellen wurden zentrifugiert (400x g, 10 min, 4 °C) und anschließend mit 500 µl einer 0,3 % Triton X-100 Lösung in PBS/BSA für 20 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut zentrifugiert (400x g, 10 min, 4 °C) und das Pellet sofort mit 100 µl einer Färbelösung bestehend aus PBS/BSA, 2 µl Beriglobin und den entsprechenden, konjugierten Antikörpern resuspendiert. Nach einer Inkubation von 30 min im Dunkeln bei RT wurde die Reaktion mit PBS/BSA abgestoppt. Die Zellen wurden zentrifugiert (400x g, 10 min, 4 °C), in 300 µl PBS/BSA resuspendiert und durchflusszytometrisch analysiert.

### 2.3.4 Fixierung und Färbung des Transkriptionsfaktors FOXP3

Die bereits auf Oberflächenmarker gefärbten Zellen wurden pelletiert (Zentrifugation bei 400x g, 10 min, 4 °C) und für 30 min bei 4 °C im Dunkeln fixiert und permeabilisiert. Dabei wurde das Fixierungs-/Permeabilisierungskonzentrat 1:4 mit der Fixierungs-/Permeabilisierungsverdünnung gemischt und für  $1 \times 10^6$  Zellen wurden 500 µl eingesetzt. Nach einem Waschschriff mit PBS/BSA und zwei weiteren Waschschriffen mit 500 µl des in dest. Wasser verdünnten 1x Permeabilisierungspuffer (Zentrifugation bei 400x g, 10 min, 4 °C) wurden die Zellen für 30 min bei 4 °C im Dunkeln mit 100 µl Färbelösung inkubiert. Für die Färbelösung wurden die konjugierten Antikörper gegen FOXP3 und die entsprechenden Transkriptionsfaktoren in 1x Permeabilisierungspuffer verdünnt. Es erfolgte ein erneuter Waschschriff mit 1x Permeabilisierungspuffer. Die in PBS/BSA/Azid resuspendierten Zellen wurden durchflusszytometrisch analysiert.

### 2.3.5 Durchflusszytometrische Analyse isolierter Zellkerne

Um die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren in Treg- und Gedächtnis-Th-Zellen auf Einzelzellebene zu untersuchen, wurden isolierte Zellkerne von unstimulierten und stimulierten Zellkernen benutzt. Die Transkriptionsfaktoren c-fos, NFATc2 und NF-κB translozieren nach ihrer Aktivierung vom Zytoplasma in den Kern. FOXP3 hingegen ist konstitutiv im Kern lokalisiert. Die Isolation intakter Zellkerne und die anschließende Färbung aller Transkriptionsfaktoren ermöglicht die durchflusszytometrische Analyse der aktivierten Faktoren in Treg (FOXP3<sup>+</sup> Zellkerne) und Gedächtnis-Th-Zellen (FOXP3<sup>-</sup> Zellkerne). Wird durch die Auswertung ein Shift in der Mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) für die Transkriptionsfaktoren zwischen unstimulierten und stimulierten Zellkernen im Histogramm

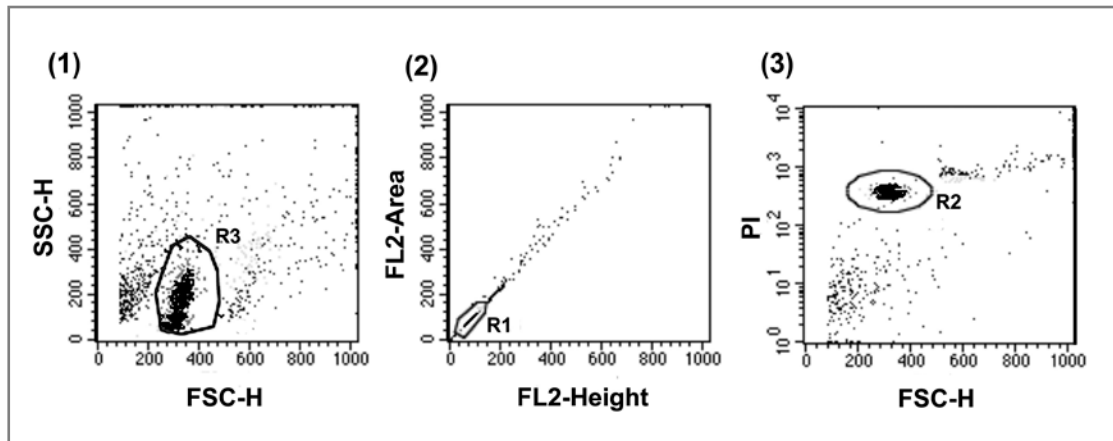
sichtbar, so deutet dies auf eine stimulationsabhängige Aktivierung und damit Translokation des Proteins in den Zellkern hin.

#### 2.3.5.1 *Isolierung, Fixierung und Färbung intakter Zellkerne*

Um nukleäre Transkriptionsfaktoren auf Einzelzellniveau detektieren zu können, mussten zunächst die Zellkerne aus humanen CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> Th-Zellen isoliert werden. Es wurden 5x10<sup>6</sup> Zellen einmal in eiskaltem PBS gewaschen und in 700 µl eiskaltem Nuklei-Lysepuffer resuspendiert und für 15 min auf Eis durch hypotonische Lyse aufgebrochen. Die Zellsuspension wurde mit 800 µl Nuklei-Waschpuffer zweimal bei 600 x g für 10 min bei 4°C gewaschen und die Zellkerne durch den im Puffer enthaltenen Sucrosegradienten von übrigen Zellkomponenten und Zelltrümmern aufgereinigt. Die pelletierten Zellkerne wurden vorsichtig gelöst und in 500 µl Fixierungs-/Permeabilisierungspuffer für 30 min bei Raumtemperatur fixiert. Danach wurden die Reaktionsgefäße mit 1 ml 1x Permeabilisierungspuffer aufgefüllt und bei 4°C, 500x g für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet vorsichtig gelöst und mit 100 µl Färbelösung (Antikörper in 1x Permeabilisierungspuffer) versetzt und für 30 min bei 4°C inkubiert. Schließlich wurden die Zellkerne mit Permeabilisierungspuffer gewaschen und das Pellet in 300 µl PBS/BSA/Azid aufgenommen. So konnten die Kerne über Nacht bei 4°C gelagert werden.

#### 2.3.5.2 *Analyse der isolierten Zellkerne mittels Durchflusszytometrie*

Um translozierte Transkriptionsfaktoren in isolierten und fixierten Zellkernen auf Einzelzellniveau durchflusszytometrisch analysieren zu können, wurde der DNA-Farbstoff Propidiumjodid (PJ, 0.1mg/ml) 1:300 zu den mit Antikörpern gefärbten Zellkernen in PBS/BSA/Azid gegeben. Die Zellkerne wurden in einem FACS Calibur, das mit einem Puls Prozessor Modul, dem *Doublet Discrimination Module* (DDM), ausgestattet ist, analysiert. Der DDM Modus ermöglicht eine zeitliche Auflösung des Durchgangs der Zellen bzw. ihres Fluoreszenzparameters durch den Laserstrahl in Pulshöhe, -weite und -fläche. Dadurch konnten Zell- oder Kerndoubletten, die im Vergleich zu Einzelzellen ein höheres Fluoreszenzsignal und eine längere Durchgangsdauer durch den Laserstrahl aufweisen und damit einen höheren DNA-Gehalt vortäuschen, unterschieden und mit Analysefenstern ausgegrenzt werden (siehe Abb. 2.1). Die Analyse der einzelnen Zellkerne erfolgte in drei Schritten durch Mehrfachgating:



**Abb. 2.1 Strategie zur durchflusszytometrischen Detektion einzelner Zellkerne mit Hilfe von Analysefenstern.** Die isolierten Zellkerne werden anhand ihrer FSC- und SSC-Eigenschaften eingegrenzt (R3). Die Auftragung FL2-A gegen FL2-H ermöglicht die Diskriminierung von Doubletten (R1). Intakte Zellkerne werden mit PI angefärbt und eingegrenzt. Nur Zellkerne, die sich in allen drei Analysefenstern befinden, werden in die Analyse der Transkriptionsfaktoren einbezogen.

1. Diskriminierung der Zellkerne (R3) von unspezifischer Debris bzw. unlysierten Zellen über SSC und FSC.
2. Ausschluss der Doubletten durch entsprechende Analysefenster in einem Punkthistogramm, indem linear FL-2-A (area) gegen FL-2-H (height) dargestellt wurde. Die Diagonale zeigt die einzelne Zellkerne (R1) oder Zellen.
3. Diskriminierung der Zellkerne (R2) von unlysierten fixierten Zellen und Debris auf Basis von PJ (FL-3) gegen FSC

## 2.4 Zellsortierung

Um Th-Zellen oder Th-Zell-Subpopulationen aus den aus Buffy Coats isolierten PBMC aufzureinigen, wurden die im Folgenden aufgeführten Methoden verwendet.

### 2.4.1 Magnetische Zellsortierung

Bei der magnetischen Zellsortierung (MACS) werden die zu sortierenden Zellen mit spezifischen an magnetische Mikropartikel gebundene Antikörper inkubiert. Beim Durchfluss durch eine in einem Dauermagneten eingespannte Säule werden die durch die Antikörper magnetisch markierten Zellen zurückgehalten. Nicht magnetisch markierten Zellen passieren die Säule. Die Eluation der auf der Säule zurückgehaltenen Zellen erfolgt durch das Entfernen der Säule aus dem magnetischen Feld. Die im Folgenden angegebenen Puffer-

und Reagenzvolumen beziehen sich auf  $1 \times 10^8$  Zellen. Bei Verwendung anderer Zellzahlen wurden die verwendeten Volumen entsprechend angepasst.

#### *2.4.1.1 Isolation von CD4<sup>+</sup> T Zellen*

Die Isolation von CD4<sup>+</sup> T Zellen erfolgte mittels positiver Selektion unter Verwendung von magnetisch markierten CD4 Mikropartikeln.

Die Zellzahl der frisch isolierten PBMC wurde bestimmt. Nach erfolgter Zentrifugation bei 304x g, 4 °C für 10 min wurden die Zellen in 800 µl PBS/BSA resuspendiert. Die Zugabe von 1 mg/ml Beriglobin führte zur Absättigung der Fcγ Rezeptoren. Anschließend wurden 150 µl CD4 Mikropartikel zu den Zellen pipettiert und für 15 min bei 4 °C inkubiert. Nachdem die Zellen mit PBS/BSA gewaschen (Zentrifugation bei 304x g, 10 min, 4 °C) und in 3 ml PBS/BSA/EDTA resuspendiert wurden, erfolgte die magnetische Separation. Die zu verwendeten LS Separationssäulen wurden im MACS Separator justiert und mit 5 ml PBS/BSA/EDTA äquilibriert. Die Zellsuspension wurde durch einen befeuchteten Präseparationsfilter gegeben, um Zellklumpen zu entfernen, die die Säule verstopfen könnten. Nicht markierte Zellen befanden sich im Durchlauf. Nachdem die Säule zweimal mit jeweils 5 ml PBS/BSA gewaschen wurde, erfolgte die Eluation der durch CD4 Mikropartikel magnetisch markierten Zellen durch 5 ml PBS/BSA und Entfernen der Säule aus dem magnetischen Feld.

Zur Bestimmung der Reinheit der CD4<sup>+</sup> sortierten Zellen wurde eine CD4<sup>+</sup> Testfärbung durchgeführt.

#### *2.4.1.2 Isolation von CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD45RO<sup>+</sup> T Zellen mittels negativer Selektion*

Für die Isolation von CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD45RO<sup>+</sup> (Gedächtnis-)T-Zellen wurde die unter 2.4.1.1 beschriebene Sortierung mit CD4 Multisort Mikropartikel durchgeführt. Diese ermöglichen die Abtrennung der magnetischen Antikörper nach der Sortierung und somit eine anschließende weitere Sortierung mit einem zweiten Magnet-gekoppelten Antikörper.

Die CD4<sup>+</sup> Zellen wurden zentrifugiert (304x g, 10 min, 4 °C), in 1 ml PBS/BSA resuspendiert und mit 20 µl Multisort Freisetzungreagenz versetzt. Nach einer Inkubation von 10 min bei 4 °C und einem Waschschrift mit PBS/BSA, wurden die Zellen in 700 µl PBS/BSA resuspendiert. Dann erfolgte die Zugabe von 150 µl Multisort Stopreagenz und 150 µl CD45RA Mikropartikeln sowie eine Inkubation von 15 min bei 4 °C. Anschließend erfolgte analog zu 2.4.1.1 die magnetische Separation. Die CD45RA<sup>-</sup>CD45RO<sup>+</sup> Zellen wurden nicht

durch die CD45RA Mikropartikel markiert und befanden sich im Durchfluss der LS Separationssäule.

Zur Bestimmung der Reinheit der CD45RA<sup>-</sup>CD45RO<sup>+</sup> T-Zellen sortierten Zellen wurde eine Testfärbung mit Antikörpern gegen CD45RA und CD45RO und eine durchflusszytometrische Analyse durchgeführt.

#### 2.4.1.3 Anreicherung von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Th-Zellen

Für die Chromatin-Immunopräzipitation war eine Anreicherung von CD25<sup>+</sup> Th-Zellen nötig. Dazu wurden CD4<sup>+</sup> Th-Zellen, die mit CD4 Multisort Mikropartikeln sortiert wurden (siehe 2.4.1.2) nach Abtrennung der Magnetischen Partikel in 200 µl PBS/BSA mit 1:10 anti-CD25-APC Antikörper aufgenommen und für 15 min bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Zellen gewaschen (304x g, 10 min, 4 °C) und in 800 µl PBS/BSA aufgenommen. Dem wurden 150 µl anti-APC Mikropartikel zugesetzt und es folgte eine erneute Inkubation für 20 min bei 4°C. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen magnetisch sortiert. Die CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Th-Zellen wurden schließlich mit 5 ml PBS/BSA eluiert und bis zur Weiterverwendung bei 4°C bis gelagert.

#### 2.4.2 Fluoreszenzvermittelte Zellsortierung von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> Treg-Zellen und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD127<sup>+</sup> Gedächtnis-Th-Zellen

Die Fluoreszenz vermittelte Zellsortierung (FACS) ermöglicht die Separation von Zellen anhand der Expression spezifischer Oberflächenmoleküle. Diese Oberflächenstrukturen werden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern angefärbt. Die Zellen passieren hintereinander aufgereiht in einem Flüssigkeitsstrom 3 Laser (488 nm, 633 nm, 405 nm). Die Laser regen die Fluorophore zur Emissionen an, die mit Hilfe von Detektoren gemessen wird. Mit Hilfe von Kondensatorplatten und elektrostatischer Aufladung ist es möglich die Zellen nach ihren Oberflächenfärbungen anzuziehen oder abzustoßen und so zu sortieren [156].

Die frisch isolierten CD4<sup>+</sup> T Lymphozyten (2.4.1.1) wurden zentrifugiert (304x g, 10 min, 4 °C) und mit 100 µl/5x10<sup>7</sup> Zellen einer Färbelösung mit anti-CD25-APC und CD127-PE Antikörpern für 30 min bei 4 °C gefärbt. Die Reaktion wurde mit 5 ml PBS/BSA abgestoppt. Die Zellen wurden durch einen Präseparationsfilter filtriert und direkt am FACSAria unter Verwendung der FACS Diva Software sortiert (siehe 3.3.1.2).



## **2.5 Stimulation und Kultivierung humaner primärer Th-Zellen**

Primäre humane Th-Zellen wurden in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$ /ml in RPMI Kulturmedium bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in einer mit Wasserdampf gesättigten (95%) Atmosphäre kultiviert. Alle *in vitro* Stimulationen wurden unter diesen Bedingungen durchgeführt. Für die polyklonale Stimulationen wurden 10 ng/ml Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) und 1 µg/ml Ionomycin verwendet. Für intrazelluläre Zytokin- und Oberflächenrezeptorfärbungen wurden die CD4<sup>+</sup> Th-Zellen fünf Stunden mit PMA/Ionomycin stimuliert und nach einer Stunde der Sekretionsinhibitor Brefeldin A (5 µg/ml) zugegeben. Für Rezeptor-vermittelte Stimulationen wurden magnetische Mikropartikel verwendet, die mit α-human CD3- und α-human CD28-Antikörpern beschichtet sind (Dynabeads human T-Activator CD3/CD28). Davon wurden 25 µl pro  $1 \times 10^6$  Zellen eingesetzt.

## **2.6 Western Blot**

### **2.6.1 Präparation von Proteinproben für die Gelelektrophoretische Analyse**

Die Th-Zellen, die analysiert werden sollten, wurden in gleicher Zellzahl aufgenommen und einmal in eiskaltem PBS für 10 min bei 300xg bei 4°C gewaschen und danach in 15 µl Laemmli Puffer/ $5 \times 10^6$  Zellen aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen mit einem Ultraschall-Stab sonifiziert und bei 98°C für 5 min denaturiert.

### **2.6.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Proteine wurden durch diskontinuierliche SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) in Tris-Glycin-Gelen aufgetrennt [157].

Die Zusammensetzung der Sammel- und Trenngele ist in Tabelle 13 aufgeführt. Für die Analyse wurden Proteine über 10%ige Trenngele bei konstanter Spannung von 140 V aufgetrennt. Als Protein-Größenmarker diente der SeebLue Plus2® Prestained Standard (Invitrogen), die verwendeten Puffer sind unter Abschnitt 2.1.6 beschrieben.

Tabelle 13 Zusammensetzung der Gele für die SDS-PAGE

Gel	Trenngel (10%; 2x)	Sammelgel (10%; 2x)
dest. Wasser [ml]	5,7	2,85
AA/Bis [ml]	4,6	0,85
Trenngelpuffer [ml]	3,5	-
Sammelgelpuffer [ml]	-	1,25
10 % SDS [ $\mu$ l]	140	50
APS [ $\mu$ l]	65	25
Temed [ $\mu$ l]	7	5

### 2.6.3 Blotten auf eine Nitrozellulosemembran

Die per SDS-PAGE der Größe nach aufgetrennten Proteine wurden mittels Western Blot (Tankblot-Apparatur; Biorad, Hercules, USA) auf eine Nitrozellulosemembran (WhatmanProtran NC Transfermembran, Whatman, Dassen) übertragen. Zu diesem Zweck wurde das Sammelgel entfernt und das Trenngel für den Blotaufbau verwendet. Der Blot setzte sich nach folgendem Schema zusammen: ein Schwamm, zwei Filterpapiere, das Gel, die Membran, zwei Filterpapiere und ein Schwamm. Dieser Komplex wurde so in die Blotapparatur eingesetzt, dass das Gel zur Anode und die Membran zur Kathode gerichtet war, so dass die Proteine durch ihre SDS-vermittelte positive Ladung in Richtung Membran wanderten.

Gebloftet wurde in 1x Blotpuffer bei 300 V, 4°C für 40 min. Nach dem Blotten wurde die Membran für 30 min mit Blockpuffer bei RT unter Schwenken inkubiert. Dies sollte unspezifische Bindung des Primärantikörpers verhindern. Es folgte die Zugabe der Primärantikörper und anti- $\beta$ -Aktin in Blockpuffer verdünnt. Anschließend wurde für 2 h bei RT unter Schwenken inkubiert. Alternativ konnten die Primärantikörper auch bei 4°C über Nacht inkubieren. Danach wurden nichtbindende Primärantikörper durch fünfmaliges Waschen für je 4 min mit PBST entfernt. Es folgte die Zugabe der an Infrarotfarbstoffe gekoppelten Sekundärantikörper, anti-mouse IgG-Alexa800 und anti-rabbit IgG-Alexa680 (Molecular Probes, Invitrogen), welche jeweils 1:10000 in Blockpuffer verdünnt wurden. Anschließend wurde für 40 min bei RT unter Schwenken inkubiert. Dann wurden wieder 5 Waschschrte mit PBST à 4 min durchgeführt. Die Membran wurde mit PBS gespült und in selbigem aufgenommen. Abschließend wurde die Detektion am Infrared Odyssey® Imaging System und die Analyse mittels Odyssey Software von Licor durchgeführt.

## 2.7 Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)

Für die ChIP wurden zunächst  $2 \times 10^6$  Zellen mit PBS gewaschen und mit 1 %iger Formaldehydlösung für 10 min bei RT fixiert. Die Fixierung wurde anschließend durch Zugabe von Glycin (Endkonzentration 0,125 molar) für 5 min abgestoppt. Die Lyse der Zellen erfolgte durch Zugabe von ChIP-Lysepuffer (50  $\mu$ l /  $2 \times 10^6$  Zellen) und einer 10 minütigen Inkubation auf Eis. Anschließend wurden 150  $\mu$ l ChIP-Verdünnungspuffer hinzugegeben. Die Scherung der genomischen DNA wurde durch Sonifikation mit einem Ultraschallstab erreicht. Die Größe der gescherten DNA wurde mit einem 2 %igem Agarosegel überprüft (durchschnittliche Größe 200-500 bp). Es erfolgte eine Abtrennung der Zellbruchstücke durch Zentrifugation (10 min  $13\,000 \times g$ ,  $4^\circ\text{C}$ ). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 300  $\mu$ l ChIP-Verdünnungspuffer versetzt. 40  $\mu$ l der Probe wurden als Input abgenommen und bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert, der Rest dann mit dem jeweiligen Antikörper über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert. Am nächsten Tag wurden die magnetischen Protein-G-Beads durch eine einstündige Inkubation an den Antikörper gekoppelt. Eine Absättigung wurde durch Zugabe von 5% Magermilchpulver in PBST erreicht. Die IP erfolgte mit dem MultiMACS M96 Separator von Milltenyi. Hierfür wurden Multi-8-columns mit 100  $\mu$ l 1% NP-40 und 100  $\mu$ l ChIP-Verdünnungspuffer equilibriert. Die mit Magermilch versetzte Probe wurde über die Säule gegeben und anschließend die Säule mit je vier Mal 250  $\mu$ l der vier Waschpuffer gewaschen. Die Elution erfolgte dann mit 4 x 50  $\mu$ l  $65^\circ\text{C}$  warmen Elutionspuffer. Zur Defixierung wurden 8  $\mu$ l 5M NaCl zu den Proben gegeben. Es folgte eine Inkubation von 4 h bei  $65^\circ\text{C}$ . Die Aufreinigung der DNA erfolgte nach dem Protokoll für SDS-haltige Proben des Nucleo Extract II Kit von Machery und Nagel. Die aufgereinigte DNA wurde dann unverdünnt für die qRT-PCR eingesetzt. Die Anreicherung der DNA wurde wie folgt berechnet  $2^{(\text{DNA}_{\text{Input}} - \text{DNA}_{\text{spezifischChIP}})}$ . Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 12 aufgeführt.

### 2.7.1 Quantitative RT-PCR

Um die durch den spezifischen Antikörper gebundene und mittels ChIP isolierte DNA zu quantifizieren, wurde eine quantitative RT-PCR mit den spezifischen Oligonukleotiden für die *NFATc2*-Promotorregion bzw. *IL-2*-Promotorregion als Kontrolle durchgeführt. Dafür wurde jeweils 1  $\mu$ l der ChIP-DNA bzw. der Input-Proben mit 1  $\mu$ l SybrGreen Master Mix, 1  $\mu$ l  $\text{MgCl}_2$  Stocklösung und 6  $\mu$ l Wasser (alles LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I Kit, Roche, Mannheim) gemischt und jeweils 0,5  $\mu$ l der Oligonukleotide zugegeben. Dieses

Gemisch wurde dann in LightCycler Kapillaren (Roche, Mannheim) überführt und die Proben im LightCycler gemessen.

Das für die Quantifizierung der DNA aus der FOXP3 ChIP am *NFATc2*-Promotor erfolgte mit den folgenden Parametern:

Denaturierung: 95°C; 15 s

Amplifizierung: 94°C, 20 s

52°C, 20 s } 45 Zyklen

72°C, 10 s }

Die Auswertung und Analyse erfolgte mit Hilfe der Software RelQuant (Roche Molecular Biochemicals).

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Die Abhängigkeit der IL-2-Produktion von der NFATc2 Menge in Th-Zellen

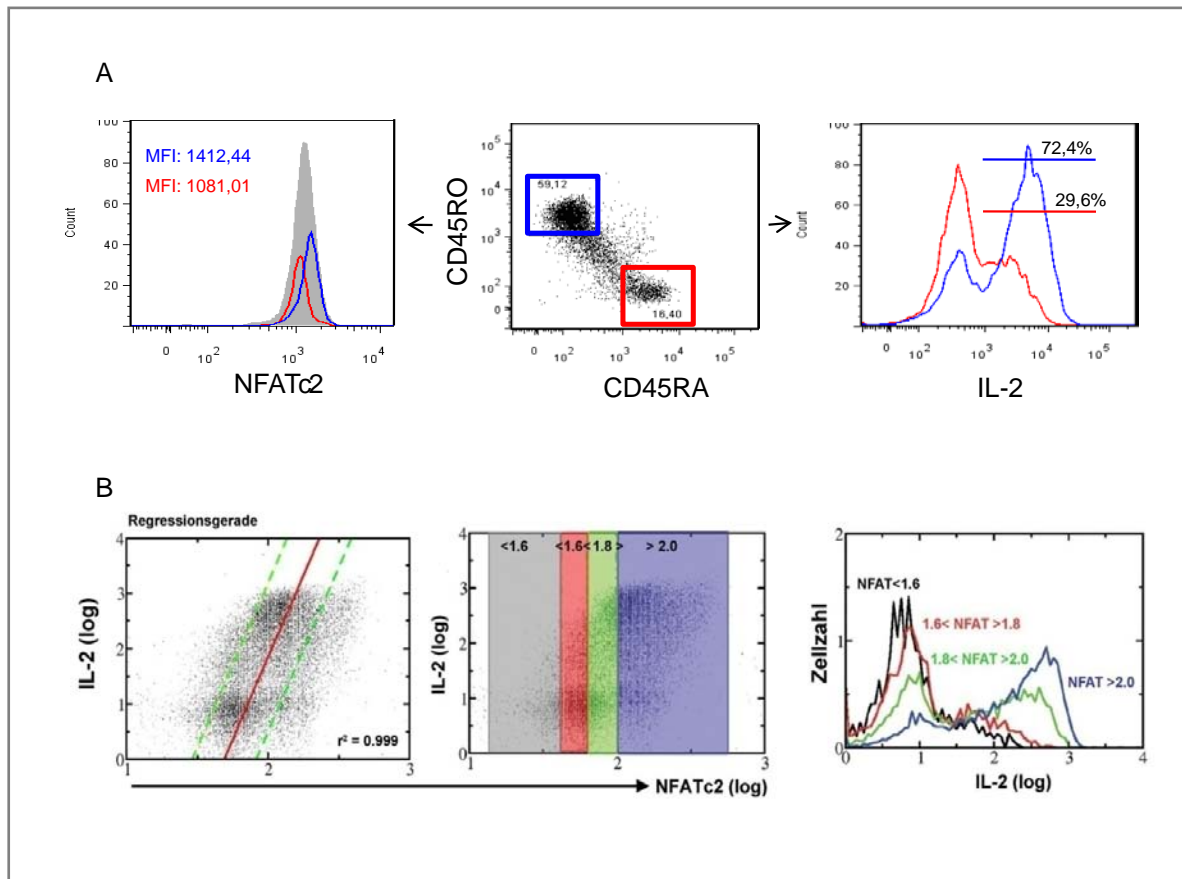
Gedächtnis-Th-Zellen exprimieren im Gegensatz zu naiven Th-Zellen nach Stimulation durch ihr spezifisches Antigen sehr schnell Effektorzytokine. Es ist nicht bekannt, wie diese Unterschiede in der Kinetik der Zytokinproduktion zwischen naiven und Gedächtnis-Th-Zellen zustande kommen und welche molekularen Mechanismen diesem Verhalten zugrunde liegen. Der Transkriptionsfaktor NFATc2 dient in humanen Gedächtnis-Th-Zellen als molekularer Schalter [131] für die IL-2 sowie IFN- $\gamma$  Transkription und ist somit ein kritischer Faktor für die Zytokinproduktion in Th-Zellen. Fiering *et al.* untersuchten mit Hilfe von LacZ-Reporterassays in Zelllinien die NFAT Aktivität auf Einzelzellebene und fanden eine konzentrationsabhängige, binäre Reporterexpression. Daraus wurde geschlossen, dass die NFAT-abhängige Geninduktion von dem Erreichen eines Schwellenwertes dieses Transkriptionsfaktors abhängig ist [135].

Im folgenden sollte die NFATc2-Expression in verschiedenen primären, humanen Th-Subpopulationen gemessen und deren Auswirkung auf die IL-2-Produktion auf Einzelzellebene untersucht werden.

#### 3.1.1 IL-2<sup>+</sup> Th-Zellen exprimieren mehr NFATc2 als IL-2<sup>-</sup> Th-Zellen

*Ex vivo* aus Blut gesunder Spender isolierte Th-Zellen stellen eine heterogene Zellpopulation da. Sie können in naive, antigen-unerfahrene und in Gedächtnis T-Zellen, die bereits in der Peripherie durch ihr spezifisches Antigen stimuliert wurden, unterteilt werden. Für die Unterscheidung eignet sich die Färbung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit Antikörpern gegen die Protein Tyrosin Phosphatase CD45, die sich abhängig vom Aktivierungsstatus der Zelle in ihrer extrazellulären Domäne unterscheidet. Naive Th-Zellen exprimieren die CD45RA- und Gedächtnis-Th-Zellen die CD45RO Isoform (1.2.2). Um zu überprüfen, wie sich diese beiden Th-Zell Populationen hinsichtlich der Expression des Transkriptionsfaktors NFATc2 und der Fähigkeit, nach Stimulation IL-2 zu exprimieren, verhalten, wurden CD4<sup>+</sup> T-Zellen für 5 h mit PMA und Ionomycin stimuliert. Damit eine zusätzliche intrazelluläre Färbung von IL-2 erfolgen konnte, wurde eine Stunde nach Beginn der Stimulation Brefeldin A zu den Zellen gegeben. Brefeldin A hemmt die Sezernierung von Proteinen, was zu einer Akkumulation des gebildeten IL-2 in den Zellen führt. Nach Stimulation wurden die Zellen mit Fluorophor-gekoppelten Antikörpern gegen CD45RA und CD45RO sowie intrazellulär gegen IL-2 und NFATc2 gefärbt.

Die durchflusszytometrische Analyse zeigte, dass 59% der CD4<sup>+</sup> T-Zellen den Marker für Gedächtnis-Th-Zellen, CD45RO (Abb. 3.1A, blaues Analysefenster), exprimierten, während 16% der Zellen CD45RA<sup>+</sup> (rotes Analysefenster) exprimierten und somit antigen-unerfahren waren. Die CD45RO<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> Zellen lassen sich nicht eindeutig dem Gedächtnis- oder naiven Th-Zell Phänotyp zuordnen und wurden daher mit Hilfe der Analysefenster von der Betrachtung ausgeschlossen.



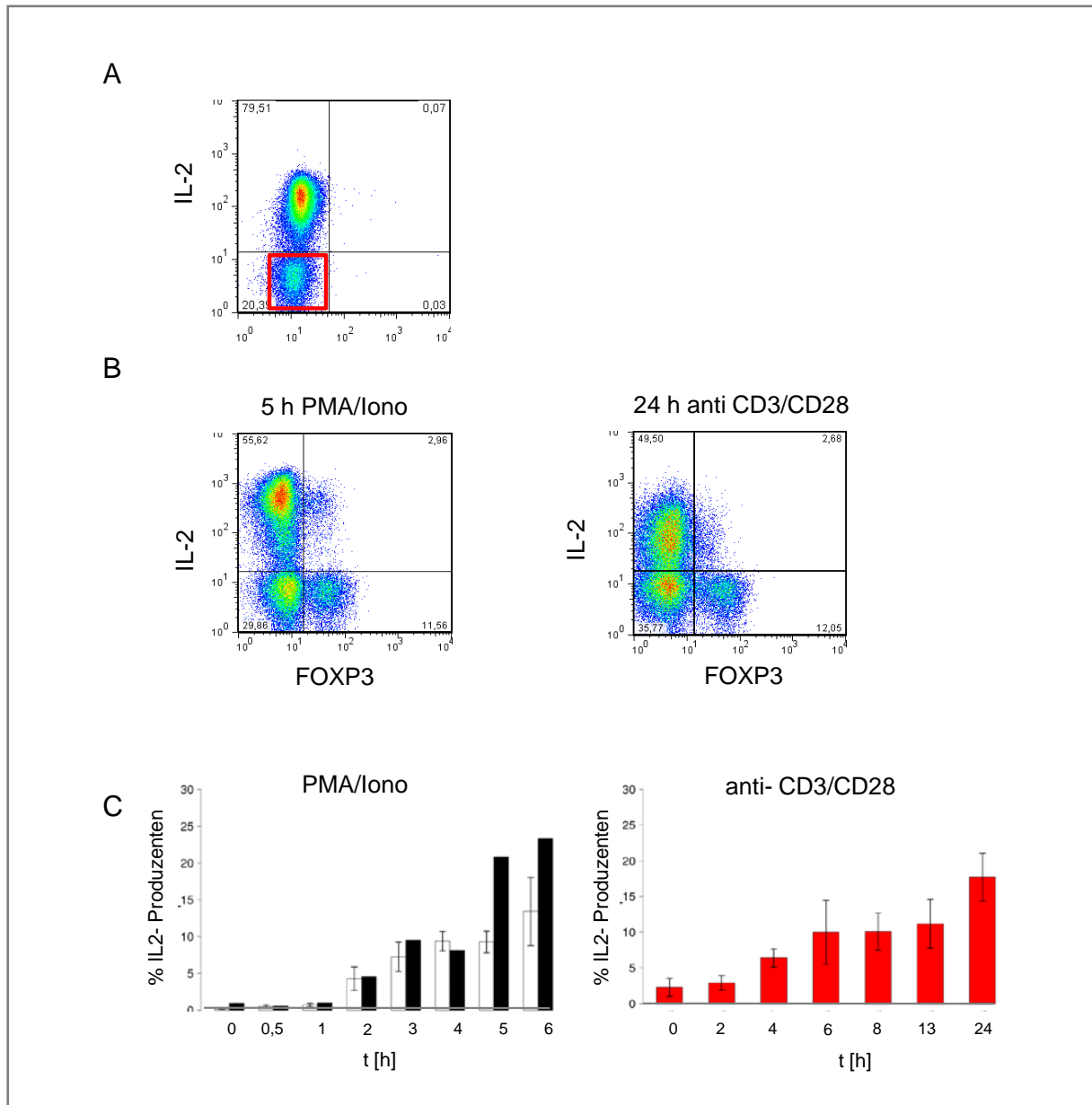
**Abb. 3.1 Abhängigkeit der IL-2-Produktion von der NFATc2 Menge.** CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden 5 h mit PMA/Ionomycin sowie Brefeldin A stimuliert und anschließend mit Fluorophor-gekoppelten Antikörpern gegen die Oberflächenmoleküle CD45RO und CD45RA gefärbt. Nach der Fixierung und Permeabilisierung erfolgte die intrazelluläre Färbung von NFATc2 und IL-2 und die durchflusszytometrische Analyse. Dargestellt ist eine Überlagerung der Histogramme der Fluoreszenzintensitäten für NFATc2 (links) und für IL-2 (rechts) der eingegrenzten CD45RO<sup>+</sup> (blau) und CD45RA<sup>+</sup> (rot) Th-Zellen (Mitte). Gezeigt ist eins von 6 unabhängigen Experimenten (A). Darstellung der Regressionsgeraden (rot) basierend auf den Rohdaten der Fluoreszenzintensitäten für IL-2 und NFATc2 in CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Die Standardabweichung der Regressionsgeraden ( $\pm 0,23$ ) ist durch die grünen Geraden dargestellt. Der Scatterplot wurde in vier Abschnitte mit unterschiedlich hohen logarithmierten (log) NFATc2 Fluoreszenzintensitäten eingeteilt. Diese wurden im Histogramm (rechts) hinsichtlich der logarithmierten IL-2 Fluoreszenzintensität überlagernd dargestellt (B).

