

Funktion natürlicher Isoformen des
Transkriptionsfaktors FOXP3 in regulatorischen
CD4⁺ 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

Reiner Karl Walter Mailer

aus Hannover

April 2009

1. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Blankenstein

2. Gutachter Prof. Dr. Wolfgang Uckert

Disputation am 22. Juli 2009

“Homo res sacra homini”

Lucius Annaeus Seneca, Epistel 95.33

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	<i>Immunologische Selbst-Toleranz.....</i>	2
1.1.1	Zentrale Toleranz.....	3
1.1.2	Periphere Toleranz.....	5
1.2	<i>Regulatorische T-Zellen.....</i>	7
1.2.1	CD4+CD25+ natürliche regulatorische T-Zellen	8
1.2.1.1	Entwicklung und Phänotyp.....	9
1.2.1.2	Suppressive Mechanismen.....	11
1.3	<i>Der Transkriptionsfaktor FOXP3</i>	13
1.3.1	Aufbau	13
1.3.2	FOXP3 Mutationen	15
1.3.3	Isoformen und Bindungspartner	17
1.4	<i>FOXP3 in der Tumorummunologie.....</i>	19
1.5	<i>Zielsetzung der Arbeit.....</i>	22
2.	Material und Methoden	23
2.1	<i>Materialien</i>	23
2.1.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterial.....	23
2.1.2	Puffer, Kulturmedien und Lösungen	23
2.1.3	Plasmide	24
2.1.4	Synthetische Oligonukleotide.....	26
2.1.5	Kits für biochemische Analysen und Isolationen	28
2.1.6	Versuchstiere	29
2.1.7	Zelllinien und biologisches Material.....	29
2.1.8	Antikörper.....	29
2.1.9	Geräte	31
2.1.10	Statistik.....	32

2.2	Methoden	32
2.2.1	Gentechnologische Methoden	32
2.2.1.1	Polymerasekettenreaktion	32
2.2.1.2	Agarose Gelelektrophorese	32
2.2.1.3	DNA-Extraktion	33
2.2.1.4	Enzymatische DNA-Restriktionsspaltung und -Ligation	33
2.2.1.5	Transformation	33
2.2.1.6	Mutagenese von DNA	33
2.2.2	Präparation von Zellsuspensionen	34
2.2.2.1	Präparation der Mauslymphozyten	34
2.2.2.2	Präparation humaner mononukleärer Zellen aus Blut	34
2.2.3	Antikörperfärbung	34
2.2.3.1	Antikörperfärbung von Oberflächenepitopen	35
2.2.3.2	Antikörperfärbung von intrazellulären Epitopen	35
2.2.3.3	Intrazelluläre Färbung von FOXP3	35
2.2.4	Fluoreszenz-aktivierte-Zellsortierung/Durchflusszytometrie	35
2.2.5	Magnetische Zellsortierung	36
2.2.6	Isolation von Ribonukleinsäure-Transkripten	37
2.2.7	Präparation von cDNA	37
2.2.8	Realtime RT-PCR	37
2.2.9	Transfektion	38
2.2.9.1	Transfektion mit Fugene	38
2.2.9.2	Transfektion mit Kalziumphosphatpräzipitation	39
2.2.9.3	Transfektion mit Lipofectamine	39
2.2.10	Luciferase Reportergen Assay	39
2.2.11	Retroviraler Gentransfer	40
2.2.11.1	Transduktion in Mauszellen	40
2.2.11.2	Transduktion in humanen Zellen	41
2.2.12	Western Blot Analyse	41
2.2.13	Suppressionsassay	42
2.2.14	Analyse von Protein-Protein-Interaktionen	43
2.2.14.1	Koimmunpräzipitationen	43
2.2.14.2	Proteinkomplexe aus Fusionsproteinen in Hefe (<i>Yeast-2-Hybrid</i>)	44

3.	Ergebnisse	45
3.1	<i>FOXP3 Isoformen in humanen Treg Zellen</i>	45
3.1.1	Transkription und Expression von FOXP3 Isoformen	45
3.2	<i>Lokalisation und Dimerisierung von FOXP3 Isoformen</i>	50
3.2.1	FOXP3 Isoformen in transfizierten humanen Zellen	50
3.2.2	Zelluläre Kompartimentierung der FOXP3 Isoformen	51
3.2.3	FOXP3 dimerisiert unabhängig von Exon 2 und Exon 7	53
3.3	<i>Isoform-unspezifische Proteinbindungen von FOXP3</i>	57
3.3.1	Suppression der NFAT und NF- κ B vermittelten Transkription.....	57
3.3.2	FOXP3 Isoformen binden AML-1	59
3.4	<i>Phänotyp und Funktion der Treg Zellen induziert von FOXP3... 60</i>	
3.4.1	Foxp3 und FOXP3 Isoformen in T-Zellen der Maus.....	60
3.4.1.1	Phänotyp natürlicher CD4+CD25+ Foxp3+ Zellen der Maus	61
3.4.1.2	FOXP3 Transduktion in CD4+CD25- T-Zellen der Maus	62
3.4.1.3	Isoform-spezifische Induktion des regulatorischen Phänotyps.....	64
3.4.2	FOXP3 Isoformen in humanen CD4+CD25- T-Zellen	68
3.4.3	Inhibitorische Funktion der FOXP3 Isoformen	70
3.5	<i>Dominant negative Effekte durch FOXP3Δ2Δ7</i>	72
3.5.1	Retrovirale Transduktion humaner Treg Zellen mit FOXP3 Isoformen .	72
3.5.2	Dominant negativer Effekt von FOXP3 Δ 2 Δ 7	73
3.6	<i>Identifizierung Isoform-spezifischer FOXP3 Bindungspartner ... 76</i>	
3.6.1	Differentielle Kontrolle der AP-1 Aktivität durch FOXP3 Isoformen.....	76
3.6.2	FOXP3 Isoformen ohne Exon 2 interagieren mit c-Jun	77
3.6.3	Isoform-spezifische Interaktionen im <i>Yeast-2-Hybrid</i>	78
3.6.4	MDM2 in naiven T-Zellen und Treg Zellen.....	80
3.6.5	FOXP3 Isoformen ohne Exon 2 interagieren mit TSG101.....	82
3.6.5.1	Koimmunpräzipitation von TSG101 und FOXP3 Δ 2.....	82
3.6.5.2	<i>Yeast-2-Hybrid</i> Assay von TSG101 und FOXP3 Δ 2	84
3.6.5.3	Analyse der FOXP3 Δ 2 Bindungsregion an TSG101	85
4.	Diskussion	89
4.1	<i>Expressionsmuster der FOXP3 Isoformen.....</i>	91

4.2	<i>Isoform-unabhängige Funktionen von FOXP3</i>	92
4.2.1	FOXP3 Isoformen dimerisieren im Zellkern.....	92
4.2.2	Repressorkomplexe von FOXP3 mit NFAT, NF- κ B und AML-1	93
4.3	<i>Isoform-abhängige Funktionen von FOXP3</i>	95
4.3.1	FOXP3 Induktion des Treg Phänotyps ist abhängig von Exon 7	95
4.3.2	FOXP3 Δ 2 Δ 7 wirkt dominant negativ auf andere FOXP3 Isoformen.....	96
4.3.3	Alternatives Spleißen ermöglicht eine differentielle Komplexbildung.....	97
4.3.3.1	Interaktion von FOXP3 Isoformen ohne Exon 2 mit c-Jun	97
4.3.3.2	Interaktion von FOXP3 Isoformen ohne Exon 2 mit TSG101.....	98
4.4	<i>Ausblick</i>	100
5.	Referenzen	101
6.	Zusammenfassung	114
7.	Summary	115
8.	Abkürzungen	116
9.	Danksagung	118
10.	Anhang	119
10.1	<i>Publikationen und Kongressteilnahmen</i>	119
10.1.1	Publikationen.....	119
10.1.2	Kongressteilnahmen.....	120
10.2	<i>Eidesstattliche Erklärung</i>	121

1. Einleitung

Organismen werden ständig mit einer Vielzahl unterschiedlichster Pathogene konfrontiert. Im Laufe der Evolution entwickelten sich mannigfaltige Abwehrmechanismen, um Viren, Bakterien, Pilze, parasitäre Protozoen und Würmer daran zu hindern, den Wirtsorganismus mit ihren toxischen Stoffwechselprodukten zu schädigen oder von dessen energiereichen organischen Verbindungen und Mineralstoffen zu profitieren. Beim Menschen wird die Invasion von Pathogenen zunächst durch die fortlaufende Erneuerung der epithelialen Zellschichten, der Sezernierung von Schleim, Fettsäuren und Schweiß und der Besiedelung von Oberflächen mit unschädlichen Bakterien verhindert. Gelingt es einem Pathogen dennoch diese physikalischen Barrieren zu überwinden, kommt es bei Säugetieren zur Immunantwort, die sich in zwei evolutionär und funktional unterschiedliche Teile aufspalten lässt. Zunächst reagiert das angeborene Immunsystem, bestehend aus Phagozyten (Makrophagen & Granulozyten, darunter Neutrophile, Basophile und Eosinophile), dem alternativen Komplementsystem, welches durch eine Proteasekaskade zur Zellyse führt, natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und Subpopulationen von Lymphozyten ($\gamma\delta$ T-Zellen & B1-B Zellen), die eine eingeschränkte Rezeptorspezifität aufweisen. Alle Abwehrmechanismen des angeborenen Immunsystems haben gemein, dass sie sofort rezeptorvermittelt auf konservierte Pathogenstrukturen reagieren können.

Darauf folgend greift einige Tage später das adaptive Immunsystem, bestehend aus Lymphozyten (B- und T-Zellen), deren gemeinsamer Ursprung pluripotente hämatopoietische Stammzellen des Knochenmarks sind, in die Abwehr der Pathogene ein [1]. B-Zellen sind Teil der humoralen Immunantwort, die nach Reifung und Antigenkontakt zu Antikörper sezernierenden Plasmazellen differenzieren. Spezifische Antikörper binden Antigene mit hoher Affinität, was die Neutralisierung von Toxinen, die Phagozytose ermöglichende Opsonierung und die Aktivierung des klassischen Komplementsystems und der Mastzellen zur Folge haben kann. Die B-Zellentwicklung findet weiterhin im Knochenmark statt, während T-Zellen in den Thymus, ein weiteres zentrales lymphatisches Organ, einwandern. Hier findet die genomische Umordnung der V(D)J-Gensegmente des T-Zellrezeptors statt, der analog zum B-Zellrezeptor eine Immunoglobulin-ähnliche Struktur aufweist [2]. Die nahezu unbegrenzte Anzahl verschiedener T-Zellrezeptorspezifitäten wird durch die somatische

Rekombination der polygenen Gensegmente beider Peptidketten und durch das Einfügen zusätzlicher Nukleotide in die Verbindungsregionen erreicht. Ersteres wird gesteuert von einer heterodimeren Endonuklease, codiert durch die rekombinationsaktivierenden Gene (RAG-1 & -2), letzteres von der terminalen Desoxyribonukleotidyltransferase [3, 4]. Die anschließende positive und negative Selektion stellt sicher, dass eine große Mehrheit der T-Zellen funktionale und nicht-autoreaktive Rezeptoren exprimiert [5, 6]. Mit der irreversiblen, individuellen Anordnung des Rezeptors einer T-Zelle, dem Allelausschluss (zumindest für die β -Kette) sowie der klonalen Selektion lassen sich die grundlegenden Eigenschaften der adaptiven Immunität nach Burnet erklären [7]: Lymphozyten besitzen eine Rezeptorspezifität, werden spezifisch durch Antigenkontakt aktiviert, alle Zellen einer klonalen Proliferation haben die gleiche Spezifität wie die Ausgangszelle und Zellen mit Rezeptorspezifitäten gegen Autoantigene werden frühzeitig deletiert.

1.1 Immunologische Selbst-Toleranz

Eine besondere Aufgabe des Immunsystems besteht darin, zwischen körpereigenen und körperfremden Strukturen unterscheiden zu können. Hierfür werden Lymphozyten, deren Rezeptoren nicht gegen definierte Pathogenmoleküle gerichtet sind, sondern als Folge der zufälligen Umordnung des T-Zellrezeptors körpereigene Strukturen erkennen, eliminiert. B-Zellen, die im Knochenmark im unreifen Zustand Antigene erkennen, erhalten Signale, die zu verminderter Reaktionsfähigkeit (Anergie) und programmierten Zelltod (Apoptose) führen. Vergleichbar werden heranreifende T-Zellen im Thymus auf Erkennen von antigenpräsentierenden Proteinen und auf Toleranz gegenüber Autoantigenen selektioniert. Allerdings kommen auch in gesunden Individuen autoreaktive Lymphozyten vor, die der Selektion auf Selbst-Toleranz während der Zellreifung (zentrale Toleranz) entgehen konnten [8, 9]. Daher besteht die Notwendigkeit diese Zellen in der Peripherie unter Kontrolle zu halten und deren Aktivierung und Proliferation zu inhibieren (periphere Toleranz). Wird das Gleichgewicht zwischen Toleranz und Immunantwort (z.B. durch Adjuvantien) gestört oder ist die Toleranzinduktion als solches gestört (z.B. durch Genmutationen) können lokale oder

systemische Autoimmunerkrankungen auftreten, die schon vor über hundert Jahren von Paul Ehrlich als Horror Autotoxicus bezeichnet wurden (Übersicht in [10]).

Darüber hinaus muss auch eine Immunantwort gegen Pathogene reguliert werden, da sonst körpereigenes Gewebe Schaden nimmt und sich Immunopathologien, chronische Entzündungsreaktionen oder Allergien entwickeln. Auf der anderen Seite darf die Immunantwort nicht zu stark unterdrückt werden, andernfalls drohen Infektionen und das unkontrollierte Wachstum von Krebszellen.

1.1.1 Zentrale Toleranz

Die Vorläuferzelle für die T-Zelllinie (*early T-cell-lineage progenitor*) entstammt den pluripotenten hämatopoietischen Stammzellen des Knochenmarks und wandert mithilfe der Expression des Chemokinrezeptors 9 (CCR9) in das Thymusgewebe ein [11]. Diese Zellen haben noch das Potential sowohl in myeloide (z.B. Monozyten) als auch in lymphoide Immunzellen (z.B. NK-Zellen, T-Zellen) zu differenzieren. In weiteren Entwicklungsschritten verringern sich die Optionen durch gezieltes An- und Abschalten von Differenzierungsfaktoren und -markern (z.B. c-kit, Stammzellantigen-1, *cluster of differentiation 44*, CD44) (Übersicht in [12]). Pro-T-Zellen, die weder den Korezeptor CD8 noch CD4 exprimieren und daher auch als doppelt negative Zellen beschrieben werden, beginnen im Thymuskortex mit der somatischen Rekombination ihrer V- (*variability*), D- (*diversity*) und J- (*joining*) Gensegmente zur variablen Region der β -Kette des T-Zellrezeptors (TCR). Zusammen mit der hinzugespleißten, konstanten C-Region wird die komplette β -Kette mit dem PreT α -Molekül an der Oberfläche der Zelle exprimiert und im Falle einer produktiven Genumordnung die Prä-T-Zelle zur Proliferation und zur Rekombination der V- und J-Segmente der α -Kette angeregt. Dieser Vorgang wird β -Selektion genannt und findet in der subkapsulären Zone des Thymuskortex statt [13]. Falls die neu entstandene β -Kette nicht funktionell ist, können noch die β -Kettengene des zweiten Allels oder aber die γ - und δ -Kettengene umarrangiert werden, andernfalls wird die Apoptose eingeleitet. Die RAG-1 & -2 Gene sind dabei einer strikten Kontrolle unterworfen, so dass verhindert wird, dass mehr als eine β -Kette erfolgreich rekombiniert wird. Auf diese Weise ist sichergestellt, dass der β -Kette immer nur ein Allel zu Grunde liegt (Allelausschluss). Die Thymozyten, die den vollständigen $\alpha\beta$ -TCR exprimieren, werden nun auf ihre Fähigkeit hin überprüft, den Liganden – den antigenpräsentierenden Haupthistokompatibilitätskomplex (*major*

histocompatibility complex, MHC) auf den kortikalen Thymusepithelzellen - zu erkennen. Erhält die Zelle aufgrund mangelnder MHC-Bindung kein positives Signal, besteht gegebenenfalls noch die Möglichkeit den TCR durch sekundäre Genumlagerung zu editieren, ansonsten stirbt die Zelle durch Apoptose [14]. Bei dieser positiven Selektion wird gleichzeitig die Korezeptorspezifität der Zelle festgelegt. Erkennt der nun doppelt positive Thymozyt (CD4+CD8+) MHC-I wird sich die Zelle zum CD8+ zytotoxischen T-Lymphozyten (*cytotoxic T lymphocyte*, CTL) entwickeln, bindet der TCR MHC-II wird eine CD4+ T-Zelle entstehen. Die Expression des jeweils anderen Korezeptors wird eingestellt – so dass aus diesem Vorgang einfach positive T-Zellen resultieren [15]. Die Restriktion der T-Zellantworten auf körperfremde Peptide wird in der negativen Selektion sichergestellt. Dafür werden zahlreiche Autoantigene, die einem breiten Spektrum ansonsten gewebespezifischer Proteine entsprechen, von Thymusepithelzellen der Medulla exprimiert und als Peptid-MHC präsentiert. Diese Fähigkeit ermöglicht der Transkriptionsfaktor AIRE (Autoimmunregulator) [16]. CD4+ oder CD8+ T-Zellen, die den Peptid-MHC mit zu hoher Avidität erkennen, erhalten das Signal zur Apoptose, so dass nach positiver und negativer Selektion nur ein Bruchteil der Thymozyten als naive T-Zellen den Thymus verlässt und die sekundären lymphatischen Organe (Lymphknoten und Milz) erreicht.

Die Tatsache, dass trotz dieser Toleranzinduktion autoreaktive Lymphozyten in gesunden Individuen auftreten, zeigt jedoch, dass tatsächlich nicht jedes Autoantigen im Thymusepithel exprimiert wurde und folglich T-Zellen die negative Selektion überlebten, deren TCR spezifisch gegen ein Autoantigen im Körper reagieren könnte [17]. Im Gegensatz zur β -Kette unterliegt die α -Kette des TCR nicht vollständig der Kontrolle des Allelausschlusses, so dass es denkbar ist, dass eine Zelle während der negativen Selektion ein Apoptose-verhinderndes Signal erhält, obwohl die Kombination einer der beiden α -Ketten mit der β -Kette eine Spezifität aufweist, die körpereigene Peptide erkennt [18]. Die Selektionsmechanismen beruhen zudem auf der Qualität der MHC-TCR-Bindung, so dass T-Zellen überleben könnten, die Autoantigene schwach, d.h. unterhalb des Grenzwertes für negative Selektion, erkennen würden. Ein weiterer Grund für das Entstehen autoreaktiver T-Zellen ist die molekulare Mimikry, d.h. das gleichzeitige Präsentieren zweier ähnlicher Peptid-MHC, von denen der eine aus einer Pathogenstruktur generiert ist, der andere ein Autoantigen darstellt. Erfolgt eine Immunantwort besteht die Gefahr, dass die T-Zellen mit körpereigenem Gewebe kreuzreagieren [19].

1.1.2 Periphere Toleranz

Obwohl autoreaktive T-Zellen im Körper zirkulieren, kommt es in den meisten Fällen nicht zur Etablierung einer Autoimmunerkrankung. Verantwortlich dafür sind im Wesentlichen zwei unterschiedliche Mechanismen, die die immunologische Homöostasis aufrecht erhalten: die rezessive oder zell-intrinsische und die dominante oder zell-extrinsische Immunregulation (Übersicht in [20, 21]). Intrinsisch bezeichnet dabei die integrale Signalverarbeitung bzw. Aktivierungskapazität der T-Zelle. Naive T-Zellen benötigen zur Aktivierung nicht nur den für ihren TCR passenden Peptid-MHC in einer ausreichenden Menge exponiert, sondern zusätzlich noch ein kostimulierendes Molekül (CD80/B7.1- und CD86/B7.2-Molekül), das von CD28 erkannt und gebunden wird. Im Gegensatz zum MHC werden B7-Moleküle ausschließlich auf antigenpräsentierenden Zellen (*antigen presenting cells*, APC) exprimiert, die in der Lage sind, aktiv Pathogenstrukturen aufzunehmen, zu verarbeiten und zu präsentieren. Hauptsächlich handelt es sich hierbei um dendritische Zellen (*dendritic cells*, DC), Makrophagen und B-Zellen, die jedoch eine vorhergehende Stimulierung durch pathogenerkennende Rezeptoren (*Toll-like-receptors*, TLR) benötigen, um die hohe B7-Expression einer reifen APC bereitzustellen. Fehlt dieser wichtige Kostimulus wird das Peptid auf dem MHC einer Gewebszelle als körpereigen erkannt und die T-Zelle mit dem potentiell autoreaktiven TCR erhält ein Signal zur Anergie oder Apoptose [22]. Wenn eine T-Zelle ausreichend mit beiden Faktoren – Peptid-MHC und B7-Molekül – stimuliert wird, kann die Immunantwort noch durch inhibitorische Signale z.B. CTL assoziiertes Antigen-4 (*cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4*, CTLA-4) moduliert und die Aktivierungsschwelle heraufgesetzt werden [23, 24]. CTLA-4 konkurriert mit CD28 um die Bindung an B7-Molekülen. Ein monoklonaler Antikörper gegen CTLA-4 (Klon MDX-010) wird in der Klinik eingesetzt, um gezielt Suppressorzellen auszuschalten, die eine stärkere Immunreaktion gegen Melanome supprimieren [25]. Allerdings können infolge dieser Behandlung starke Autoimmunreaktionen wie Enterokolitis und Hepatitis als Nebenwirkungen auftreten [25]. Neben dem Einfluss inhibitorischer Signale, konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass eine wiederholte und übermäßige Aktivierung über den T-Zellrezeptor ebenfalls zur Apoptose (*activation induced cell death*) führt [26].

Eine dominante, zell-extrinsische Toleranzinduktion wird durch regulatorische Zellen oder aber Suppressorzellen gewährleistet. In diesem Zusammenhang ist es wichtig zu erwähnen, dass eine adaptive Immunantwort immer eine gewisse Präferenz für eine entweder humorale

(durch Antikörper unterstützte) oder zelluläre (durch Makrophagen und CD8⁺ T-Zellen unterstützte) Immunreaktion aufweist. Wahrscheinlich liegt die Entscheidung für eine dieser unterschiedlichen Optionen schon in der Zytokinproduktion der angeborenen Immunantwort begründet. So bewirkt beispielsweise eine hohe Konzentration Interleukin-12 (IL-12), dass sich aktivierte T-Zellen zu Th1-Effektorzellen umwandeln, die hauptsächlich Interferon- γ (IFN- γ) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) produzieren, was wiederum Makrophagen aktiviert [27]. Im Gegensatz dazu bewirken IL-4 und IL-6 die Reifung zu Th2-Effektorzellen, die durch IL-4 und IL-10 B-Zellen aktivieren können [28]. Stimmt das Zytokinmilieu nicht mit der entsprechenden Effektorzelllinie überein, werden die T-Zellen in ihrer Wirkung inhibiert. Eine weitere immunmodulatorische T-Zellpopulation stellen die NKT-Zellen dar, die auf CD1 gebundene Lipide reagieren und viel IL-4 produzieren können [29]. Eine Suppression der APC-Aktivierung und der T-Zellproliferation wird auch durch die Sezernierung von anti-inflammatorischen Zytokinen wie IL-10 und transformierender Wachstumsfaktor- β (*transforming growth factor- β* , TGF- β) erreicht [30].

Einen besonderen Stellenwert haben hier CD4⁺ regulatorische T-Zellen, die zum großen Teil für die periphere Toleranz verantwortlich sind. Diese Zellen sind in der Lage durch dominante Suppression der Effektor-T-Zellen die Immunantwort gänzlich zu unterdrücken, was besonders deutlich wird, wenn das Gleichgewicht von Effektorzellen zu Suppressorzellen gestört wird. So erkrankten neugeborene Mäuse, denen der Thymus entfernt wurde, an diversen Autoimmunerkrankungen. Ebenso verhält es sich bei älteren Ratten, die mehrmals mit γ -Strahlen in subletaler Dosis behandelt wurden. Spritzte man diesen Tieren syngene CD4⁺ T-Zellen konnte die Etablierung der Autoimmunerkrankungen verhindert werden [31, 32]. Auf diese Weise wurde gezeigt, dass eine bestimmte Population von T-Zellen autoreaktive Effektorzellen supprimieren kann.

1.2 Regulatorische T-Zellen

Als in den späten 1960er Jahren herausgefunden wurde, dass T-Zellen auch inhibitorische Wirkungen auf B-Zellen ausüben können, entstand die Idee einer suppressiven T-Zellpopulation. Darüber hinaus zeigte insbesondere die Entdeckung der „infektiösen Toleranz“ von Gershon und Kondo, dass in T-Zellen Toleranz induziert werden konnte und diese Zellen in der Lage waren, nach adoptivem T-Zelltransfer in anderen Tieren eine immunsuppressive Wirkung zu erzielen [33]. Die zunächst postulierten Suppressorzellen, die ihre Wirkung mittels spezialisiertem MHC und löslichen Suppressionsfaktoren entfalten sollten, konnten jedoch mit inzwischen verbesserten DNA-Sequenzierungstechniken nicht nachgewiesen werden, so dass die Idee der Suppressorzellen vorübergehend in Vergessenheit geriet. Danach wurden die vorausgegangenen Experimente mit der Immundeprivation interpretiert, die die entgegengesetzten Wirkmechanismen von Th1- und Th2-Zellen und deren wechselseitiger Suppression beschreibt. In den letzten Jahrzehnten hat sich jedoch gezeigt, dass eine definierte T-Zellpopulation zur Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz notwendig ist. Anfangs wurden diverse Autoimmunerkrankungen beschrieben, die nach der Entfernung des Thymus in verschiedenen Tiermodellen auftraten [34-36] und durch Behandlung mit CD4⁺ T-Zellen verhindert werden konnten. Später gelang es die Population regulatorischer T-Zellen durch Markergene zu definieren, wodurch auch eine Erklärung für Autoimmunerkrankungen bei Patienten gefunden wurde, die Mutationen in Genen aufweisen, die die Entwicklung und Funktion dieser Zellen beeinträchtigen.

Sakaguchi et al. entdeckte 1995 die konstitutive Expression der α -Kette des IL-2 Rezeptors/CD25 an der Oberfläche der natürlichen regulatorischen T-Zelle (Treg) [37]. In zahlreichen Versuchen konnte daraufhin eine Population CD25⁺ Treg Zellen isoliert werden und deren positiver Einfluss in tierexperimentellen Autoimmunerkrankungen nachgewiesen werden (Übersicht in [38]). Neben Treg Zellen sind noch weitere regulatorische Zellen bekannt, die sich vor allem durch ihr ausgeprägtes Zytokinprofil voneinander unterscheiden: Tr1- und Th3-Zellen, von denen man annimmt, dass sie thymusunabhängig in der Peripherie induziert werden. Tr1-Zellen lassen sich beispielsweise *in vitro* durch Zugabe von Dexamethason und Vitamin D₃, bzw. IL-10 aus CD4⁺ T-Zellen generieren und sezernieren selbst hohe Konzentrationen von IL-10 [39]. Th3-Zellen stehen im Zusammenhang mit der Vermittlung von oraler Toleranz. So konnte gezeigt werden, dass die Verfütterung von

Autoantigenen an Mäuse (z.B. Myelinscheidenprotein) vor der autoreaktiven Zerstörung der Myelinscheide im zentralen Nervensystem (*experimental autoimmune encephalomyelitis*, EAE) schützt. Dieser Effekt wird durch die Freisetzung von TGF- β durch Th3-Zellen vermittelt [40]. Beiden Zelltypen ist gemein, dass sie weder CD25 noch den Transkriptionsfaktor *forkhead box* (*mus musculus*: Foxp3; *homo sapiens*: FOXP3) der Treg Zellen konstitutiv exprimieren. Allerdings konnte gezeigt werden, dass Foxp3⁺ Treg Zellen abhängig vom Gewebetyp, in dem sie auftraten, ebenfalls IL-10 und TGF- β produzieren und über diese Zytokine auch supprimieren, so dass die Verbindung dieser Populationen zueinander noch Gegenstand der Forschung ist [41].

1.2.1 CD4⁺CD25⁺ natürliche regulatorische T-Zellen

Die Population der natürlichen Treg Zellen spielt die wohl größte Rolle in der Aufrechterhaltung der immunologischen Homöostasis durch dominante Toleranzinduktion neben Tr1- und Th3-Zellen. Eine Vielzahl immunologischer Arbeitsgruppen konnte in jüngster Zeit zeigen, dass mit Hilfe der Treg Zellen im Mausmodell unterschiedlichste Autoimmunerkrankungen in ihrer Ausprägung und Schwere erfolgreich behandelt werden konnten. So konnte nach der Etablierung von Kolitis und Arthritis in Mäusen mittels Injektion von Treg Zellen ein Rückgang der Symptome erzielt werden. Ein Treg Zelltransfer vor der experimentellen Induktion von EAE in Mäusen, die transgen für Ovalbumin-spezifische TCR sind, verminderte die neuromotorischen Schädigungen im zentralen Nervensystem. (Übersicht in [42]). Ebenso konnte spontaner Typ1-Diabetes in Mäusen durch Treg Zellen kontrolliert werden [43, 44]. Außerdem wurde in B- und T-Zell defizienten Mäusen, die neben Effektor-T-Zellen auch Treg Zellen gespritzt bekamen, eine längere Toleranz gegen allogene Transplantate beobachtet [37, 45]. Eine Depletion der Treg Zellen mit monoklonalen Antikörpern gegen CD25 (Klon PC61) führte in diesen Modellen zu einer schnelleren Ausprägung von Autoimmunerkrankungen und Transplantatabstoßung. Außerdem konnte in Treg-depletierten Mäusen, die Tumorzellen gespritzt bekamen, eine verbesserte tumorspezifische Immunreaktion und eingeschränktes Tumorstadium beobachtet werden [46]. Eine wichtige Rolle spielen Treg Zellen auch bei der maternalen Toleranz gegenüber fetalen Epitopen und auch die Immunantwort von Mäusen, die mit *Leishmania* infiziert wurden, konnte mit dem Transfer von Treg Zellen unterdrückt werden [47, 48].

Im Menschen konnte eine Korrelation von unzureichender Treg-vermittelter Suppression und Autoimmunerkrankungen wie Typ1-Diabetes, Myasthenia gravis, Psoriasis, Polyglanduläres Syndrom Typ II und Multipler Sklerose beobachtet werden, wobei die Treg Population quantitativ scheinbar unverändert blieb [49-53].

1.2.1.1 Entwicklung und Phänotyp

Treg Zellen entstehen zum größten Teil im Thymus. Die ersten Hinweise darauf erhielt man in Mäusen, in denen eine Thymektomie am dritten Tag postnatal zu Autoimmunkrankheiten führte, darunter Gastritis, Thyroiditis, Oophoritis, Prostatitis, Insulitis, Glomerulonephritis, Epididymitis, Arthritis, etc. [31, 54]. Die Abhängigkeit der Treg Entwicklung vom Thymus zeigt sich deutlich bei Mäusen, denen MHC-I & -II oder aber RAG fehlen. In beiden Fällen können wenig bis gar keine Treg Zellen entstehen, wodurch klar wird, dass die positive und negative Selektion im Thymus wichtig für deren normale Entwicklung ist. Analog dazu haben auch weitere akzessorische Rezeptor- und Ligandenmoleküle Einfluss auf die Interaktion zwischen Thymusstroma und reifender Treg Zelle, so dass Mäusestämme, defizient für CD28, CD40, CD11a/CD18 oder CD80 und CD86, weniger Treg Zellen aufweisen (Übersicht in [55]). Untersuchungen von Jordan et al. bewiesen, dass die Expression eines stark agonistisch wirkenden Proteins während der positiven Selektion im Thymus eine prozentual größere Treg Population zur Folge hatte [56]. In transgenen Mäusen, die ein Superantigen oder ein bestimmtes Peptid-MHC-II in kortikalen Thymusepithelzellen exprimieren, entwickelten sich vermehrt spezifische Treg Zellen [57, 58]. Demzufolge müssten Treg Zellen bevorzugt Autoantigene erkennen; in der Tat konnte gezeigt werden, dass der Transfer von TCR-Ketten aus Treg Zellen in CD4⁺CD25⁻ T-Zellen eine Stimulation durch Autoantigene in der Peripherie und eine Proliferation dieser Zellen zu Folge hatte [59]. Sequenzanalysen in Mäusen mit limitiertem TCR-Repertoire konnten bisher allerdings nicht abschließend klären, ob das TCR-Repertoire der Treg Zellen grundlegend verschieden von dem der Effektor-T-Zellen ist bzw. wie groß die Übereinstimmung der TCR in beiden Populationen ist [59, 60]. Das TCR-Repertoire der Treg Zellen scheint gegenüber naiven CD4⁺CD25⁻ T-Zellen eine höhere Diversität zu haben, beide Populationen variieren ihr Repertoire vom Thymus zur Peripherie, was darauf hindeutet, dass nur ein Teil der Zellen gleicher Spezifität in der Peripherie überleben kann [61, 62].