Die beiden Th-Zell-Populationen wurden hinsichtlich ihrer NFATc2-Expression verglichen. Dafür wurden die Histogramme der beiden Populationen überlagert (Abb. 3.1A.links). Dies zeigte einen deutlichen Unterschied in der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI). Die CD45RO<sup>+</sup> Th-Zellen exprimierten mehr NFATc2 (MFI=1412,44) als die CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen (MFI=1081,01). Abb. 3.1A rechts zeigt die Überlagerung der Histogramme der

IL-2-Expression der wenig NFATc2 exprimierenden naiven Th-Zellen (rot) und der NFATc2 stark exprimierenden Gedächtnis-Th-Zellen (blau). Lediglich 29% der naiven-, aber 72% der Gedächtnis-Th-Zellen produzierten IL-2. Auch die Menge des pro Zelle exprimierten IL-2 war in Gedächtnis-Th-Zellen (MFI=5348,41) fast doppelt so hoch wie in naiven Th-Zellen (MFI=2704,75). Somit waren zum Zeitpunkt 5 h nach Stimulation mit PMA/Ionomycin nur wenige naive Zellen in der Lage, IL-2 zu produzieren. Es könnte sein, dass die naiven Th-Zellen im Gegensatz zu den stark NFATc2 exprimierenden Gedächtnis-Th-Zellen zu wenig NFAT exprimieren, so dass ein Schwellenwert, der zur IL-2-Produktion benötigt wird, nicht erreicht wird. Um diese Hypothese genauer zu untersuchen, sollte überprüft werden, ob die IL-2-Produktion in Th-Zellen direkt von der Menge an exprimiertem NFATc2 abhängig ist. Dies wurde auf Basis von Rohdaten einer IL-2 und NFATc2 Färbung in CD4<sup>+</sup> Th-Zellen nach 5 h PMA/Ionomycin Stimulation mit Hilfe eines linearen Regressionsmodells gezeigt (Abb. 3.1B; durchgeführt von Luca Mariani, Biophysikalisches Institut, Humboldt Universität Berlin). Die Regressionsgerade zeigt eine hoch signifikante Abhängigkeit der IL-2-Produktion von der NFATc2 Menge ( $r^2 = 0.999$ ). Die Einteilung des Scatter-Plots in Regionen mit sehr niedriger (grau), niedriger (rot), mittlerer (grün) und hoher (blau) NFATc2-Expression und deren Überlagerung im Histogramm ergab, dass die Mehrheit der Zellen mit einer hohen NFATc2 Menge auch IL-2 produzierte, während die Zellen mit sehr niedriger bzw. niedrigen NFATc2 Konzentrationen kein oder kaum IL-2 exprimierten. Somit ist eine hohe NFATc2 Konzentration charakteristisch für IL-2 produzierende Th-Zellen.

### 3.1.2 Detektion IL-2 produzierender FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen

Spenderabhängig exprimierten 60-90% der CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> (Gedächtnis-) Th-Zellen nach Stimulation mit PMA/Ionomycin IL-2 (Abb. 3.2A). Regulatorische Th-Zellen sind, soweit bisher bekannt, nicht in der Lage IL-2 und andere Effektorzytokine zu produzieren [33].



**Abb. 3.2 Einige FOXP3<sup>+</sup>Th-Zellen können nach Stimulation IL-2 exprimieren.** CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T-Zellen aus peripherem Blut wurden für 5 h mit PMA/Ionomycin (A und B links) oder mit Antikörpern gegen CD3 und CD28 (B rechts) stimuliert. Danach wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und intrazellulär gegen IL-2 (A) bzw. IL-2 und FOXP3 (B) gefärbt. Abgebildet ist jeweils eins von fünf unabhängigen Experimenten. Die Kinetik der IL-2-Produktion in PMA/Ionomycin (C links) oder anti-CD3/CD28 (C rechts) stimulierten CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T-Zellen von einem (rechts) bzw. 2 verschiedenen Spendern (links).

Um zu untersuchen, ob es sich bei den IL-2<sup>-</sup> Th-Zellen (rotes Analysefenster, Abb. 3.2A) um regulatorische T-Zellen handelt, wurden CD45RO<sup>+</sup> Th-Zellen für 5 h mit PMA/Ionomycin unter Zugabe von Brefeldin A stimuliert und mit Antikörpern gegen IL-2 und den Treg-

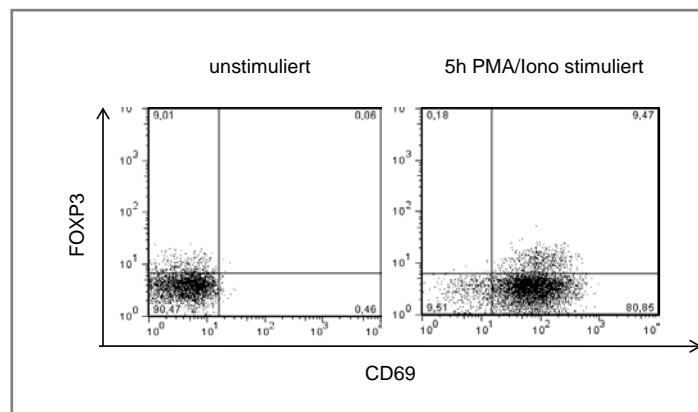


spezifisch exprimierten Transkriptionsfaktor FOXP3 (siehe 1.2.2.4) gefärbt. Die Abb. 3. 2B zeigt, dass 11% der Zellen FOXP3<sup>+</sup> sind und kein IL-2 produzierten. Jedoch erwartete man eine kleine Population von FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen (3%) IL-2.

Da die Stimulation mit PMA/Ionomycin sehr stark und unphysiologisch ist (siehe 1.3.7), wurde untersucht, ob dieser Teil der FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen auch nach Aktivierung mit einem physiologischeren, milderen Stimulus IL-2 produzieren kann. Dazu wurden CD45RO<sup>+</sup> Th-Zellen für 24 h mit Antikörpern gegen CD3 und CD28 kultiviert und anschließend gegen FOXP3 und IL-2 gefärbt. Auch unter diesen Bedingungen waren 18% der insgesamt 15% FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen in der Lage, IL-2 zu exprimieren (Abb. 3.2B, rechts). Lediglich die Kinetik der IL-2-Expression in FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen unterschied sich abhängig von der Art der Stimulation (Abb. 3.2C). Mit PMA/Ionomycin konnten 15 bis 20% der FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen bereits nach 6h IL-2 produzieren, während die Stimulation mit anti-CD3 und anti-CD28 zu einer deutlich langsameren Induktion der IL-2-Produktion in FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen führte. Unter diesen Bedingungen wurde das Maximum der IL-2<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> von 15% erst nach 24 h erreicht.

### 3.1.2.1 Alle FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen werden nach Stimulation aktiviert

Mit Hilfe des Aktivierungsmarkers CD69 sollte untersucht werden, ob alle FOXP3<sup>+</sup> Zellen nach Stimulation gleichermaßen aktiviert wurden. Dazu wurden CD45RO<sup>+</sup> Th-Zellen für 5 h

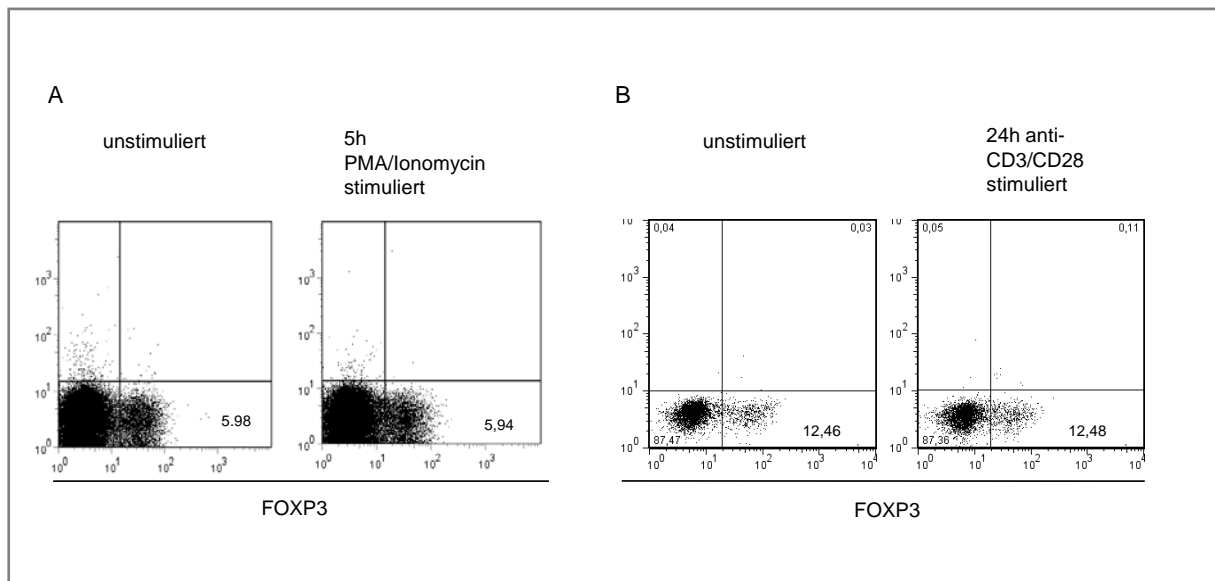


**Abb. 3.3 Alle FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen werden nach Stimulation aktiviert.** Unstimulierte bzw. 5 h PMA/Ionomycin stimulierte CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T-Zellen wurden zunächst mit einem Fluorochrom-gekoppelten Antikörper gegen CD69 gefärbt, dann fixiert und permeabilisiert. Anschließend wurde FOXP3 intrazellulär gefärbt und die Zellen mittels Durchflußzytometrie analysiert. Dargestellt ist eins von drei unabhängig durchgeführten Experimenten.

mit PMA/Ionomycin stimuliert und mit spezifischen Antikörpern gegen FOXP3 und den Aktivierungsmarker CD69 gefärbt (Abb. 3.3). Alle FOXP3<sup>+</sup> Treg-Zellen, sowohl IL2<sup>+</sup> als auch IL-2<sup>-</sup>, exprimierten nach Stimulation CD69 und waren somit in demselben Maße aktiviert.

### 3.1.2.2 Keine stimulationsabhängige FOXP3 Induktion in FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen

Humane, FOXP3<sup>+</sup> Gedächtnis-Th-Zellen können unter bestimmten Bedingungen nach Stimulation *in vitro* FOXP3 produzieren. Im Gegensatz zur FOXP3 Induktion bei der Differenzierung von naiven Th-Zellen zu iTreg-Zellen (siehe 1.2.2.4) ist diese FOXP3-Expression nur transient und verleiht den Zellen keine Treg-spezifischen Funktionen [37]. Unsere Versuche zeigten jedoch keine Zunahme in der Frequenz der FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen



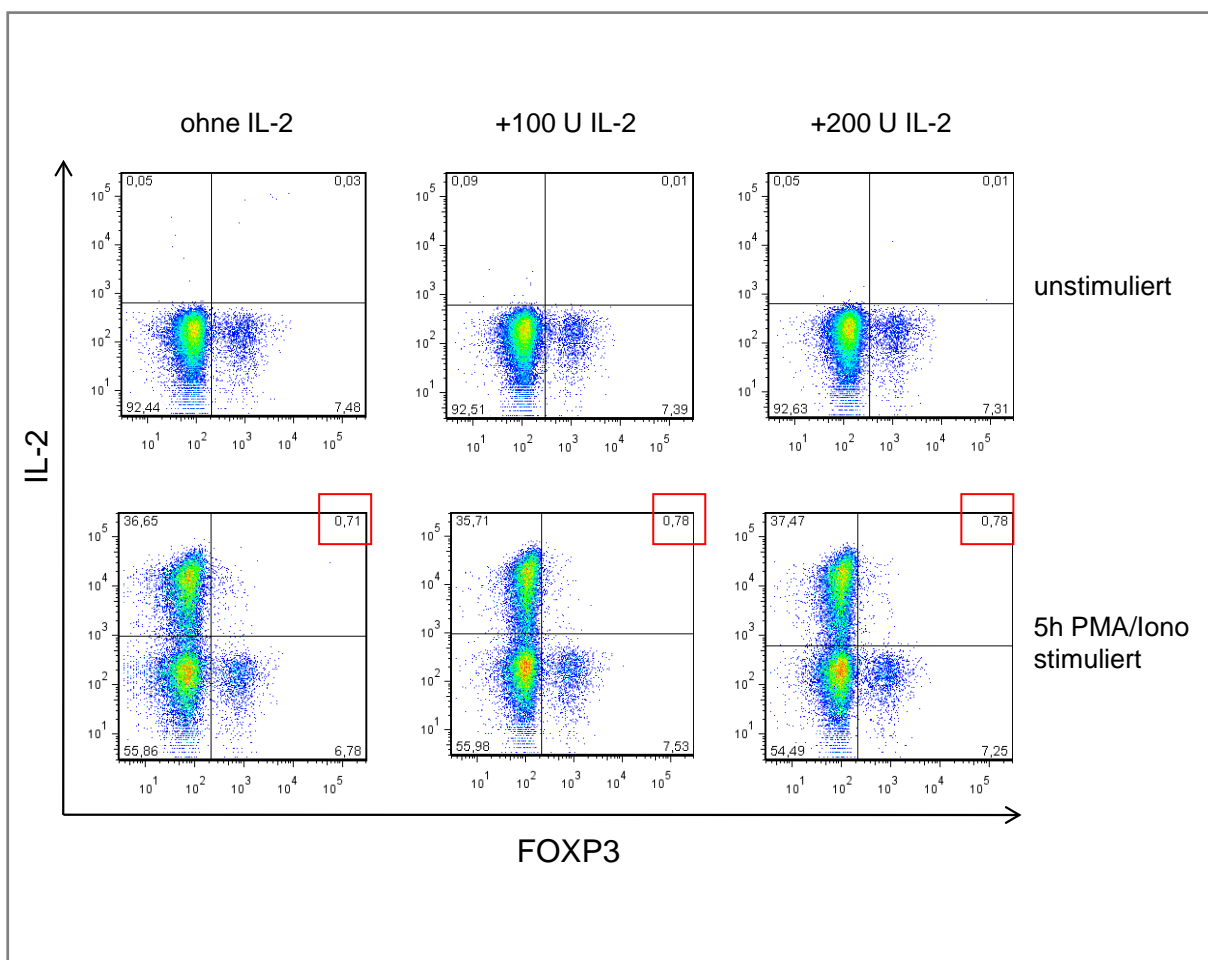
**Abb. 3.4 FOXP3 wird nicht stimulationsabhängig in Gedächtnis-Th-Zellen induziert.** Sortierte Gedächtnis-T-Zellen wurden entweder für 5 h mit PMA/Ionomycin (A) oder für 24 h mit anti-CD3/CD28 Antikörpern (B) stimuliert. Danach wurden sie fixiert, permeabilisiert, intrazellulär mit einem Antikörper gegen FOXP3 gefärbt und durchflußzytometrisch analysiert. Dargestellt ist jeweils eins von fünf unabhängigen Experimenten.

nach Stimulation sowohl mit PMA/Ionomycin (Abb. 3.4A) als auch mit anti-CD3 und -CD28 (Abb. 3.4B) im Vergleich zu den unstimulierten Proben.

### 3.1.2.3 Kein Einfluß von exogenem IL-2 auf die Frequenz der FOXP3<sup>+</sup>IL-2<sup>+</sup> Th-Zellen

FOXP3<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen exprimieren große Mengen CD25, die Alpha-Kette des IL-2 Rezeptors. Treg-Zellen benötigen die Signale, die bei der Bindung von IL-2 an CD25 weitergeleitet werden werden zur Entwicklung, Expansion und Aufrechterhaltung ihres spezifischen Phänotyps (FOXP3-Expression, Suppressivität). Da unter den in Abb. 3.2 verwendeten Stimulationsbedingungen aufgrund der Verwendung von Brefeldin A kein IL-2 ins Medium sezerniert wurde, konnten keine IL-2 vermittelten Signale in Treg-Zellen ausgelöst werden.

Es wurde nun überprüft, ob der Verlust des IL-2 Signals durch die Stimulation in Gegenwart von Brefeldin A zum Verlust des anergen Treg-Zell Phänotyps und somit zur IL-2



**Abb. 3.5 Die Zugabe von exogenem IL-2 hat keinen Einfluß auf die Frequenz der IL-2<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen.** CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T-Zellen wurden 5 h mit PMA/Ionomycin und Brefeldin A unter Zugabe von DMSO (Kontrolle), 100 U und 200 U rekombinatem humanem IL-2 stimuliert. Anschließend wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und intrazellulär gegen IL-2 und FOXP3 gefärbt. Abgebildet ist eins von zwei unabhängigen Experimenten.

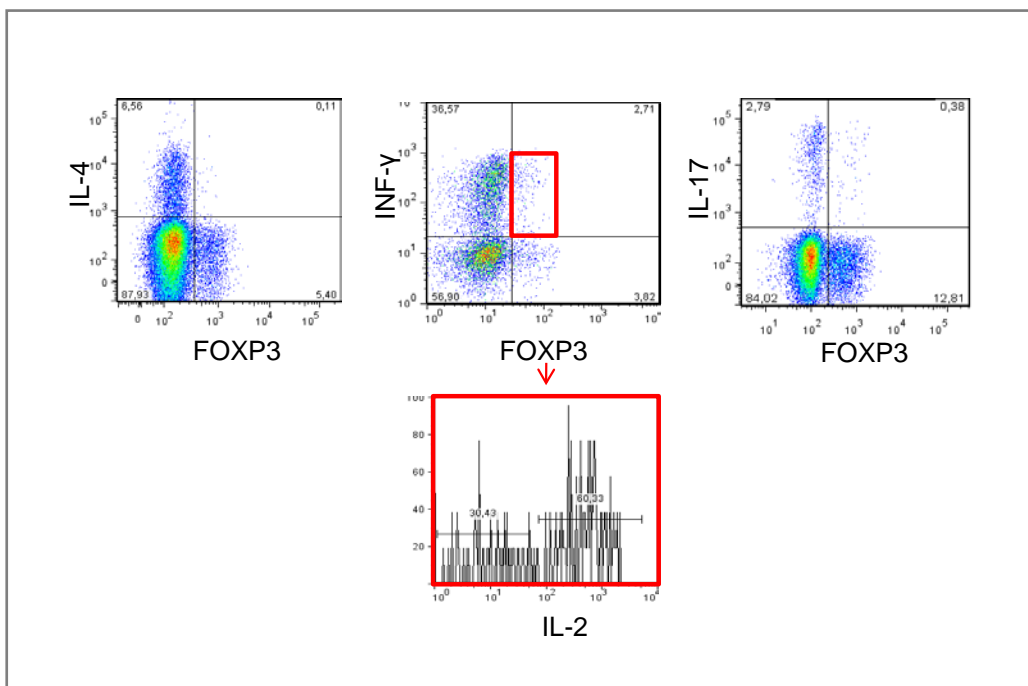
Produktion in FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen führen könnte. Dazu wurden die Zellen 5 h mit PMA/Ionomycin und Brefeldin A stimuliert und zusätzlich exogenes rekombinantes IL-2 in zwei verschiedenen Konzentrationen hinzugefügt. Unter allen Stimulationsbedingungen (0, 100 bzw. 200 U IL-2) machte die FOXP3<sup>+</sup> IL-2<sup>+</sup> Population konstant 0,71% -0,78% der gesamten CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T-Zellen aus. Der Zusatz von IL-2 hatte also keinen Einfluss auf die Frequenz der IL-2<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Zellen.

### 3.1.3 Phänotypische Charakterisierung der IL-2 produzierenden FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen

In den folgenden Experimenten wurden die IL-2<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen hinsichtlich ihres Phänotyps untersucht. Dazu wurde die Expression der Oberflächenmarker CD127, CD25 und CD40L sowie die Produktion von Effektorzytokinen in diesen Zellen analysiert, um Informationen über den Aktivierungszustand und die Ausprägung der Effektor-Zell- bzw. Treg-spezifischen Merkmale in diesen Zellen zu erhalten.

#### 3.1.3.1 IL-2<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen können IFN- $\gamma$ , aber kein IL-4 oder IL-17 produzieren

Um zu untersuchen, ob die unter 3.1.2 beschriebenen IL-2 produzierenden FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen auch Th1-, Th2- oder Th17-spezifische Effektorzytokine produzieren, wurden CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T-Zellen 5 h mit PMA/Ionomycin stimuliert und mit Antikörpern gegen IL-2, CD4, FOXP3 und IL-4, IFN- $\gamma$  bzw. IL-17 gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert.



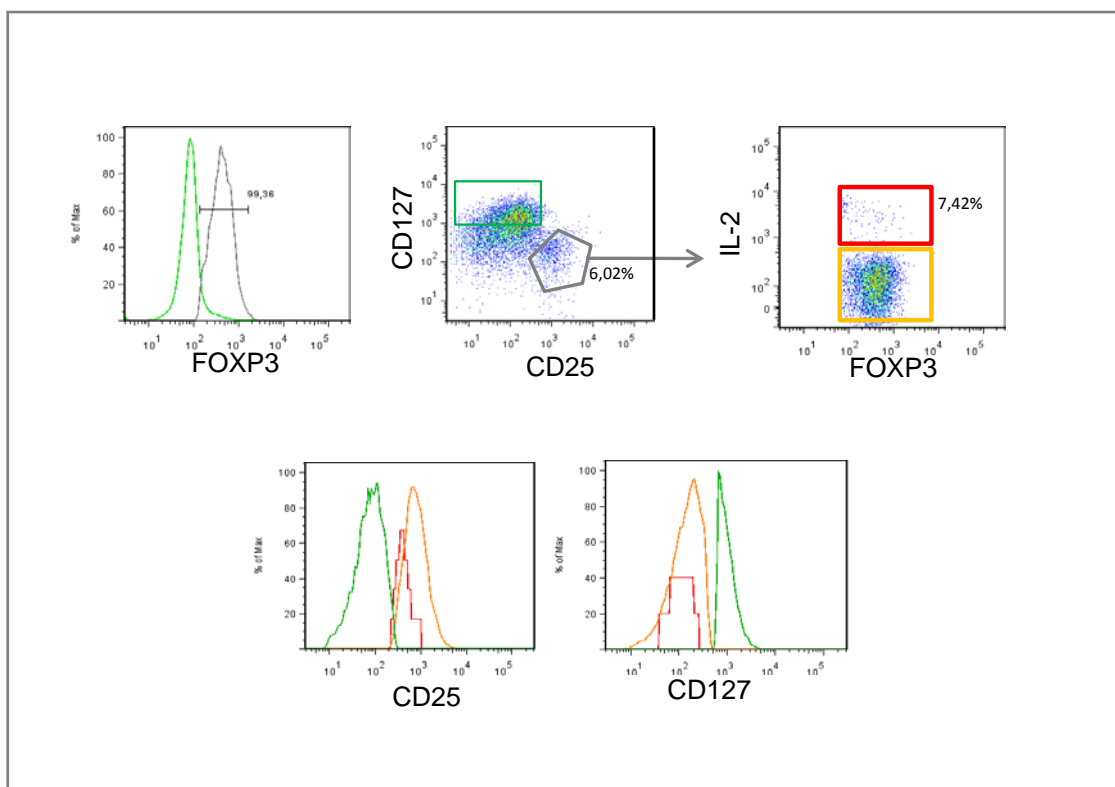
**Abb. 3.6 Die Mehrzahl der IL2<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen koexpressieren IFN- $\gamma$ .** MACS-sortierte CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T-Zellen wurden 5 h mit PMA/Ionomycin stimuliert und anschließend intrazellulär mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gegen IL-2, FOXP3 und IL-4 (links), IFN- $\gamma$  (mitte) bzw. IL-17 (rechts) gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Dargestellt ist eins von drei unabhängigen Experimenten.

FOXP3 sowie IL-4 (Abb. 3.6 links), IFN- $\gamma$  (mitte) bzw. IL-17 (rechts) gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die Auftragung der Intensitäten der Zytokine gegen FOXP3 im Scatter-Plot zeigte, dass unter den verwendeten Stimulationsbedingungen keine FOXP3<sup>+</sup> Zellen in der Lage waren, IL-4 zu exprimieren. Die Kofärbung von IFN- $\gamma$ , IL-2 und

FOXP3 machte hingegen deutlich, dass 35-50% der FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen IFN- $\gamma$  exprimierten. Diese IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen wurden in einem Analysefenster eingegrenzt (rot) und hinsichtlich ihrer IL-2-Expression untersucht. Hierbei zeigte sich, dass 55-65% der IFN- $\gamma$  produzierenden FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen auch IL-2 exprimierten. Die Färbung von IL-17 verdeutlichte, dass lediglich 0,2-0,4% der CD4<sup>+</sup> Zellen, und damit 2-5% der FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen, FOXP3 und IL-17 koexprimierten. Es konnten keine FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen detektiert werden, die sowohl IL-17 als auch IL-2 exprimierten.

### 3.1.3.2 IL-2<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen exprimieren CD25 aber kein CD127

Die Expression der Marker CD25 und CD127 können zur Unterscheidung von humanen Effektor- bzw. Gedächtnis-Th-Zellen (CD25<sup>+</sup>CD127<sup>high</sup>) und Treg-Zellen (CD25<sup>+</sup> CD127<sup>low</sup>) [158] verwendet werden. Um die IL-2<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen auf diese Oberflächenmoleküle hin zu analysieren, wurden CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T-Zellen nach 5 h Stimulation mit PMA/Ionomycin mit



**Abb. 3.7 FOXP3<sup>+</sup>IL-2<sup>+</sup> Th-Zellen exprimieren CD25 aber kein CD127.** MACS-sortierte CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> Th-Zellen wurden 5 h mit PMA/Ionomycin stimuliert, mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gegen CD25 und CD127 gefärbt, anschließend fixiert, permeabilisiert und zusätzlich intrazellulär gegen FOXP3 und IL-2 gefärbt. Die Analyse erfolgte im Durchflusszytometer. Gezeigt ist repräsentativ eins von drei unabhängigen Experimenten.

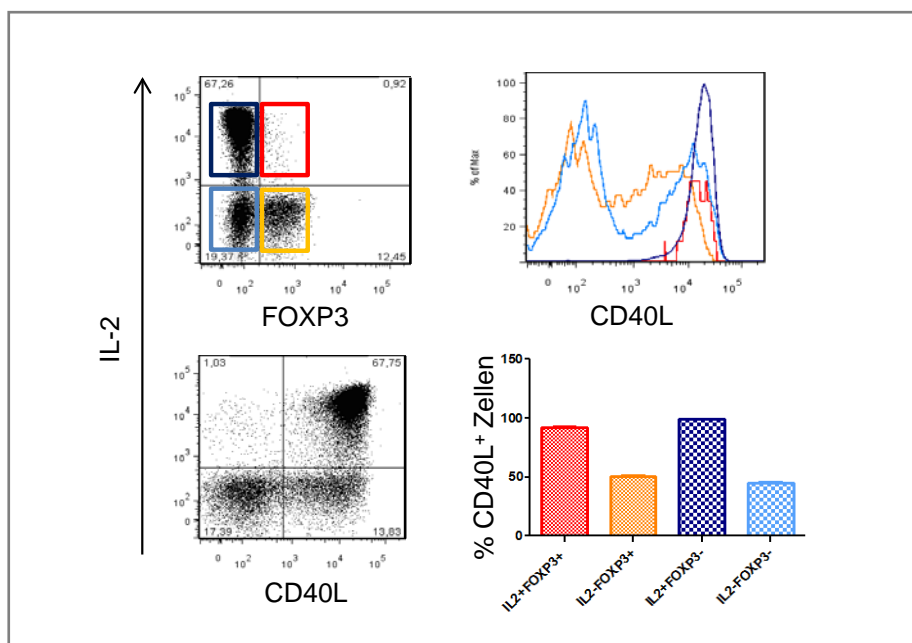
Antikörpern gegen CD25, CD127 an der Oberfläche sowie intrazellulär gegen IL-2 und FOXP3 gefärbt und im Durchflusszytometer gemessen. Die 6% CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> Zellen, die in

dem grauen Analysefenster eingegrenzt wurden, exprimierten zu 99% FOXP3, während die CD25<sup>+</sup>CD127<sup>high</sup> Zellen FOXP3<sup>-</sup> waren (Abb. 3.7 oben links). Die FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen (grau) wurden dann im Scatterplot gegen IL-2 aufgetragen (Abb. 3.7 oben rechts). In dieser Darstellung wurden Analysefenster angelegt, die die 7% IL-2<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Zellen (rot) von den IL-2<sup>-</sup>FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen (orange) abgrenzten. Diese so definierten Populationen sowie die Effektorzellen (grün) wurden bezüglich der Expression von CD25 (unten, linkes Histogramm) und CD127 (unten, rechtes Histogramm) miteinander verglichen.

Die IL-2<sup>-</sup>FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen exprimierten am meisten CD25 (MFI= 900,57), während die IL-2<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen lediglich eine MFI von 548,58 aufwiesen. Die eingegrenzten CD127<sup>+</sup> Zellen exprimierten kein CD25 (MFI= 91). Große Mengen CD127 wurden von den Effektorzellen exprimiert (MFI= 1065,50), während die Expression sowohl in den IL-2<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> (MFI= 131,57) als auch in den IL-2<sup>-</sup>FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen (MFI= 165,91) sehr gering war.

### 3.1.3.3 Alle IL-2<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen exprimieren den Aktivierungsmarker CD40L

CD40L (CD154) ist ein Ligand, der NFATc2-abhängig nach Stimulation auf der Oberfläche von Th-Zellen exprimiert wird und als Aktivierungsmarker dient [159]. Um den



**Abb. 3.8 Die FOXP3<sup>+</sup>IL-2<sup>+</sup> Th-Zellen exprimieren nach Stimulation CD40L.** MACS-sortierte CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T-Zellen wurden 5 h mit PMA/Ionomycin stimuliert und anschließend mit Fluorophor-gekoppelten Antikörpern gegen CD40L gefärbt. Danach wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und intrazellulär gegen IL-2 und FOXP3 gefärbt. Die Analyse erfolgte durchflusszytometrisch. Dargestellt ist eins von drei unabhängigen Experimenten.

Aktivierungsstatus der IL2<sup>+</sup> und IL-2<sup>-</sup>FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen zu vergleichen, wurden CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T-Zellen für 5 h mit PMA und Ionomycin stimuliert und anschließend mit Antikörpern gegen CD40L, IL-2 und FOXP3 gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. 68% der Zellen produzierten nach Stimulation IL-2 und exprimierten CD40L, während 14% zwar CD40L hochregulierten, jedoch kein IL-2 produzierten. Es wurden fast keine Zellen (1%) detektiert, die kein CD40L exprimierten und trotzdem IL-2 produzierten. 17% der Th-Zellen waren nicht aktiviert und exprimierten weder CD40L noch IL-2 (Abb. 3.8 links unten). Die Auftragung von FOXP3 gegen IL-2 im Scatterplot ermöglichte die Eingrenzung der vier Subpopulationen IL2<sup>+</sup>FOXP3<sup>-</sup> (dunkelblau), IL-2<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> (rot), IL-2<sup>-</sup>FOXP3<sup>-</sup> (hellblau) sowie IL-2<sup>-</sup>FOXP3<sup>+</sup> (orange) in Analysefenstern. Die CD40L-Expression wurde vergleichend in einem überlagerten Histogramm der Fluoreszenzintensitäten der vier Populationen dargestellt, wobei die Farben den Analysefenstern im Scatter-Plot entsprachen (Abb. 3.8 rechts oben). Die prozentuale Anteil der CD40L<sup>+</sup> Zellen in den einzelnen Analysefenstern wurden zusätzlich im Balkendiagramm dargestellt (rechts unten). 99% der IL-2<sup>+</sup>FOXP3<sup>-</sup> und 91% der IL-2<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen exprimierten CD40L. Von den IL-2<sup>-</sup>FOXP3<sup>-</sup> Th-Zellen konnten lediglich 46% und von den IL-2<sup>-</sup>FOXP3<sup>+</sup> 52% der Zellen nach Aktivierung CD40L hochregulieren.

**Tabelle 14. Zusammenfassung der phänotypischen Charakterisierung der IL-2<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen.**

	CD127	CD25	CD40L
IL-2 <sup>-</sup> FOXP3 <sup>+</sup>	-	++	+
IL-2 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>+</sup>	-	+	++
FOXP3 <sup>-</sup>	++	-	++

Die Ergebnisse der phänotypischen Charakterisierung wurden in Tabelle 14 nochmals zusammenfassend dargestellt. Die IL2<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen exprimierten demnach mehr CD25 und CD40L als die IL-2<sup>-</sup>FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen, wohingegen CD127 in beiden FOXP3<sup>+</sup> Zellpopulationen nicht exprimiert wurde.