Man geht davon aus, dass neben den natürlichen Treg Zellen, die aus dem Thymus in die Peripherie auswandern, auch Treg Zellen aus naiven T-Zellen durch lokale Induktion

entstehen können. So gelang es *in vitro* durch TGF- β , gegebenenfalls in Kombination mit Retinolsäure oder exogenem IL-2, Foxp3 in den Zellen zu exprimieren und funktionale Treg Zellen zu erhalten (Übersicht in [55]). Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass IL-6 zusammen mit TGF- β die Entwicklung von Treg Zellen blockiert und sich stattdessen TH17-Zellen entwickeln, die proinflammatorisches IL-17 produzieren [63]. Die Generierung von spezifischen Treg Zellen aus naiven CD4⁺ T-Zellen *in vitro* ermöglicht den therapeutischen Einsatz und ist daher Gegenstand intensiver Forschung. Bislang ist allerdings ungeklärt, ob die induzierten Treg Zellen *in vivo* stabil sind. So ist beispielsweise in natürlichen Treg Zellen das Gen Foxp3 in der Maus, bzw. FOXP3 im Menschen, stärker demethyliert als in entsprechenden induzierten Treg Zellen [64, 65]. Unbestimmt ist auch das quantitative Verhältnis von den unterschiedlichen Treg Populationen zueinander, es ist jedoch anzunehmen, dass lokal induzierte Treg Zellen eine untergeordnete Rolle spielen, da sie nicht in der Lage sind das Fehlen natürlicher Treg Zellen zu kompensieren.

Der Phänotyp der Treg Zelle gleicht im Wesentlichen dem einer aktivierten CD4⁺ T-Zelle, was auch auf die kompetitive Rolle bei der Suppression hinweist. Der wichtigste Oberflächenmarker ist CD25, die α -Kette assoziiert mit der β - und γ -Kette (CD122 und CD132) zum hochaffinen IL-2 Rezeptor. Das Expressionsniveau von Oberflächenmarkern wie CD39, einer Ektonukleotidphosphatase, ist gegenüber naiven T-Zellen erhöht, ebenso wie das von CD5, CD27 und OX40, während CD127 erniedrigt ist. CD45, eine Phosphatase mit verschiedenen Spleißformen, tritt überwiegend als CD45RO auf. Zudem werden die Suppressormoleküle CTLA-4 und der glukocorticoid-induzierte TNF-Rezeptor (GITR) verstärkt exprimiert. Durch die Expression von Chemokinrezeptoren (CCR4, CCR6, CCR7, CXCR4 und CXCR5) können Treg Zellen Chemokine aus der Umgebung wahrnehmen. Integrine (CD103) und Selektine (CD62L) ermöglichen bestimmten Treg Subpopulationen zu definierten Bereichen innerhalb des Körpers zu gelangen und zu Entzündungsherden im Gewebe zu migrieren. Zusätzlich besitzen Treg Zellen verschiedene TLR (TLR-2, -4, -5 und -8), wodurch sie unabhängig von der TCR-Stimulierung durch Kontakt mit Pathogenbestandteilen aktiviert werden können (Pam3Cys, Lipopolysaccharide, Flagellin und Einzelstrang-RNA), wobei deren Wirkung im einzelnen noch unklar ist, da sich unterschiedliche Studien in ihren Ergebnisse widersprachen (Übersicht in [66]).

Von großer Bedeutung ist die Expression des Transkriptionsfaktors FOXP3 [67, 68], da dieses Protein in der Lage ist das Treg-typische Expressionsmuster zu induzieren und darüber hinaus auch einer Zelle die suppressive Kapazität überträgt [69]. Neuere Untersuchungen

ergaben, dass zumindest im Menschen CD4⁺CD25⁻ T-Zellen nach Aktivierung vorübergehend ebenfalls FOXP3 exprimieren, was die Zellen allerdings nicht zur Suppression befähigt [70, 71]. Isolierte Treg Zellen, die mit Antikörpern (α -CD3, α -CD28) aktiviert werden, verhalten sich *in vitro* anerg und proliferieren nur mit Hilfe hoher Konzentrationen IL-2, aber jeweils schwächer als naive T-Zellen. Dies spiegelt jedoch nicht die Situation *in vivo* wider, wo Treg Zellen durchaus proliferieren und für deren Aktivierung eine zehnfach bis hundertfach niedrigere Peptidkonzentration benötigt wird als für naive T-Zellen gleicher Spezifität, so dass selbst unreife DC mit geringer B7-Molekülexpression eine Stimulierung bewirken können [72]. Die höhere metabolische Aktivität der Treg Zellen ist auch der Ansatzpunkt für klinische Studien, in denen Toleranz durch Bestrahlung und radiomimetische Medikamente wie Cyclophosphamid aufgehoben wird, um z.B. eine antitumorspezifische Immunantwort zu forcieren [73-76]. Physiologisch unterscheiden sich Treg Zellen von naiven T-Zellen außerdem in der Signaltransduktion des IL-2 Rezeptors. Infolge der IL-2 Bindung wird zunächst durch die Phosphatidylinositol-3-Kinase der sekundäre Botenstoff Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat hergestellt. Dieser vermittelt den Start einer Kaskade von sich gegenseitig aktivierenden Serin/Threonin-Kinasen. Wichtigster Mediator ist hierbei die AKT/Proteinkinase B, die Kontrolle auf den Zellzyklus und die Zytokinproduktion ausübt (Übersicht in [77]). Untersuchungen ergaben, dass Treg Zellen eine unphosphorylierte und damit weniger aktive Form von AKT exprimieren und dass dieser Zustand für die Funktion der Zelle von Bedeutung ist [78]. Ein Protein, welches von AKT aktiviert wird, ist mTOR (*mammalian target of rapamycin*), dessen antagonistischer Ligand Rapamycin eine antiproliferative Wirkung auf T-Zellen hat. Bei Treg Zellen konnte im Vergleich zu naiven T-Zellen eine Rapamycin-Resistenz beobachtet werden [79, 80].

1.2.1.2 Suppressive Mechanismen

Der Mechanismus der Treg-vermittelten Suppression ist offensichtlich durch ein Zusammenspiel verschiedener Faktoren gewährleistet. Neben der Proliferation von CD4⁺ Effektor-T-Zellen wird ebenso die Maturierung oder Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen, NKT-Zellen, Makrophagen und DC durch Treg Zellen effektiv inhibiert (Übersicht in [42]). Treg Zellen benötigen für die optimale suppressive Wirkung eine vorausgehende antigenspezifische Aktivierung durch DC, wobei geringe Konzentrationen von Peptid-MHC und B7-Molekülen selbst unreifer DC ausreichen können. Unerlässlich für Treg Zellen ist der T-Zellwachstumsfaktor IL-2, was sich in IL-2 defizienten Mäusen zeigt, die

keine Treg Zellen entwickeln und an schweren Autoimmunerkrankungen leiden [81]. Der hochaffine IL-2 Rezeptor der Treg Zellen ist in der Lage sehr effizient IL-2 aus der Umgebung zu entfernen, wodurch konkurrierenden Effektor-T-Zellen nicht genügend Wachstumsfaktor zur Verfügung steht. Besonders deutlich wird dieser Effekt, wenn die Suppression *in vitro* durch Zugabe von exogenem IL-2 aufgehoben wird. Dieser kompetitive IL-2 Konsum kann jedoch nicht erklären, warum auch IL-2 Rezeptor defiziente Effektor-T-Zellen supprimiert werden können ([82] und Übersicht in [83]). Treg Zellen können indirekt über die Modifizierung von DC eine Proliferation naiver T-Zellen verhindern, indem sie die DC zur Expression von weniger B7-Molekülen und IL-10 [84] und der Tryptophan-abbauenden Indolamin-2,3-dioxygenase anregen [85]. Sowohl der verminderte Kostimulus als auch das für T-Zellen toxische Abbauprodukt Kynurenin lässt naive T-Zellen absterben. Die direkte Beobachtung der Zellinteraktionen *in vivo*, ermöglicht durch die computergestützte Zwei-Photon-Laser-Mikroskopie (*two-photon-laser-scanning-microscopy*), zeigte im lymphatischen Gewebe bevorzugte eine DC-Treg-Interaktion im Vergleich zur naiven T-Zell-Treg-Interaktion [86]. Treg Zellen können darüber hinaus das immunologische Mikromilieu direkt durch die Sezernierung von anti-inflammatorischen Zytokinen wie IL-10 [41], TGF- β [24] und IL-35 [87] beeinflussen oder durch Katabolisierung von ATP mit Hilfe der Oberflächenmoleküle CD39 und CD73 die Apoptose-einleitende Base Adenosin generieren [88]. Eine weitere enzymatische Katalyse in Treg Zellen ist die Umwandlung der Hämgruppe in Kohlenmonoxid, Biliverdin und freiem Eisen(III)ion durch Hämoxxygenase-1, eine Inhibierung dieser Reaktion beeinflusst die Suppression negativ [89]. Darüber hinaus ist ein Zellkontakt-abhängiger Mechanismus bekannt, der sowohl durch die inhibierenden Treg-spezifischen Marker CTLA-4, GITR, CD223, membrangebundenes TGF- β (Übersicht in [90]), als auch durch die Expression von lysierendem Granzym oder Perforin T-Zellen absterben lässt [91]. Obwohl viele Publikationen beschreiben, dass bestimmte suppressive Moleküle obligatorisch für die Treg-Funktion sein sollen, konnte abschließend noch kein Universalmechanismus der Suppression gefunden werden. Vielmehr erhärtet sich der Verdacht, dass Treg Zellen auf unterschiedlichen Ebenen mit unterschiedlichen suppressiven Mechanismen ihre Wirkung entfalten, was eine situationsbedingte und auf das lokale Mikromilieu abgestimmte Regulation der Immunantwort ermöglicht.

Interessant ist in diesem Zusammenhang der Unterschied zwischen Treg Zellen in Mäusen und Menschen: Da humane Effektor-T-Zellen und Gedächtnis-T-Zellen ebenso CD25 schwach exprimieren, ist nur die Subpopulation von CD25 stark exprimierenden Zellen mit

regulatorischem Potential ausgestattet (ca. 5-10% aller CD4+ T-Zellen). Im Gegensatz zur Maus haben humane Treg Zellen MHC-II, CCR8 aber kein CD103 und vermitteln die Zellkontakt-abhängige Suppression über Granzym A, nicht über Granzym B [91]. Hämoxygenase-1 scheint wiederum nur bei humanen Treg Zellen eine Rolle zu spielen [92]. Der wichtigste Unterschied ist jedoch, dass humane CD4+CD25- T-Zellen nach Aktivierung FOXP3 exprimieren, wohingegen bei Mäusen die Foxp3 Expression exklusiv auf Treg Zellen beschränkt bleibt [70, 71]. Diese Unterschiede sind bei der Betrachtung - vor allem FOXP3-abhängiger Prozesse - zu beachten; letztendlich können naive humane T-Zellen nach Aktivierung nicht mehr phänotypisch von Treg Zellen unterschieden werden, sondern nur noch funktionell. Ergebnisse von Studien, die im Mausmodell durchgeführt wurden, können aus diesem Grund nicht auf die Situation im Menschen übertragen werden. Es ist durchaus möglich, dass zwar in beiden Spezies eine periphere Toleranz über Foxp3+ bzw. FOXP3+ Treg Zellen aufgebaut wird, dass aber die suppressiven Mechanismen und deren Regulation unterschiedlich sind.

1.3 Der Transkriptionsfaktor FOXP3

FOXP3, alternativ auch als Scurfin oder JM2 bezeichnet, ist der determinierende Transkriptionsfaktor für die regulatorische T-Zelllinie. Ähnliche Faktoren sind auch für die anderen definierten T-Zellen bekannt: Der Th1-Phänotyp wird hauptsächlich durch die Transkriptionsfaktoren T-bet und Runx-3 bestimmt, der von Th2-Zellen durch Gata-3 und Th17-Zellen exprimieren einen für sie spezifischen Rezeptor ROR γ t (*retinoic orphan receptor γ t*), der Homologien zum Retinolsäurerezeptor aufweist.

1.3.1 Aufbau

FOXP3 ist X-chromosomal, beim Menschen im Genlokus Xp11.23 kodiert. Das Protein ist stark konserviert und weist 86 % Homologie zu Foxp3 in der Maus auf. Der Transkriptionsfaktor gehört zu der Gruppe der *forkhead/winged-helix family of*

transcriptional regulators, wobei sich die Bezeichnung *forkhead* von dem Genprodukt *fhx* aus der Embryonalentwicklung von *Drosophila melanogaster* ableitet [93].

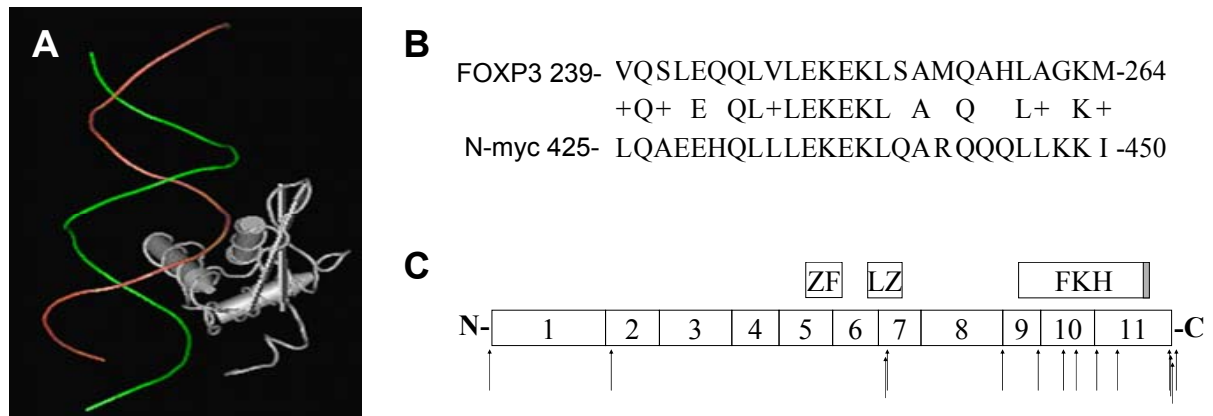


Abbildung 1: Die Struktur des humanen Transkriptionsfaktors FOXP3

A) Bändermodell der *forkhead domain* von FOXP2 gebunden an DNA; FOXP2 FKH in grau, DNA-Doppelhelix (21 Basenpaare) in grün und rot; berechnet aus einer Röntgenkristallstrukturanalyse [94]. B) Vergleich der Aminosäuresequenzen von FOXP3 und N-myc; Aminosäuren vergleichbarer Hydrophobizität sind mit + gekennzeichnet. C) Schematische Darstellung der Exons von FOXP3, der Position der Domänen und beschriebener IPEX Mutationen; ZF = Zinkfinger, LZ = *leucine zipper*, FKH = *forkhead* Domäne, die Region des Kernlokalisationssignals ist grau markiert.

Die Struktur der C-terminalen, DNA-bindenden *forkhead* Domäne (FKH) konnte für die Familie der FOXP-Moleküle anhand der Kristallstrukturanalyse eines DNA-FOXP2-Komplexes aufgeklärt werden, sie erinnert an eine geflügelte Helix (*winged helix*) und besteht aus drei α -Helices zusammen mit drei Teilen einer antiparallelen β -Faltblattstruktur (Abbildung 1A). Durch Sequenzvergleiche konnten weitere Sekundär- bzw. Tertiärstrukturen vorhergesagt werden: ein Zinkfingermotiv, gebildet durch die Aminosäuren 199-222, und eine Leucinreißverschlußregion (*leucine zipper*), gebildet von den Aminosäuren 239-260. Der Zinkfinger entsteht durch die tetraedrische Anordnung von jeweils zwei Cystein- und Histidinresten um ein Zinkion, wodurch eine fingerartige Struktur entsteht. Tatsächlich interagiert dieses Motiv häufig mit DNA, für das spezifische Erkennen einer Konsensussequenz wären jedoch mehrere Zinkfinger notwendig, da ein Zinkfinger mit jeweils nur 3-4 Basenpaaren wechselwirkt [95, 96]. Der *leucine zipper* besteht aus einer α -Helix, deren jeweils siebte Aminosäure entweder Leucin oder eine andere hydrophobe Aminosäure ist [97]. Diese Struktur ermöglicht die Dimerisierung mit einem weiteren *leucine*

zipper, so dass die hydrophoben Reste ineinander greifen. Beim humanen FOXP3 erinnert diese Region der Aminosäuresequenz an N-myc (Abbildung 1B), ein Protein das Zellwachstum und Proliferation kontrolliert und von dem ursprünglich gedacht wurde, dass es mittels des *leucine zipper* Homodimere bildet. Diese Vorstellung von *leucine zipper*-vermittelter Homodimerisierung wurde auf FOXP3 übertragen, nachdem gezeigt wurde, dass FOXP3 mit sich selbst assoziiert [98]. Tatsächlich aber gilt für die Familie der myc-Onkogene, dass ausschließlich Heterodimere, beispielsweise mit Max, unter physiologischen Konditionen gebildet werden [99, 100].

Humanes FOXP3 besteht aus 431 Aminosäuren, die sich aus 11 Exons zusammensetzen (Abbildung 1C). Der Zinkfinger wird von den Exons 5 und 6 gebildet, während der *leucine zipper* durch einen Teil des Exons 6, hauptsächlich aber durch Exon 7 kodiert wird. Die für die FOX-Proteine ungewöhnliche C-terminale Position der FKH Domäne (Aminosäure 335-418) wird von den Exons 9, 10 und 11 gebildet und beinhaltet auch das Kernlokalisationssignal.

1.3.2 FOXP3 Mutationen

Der Einfluss von FOXP3 bei der Etablierung von Toleranz zeigt sich deutlich bei männlichen Individuen, deren X-Chromosom im FOXP3-Gen mutiert ist. Diese Patienten leiden unter schweren multiplen Autoimmunerkrankungen, die man unter der Bezeichnung IPEX (*immune dysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked syndrome*), alternativ auch XLAAD (*X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome*), zusammenfasst und die häufig schon im Kleinkindalter zum Tod führen [101, 102]. Eine Übersicht über IPEX auslösende Mutationen von FOXP3 liefert Abbildung 1C und Tabelle 1, wobei auffällt, dass neben der FKH Domäne auch Exon 7 von Bedeutung für die Funktion des Transkriptionsfaktors zu sein scheint.

Tabelle 1: Publierte FOXP3 Mutationen

<i>Mutation</i>	<i>Bedeutung</i>	<i>Referenz</i>
Deletion Exon -1 & Intron 1	Verminderte Proteinsynthese	[103]
Deletion eines Nukleotids im Leucin 76	Leserasterverschiebung, vorzeitiger Abbruch der Proteinsynthese	[104]
Deletion Lysin 250	Veränderte <i>leucine zipper</i> Struktur (Exon 7)	[105]
Deletion Glutamat 251	Veränderte <i>leucine zipper</i> Struktur (Exon 7)	[98]
5'-Spleißsequenz von Intron 8	Fehlerhaftes Spleißen/ Leserasterverschiebung	[98]
Arginin 347 zu Histidin	Veränderte Struktur der Helix I (FKH)	[105]
Isoleucin 363 zu Valin	Veränderte Struktur der Helix II (FKH)	[104]
Phenylalanin 371 zu Cystein	Veränderte Struktur der Zwischenhelixsequenz (FKH)	[101]
Alanin 384 zu Threonin	Veränderte Struktur der Zwischenhelixsequenz (FKH)	[101]
Arginin 397 zu Tryptophan	Veränderung der C-terminalen Faltblattstruktur (FKH)	[106]
Glycin 430, Prolin 431 & stop-Codon 432 zu Valin, Glycin & addierte Aminosäuresequenz	zusätzlicher Aminosäurenanhang an Helix II (FKH)	[107]
Stop-Codon 432 zu Threonin und addierte Aminosäuresequenz	zusätzlicher Aminosäurenanhang an Helix II (FKH)	[108]
3'-uncodierende Region	Fehlerhaftes Polyadenylierungssignal/ Verminderte Proteinsynthese	[108]

Korrespondierend zu IPEX ist die *scurfy* Maus, die ebenfalls X-chromosomal rezessiv an schweren Autoimmunkrankheiten, Anämie, Diarrhöe und Hautschuppen (englisch: *scurfy*) erkrankt. Die *scurfy* Mutation betrifft das *Foxp3* Gen der Maus, welches nach der Aminosäure 277 eine Leserasterverschiebung durch eine Insertion von zwei Basenpaaren aufweist [109]. Diese Mutation hat zur Folge, dass DNA und der Kernfaktor aktivierter T-Zellen (*nuclear factor of activated T cells*, NFAT) zwar noch gebunden wird, die Entwicklung funktionaler Treg Zellen jedoch gestört ist [110]. Interessanterweise konnte ein ähnlicher Phänotyp auch in anderen Mäusestämmen beobachtet werden, die defizient sind für weitere Gene der Treg-Entwicklung. Hierzu zählen IL-2 [111, 112], die IL-2 Rezeptorketten CD25 [113] und CD122 [114], CD28 [44], CTLA-4 [23, 115], Signalvermittler und Transkriptionsaktivator 5 (*signal transducer and activator of transcription 5*, STAT5a und b) [116, 117] sowie TGF- β [118] und IL-10 [119]. Dass ebenso in gesunden Tieren die Depletion von Treg Zellen durch Antikörper gegen IL-2 [120], CD25 [121-123], CTLA-4 [121] und GITR [124] Autoimmunerkrankungen auslöst, unterstreicht die Bedeutung dieser Moleküle für die Entstehung oder Funktion von Treg Zellen.

1.3.3 Isoformen und Bindungspartner

Wie bereits erwähnt, exprimieren im Menschen auch CD4⁺CD25⁻ T-Zellen nach Aktivierung zumindest vorübergehend FOXP3, darüber hinaus sind beim Menschen im Gegensatz zur Maus zwei Isoformen bekannt. Neben der vollständigen 11 Exon langen Variante kann Exon 2 alternativ gespleißt werden. Naive CD4⁺ T-Zellen, die retroviral mit den Isoformen mit oder ohne Exon 2 (im folgenden FOXP3 bzw. FOXP3 Δ 2 benannt) transduziert wurden, zeigten in beiden Fällen eine Induktion des Treg Phänotyps. Abhängig von der Expressionsstärke differieren in den Studien jedoch die suppressiven Eigenschaften der transduzierten Zellen [68, 125, 126]. Übereinstimmend konnte eine eingeschränkte Proliferation der transduzierten Zellen *in vitro* und eine Induktion von Suppressormolekülen beobachtet werden. Bislang ist es ungeklärt, ob jede Treg Zelle alle Isoformen exprimiert oder bestimmte FOXP3 Isoformen nur auf einer Untergruppe der Treg Population vorkommen. Da jedoch eine IPEX Mutation in Exon 2 bekannt wurde, deren FOXP3 Δ 2 funktional sein sollte, ist anzunehmen, dass die einzelnen Isoformen zumindest genau definierte Aufgaben übernehmen. Dies ermöglicht zudem eine Isoform-abhängige Interaktion mit Bindungspartnern (siehe unten).

Das FOXP3 Protein besitzt keine Transaktivierungsdomäne, beeinflusst die Gentranskription also unabhängig von einem Kofaktor. FOXP3 allein bindet allerdings nur schwach an DNA. In letzter Zeit mehren sich die Publikationen über Bindungspartner von FOXP3. Die Inhibition von Zytokinen wird effektiv durch die Bildung eines Komplexes aus FOXP3 und NFAT blockiert. Diese Interaktion trägt aber ebenfalls entscheidend zur Funktion und zum Phänotyp der Treg Zelle bei [94]. Die Struktur von NFAT, der FKH Domäne des homologen Proteins FOXP2 und einer Minimalpromotorsequenz von IL-2 konnte auf atomarer Ebene aufgeklärt werden [127] (Abbildung 2).

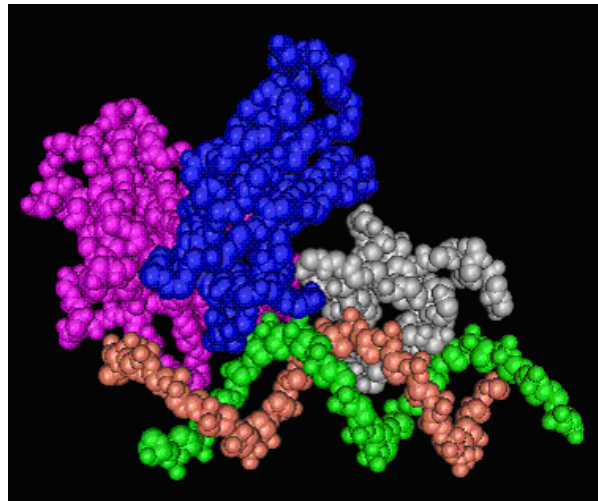


Abbildung 2: Der Transkriptionskomplex aus DNA, NFAT und FOXP2 FKH

A) Kalottenmodell der FKH Domäne von FOXP2 und NFAT gebunden an DNA; FOXP2 FKH in grau, DNA-Doppelhelix (21 Basenpaare) in grün und rot, NFAT RHD (*Rel homology domain*, aa 1-178) in rosa, NFAT IPT (*Immunoglobulin like fold, Plexins, transcription factors*, aa 179- 287) in blau; Ergebnis einer Röntgenkristallstrukturanalyse [94].

Analog zu NFAT konnte gezeigt werden, dass Foxp3 auch ein transkriptioneller Repressor vom Kernfaktor κ B (*nuclear factor* κ B, NF- κ B) ist [128, 129]. Ein wichtiger Isoform-spezifischer Unterschied des humanen Transkriptionsfaktors ist die Bindung von ROR α und ROR γ t an die Region des Exons 2, wodurch die Generierung von Th17-Zellen inhibiert wird [130, 131]. Darüber hinaus konnte die Interaktion des Transkriptionsfaktors Runx-1/AML-1 (*runt-related transcription factor-1/acute myeloid leukaemia-1*) mit der Foxp3 Region 278-336, d.h. direkt C-terminal vom *leucine zipper* nachgewiesen werden [132]. FOXP3 ist in der Lage über Assoziation mit Histonacetyltransferase-deacetylase-Komplexen die DNA-Histon-Struktur weitläufig zu verändern. Die Aminosäuren 106-190 von FOXP3 binden mit der Histonacetyltransferase Tip60 (*tat-interactive protein 60*) und den Histondeacetylasen-7 und -9 [133, 134]. Es konnte gezeigt werden, dass Tip60 auch in der Lage ist FOXP3 und FOXP3 Δ 2 zu acetylieren [133]. Ein weiterer Bestandteil des hochmolekularen FOXP3-Komplexes ist der verwandte Faktor FOXP1 [135]. Für Foxp3 der Maus konnte zudem eine Bindung an Aktivatorprotein-1 (AP-1) nachgewiesen werden [136]. Die bereits erwähnte Dimerisierung von FOXP3 wurde von verschiedenen Gruppen nachgewiesen [135, 137, 138]. Der Transkriptionsfaktor FOXP3 ist im menschlichen Blut hauptsächlich in CD4⁺ T-Zellen zu finden, allerdings sind auch FOXP3⁺ CD8⁺ T-Zellen mit suppressiven Eigenschaften beschrieben worden [139]. Treg Zellen müssen kontinuierlich neu gebildet werden um eine

lebenslange Toleranz gegen Autoantigene zu gewährleisten [140]. In Treg Zellen ist die konstitutive Expression von FOXP3 notwendig, um die Funktion und den Phänotyp der Treg Zelle aufrecht zu erhalten [141]. Andererseits ist es im humanen System und in der Maus möglich durch einen FOXP3- bzw. Foxp3-Gentransfer naive CD4⁺ T-Zellen zu stabilen Treg Zelllinien reifen zu lassen. Diese induzierten Treg Zellen zeichnen sich *in vitro* durch Anergie, sehr geringe Zytokinproduktion, Expression Treg-assoziiierter Moleküle und eine Zellkontakt-abhängige Suppression von Effektor-T-Zellen aus [67, 126]. Untersuchungen von Foxp3 Bindungsstellen im Mausgenom konnten zeigen, dass eine Vielzahl unterschiedlichster Gene von Foxp3 beeinflusst werden und Foxp3 bevorzugt an der Konsensussequenz TAAACA im Promotor dieser Gene bindet [142, 143]. Der humane FOXP3 Promotor besitzt NFAT, AP-1 und Smad3 Bindungsstellen, was erneut verdeutlicht, dass FOXP3 im Menschen durch eine TCR Stimulierung induziert werden kann [144, 145].

Durch gezielte Manipulation von FOXP3 Expression und Interaktion könnte es in Zukunft möglich sein Immunantworten in Ausmaß und Stärke zu regulieren.

1.4 FOXP3 in der Tumorummunologie

Da Treg Zellen neben der Kontrolle von Autoimmunerkrankungen auch die Immunantwort gegen Pathogene und Transplantate regulieren, vermutete man früh auch eine durch Treg Zellen induzierte Suppression antitumoraler Immunreaktionen. Tatsächlich konnte in der Maus gezeigt werden, dass die von CD8⁺ T-Zellen vermittelte Abstoßungsreaktion von CD4⁺CD25⁻ T-Zellen gefördert, von Treg Zellen aber inhibiert wird [146]. In Abwesenheit der Treg Population können CD8⁺ T-Zellen neben dem Tumor zudem auch körpereigenes Gewebe angreifen, wenn es sich beim tumorassoziierten Antigen um ein Autoantigen handelt [147]. Eine Treg Depletion mit Antikörpern gegen GITR und CTLA-4 (systemisch) oder CD4 (intratumoral) löste selbst in etablierten Tumoren in der Maus eine schnelle und effektive Immunreaktion aus [148, 149].

Untersuchungen bei Patienten mit Melanomen ergaben, dass FOXP3⁺ T-Zellen vermehrt in Lymphknoten auftreten, die mit Metastasen befallenen sind, verglichen mit nicht befallenen Lymphknoten [150]. Weitere Studien mit verschiedenen Krebsarten zeigten eine

Akkumulation von Treg Zellen im Tumor, wobei sogar eine aktive Rekrutierung dieser Zellen durch Tumor-sezerniertes Chemokin CCL22 diskutiert wurde [151, 152]. In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass T-Zellen von Krebspatienten *in vitro* spezifische Immunreaktionen gegen tumorassoziierte Antigene auslösen, wenn Treg Zellen zuvor depletiert wurden [17, 153]. Darüber hinaus supprimierten infiltrierende Lymphozyten aus Hodgkin-Lymphomen naive T-Zellen, vermittelt durch IL-10, CTLA-4 und Zellkontakt-abhängige Mechanismen [154]. Um die unzureichende Immunantwort gegen Tumore zu überwinden, wurden für verschiedene Tumore die immunogensten Antigene definiert, gegen die eine Vakzinierung oder ein Transfer spezifischer TCR-transduzierter T-Zellen Erfolg versprechen könnte [155, 156]. Allerdings resultiert die überwiegende Mehrheit der Krebserkrankungen aus spontan und sporadisch transformierten Zellen, die erst nach langer Latenzzeit klinische Symptome hervorrufen. Es konnte gezeigt werden, dass diese Tumorzellen immunogen sind, die vorhandenen, spezifischen T-Zellen allerdings in ihrer Wirkung supprimiert sind [157]. Diese Tumortoleranz steht in Zusammenhang mit der Proliferation unreifer myeloischer Zellen und hoher systemischer TGF- β Konzentrationen [158]. Auf welche Art und Weise der Tumor die Immunantwort moduliert und somit einer Abstoßung entgeht wird zurzeit intensiv erforscht. Die Induktion von Toleranz und die suppressive Kapazität der Treg Zellen, wie auch ihre lokale Akkumulation im Tumor, weisen auf die wichtige Rolle dieser Population in der Tumorummunologie hin.