### 3.1.4 IL-2<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen exprimieren mehr NFATc2 als IL-2<sup>-</sup>FOXP3<sup>+</sup>

Aufgrund der signifikanten Abhängigkeit der IL-2-Produktion von der NFATc2 Menge in Th-Zellen, die in Abb. 3.1 dargestellt wurde, sollte im folgenden untersucht werden, wie sich die NFATc2-Expression in FOXP3<sup>+</sup> IL-2<sup>+</sup> zu den FOXP3<sup>+</sup> IL-2<sup>-</sup> Zellen verhält und ob die relativen NFATc2-Mengen in diesen Zellen vergleichbar mit denen in Gedächtnis-Th-Zellen sind (Abb. 3.9).

Um eine möglichst homogene T-Zell Fraktion zu erhalten, wurden CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> sortierte T-Zellen verwendet, die für 5 h mit PMA/Ionomycin stimuliert und anschließend intrazellulär gegen IL-2, FOXP3 und NFATc2 gefärbt wurden. IL-2 wurde gegen FOXP3 in einem Scatter-Plot aufgetragen, so dass sich klar vier verschiedene Subpopulationen erkennen ließen, die einzeln mit Hilfe von Analysefenstern eingegrenzt wurden (Abb. 3.9A). Die FOXP3<sup>+</sup> Zellen entsprachen den roten (IL-2<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup>) und gelben (IL-2<sup>-</sup>FOXP3<sup>+</sup>) Fenstern, während die FOXP3<sup>-</sup> Populationen dem dunkelblauen (IL2<sup>+</sup>FOXP3<sup>-</sup>) und hellblauen (IL2<sup>-</sup>FOXP3<sup>-</sup>) Ausschnitten entsprachen. Die Überlagerung der Histogramme für die NFATc2-Expression der vier Subpopulationen in Abb. 3.9A zeigte, dass sich die Subpopulationen teilweise erheblich in den mittleren Fluoreszenzintensitäten für NFATc2 unterschieden.

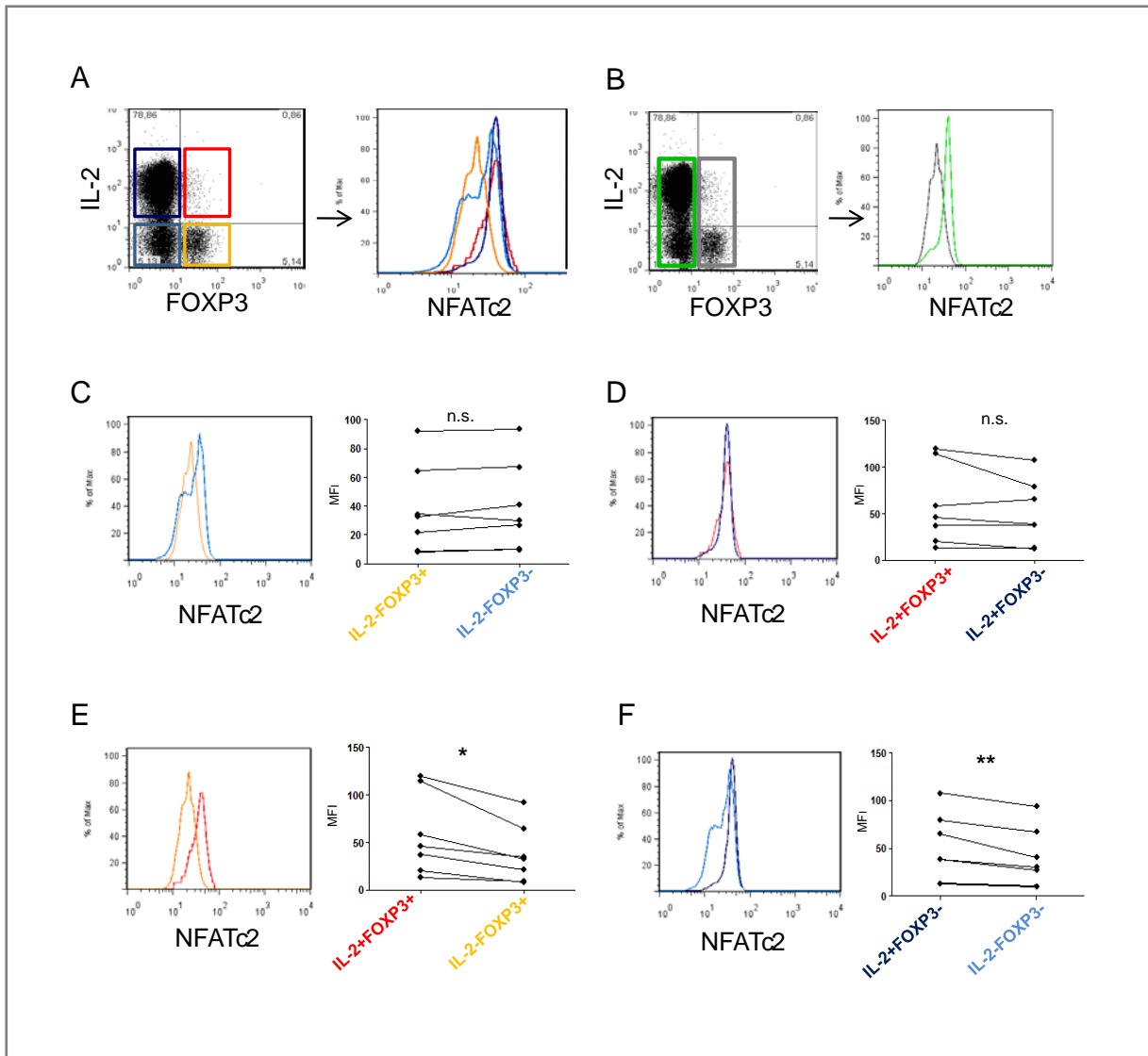
Der Vergleich der relativen NFATc2-Mengen (MFI) der gesamten FOXP3<sup>+</sup> (grau) und FOXP3<sup>-</sup> (grün) Th-Zellen (Abb. 3.9B) zeigte eine deutlich geringere NFATc2-Expression in FOXP3<sup>+</sup> Treg-Zellen (MFI= 21,15) als in FOXP3<sup>-</sup> Zellen (MFI= 38,61). Diese Beobachtung traf für alle untersuchten Spender zu (n=6).

Vergleicht man die MFI für die beiden IL-2<sup>-</sup> Th-Zellen (Abb. 3.9C) im Histogramm, so ließ sich erkennen, dass in dem exemplarisch dargestellten Experiment die NFATc2-Expression in den IL-2<sup>-</sup>FOXP3<sup>+</sup> Zellen (MFI= 21,74) zwar geringfügig schwächer war als in den IL-2<sup>-</sup>FOXP3<sup>-</sup> MFI= 26,01), dieser Unterschied sich aber in verschiedenen Spendern als nicht konsistent herausgestellt hat und somit nicht signifikant (p= 0,1664) war. Die IL2<sup>-</sup>FOXP3<sup>-</sup> Th-Zellen zeigten eine bimodale Dichteverteilung, während es sich bei den IL-2<sup>-</sup>FOXP3<sup>+</sup> Zellen um eine normalverteilte Population handelte, deren MFI dem Teil der FOXP3<sup>+</sup>IL2<sup>-</sup> Zellen entsprach, der geringer in seinem NFATc2 Gehalt war. Am wenigsten NFATc2 wurde in den IL-2<sup>-</sup>FOXP3<sup>+</sup> Treg-Zellen detektiert.

Die Überlagerung der Histogramme für die NFATc2-Expression der beiden IL-2 produzierenden Populationen (Abb. 3.9D) zeigte, dass sie sich nicht signifikant (p= 0,1829) in den MFI für NFATc2 unterschieden. Die MFI beider IL-2<sup>+</sup> Subpopulationen waren jedoch deutlich höher als die der IL-2<sup>-</sup> Th-Zellen.

Dies wurde auch in der Überlagerung der Histogramme der IL-2<sup>-</sup>FOXP3<sup>+</sup> (MFI= 21,74) und IL2<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> (MFI=37,48) Zellen (Abb. 3.9E) deutlich, die eine signifikant höhere NFATc2-Expression (p= 0,0105) in den IL-2<sup>+</sup> als in den IL-2<sup>-</sup> Treg-Zellen zeigte.





**Abb. 3.9 NFATc2-Expression in den verschiedenen IL-2/FOXP3 Subpopulationen.** CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T-Zellen wurden aus dem Blut gesunder Spender isoliert und 5 h mit PMA/Ionomycin unter Zugabe von Brefeldin A stimuliert. Anschließend wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit Fluorophor-gekoppelten Antikörpern gegen IL-2, FOXP3 und NFATc2 gefärbt. Die Analyse erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Gezeigt ist eins von sieben unabhängig durchgeführten Experimenten (A-F). Überlagerte Histogramm Daten der NFATc2-Expressionen der vier in Analysefenstern eingegrenzten Populationen; die FOXP3 Populationen in hell- bzw. dunkelblau, die FOXP3<sup>+</sup> Populationen in rot bzw. orange (A). Vergleich der NFATc2 Fluoreszenzintensitäten jeweils zweier eingegrenzter Subpopulationen im Histogramm und die Darstellung des Vergleichs der gemittelten Fluoreszenzintensitäten (MFI) für NFATc2 von sieben unabhängigen Experimenten. Die Signifikanzen wurden mittels eines gepaarten Student-T-Tests ermittelt (B-F).

Auch bei dem Vergleich der NFATc2 MFI in IL-2<sup>+</sup>FOXP3<sup>-</sup> (MFI= 38,21) und IL-2<sup>-</sup>FOXP3<sup>-</sup> (MFI= 26,01) Gedächtnis-Th-Zellen (Abb. 3. 9F) zeigte sich eine deutlich höhere NFATc2-Expression in den IL-2<sup>+</sup> Th-Zellen (p= 0,0083).

Zusammenfassend demonstrieren diese Ergebnisse, dass die gesamte FOXP3<sup>+</sup> Population deutlich weniger NFATc2 exprimiert als die gesamte Gedächtnis-Th-Zellpopulation. Zudem

wurde deutlich, dass sowohl in Gedächtnis-Th-Zellen als auch in FOXP3 exprimierenden Th-Zellen die NFATc2 Menge mit der Fähigkeit IL-2 zu produzieren korreliert.

### **3.1.5 FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen exprimieren unabhängig von ihrem Differenzierungsstatus weniger NFATc2 als FOXP3<sup>-</sup> Th-Zellen**

Abb. 3.1 zeigte, dass die CD45RO<sup>+</sup> Gedächtnis-Th-Zellen größere Mengen NFATc2 exprimieren als CD45RA<sup>+</sup> naive Th-Zellen, und die Menge exprimierten NFATs mit der Fähigkeit IL-2 zu produzieren korreliert. Die NFATc2 Konzentration variiert somit abhängig vom Differenzierungsstatus der Zellen.

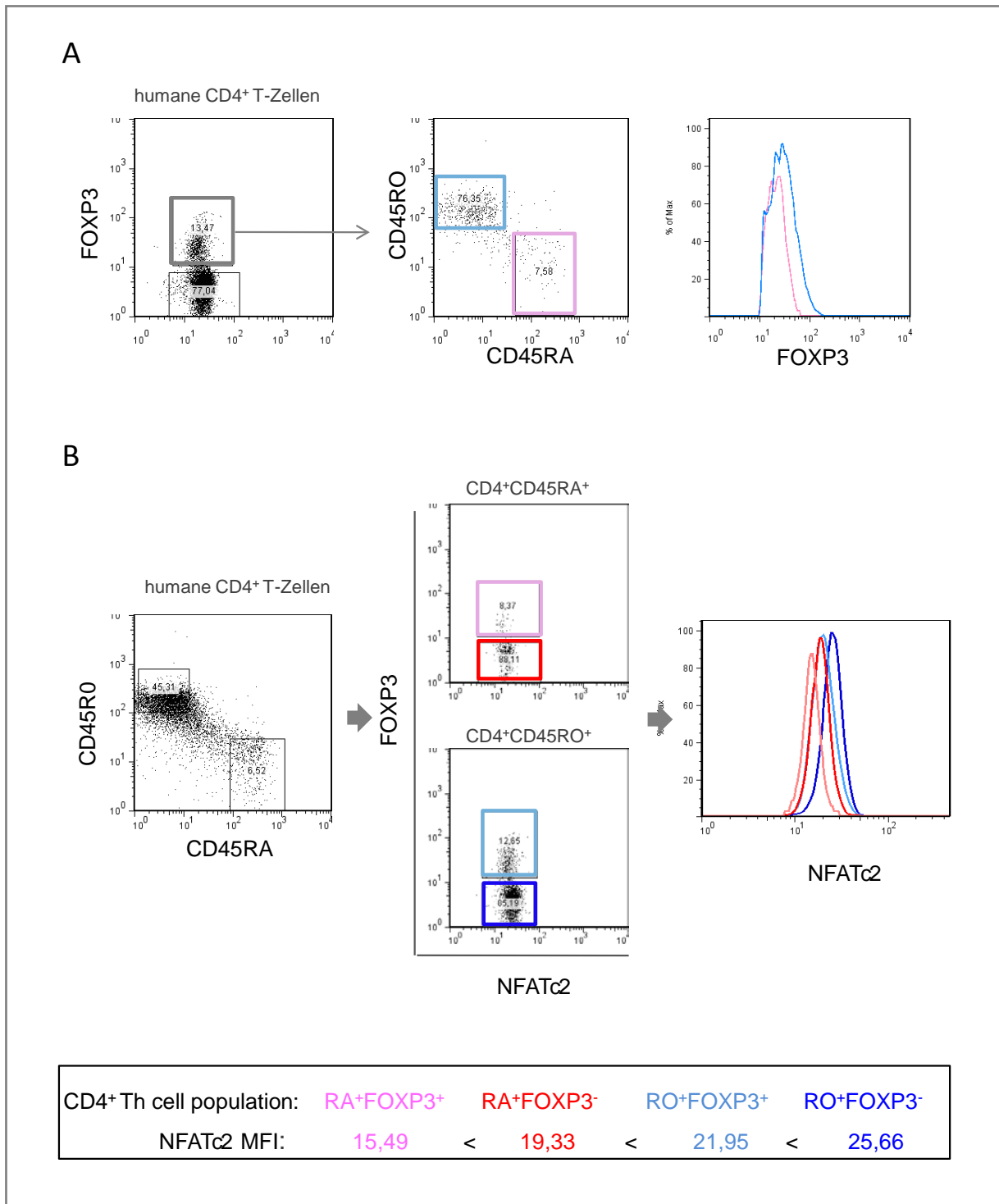
Im folgenden sollte überprüft werden, ob FOXP3<sup>+</sup> Treg-Zellen während ihrer Differenzierung von naiven zu Gedächtnis-Zellen auch eine Hochregulation der NFATc2-Expression erfahren wie es für FOXP3<sup>-</sup> Th-Zellen beobachtet wurde.

Dazu wurden CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit Antikörpern gegen CD45RA, CD45RO, FOXP3 und NFATc2 gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Abb. 3.10B zeigt die in Analysefenstern eingegrenzten CD45RA<sup>+</sup> und CD45RO<sup>+</sup> Subpopulationen. Sowohl die Gedächtnis-Th-Zellen (blau) als auch die naiven Th-Zellen (rot) wurden in FOXP3<sup>+</sup> und FOXP3<sup>-</sup> Fraktionen eingegrenzt und hinsichtlich ihrer NFATc2-Expression (MFI) im überlagerten Histogramm verglichen.

Die CD45RA<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> Zellen exprimierten dabei weniger NFATc2 (MFI= 15,49) als die naiven FOXP3<sup>-</sup> Zellen (MFI= 19,33). Das gleiche war auch in den CD45RO<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> -Zellen (MFI= 21,95) im Vergleich zu den CD45RO<sup>+</sup> FOXP3<sup>-</sup> Zellen (MFI= 25,66) zu beobachten. Somit exprimierten sowohl CD45RA<sup>+</sup> als auch CD45RO<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> Zellen weniger NFATc2 als die jeweiligen FOXP3<sup>-</sup> Th-Zellpopulationen, wobei die Differenzen der MFI in den FOXP3<sup>+</sup> und FOXP3<sup>-</sup> Populationen fast identisch waren (3,84 für die CD45RA<sup>+</sup> bzw. 3,71 für die CD45RO<sup>+</sup> Th-Zellen).

Dieser Versuch zeigte, dass die FOXP3<sup>+</sup> ebenso wie die FOXP3<sup>-</sup> Th-Zellen im CD45RO<sup>+</sup> Differenzierungsstatus mehr NFATc2 exprimierten als die CD45RA<sup>+</sup> Zellen, und somit während der Differenzierung eine Hochregulation der NFATc2-Mengen in den Treg-Zellen analog zu den Th-Zellen erfolgte.

In den folgenden Experimenten, in denen die FOXP3-Expression untersucht wurde, wurden stets CD45RO<sup>+</sup> Th-Zellen verwendet, da sich die Mehrheit der FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen (spenderabhängig 70-90%) in peripherem Blut im Stadium der Gedächtnis-Zellen befindet,



**Abb. 3.10 FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen exprimieren unabhängig von ihrem Differenzierungsstatus weniger NFATc2 als FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen.** MACS sortierte humane CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden mit Antikörpern gegen CD45RO und CD45RA gefärbt. Anschließend wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und zusätzlich intrazellulär gegen FOXP3 und NFATc2 gefärbt. Die Analyse erfolgte durchflusszytometrisch. Dargestellt ist eins von drei unabhängigen Experimenten.

während nur 7-10% der FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen den Marker CD45RA für naive Zellen exprimierte (Abb. 3. 10A).

### 3.2 FOXP3 bindet an den NFATc2-Promotor in CD25<sup>+</sup> Th-Zellen

FOXP3<sup>+</sup> Zellen exprimieren unabhängig von ihrem Differenzierungsstadium weniger NFATc2 als FOXP3<sup>-</sup> Th-Zellen. In „ChIP-on-Chip“ Experimenten von FOXP3 transfizierten Zelllinien wurde bereits die Bindung von FOXP3 an Gene von Molekülen der TZR-Signalkaskade und deren eingeschränkte Expression in diesen Zellen gezeigt (siehe 1.5.1). Nachfolgend sollte untersucht werden, ob die geringe NFATc2-Expression in primären FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen eine direkte Folge der Bindung und Repression der Transkription durch FOXP3 am Promotor des *NFATc2* Gens ist.

#### 3.2.1 In silico Analyse von potentiellen FOXP3-Bindestellen im NFATc2 Promoter

Zunächst wurde eine *in silico* Analyse des humanen *NFATc2*-Promotorbereichs nach Lee et al. durchgeführt [160]. Dafür wurde der Bereich 1000 bp vor und hinter dem Transkriptionsstart hinsichtlich putativer FOXP3 bzw. gemeinsamer NFAT/FOXP3-Bindestellen untersucht. Abb. 3.11 zeigt, dass im Bereich von 850 bis 950 bp vor dem Transkriptionsstart eine Akkumulation von zwei potentiellen FOXP3-Bindestellen (rot) sowie

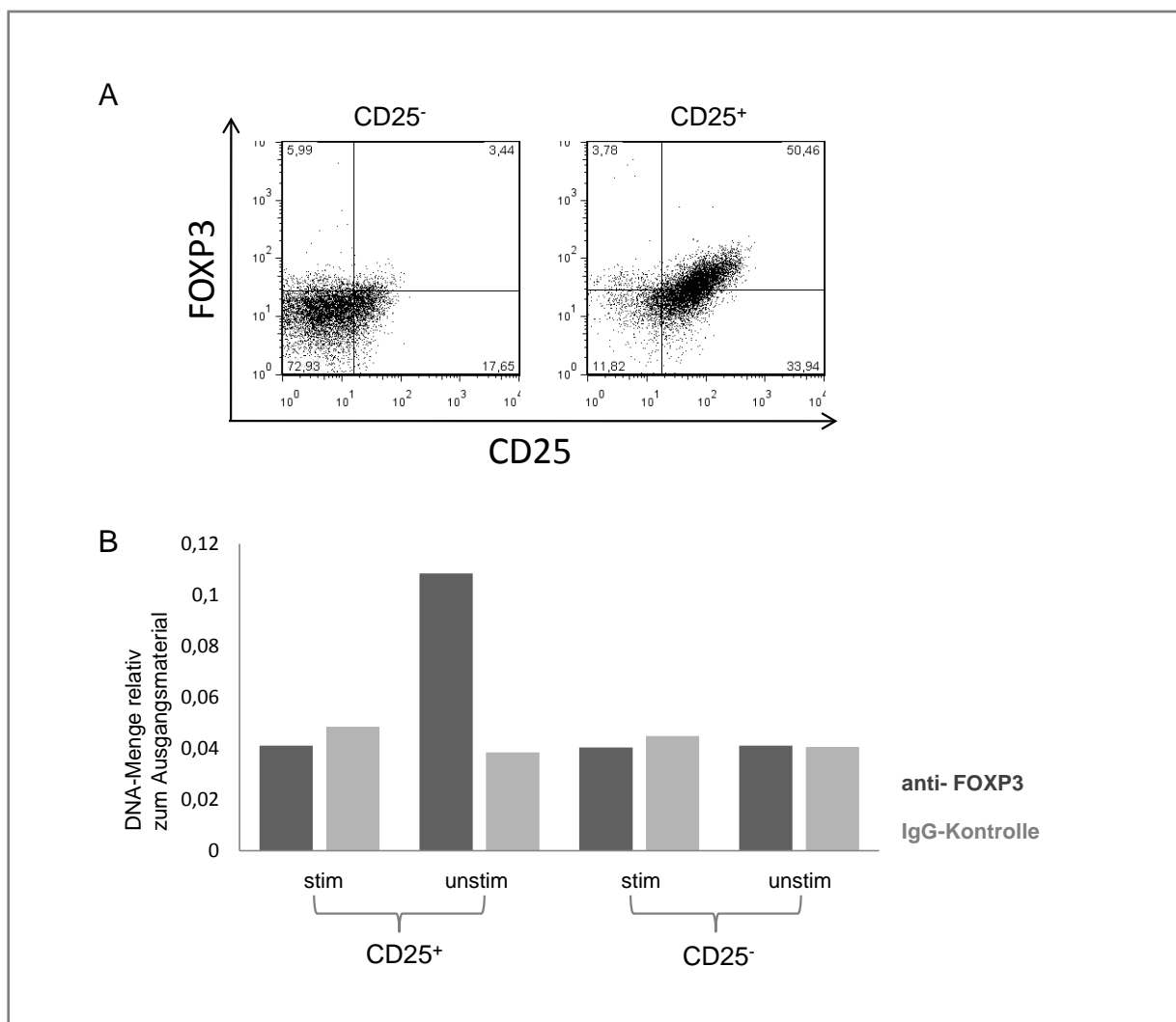
-1000	TAATTA AAAA TACACATTCA CGAGTCTGTA TTCAGACTTAT GGAATCAGA
-950	AGCTCCAGGG <u>AGGGGCCTGG GAATCATGCTT TAAACAAGC</u> AGCCAGGCGT
-900	<u>GTTTGTC</u> ACT TGCCAACCGC CCCATCAGAA CTGTACTCCT CGTTCTCCCT
-850	CCAGCACACC CAGCCCCTTC GAGCTCTGGC TCTGTGTTTT GGTTCCTACT
-800	GCCAGAACAC ACTTCCCCAA GATCGCCTCA TCAATCAGGT TTCTTCAAAT

**Abb. 3.11 In silico Analyse des humanen *NFATc2*-Promotorbereichs.** Abgebildet sind die putativen FOXP3 (rot) und NFAT/FOXP3 (blau)-Bindstellen in der Region 850- 1000 bp vor dem Transkriptionsstart des *NFATc2* Gens. Die Sequenz der verwendeten Oligonukleotide für die RT-PCR sind in grau dargestellt.

einer gemeinsamen FOXP3/NFAT-Bindestelle (blau) identifiziert werden konnte. Mittels Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) sollte untersucht werden, ob in primären Treg-Zellen tatsächlich eine Bindung von FOXP3 am *NFATc2*-Promotor erfolgt.

### 3.2.2 FOXP3-Bindung an den *NFATc2*-Promotor in unstimulierten $CD25^+$ Th-Zellen

Zunächst wurden  $CD25^-$  und  $CD25^+$  Th-Zellen mit Hilfe der MACS-Sortierung angereichert. Ein Teil der Zellen wurde abgenommen und mit einem spezifischen Antikörper gegen FOXP3 gefärbt. Die durchflusszytometrische Analyse ergab, dass lediglich 50,46% der  $CD25^+$  Zellpopulation FOXP3 exprimierten (Abb. 3.12). Diese FOXP3-angereicherten  $CD25^+$  Zellen sowie die  $CD25^-$  Th-Zellen wurden entweder unstimuliert verwendet oder für 30 min mit PMA/Ionomycin stimuliert. Mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers gegen FOXP3 bzw. einer unspezifischen IgG-Kontrolle wurde eine ChIP durchgeführt.



**Abb. 3.12 FOXP3 bindet in unstimulierten  $CD25^+$  T-Zellen an den *NFATc2*-Promotor.**  $CD25^-$  depletierte  $CD4^+$  T-Zellen ( $CD25^-$ ) und  $CD25^+$  angereicherte Th-Zellen ( $CD25^+$ ) wurden mittels MACS sortiert. Die Expression von FOXP3 in den beiden Populationen wurde durchflusszytometrisch ermittelt (A). Die Zellen wurden anschließend entweder 30 min mit PMA/Ionomycin stimuliert oder unstimuliert weiter verwendet. Mit den Zellfraktionen wurde eine ChIP mit einem spezifischen Antikörper gegen FOXP3 sowie einer unspezifischen IgG-Kontrolle durchgeführt. Die Quantifizierung der präzipitierten DNA erfolgte mit Hilfe einer qRT-PCR mit Oligonukleotiden, die die potentiellen FOXP3-Bindestellen im *NFATc2*-Promotor umspannen (siehe Abb. 3.11). Dargestellt sind die präzipitierten DNA-Mengen relativ zum Ausgangsmaterial der ChIP mit einem FOXP3-Antikörper (schwarze Balken) oder der IgG-Kontrolle (graue Balken). Das abgebildete Experiment ist repräsentativ für 2 unabhängige Experimente mit vergleichbarem Ergebnis (B).

Abb. 3.12B zeigt die dabei präzipitierte DNA-Menge relativ zum Ausgangsmaterial, bestimmt mittels qRT-PCR mit den in Abb. 3.11 angegebenen Oligonukleotiden. In CD25<sup>-</sup> Th-Zellen wurde weder in stimulierten noch in unstimulierten Zellen mit dem FOXP3 Antikörper mehr DNA präzipitiert als mit der IgG-Kontrolle. Somit erfolgt in dieser Zellpopulation keine Bindung von FOXP3 an den angegebenen Bereich des *NFATc2-Promotors*. Auch in den stimulierten CD25<sup>+</sup> Th-Zellen, von denen 50% FOXP3 exprimieren, ist keine Bindung erkennbar. Lediglich in den unstimulierten CD25<sup>+</sup> Th-Zellen bindet FOXP3 an den *NFATc2-Promotor*. Da das Signal mehr als zweimal höher als die Kontrolle ist, obwohl lediglich die Hälfte der Zellen überhaupt FOXP3 exprimiert, handelt es sich dabei um ein starkes Signal, dass auf eine spezifische Bindung des FOXP3 in unstimulierten CD25<sup>+</sup> Th-Zellen schließen lässt.

### **3.3 Expression und Aktivierung der TZR-abhängigen Transkriptionsfaktoren**

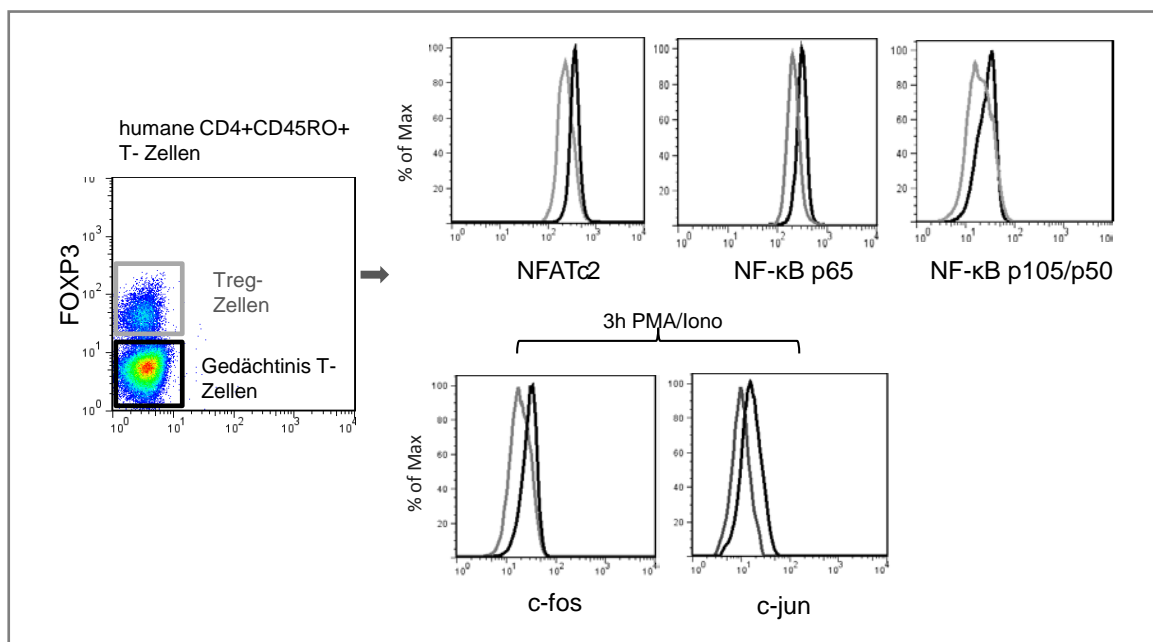
In den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob sich Treg-Zellen neben der geringeren NFATc2-Expression (Abb. 3.9A, links) auch in der Expression der TZR-abhängig aktivierten Transkriptionsfaktoren NF-κB und AP-1 von den Gedächtnis-Th-Zellen unterscheiden. NFATc2, NF-κB und AP-1 müssen kooperativ an den *IL-2-Promotor* binden, um die IL-2-Expression zu induzieren. Zu geringe Mengen oder Defekte in der Aktivierung dieser Faktoren können zur Unfähigkeit der Treg-Zellen, IL-2 zu produzieren, beitragen.

#### **3.3.1 Die Expression von NFATc2, NF-κB und AP-1 ist geringer in Treg- als in Gedächtnis-Th-Zellen**

##### *3.3.1.1 Detektion der Transkriptionsfaktoren mittels Durchflusszytometrie*

Um die basale Expression der Transkriptionsfaktoren auf Einzelzellebene zu untersuchen, wurden die *ex vivo* isolierten humanen CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T-Zellen ohne Stimulation fixiert und mit Antikörpern gegen FOXP3 zusammen mit NFATc2, NF-κB p65 bzw. NF-κB p105/p50 gefärbt. Die FOXP3<sup>+</sup> (Treg-) und FOXP3<sup>-</sup> (Gedächtnis-) Th-Zellen wurden mit Hilfe von Analysefenstern eingegrenzt (Abb. 3.13) und die Histogramme der beiden Subpopulationen für die einzelnen Transkriptionsfaktoren überlagernd dargestellt. Dies ermöglichte den direkten Vergleich der MFI der Faktoren in den beiden Th-Zellpopulationen in einer Messung, ohne die Zellen vorher sortieren zu müssen. Für die Detektion der stimulationsabhängig induzierten Transkriptionsfaktoren c-fos und c-jun, die zusammen als

Heterodimer AP-1 an die DNA binden, wurden die Zellen vor der Fixierung und Färbung 3 h mit PMA/Ionomycin stimuliert.



**Abb. 3.13 Treg-Zellen exprimieren weniger NFATc2, NF-κB und AP-1 als Gedächtnis-Th-Zellen.** *Ex vivo* aus peripherem Blut gewonnene Gedächtniszellen wurden fixiert, permeabilisiert und intrazellulär mit Antikörpern gegen FOXP3 sowie NFATc2, NF-κBp65 und NF-κBp105/p50 gefärbt. C-jun und c-fos wurden mit FOXP3 nach der Stimulation der Zellen für 3 h mit PMA/Ionomycin intrazellulär angefärbt. Die gemittelte Fluoreszenzintensität der eingegrenzten FOXP3<sup>+</sup> Treg-Zellen (grau) und der FOXP3<sup>+</sup> Gedächtnis-T-Zellen (schwarz) für die jeweiligen Transkriptionsfaktoren wurden im Histogramm überlagernd dargestellt. Gezeigt ist eins von fünf unabhängig durchgeführten Experimenten.