Neuere Untersuchungen ergaben, dass FOXP3 nicht nur von T-Zellen, sondern auch von bestimmten Tumorzellen exprimiert wird. Sowohl Zelllinien aus Melanomen als auch diverse andere Tumorzellen konnten mit Antikörpern gegen FOXP3 positiv gefärbt werden [159, 160]. Darüber hinaus induzierte die Transformation von B-Zellen mittels Epstein-Barr-Virus die Expression von FOXP3 [159]. Eine andere Studie mit Pankreaskarzinomen ergab, dass FOXP3 ein funktionaler Repressor von IL-6 in Tumorzellen ist und den Tumorzellen suppressive Kapazität verleiht [160]. Darüber hinaus konnte für Brustkrebszellen nachgewiesen werden, dass FOXP3 ein Repressor der Onkogene Her-2 (*human epidermal growth factor receptor-2*) und SKP2 (*S-phase kinase-associated protein 2*) darstellt [161, 162]. Heterozygote *scurfy* Mäuse erkrankten infolge des nicht funktionalen Foxp3 überdurchschnittlich oft an Brustkrebs. Weitere Untersuchungen ergaben, dass humane Brustepithelzellen, bei denen die Expression von FOXP3 durch spezifische siRNA (*small interfering ribonucleic acid*) geblockt wurde, mehr Her-2 gebildet wurde. Eine Analyse der FOXP3 Isoformen in humanen Zelllinien aus Mammakarzinomen zeigte zudem, dass maligne

Zellen alternative Spleißformen wie FOXP3 Δ 2, FOXP3 Δ 2 Δ 3, FOXP3 Δ 7 und FOXP3 Δ 2 Δ 7 exprimieren, was auf eine Isoform-spezifische Inhibition der Her-2 Expression hindeutet [162]. Interessanterweise sind Spleißformen wie FOXP3 Δ 2 und besonders FOXP3 Δ 2 Δ 7 auch in malignen T-Zellen des Sézary Syndroms, eines kutanen Lymphoms, bevorzugt exprimiert [163]. Ob die FOXP3 Expression ein generelles Merkmal transformierter Zellen ist und inwieweit FOXP3 oder die beschriebenen Isoformen dem Tumor immunmodulatorische Effekte vermitteln können, ist bislang noch unzureichend erforscht.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die meisten Untersuchungen berücksichtigten nicht die unterschiedlichen Spleißvarianten des Transkriptionsfaktors FOXP3 in regulatorischen T-Zellen. Erste Hinweise auf eine Isoform-spezifische Funktion ergab die Analyse der IPEX Mutationen, die verdeutlichte, dass beispielsweise der *leucine zipper* und die DNA-bindende FKH Domäne wichtig für die FOXP3 Funktion ist. Schließlich konnte gezeigt werden, dass eine retrovirale Transduktion humaner CD4⁺ T-Zellen mit FOXP3 oder FOXP3 Δ 2 einen regulatorischen Phänotyp hervorruft [126]. Genauere Untersuchungen an FOXP3 Isoformen bezüglich der Dimerisierung, der Assoziation mit weiteren Transkriptionsfaktoren wie AML-1, des Einflusses auf die transkriptionelle Aktivität von NFAT, NF- κ B und AP-1, der Induktion Treg-assoziiierter Moleküle sowie des Transfers suppressiver Kapazität fehlen bislang. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten die spezifischen und unspezifischen Merkmale und Funktionen der beiden bekannten Isoformen FOXP3 und FOXP3 Δ 2, sowie einer neu identifizierten Isoform FOXP3 Δ 2 Δ 7 in CD4⁺ T-Zellen untersucht werden. Durch die experimentelle Analyse von unterschiedlichen biochemischen Eigenschaften einzelner Regionen/Exons von FOXP3 sollte ein Hinweis auf die betreffenden Signalkaskaden und deren Abhängigkeit von FOXP3 geliefert werden. Die differentielle Funktion der Isoformen könnte in Zukunft deren gezielte therapeutische Manipulation ermöglichen und somit ein Werkzeug zur Beeinflussung der Immunreaktion darstellen.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Sofern nicht anders angegeben wurden die Chemikalien von Cambrex Bio Science (Walkersville, USA), Invitrogen (Karlsruhe, D), Roth (Karlsruhe, D), SigmaAldrich (St.Louis, USA) oder StarLab (Ahrensburg, D) bezogen. Verbrauchsmaterialien aus Polyethylen, Polypropylen und Polystyrol wurden von den Firmen Becton Dickinson (Heidelberg, D), Becton Dickinson Falcon (Heidelberg, D), Braun (Melsungen, D), Costar (Bodenheim, D), Eppendorf (Hamburg, D), Fluka (Taufkirchen, D), Greiner (Solingen, D), Roth (Karlsruhe, D), Schleicher&Schüll (Dassel, D) und TPP AG (Transadingen, D) bezogen.

2.1.2 Puffer, Kulturmedien und Lösungen

Alle Lösungen und Puffer wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt.

Tabelle 2: Puffer, Medien und Lösungen

<i>Puffer/Medien/Lösungen</i>	<i>Zusammensetzung</i>
50x TAE Puffer	2 M Tris-Acetat; 50 mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA), pH: 8,0
10x Ladungspuffer Agarosegel	20 % Ficoll (v/v) (Amersham, Uppsala, S); 100 mM EDTA pH: 8,0; 1 % (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS); 0,25 % (w/v) Bromphenolblau; 0,25 % (w/v) Xylen Cymol
Phosphat gepufferte Saline (<i>phosphate buffered saline, PBS</i>)	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,4 mM KH ₂ PO ₄ ; pH: 7,4
RPMI Medium	RPMI1640 von Invitrogen (Karlsruhe, D) mit 5 % bzw. 10 % fetalem Kälberserum (<i>fetal calf serum, FCS</i>); 1 mM Pyruvat; 2 mM L-Glutamin; 10 mM N-2Hydroxyethyl-N'2' piperazinethylsulfonat (HEPES); 100 U/ml Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin; 1 mM nicht essentielle Aminosäuren (NEA); 0,05 mM β-Mercaptoethanol (β-ME)
DMEM Medium	DMEM von Invitrogen mit 5 % bzw. 10 % FCS; 2 mM L-Glutamin; 100 U/ml Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin; 1 mM NEA; 50 µM β-ME
Erythrozytenlysis Puffer	10 mM Tris/HCl; 0,165 M NH ₄ Cl; pH: 7,2

Fortsetzung Tabelle 2:

<i>Puffer/Medien/Lösungen</i>	<i>Zusammensetzung</i>
MACS Puffer	PBS; 2 mM EDTA, pH: 8,0; 0,5 % FCS
Puffer zur Antikörperfärbung	PBS; 2 % FCS
Saponin Puffer	PBS; 5 % FCS; 0,5 % (w/v) Saponin
RNAse-freies Wasser	0,01 % (v/v) Diethylpyrocarbonat (DEPC), autoklaviert
Transferpuffer	274 mM NaCl; 10 mM KCl; 3,5 mM Na ₂ HPO ₄ ; 42 mM HEPES; pH: 6,75
Luciferase Puffer	150 mM HEPES; 8 mM MgSO ₄ ; 40 mM Dithiothreitol; 200 µM EDTA; 1,06 mM Adenosintriphosphat; pH: 8,0
<i>Renilla</i> Puffer	30 mM Na ₄ P ₂ O ₇ ; 15 mM Natriumacetat; 20 mM Cyclohexandiamintetraessigsäure; 800 mM Na ₂ SO ₄ ; pH: 5,0
Western Blot Laufgel (10 %)	1,25 ml (40 %) Acrylamid; 1,875 ml 1 M Tris/HCl, pH: 8,8; 50 µl (10 % w/v) SDS; 50 µl Ammoniumpersulfat (APS); 1,8 ml H ₂ O; 2,5 µl Tetramethylethyldiamin (TEMED)
Western Blot Sammelgel	169 µl (40 %) Acrylamid; 375 µl 0,5 M Tris/HCl, pH: 6,8; 15 µl (10 % w/v) SDS; 12,5 µl APS; 950 µl H ₂ O; 3 µl TEMED
Western Blot Laufpuffer	125 mM Tris; 125 mM Glycin; 1 % (w/v) SDS
Western Blot Probenlysispuffer für Proteinnachweis	50 mM HEPES, pH: 7,4; 150 mM NaCl; 1 % (v/v) TritonX-100; 10 % (v/v) Glycerol; 10 mM EDTA, pH: 8,0; Phosphatase-Inhibitor (Roche Diagnostics, Mannheim, D) 1:1000; Protease-Inhibitor (Roche Diagnostics, Mannheim, D) 1 Tablette / 10ml
Western Blot Probenlysispuffer für Kopräzipitation	50 mM Tris/HCl, pH: 7,5; 150 mM NaCl; 1 % (v/v) Nonidet P40; 0,5 % (w/v) Natriumdeoxycholate; Protease-Inhibitor 1 Tablette / 10ml
6x Western Blot Ladungspuffer	350 mM Tris/HCl, pH: 6,8; 30 % (v/v) Glycerol; 10 % (w/v) SDS; 0,025 % (w/v) Bromphenolblau; 1:17 β-ME
Western Blot Übertragungspuffer	125 mM Tris; 125 mM Glycin
PBS-T	PBS; 0,1 % (v/v) Tween
Western Blot Lösung	PBS; 0,1 % (v/v) Tween; 2,5 % (w/v) Magermilchpulver

2.1.3 Plasmide

Für alle Klonierungen, Transformationen, Transfektionen und Transduktionen wurden entweder Vektoren der Firmen Clontech (Mountain View, USA), Genecopoeia (Germantown, USA), Invitrogen (Karlsruhe, D), Promega (Madison, USA) und Stratagene (Cedar Creek, USA) erworben oder von anderen Forschungslaboren freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Entsprechende Referenzen, die Eigenschaften der Plasmide und gegebenenfalls Klonierungen von Zielgenen sind im Folgenden aufgeführt:

Tabelle 3: Plasmide

<i>Name</i>	<i>Eigenschaften</i>	<i>Klonierte Zielgene</i>	<i>Referenz</i>
MIGR1	Retroviraler Vektor, Transkription des Zielgens, einer Internen Ribosomen-Eintrittsstelle (IRES) und GFP bzw. CFP, Kontrolle durch lange terminale repetitive Sequenzen (LTR) aus dem Stammzellvirus der Maus	FOXP3 Isoformen, cyanblau fluoreszierendes Protein (CFP)	[164]
pALF-10A1	Expression einer amphotropen Virushülle		[165]
pAP1-TA-luc	6x AP-1 Bindungsstelle vor dem Leuchtkäfer-Luciferasegen, Kontrolle durch Minimalpromotor		Clontech
pcDNA3.1+	Expressionsvektor, Kontrolle durch den Promotor des Cytomegalovirus (CMV)	FOXP3 Isoformen und Mutationen, TSG101, GFP	Invitrogen
pcDNA3.1 MLV g/p	Expression der reversen Polymerase & Strukturproteine des Leukämie Retrovirus der Maus (MLV), Kontrolle durch den Promotor des CMV		[166]
pCMV-Tag2	Expression eines FLAG-Motivgekoppelten Zielgens, Kontrolle durch den Promotor des CMV	FOXP3 Isoformen	Stratagene
pCMV-AML1-Tag2	Expression von FLAG-AML-1, Kontrolle durch den Promotor des CMV		[132]
pGBT9	Expression eines Fusionsproteins aus der DNA-Bindungsdomäne von Gal4 und dem Zielgen, Kontrolle durch den Hefepromotor ADH1	FOXP3 Isoformen, FOXP3 Mutationen	Clontech
pLP-ECFP-C1	Expression von CFP, Kontrolle durch den Promotor des CMV		Clontech
pNFAT-TA-luc	3x NFAT Bindungsstelle vor dem Leuchtkäfer-Luciferasegen, Kontrolle durch Minimalpromotor		Clontech
pNF- κ B-TA-luc	4x NF- κ B Bindungsstelle vor dem Leuchtkäfer-Luciferasegen, Kontrolle durch Minimalpromotor		Clontech
pReceiver-M12	Expression eines 3x FLAG-Motivgekoppelten Zielgens, Kontrolle durch den Promotor des CMV	TSG101	Genecopoeia
pRL-CMV	Expression von <i>Renilla</i> Luciferase, Kontrolle durch den Promotor des CMV		Promega

Die Integrität aller vorgenommenen Klonierungen wurde jeweils durch DNA-Sequenzierung der Firma SeqLab (Göttingen, D) bestätigt.

2.1.4 Synthetische Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide/Primer wurden von der Firma Invitrogen (Karlsruhe, D) synthetisiert. In manchen Fällen wurde nach der initialen Aufnahme die Lösung mit einer Vakuumentrifuge eingetrocknet, um eventuelle Verunreinigungen zu entfernen. Oligonukleotide wurden in deionisiertem Wasser aufgenommen, das vorher mit DEPC versetzt und autoklaviert wurde, um eventuell vorhandene Ribonukleotidasen zu inaktivieren. Alle Oligonukleotide wurden bei -20°C bis -80°C gelagert.

Tabelle 4: Oligonukleotide für Polymerasenkettenreaktionen
(*polymerase chain reaction, PCR*)

<i>Name</i>	<i>Sequenz (5' → 3')</i>	<i>Spezifität</i>
hFOXP3 Xho ffw	ACGCTACTCGAGGCCACCATGC CCAACCCCAGGCCTG	FOXP3 Klonierung in MIGR1
hFOXP3 EcoR1 rev	TGCGAGGAATTCTCAGGGGCCA GGTGTAGGG	FOXP3 Klonierung in MIGR1
hFOXP3 EcoRI ffw	ACGCTACGAATTCGATGCCCAA CCCCAGGCCTG	FOXP3 Klonierung in pCMV- Tag2
hFOXP3 Xho rev	TGCGATGCTCGAGTCAGGGGCC AGGTGTAGGG	FOXP3 Klonierung in pcDNA3.1+ und pCMV-Tag2
hFOXP3 fl EcoRI ffw	ACGCTGAATTCATGCCCAACCC CAGGCC	FOXP3 Klonierung in pGBT9 und pcDNA3.1+
hFOXP3 fl BamHI rev	TGCGAGGATCCGGGGCCAGGTG TAGGG	FOXP3 Klonierung in pGBT9
FOXP3 FKH BamHI rev	TGCGAGGATCCGTTGTGGAGGA ACTCTGG	FOXP3 Δ FKH Klonierung in pGBT9
TSG101 clon EcoRI ffw	ACGCTACGAATTCATGGCGGTG TCGGAGAGCCA	TSG101 Klonierung in pCMV-Tag2
TSG101 clon XhoI rev	TGCGATGCTCGAGTCAGTAGAG GTCCTGAGACC	TSG101 Klonierung in pCMV-Tag2
CFP forward	ACGCTCCATGGGCCACCATGGT GAGCAAGGGCGAG	CFP Klonierung
CFP reverse	TGCGAGTCGACCTACTTGTACA GCTCGTCCATG	CFP Klonierung
BamHI GFP ffw 66	ACGCTGGGATCCGCCGCCAC CATGGCCACAACCATGGTGA GC	GFP-Klonierung in pcDNA3.1+ zur N-terminalen Fusion mit FOXP3
EcoRI GFP rev 66	TGCGACGAATTCCTTGTACA GCTCGTCCATGCC	GFP-Klonierung in pcDNA3.1+ zur N-terminalen Fusion mit FOXP3

Fortsetzung Tabelle 4:		
Name	Sequenz (5' → 3')	Spezifität
hFOXP3 exon 1-2 ffw	CAGCTGCAGCTCTCAACGGTG	FOXP3 Reverse Transkriptase (RT-) PCR
hFOXP3 exon 1-3 ffw	CAGCTGCAGCTGCCCACTG	FOXP3 RT-PCR
hFOXP3 exon 3 rev	GCCTTGAGGGAGAAGACC	FOXP3 RT-PCR
hFOXP3 exon6-7 ffw	GAGCAGCAGCTGGTGCTGG	FOXP3 RT-PCR
hFOXP3 exon6-8 ffw	GAGCAGCAGGCATCATCCG	FOXP3 RT-PCR
hFOXP3 exon8 rev	CTGGGAATGTGCTGTTCC	FOXP3 RT-PCR
hTSG101 58 ffw	CACCCACAGTCAGACTTGT	TSG101 RT-PCR
hTSG101 58 rev	GGTATGGAGAGATTCCACC	TSG101 RT-PCR
hZNF307 58 ffw	TTGAGCCGGCTCCGAGAA	ZNF307 RT-PCR
hZNF307 58 rev	GCACCACCACCTCCTCC	ZNF307 RT-PCR
hp53 58 ffw	TGCTCCCCCGTGGCC	p53 RT-PCR
hp53 58 rev	GGGGAGTACGTGCAAGTC	p53 RT-PCR
hMdm2 58 ffw	GTGCCAAGCTTCTCTGTGA	MDM2 RT-PCR
hMdm2 58 rev	AGGTTTCTCTTCCCTGAAGCT	MDM2 RT-PCR
hHPRT1 ffw	TGACACTGGCAAACAATGCA	HPRT RT-PCR
hHPRT1 rev	GGTCTTTTACCAGCAAGCT	HPRT RT-PCR
hGAPDH ffw	GTCCACTGGCGTCTTAC	GAPDH RT-PCR
hGAPDH rev	CTTGAGGCTGTTGTCATACTC	GAPDH RT-PCR
short up EcoRI 5' end	ACGCTACGAATTCCTAATACGA CTCACTATAGGGC	Klonierung des RACE Produktes
short up XhoI 3' end	ACGCTACCTCGAGCTAATACGA CTCACTATAGGGC	Klonierung des RACE Produktes
gsp FOXP3 ffw exon1	ACGCTACGAATTCCTTCCAGGG CCGAGATCTTCGAGGCGG	Amplifizierung des RACE Produktes
gsp FOXP3 rev exon8	ACGCTACCTCGAGCAGGTGCCT CCGGACAGCAAACAGGCTG	Amplifizierung des RACE Produktes
race clon 6/7 EcoRI ffw	ACGCTACGAATTCGAGCAGCAG CTGGTGCTGG	Klonierung des Isoform spezifischen RACE Produktes
race clon 6/8 EcoRI ffw	ACGCTACGAATTCGAGCAGCAG GCATCATCCGA	Klonierung des Isoform spezifischen RACE Produktes
race clon 7/6 XhoI rev	ACGCTACCTCGAGTCCAGCACC AGCTGCTGCTC	Klonierung des Isoform spezifischen RACE Produktes
race clon 8/6 XhoI rev	ACGCTACCTCGAGGATGATGCC TGCTGCTCCAG	Klonierung des Isoform spezifischen RACE Produktes
hFOXP3 mut1 A11L ffw	CTGGCAAGCCCTCGCTCCCTTC CTTGCC	FOXP3 Mutation A11L
hFOXP3 mut1 A11L rev	GGCCAAGGAAGGGAGCGAGGG CTTGCCAG	FOXP3 Mutation A11L
hFOXP3 mut1 A11R ffw	CTGGCAAGCCCTCGCGCCCTTC CTTGCC	FOXP3 Mutation A11R
hFOXP3 mut1 A11R rev	GGCCAAGGAAGGGCGCGAGGG CTTGCCAG	FOXP3 Mutation A11R
hFOXP3 mute2 L74A ffw	GCAGCTGCCACAGCGCCCTA GTCATGG	FOXP3 Mutation L74A
hFOXP3 mute2 L74A rev	CCATGACTAGGGGCGCTGTGGG CAGCTGC	FOXP3 Mutation L74A
hFOXP3 mut2 A176L ffw	CTTCCCAAATCCCAGTCTACCC AGGAAGGACAGC	FOXP3 Mutation A176L

Fortsetzung Tabelle 4:		
Name	Sequenz (5' → 3')	Spezifität
hFOXP3 mut2 A176L rev	GCTGTCCTTCCTGGGTAGACTG GGATTGGGAAG	FOXP3 Mutation A176L
hFOXP3 mut2 A176R ffw	CTTCCCAAATCCCAGTCGACCC AGGAAGGACAGC	FOXP3 Mutation A176R
hFOXP3 mut2 A176R rev	GCTGTCCTTCCTGGGTAGACTG GGATTGGGAAG	FOXP3 Mutation A176R
Seq MIGR1 ffw 6146	CCGTCTCTCCCCCTTGAACCTCC TCG	Sequenzierung von MIGR1 vor IRES
Seq MIGR1 rev 55	ACATATAGACAAACGCACACCG GCC	Sequenzierung von MIGR1 vor IRES
Seq MIGR1 before NcoI ffw	CCGAACCACGGGGACGTGGT	Sequenzierung von MIGR1 nach IRES
Seq MIGR1 after Sall rev	GATTTTATTTAGTCTCCAG	Sequenzierung von MIGR1 nach IRES
Seq MIGR1 rev 1422	TGGCGTACTTAAGCTAGCTT	Sequenzierung von MIGR1 nach GFP
Seq FLAG ffw	ACCCTCACTAAAGGGAACAAAA GC	Sequenzierung von pCMV- Tag2
Seq FLAG rev	TAATACGACTCACTATAGGGCG AAT	Sequenzierung von pCMV- Tag2
Seq pcDNA ffw	GAGAACCCACTGCTTACTGGCT	Sequenzierung von pcDNA3.1+
Seq pcDNA rev	TGGCAACTAGAAGGCACAG	Sequenzierung von pcDNA3.1+
Seq pGBT9 ffw	GATGCCGTCACAGATAG	Sequenzierung von pGBT9
Seq pGBT9 rev	AAATCATAAGAAATTCGCCCG	Sequenzierung von pGBT9

2.1.5 Kits für biochemische Analysen und Isolationen

Amplifikation von komplementärer DNA (*complementary DNA*, cDNA) zur Bestimmung der relativen Transkription ausgewählter Genbereiche erfolgte mit *RealMasterMix* von Eppendorf (Hamburg, D).

Die Sequenzierung nicht translatierter cDNA Enden wurde mit Hilfe des *SMART RACE cDNA Amplification Kit* von Clontech (Mountain View, USA) durchgeführt.

Die Präparation von Plasmiden erfolgte mit *Genomed Jetstar* (Löhne, D), die Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen mit *Gel Extraction Wizard* von Promega (Madison, USA).

Endotoxinkonzentrationen wurden im Limulustest mittels *Limulus amoebocyte lysate assay QCL-1000* von Cambrex Bio Science (Walkersville, USA) ermittelt.

Die Isolation von bestimmten Zellpopulationen über Antikörper, gekoppelt an magnetische Partikel, wurde mittels *mouse bzw. human CD4+CD25+Regulatory T Cell Isolation Kit* von Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D) durchgeführt.

Die Lichtreaktion der Western Blot Membranen erfolgte mit *ECL Plus Western Blotting Detection Reagents* von Amersham Biosciences (Buckinghamshire, UK).

Die Proliferation bestimmter Zellpopulationen wurde anhand der Verdünnung des Fluoreszenzfarbstoffes Carboxy-Fluoreszein-diacetat-succinimidyl-ester (CFSE) im Durchflusszytometer bestimmt. Die Markierung der Zellen erfolgte mit Hilfe des *Vybrant CFDA-SE Cell Tracer Kit* von Invitrogen (Karlsruhe, D) nach den Angaben des Herstellers.

2.1.6 Versuchstiere

Für die tierexperimentellen Versuche in der vorliegenden Studie wurden Balb/c Mäuse, bezogen von der Firma Charles River (Sulzfeld, D), verwendet. Die Tiere wurden unter Standardbedingungen im Maushaus des Max-Delbrück-Zentrums (MDC) in Berlin gehalten: 21 °C ±2 °C; Nahrung und Wasser *ad libitum*; bis zu sechs Tiere in einem Mikroisolatorkäfig mit künstlichem 24 h Tag-Nacht-Zyklus. Alle verwendeten Mäuse waren 8-15 Wochen alt. Die Tierexperimente wurden in Übereinstimmung mit den deutschen Tierschutzrichtlinien durchgeführt.

2.1.7 Zelllinien und biologisches Material

Für Experimente, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, wurden folgende Zelllinien verwendet: Mausfibroblastenzellen NIH3T3, humane embryonale Nierenzellen (*human embryonal kidney*, HEK293T) und Platinum E-Zellen. Letztere sind transfizierte HEK293T Zellen, die eine ecotrope Virushülle herstellen, wenn sie mit einem retroviralen Vektor, inklusive Verpackungssignal (Ψ) transfiziert werden [167]. Diese Zellen werden mit Blasticidin (10 µg/ml) und Puromycin (1 µg/ml) selektioniert. Alle Zelllinien wurden bei 37 °C in DMEM Medium kultiviert (90 % Luftfeuchtigkeit und 10 % CO₂ bzw. 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ für NIH3T3). Primäre Zellen aus Lymphknoten und Milz der Maus bzw. humanes Blut von gesunden, freiwilligen Donoren wurde in RPMI Medium kultiviert (37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂).

2.1.8 Antikörper

Für die Analyse der Moleküle der Zelloberfläche und intrazellulärer Marker in Mauszellen (m) bzw. humanen (h) Zellen wurden Fluorophor-gekoppelte Antikörper der Firma AbD Serotec (Kidlington, UK), Becton Dickinson (San Diego, USA), Coulter (Fullerton, USA),

eBioscience (San Diego, USA), Immuno Tools (Friesoythe, D), Invitrogen (Karlsruhe, D), R&D Systems (Minneapolis, USA) und SigmaAldrich (St. Louis, USA) verwendet.

Als Fluorophor fungierten Fluorescein-isothiocyanat, Phycoerythrin (PE), Allophycocyanin und die Konjugate Peridinin Chlorophyll Protein (PerCP)-Cy5.5, PE-Cy7 und Allophycocyanin-Cy7. Biotinylierte Antikörper wurden mit den entsprechenden Fluorophor-Streptavidinen gefärbt.

Die Expression von Proteinen in Zelllysaten bzw. Immunpräzipitaten wurde mit Hilfe der Western Blot Antikörper der Firma Becton Dickinson (San Diego, USA) und eBioscience (San Diego, USA) nachgewiesen. Mit Meerrettich-Peroxidase (*horse raddish peroxidase*, HRP) gekoppelter, sekundärer Antikörper wurde von der Firma Dako (Glostrup, DK) bezogen und für die Western Blot Analysen verwendet.

Tabelle 5: Antikörper

<i>Spezifität</i>	<i>Klon</i>	<i>Hersteller</i>
α -mCD3	145.2C11	Becton Dickinson
α -mCD4	GK1.5	Becton Dickinson
α -mCD25	PC61	Becton Dickinson
α -mCD28	37.51	Becton Dickinson
α -mCD44	KM114	Becton Dickinson
α -mCD69	H1.2F3	Invitrogen
α -mCD152 (CTLA-4)	UC10-4F10-11	Becton Dickinson
α -mMDM2	SMP14	Becton Dickinson
α -mActin	AC-15	SigmaAldrich
α -mGITR	YGITR765	AbD Serotec
α -mGITR	BAF524	R&D Systems
α -hCD3	OKT3	eBioscience
α -hCD4	RPA-T4	Becton Dickinson
α -hCD25	M-A251	Becton Dickinson
α -hCD28	28.2	Becton Dickinson
α -hFOXP3 (auch α -mFoxp3)	FJK-16s	eBioscience
α -hFOXP3 (auch α -mFoxp3)	eBio7979	eBioscience
α -hFOXP3	PCH101	eBioscience
α -hMDM2	SMP14	Becton Dickinson
α -FLAG-Agarose	M2	SigmaAldrich
α -mImmunoglobulin	polyklonal	Dako

2.1.9 Geräte

Für die vorliegende Arbeit wurden folgende Geräte genutzt.

Tabelle 6: Geräte

<i>Gerät</i>	<i>Hersteller</i>
Bakterieninkubator Infors HAT	Multitron (Bottmingen, CH)
FACSCalibur	Becton Dickinson (San Jose, USA)
FACSCanto	Becton Dickinson (San Jose, USA)
FACS LSR II	Becton Dickinson (San Jose, USA)
FACS Vantage	Becton Dickinson (San Jose, USA)
FACS Aria	Becton Dickinson (San Jose, USA)
Fluoreszenzmikroskop CTR 6000	Leica (Wetzlar, D)
Gelelektrophoreseapparatur	Bio-Rad (Hercules, USA)
Gelimager	Biozym Diagnostics (Oldendorf, D)
I-Cycler	Bio-Rad (Hercules, USA)
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf (Hamburg, D)
Kühlzentrifuge Sorvall RC3C plus	Thermo Scientific (Waltham, USA)
MicroLumat Plus LB 96V	Berthold Australia Pty Ltd. (Bundoorra, AUS)
PCR-Cycler Mastercycler gradient	Eppendorf (Hamburg, D)
Plattenzentrifuge Heraeus Christ	Thermo Scientific (Waltham, USA)
SDS Gelelektrophorese Apparatur	Bio-Rad (Hercules, USA)
Spektrophotometer Ultraspec 3100 pro	Amersham Biosciences (Buckinghamshire, UK)
Sterilbank BDK	BDK (Sonnenbühl-Genkingen, D)
Tischzentrifuge Centrifuge 5415D	Eppendorf (Hamburg, D)
Transblot SD	Bio-Rad (Hercules, USA)
Zellinkubator	Labotect (Göttingen, D)
Zentrifuge GPR Centrifuge	Beckman Coulter (Fullerton, USA)
Zentrifuge Heraeus Varifuge 3.0R	Heraeus (Hanau, D)
Zentrifuge Heraeus Megafuge 1.0	Heraeus (Hanau, D)

2.1.10 Datenauswertung

Die Datenauswertung für diese Arbeit erfolgte mit Hilfe der folgenden Programme:

Tabelle 7: Software Programme

<i>Software</i>	<i>Hersteller</i>
BD FacsDiva	BD Bioscience (San Jose, USA)
CellQuest pro	BD Bioscience (San Jose, USA)
ChemiImager	Alpha Innotech (San Leandro, USA)
iCycler Software	Bio-Rad (Hercules, USA)
LASAF	Leica (Wetzlar, D)
Microsoft Office	Microsoft (Redmont, USA)

Fortsetzung Tabelle 7:

<i>Software</i>	<i>Hersteller</i>
pDraw32	Acaclone
Sigma Plot	SPSS (Chicago, USA)

2.1.10 Statistik

Alle Fehlerbalken in den Grafiken entsprechen der Standardabweichung. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels ungepaartem *student's* t-test, ein P-Wert kleiner als 0,05 (Abweichung von der Nullhypothese ist geringer als 5 %) wurde als statistisch signifikant erachtet.

2.2 Methoden**2.2.1 Gentechnologische Methoden****2.2.1.1 Polymerasekettenreaktion**

Amplifizierungen von Gensequenzen erfolgte mittels PCR: 5 µl 1x Pfu Puffer, 1 µl 10 mM Desoxynukleotidtriphosphat-Mix (dNTP), jeweils 1 µl 25 µM Primer, 0,5-1 µl Matrize (Plasmid bzw. cDNA), 1 µl Pfu Polymerase (Stratagene, Cedar Creek, USA), aufgefüllt auf 50 µl Gesamtvolumen. Der verwendete Standard-Reaktionszyklus lautet: 30 sek 95 °C, (1 min 95 °C, 1 min 58 °C, 1 min 72 °C) x 30, 15 min 72 °C, 4 °C.

2.2.1.2 Agarose Gelelektrophorese

Amplifizierte DNA und Plasmide, die zur Kontrolle mit Restriktionsenzymen behandelt wurden, wurden mit 10x Ladungspuffer versetzt und auf 0,8 %igen Agarosegelen aufgetragen. Ein 60 ml Agarosegel (inklusive 1x TAE Puffer) enthält 0,5 µg Ethidiumbromid. Die Elektrophorese wird für 1 h bei 90 V durchgeführt. DNA wurde mittels Gelimager unter UV-Licht (ca. 250 nm) zur Fluoreszenz angeregt. Die Bestimmung der Länge der DNA-Banden erfolgte durch den Vergleich mit entsprechenden DNA-Kontrollfragmenten (Invitrogen, Karlsruhe, D).