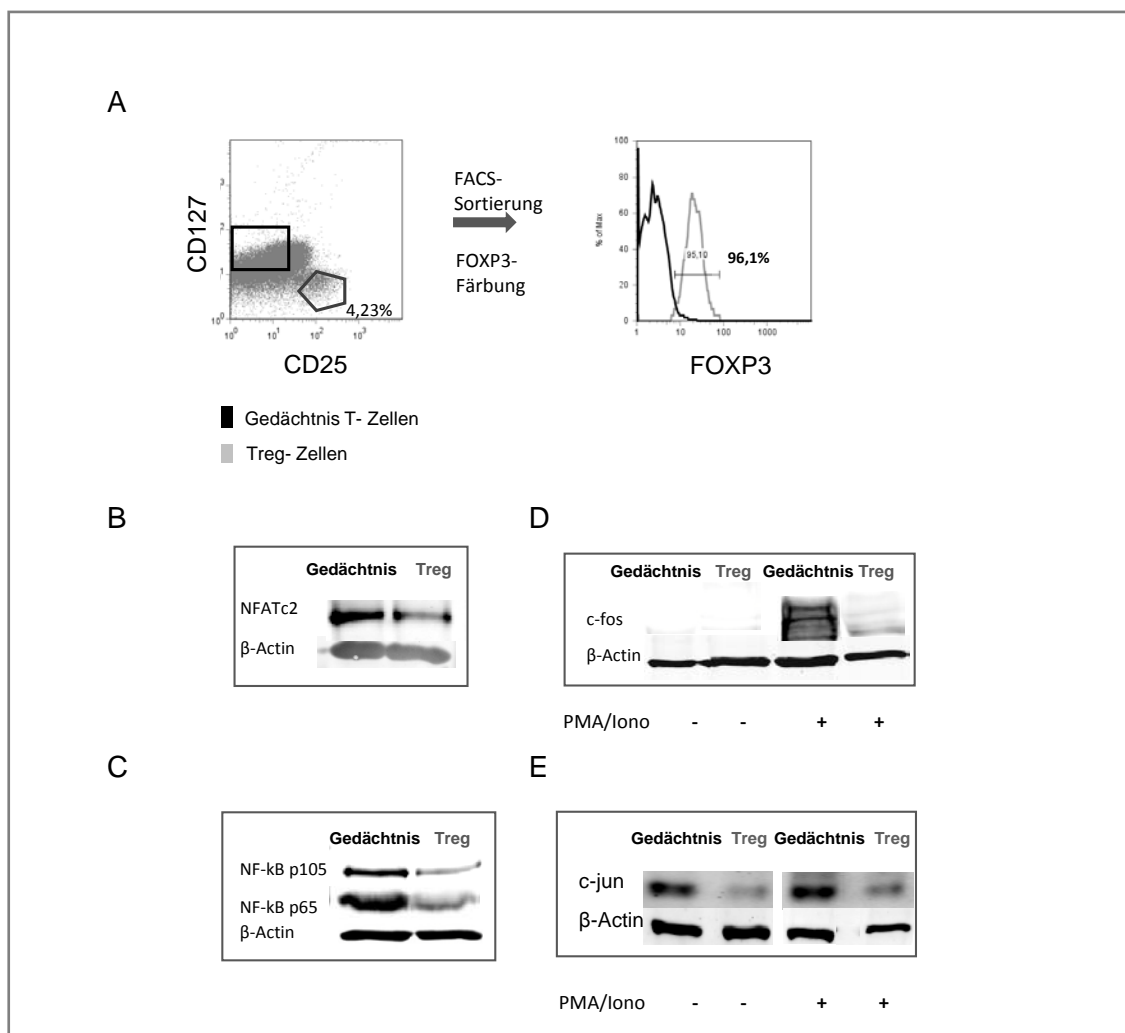
Die Messungen zeigten, dass alle gemessenen Transkriptionsfaktoren, die essentiell für die IL-2-Produktion sind, in Treg-Zellen (grau) deutlich kleinere MFI-Werte aufweisen als die Gedächtnis-Th-Zellen (schwarz) und somit geringer exprimiert sind.

### 3.3.1.2 Bestätigung der Transkriptionsfaktorexpression in Treg-Zellen mittels Western Blot

Um zu überprüfen, ob es sich bei den durchflusszytometrisch erhobenen Unterschieden in den MFI für NFATc2, NF-κB und AP-1 zwischen Gedächtnis- und Treg-Zellen, die in Abb. 3.13 dargestellt sind, tatsächlich um relevante Unterschiede in den Proteinkonzentrationen handelt, sollten diese Ergebnisse mit Hilfe von Western Blots verifiziert werden. MACS-sortierte CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T-Zellen wurden dafür mit Antikörpern gegen die Oberflächenmoleküle CD25 und CD127 gefärbt. Die beiden Effektor- bzw. Gedächtnis- (CD25<sup>-</sup>CD127<sup>high</sup>) und Treg- (CD25<sup>+</sup> CD127<sup>low</sup>) Zellpopulationen wurden anschließend mit Hilfe eines FACSaria sortiert. Ein Teil der sortierten Treg-Zellen wurde abgenommen, um die

Reinheit der Zellpopulation im Durchflusszytometer zu analysieren. Die Treg-Zellen waren zu 95-98% FOXP3<sup>+</sup> (Abb. 3.14A). Die Zelllysate der sortierten Gedächtnis- und Treg-Zellen wurden im Western Blot hinsichtlich ihrer NFATc2- (Abb. 3.14B), NF-κBp65- und p105/p50- (Abb. 3.14C), c-fos- (Abb. 3.14D) und c-jun- (Abb. 3.14E) Expression untersucht. Die sortierten Zellen für die Detektion von c-fos und c-jun wurden zusätzlich für 2 h mit PMA/Ionomycin inkubiert. Als Ladekontrolle wurde jeweils β-Actin mitgefärbt.

Die Western Blot Experimente zeigten deutlich, dass die Protein-Expression von NFATc2 und NF-κB in Gedächtnis-Th-Zellen wesentlich stärker ist als in Treg-Zellen.



**Abb. 3.14 Bestätigung der geringeren Transkriptionsfaktorexpression in Treg-Zellen im Western Blot.**

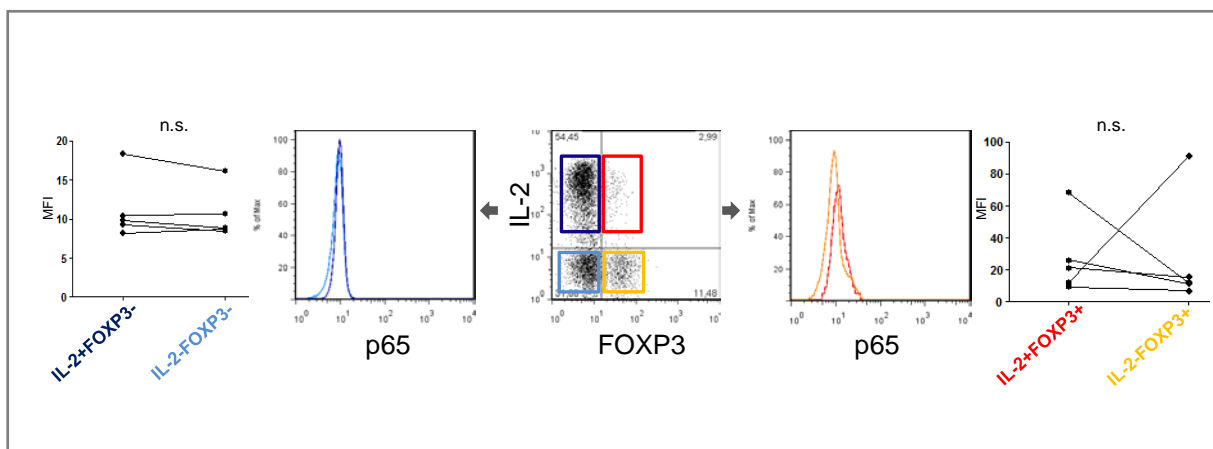
MACS-sortierte CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> Gedächtnis-T-Zellen wurden mit Fluorophor-gekoppelten Antikörpern gegen CD127 und CD25 gefärbt und mittels FACS in CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> Treg-Zellen (grau) sowie CD25<sup>+</sup>CD127<sup>high</sup> Gedächtnis-T-Zellen (schwarz) sortiert. Ein Teil der CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> Zellen wurde fixiert, permeabilisiert und mit einem Antikörper gegen FOXP3 intrazellulär angefärbt und durchflusszytometrisch analysiert (A). Zelllysate der sortierten Zellen wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und mit Antikörpern gegen NFATc2 (B), NF-κBp105 und p65 (C), c-fos (D), c-jun (E) sowie β-Actin als Ladekontrolle inkubiert. Nach einer folgenden Inkubation mit einem sekundären Fluorophor-gekoppelten Antikörper, erfolgte die Analyse mittels des Odyssey® Imaging System Scanners. Dargestellt ist eins von drei unabhängig durchgeführten Experimenten.



Die c-fos-Expression wurde in Gedächtnis-Th-Zellen nach Stimulation stark induziert, während in Treg-Zellen kaum eine Proteinbande erkennbar war (Abb. 3.14D). C-jun konnte im Western Blot sowohl in unstimulierten als auch in stimulierten Zelllysaten detektiert werden, wurde aber unter beiden Bedingungen drastisch geringer in Treg- als in Gedächtnis-Th-Zellen exprimiert. Die Experimente in 3.3.1.1 und 3.3.1.2 zeigen demnach übereinstimmend, dass die Expression der TZR-abhängig aktivierten und für die IL-2-Produktion benötigten Transkriptionsfaktoren in Treg-Zellen erheblich geringer war als in Gedächtnis-Th-Zellen.

### 3.3.2 Kein signifikanter Unterschied der NF- $\kappa$ B-Menge zwischen IL-2<sup>+</sup> und IL-2<sup>-</sup> Zellen

Die untersuchten Transkriptionsfaktoren wurden in Treg- deutlich schwächer als in Gedächtnis-Th-Zellen exprimiert (3.3.1). Jetzt stellte sich die Frage, wie sich deren Expression im Zusammenhang mit der IL-2-Produktion in FOXP3<sup>+</sup> und FOXP3<sup>-</sup> Th-Zellen verhält. Dafür wurden CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T-Zellen entweder 5 h mit PMA/Ionomycin (Abb. 3.15-Abb. 3.18) oder mit anti-CD3/CD28 Antikörpern (nicht gezeigt) stimuliert und mit Antikörpern



**Abb. 3.15 Kein Einfluss der NF- $\kappa$ B-Menge auf die IL-2-Produktion.** MACS-sortierte CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T-Zellen wurden für 5 h mit PMA/Ionomycin stimuliert, fixiert, permeabilisiert und mit Fluorophor-gekoppelten Antikörpern gegen IL-2, FOXP3 und NF- $\kappa$ Bp65 gefärbt. Dargestellt sind die überlagerten Histogramm Daten der eingegrenzten Analysefenster der FOXP3<sup>+</sup> (rot) bzw. der FOXP3<sup>-</sup> Subpopulationen (blau) jeweils eines exemplarischen Spenders sowie die Auftragung der Unterschiede in den Transkriptionsfaktor-Fluoreszenzintensitäten der verschiedenen Subpopulationen in 6 verschiedenen Spendern. Die statistischen Signifikanzen wurden mit Hilfe des gepaarten Student-T-Tests ermittelt.

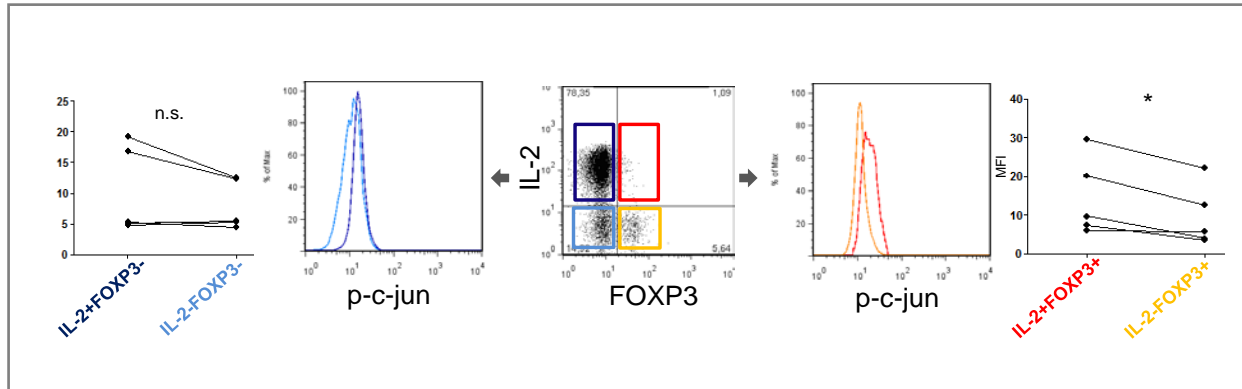
gegen FOXP3 und IL-2 sowie NF- $\kappa$ Bp65, c-fos bzw. p-c-jun gefärbt. Die durchflusszytometrische Analyse ermöglichte analog zu Abb. 3.9 eine Einteilung der CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T-Zellen hinsichtlich der IL-2- und FOXP3-Expression in vier verschiedene Subpopulationen.

Der Vergleich der IL-2<sup>+</sup> FOXP3<sup>-</sup> (dunkelblau) mit der IL-2<sup>-</sup> FOXP3<sup>-</sup> (hellblau) Population für den Transkriptionsfaktor NF-κBp65 zeigte, dass kein signifikanter Unterschied in den MFI (8,16 und 8,69) bestand (Abb. 3.15). Die MFI für p65 in den FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellpopulationen unterschieden sich in dem dargestellten Experiment nur geringfügig (MFI IL-2<sup>+</sup> = 9,03; MFI IL-2<sup>-</sup> = 6,73). Die Analyse verschiedener Spender zeigt, dass dieser Unterschied jedoch nicht signifikant (p= 0,9988) war.

### 3.3.3 P-c-jun ist nicht differentiell exprimiert in IL-2<sup>+</sup> und IL-2<sup>-</sup> Zellen

Da zur Detektion der Expression von c-jun kein geeigneter Antikörper verfügbar war, der eine durchflusszytometrische Detektion zusammen mit IL-2 und FOXP3 zuließ, wurde ein phospho-spezifischer Antikörper gegen c-jun verwendet, der die aktivierte Form des Protein erkennt (Abb. 3.16).

Hier zeigte sich im Vergleich der IL-2<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> und IL-2<sup>-</sup> FOXP3<sup>+</sup> Zellpopulationen, dass ein signifikanter Unterschied in den MFI erkennbar war (p= 0,0197). Zwischen den IL-2<sup>-</sup> FOXP3<sup>-</sup> und IL-2<sup>+</sup>FOXP3<sup>-</sup> Th-Zellen hingegen wurde kein signifikanter Unterschied in der Expression des aktiven c-jun (p= 0,2007) festgestellt.

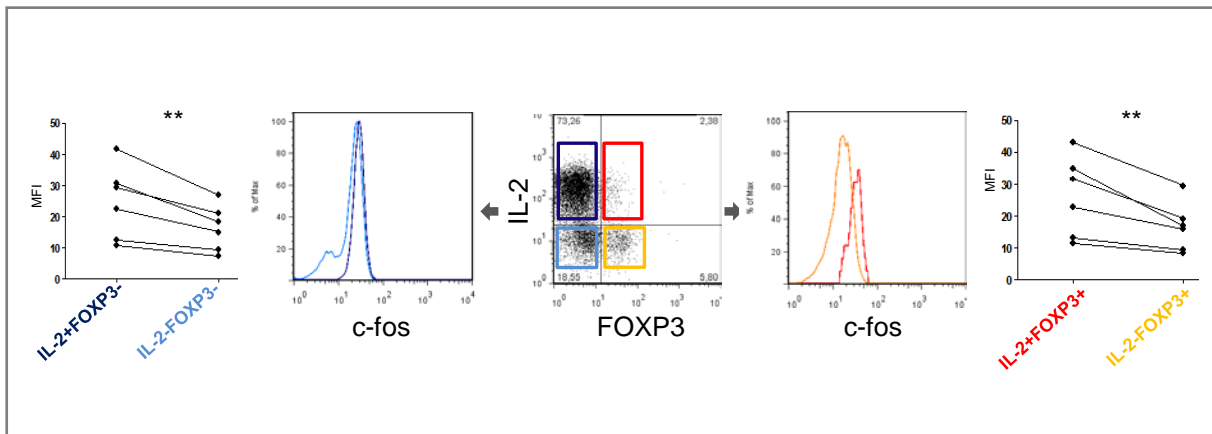


**Abb. 3.16 P-c-jun hat keinen Einfluss auf die IL-2-Produktion in Gedächtnis-Th-Zellen.** MACS-sortierte CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T-Zellen wurden für 5 h mit PMA/Ionomycin stimuliert, fixiert, permeabilisiert und mit Fluorophorgekoppelten Antikörpern gegen IL-2, FOXP3 und p-c-jun gefärbt. Dargestellt sind die überlagerten Histogramm Daten der eingegrenzten Analysefenster der FOXP3<sup>+</sup> (rot) bzw. der FOXP3<sup>-</sup> Subpopulationen (blau) jeweils eines exemplarischen Spenders sowie die Auftragung der Unterschiede in den Transkriptionsfaktor-Fluoreszenzintensitäten der verschiedenen Subpopulationen in 6 verschiedenen Spendern. Die statistischen Signifikanzen wurden mit Hilfe des gepaarten Student-T-Tests ermittelt.

### 3.3.4 IL-2<sup>+</sup> Zellen exprimieren mehr c-fos als IL-2<sup>-</sup> Zellen

Die Färbung von c-fos (Abb. 3.17) zeigte eine hochsignifikante differentielle Expression des Transkriptionsfaktors in den beiden FOXP3<sup>-</sup> Th-Zellpopulationen (p=0,0082). Auch hier war,

wie bereits in Abb. 7 für NFATc2 beobachtet wurde, in den  $IL-2^- FOXP3^-$  Th-Zellen eine bimodale Verteilung der c-fos-Expression zu erkennen. 34,91% der Zellen exprimierten kaum c-fos (MFI= 8,84), während 63,03% ebenso viel c-fos wie die  $IL-2^+ FOXP3^-$  Th-Zellen exprimierten (MFI= 36,79).



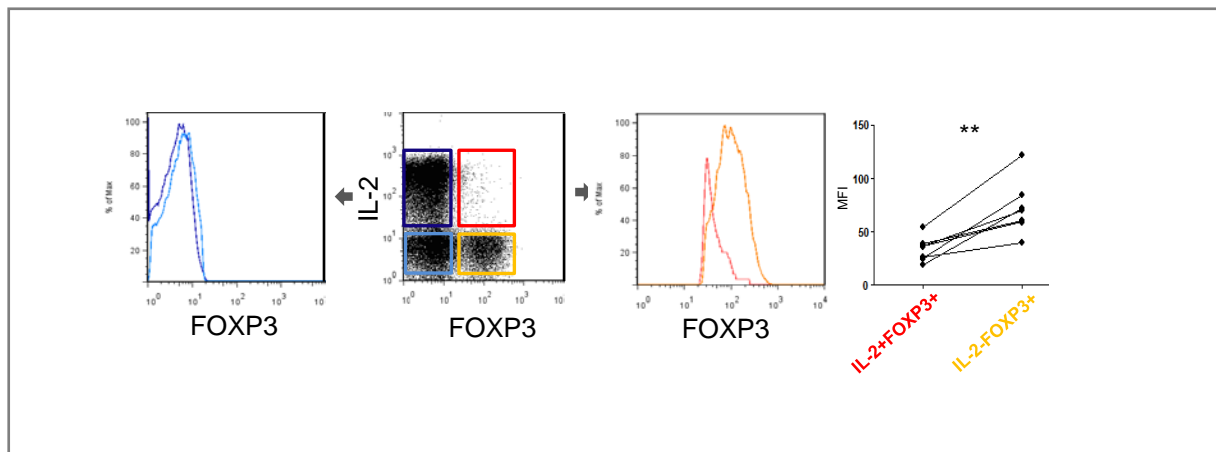
**Abb. 3.17 Die c-fos Menge ist entscheidend für die IL-2-Produktion.** MACS-sortierte  $CD4^+CD45RO^+$  T-Zellen wurden für 5 h mit PMA/Ionomycin stimuliert, fixiert, permeabilisiert und mit Fluorophor-gekoppelten Antikörpern gegen IL-2, FOXP3 und c-fos gefärbt. Dargestellt sind die überlagerten Histogramm Daten der eingegrenzten Analysefenster der  $FOXP3^+$  (rot) bzw. der  $FOXP3^-$  Subpopulationen (blau) jeweils eines exemplarischen Spenders sowie die Auftragung der Unterschiede in den Transkriptionsfaktor-Fluoreszenzintensitäten der verschiedenen Subpopulationen in 6 verschiedenen Spendern. Die statistischen Signifikanzen wurden mit Hilfe des gepaarten Student-T-Tests ermittelt.

Die c-fos-Expression in  $IL-2^+FOXP3^+$  Zellen war zudem signifikant stärker als in  $IL-2^-FOXP3^+$  Th-Zellen. Die MFI in den beiden IL-2 produzierenden Zellpopulationen waren gleich.

### 3.3.5 FOXP3 ist in $IL-2^+FOXP3^+$ Zellen geringer exprimiert als in $IL-2^-FOXP3^+$ Zellen

Unter 3.2 wurde eine Bindung von FOXP3 an den *NFATc2*-Promotor gezeigt und damit eine mögliche Hemmung der *NFATc2*-Expression in Treg-Zellen. Nun sollte untersucht werden, ob  $IL-2^+FOXP3^+$  Zellen, die mehr *NFATc2* exprimieren als  $IL-2^-FOXP3^+$  Zellen, weniger FOXP3 exprimieren und somit einer schwächeren Hemmung der *NFATc2*-Transkription unterliegen.

Die Betrachtung der mittleren Fluoreszenzintensität von FOXP3 in den beiden  $FOXP3^+$  Subpopulationen (Abb. 3.18) zeigte, dass die  $IL-2^+FOXP3^+$  Zellen tatsächlich erheblich weniger FOXP3 (MFI= 54,84 ) als die  $IL-2^-FOXP3^+$  Zellen (MFI= 122,20) exprimierten, was in allen Messungen konsistent war ( $p= 0,0030$  ).



**Abb. 3.18 IL-2<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen exprimieren weniger FOXP3 als IL-2<sup>-</sup>FOXP3<sup>+</sup> Zellen.** MACS-sortierte CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T-Zellen wurden für 5 h mit PMA/Ionomycin stimuliert, fixiert, permeabilisiert und mit Fluorophor-gekoppelten Antikörpern gegen IL-2 und FOXP3 gefärbt. Dargestellt sind die überlagerten Histogramm- und Histogramm-Overlaydaten der eingegrenzten Analysefenster der FOXP3<sup>+</sup> (rot) bzw. der FOXP3<sup>-</sup> Subpopulationen (blau) jeweils eines exemplarischen Spenders sowie die Auftragung der Unterschiede in den Transkriptionsfaktor-Fluoreszenzintensitäten der verschiedenen Subpopulationen in 6 verschiedenen Spendern. Die statistischen Signifikanzen wurden mit Hilfe des gepaarten Student-T-Tests ermittelt.

Zusammenfassend exprimierten die IL-2<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> also nicht nur mehr NFATc2 (Abb. 3.9), sondern auch mehr c-fos als die IL-2<sup>-</sup>FOXP3<sup>+</sup>, während NF-κBp65 und p-cjun nicht signifikant differentiell exprimiert wurden. Die FOXP3 Menge war in IL-2<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Zellen erheblich geringer als in IL-2<sup>-</sup>FOXP3<sup>+</sup>.

In Gedächtnis-Th-Zellen exprimierten die IL-2<sup>+</sup> Zellen signifikant mehr NFATc2 und c-fos aber nicht mehr NF-κB und p-c-jun als IL-2<sup>-</sup> Zellen.

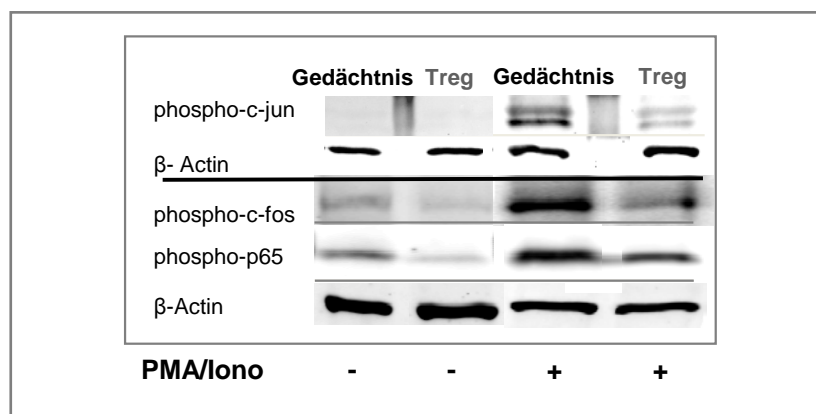
Die Mengen von NFATc2, c-fos, p-c-jun und NF-κB in beiden IL-2<sup>+</sup> Populationen, sowohl IL-2<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> als auch IL-2<sup>+</sup>FOXP3<sup>-</sup>, waren gleich.

### 3.3.6 Die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren in Treg-Zellen ist intakt

Einige proximale Signalweiterleitungs-Prozesse im TZR-Signalweg sind in Treg-Zellen vermindert (siehe 1.5.1). Ob dies jedoch auch eine verminderte Aktivierbarkeit der untersuchten Transkriptionsfaktoren in Treg-Zellen nach sich zieht, und damit die Produktion von Zytokinen unterbindet, ist bisher nicht bekannt und soll im folgenden überprüft werden.

#### 3.3.6.1 Geringere Phosphorylierung von c-jun, c-fos und NF- $\kappa$ Bp65 in Treg-Zellen

Die Transkriptionsfaktoren c-fos, c-jun und NF- $\kappa$ Bp65 werden nach Stimulation durch ihre jeweiligen Kinasen phosphoryliert und damit aktiviert. Mit Hilfe von phospho-spezifischen Antikörpern ist es möglich, die aktiven Formen dieser Faktoren im Western Blot zu detektieren. Dazu wurden MACS-sortierte CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T-Zellen, die mittels FACS in



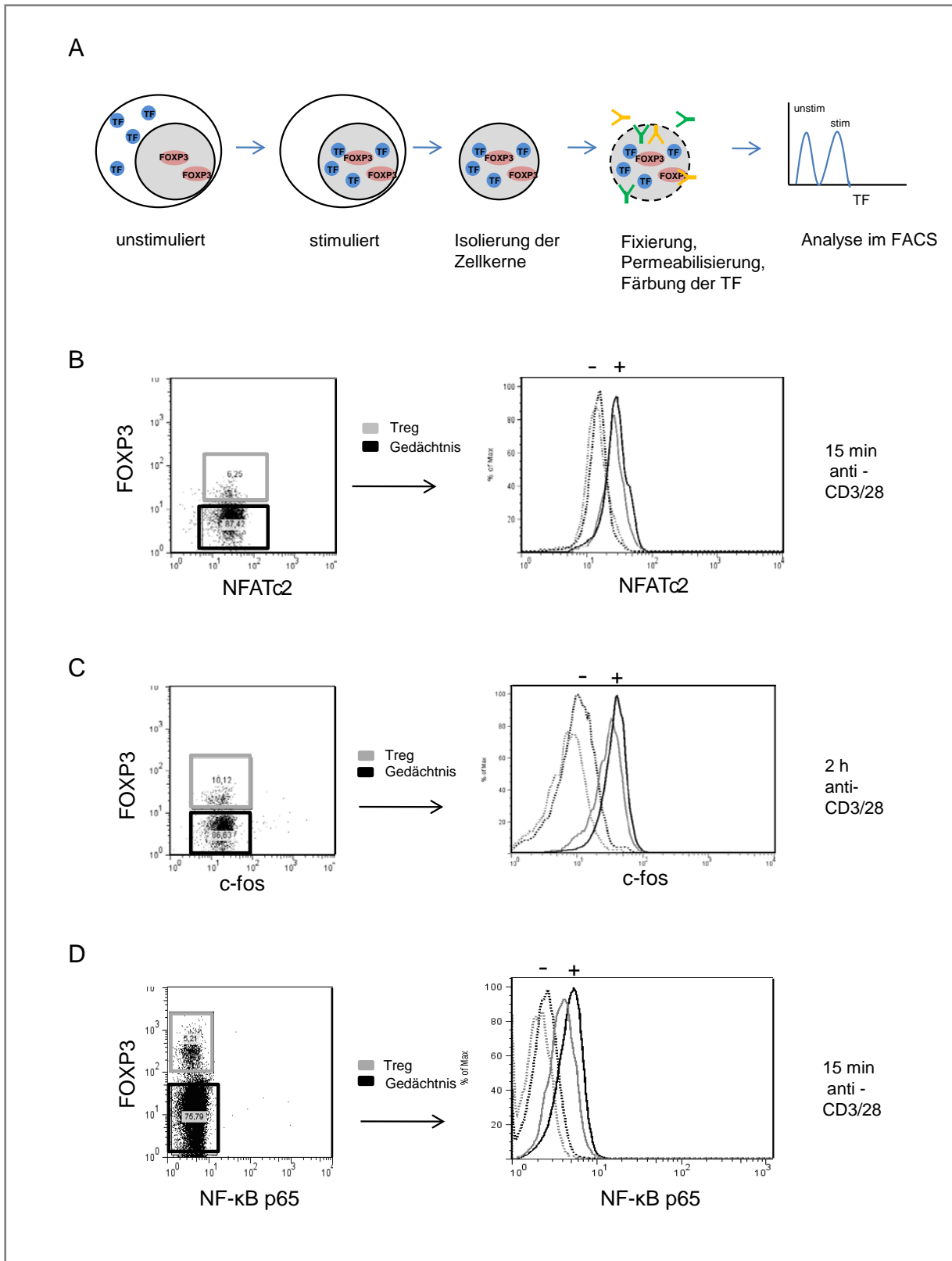
**Abb. 3.19 Treg-Zellen exprimieren geringere Mengen von phosphoryliertem c-jun, c-fos und NF- $\kappa$ B p65 als Gedächtnis-T-Zellen.** MACS-sortierte CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T-Zellen wurden mit Antikörpern gegen CD127 und CD25 gefärbt und mittels FACS in CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> Treg-Zellen sowie CD25<sup>-</sup>CD127<sup>high</sup> Gedächtnis-T-Zellen sortiert. Die Zellen wurden für 30 min mit PMA/Ionomycin stimuliert. Danach wurden Zelllysate hergestellt, die gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Membran geblottet wurden. Diese wurde mit spezifischen Antikörpern gegen die phosphorylierten Formen von c-jun, c-fos und NF- $\kappa$ Bp65 sowie gegen  $\beta$ -Actin als Ladekontrolle inkubiert. Nach der Verwendung eines Fluorophor-gekoppelten sekundären Antikörpers wurde der Blot mit dem Odyssey® Imaging System analysiert. Gezeigt ist eins von drei unabhängigen Experimenten.

CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> Treg-Zellen und CD25<sup>-</sup>CD127<sup>high</sup> Gedächtnis-Th-Zellen separiert wurden, verwendet. In unstimulierten Zellen war nur eine sehr geringe Expression des phosphorylierten p65 und c-fos und keinerlei phospho-c-jun messbar (Abb. 3.19). Nach Stimulation wurden starke Banden aktivierter, phosphorylierter Transkriptionsfaktoren in Gedächtnis-Th-Zellen erkennbar. In Treg-Zellen hingegen sind diese Banden deutlich schwächer ausgeprägt, obwohl die aufgetragenen Proteinmengen für Gedächtnis- und Th-Zellen vergleichbar waren.

Diese Unterschiede in den Phosphorylierungen könnten auf eine defekte Aktivierbarkeit der Transkriptionsfaktoren in Treg-Zellen hinweisen. Mit Western Blot Experimenten sind nur Untersuchungen auf Populationsebene möglich. Daher ist mit dieser Methode keine Aussage darüber zu treffen, ob es sich bei den schwächeren Banden tatsächlich um eine fehlerhafte Phosphorylierung handelt, oder ob alle Transkriptionsfaktoren voll aktiviert wurden, und lediglich die Gesamtmenge (Abb. 3.13) viel geringer als in Gedächtnis-Th-Zellen war. Um diese Frage zu beantworten, bedarf es einer Untersuchung der Transkriptionsfaktor-Aktivität auf Einzelzellebene.

### 3.3.6.2 Nachweis der Aktivierung von NFATc2, c-fos und NF- $\kappa$ B auf Einzelzellebene

Die Transkriptionsfaktoren sind in unstimulierten Zellen im Zytoplasma lokalisiert und werden erst nach Stimulation der Zelle phosphoryliert und in den Zellkern transloziert. Diese Translokation ermöglicht es, die Aktivierung von NFATc2, c-fos und NF- $\kappa$ B in Gedächtnis- und Treg-Zellen vergleichend auf Einzelzellebene durchflusszytometrisch nachzuweisen. Dazu wurden die Zellkerne unstimulierter und PMA/Ionomycin (nicht dargestellt) oder anti-CD3/CD28 (Abb. 3.20) stimulierter CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> Th-Zellen isoliert und fixiert (siehe Schema Abb. 3.20A). Durch die Fixierung der Kerne wurde ein Rücktransport der Transkriptionsfaktoren aus dem Zellkern infolge der Präparation verhindert. Anschließend wurden die Zellkerne permeabilisiert und mit Antikörpern gegen FOXP3 sowie NFATc2 (Abb. 3.20B), c-fos (Abb. 3.20C) und NF- $\kappa$ Bp65 (Abb. 3.20D) gefärbt. Mit Hilfe einer zusätzlichen Färbung der DNA mit PJ und einer Eingrenzungs-Strategie (siehe 2.3.5.2) erfolgte die Analyse der Translokation und damit Aktivierung der Transkriptionsfaktoren im Durchflusszytometer. Das Eingrenzen der FOXP3<sup>+</sup> und FOXP3<sup>-</sup> Zellkerne erlaubte den Vergleich der Translokation zwischen Treg- und Gedächtnis-Th-Zellen innerhalb einer Probe. Abb. 3.20B zeigt eine Histogrammüberlagerung der NFATc2 Fluoreszenzintensitäten der FOXP3<sup>+</sup> Zellkerne in der unstimulierten (graue gestrichelte Linie) und stimulierten Probe (graue durchgezogene Linie). Um überprüfen zu können, ob die Aktivierung und damit der Shift in den MFI zwischen unstimulierten und stimulierten Treg-Zellen mit den Gedächtnis-Th-Zellen übereinstimmt, wurden zusätzlich die Histogramme für die NFATc2-Expression in den FOXP3<sup>-</sup> Th-Zellen (schwarze Linien) dargestellt. Beide Zellpopulationen zeigten nach Stimulation für 15 min mit anti-CD3/CD28 Antikörpern einen vergleichbaren Shift in der Fluoreszenzintensität für NFATc2 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Somit konnte nachgewiesen werden, dass NFATc2 sowohl in Treg- als auch in Gedächtnis-Th-Zellen nach Stimulation komplett aktiviert und in die Zellkerne transloziert wurde.



**Abb. 3.20 Die Aktivierung von NFATc2, c-fos und NF- $\kappa$ B p65 in Treg-Zellen ist nicht beeinträchtigt.** Die Kerne von unstimulierten und anti-CD3/CD28 stimulierten Gedächtnis-T-Zellen wurden isoliert, fixiert, permeabilisiert und mit Antikörpern gegen FOXP3 und NFATc2 (B), c-fos (C) bzw. NF- $\kappa$ B p65 (D) gefärbt. Die Nuklei wurden zusätzlich mit PJ behandelt und mittels Durchflußzytometrie analysiert. Dargestellt ist die Überlagerung der Fluoreszenzintensitäten der Transkriptionsfaktoren in stimulierten (durchgezogene Linien) und unstimulierten (gestrichelten Linien) FOXP3+ (grau) und FOXP3-(schwarz) Nuklei im Histogramm.