2.2.1.3 DNA-Extraktion

DNA, die anschließend extrahiert werden sollte, wurde auf Agarosegelen mit niedrigem Schmelzpunkt aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurden Produktbanden ausgeschnitten, erhitzt und mittels *Gel Extraction Wizard* (siehe Kapitel 2.1.5) gebunden. Nach Vakuumfiltration und zwei Waschschritten mit je 1 ml 80 % Isopropanol wurde die DNA mit 30 µl heißem H₂O eluiert.

2.2.1.4 Enzymatische DNA-Restriktionsspaltung und -Ligation

DNA wurde mittels Restriktionsenzymen (New England Biolabs NEB, Ipswich, USA) bei den vom Hersteller empfohlenen Pufferkonzentrationen und Temperaturen geschnitten, wobei jeweils 2 µg Vektor bzw. PCR-Produkt für 2 h inkubiert wurden. Plasmide wurden anschließend 30 min bei 37 °C mit Phosphatase (*calf intestinal alkaline phosphatase*) von NEB behandelt um spätere Re-Ligationen zu vermeiden. Linearisierte Plasmid-DNA wurde danach mittels Gelelektrophorese aufgereinigt, extrahiert und 1:10 verdünnt. Die Ligation erfolgte mit 1 µl 10x Ligase Puffer, 1 µl linearisierter Vektorlösung, 7 µl Insert und 1 µl Ligase über Nacht bei 16 °C.

2.2.1.5 Transformation

Bakterien (*E. coli*, TOP10/F, Invitrogen, Karlsruhe, D) wurden in tetrazyklinhaltigem LB-Medium (*lysogeny broth*) bis zu einer OD₆₀₀: 0,4 kultiviert und zweimal mit kalter Lösung aus 10 mM 2-[4-(2-sulfoethyl)piperazin-1-yl]ethansulfonat, pH: 7,0; 15 % (v/v) Glycerin und 6 mM CaCl₂ gewaschen und 30 min auf Eis inkubiert. Durch anschließendes Schockgefrieren in flüssigem N₂ wurden die Bakterien für die DNA-Aufnahme kompetent. Jeweils 70 µl dieser Bakterienlösung wurden mit dem Ligationsansatz 30 min auf Eis inkubiert, 90 sek bei 42 °C erhitzt und auf entsprechenden antibiotikahaltigen YT-Platten ausplattiert. Im Fall einer Kanamycin Resistenz wurden die Ansätze 1 h ohne Antibiotikum inkubiert, bevor sie ausplattiert wurden.

2.2.1.6 Mutagenese von DNA

Die zielgerichtete Mutation von Sequenzen erfolgte mittels PCR unter Einsatz von 10 ng Ursprungsvektor und geeigneter Primer (Schmelztemperatur 78 °C = 81,5 + 0,41 * (% GC) – 675 / Primerlänge - % Mutation). Das Protokoll der PCR-Reaktion lautete: 30 sek 95 °C, 12-18x (30 sek 95 °C, 1 min 55 °C, 2 min / kb 68 °C). Danach wurde der Ursprungsvektor 1 h

mit Methylierungs-sensitiver DpnI (NEB) abgebaut. Neu synthetisiertes, mutiertes Plasmid wurde anschließend transformiert.

2.2.2 Präparation von Zellsuspensionen

2.2.2.1 Präparation der Mauslymphozyten

Mäuse wurden mit Ether betäubt, durch Genickbruch getötet und anschließend mit 75 % Ethanol besprüht. Unter einer Sterilbank wurden die Milz und folgende Lymphknoten isoliert: superfizielle und profunde zervikale Lymphknoten, axillare und brachiale Lymphknoten, inguinale, lumbale und sacrale Lymphknoten. Das Gewebe wurde mit Hilfe eines Zellsiebs vorsichtig zerdrückt und in RPMI Medium aufgenommen und zentrifugiert (10 min, 1300 upm, 8 °C). Nach Inkubation in 3 ml Erythrozytenlysis Puffer für 3 min wurde die hypotonische Lyse durch 30 ml RPMI Medium gestoppt. Eventuell auftretende Verklumpungen wurden mit Hilfe einer Pasteurpipette entfernt. Nach einer weiteren Zentrifugation wurden die Zellen in MACS Puffer aufgenommen und die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ermittelt.

2.2.2.2 Präparation humaner mononukleärer Zellen aus Blut

Humanes Blut wurde von gesunden, freiwilligen Donoren gewonnen und in Gefäßen gesammelt, deren Wände zuvor mit 25000 IE Heparinlösung (Ratiopharm, Blaubeuren, D) benetzt wurden, um eine Koagulation zu verhindern. Je 35 ml Blut wurden vorsichtig auf 15 ml Ficoll (Amersham, Uppsala, S) geschichtet und zentrifugiert (30 min, 2000 upm, 20 °C, ohne Bremse). Lymphozyten der weißen Interphase wurden entnommen, mit RPMI Medium gewaschen und die Zahl der erhaltenen peripheren mononukleären Blutzellen (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ermittelt.

2.2.3 Antikörperfärbung

Zellen wurden sowohl im naiven als auch im aktivierten Zustand auf ihre Proteinexpression via Antikörperfärbung analysiert. Zur Aktivierung wurden Mauszellen über Nacht mit α -CD3 (Klon 145.2C11, 3 μ g/ml) und mit α -CD28 (Klon 37.51, 1,5 μ g/ml) beschichteten Platten inkubiert oder für 2 h mit 50 ng/ml Phorbol ester und 1 μ M Ionomycin versetzt. Die Anreicherung von intrazellulären Epitopen (z.B. CTLA-4) in Vesikeln erfolgte nach 6 h Inkubation mit Monensin (2,5 μ M) bzw. Brefeldin A (2 μ g/ml).

2.2.3.1 Antikörperfärbung von Oberflächenepitopen

Zellsuspensionen wurden im Puffer zur Antikörperfärbung aufgenommen und mit entsprechenden spezifischen Antikörpern bzw. unspezifischen Isotypen versetzt (10-20 ng/ml bei humanen Epitopen; 2,5-5 ng/ml bei Mausepitopen). Die Inkubation erfolgte für 20-30 min unter Lichtausschluss bei 4 °C. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (5 min, 1300 upm, 20 °C), zweimal gewaschen und gegebenenfalls mit einem sekundären Antikörper oder Streptavidin-Konjugat inkubiert.

2.2.3.2 Antikörperfärbung von intrazellulären Epitopen

Um die Expression intrazellulärer Proteine zu analysieren wurde in manchen Fällen nach der Oberflächenfärbung zusätzlich intrazelluläre Epitope gefärbt. Dafür wurden die Zellen zunächst für 20 min mit 2 % Paraformaldehyd fixiert, mit PBS gewaschen und 10 min mit Saponin Puffer behandelt. Dadurch wurde die Zellmembran für Antikörper durchlässig, die vorhergehende Vernetzung der Oberflächenstruktur mit Paraformaldehyd verhinderte dabei die völlige Lyse der Membranen. Nach Zentrifugation (5 min, 1300 upm, 20 °C) erfolgt die Antikörperfärbung in Saponin Puffer für 30 min unter Lichtausschluss bei 4 °C. Abschließend erfolgten jeweils zwei Waschschrte mit Saponin Puffer und PBS.

2.2.3.3 Intrazelluläre Färbung von FOXP3

Zur Färbung von FOXP3 wurde abweichend von der Methode bei den übrigen intrazellulären Epitopen die Lösungen der Firma eBioscience verwendet.

2.2.4 Fluoreszenz-aktivierte-Zellsortierung/Durchflusszytometrie

Die Analyse und Sortierung antikörpermarkierter Zellen erfolgte am Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierer (*Fluorescence activated cell sorting*, FACS). Zunächst wurde eine Zellsuspension in ca. 300 µl PBS aufgenommen, von Kapillaren der FACS-Geräte aufgesogen und in einzelne Tropfen zerlegt, die maximal eine Zelle beinhalteten. Diese Tropfen wurden in einer Messeinheit mit Licht bestrahlt, dessen Streulicht in Vorwärts-Streulicht (*forward scatter*, FSC) und Rechtwinkel-Streulicht (*sideward scatter*, SSC) detektiert wird. Der erste Parameter gibt dabei Auskunft über die Größe der Zelle, der zweite über deren Granularität. Darüber hinaus wurden die Fluorophore der Antikörper mit starkem monochromatischen Licht (*light amplification by stimulated emission of radiation*, Laser) angeregt. Die verwendeten Geräte waren mit Lasern der Wellenlänge 405 nm, 488 nm und

633 nm ausgestattet. Das emittierte Fluoreszenzlicht wurde von einer Reihe halbdurchlässiger Spiegel chromatisch aufgespaltet und von Photozellen (*Photomultiplier*, PMT) detektiert. Zur sicheren Unterscheidung der Fluorochrome wurde mit einfach gefärbten Zellen deren Spektralüberschneidung definiert und eine Kompensationsmatrix errechnet. Auf diese Weise wurde sichergestellt, dass die Signalintensität mit der spezifischen Expressionsstärke eines Proteins übereinstimmt. Für die Analyse wurden die Signale zuvor auf die Autofluoreszenz der entsprechenden Zellen bzw. die unspezifische Antikörperbindung der Isotypen normiert. Die Informationen über die Intensität der einzelnen Fluoreszenzen wurden in bilogarithmischen Graphen dargestellt und analysiert.

Die ermittelten Parameter ermöglichten darüber hinaus eine Separation bestimmter Zellpopulationen, indem eine elektrostatische Auslenkung den Zelltropfen in ein definiertes Gefäß mit Puffer fallen ließ. Diese Zellsortierung wurde jeweils mittels Durchflusszytometrie reanalysiert und erreichte eine Reinheit der Zellpopulationen von über 90%. FACS-aufgereinigte Zellen wurden für eine spätere Kultivierung mit Gentamycin (1 mg/ml) versetzt.

2.2.5 Magnetische Zellsortierung

Eine Alternative zum FACS, ist die magnetische Sortierung der Zellen (*magnetic cell sorting*, MACS). Bei diesem Verfahren binden spezifische Antikörper oder Streptavidinmoleküle, die mit ferromagnetischen, kolloidalen Partikeln konjugiert sind (MicroBeads) an ihr Epitop bzw. Biotin. Wenn eine derart markierte Zelle einem starken Magnetfeld ausgesetzt ist, bleibt sie hängen, während nicht markierte Zellen in einem laminaren Strom den Magneten passieren können. Für diese Arbeit wurden Treg Zellen von Maus und Mensch mit den entsprechenden Antikörperlösungen von Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D) aufgereinigt (siehe Kapitel 2.1.5). Zunächst wurden dabei alle nicht-CD4⁺ Zellen mit Biotin-Antikörpern markiert, dann mit Anti-Biotin MicroBeads inkubiert und schließlich durch magnetische Separation entfernt. Aus der so erhaltenen CD4⁺ T-Zellpopulation wurden anschließend durch α -CD25-PE Antikörper und α -PE-MicroBeads Treg Zellen isoliert. Inkubations- und Waschschrte erfolgten gemäß den Herstellerangaben. Bei allen MACS Aufreinigungen wurde eine Reinheit von 94-99 % erreicht.

2.2.6 Isolation von Ribonukleinsäure-Transkripten

Um die isolierten Zellpopulationen (siehe Kapitel 2.2.4 & 2.2.5) auf die Transkription bestimmter Gene zu untersuchen, wurden die Zellen zentrifugiert (5 min, 13000 upm, 20 °C) und das Pellet in Trizol (1 ml / $5 \cdot 10^6$ Zellen) lysiert. Nach einer Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur wurden 200 µl Chloroform hinzugegeben, geschüttelt und weitere 3 min inkubiert. Danach erfolgte eine Zentrifugation (15 min, 12000 upm, 5 °C) und die Isolierung der oberen Phase. Ribonukleinsäure wurde nach Zugabe von 0,5 ml Isopropanol bei -20 °C über Nacht gefällt. Eine Zentrifugation (10 min, 12000 upm, 5 °C) ergab ein weißes Pellet, wobei linearisiertes Polyacrylamid gegebenenfalls die Visualisierung des Präzipitats verbesserte. Nach zwei Waschschrinen mit kaltem 75 % Ethanol wurde die Probe getrocknet und anschließend in RNase freiem H₂O aufgenommen (20 µl / $1 \cdot 10^6$ Zellen). Um die Löslichkeit zu erhöhen, wird dabei die Probe mehrmals abwechselnd für 5 min auf 65 °C erhitzt und 5 min lang geschüttelt. Die Konzentration und der Absorptionsquotient $A_{260/280}$ (idealerweise < 1,6) wurden photometrisch bestimmt. Ribonukleinsäure wurde bei -20 °C oder -80 °C gelagert.

2.2.7 Präparation von cDNA

Ribonukleinsäure wurde mit Hilfe der Reversen Transkriptase Superscript II (Invitrogen, Karlsruhe, D) in cDNA umgeschrieben. Hierfür wurden 10 µl Ribonukleinsäurelösung (entsprechend ca. 1-5 µg) mit 1 µl Oligo-dT-Mix, bestehend aus CT₁₇/GT₁₇/AT₁₇ (0,5 µg / 1 µg RNA) 5 min bei 65 °C inkubiert, danach auf Eis 4 µl 5x Puffer, 2 µl 0,1 M Dithiothreitol, 1 µl RNase Out und 1 µl 10 mM dNTP addiert und 2 min bei 42 °C inkubiert. Nach der Zugabe von 1 µl Reverser Transkriptase startete die Reaktion bei 42 °C für 50 min und weiteren 15 min bei 72 °C. Abschließend wird die Ribonukleinsäure mit RNase H (Invitrogen, Karlsruhe, D) verdaut (20 min, 37 °C). cDNA wurde bei -20 °C oder -80 °C gelagert.

2.2.8 *Realtime* RT-PCR

Die Methode der *Realtime* (Echtzeit) RT-PCR ermöglicht die relative Quantifizierung der Gentranskripte verschiedener Zellpopulationen zueinander. Hierfür wurde die cDNA im Beisein von SYBR-Green, einem Fluoreszenzfarbstoff, der in doppelsträngige DNA interkaliert, amplifiziert. Durch Anregung mit Licht der Wellenlängen 475-495 nm emittierte SYBR-Green Fluoreszenzlicht von 522 nm und signalisierte so die Produktion

doppelsträngiger DNA. Die initialen PCR-Zyklen, bei denen zum ersten Mal PCR-Produkte für verschiedene Gene detektiert wurden, sind charakteristisch für das Expressionsmuster der untersuchten Zellpopulation. Nach der Bestimmung des Grenzyklus (*threshold cycle*, Ct) für ein gegebenes Transkript wurden die Differenzzyklen zu ein oder zwei ubiquitär exprimierten Genen (*housekeeping genes*) errechnet (ΔCt). Als *housekeeping genes* wurden Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT) und Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet. Auf diese Weise wurden die Proben normiert, so dass unterschiedliche Zellzahlen bzw. cDNA-Konzentrationen in den zu vergleichenden Populationen keinen Einfluss auf die Ct-Werte haben. Die Differenz der ΔCt -Werte der Populationen ($\Delta\Delta\text{Ct}$) ergibt den relativen Expressionsunterschied nach der Formel $R = 2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$.

Der 20 μl Reaktionsansatz enthält 9 μl 2,5x *RealMasterMix* / 20x SYBR Solution (siehe Kapitel 2.1.5), 0,2 μl Kalibrierungsfarbstoff (*Calibration Dye*) (Bio-Rad, Hercules, USA), 0,6 μl Primer-Mix (25 μM) und 0,5 μl cDNA (siehe Kapitel 2.2.7). Alle Ansätze wurden in Duplikaten oder Triplikaten gemessen. Nach der Amplifizierung erfolgte eine Analyse des Produktes mit Hilfe einer Gradienten-Schmelzkurve. Die gesamte Reaktion erfolgte im iCycler nach folgendem Schema: 2 min 95 °C, 55x (15 sek 95 °C, 45 sek 58 °C, 30 sek 68 °C), 1 min 95 °C, 1 min 55 °C, 80x (10 sek 55 °C + 0,5 °C). Alle PCR-Produkte wurden zur Kontrolle auf einem Agarosegel elektrophoretisch getrennt.