Die Expression von c-fos ist nicht wie die von NFATc2 und NF- $\kappa$ B konstitutiv, sondern wird erst nach Stimulation der Zelle induziert. Die Aktivierung von c-fos (Abb. 3.20C) wurde daher erst nach 2 h Stimulation mit Antikörpern gegen CD3 und CD28 gemessen. Auch hier zeigte sich in der Überlagerung der Histogramme, dass Treg- (grau) und Gedächtnis-Th-Zellen (schwarz) gleichermaßen nach Stimulation c-fos aktivierten und in die Zellkerne translozierten. Die MFI für c-fos in den Treg-Zellen waren zwar etwas geringer als in Gedächtnis-Th-Zellen, aber die Differenzen zwischen den MFI in unstimulierten und stimulierten Proben stimmten für beide Zellpopulationen überein.

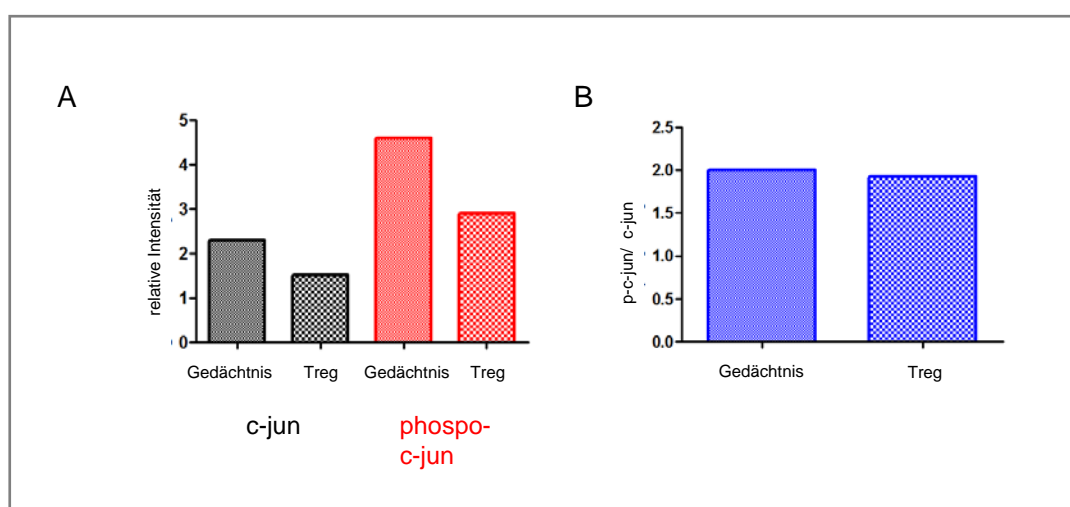
Das Gleiche galt für die Aktivierung von NF- $\kappa$ Bp65 (Abb. 3.20D). Auch hier zeigte sich nach Stimulation in beiden Populationen ein Shift in den MFI, weil NF- $\kappa$ B in den Kern transportiert wurde.

Diese Versuche belegen, dass die Aktivierung und Translokation der Transkriptionsfaktoren NFATc2, c-fos und NF- $\kappa$ Bp65 in Treg-Zellen intakt war.

Bei der Etablierung der Zellkernfärbung von FOXP3 mit den jeweiligen Transkriptionsfaktoren stellte sich heraus, dass sich nur wenige Antikörper für die Messung von Proteinen in isolierten Zellkernen zusammen mit FOXP3 eigneten. Aus diesem Grund war eine Messung von c-jun bzw. phospho-c-jun mit dieser Methode nicht möglich.

### 3.3.6.3 Nachweis der intakten c-jun-Aktivierung in Treg-Zellen

Die Licor Odyssey® Software ermöglichte die Bestimmung der integrierten Intensitäten von c-jun (Abb. 3.14E) und phospho-c-jun (Abb. 3.19) im Western Blot relativ zu  $\beta$ -Actin



**Abb. 3.21 C-jun wird in Gedächtnis- und Treg-Zellen gleichermaßen aktiviert.** Mit Hilfe der Licor Odyssey® Software wurden die integrierten Intensitäten (relativ zu  $\beta$ -Actin) für c-jun (Abb. 3.12E) und phospho-c-jun (Abb. 3.14) für Treg- und Gedächtnis-T-Zellen in den Western Blot Experimenten bestimmt (A). Das Verhältnis der relativen Intensitäten von phospho-c-jun zu c-jun ist in Treg- und Gedächtnis-Th-Zellen gleich (B). Dargestellt ist eins drei unabhängigen Experimenten.



(Proteinmenge) (Abb. 3.21A). Die Quantifizierung ließ deutlich erkennen, dass sowohl die c-jun- als auch die phospho-c-jun-Expression in Treg-Zellen geringer als in Gedächtnis-Th-Zellen war. Das Verhältnis von phospho-c-jun zu c-jun innerhalb einer T-Zellpopulation (1,93 für Treg- und 2 für Gedächtnis-T-Zellen) war jedoch gleich (Abb. 3.21B). Die Aktivierung von c-jun in Treg-Zellen war also ebenso intakt wie in Gedächtnis-Th-Zellen, lediglich die Gesamtmenge an exprimiertem c-jun war geringer.

Zusammenfassend zeigten diese Versuche, dass die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFATc2, NF- $\kappa$ B und AP-1 in humanen Treg-Zellen voll funktionsfähig ist.

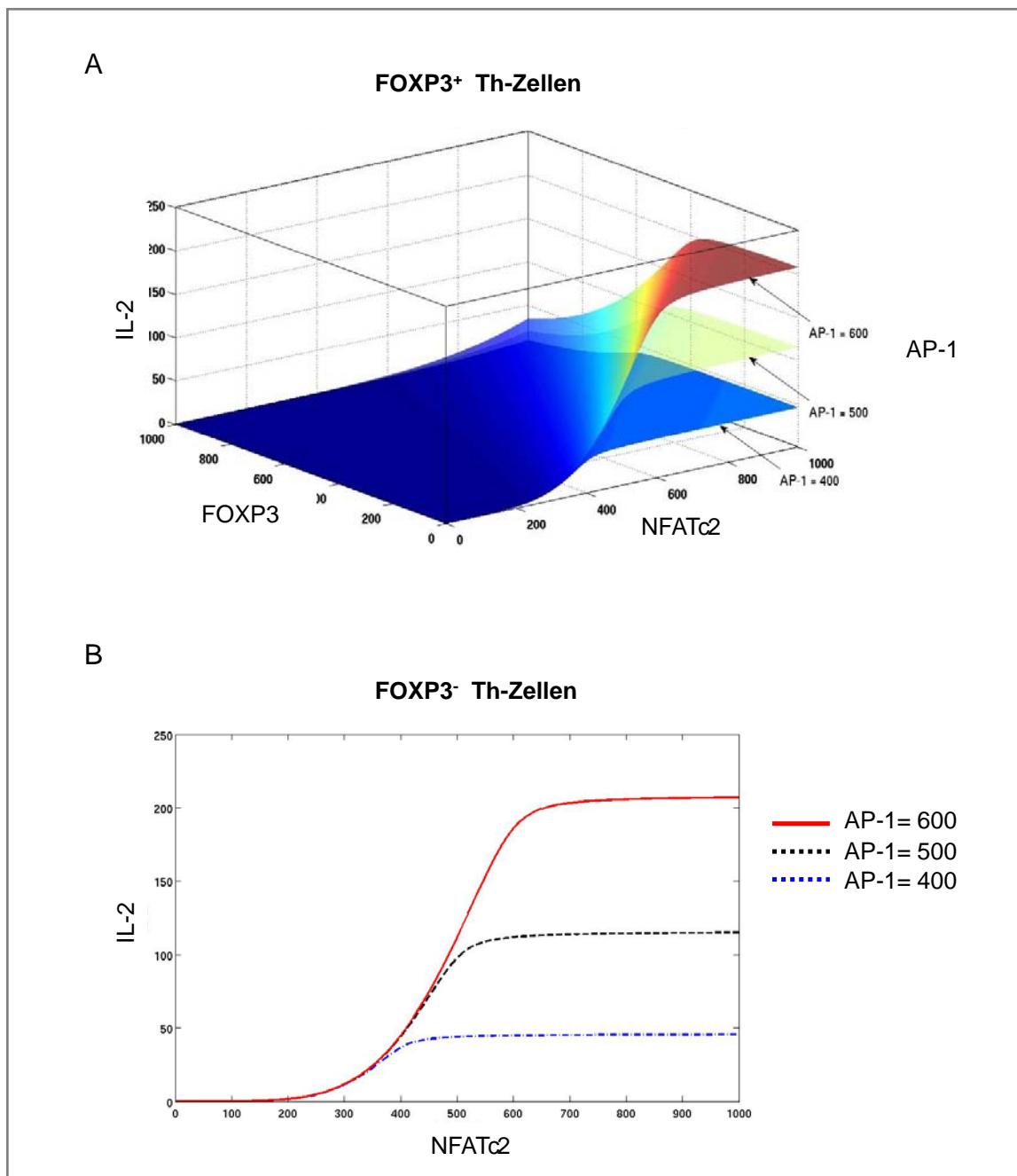
### 3.3.7 Mathematisches Modell zur IL-2-Expression in Th-Zellen

Wie in Abschnitt 3.3.6 gezeigt wurde, ist die Unfähigkeit der Mehrheit der Treg-Zellen IL-2 zu produzieren nicht durch eine defekte TZR-Signalweiterleitung und damit defekte Aktivierung der Transkriptionsfaktoren bedingt. Vielmehr scheinen die Mengen und Verhältnisse der Transkriptionsfaktoren zueinander eine kritische Rolle zu spielen (3.1.4 und Abb. 3.15-Abb. 3.18). Die Expressionsdaten der Transkriptionsfaktoren NFATc2, NF- $\kappa$ B, AP-1 und FOXP3 in Relation zur IL-2-Produktion wurden als Grundlage für die Erstellung eines mathematischen Modells benutzt (Manuela Benary, Institut für Theoretische Biologie, Berlin).

Das nicht-lineare Differentialgleichungsmodell beschreibt die IL-2-Expression in FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen im Fließgleichgewicht der IL-2-Produktion (Abb. 3.22A). Hierbei wurden vier Ebenen betrachtet, die die Proteinmengen von NFATc2, FOXP3, AP-1 und IL-2 repräsentieren. Die NF- $\kappa$ B-Konzentrationen in IL-2 Produzenten und -Nichtproduzenten unterschieden sich nicht signifikant (Abb. 3.15A) und wurden somit nicht in das Modell einbezogen, da sie für die differentielle IL-2-Produktion nicht relevant sind. Das Modell basiert auf der Annahme einer Kooperativität der Transkriptionsfaktoren NFATc2 und AP-1 an fünf Bindestellen im IL-2-Promotor (siehe 1.4.2), woraus eine Hill-Kinetik ( $n=5$ ) resultiert. Zudem wurde von einer Konkurrenz zwischen FOXP3 und AP-1 um die Bindung an NFATc2 [82] ausgegangen. Mit Hilfe dieses Modells ließ sich die Hypothese reproduzieren, dass die Mengen und Verhältnisse der Transkriptionsfaktoren essentiell für die IL-2-Expression sind.

In FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen entscheidet dabei das Verhältnis FOXP3 zu NFATc2 darüber, ob IL-2 gebildet wird. Das bedeutet, je höher der Anteil Zellen ist, die viel NFATc2- und wenig FOXP3 exprimieren, desto höher ist die Frequenz der IL-2 Produzenten in einer Treg-Zellpopulation.

Die Mengen an AP-1 (in Abb. 3.22A drei verschiedene Konzentrationen) wirken sich hingegen auf die Konzentration des pro Zelle produzierten IL-2 aus. Je mehr AP-1 exprimiert wird, desto mehr IL-2 wird in einer Zelle gebildet.



**Abb. 3.22 Die IL-2-Produktion in Th-Zellen ist abhängig von den Mengen und Verhältnissen der Transkriptionsfaktoren NFATc2, FOXP3 und AP-1 – ein mathematisches Modell.** Nicht-lineares Differentialgleichungsmodell (im Fließgleichgewicht der IL-2-Produktion), das die IL-2-Expression in Abhängigkeit der Transkriptionsfaktoren NFATc2, AP-1 und FOXP3 in FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen (A) bzw. NFATc2 und AP-1 in FOXP3<sup>-</sup> Th-Zellen (B) darstellt.

Betrachtet man das analoge Modell für die FOXP3<sup>-</sup> Th-Zellen, so wurden nur noch drei Ebenen in das Modell integriert, da FOXP3 nicht exprimiert und somit gleich null gesetzt wurde (Abb. 3.22B). Aus dem Modell ist ersichtlich, dass IL-2 produziert wird, wenn ein Schwellenwert von NFATc2 und AP-1 erreicht wird. Die Entscheidung, ob die IL-2-Expression induziert wird, ist also von dem Verhältnis NFATc2/AP-1-abhängig. Um

mehr IL-2 pro Zelle zu produzieren, bedarf es eines Anstiegs der Mengen sowohl von NFATc2 als auch von AP-1.

### **3.3.8 Die c-fos- und NFATc2-Mengen sind limitierend für die binäre IL-2-Produktion in Gedächtnis-Th-Zellen**

Mit Hilfe der folgenden statistischen Erhebungen sollte die Relevanz der Transkriptionsfaktor-Mengen für die IL-2-Produktion in Gedächtnis-Th-Zellen und damit auch die Aussage des Modells weitergehend untersucht werden.

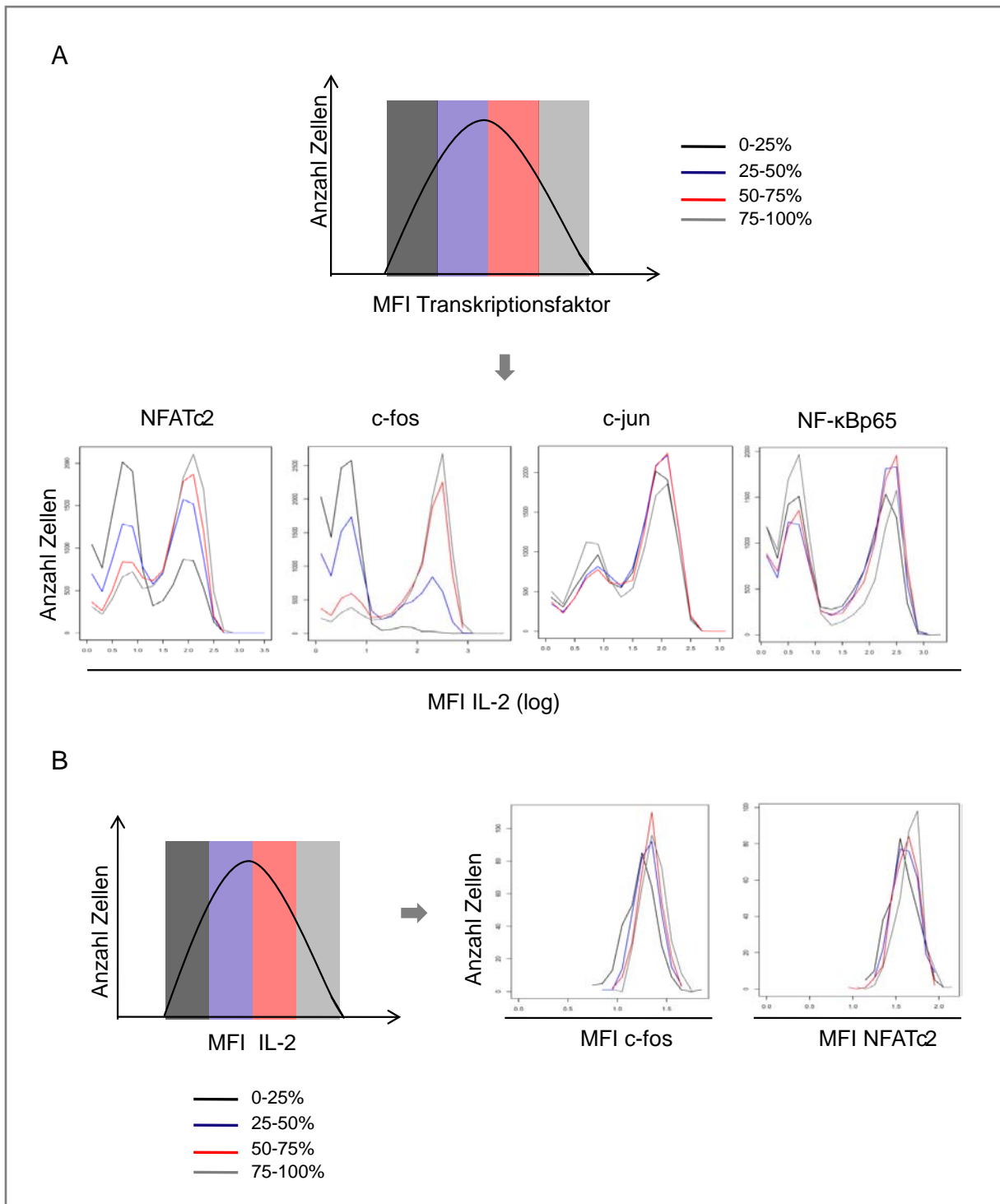
Dazu wurden die MFI der einzelnen Transkriptionsfaktoren in bis zu 25%, 50%, 75% und 100% der Intensität als Maß der relativen Protein-Menge partitioniert. Anschließend wurden diese Werte auf die Zellzahl normalisiert und mit der MFI für IL-2 korreliert. Das Ergebnis wurde im Histogramm dargestellt (Abb. 3.23A).

Hierbei zeigte sich, dass weniger NF- $\kappa$ B keinen Einfluss weder auf die IL-2 MFI noch auf die Frequenz der IL-2<sup>+</sup> Zellen hat.

Auch ein Effekt geringerer p-c-jun-Mengen auf die Anzahl der IL-2 produzierenden Zellen und auf die IL-2 MFI war nicht sichtbar.

Die Betrachtung der Auswirkung unterschiedlicher c-fos-Mengen auf die IL-2-Expression in Gedächtnis-Th-Zellen hingegen machte einen erheblichen Einfluss der c-fos-Menge auf die Frequenz der IL-2 produzierenden Zellen deutlich. Je mehr c-fos exprimiert wird (je größer die MFI), desto mehr Zellen produzieren IL-2. Die binäre IL-2-Expression korreliert somit direkt mit der c-fos-Expression. Ein Einfluss von c-fos auf die Menge des pro Zelle exprimierten IL-2 ist jedoch in dieser Darstellung nicht zu erkennen.

Wie schon in Abb. 3.1B für die gesamte CD4<sup>+</sup> T-Zell Population gezeigt wurde, wird auch in sortierten Gedächtnis-Th-Zellen eine Wirkung der NFATc2-Mengen auf die IL-2-Produktion deutlich. Die NFATc2-Expression scheint wie die c-fos-Expression lediglich auf die Entscheidung, ob eine Zelle IL-2 produziert zu wirken, aber nicht auf die Menge des pro Zelle produzierten IL-2. Um zu bestätigen, dass c-fos und NFATc2 keinen Einfluss auf die IL-2-Menge haben, wurde eine Partitionierung der IL-2 MFI in IL-2<sup>+</sup> Gedächtnis-Th-Zellen vorgenommen. Diese wurde mit den MFI für c-fos und NFATc2 korreliert. Die Unterschiede in den daraus resultierenden MFI für c-fos und NFATc2 sind nur sehr gering (siehe Abb. 3.23B). Es ist also kein gradueller Effekt der beiden Transkriptionsfaktoren auf die IL-2-Expression erkennbar. Dies widerspricht dem in Abb. 3.22 dargestellten mathematischen Modell, das zusätzlich zur Wirkung von c-fos (AP-1) und NFATc2 auf die binäre IL-2-Expression auch einen Einfluss auf die Menge des produzierten IL-2 postuliert.



**Abb. 3.23 Geringere Mengen c-fos und NFATc2 in Gedächtnis-Th-Zellen führen zu einer binären IL-2-Produktion.** Die Fluoreszenzintensitäten von NFATc2, c-fos, p-c-jun und NF-κB wurden partitioniert in 0-25% (schwarz), 25-50% (blau), 50-75% (rot) und 75-100% (grau) der Intensität und die Zellzahlen wurden normalisiert. Die aus der Partitionierung resultierenden Auswirkungen auf die IL-2 Fluoreszenzintensität wurde in einem überlagerten Histogramm dargestellt (A). Die MFI von IL-2 in IL-2<sup>+</sup> Gedächtnis-Th-Zellen wurden partitioniert, die Zellzahlen normalisiert und die korrelierenden MFI für c-fos und c-jun im überlagerten Histogramm abgebildet (B).

Es handelte sich also bei den c-fos- und NFATc2-Mengen um limitierende Parameter für die binäre IL-2-Produktion, aber nicht für die pro Zelle produzierte IL-2-Menge. Eine verringerte Expression von NF-κB und p-c-jun hatte keinen Einfluss auf die IL-2-Produktion.

## 4 Diskussion

Die IL-2-Expression in aktivierten Th-Zellen ist ein wesentlicher Vorgang während einer Immunantwort, der entscheidend über Stärke und Ausprägung einer Th-Zell-Antwort bestimmt. Zudem ist IL-2 für das „fine-tuning“ zwischen inflammatorischer Immunantwort und Toleranz verantwortlich (siehe 1.4.1). In dieser Arbeit wurde die Bedeutung der Mengen und Verhältnisse der TZR-abhängig aktivierten Transkriptionsfaktoren NFATc2, NF-κB und AP-1 für die IL-2-Expression in humanen Gedächtnis- und FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen untersucht.

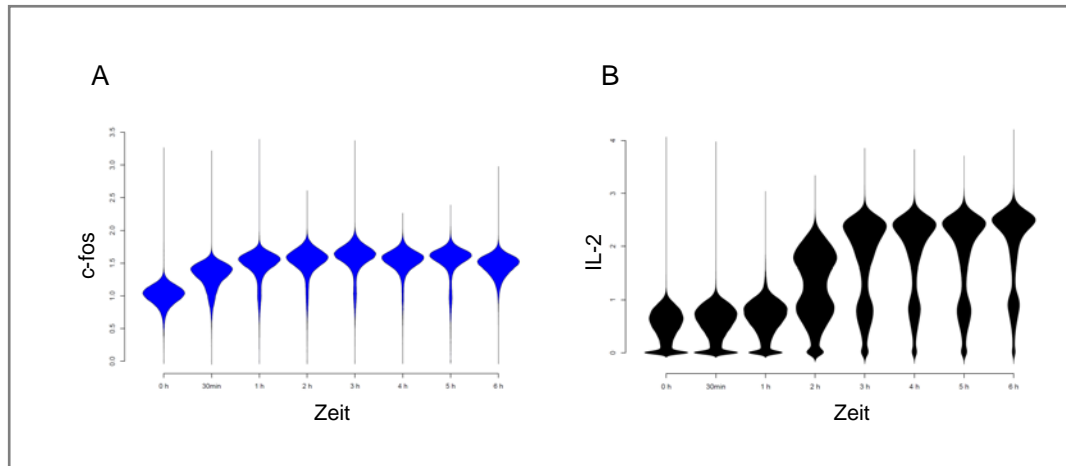
### 4.1 Die binäre IL-2-Produktion in Gedächtnis-Th-Zellen

Die transkriptionelle Kontrolle des *IL-2* Gens wurde bereits intensiv studiert (siehe 1.4). So ist bereits bekannt, dass

1. die stimulationsabhängig in den Kern translozierten Transkriptionsfaktoren NFATc2, NF-κB und AP-1 kooperativ an den Promotor des *IL-2* Gens binden müssen, um die Transkription zu initiieren [129],
2. die IL-2-Produktion in einer einzelnen Gedächtnis-Th-Zelle einer Alles-oder-nichts-Entscheidung unterliegt und somit binär reguliert ist [131],
3. die digitale NFATc2-Aktivierung und Translokation als molekularer Schalter für die IL-2-Produktion dient und alle IL-2 exprimierenden Th-Zellen das gesamte NFATc2 in den Kern translozieren [131] und
4. die Rückkopplungsmechanismen im proximalen TZR-Signalweg zu einer binären Erk-Aktivierung führen [133] und so eine digitale c-fos-Expression nach sich ziehen könnten, die als Schalter der IL-2-Produktion dienen würde (siehe 1.4.2).

Der letzte Punkt spielt unter den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Stimulationsbedingungen keine Rolle für die binäre IL-2-Expression. Die Stimulation mit PMA/Ionomycin umgeht die proximalen Signalweiterleitungs-Prozesse. Somit werden die beschriebenen Rückkopplungsmechanismen umgangen, die in der binären Erk-Aktivierung münden. Zudem wird sowohl unter Verwendung von PMA/Ionomycin als auch der Stimulation mit anti-CD3/CD28 Antikörpern in allen IL-2<sup>+</sup> und IL-2<sup>-</sup> Gedächtnis-Th-Zellen c-fos exprimiert und in den Kern transloziert (siehe Abb. 3.20). Die Etablierung der Kofärbung von IL-2 und c-fos und die dadurch ermöglichte Einzelzell-Analyse zeigte überdies, dass c-fos unter den Bedingungen einer starken, vollen T-Zell-Stimulation im Gegensatz zu IL-2 graduell exprimiert wird und somit keiner Alles-oder-nichts Entscheidung unterliegt (siehe Abb. 4.1).

Auch die binäre NFATc2-Aktivierung kann nicht allein für die in Gedächtnis-Th-Zellen beobachtete binäre IL-2-Produktion verantwortlich sein, da in dieser Arbeit gezeigt wurde,



**Abb. 4.1 Die c-fos-Expression in Gedächtnis-Th-Zellen ist graduell.** Dargestellt sind Violinen-Plots der c-fos (A) und IL-2-Expression (B) in PMA/Ionomycin stimulierten CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> Zellen über die Zeit. Die c-fos-Expression wird graduell über die Zeit exprimiert, während IL-2 bimodal exprimiert wird.

dass NFATc2 nach Stimulation in allen Gedächtnis-Th-Zellen aktiviert wird (Abb. 3.20). Trotzdem können nur 60-90% der Zellen IL-2 produzieren (siehe Abb. 3.2). Es muss also neben der NFATc2-Aktivierung mindestens eine weitere Entscheidungsebene geben, die über die IL-2-Expression bestimmt.

In nicht sortierten Th-Zellen, die sowohl naive als auch Gedächtnis-Th-Zellen enthalten, variieren die NFATc2-Mengen stark. Diese NFATc2-Mengen wurden in einer linearen Regression mit der IL-2-Produktion auf Einzelzellebene korreliert (siehe Abb. 3.1). Dies zeigt eine starke Abhängigkeit der binären IL-2-Produktion von der NFATc2 Konzentration pro Zelle. Die geringere Expression von NFATc2 in naiven Th-Zellen könnte somit ein Grund für die verzögerte Kinetik der IL-2-Expression im Vergleich zu Gedächtnis-Th-Zellen sein [161]. Demnach würde nach TZR-Stimulation in naiven Th-Zellen NFATc2 hochreguliert werden, bis ein Schwellenwert erreicht wird, der die IL-2-Expression induzieren kann.

Im folgenden Abschnitt soll diskutiert werden, ob die Mengen der Transkriptionsfaktoren auch bei der Induktion der IL-2-Expression in den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Gedächtnis-Th-Zellen eine essentielle Rolle spielen.

#### 4.1.1 Die Bedeutung der Transkriptionsfaktor-Mengen für die IL-2-Produktion

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass sich die Mengen der Transkriptionsfaktoren nicht nur zwischen naiven und Gedächtnis-Th-Zellen unterscheiden, sondern auch innerhalb der Gedächtnis-Th-Zell Population signifikante Unterschiede zwischen IL-2<sup>+</sup> und IL-2<sup>-</sup> Zellen bestehen (siehe 3.3). So exprimieren IL-2<sup>+</sup> Gedächtnis-Th-Zellen wesentlich mehr NFATc2 und c-fos als IL-2<sup>-</sup> Zellen. NF-κB und p-c-jun hingegen sind nicht signifikant differentiell exprimiert.

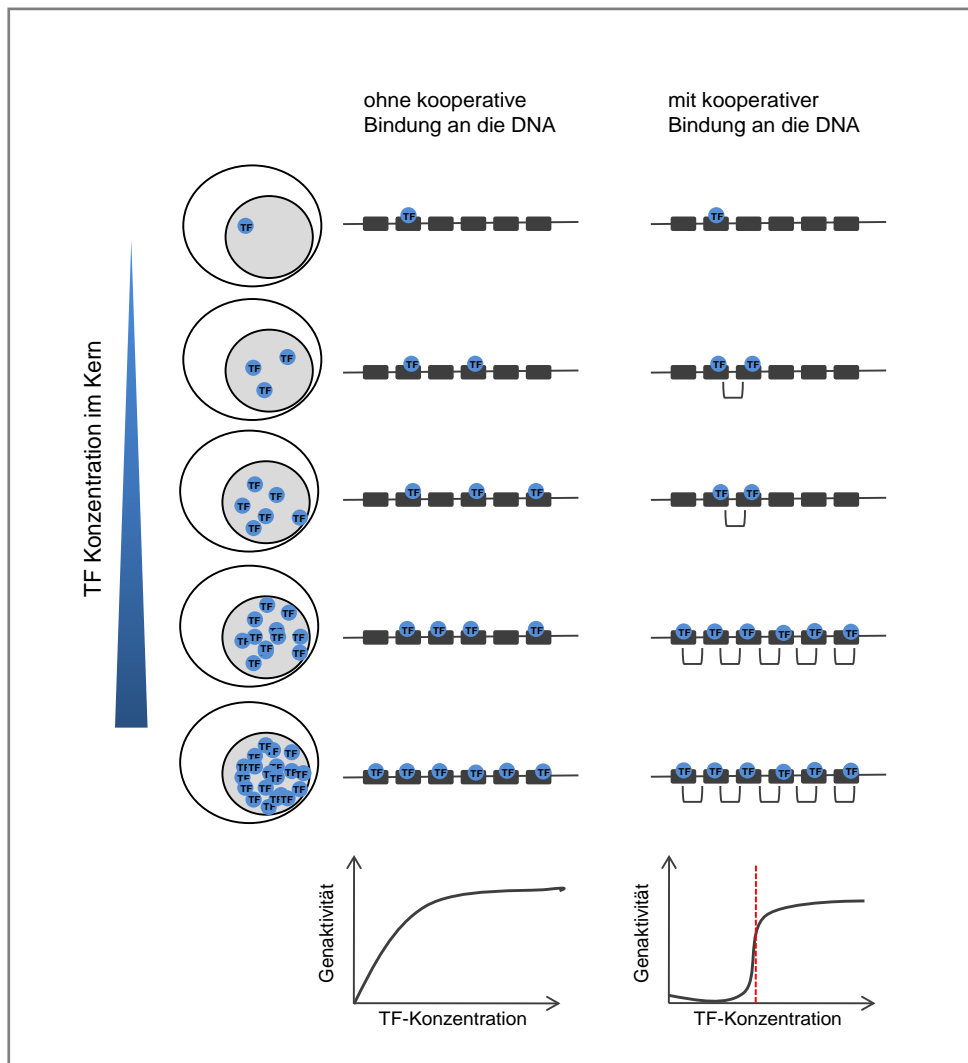
Die Korrelation der NFATc2-Mengen und der IL-2-Produktion in Gedächtnis-Th-Zellen verhält sich wie in gesamten Th-Zellen. Je mehr NFATc2 exprimiert wird, desto mehr Zellen exprimieren IL-2. Es handelt sich also auch in Gedächtnis-Th-Zellen um eine binäre Genexpression, die abhängig von der NFATc2 Menge ist. Die Korrelation der NF-κB und p-c-jun-Expression mit IL-2 hingegen zeigt keinen Einfluss der Mengen dieser beiden Transkriptionsfaktoren auf die Entscheidung, ob IL-2 gemacht wird. Da nachgewiesen wurde, dass NFATc2 zusammen mit AP-1 und NF-κB gemeinsam an den *IL-2*-Promotor binden muss [129], ist es wahrscheinlich, dass NF-κB und p-c-jun im Überschuss in der Zelle exprimiert werden und somit geringe Unterschiede in den Konzentrationen keinen Einfluß auf die *IL-2*-Genaktivität ausüben.

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass neben NFATc2 auch c-fos ein limitierender Faktor für die IL-2-Produktion ist (siehe 3.3.4). Die Partitionierung der Fluoreszenzintensität für c-fos verdeutlicht, dass geringere Mengen c-fos ebenfalls zu einer binären Abnahme der IL-2-Produktion führen. C-fos ist der einzige Transkriptionsfaktor, der nicht konstitutiv exprimiert wird. Es ist also wahrscheinlich dass c-fos sowohl bei der Bildung des AP-1 Heterodimer mit c-jun als auch bei der Bildung des NFATc2/AP-1 Komplexes an der DNA den limitierenden Faktor darstellt, sobald NFATc2 aktiv im Kern vorliegt.

Abb. 4.2 beschreibt die differentielle Auswirkung der Transkriptionsfaktor-Bindung an einen Promotor mit mehreren Bindestellen, abhängig davon, ob dieser Faktor kooperativ oder nicht kooperativ bindet [162]. Ein gradueller Anstieg in der Transkriptionsfaktor-Konzentration wird dabei übersetzt in eine digitale transkriptionelle Antwort. Dies wird ermöglicht durch die kooperative Bindung von Transkriptionsfaktoren an benachbarte Bindestellen in einem Promotor. Wird keine kooperative Bindung benötigt, so führt die graduelle Zunahme der Transkriptionsfaktor-Konzentration zu einem graduellen Anstieg der Genexpression [134, 163]. Dieses Modell, hat sich bisher besonders bei Transkriptionsfaktoren bestätigt, die Entwicklungsprozesse steuern, z.B. während der Embryonalentwicklung [163, 164].

Demnach müßte die Menge des Transkriptionsfaktors einen Schwellenwert überschreiten, um die Genexpression in Gang zu setzen.

Dieses Modell wäre auch auf die Regulation der *IL-2*-Genexpression zu übertragen. Hier würde es sich nicht um einen Transkriptionsfaktor handeln, sondern um verschiedene (NFATc2/AP-1, NF- $\kappa$ B), die kooperativ binden. Geht man davon aus, dass NF- $\kappa$ B in Gedächtnis-Th-Zellen im Überschuß exprimiert wird, würde es den benötigten Schwellenwert zu jeder Zeit überschreiten und stünde für die kooperative Bindung ständig zur Verfügung. Auch die c-jun-Konzentration wäre jederzeit ausreichend um mit c-fos das Heterodimer AP-1



**Abb. 4.2** Kooperative DNA-Bindung führt zu einer binären Induktion der Genaktivität. Bindet ein Transkriptionsfaktor (TF) nicht kooperativ an eine Ansammlung von DNA-Bindestellen in einem Promotor, führt ein gradueller Anstieg in der TF-Konzentration zu einem graduellen Anstieg in der Besetzung der Bindestellen. Wenn die Bindung des TF an benachbarte Bindestellen kooperativ ist, resultiert ein gradueller Anstieg in der TF-Konzentration in einer Alles-oder-nichts-Antwort sobald die Konzentration einen Schwellenwert überschreitet. Die Diagramme zeigen die unterschiedlichen Genaktivitäten bei steigenden TF-Konzentration bei nicht-kooperativer und kooperativer Bindung.

zu bilden. Die Mengen von NFATc2 und c-fos hingegen wären kritisch für die Bildung des NFATc2/AP-1 Komplexes und die anschließende Bindung an die fünf kooperativen Bindestellen im *IL-2*-Promotor. Die Konzentrationen dieser beiden Transkriptionsfaktoren



müssen einen Schwellenwert erreichen, um die vollständige kooperative Bindung des Transkriptionsfaktor-Komplexes zu gewährleisten und die binäre IL-2 Antwort hervorzurufen. Diese Hypothese deckt sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit und auch mit dem auf diesen Daten beruhenden mathematischen Modell, das unter 3.3.7 abgebildet ist. Auch hier wird ersichtlich, dass NFATc2 und AP-1 einen Schwellenwert erreichen müssen, um die IL-2-Produktion in Gang zu setzen. Das mathematische Modell beschreibt zudem, dass ein Anstieg der NFATc2 und AP-1 Konzentrationen eine Zunahme des pro Zelle produzierten IL-2 nach sich zieht. Das konnte mit Hilfe der Partitionierung der Transkriptionsfaktor-Fluoreszenzintensitäten in Abb. 3.23 nicht bestätigt werden. Hier wird lediglich ein Einfluss der c-fos-Expression auf die Frequenz der IL-2 produzierenden Zellen ersichtlich, aber kein gradueller Einfluss auf die IL-2-Menge. Demnach muss das mathematische Modell in Zukunft noch verfeinert und an die durch die Partitionierung gewonnenen Erkenntnisse bezüglich des Einflusses der Transkriptionsfaktor-Mengen auf die IL-2-Expression angepasst werden.

Zusammenfassend kann die binäre IL-2-Expression in Gedächtnis-Th-Zellen auf verschiedene Regulationsebenen zurückgeführt werden:

1. den von Podtschaske *et al.* beschriebenen Switch in der NFATc2 Aktivität, der darüber entscheidet, ob NFATc2 in den Kern transloziert wird und für die Bindung an die DNA zur Verfügung steht [131],
2. die Expression des stimulationsabhängig exprimierten Transkriptionsfaktors c-fos (alle anderen essentiellen Transkriptionsfaktoren werden konstitutiv exprimiert),
3. das Überschreiten eines Schwellenwerts der NFATc2 und c-fos Konzentrationen für die kooperative Bindung an den *IL-2*-Promotor.

Die Untersuchung von T-Zellen aus SLE Patienten mit den in dieser Arbeit etablierten IL-2- und Transkriptionsfaktor-Färbungen auf Einzelzellebene könnte weiteren Aufschluss über die Wichtigkeit der Mengen und Verhältnisse der Faktoren für die IL-2-Produktion geben. Die IL-2-Produktion in Th-Zellen von SLE Patienten ist stark beeinträchtigt [165]. Es konnte bereits gezeigt werden, dass SLE Th-Zellen weniger NF- $\kappa$ B Protein und c-fos mRNA exprimieren [166, 167]. Die Messung der Transkriptionsfaktoren mit IL-2 auf Einzelzellebene in SLE T-Zellen könnte Aufschluß darüber geben, ob sich bestätigt, dass die NFATc2 und c-fos-Mengen für die Entscheidung über die IL-2-Produktion verantwortlich sind.

Im folgenden wurden die Transkriptionsfaktoren in Treg-Zellen als Modell für IL-2<sup>+</sup> Th-Zellen gemessen und diskutiert, inwiefern die Verhältnisse von NFATc2, AP-1 und NF- $\kappa$ B zum anergen Phänotyp dieser Zellen beitragen.

## **4.2 Die Transkriptionsfaktor-Expression und -Aktivierung in FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen**

Bislang war unklar, ob humane periphere FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen generell nicht in der Lage sind, IL-2 zu produzieren, oder ob dabei Defekte in der TZR-Signalkaskade, und somit bei der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren, eine Rolle spielen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass nach *in vitro* Stimulation von *ex vivo* isolierten FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen eine kleine Population IL-2 produziert. Diese Zellen zeichneten sich durch veränderte Verhältnisse und Mengen der Transkriptionsfaktoren NFATc2, NF-κB, AP-1 und FOXP3 aus. Die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren war in allen FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen intakt, unabhängig davon, ob sie IL-2 produzierten oder nicht. Inwieweit die Transkriptionsfaktor-Mengen und Verhältnisse zum Treg-Zell-Phänotyp beitragen, und um was für eine Zell-Population es sich bei den IL-2<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen handelt, soll im Folgenden näher diskutiert werden.

### **4.2.1 Geringe Transkriptionsfaktor-Expression in Treg-Zellen**

In dieser Arbeit wurde erstmals auf Einzelzellebene gezeigt, dass sowohl unstimulierte (siehe Abb. 3.13) als auch stimulierte Treg-Zellen (Abb. 3.15) weniger NFATc2, NF-κB und AP-1 exprimieren als Gedächtnis-Th-Zellen. Obwohl zahlreiche Arbeiten die TZR-abhängige Signalweiterleitung in Treg-Zellen behandeln, wurden die Transkriptionsfaktor-Mengen bisher nur in wenigen Artikeln betrachtet. So stellten Lee *et al.* [150] nach Stimulation mit PMA/Ionomycin eine verminderte Expression des Transkriptionsfaktors NFATc1 (siehe 1.3.8.1) in humanen CD25<sup>+</sup> Th-Zellen fest. Es ist bekannt, dass die aktivierungsabhängige Induktion der NFATc1-Expression in Th-Zellen durch das konstitutiv exprimierte NFATc2 vermittelt wird [168]. Daher ist es wahrscheinlich, dass die beschriebene geringe NFATc1-Expression in Treg-Zellen eine direkte Folge der in dieser Arbeit aufgezeigten verminderten NFATc2-Expression ist. Diese würde nicht ausreichen, um die *NFATc1* Genexpression zu induzieren.

Hickmann *et al.* (übereinstimmend mit den in Abb. 3.13 gezeigten Daten) stellten in murinen CD25<sup>+</sup> Th-Zellen eine geringere c-fos-Expression fest, die auf eine defekte ERK Aktivität zurück geführt wurde.

Die c-jun-Expression in Kernextrakten von stimulierten murinen CD25<sup>+</sup> Th-Zellen war in Analysen von Lee *et al.* vergleichbar mit CD25<sup>-</sup> Th-Zellen. In der vorliegenden Arbeit wurde hingegen eine verminderte c-jun (Abb. 3.14) und phospho-c-jun-Expression (Abb. 3.19) in unstimulierten bzw. stimulierten humanen FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen detektiert. Da das aktivierte, phosphorylierte c-jun in den Kern transportiert wird, ist die c-jun Menge in Kernen vergleichbar mit der Menge p-c-jun, die in dieser Arbeit gemessen wurde. Die

widersprüchlichen Ergebnisse könnten durch die Unterschiede in der Sortierung der Treg-Zellen (CD25<sup>+</sup> und FOXP3<sup>+</sup>) oder den verschiedenen Spezies zustande kommen. Zudem ist die durchflusszytometrische Analyse sensitiver als der von *Lee et al.* verwendete Western-Blot und deckt auch geringere Unterschiede in der Proteinexpression auf.

In Abschnitt 4.1 wurde bereits die Wichtigkeit der Transkriptionsfaktor-Mengen für die Transkription TZR-abhängiger Gene in Gedächtnis-Th-Zellen herausgestellt. In FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen könnte die geringe NFAT-, NF- $\kappa$ B- und AP-1-Expression zusätzlich zu anderen FOXP3-abhängigen Mechanismen zur Unterdrückung von Effektorzell-Funktionen beitragen.

Zytokine wie IL-2 und IFN- $\gamma$  werden durch eine binäre Genexpression reguliert, die stark abhängig von den Transkriptionsfaktor-Konzentration ist (siehe Abb. 4.2). In Treg-Zellen würden die geringen Transkriptionsfaktor-Mengen demnach die Expression von Zytokinen wie IL-2 sogar bei einer sehr starken Stimulation (in dieser Arbeit simuliert durch PMA/Ionomycin) verhindern. Da das Gleichgewicht zwischen IL-2 produzierenden Th-Zellen und IL-2 konsumierenden Treg-Zellen von erheblicher Bedeutung für die Balance zwischen akuter Immunantwort und Toleranz (vgl. 1.4.1) ist, wäre ein solcher Schutz wichtig, um ein funktionierendes Immunsystem aufrechtzuerhalten.

Inwieweit FOXP3 direkt an der Inhibierung der Transkriptionsfaktor-Expression beteiligt ist, soll im Folgenden näher erläutert werden.

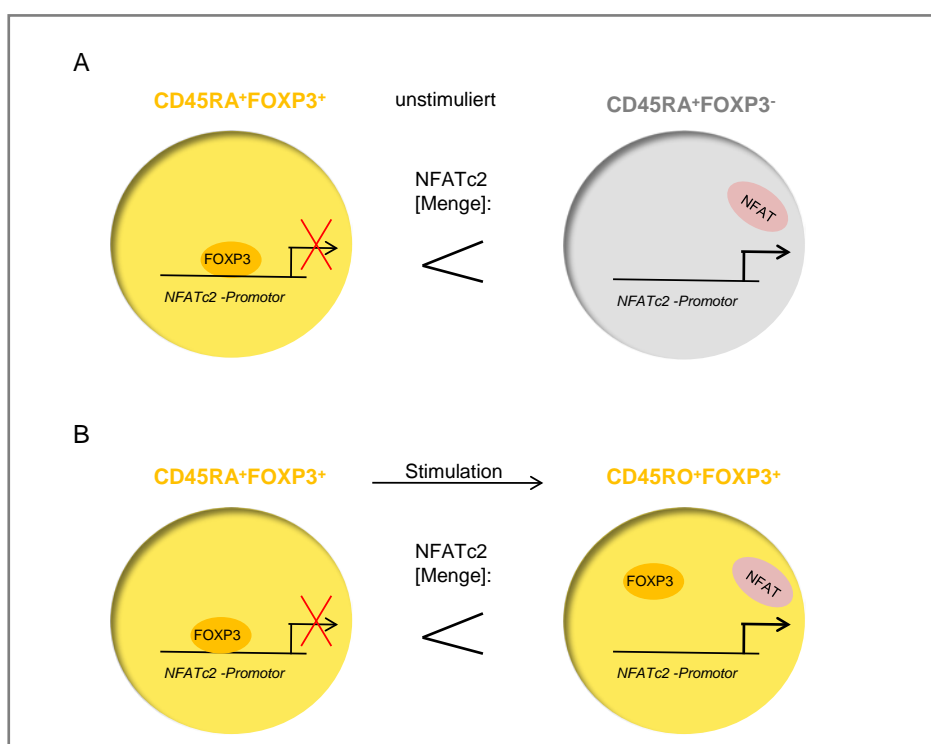
#### **4.2.2 Die Abhängigkeit der geringen Transkriptionsfaktor-Expression von FOXP3**

Th-Zellen und Zelllinien, die ektopisch FOXP3 exprimieren, erlangen Treg-spezifische Eigenschaften, wie suppressive Funktionen, Verlust der Zytokinproduktion, eingeschränkte Proliferation *in vitro* und die vermehrte Expression von CD25 und CTLA-4 [145, 169]. Da FOXP3 allein für die Ausprägung des Treg-Phänotyps ausreicht und zudem selbst als transkriptioneller Aktivator und Repressor dient (siehe 1.5.1), liegt die Vermutung nahe, dass die Unterschiede zwischen Gedächtnis- und Treg-Zellen direkt durch FOXP3 vermittelt werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob FOXP3 direkt an der geringen NFATc2-Expression in Treg-Zellen beteiligt ist.

*In silico* konnten im humanen *NFATc2*-Promotor zwei Regionen gefunden werden, die potentielle FOXP3-Bindestellen enthalten. Ein Abschnitt befindet sich 795-629 bp vor dem Transkriptionsstartpunkt und umfasst zwei direkt aneinander grenzende FOXP3- sowie eine kombinierte NFAT/FOXP3-Bindestelle. Eine zweite Region, die in Abb. 3.11 dargestellt ist und in der vorliegenden Arbeit näher untersucht wurde, befindet sich 853-901 bp vor dem Transkriptionsstart. Hier finden sich zwei FOXP3- und eine NFAT/FOXP3-Bindestelle.

ChIP-Versuche mit einem spezifischen Antikörper gegen FOXP3 zeigten, dass in unstimulierten FOXP3-angereicherten Zellen (50% FOXP3<sup>+</sup>-Th-Zellen) eine Bindung von FOXP3 an den *NFATc2*-Promotor erfolgt. Nach Stimulation hingegen ist keine Bindung mehr nachweisbar. FOXP3 bildet an der DNA große supramolekulare Komplexe aus verschiedenen Transkriptionsfaktoren sowie Histon-Acetyltransferasen (HATs) und Histone-Deacetylasen (HDACs). HATs und HDACs regulieren die Acetylierung der Histone und damit die Chromatinstruktur und Zugänglichkeit des Promotors. Es wird spekuliert, dass FOXP3 für die Rekrutierung dieser Enzyme zum Promotor und somit Inhibierung der Genexpression verantwortlich ist [170].

Die NFATc2-Expression in unstimulierten, *ex vivo* isolierten FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen ist erheblich geringer als in FOXP3<sup>-</sup> Th-Zellen (siehe Abb. 3.13), was eine direkte Folge der FOXP3-Bindung an den *NFATc2*-Promotor und der damit verbundenen Hemmung der Transkription sein könnte. Nach Stimulation bindet der reprimierende FOXP3-Komplex dann nicht mehr an das Chromatin, und es kann wieder eine Expression von NFATc2 erfolgen.



**Abb. 4.3 Modell zur Regulation der *NFATc2*-Transkription in FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen.** Schematische Darstellung der Ergebnisse in Abb. 3.10. CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen entsprechen unstimulierten, CD45RO<sup>+</sup>-Th-Zellen stimulierten Zellen. In unstimulierten FOXP3<sup>+</sup> Zellen bindet FOXP3 an den *NFATc2*-Promotor und verhindert die Gentranskription. In FOXP3<sup>-</sup> Zellen wird NFAT konstitutiv exprimiert. Daraus resultiert ein Unterschied in den NFATc2-Mengen zwischen FOXP3<sup>+</sup> und FOXP3<sup>-</sup> unstimulierten Zellen (A). Nach Stimulation (und damit Verlust der CD45RA- zugunsten der CD45RO-Isoform) bindet FOXP3 nicht mehr am Promotor und erlaubt die NFATc2-Produktion. Somit erfolgt eine Hochregulation der NFATc2-Expression in Treg-Zellen nach Stimulation (B).

Diese Hypothese stimmt mit den Ergebnissen in 3.1.5 überein, die eine höhere NFATc2-Expression in CD45RA<sup>+</sup>FOXP3<sup>-</sup> als CD45RA<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen zeigen. Es wird

davon ausgegangen, dass es sich bei CD45RA<sup>+</sup> Zellen um antigen-unerfahrene, unstimulierte Zellen handelt. CD45RO<sup>+</sup> Zellen hingegen wurden bereits durch ihr spezifisches Antigen aktiviert und können somit als stimulierte Zellen bezeichnet werden. In unstimulierten CD45RA<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen wäre FOXP3 im Gegensatz zu CD45RA<sup>+</sup>FOXP3<sup>-</sup> Zellen an den *NFATc2*-Promotor gebunden und würde die Expression hemmen. Daraus würde die aufgezeigte geringere NFATc2 Menge in CD45RA<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen resultieren (Abb. 4.3A).

Vergleicht man die NFATc2-Expression in unstimulierten CD45RA<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Zellen mit dem Gehalt in stimulierten CD45RO<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Zellen wird eine Hochregulation der NFATc2-Expression in FOXP3<sup>+</sup> Zellen nach Stimulation erkennbar (Abb. 4.3B). Dies stimmt ebenfalls mit dem Ergebnis in 3.2.2 überein, dass FOXP3 nach Stimulation nicht mehr an den Promotor bindet und somit die NFATc2-Expression zulässt. Wäre FOXP3 auch nach Stimulation an den *NFATc2*-Promotor gebunden, würde die Transkription weiterhin gehemmt sein und keine Hochregulation stattfinden.

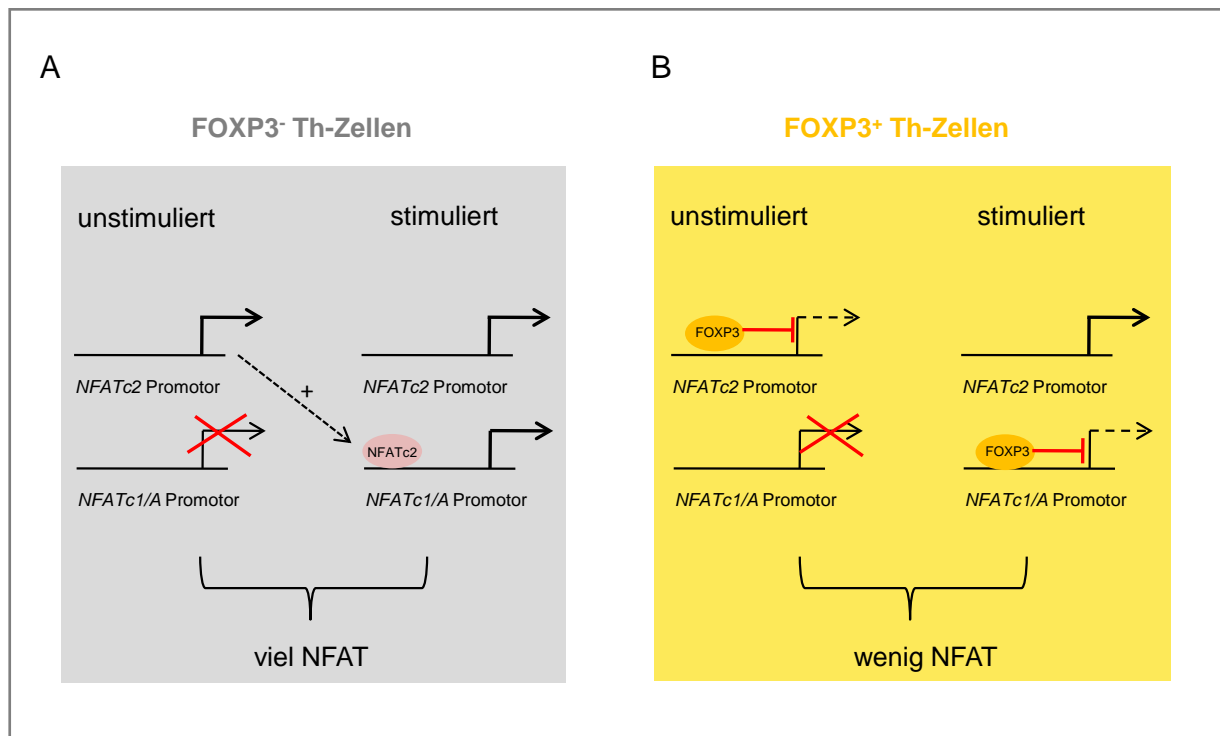
Die Unterschiede in der NFATc2-Expression zwischen stimulierten CD45RO<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> und CD45RO<sup>+</sup>FOXP3<sup>-</sup> Th-Zellen käme also nicht durch eine defekte oder reprimierte stimulationsabhängige NFATc2-Expression zustande, sondern durch eine vor der Stimulation (im CD45RA<sup>+</sup> Stadium) geringere, konstitutiv vorhandene NFATc2-Menge. Dies stimmt mit der Feststellung überein, dass die Differenz der NFATc2-Expression zwischen CD45RA<sup>+</sup> und CD45RO<sup>+</sup> in FOXP3<sup>+</sup> und FOXP3<sup>-</sup> Th-Zellen gleich ist (Abb. 3.10B).

Torgerson *et al.* weisen eine Bindung von FOXP3 an den Promotor der NFATc1/A Isoform in FOXP3-transduzierten Maus Th-Zellen nach [150]. Diese Isoform wird im Gegensatz zu NFATc2 nicht konstitutiv sondern erst nach Stimulation exprimiert. Der *NFATc1/A*-Promotor wird nur in stimulierten Zellen von FOXP3 gebunden. Da die beiden NFAT-Formen in ihren Funktionen teilweise redundant sind, könnte ein gleichbleibend niedriger NFAT-Gehalt in Treg-Zellen erreicht werden, indem FOXP3 (I) die Expression des konstitutiv exprimierten NFATc2 in unstimulierten Zellen unterdrückt und (II) nach Stimulation die stimulationsabhängige NFATc1/A-Expression hemmt. So würde nach Stimulation gerade genug NFAT produziert, um die Transkription der NFAT/FOXP3-Komplex-abhängigen Gene sicherzustellen, ohne den „Schutzmechanismus“ der geringeren NFAT-Gesamtmenge aufzugeben.

Diese Hypothese wird unterstützt durch die Beobachtung von Torgerson *et al.*, dass die Überexpression von NFATc1 in murinen Treg-Zellen zur IL-2-Produktion in diesen Zellen führt. Demnach scheint die NFAT Konzentration in Treg-Zellen von großer Bedeutung für den Erhalt des Treg-Zell Phänotyps zu sein.

Neben der FOXP3-abhängigen Repression der *NFATc1/A* Genexpression könnte zusätzlich die geringe Menge NFATc2 zu einer eingeschränkten NFATc1/A-Expression beitragen, da

die Initiation der NFATc1/A-Expression direkt von NFATc2-abhängig ist [74] (siehe Modell in Abb. 4.4).



**Abb. 4.4 Modell zur FOXP3-abhängigen Hemmung der NFATc2 und NFATc1/A-Expression.** In unstimulierten FOXP3<sup>-</sup> Th-Zellen wird konstitutiv NFATc2 gebildet, während der Promotor des *NFATc1/A* Gens inaktiv ist. Nach Stimulation wird die Transkription von *NFATc1/A* durch die NFATc2-Bindung an den Promotor gestartet. Der *NFATc2*-Promotor bleibt aktiv (A). Die Expression und Bindung von FOXP3 in Treg-Zellen bewirkt die Hemmung der NFATc2-Expression in unstimulierten Zellen. Die Stimulation bewirkt die Dissoziation von FOXP3 vom *NFATc2*-Promotor, so dass eine Transkription ermöglicht wird. Gleichzeitig bindet FOXP3 am *NFATc1/A*-Promotor und hemmt die Expression. So wäre die NFAT-Gesamtmenge sowohl in unstimulierten als auch in stimulierten FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen geringer als in FOXP3<sup>-</sup> Th-Zellen.

Zudem wurde in 3.3.1 die eingeschränkte Expression der Transkriptionsfaktoren c-fos, c-jun und NF-κB in Treg-Zellen nachgewiesen. Die *in silico* Analyse der Promotoren ergab, dass sich im *c-fos*-Promotor sechs potentielle FOXP3- und zwei NFAT/FOXP3-Bindestellen befinden. Im *c-jun*-Promotor wurde eine NFAT/FOXP3- sowie drei FOXP3-Bindestellen gefunden. Auch der Promotor des Gens für NF-κBp65 weist zwei hypothetische FOXP3-Bindestellen auf (nicht gezeigt). Es ist also möglich, dass FOXP3 auch die Expression dieser Transkriptionsfaktoren hemmt und damit zum Abschalten der IL-2-Produktion beiträgt.

### 4.2.3 Die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren in FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen ist intakt

In verschiedenen Arbeiten wurden Defekte im TZR-Signalweg in Treg-Zellen gezeigt. So wiesen Hickman *et al.* einen geringeren Ca<sup>2+</sup>-Einstrom nach Aktivierung von Maus CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen nach. Des Weiteren wurden Defekte in der Aktivierung der PLC $\gamma$  und ERK aufgezeigt. Auch die Aktivierung von NFATc2 wurde in dieser Arbeit betrachtet. In Western Blot Experimenten mit Kernextrakten von CD25<sup>+</sup> und CD25<sup>-</sup> Th-Zellen wurde deutlich, dass nach Stimulation mit Antikörpern gegen CD3 in CD25<sup>+</sup> Th-Zellen sehr viel weniger NFATc2 in den Kern transloziert als in CD25<sup>-</sup>. Daraus schlossen die Autoren auf eine defekte Aktivierung von NFATc2 in CD25<sup>+</sup> Th-Zellen. Nach Stimulation mit PMA/Ionomycin und damit unter Umgehung der proximalen TZR-Signalweiterleitung war jedoch genauso viel NFATc2 in den Kernen der CD25<sup>+</sup>, wie in den CD25<sup>-</sup> Th-Zellen detektierbar [142].

Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen dieser Arbeit. Die Etablierung der gleichzeitigen Färbung von FOXP3 und NFATc2 in isolierten Zellkernen ermöglicht erstmals

1. die Detektion des aktiven NFATc2 in Treg-Zellen auf Einzelzellebene (siehe 3.3.6.2),
2. den direkten Vergleich der NFATc2 Translokation in FOXP3<sup>+</sup> und FOXP3<sup>-</sup> Th-Zellen innerhalb einer Probe, sowie
3. die relative Quantifizierung der NFATc2-Expression in Subpopulationen mit Hilfe der MFI-Werte.

In diesen Versuchen wurde eine vollständige NFATc2-Aktivierung in Gedächtnis- und Treg-Zellen nach Stimulation sowohl mit anti-CD3/CD28 (siehe Abb. 3.20B) als auch mit PMA/Ionomycin (nicht gezeigt) nachgewiesen. Die leicht niedrigeren MFI-Werte für NFATc2 in den stimulierten FOXP3<sup>+</sup> im Vergleich zu den FOXP3<sup>-</sup> Th-Zellen (nach Stimulation mit PMA/Ionomycin genauso wie mit anti-CD3/CD28 Antikörpern) weisen darauf hin, dass die Gesamtmenge NFATc2 in FOXP3<sup>+</sup> Zellkernen geringer ist. Dies bestätigt sich in dem Vergleich des gesamten NFATc2 Gehalts in FOXP3<sup>+</sup> und FOXP3<sup>-</sup> Th-Zellen in Abb. 3.13, der in den Treg-Zellen deutlich geringer ist. Die unterschiedlichen Mengen des nukleären NFATc2 in der Arbeit von Hickman *et al.* lassen sich also durch die in dieser Arbeit gezeigten ungleichen totalen NFATc2-Mengen erklären, denn in beiden Zell-Populationen wird, wie in Abb. 3.20B gezeigt, nach Stimulation in allen Zellen NFATc2 aktiviert und in den Kern transloziert.

Die Aktivierbarkeit sowohl von NFATc2 als auch von NF- $\kappa$ B in FOXP3<sup>+</sup> im Vergleich zu FOXP3<sup>-</sup> Th-Zellen wurde in weiteren Publikationen mit Hilfe von Reporterassays analysiert. Kim *et al.* [169] benutzten Jurkat Zellen, die ektopisch FOXP3 überexprimieren, und transfizierten diese mit NFAT- und NF- $\kappa$ B-Luciferase-Reporterkonstrukten. Nach

Stimulation wurde die Reporterogenaktivität in diesen Zellen mit Jurkat Zellen verglichen, die kein FOXP3 exprimieren. Die Luciferase Aktivität der NFAT- und NF- $\kappa$ B-Reporter in FOXP3<sup>+</sup> Zellen war drastisch reduziert. Auch in primären humanen CD4<sup>+</sup> T-Zellen konnte eine Reduktion der NF- $\kappa$ B Reporterogen-Aktivität nach Überexpression von FOXP3 festgestellt werden [171]. In den FOXP3 transfizierten Zellen wurden jedoch nicht die Gesamtmengen der beiden Transkriptionsfaktoren bestimmt, so dass es wahrscheinlich ist, dass es sich bei der FOXP3-abhängig reduzierten Reporterogen-Aktivität ebenfalls um eine Folge der geringen NFAT- und NF- $\kappa$ B-Expression handelt, die in der vorliegenden Arbeit in primären Zellen gezeigt wurde (siehe Abb. 3.14B+C). Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen, dass die Aktivierung und damit Translokation von NF- $\kappa$ B in den Kern, in primären humanen FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen nicht beeinträchtigt ist (Abb. 3.20D), da alle FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen NF- $\kappa$ B in den Kern translozieren.

Die vollständige NFATc2-Aktivierung in FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen ist von besonderer Bedeutung für die Zellen. NFATc2 ist in der Lage, nach Stimulation mit FOXP3 als Komplex an die Promotoren einer Vielzahl von Genen zu binden und dort als Aktivator oder Repressor der Gentranskription zu wirken [82]. Würde NFATc2 in Treg-Zellen nicht aktiviert werden, könnten diese ihren spezifischen Phänotyp nicht aufrechterhalten, da der NFAT/FOXP3-Komplex u.a. die Transkription der Gene für CD25, CTLA-4 oder GITR in Treg-Zellen reguliert. Überdies ist die FOXP3-Expression selbst NFAT-abhängig, so dass ohne eine intakte NFATc2-Aktivierung die Ausprägung des Treg-Zell-Phänotyps (siehe 1.2.2.4) nicht möglich wäre. Inwieweit die NF- $\kappa$ B-Aktivierung in peripheren Treg-Zellen dazu beiträgt, ist bisher nicht bekannt.

Hickman *et al.* stellten eine schwächere Aktivierung von ERK in Maus CD25<sup>+</sup> als in CD25<sup>-</sup> Th-Zellen fest [142]. Dazu verglichen sie nach Stimulation die ERK Gesamtexpression sowie das phosphorylierte, aktivierte ERK in den zwei Zell-Populationen im Western Blot. Die ERK Gesamtmenge war in beiden Populationen identisch, aber die Phosphorylierung scheint in CD25<sup>+</sup> Th-Zellen beeinträchtigt zu sein. Da ERK nach Stimulation nicht nur die Induktion der c-fos-Expression sondern auch dessen Phosphorylierung bewirkt [172], könnte man davon ausgehen, dass sowohl die Menge als auch die Aktivierung von c-fos in FOXP3<sup>+</sup> bzw. CD25<sup>+</sup> Th-Zellen vermindert sein müsste. Die Aktivierung von c-fos wurde von *Hickman et al.* nicht betrachtet, aber die c-fos-Expression in CD25<sup>+</sup> Zellen war in der Tat vermindert. Dies stimmt mit den Ergebnissen in Abb. 3.13 und Abb. 3.14D dieser Arbeit überein. Zudem konnte hier gezeigt werden, dass auch die Aktivierung von c-fos ( Abb. 3.20C) in FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen, trotz der postulierten Beeinträchtigung der ERK-Aktivierung, unbeschädigt ist. Es ist allerdings fraglich, ob die Daten zur ERK-Aktivierung in Maus CD25<sup>+</sup> Th-Zellen ohne Weiteres auf die von uns verwendeten humanen FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen übertragbar sind.



Die drei mit Hilfe der Kernfärbung gemessenen Transkriptionsfaktoren werden in FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen nach Stimulation in den Kern transloziert. Es ist bei allen Messungen durchgehend zu beobachten, dass die MFI für die jeweiligen Transkriptionsfaktoren in FOXP3<sup>+</sup> Zellkernen sowohl in stimulierten als auch in unstimulierten Zellkernen geringer als in FOXP3<sup>-</sup> Kernen sind. Das könnte daran liegen, dass in unstimulierten Zellen immer ein geringes basales Shuttling der Transkriptionsfaktoren in den Zellkern vorherrscht, das jedoch zu gering zum Start der aktivierungsabhängig induzierten Gentranskription ist. Da wie in 3.3.1 gezeigt, die Treg-Zellen insgesamt geringere Transkriptionsfaktormengen exprimieren, liegt die Vermutung nahe, dass auch die Menge an basal in den Zellkern transloziertem NFATc2, c-fos und NF-κBp65 in Treg-Zellen geringer als in Gedächtnis-Th-Zellen war. Dadurch könnte es zu den Unterschieden in den MFI der angefärbten Proteine zwischen unstimulierten FOXP3<sup>+</sup> und FOXP3<sup>-</sup> Zellkernen kommen.

Die Aktivierung von c-jun konnte nicht mit Hilfe der Kernfärbung auf Einzelzellebene nachgewiesen werden. Die Quantifizierung der Western Blot Daten zur c-jun und phospho-c-jun-Expression jedoch ließen den Schluss zu, dass auch c-jun vollständig aktiviert wird (Abb. 3.21). Dies wird unterstützt durch Versuche, in denen mit Immunopräzipitationen gezeigt wurde, dass nach Stimulation in Maus CD25<sup>+</sup> Th-Zellen phosphoryliertes c-jun im Kern lokalisiert ist und an den N-terminus von FOXP3 binden kann [173].

Trotz der in Treg-Zellen beschriebenen Defekte in einer Vielzahl von Signalmolekülen der TZR-Signalkaskade (z.B. CD3, ZAP70, PKC, ERK, PLCγ) [142-144], konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die TZR-abhängigen Transkriptionsfaktoren NFAT, NF-κB und AP-1 in humanen primären FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen nach *in vitro* Stimulation voll aktivierbar sind. Die in der Literatur diskutierte eingeschränkte TZR-abhängige Transkriptionsfaktor-Aktivität scheint somit nicht ursächlich zu sein für die Unfähigkeit der FOXP3 exprimierenden Th-Zellen, Zytokine zu produzieren.

#### 4.2.4 Die IL-2-Produktion in FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen

FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen zeichnen sich u.a. dadurch aus, dass sie keine Effektor-Zytokine exprimieren können. Überraschenderweise wurde in dieser Arbeit nach *in vitro* Stimulation von *ex vivo* isolierten, humanen Gedächtnis-Th-Zellen eine kleine Population von bis zu 20% FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen detektiert, die IL-2 produziert (Abb. 3.2).

In humanen primären Zellen kann nach *in vitro* Stimulation eine FOXP3-Expression in FOXP3<sup>-</sup> Th-Zellen erfolgen. Diese ist jedoch nur transient und führt nicht zum Erlangen von Suppressor-Funktionen [174]. Da sich unter den in dieser Arbeit verwendeten Bedingungen die Frequenz der FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen vor und nach Stimulation nicht unterscheidet (siehe

Abb. 3.4), handelt es sich bei den IL-2<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen nicht um diese Art der stimulationsabhängigen FOXP3-Expression.

Die Etablierung von Transkriptionsfaktor-Färbungen zusammen mit IL-2 und FOXP3 für die Durchflusszytometrie ermöglichte es, die relativen Transkriptionsfaktor-Mengen und Verhältnisse in den verschiedenen Subpopulationen auf Einzelzellebene zu analysieren und zu vergleichen. Wie schon diskutiert, wurde festgestellt, dass FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen viel weniger von den untersuchten Transkriptionsfaktoren exprimieren als FOXP3<sup>-</sup> Th-Zellen. Aber auch innerhalb der FOXP3<sup>+</sup> Subpopulationen unterscheiden sich die Transkriptionsfaktor-Konzentrationen. So exprimieren IL-2<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Zellen mehr NFATc2, c-fos und p-c-jun als IL-2<sup>-</sup>FOXP3<sup>+</sup> Zellen, wohingegen die Menge von NF-κB gleich bleibt. FOXP3 wird in IL-2<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Zellen weniger stark exprimiert als in IL-2<sup>-</sup>FOXP3<sup>+</sup> Zellen (Zusammenfassung in Tabelle 15).

**Tabelle 15 Vergleich der Transkriptionsfaktor Mengen in IL-2<sup>+</sup> und IL-2<sup>-</sup> FOXP3<sup>+</sup> Zellen**

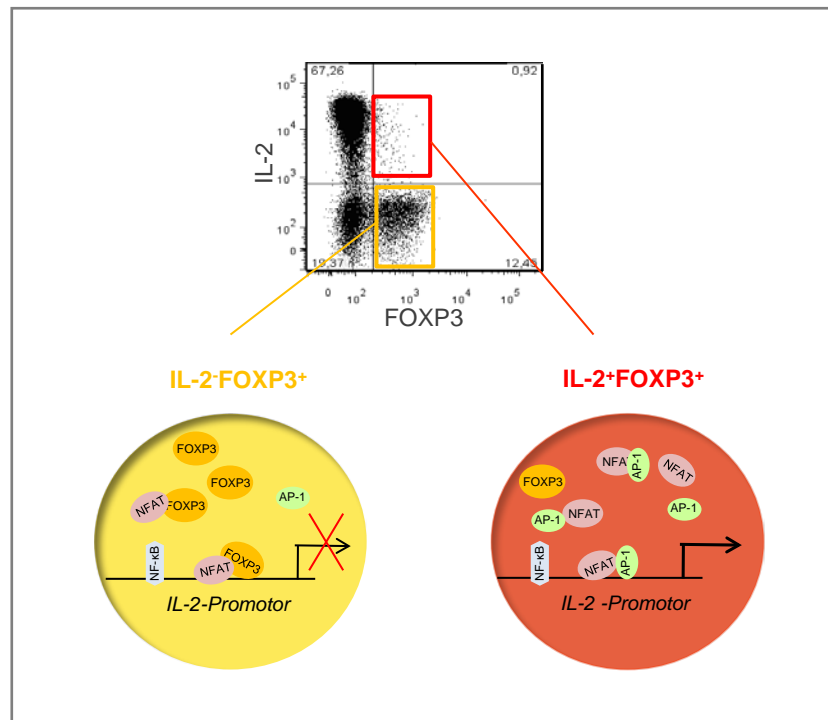
IL-2+FOXP3+ vs IL-2-FOXP3+	
NFATc2	>
c-fos	>
p-c-jun	>
NF-κBp65	=
FOXP3	<

Obwohl sich die TZR-abhängige Signalweiterleitung zwischen Treg- und Gedächtnis-Th-Zellen unterscheidet, führt sie in beiden Populationen zur vollständigen Aktivierung der Transkriptionsfaktoren (3.3.6.2). Somit kann ausgeschlossen werden, dass Treg-Zellen unfähig sind, IL-2 zu exprimieren, weil die Transkriptionsfaktoren nicht aktivierbar sind.

Die Tatsache, dass in dieser Arbeit eine Population IL-2 produzierender FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen vorgefunden wurde, deutet darauf hin, dass auch Treg-Zellen potentiell zur IL-2-Expression in der Lage sind. Somit ist es unwahrscheinlich, dass epigenetische Unterschiede zwischen FOXP3<sup>+</sup> und FOXP3<sup>-</sup> Th-Zellen im *IL-2*-Genlocus für die differentielle IL-2-Produktion verantwortlich sind.

Vielmehr scheinen andere Faktoren die IL-2-Expression in Treg-Zellen zu unterdrücken. Wu *et al.* zeigten durch Überexpression von FOXP3 in Zelllinien, dass ein Mechanismus der Hemmung der Zytokin-Produktion durch FOXP3 selbst vermittelt wird [82]. Hierbei bindet FOXP3 als Heterodimer mit NFAT an die NFAT/AP-1-Bindestellen im *IL-2*-Promotor. Dies führt zur Inhibierung der Transkription (vgl. 1.5.1). Mutiertes FOXP3, das keinen Komplex mit NFAT bilden kann, führt nicht zur Repression der IL-2-Produktion. Es wurde spekuliert, dass die NFAT/FOXP3-Komplex-Bildung eine Konkurrenz zwischen AP-1 und FOXP3 um die

Bindung an NFAT zur Folge hat. In diesem Kontext zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass in primären, humanen Treg-Zellen die Mengen und Verhältnisse der Transkriptionsfaktoren so „eingestellt“ sind, dass die Produktion von Zytokinen weitgehend verhindert wird (siehe Modell in Abb. 4.5).



**Abb. 4.5 Die IL-2-Expression in Treg-Zellen ist abhängig von den Mengen und Verhältnissen der TZR-abhängigen Transkriptionsfaktoren.** Modell der IL-2 Transkription in den im Dot Plot eingegrenzten IL-2<sup>-</sup>FOXP3<sup>+</sup> (gelb) und IL-2<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> (rot) Populationen. Die IL-2<sup>-</sup>FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen exprimieren viel FOXP3, aber wenig NFATc2 und AP-1. Dadurch wird die Bildung des NFAT/FOXP3-Komplexes begünstigt und die IL-2-Expression inhibiert. Die IL-2<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen exprimieren hingegen weniger FOXP3 und viel NFATc2 und AP-1, was zur bevorzugten Bildung des aktivierenden NFAT/AP-1-Komplexes und damit zur IL-2-Produktion führt.

Dies wird besonders bei dem Vergleich der Transkriptionsfaktor-Expression in den IL-2<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> und IL-2<sup>-</sup>FOXP3<sup>+</sup> Populationen deutlich:

1. Die IL-2<sup>-</sup>FOXP3<sup>+</sup> Zellen exprimieren (FOXP3-abhängig, siehe 4.2.2) weniger NFATc2 als die IL-2<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen. Das trägt wie in FOXP3<sup>-</sup> Gedächtnis-Th-Zellen dazu bei, dass keine binäre IL-2-Expression induziert wird.
2. Die geringe AP-1- und gleichzeitig hohe FOXP3-Expression in IL-2<sup>-</sup>FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen unterstützt die Bildung des inhibierenden NFAT/FOXP3-Komplexes anstelle eines aktivierenden NFAT/AP-1-Komplexes.

In IL-2<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen liegt die umgekehrte Situation vor. Hier wird neben großen Mengen NFATc2 auch viel AP-1 und wenig FOXP3 exprimiert, was primär zur Bildung des NFAT/AP-1-Komplexes und somit Produktion von IL-2 führt (siehe 3.3.1).

Auf Basis der erhobenen Einzelzell-Daten zur Transkriptionsfaktor- und IL-2-Expression in Treg-Zellen wurde ein mathematisches Modell erstellt (Manuela Benary, siehe Abb. 3.22). Durch dieses Modell lassen sich die erhobenen experimentellen Daten und die daraus abgeleitete Hypothese reproduzieren. Demnach sind die Mengen und Verhältnisse von NFATc2, AP-1 und FOXP3 essentiell für die Entscheidung, ob eine Zelle IL-2 produziert.

Die Daten, die dem Modell zu grunde liegen, sind Messungen, die sich auf den Zeitpunkt 5 h nach Stimulation beschränken. Daher wird in dem Modell von einem Fließgleichgewicht ausgegangen. Diese Annahme könnte zu einer eingegrenzten Erfassung der Verhältnisse und Korrelationen der einzelnen Parameter führen, da die Transkriptionsfaktor- und Zytokin-Expression dynamische Prozesse sind. Daher soll das Modell mit Hilfe von Messungen der Transkriptionsfaktoren und IL-2 über die Zeit zusätzlich verfeinert werden. Dies würde schließlich eine aussagekräftige Vorhersage über die Wahrscheinlichkeit der IL-2-Produktion anhand der Transkriptionsfaktor-Mengen ermöglichen.

Neben den gemessenen Transkriptionsfaktoren, die in das Modell integriert wurden, gibt es eine Reihe anderer Faktoren, die die IL-2-Produktion beeinflussen. Dazu gehören die Transkriptionsfaktoren Ikaros [137] und Oct (siehe 1.4.2), die in den Messungen nicht betrachtet wurden. Auch die Dissoziations- und Assoziationskonstanten wurden für alle Faktoren als gleich angenommen, da in der Literatur keine Angaben zu diesen Parametern gemacht wurden.

Dieses sehr einfache Modell, ist also in der Lage, den Einfluss der Transkriptionsfaktoren NFATc2, AP-1 und FOXP3 auf die Entscheidung abzubilden, ob eine Treg-Zelle IL-2 produziert. Der Einfluss von AP-1 auf die Menge des produzierten IL-2, ist allerdings eher fraglich, da die Partitionierung in Gedächtnis-Th-Zellen lediglich einen Einfluss dieser Faktoren auf die binäre, nicht auf die graduelle IL-2-Expression gezeigt wurde. Für Treg-Zellen war diese Partitionierung aufgrund der geringen Zellzahl IL-2<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Zellen nicht möglich. Es ist aber wahrscheinlich, dass dies auch für Treg-Zellen gilt und das Modell in diesem Punkt besser an die experimentellen Daten angepasst werden muss.

Um den endgültigen Beweis für die Richtigkeit des Modells zu erbringen, wäre eine Überexpression der einzelnen gemessenen Parameter in *ex vivo* isolierten, humanen FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen nötig. Dazu wird jedoch ein System benötigt, dass es ermöglicht, die Transkriptionsfaktoren in die Zellen einzubringen, ohne sie vorher zu stimulieren. Die Stimulation würde eine Hochregulation einzelner Transkriptionsfaktoren und damit Veränderung des *Status quo* der Transkriptionsfaktor-Verhältnisse vor der Restimulation bedeuten. Somit könnten die Auswirkungen auf die IL-2-Expression nicht zwingend dem überexprimierten Protein zugesprochen werden. Auch der Einstrom von Calcium, der u.a. durch das Einbringen von Expressions-Vektoren mit Hilfe von Elektroporation erfolgt (unpublizierte Daten der AG Baumgrass) stimuliert die Zellen. Die einzige Methode, mit der

ruhende Treg-Zellen transduziert werden könnten, ist die Lentivirale Überexpression der Transkriptionsfaktoren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden bereits lentivirale Konstrukte hergestellt, die die Gene der Transkriptionsfaktoren enthalten und Virus produziert. Lediglich die Infektion mit dem gewonnenen Virus blieb bislang erfolglos. Es ist bekannt, dass sich humane periphere Lymphozyten im Gegensatz zu Zelllinien oder murinen Zellen sehr schwer transduzieren lassen [175]. Vielleicht würde in Zukunft die Verwendung eines modifizierten lentiviralen Vectors, der die Transduktion ruhender primärer T-Zellen verstärken soll, die Überexpression der Transkriptionsfaktoren und damit Bestätigung des Modells ermöglichen [176].

#### 4.2.5 Die Phänotypische Charakterisierung der IL-2<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen

Da bisher in der Literatur noch keine humanen IL-2<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Zellen beschrieben wurden, stellt sich die Frage, welchen Phänotyp die hier detektierte Population besitzt und welche Funktion sie ausüben könnte.

Die Bestimmung der Expression der Oberflächenmarker CD127 und CD25 in IL-2<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Zellen (3.1.3.2) zeigte, dass sie wie die IL-2<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Zellen kein oder wenig CD127 exprimieren. Die CD25-Expression ist geringer als in IL-2<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Zellen, aber verglichen mit CD25<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup>FOXP3<sup>-</sup> Gedächtnis-Th-Zellen deutlich positiv (siehe Abb. 3.7).

Obwohl nach *in vitro* Stimulation der isolierten Th-Zellen keine FOXP3 Hochregulation beobachtet wurde (3.1.2.2), ist nicht auszuschließen, dass es sich bei den IL-2<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Zellen um Effektor-Zellen handelt, die vor der Blutabnahme stimulationsabhängig *in vivo* FOXP3 hochreguliert haben. Diese verlieren wie nTreg-Zellen die Fähigkeit zu proliferieren und Zytokine zu produzieren, können jedoch keine suppressorischen Funktionen ausführen [177]. Effektorzellen exprimieren aber im Gegensatz zu nTreg-Zellen trotz der FOXP3-Expression große Mengen des Oberflächenrezeptors CD127 [178]. Da die hier beschriebenen IL-2<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen kein CD127 exprimieren ist es wahrscheinlich, dass es sich nicht um eine *in vivo* induzierte FOXP3-Expression in Effektor-Zellen handelt. Vielmehr könnten es tatsächlich FOXP3<sup>+</sup> Zellen sein, die nach Stimulation die FOXP3-Expression heruntergefahren haben, wodurch keine Inhibierung der Expression der TZR-abhängigen Transkriptionsfaktoren mehr stattfindet. Das so verschobene Verhältnis der Transkriptionsfaktoren könnte schließlich zur IL-2-Produktion führen.

Die gemeinsame Färbung von FOXP3 und IL-2 mit IL-4, IFN- $\gamma$  bzw. IL-17 zeigte, dass FOXP3 nicht mit dem für die Th2-Antwort charakteristischen Zytokin IL-4 koexprimiert wird (3.1.3.1). IFN- $\gamma$  hingegen wird von 10-40% der FOXP3<sup>+</sup> Zellen produziert. Von diesen exprimieren bis zu 60% zusätzlich IL-2. Die IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Zellen exprimieren den für Th1-Zellen charakteristischen Transkriptionsfaktor T-bet (nicht gezeigt).

Während einer Th1-Zell vermittelten Immunantwort in Mäusen wird in einem Teil der Treg-Zellen ebenfalls T-bet hochreguliert. Dies wiederum führt zur Induktion des Homing-Rezeptors CXCR3, der die Zellen zu den Orten der Th1-Zelle vermittelten Entzündung leitet [179]. Es wird spekuliert, dass Treg-Zellen so abhängig von der Art der Infektion spezifisch die Entzündungsantwort hemmen können.

Von den beschriebenen T-bet<sup>+</sup> Treg-Zellen exprimieren nach Restimulation mit PMA/Ionomycin 13% IFN- $\gamma$ . Auch Oldenhove *et al.* zeigten, dass nach einer Infektion von Mäusen mit *T. Gondii*, die eine sehr starke Th1-Zell-Antwort hervorruft, Treg-Zellen T-bet hochregulieren und IFN- $\gamma$  produzieren [180]. Es scheint also, dass Treg-Zellen unter bestimmten Bedingungen *in vivo* Effektor-Zell-Funktionen annehmen und ihren regulatorischen Phänotyp verlieren können.

Dies gilt nicht nur für Th1-Zell-Antworten, da in dieser Arbeit übereinstimmend mit Voo *et al.* eine kleine Population (ca. 0,3% der CD4<sup>+</sup> Zellen) von FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen in peripherem Blut gefunden wurde, die IL-17 produziert. In isolierten Th-Zellen aus Mandeln war diese Population sogar noch 7-fach größer [181].

Der anerge, suppressive Treg-Zell Phänotyp ist also nicht statisch sondern kann sich je nach Stärke, Art und Ort der Infektion verändern und zum Erlangen von Effektor-Funktionen führen.

Um zu untersuchen, ob es sich bei den Zytokin-produzierenden Treg-Zellen um nTreg- oder in der peripherie induzierte iTreg-Zellen handelt, könnte man zusätzlich die Expression des Transkriptionsfaktors Helios ermitteln. Eine sehr aktuelle Arbeit von Thornten *et al.* zeigt, dass Helios sich zur Unterscheidung dieser zwei Treg-Arten eignet. So exprimieren 100% der Treg-Zellen im Thymus Helios, während es in der Peripherie nur noch 70% sind. Auch *in vitro* induzierte Treg-Zellen oder FOXP3 transduzierte Zellen exprimieren kein Helios. Somit ist es wahrscheinlich, dass die Helios-Expression als Marker für nTreg-Zellen dienen könnte [182]. Die Helios<sup>-</sup> Treg-Zellen sind zugleich angereichert für Zytokin-produzierende FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen, was darauf schließen lässt, dass es sich bei den in dieser Arbeit beschriebenen IL-2<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen möglicherweise um in der Peripherie induzierte iTregs handeln könnte.

Mit Hilfe des stimulationsabhängig exprimierten Oberflächenmoleküls CD40L (CD154) sollte untersucht werden, ob sich die Aktivierbarkeit der beiden FOXP3<sup>+</sup> Populationen unterscheidet. Da CD40L NFATc2-abhängig reguliert wird [183], stellt sich die Frage, ob nur die IL-2<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen, die große Mengen NFATc2 exprimieren, CD40L hochregulieren und damit voll stimuliert werden. Hier zeigte sich, dass die IL-2<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen alle CD40L exprimieren. Aber auch von den IL-2<sup>-</sup>FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen regulieren ca. 50% der Zellen nach Stimulation CD40L herauf (siehe 3.1.3.3). Diese Zellen scheinen demnach zwar genug NFATc2 für die CD40L aber nicht für die IL-2-Produktion zu exprimieren. Das könnte

daran liegen, dass die CD40L-Expression im Gegensatz zur IL-2-Expression nicht abhängig von der kooperativen NFAT/AP-1 Bindung am Promotor ist [184]. Bei kooperativen Bindungen sind die Transkriptionsfaktor-Mengen ausschlaggebend für die Entscheidung, ob ein Gen exprimiert wird. Die Transkriptionsfaktor-Mengen bei nicht-kooperativen Bindungen führen eher zu graduellen Unterschieden in der Genexpression [162]. Das stimmt auch mit der Beobachtung überein, dass die IL-2<sup>-</sup>FOXP3<sup>+</sup>CD40L<sup>+</sup> Th-Zellen, die wenig NFATc2 exprimieren, geringere Mengen CD40L exprimieren als IL-2<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Zellen.

Zusammenfassend könnte es sich bei den hier beschriebenen IL-2<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen um in der Peripherie induzierte iTreg-Zellen handeln, die durch die *in vivo* Bedingungen so geprägt sind, dass sie nach Restimulation IFN- $\gamma$  bzw. IL-2 produzieren.

## 5 Ausblick

Zur Fortsetzung der Arbeiten soll die Relevanz der Transkriptionsfaktor-Mengen und -Verhältnisse für die Alles-oder-nichts-Entscheidung bei der Zytokin-Produktion in Th-Zellen weitergehend untersucht werden. Dazu sollen die folgenden Hauptfragen bearbeitet werden:

### IL-2-Produktion in Gedächtnis-Th-Zellen

1. Tragen alle potentiellen Schaltermechanismen im gleichen Maße zur binären IL-2-Produktion bei?
2. Unter welchen Stimulationsbedingungen bewirkt die binäre ERK-Aktivierung eine binäre c-fos-Expression?
3. Ist eine Subpopulation von Gedächtnis-Th-Zellen, die wenig c-fos aufweist und kein IL-2 produziert, durch Oberflächenmarker charakterisierbar und dadurch sortierbar?
4. Wie tragen die Transkriptionsfaktoren zur binären IFN- $\gamma$ -Expression bei?
5. Welche Transkriptionsfaktoren sind für die IL-17-Expression limitierend? Wird auch IL-17 binär exprimiert?
6. Welche Expressions- und Aktivierungsprofile der Transkriptionsfaktoren weisen Gedächtnis Th-Zellen von SLE-Patienten auf, die durch eine verminderte IL-2-Produktion gekennzeichnet sind?
7. Sind die gefundenen molekularen Schalter für potenzielle therapeutische Anwendungen manipulierbar?

### IL-2-Produktion in Treg-Zellen

1. Lässt sich die IL-2-Produktion in allen Treg-Zellen durch Manipulation der Transkriptionsfaktor-Mengen und -Verhältnisse induzieren?
2. Wird auch die Expression von c-fos, c-jun und NF- $\kappa$ B direkt durch FOXP3 gehemmt?
3. Inwiefern tragen epigenetische Faktoren zu der verminderten Zytokinproduktion in Treg-Zellen bei?
4. Wie verhält sich die Expression des Transkriptionsfaktors Ikaros, der zur hypoacetylierung des *IL-2*-Promotors und damit zum Abschalten der IL-2-Produktion beiträgt, in IL-2<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> und IL-2<sup>-</sup>FOXP3<sup>+</sup> Th-Zellen?
5. Welche äußeren Einflüsse tragen zur Entstehung Zytokin-produzierender Treg-Zellen bei?



## 6 Literaturverzeichnis

- 1 **Carter, L. L., Zhang, X., Dubey, C., Rogers, P., Tsui, L. and Swain, S. L.**, Regulation of T cell subsets from naive to memory. *J Immunother* 1998. **21**: 181-187.
- 2 **Mosmann, T. R. and Coffman, R. L.**, TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989. **7**: 145-173.
- 3 **Clement, L. T., Yamashita, N. and Martin, A. M.**, The functionally distinct subpopulations of human CD4+ helper/inducer T lymphocytes defined by anti-CD45R antibodies derive sequentially from a differentiation pathway that is regulated by activation-dependent post-thymic differentiation. *J Immunol* 1988. **141**: 1464-1470.
- 4 **Clement, L. T.**, Isoforms of the CD45 common leukocyte antigen family: markers for human T-cell differentiation. *J Clin Immunol* 1992. **12**: 1-10.
- 5 **Beverley, P. C.**, Functional analysis of human T cell subsets defined by CD45 isoform expression. *Semin Immunol* 1992. **4**: 35-41.
- 6 **Altin, J. G. and Sloan, E. K.**, The role of CD45 and CD45-associated molecules in T cell activation. *Immunol Cell Biol* 1997. **75**: 430-445.
- 7 **Depper, J. M., Leonard, W. J., Robb, R. J., Waldmann, T. A. and Greene, W. C.**, Blockade of the interleukin-2 receptor by anti-Tac antibody: inhibition of human lymphocyte activation. *J Immunol* 1983. **131**: 690-696.
- 8 **Fehervari, Z., Yamaguchi, T. and Sakaguchi, S.**, The dichotomous role of IL-2: tolerance versus immunity. *Trends Immunol* 2006. **27**: 109-111.
- 9 **Goronzy, J. J. and Weyand, C. M.**, T-cell co-stimulatory pathways in autoimmunity. *Arthritis Res Ther* 2008. **10 Suppl 1**: S3.
- 10 **Zhu, J., Yamane, H. and Paul, W. E.**, Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations. *Annu Rev Immunol*.
- 11 **Boyton, R. J. and Altmann, D. M.**, Is selection for TCR affinity a factor in cytokine polarization? *Trends Immunol* 2002. **23**: 526-529.
- 12 **Sadick, M. D., Heinzel, F. P., Shigekane, V. M., Fisher, W. L. and Locksley, R. M.**, Cellular and humoral immunity to *Leishmania major* in genetically susceptible mice after in vivo depletion of L3T4+ T cells. *J Immunol* 1987. **139**: 1303-1309.
- 13 **Scott, P., Natovitz, P., Coffman, R. L., Pearce, E. and Sher, A.**, Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. *J Exp Med* 1988. **168**: 1675-1684.
- 14 **Mastroeni, P., Clare, S., Khan, S., Harrison, J. A., Hormaeche, C. E., Okamura, H., Kurimoto, M. and Dougan, G.**, Interleukin 18 contributes to host resistance and gamma interferon production in mice infected with virulent *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* 1999. **67**: 478-483.
- 15 **Tanaka-Kataoka, M., Kunikata, T., Takayama, S., Iwaki, K., Ohashi, K., Ikeda, M. and Kurimoto, M.**, In vivo antiviral effect of interleukin 18 in a mouse model of vaccinia virus infection. *Cytokine* 1999. **11**: 593-599.
- 16 **Thierfelder, W. E., van Deursen, J. M., Yamamoto, K., Tripp, R. A., Sarawar, S. R., Carson, R. T., Sangster, M. Y., Vignali, D. A., Doherty, P. C., Grosveld, G. C. and Ihle, J. N.**, Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells. *Nature* 1996. **382**: 171-174.
- 17 **Frucht, D. M., Aringer, M., Galon, J., Danning, C., Brown, M., Fan, S., Centola, M., Wu, C. Y., Yamada, N., El Gabalawy, H. and O'Shea, J. J.**, Stat4 is expressed in activated peripheral blood monocytes, dendritic cells, and macrophages at sites of Th1-mediated inflammation. *J Immunol* 2000. **164**: 4659-4664.
- 18 **Usui, T., Nishikomori, R., Kitani, A. and Strober, W.**, GATA-3 suppresses Th1 development by downregulation of Stat4 and not through effects on IL-12Rbeta2 chain or T-bet. *Immunity* 2003. **18**: 415-428.

- 19 **Szabo, S. J., Kim, S. T., Costa, G. L., Zhang, X., Fathman, C. G. and Glimcher, L. H.**, A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 2000. **100**: 655-669.
- 20 **Finkelman, F. D., Pearce, E. J., Urban, J. F., Jr. and Sher, A.**, Regulation and biological function of helminth-induced cytokine responses. *Immunol Today* 1991. **12**: A62-66.
- 21 **Robinson, D. S., Hamid, Q., Ying, S., Tsicopoulos, A., Barkans, J., Bentley, A. M., Corrigan, C., Durham, S. R. and Kay, A. B.**, Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med* 1992. **326**: 298-304.
- 22 **Le Gros, G., Ben-Sasson, S. Z., Seder, R., Finkelman, F. D. and Paul, W. E.**, Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells. *J Exp Med* 1990. **172**: 921-929.
- 23 **Zhu, J., Yamane, H., Cote-Sierra, J., Guo, L. and Paul, W. E.**, GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanisms: induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors. *Cell Res* 2006. **16**: 3-10.
- 24 **Kolls, J. K. and Linden, A.**, Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* 2004. **21**: 467-476.
- 25 **Liang, S. C., Tan, X. Y., Luxenberg, D. P., Karim, R., Dunussi-Joannopoulos, K., Collins, M. and Fouser, L. A.**, Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med* 2006. **203**: 2271-2279.
- 26 **Ye, P., Rodriguez, F. H., Kanaly, S., Stocking, K. L., Schurr, J., Schwarzenberger, P., Oliver, P., Huang, W., Zhang, P., Zhang, J., Shellito, J. E., Bagby, G. J., Nelson, S., Charrier, K., Peschon, J. J. and Kolls, J. K.**, Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J Exp Med* 2001. **194**: 519-527.
- 27 **Park, H., Li, Z., Yang, X. O., Chang, S. H., Nurieva, R., Wang, Y. H., Wang, Y., Hood, L., Zhu, Z., Tian, Q. and Dong, C.**, A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 2005. **6**: 1133-1141.
- 28 **Hofstetter, H. H., Ibrahim, S. M., Koczan, D., Kruse, N., Weishaupt, A., Toyka, K. V. and Gold, R.**, Therapeutic efficacy of IL-17 neutralization in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cell Immunol* 2005. **237**: 123-130.
- 29 **Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T. B., Oukka, M., Weiner, H. L. and Kuchroo, V. K.**, Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 2006. **441**: 235-238.
- 30 **Ivanov, I., McKenzie, B. S., Zhou, L., Tadokoro, C. E., Lepelletier, A., Lafaille, J. J., Cua, D. J. and Littman, D. R.**, The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$  directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 2006. **126**: 1121-1133.
- 31 **Yang, X. O., Pappu, B. P., Nurieva, R., Akimzhanov, A., Kang, H. S., Chung, Y., Ma, L., Shah, B., Panopoulos, A. D., Schluns, K. S., Watowich, S. S., Tian, Q., Jetten, A. M. and Dong, C.**, T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR $\alpha$  and ROR $\gamma$ . *Immunity* 2008. **28**: 29-39.
- 32 **Wing, K. and Sakaguchi, S.**, Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nat Immunol*. **11**: 7-13.
- 33 **Sakaguchi, S.**, Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2004. **22**: 531-562.
- 34 **Bluestone, J. A. and Abbas, A. K.**, Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 2003. **3**: 253-257.
- 35 **Fritzsching, B., Oberle, N., Pauly, E., Geffers, R., Buer, J., Poschl, J., Krammer, P., Linderkamp, O. and Suri-Payer, E.**, Naive regulatory T cells: a novel subpopulation defined by resistance toward CD95L-mediated cell death. *Blood* 2006. **108**: 3371-3378.

- 36 **Hoffmann, P., Eder, R., Boeld, T. J., Doser, K., Piseshka, B., Andreesen, R. and Edinger, M.**, Only the CD45RA+ subpopulation of CD4+CD25high T cells gives rise to homogeneous regulatory T-cell lines upon in vitro expansion. *Blood* 2006. **108**: 4260-4267.
- 37 **Williams, L. M. and Rudensky, A. Y.**, Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3. *Nat Immunol* 2007. **8**: 277-284.
- 38 **Bennett, C. L., Christie, J., Ramsdell, F., Brunkow, M. E., Ferguson, P. J., Whitesell, L., Kelly, T. E., Saulsbury, F. T., Chance, P. F. and Ochs, H. D.**, The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 2001. **27**: 20-21.
- 39 **Shevach, E. M.**, Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity* 2009. **30**: 636-645.
- 40 **Pandiyan, P., Zheng, L., Ishihara, S., Reed, J. and Lenardo, M. J.**, CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat Immunol* 2007. **8**: 1353-1362.
- 41 **Takeuchi, T., Tsuzaka, K., Kameda, H. and Amano, K.**, Therapeutic targets of misguided T cells in systemic lupus erythematosus. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2005. **4**: 295-298.
- 42 **Downward, J.**, Signal transduction. Prelude to an anniversary for the RAS oncogene. *Science* 2006. **314**: 433-434.
- 43 **Galeazzi, M., Bellisai, F., Manganelli, S., Morozzi, G. and Sebastiani, G. D.**, Cyclosporine A for the treatment of autoimmune disorders in HCV infected patients. *Autoimmun Rev* 2006. **5**: 493-498.
- 44 **Brandt, C., Pavlovic, V., Radbruch, A., Worm, M. and Baumgrass, R.**, Low-dose cyclosporine A therapy increases the regulatory T cell population in patients with atopic dermatitis. *Allergy* 2009. **64**: 1588-1596.
- 45 **Rudolph, M. G., Stanfield, R. L. and Wilson, I. A.**, How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. *Annu Rev Immunol* 2006. **24**: 419-466.
- 46 **Iwashima, M., Irving, B. A., van Oers, N. S., Chan, A. C. and Weiss, A.**, Sequential interactions of the TCR with two distinct cytoplasmic tyrosine kinases. *Science* 1994. **263**: 1136-1139.
- 47 **Zhang, W., Sloan-Lancaster, J., Kitchen, J., Triple, R. P. and Samelson, L. E.**, LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation. *Cell* 1998. **92**: 83-92.
- 48 **Buday, L. and Downward, J.**, Epidermal growth factor regulates the exchange rate of guanine nucleotides on p21ras in fibroblasts. *Mol Cell Biol* 1993. **13**: 1903-1910.
- 49 **Koretzky, G. A., Abtahian, F. and Silverman, M. A.**, SLP76 and SLP65: complex regulation of signalling in lymphocytes and beyond. *Nat Rev Immunol* 2006. **6**: 67-78.
- 50 **Smith-Garvin, J. E., Koretzky, G. A. and Jordan, M. S.**, T cell activation. *Annu Rev Immunol* 2009. **27**: 591-619.
- 51 **Choi, J. H., Ryu, S. H. and Suh, P. G.**, On/off-regulation of phospholipase C-gamma 1-mediated signal transduction. *Adv Enzyme Regul* 2007. **47**: 104-116.
- 52 **Genot, E. and Cantrell, D. A.**, Ras regulation and function in lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 2000. **12**: 289-294.
- 53 **Schulze-Luehrmann, J. and Ghosh, S.**, Antigen-receptor signaling to nuclear factor kappa B. *Immunity* 2006. **25**: 701-715.
- 54 **Ghaffari-Tabrizi, N., Bauer, B., Villunger, A., Baier-Bitterlich, G., Altman, A., Utermann, G., Uberall, F. and Baier, G.**, Protein kinase Ctheta, a selective upstream regulator of JNK/SAPK and IL-2 promoter activation in Jurkat T cells. *Eur J Immunol* 1999. **29**: 132-142.
- 55 **Melowic, H. R., Stahelin, R. V., Blatner, N. R., Tian, W., Hayashi, K., Altman, A. and Cho, W.**, Mechanism of diacylglycerol-induced membrane targeting and activation of protein kinase Ctheta. *J Biol Chem* 2007. **282**: 21467-21476.
- 56 **Oh-hora, M. and Rao, A.**, Calcium signaling in lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 2008. **20**: 250-258.

- 57 **Serfling, E., Berberich-Siebelt, F., Chuvpilo, S., Jankevics, E., Klein-Hessling, S., Twardzik, T. and Avots, A.**, The role of NF-AT transcription factors in T cell activation and differentiation. *Biochim Biophys Acta* 2000. **1498**: 1-18.
- 58 **Acuto, O. and Michel, F.**, CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. *Nat Rev Immunol* 2003. **3**: 939-951.
- 59 **Kane, L. P., Andres, P. G., Howland, K. C., Abbas, A. K. and Weiss, A.**, Akt provides the CD28 costimulatory signal for up-regulation of IL-2 and IFN-gamma but not TH2 cytokines. *Nat Immunol* 2001. **2**: 37-44.
- 60 **Beals, C. R., Sheridan, C. M., Turck, C. W., Gardner, P. and Crabtree, G. R.**, Nuclear export of NF-ATc enhanced by glycogen synthase kinase-3. *Science* 1997. **275**: 1930-1934.
- 61 **Oh-hora, M.**, Calcium signaling in the development and function of T-lineage cells. *Immunol Rev* 2009. **231**: 210-224.
- 62 **Li, Y., Sedwick, C. E., Hu, J. and Altman, A.**, Role for protein kinase C $\theta$  (PKC $\theta$ ) in TCR/CD28-mediated signaling through the canonical but not the non-canonical pathway for NF- $\kappa$ B activation. *J Biol Chem* 2005. **280**: 1217-1223.
- 63 **Shaw, J. P., Utz, P. J., Durand, D. B., Toole, J. J., Emmel, E. A. and Crabtree, G. R.**, Identification of a putative regulator of early T cell activation genes. *Science* 1988. **241**: 202-205.
- 64 **Okamura, H., Aramburu, J., Garcia-Rodriguez, C., Viola, J. P., Raghavan, A., Tahiliani, M., Zhang, X., Qin, J., Hogan, P. G. and Rao, A.**, Concerted dephosphorylation of the transcription factor NFAT1 induces a conformational switch that regulates transcriptional activity. *Mol Cell* 2000. **6**: 539-550.
- 65 **Macian, F., Lopez-Rodriguez, C. and Rao, A.**, Partners in transcription: NFAT and AP-1. *Oncogene* 2001. **20**: 2476-2489.
- 66 **Graef, I. A., Chen, F. and Crabtree, G. R.**, NFAT signaling in vertebrate development. *Curr Opin Genet Dev* 2001. **11**: 505-512.
- 67 **Imamura, R., Masuda, E. S., Naito, Y., Imai, S., Fujino, T., Takano, T., Arai, K. and Arai, N.**, Carboxyl-terminal 15-amino acid sequence of NFATx1 is possibly created by tissue-specific splicing and is essential for transactivation activity in T cells. *J Immunol* 1998. **161**: 3455-3463.
- 68 **Xu, L. and Massague, J.**, Nucleocytoplasmic shuttling of signal transducers. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004. **5**: 209-219.
- 69 **Beals, C. R., Clipstone, N. A., Ho, S. N. and Crabtree, G. R.**, Nuclear localization of NF-ATc by a calcineurin-dependent, cyclosporin-sensitive intramolecular interaction. *Genes Dev* 1997. **11**: 824-834.
- 70 **Sheridan, C. M., Heist, E. K., Beals, C. R., Crabtree, G. R. and Gardner, P.**, Protein kinase A negatively modulates the nuclear accumulation of NF-ATc1 by priming for subsequent phosphorylation by glycogen synthase kinase-3. *J Biol Chem* 2002. **277**: 48664-48676.
- 71 **Kiani, A., Rao, A. and Aramburu, J.**, Manipulating immune responses with immunosuppressive agents that target NFAT. *Immunity* 2000. **12**: 359-372.
- 72 **Loh, C., Shaw, K. T., Carew, J., Viola, J. P., Luo, C., Perrino, B. A. and Rao, A.**, Calcineurin binds the transcription factor NFAT1 and reversibly regulates its activity. *J Biol Chem* 1996. **271**: 10884-10891.
- 73 **Lyakh, L., Ghosh, P. and Rice, N. R.**, Expression of NFAT-family proteins in normal human T cells. *Mol Cell Biol* 1997. **17**: 2475-2484.
- 74 **Chuvpilo, S., Jankevics, E., Tyrstin, D., Akimzhanov, A., Moroz, D., Jha, M. K., Schulze-Luehrmann, J., Santner-Nanan, B., Feoktistova, E., Konig, T., Avots, A., Schmitt, E., Berberich-Siebelt, F., Schimpl, A. and Serfling, E.**, Autoregulation of NFATc1/A expression facilitates effector T cells to escape from rapid apoptosis. *Immunity* 2002. **16**: 881-895.
- 75 **Chuvpilo, S., Avots, A., Berberich-Siebelt, F., Glockner, J., Fischer, C., Kerstan, A., Escher, C., Inashkina, I., Hlubek, F., Jankevics, E., Brabletz, T. and Serfling, E.**, Multiple NF-ATc isoforms with individual transcriptional properties are synthesized in T lymphocytes. *J Immunol* 1999. **162**: 7294-7301.

- 76 **Macian, F., Garcia-Rodriguez, C. and Rao, A.**, Gene expression elicited by NFAT in the presence or absence of cooperative recruitment of Fos and Jun. *Embo J* 2000. **19**: 4783-4795.
- 77 **Cockerill, P. N., Bert, A. G., Jenkins, F., Ryan, G. R., Shannon, M. F. and Vadas, M. A.**, Human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhancer function is associated with cooperative interactions between AP-1 and NFATp/c. *Mol Cell Biol* 1995. **15**: 2071-2079.
- 78 **Burke, T. F., Casolaro, V. and Georas, S. N.**, Characterization of P5, a novel NFAT/AP-1 site in the human IL-4 promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 2000. **270**: 1016-1023.
- 79 **Rao, A., Luo, C. and Hogan, P. G.**, Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol* 1997. **15**: 707-747.
- 80 **Villalba, M., Kasibhatla, S., Genestier, L., Mahboubi, A., Green, D. R. and Altman, A.**, Protein kinase ctheta cooperates with calcineurin to induce Fas ligand expression during activation-induced T cell death. *J Immunol* 1999. **163**: 5813-5819.
- 81 **Schuh, K., Twardzik, T., Kneitz, B., Heyer, J., Schimpl, A. and Serfling, E.**, The interleukin 2 receptor alpha chain/CD25 promoter is a target for nuclear factor of activated T cells. *J Exp Med* 1998. **188**: 1369-1373.
- 82 **Wu, Y., Borde, M., Heissmeyer, V., Feuerer, M., Lapan, A. D., Stroud, J. C., Bates, D. L., Guo, L., Han, A., Ziegler, S. F., Mathis, D., Benoist, C., Chen, L. and Rao, A.**, FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell* 2006. **126**: 375-387.
- 83 **Xanthoudakis, S., Viola, J. P., Shaw, K. T., Luo, C., Wallace, J. D., Bozza, P. T., Luk, D. C., Curran, T. and Rao, A.**, An enhanced immune response in mice lacking the transcription factor NFAT1. *Science* 1996. **272**: 892-895.
- 84 **Schuh, K., Kneitz, B., Heyer, J., Bommhardt, U., Jankevics, E., Berberich-Siebelt, F., Pfeffer, K., Muller-Hermelink, H. K., Schimpl, A. and Serfling, E.**, Retarded thymic involution and massive germinal center formation in NF-ATp-deficient mice. *Eur J Immunol* 1998. **28**: 2456-2466.
- 85 **Kiani, A., Garcia-Cozar, F. J., Habermann, I., Laforsch, S., Aebischer, T., Ehninger, G. and Rao, A.**, Regulation of interferon-gamma gene expression by nuclear factor of activated T cells. *Blood* 2001. **98**: 1480-1488.
- 86 **Yoshida, H., Nishina, H., Takimoto, H., Marengere, L. E., Wakeham, A. C., Bouchard, D., Kong, Y. Y., Ohteki, T., Shahinian, A., Bachmann, M., Ohashi, P. S., Penninger, J. M., Crabtree, G. R. and Mak, T. W.**, The transcription factor NF-ATc1 regulates lymphocyte proliferation and Th2 cytokine production. *Immunity* 1998. **8**: 115-124.
- 87 **Ranger, A. M., Hodge, M. R., Gravallese, E. M., Oukka, M., Davidson, L., Alt, F. W., de la Brousse, F. C., Hoey, T., Grusby, M. and Glimcher, L. H.**, Delayed lymphoid repopulation with defects in IL-4-driven responses produced by inactivation of NF-ATc. *Immunity* 1998. **8**: 125-134.
- 88 **Oukka, M., Ho, I. C., de la Brousse, F. C., Hoey, T., Grusby, M. J. and Glimcher, L. H.**, The transcription factor NFAT4 is involved in the generation and survival of T cells. *Immunity* 1998. **9**: 295-304.
- 89 **Rengarajan, J., Tang, B. and Glimcher, L. H.**, NFATc2 and NFATc3 regulate T(H)2 differentiation and modulate TCR-responsiveness of naive T(H)cells. *Nat Immunol* 2002. **3**: 48-54.
- 90 **Go, W. Y., Liu, X., Roti, M. A., Liu, F. and Ho, S. N.**, NFAT5/TonEBP mutant mice define osmotic stress as a critical feature of the lymphoid microenvironment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004. **101**: 10673-10678.
- 91 **Ranger, A. M., Oukka, M., Rengarajan, J. and Glimcher, L. H.**, Inhibitory function of two NFAT family members in lymphoid homeostasis and Th2 development. *Immunity* 1998. **9**: 627-635.
- 92 **Peng, S. L., Gerth, A. J., Ranger, A. M. and Glimcher, L. H.**, NFATc1 and NFATc2 together control both T and B cell activation and differentiation. *Immunity* 2001. **14**: 13-20.

- 93 **Soto-Nieves, N., Puga, I., Abe, B. T., Bandyopadhyay, S., Baine, I., Rao, A. and Macian, F.**, Transcriptional complexes formed by NFAT dimers regulate the induction of T cell tolerance. *J Exp Med* 2009. **206**: 867-876.
- 94 **Jin, L., Sliz, P., Chen, L., Macian, F., Rao, A., Hogan, P. G. and Harrison, S. C.**, An asymmetric NFAT1 dimer on a pseudo-palindromic kappa B-like DNA site. *Nat Struct Biol* 2003. **10**: 807-811.
- 95 **Tonshoff, B. and Hocker, B.**, Treatment strategies in pediatric solid organ transplant recipients with calcineurin inhibitor-induced nephrotoxicity. *Pediatr Transplant* 2006. **10**: 721-729.
- 96 **Chen, L., Glover, J. N., Hogan, P. G., Rao, A. and Harrison, S. C.**, Structure of the DNA-binding domains from NFAT, Fos and Jun bound specifically to DNA. *Nature* 1998. **392**: 42-48.
- 97 **Hess, J., Angel, P. and Schorpp-Kistner, M.**, AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *J Cell Sci* 2004. **117**: 5965-5973.
- 98 **Jain, J., Loh, C. and Rao, A.**, Transcriptional regulation of the IL-2 gene. *Curr Opin Immunol* 1995. **7**: 333-342.
- 99 **Nel, A. E., Taylor, L. K., Kumar, G. P., Gupta, S., Wang, S. C., Williams, K., Liao, O., Swanson, K. and Landreth, G. E.**, Activation of a novel serine/threonine kinase that phosphorylates c-fos upon stimulation of T and B lymphocytes via antigen and cytokine receptors. *J Immunol* 1994. **152**: 4347-4357.
- 100 **Su, B., Jacinto, E., Hibi, M., Kallunki, T., Karin, M. and Ben-Neriah, Y.**, JNK is involved in signal integration during costimulation of T lymphocytes. *Cell* 1994. **77**: 727-736.
- 101 **Rincon, M. and Flavell, R. A.**, AP-1 transcriptional activity requires both T-cell receptor-mediated and co-stimulatory signals in primary T lymphocytes. *Embo J* 1994. **13**: 4370-4381.
- 102 **Ghosh, S., May, M. J. and Kopp, E. B.**, NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 1998. **16**: 225-260.
- 103 **Karin, M. and Ben-Neriah, Y.**, Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol* 2000. **18**: 621-663.
- 104 **Lai, J. H., Horvath, G., Subleski, J., Bruder, J., Ghosh, P. and Tan, T. H.**, RelA is a potent transcriptional activator of the CD28 response element within the interleukin 2 promoter. *Mol Cell Biol* 1995. **15**: 4260-4271.
- 105 **Venkataraman, L., Burakoff, S. J. and Sen, R.**, FK506 inhibits antigen receptor-mediated induction of c-rel in B and T lymphoid cells. *J Exp Med* 1995. **181**: 1091-1099.
- 106 **Bertrand, M. J. and Vandenabeele, P.**, RIP1's function in NF-kappaB activation: from master actor to onlooker. *Cell Death Differ.* **17**: 379-380.
- 107 **Yui, M. A., Sharp, L. L., Havran, W. L. and Rothenberg, E. V.**, Preferential activation of an IL-2 regulatory sequence transgene in TCR gamma delta and NKT cells: subset-specific differences in IL-2 regulation. *J Immunol* 2004. **172**: 4691-4699.
- 108 **Granucci, F., Vizzardelli, C., Pavelka, N., Feau, S., Persico, M., Virzi, E., Rescigno, M., Moro, G. and Ricciardi-Castagnoli, P.**, Inducible IL-2 production by dendritic cells revealed by global gene expression analysis. *Nat Immunol* 2001. **2**: 882-888.
- 109 **Jiang, S., Game, D. S., Davies, D., Lombardi, G. and Lechler, R. I.**, Activated CD1d-restricted natural killer T cells secrete IL-2: innate help for CD4+CD25+ regulatory T cells? *Eur J Immunol* 2005. **35**: 1193-1200.
- 110 **Kim, H. P., Imbert, J. and Leonard, W. J.**, Both integrated and differential regulation of components of the IL-2/IL-2 receptor system. *Cytokine Growth Factor Rev* 2006. **17**: 349-366.
- 111 **Morgan, D. A., Ruscetti, F. W. and Gallo, R.**, Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science* 1976. **193**: 1007-1008.
- 112 **Willerford, D. M., Chen, J., Ferry, J. A., Davidson, L., Ma, A. and Alt, F. W.**, Interleukin-2 receptor alpha chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment. *Immunity* 1995. **3**: 521-530.

- 113 **Sadlack, B., Merz, H., Schorle, H., Schimpl, A., Feller, A. C. and Horak, I.**, Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. *Cell* 1993. **75**: 253-261.
- 114 **Suzuki, H., Kundig, T. M., Furlonger, C., Wakeham, A., Timms, E., Matsuyama, T., Schmits, R., Simard, J. J., Ohashi, P. S., Griesser, H. and et al.**, Deregulated T cell activation and autoimmunity in mice lacking interleukin-2 receptor beta. *Science* 1995. **268**: 1472-1476.
- 115 **Almeida, A. R., Legrand, N., Papiernik, M. and Freitas, A. A.**, Homeostasis of peripheral CD4+ T cells: IL-2R alpha and IL-2 shape a population of regulatory cells that controls CD4+ T cell numbers. *J Immunol* 2002. **169**: 4850-4860.
- 116 **Malek, T. R., Yu, A., Vincek, V., Scibelli, P. and Kong, L.**, CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2Rbeta-deficient mice. Implications for the nonredundant function of IL-2. *Immunity* 2002. **17**: 167-178.
- 117 **Laurence, A., Tato, C. M., Davidson, T. S., Kanno, Y., Chen, Z., Yao, Z., Blank, R. B., Meylan, F., Siegel, R., Hennighausen, L., Shevach, E. M. and O'Shea J, J.**, Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity* 2007. **26**: 371-381.
- 118 **Dooms, H., Kahn, E., Knoechel, B. and Abbas, A. K.**, IL-2 induces a competitive survival advantage in T lymphocytes. *J Immunol* 2004. **172**: 5973-5979.
- 119 **Dooms, H., Wolslegel, K., Lin, P. and Abbas, A. K.**, Interleukin-2 enhances CD4+ T cell memory by promoting the generation of IL-7R alpha-expressing cells. *J Exp Med* 2007. **204**: 547-557.
- 120 **Liao, W., Schones, D. E., Oh, J., Cui, Y., Cui, K., Roh, T. Y., Zhao, K. and Leonard, W. J.**, Priming for T helper type 2 differentiation by interleukin 2-mediated induction of interleukin 4 receptor alpha-chain expression. *Nat Immunol* 2008. **9**: 1288-1296.
- 121 **Cho, J. H., Boyman, O., Kim, H. O., Hahm, B., Rubinstein, M. P., Ramsey, C., Kim, D. M., Surh, C. D. and Sprent, J.**, An intense form of homeostatic proliferation of naive CD8+ cells driven by IL-2. *J Exp Med* 2007. **204**: 1787-1801.
- 122 **Shaw, J., Meerovitch, K., Bleackley, R. C. and Paetkau, V.**, Mechanisms regulating the level of IL-2 mRNA in T lymphocytes. *J Immunol* 1988. **140**: 2243-2248.
- 123 **Durand, D. B., Shaw, J. P., Bush, M. R., Replogle, R. E., Belagaje, R. and Crabtree, G. R.**, Characterization of antigen receptor response elements within the interleukin-2 enhancer. *Mol Cell Biol* 1988. **8**: 1715-1724.
- 124 **Jain, J., McCaffrey, P. G., Miner, Z., Kerppola, T. K., Lambert, J. N., Verdine, G. L., Curran, T. and Rao, A.**, The T-cell transcription factor NFATp is a substrate for calcineurin and interacts with Fos and Jun. *Nature* 1993. **365**: 352-355.
- 125 **Ullman, K. S., Flanagan, W. M., Edwards, C. A. and Crabtree, G. R.**, Activation of early gene expression in T lymphocytes by Oct-1 and an inducible protein, OAP40. *Science* 1991. **254**: 558-562.
- 126 **Rooney, J. W., Sun, Y. L., Glimcher, L. H. and Hoey, T.**, Novel NFAT sites that mediate activation of the interleukin-2 promoter in response to T-cell receptor stimulation. *Mol Cell Biol* 1995. **15**: 6299-6310.
- 127 **Ghosh, P., Tan, T. H., Rice, N. R., Sica, A. and Young, H. A.**, The interleukin 2 CD28-responsive complex contains at least three members of the NF kappa B family: c-Rel, p50, and p65. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993. **90**: 1696-1700.
- 128 **Bryan, R. G., Li, Y., Lai, J. H., Van, M., Rice, N. R., Rich, R. R. and Tan, T. H.**, Effect of CD28 signal transduction on c-Rel in human peripheral blood T cells. *Mol Cell Biol* 1994. **14**: 7933-7942.
- 129 **Garrity, P. A., Chen, D., Rothenberg, E. V. and Wold, B. J.**, Interleukin-2 transcription is regulated in vivo at the level of coordinated binding of both constitutive and regulated factors. *Mol Cell Biol* 1994. **14**: 2159-2169.
- 130 **Bruniquel, D. and Schwartz, R. H.**, Selective, stable demethylation of the interleukin-2 gene enhances transcription by an active process. *Nat Immunol* 2003. **4**: 235-240.

- 131 **Podtschaske, M., Benary, U., Zwinger, S., Hofer, T., Radbruch, A. and Baumgrass, R.**, Digital NFATc2 activation per cell transforms graded T cell receptor activation into an all-or-none IL-2 expression. *PLoS One* 2007. **2**: e935.
- 132 **Altan-Bonnet, G. and Germain, R. N.**, Modeling T cell antigen discrimination based on feedback control of digital ERK responses. *PLoS Biol* 2005. **3**: e356.
- 133 **Das, J., Ho, M., Zikherman, J., Govern, C., Yang, M., Weiss, A., Chakraborty, A. K. and Roose, J. P.**, Digital signaling and hysteresis characterize ras activation in lymphoid cells. *Cell* 2009. **136**: 337-351.
- 134 **Segal, E., Raveh-Sadka, T., Schroeder, M., Unnerstall, U. and Gaul, U.**, Predicting expression patterns from regulatory sequence in *Drosophila* segmentation. *Nature* 2008. **451**: 535-540.
- 135 **Fiering, S., Northrop, J. P., Nolan, G. P., Mattila, P. S., Crabtree, G. R. and Herzenberg, L. A.**, Single cell assay of a transcription factor reveals a threshold in transcription activated by signals emanating from the T-cell antigen receptor. *Genes Dev* 1990. **4**: 1823-1834.
- 136 **Murayama, A., Sakura, K., Nakama, M., Yasuzawa-Tanaka, K., Fujita, E., Tateishi, Y., Wang, Y., Ushijima, T., Baba, T., Shibuya, K., Shibuya, A., Kawabe, Y. and Yanagisawa, J.**, A specific CpG site demethylation in the human interleukin 2 gene promoter is an epigenetic memory. *Embo J* 2006. **25**: 1081-1092.
- 137 **Bandyopadhyay, S., Dure, M., Paroder, M., Soto-Nieves, N., Puga, I. and Macian, F.**, Interleukin 2 gene transcription is regulated by Ikaros-induced changes in histone acetylation in anergic T cells. *Blood* 2007. **109**: 2878-2886.
- 138 **Crispin, J. C. and Tsokos, G. C.**, Transcriptional regulation of IL-2 in health and autoimmunity. *Autoimmun Rev* 2009. **8**: 190-195.
- 139 **Ohkura, N. and Sakaguchi, S.**, Regulatory T cells: roles of T cell receptor for their development and function. *Semin Immunopathol*.
- 140 **Baecher-Allan, C., Brown, J. A., Freeman, G. J. and Hafler, D. A.**, CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol* 2001. **167**: 1245-1253.
- 141 **Takahashi, T., Kuniyasu, Y., Toda, M., Sakaguchi, N., Itoh, M., Iwata, M., Shimizu, J. and Sakaguchi, S.**, 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**: 1969-1980.
- 142 **Hickman, S. P., Yang, J., Thomas, R. M., Wells, A. D. and Turka, L. A.**, Defective activation of protein kinase C and Ras-ERK pathways limits IL-2 production and proliferation by CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 2006. **177**: 2186-2194.
- 143 **Gavin, M. A., Clarke, S. R., Negrou, E., Gallegos, A. and Rudensky, A.**, Homeostasis and anergy of CD4(+)CD25(+) suppressor T cells in vivo. *Nat Immunol* 2002. **3**: 33-41.
- 144 **Carson, B. D. and Ziegler, S. F.**, Impaired T cell receptor signaling in Foxp3+ CD4 T cells. *Ann N Y Acad Sci* 2007. **1103**: 167-178.
- 145 **Campbell, D. J. and Ziegler, S. F.**, FOXP3 modifies the phenotypic and functional properties of regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 2007. **7**: 305-310.
- 146 **Marson, A., Kretschmer, K., Frampton, G. M., Jacobsen, E. S., Polansky, J. K., MacIsaac, K. D., Levine, S. S., Fraenkel, E., von Boehmer, H. and Young, R. A.**, Foxp3 occupancy and regulation of key target genes during T-cell stimulation. *Nature* 2007. **445**: 931-935.
- 147 **Gibson, H. M., Hedgcock, C. J., Aufiero, B. M., Wilson, A. J., Hafner, M. S., Tsokos, G. C. and Wong, H. K.**, Induction of the CTLA-4 gene in human lymphocytes is dependent on NFAT binding the proximal promoter. *J Immunol* 2007. **179**: 3831-3840.
- 148 **Tone, Y., Furuuchi, K., Kojima, Y., Tykocinski, M. L., Greene, M. I. and Tone, M.**, Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer. *Nat Immunol* 2008. **9**: 194-202.
- 149 **Sumpter, T. L., Payne, K. K. and Wilkes, D. S.**, Regulation of the NFAT pathway discriminates CD4+CD25+ regulatory T cells from CD4+CD25- helper T cells. *J Leukoc Biol* 2008. **83**: 708-717.



- 150 **Torgerson, T. R., Genin, A., Chen, C., Zhang, M., Zhou, B., Anover-Sombke, S., Frank, M. B., Dozmorov, I., Ocheltree, E., Kulmala, P., Centola, M., Ochs, H. D., Wells, A. D. and Cron, R. Q.**, FOXP3 inhibits activation-induced NFAT2 expression in T cells thereby limiting effector cytokine expression. *J Immunol* 2009. **183**: 907-915.
- 151 **Fontenot, J. D., Rasmussen, J. P., Gavin, M. A. and Rudensky, A. Y.**, A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol* 2005. **6**: 1142-1151.
- 152 **Zorn, E., Nelson, E. A., Mohseni, M., Porcheray, F., Kim, H., Litsa, D., Bellucci, R., Raderschall, E., Canning, C., Soiffer, R. J., Frank, D. A. and Ritz, J.**, IL-2 regulates FOXP3 expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells through a STAT-dependent mechanism and induces the expansion of these cells in vivo. *Blood* 2006. **108**: 1571-1579.
- 153 **Wan, Y. Y. and Flavell, R. A.**, Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression. *Nature* 2007. **445**: 766-770.
- 154 **Yao, Z., Kanno, Y., Kerenyi, M., Stephens, G., Durant, L., Watford, W. T., Laurence, A., Robinson, G. W., Shevach, E. M., Moriggl, R., Hennighausen, L., Wu, C. and O'Shea, J. J.**, Nonredundant roles for Stat5a/b in directly regulating Foxp3. *Blood* 2007. **109**: 4368-4375.
- 155 **Thornton, A. M. and Shevach, E. M.**, CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* 1998. **188**: 287-296.
- 156 **Bonner, W. A., Hulett, H. R., Sweet, R. G. and Herzenberg, L. A.**, Fluorescence activated cell sorting. *Rev Sci Instrum* 1972. **43**: 404-409.
- 157 **Laemmli, U. K.**, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970. **227**: 680-685.
- 158 **Banham, A. H.**, Cell-surface IL-7 receptor expression facilitates the purification of FOXP3(+) regulatory T cells. *Trends Immunol* 2006. **27**: 541-544.
- 159 **Meier, S., Stark, R., Frentsch, M. and Thiel, A.**, The influence of different stimulation conditions on the assessment of antigen-induced CD154 expression on CD4+ T cells. *Cytometry A* 2008. **73**: 1035-1042.
- 160 **Lee, Y. H., Benary, M., Baumgrass, R. and Herzel, H.**, Prediction of regulatory transcription factors in T helper cell differentiation and maintenance. *Genome Inform.* **22**: 84-94.
- 161 **Sojka, D. K., Bruniquel, D., Schwartz, R. H. and Singh, N. J.**, IL-2 secretion by CD4+ T cells in vivo is rapid, transient, and influenced by TCR-specific competition. *J Immunol* 2004. **172**: 6136-6143.
- 162 **Giorgetti, L., Siggers, T., Tiana, G., Caprara, G., Notarbartolo, S., Corona, T., Pasparakis, M., Milani, P., Bulyk, M. L. and Natoli, G.**, Noncooperative interactions between transcription factors and clustered DNA binding sites enable graded transcriptional responses to environmental inputs. *Mol Cell.* **37**: 418-428.
- 163 **Burz, D. S., Rivera-Pomar, R., Jackle, H. and Hanes, S. D.**, Cooperative DNA-binding by Bicoid provides a mechanism for threshold-dependent gene activation in the Drosophila embryo. *Embo J* 1998. **17**: 5998-6009.
- 164 **Markstein, M., Markstein, P., Markstein, V. and Levine, M. S.**, Genome-wide analysis of clustered Dorsal binding sites identifies putative target genes in the Drosophila embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002. **99**: 763-768.
- 165 **Tenbrock, K. and Tsokos, G. C.**, Transcriptional regulation of interleukin 2 in SLE T cells. *Int Rev Immunol* 2004. **23**: 333-345.
- 166 **Klinman, D. M., Mushinski, J. F., Honda, M., Ishigatsubo, Y., Mountz, J. D., Raveche, E. S. and Steinberg, A. D.**, Oncogene expression in autoimmune and normal peripheral blood mononuclear cells. *J Exp Med* 1986. **163**: 1292-1307.
- 167 **Wong, H. K., Kammer, G. M., Dennis, G. and Tsokos, G. C.**, Abnormal NF-kappa B activity in T lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus is associated with decreased p65-RelA protein expression. *J Immunol* 1999. **163**: 1682-1689.

- 168 **Serfling, E., Chuvpilo, S., Liu, J., Hofer, T. and Palmetshofer, A.**, NFATc1 autoregulation: a crucial step for cell-fate determination. *Trends Immunol* 2006. **27**: 461-469.
- 169 **Kim, J. Y., Kim, H. J., Hurt, E. M., Chen, X., Howard, O. M. and Farrar, W. L.**, Functional and genomic analyses of FOXP3-transduced Jurkat-T cells as regulatory T (Treg)-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007. **362**: 44-50.
- 170 **Li, B., Samanta, A., Song, X., Iacono, K. T., Bembas, K., Tao, R., Basu, S., Riley, J. L., Hancock, W. W., Shen, Y., Saouaf, S. J. and Greene, M. I.**, FOXP3 interactions with histone acetyltransferase and class II histone deacetylases are required for repression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007. **104**: 4571-4576.
- 171 **Grant, C., Oh, U., Fugo, K., Takenouchi, N., Griffith, C., Yao, K., Newhook, T. E., Ratner, L. and Jacobson, S.**, Foxp3 represses retroviral transcription by targeting both NF-kappaB and CREB pathways. *PLoS Pathog* 2006. **2**: e33.
- 172 **Monje, P., Hernandez-Losa, J., Lyons, R. J., Castellone, M. D. and Gutkind, J. S.**, Regulation of the transcriptional activity of c-fos by ERK. A novel role for the prolyl isomerase PIN1. *J Biol Chem* 2005. **280**: 35081-35084.
- 173 **Lee, S. M., Gao, B. and Fang, D.**, FoxP3 maintains Treg unresponsiveness by selectively inhibiting the promoter DNA-binding activity of AP-1. *Blood* 2008. **111**: 3599-3606.
- 174 **Allan, S. E., Crome, S. Q., Crellin, N. K., Passerini, L., Steiner, T. S., Bacchetta, R., Roncarolo, M. G. and Levings, M. K.**, Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *Int Immunol* 2007. **19**: 345-354.
- 175 **Maurice, M., Verhoeyen, E., Salmon, P., Trono, D., Russell, S. J. and Cosset, F. L.**, Efficient gene transfer into human primary blood lymphocytes by surface-engineered lentiviral vectors that display a T cell-activating polypeptide. *Blood* 2002. **99**: 2342-2350.
- 176 **Verhoeyen, E., Dardalhon, V., Ducrey-Rundquist, O., Trono, D., Taylor, N. and Cosset, F. L.**, IL-7 surface-engineered lentiviral vectors promote survival and efficient gene transfer in resting primary T lymphocytes. *Blood* 2003. **101**: 2167-2174.
- 177 **Wang, J., Ioan-Facsinay, A., van der Voort, E. I., Huizinga, T. W. and Toes, R. E.**, Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells. *Eur J Immunol* 2007. **37**: 129-138.
- 178 **Seddiki, N., Santner-Nanan, B., Martinson, J., Zaunders, J., Sasson, S., Landay, A., Solomon, M., Selby, W., Alexander, S. I., Nanan, R., Kelleher, A. and Fazekas de St Groth, B.**, Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med* 2006. **203**: 1693-1700.
- 179 **Koch, M. A., Tucker-Heard, G., Perdue, N. R., Killebrew, J. R., Urdahl, K. B. and Campbell, D. J.**, The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. *Nat Immunol* 2009. **10**: 595-602.
- 180 **Oldenhove, G., Bouladoux, N., Wohlfert, E. A., Hall, J. A., Chou, D., Dos Santos, L., O'Brien, S., Blank, R., Lamb, E., Natarajan, S., Kastenmayer, R., Hunter, C., Grigg, M. E. and Belkaid, Y.**, Decrease of Foxp3+ Treg cell number and acquisition of effector cell phenotype during lethal infection. *Immunity* 2009. **31**: 772-786.
- 181 **Voo, K. S., Wang, Y. H., Santori, F. R., Boggiano, C., Wang, Y. H., Arima, K., Bover, L., Hanabuchi, S., Khalili, J., Marinova, E., Zheng, B., Littman, D. R. and Liu, Y. J.**, Identification of IL-17-producing FOXP3+ regulatory T cells in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009. **106**: 4793-4798.
- 182 **Thornton, A. M., Korty, P. E., Tran, D. Q., Wohlfert, E. A., Murray, P. E., Belkaid, Y. and Shevach, E. M.**, Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells. *J Immunol*. **184**: 3433-3441.
- 183 **Hodge, M. R., Ranger, A. M., Charles de la Brousse, F., Hoey, T., Grusby, M. J. and Glimcher, L. H.**, Hyperproliferation and dysregulation of IL-4 expression in NF-ATp-deficient mice. *Immunity* 1996. **4**: 397-405.

- 
- 184 **Lindgren, H., Axcrona, K. and Leanderson, T.**, Regulation of transcriptional activity of the murine CD40 ligand promoter in response to signals through TCR and the costimulatory molecules CD28 and CD2. *J Immunol* 2001. **166**: 4578-4585.

## 7 Danksagung

HERZLICHEN DANK:

### **Prof. Dr. Rupert Mutzel**

für die Begutachtung meiner Doktorarbeit und den Vorsitz der Prüfungskommission.

### **PD Dr. Ria Baumgrass**

für die Möglichkeit in Ihrem Labor zu arbeiten, die gute Betreuung und Unterstützung bei der Bearbeitung meines Projekts und für die schönen Gruppenunternehmungen, die viel zur guten Arbeitsatmosphäre beigetragen haben.

### **Manuela Benary**

für die gute Zusammenarbeit, die vielen fruchtbaren montäglichen Diskussionen und natürlich das mathematische Modell!

Ich wünsche ihr noch ganz viel Erfolg bei Ihrer Doktorarbeit!

### **Labmanagers, FACS-Facility, Spülküche**

für die Hilfe! Und bei Regina Schuck für das Schnacken zwischendurch.

### **AG Baumgrass**

für die wirklich guten Jahre mit Euch allen! Euch ist es zu verdanken, dass ich mich (fast) jeden Tag gefreut habe, ins Labor zu kommen! Dank auch für die fachliche Hilfe, die guten Anregungen bei der Durchsicht meiner Arbeit, die Aktivitäten außerhalb des Instituts und die wirklich gute Stimmung während der Arbeit. Ich würde jederzeit gern wieder mit Euch zusammen arbeiten! Also vielen Dank an alle, die die Arbeitsgruppe in den fünf Jahren durchlaufen haben und natürlich besonders an den harten Kern:

Uwe Benary, Claudia Brandt, Andreas Czech, Stefan Frischbutter, Anne Gompf, Uschi Gruner, Daniel Hackbusch, Ivan Kel, Sonja Kimmig, Anett Köhler, Stefan Kröger, Melanie Krüger, Solveigh Krusekopf, Britta Lamottke, Yü-Hien Lee, Maria Lexberg, Peter Liman, Martin Listek, Astrid Menning, Karin Müller, Luisa Neubrandt, Sylvia Niebrügge, Vladimir Pavlovic, Martin Pohland, Miriam Podtschaske, Tobias Scheel, Claudia Schlundt, Michael Schmück, Matthias Sieber, Biljana Smiljanovic, Alexander Stöhr, Katherine Sturm, Jil Ulrich

### **Meine Familie**

für die Unterstützung, derer ich mir immer sicher sein kann.

**Claas !!!**

## **8 Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unzulässige Hilfsmittel angefertigt habe. Ich habe keine als die hier angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet.

Hanna Bendfeldt  
Berlin, 27.05.2010