2.2.9 Transfektion

2.2.9.1 Transfektion mit Fugene

Eine Transfektion mittels Fugene-6 (Roche, Basel, CH) wurde mit Platinum E und HEK293T Zellen durchgeführt. Pro Ansatz (entsprechend $0,5-1 \cdot 10^6$ Zellen in einer 6-Kammer-Platte) wurden 4 μg Plasmid-DNA in 50 μl Opti-MEM (Invitrogen) verdünnt, sowie 12 μl Fugene in 238 μl Opti-MEM Medium. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wurde die DNA-Lösung langsam in die Fugene-haltige Lösung hineingetropt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, um eine allmähliche DNA-Präzipitatbildung zu ermöglichen. Danach wurde der Transfektionsansatz direkt auf frisches Zellmedium getropft. Die adhären Zellen hatten zu diesem Zeitpunkt idealerweise eine Konfluenz von ca. 80 % erreicht. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt, in den weiteren 24-72 h exprimierten die Zellen die transfizierten Gene. Transfizierte HEK293T Zellen wurden für Western Blot Analysen und Fluoreszenzmikroskopie verwendet, Platinum E Zellen lieferten ecotropen Virusüberstand.

2.2.9.2 Transfektion mit Kalziumphosphatpräzipitation

HEK293T Zellen mit einer Konfluenz von ca. 80 % wurden mit Hilfe der Kalziumphosphatpräzipitation transfiziert. In einem Polystyrol-Röhrchen wurden insgesamt 18 µg Plasmid-DNA in 150 µl 250 mM CaCl₂ verdünnt und unter ständigem Durchmischen der Lösung 150 µl Transferpuffer hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei Raumtemperatur wurde der Transfektionsansatz zu den Zellen getropft, nach 6 h wurde kurz mit PBS gewaschen und das Medium gewechselt. Durch die Transfektion mit retroviralen Vektoren (MIGR1) und Expressionsplasmiden von viralen Hüll- und Strukturproteinen (MLV, 10A1) wurden in HEK293T Zellen amphotrope Viren hergestellt, die 72 h später zur Transduktion humaner CD4⁺ T-Zellen verwendet wurden.

2.2.9.3 Transfektion mit Lipofectamine

NIH3T3 Zellen wurden mit Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Karlsruhe, D) transfiziert. Hierfür wurden jeweils 1 µg DNA und 1 µl Lipofectamine in 50 µl Opti-MEM verdünnt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden beide Lösungen vereinigt, weitere 25 min inkubiert und anschließend zum Zellmedium getropft. Die Transfektion erfolgte in einer 12-Kammer-Platte mit ca. 80 % konfluenten Zellen. Nach 12 h wurde das Medium gewechselt, nach insgesamt 48 h wurden die Zellen im Luciferase Reporter Assay analysiert.

2.2.10 Luciferase Reporter Assay

Die Verstärkung oder Repression transkriptioneller Aktivität wurde mit Hilfe von Luciferase Reporter Assay Vektoren analysiert, die zusammen mit dem Zielgen und einer internen Kontrolle in NIH3T3 Zellen transfiziert wurden (siehe Kapitel 2.2.9.3). Die DNA-Lösungen wurden dafür mit TritonX-114 von Endotoxin befreit, um einen exogenen Effekt auf die Transkription zu vermeiden. Nach Zugabe von 1 % (v/v) TritonX-114 wurden die Proben 15 min auf Eis ruhen gelassen, danach gut durchmischt und 15 min bei 37 °C inkubiert. Daraufhin erfolgten eine einminütige Zentrifugation bei 13000 upm und 37 °C und die sofortige Abnahme der oberen Phase. Die Prozedur wurde solange wiederholt bis eine Endotoxinkonzentration unter 30 IE/µl erreicht wurde, was mittels Limulustest (Cambrex Bio Science, Walkersville, USA) (siehe Kapitel 2.1.5) bestimmt wurde.

Der 1 µg DNA-Mix für die Transfektion wurde nach dem Schema 1:10:50 (*Renilla*, Reporteragen, Zielgen) angesetzt, für Kontrollen wurden entsprechende Mengen Leervektor (pcDNA3.1+) verwendet. Pro Ansatz wurden drei Proben transfiziert.

Die transfizierten Zellen wurden nach zwei Tagen mit 50 µl 1x Lysispuffer (Promega, Madison, USA) resuspendiert und die Lysate zentrifugiert (1 min, 13000 upm, 20 °C). Es wurden Triplikate des Zellextraktes analysiert und jeweils 10 µl in weiße Luminometer-Platten transferiert. Vor jedem Versuch wurde der Luciferase Puffer 1:1 mit Wasser verdünnt und 270 µM CoenzymA (AppliChem, Darmstadt, D) und 200 µM D-Luciferin (Synchem, Felsberg, D) versetzt. Der *Renilla* Puffer wurde ebenfalls 1:1 mit Wasser verdünnt und erhielt zusätzlich eine Mischung aus 50 µM 2-(4-Aminophenyl)-6-Methylbenzothiazol als reversibler Luciferaseinhibitor und 2,2 µM Coelenterazin (Synchem, Felsberg, D). Die Messung der Luciferaseaktivitäten erfolgte luminometrisch, wobei beide Lichtreaktionen über ein 10 sek Intervall gemessen wurden. Der Abstand zwischen den Einzelmessungen betrug 1,6 sek. Die interne Transfektionskontrolle über die unabhängige *Renilla* Expression ermöglichte die Normierung der Daten.

2.2.11 Retroviraler Gentransfer

2.2.11.1 Transduktion in Mauszellen

$2 \cdot 10^6$ aufgereinigte CD4⁺ T-Zellen der Maus (siehe Kapitel 2.2.5) wurden über Nacht mit $0,5 \cdot 10^6$ bestrahlten APC (30 Gy) und 100 IE/ml IL-2 in 24-Kammer-Platten, die vorher mit 0,5 µg/ml α-mCD3 (Klon 145.2C11) beschichtet wurden, inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium bis auf 0,5 ml entfernt und virushaltiger Überstand von transfizierten Platinum-E Kulturen addiert (siehe Kapitel 2.2.9.1), der zuvor durch Filtration mit 0,45 µm Sterilfiltern von Zellen gereinigt wurde. Das Medium wurde mit 7 µg/ml Polybrene versetzt und die Zellen bei 1800 upm für 1,5 h zentrifugiert. Am darauf folgenden Tag wurde die Zentrifugation mit neuem Virusüberstand wiederholt, außer dem Polybren wurden noch 10 IE/ml IL-2 addiert. Für die spätere Kultivierung wurde jeden zweiten bis dritten Tag das RPMI Medium ersetzt. Die transduzierten Gene wurden nach ca. 72 h exprimiert.

2.2.11.2 Transduktion in humanen Zellen

24-Kammer-Platten wurden mit 5 µg/ml α-hCD3 (Klon OKT3) und 1 µg/ml α-hCD28 (Klon 28.2) in 0,5 ml PBS für 2 h bei 37 °C beschichtet. Danach wurden die Kammern mit 2 % (w/v) bovines Serumalbumin (BSA) in H₂O 30 min bei 37 °C inkubiert und mit PBS gewaschen. In diesen beschichteten 24-Kammer-Platten wurden 2*10⁶ aufgereinigte humane CD4⁺ T-Zellen (siehe Kapitel 2.2.5) über Nacht mit 2 ml RPMI Medium inklusive 100 IE/ml IL-2 kultiviert. Nach zwei Tagen wurden pro Ansatz insgesamt 6 ml virushaltiger Überstand von HEK293T Zellen gesammelt und mit 0,45 µm Sterilfiltern zellfrei filtriert (siehe Kapitel 2.2.9.2). Von den proliferierenden Zellen wurde 1 ml Medium entfernt und durch 1 ml virushaltigen Überstand ersetzt, der übrige Virusüberstand wurde bis zum nächsten Tag eingefroren. Danach wurden die Zellen mit 4 µg/ml Protaminsulfat und 100 IE/ml IL-2 für 1,5 h bei 2000 upm und 37 °C zentrifugiert. Pro Ansatz wurden drei Kammern einer 24-Kammer-Platte mit 12,5 µg/ml Retronectin (Takara, Otsu, J) 2 h bei Raumtemperatur beschichtet, mit 0,5 ml 2 % (w/v) BSA in PBS 30 min bei 37 °C inkubiert und mit 2 ml 2,5 % (v/v) 1 M HEPES in PBS bei 4 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen auf diese vorbehandelten 24-Kammer-Platten verteilt und die Zentrifugation wie am Vortag wiederholt. Für die spätere Kultivierung wurde jeden zweiten bis dritten Tag das RPMI Medium ersetzt. Die transduzierten Gene wurden nach ca. 72 h exprimiert.

2.2.12 Western Blot Analyse

Die Proteinexpression von sortierten bzw. transfizierten oder transduzierten Zellen (siehe Kapitel 2.2.4, 2.2.5, 2.2.9 und 2.2.11) wurde mit Hilfe des Western Blot Verfahrens untersucht. Die Zellen wurden mit Western Blot Probenlysispuffer zum Proteinnachweis bzw. Kopräzipitation aufgenommen und für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte eine Zentrifugation (5 min, 13000 upm) um Membranreste zu entfernen. In einigen Fällen wurde der Proteingehalt der Lysate bestimmt. Dazu wurde eine Standardkonzentrationsreihe BSA in *roti-Quant* hergestellt (1-5 µg/ml) und die OD bei 595 nm gemessen; aus dem Wert der Zelllysate (5 µl/ml *roti-Quant*) wurde die Proteinkonzentration anhand der Standardkurve errechnet. Die Lysate wurden mit 6x Western Blot Ladungspuffer versetzt und 10 min bei 95° C denaturiert.

Die 10 %igen SDS-Gele, bestehend aus Western Blot Laufgel (1 h Polymerisation, 100 µl Butanol überschichtet) und Western Blot Sammelgel (10 min Polymerisation), wurden für die Elektrophorese der Lysate verwendet. Die Proteine wurden der Masse nach im Western Blot

Laufpuffer für 10 min bei 90 V und weiteren 45 min bei 160 V separiert. Anschließend wurden die Proteine auf eine Immobilon P Membran aus Polyvinylidenfluorid (Millipore, Billerica, USA) übertragen, die kurz zuvor in Methanol und Western Blot Übertragungspuffer gewaschen wurde. Zwischen die Elektroden eines Transblot SD wurden dafür in Western Blot Übertragungspuffer getränktes Filterpapier (Bio-Rad, Hercules, USA), Membran, Gel und erneut Filterpapier geschichtet, eventuelle Luftblasen herausgestrichen und 1 h bei 0,8 mA/cm² die Proteine mobilisiert. Anschließend wurde die Membran in PBS-T sechsmal gewaschen, 20 min in Western Blot Lösung geblockt, sechsmal mit H₂O gewaschen und über Nacht bei 4 °C mit dem primären Antikörper in Western Blot Lösung inkubiert. Danach erfolgten drei Waschschrte über jeweils 5 min mit PBS-T und die Inkubation mit dem sekundären Antikörper für 1 h in Western Blot Lösung. Unspezifische Bindungen wurden durch jeweils fünfminütige Waschschrte mit dreimal PBS-T, zweimal PBS und einmal H₂O entfernt. Die durch HRP katalysierte Lichtreaktion wurde nach Zugabe von Substrat- und Reagenzlösung (siehe Kapitel 2.1.5) gestartet. Die Membran wurde nach 5 min Inkubation in durchsichtige Folie gewickelt und überschüssiges Substrat herausgedrückt. Abschließend wurden die Signale von einem lichtsensiblen Film *BioMax XAR* (SigmaAldrich, St. Luis, USA) detektiert. Für eine weitere Proteindetektion können die Antikörperkomplexe durch einen Puffer entfernt werden (0,2 M Glycin, 0,1 % (w/v) SDS, 1 % (v/v) Tween, pH: 2,2). Durch zweimalige Inkubation der Membran für 10 min und anschließendem Waschen mit PBS, PBS-T und der Rehydrierung mit Methanol kann die Membran erneut geblockt und mit primären Antikörpern inkubiert werden.

2.2.13 Suppressionsassay

Retroviral transduzierte Zellen können anhand ihrer Markergene GFP bzw. CFP, deren Expression durch die IRES Sequenz mit der vom Zielgen gekoppelt ist, sortiert werden und auf ihre suppressiven Kapazitäten *in vitro* getestet werden. Als Vergleich dienen frisch isolierte CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg Zellen. Im Suppressionsassay werden die isolierten Zellen (siehe Kapitel 2.2.4 & 2.2.5) im Beisein von α -CD3 (Klon 145.2C11, 3 μ g/ml) und bestrahlter APC (30 Gy) mit frisch isolierten CD4⁺CD25⁻ T-Zellen in 96-Kammer-Platten mit V-Boden kokultiviert. Pro Kammer werden $5 \cdot 10^4$ APC, $2,5 \cdot 10^4$ CD4⁺CD25⁻ T-Zellen und variable Mengen an transduzierten Zellen bzw. Treg Zellen in 200 μ l RPMI Medium gegeben. Die Proliferation der CD4⁺CD25⁻ T-Zellen wird anhand der Verdünnung des Fluoreszenzfarbstoffes CFSE (siehe Kapitel 2.1.5) bestimmt, wobei die Ausgangspopulation

durch die kovalente Bindung des Moleküls an Zellproteine die stärkste Fluoreszenzintensität hat. Nach einer Zellteilung werden die gefärbten Moleküle zwischen den Tochterzellen aufgeteilt, der Farbstoff verliert um den Faktor 2 an Intensität. Die Analyse der Proliferation markierter CD4+CD25- T-Zellen erfolgte 72-96 h nach Beginn der Kokultivierung im Durchflusszytometer.

2.2.14 Analyse von Protein-Protein-Interaktionen

2.2.14.1 Koimmunpräzipitationen

Zum Nachweis von Proteinkomplexen wurden Zellen mit mehreren Plasmiden kotransfiziert und die Interaktion der überexprimierten Proteine mittels Koimmunpräzipitation detektiert. Transfizierte Zellen (siehe Kapitel 2.2.9.1) wurden im pH-neutralen, isotonischen Western Blot Probenlysispuffer zur Kopräzipitation aufgeschlossen und von Membranresten durch kurze Zentrifugation (5 min, 13000 upm) befreit. Im Fall einer Protein G Agarose-Präzipitation wurde das Lysat 1 h mit 100 µl/ml Protein G Agarose auf Eis vorinkubiert um unspezifische Bindungen zu vermeiden. Die Protein G Agarose wurde vor der Anwendung zweimal mit Western Blot Probenlysispuffer zur Kopräzipitation gewaschen (10 µl Puffer / 1 µl Protein G). Die Dimerisierung von FOXP3 Isoformen wurde durch die Bindung eines Antikörpers, spezifisch für die Region des Exons 2 nachgewiesen (Klon FJK-16s). Da den beiden anderen Isoformen Exon 2 fehlt, konnten Komplexe nur über das 11 Exon lange FOXP3 gebunden werden. Die Inkubation mit dem Antikörper (15 µg/ml) erfolgte für 1 h bei 4 °C, danach wurden 100 µl/ml Protein G Agarose addiert und erneut 1 h bei 4 °C inkubiert. Alternativ wurden Proteinkomplexe isoliert, indem ein transfiziertes Plasmid für ein N-terminales FLAG-Fusionsprotein kodierte. Das FLAG-Epitop (Aminosäuresequenz: DYKDDDDK) wurde mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers, der an Agarosepartikel gebunden ist, erkannt (Klon M2). Auf diese Weise konnten Proteine, die mit dem FLAG-markierten Protein stabile Komplexe bilden, abzentrifugiert und von dem restlichen Zelllysate getrennt werden. Die Inkubation mit α-FLAG Agarose erfolgte ebenfalls 1 h bei 4 °C. Antikörpermarkierte Proteinkomplexe wurden daraufhin abzentrifugiert (30 sek, 1000 upm), der Überstand als Transfektionskontrolle abgenommen und das Präzipitat mit 300 µl eiskaltem Western Blot Probenlysispuffer zur Kopräzipitation gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (30 sek, 1000 upm) wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und verworfen, dieser Waschschrift wurde insgesamt sechsmal durchgeführt. Danach wurden die

Proben mit 6x Western Blot Ladungspuffer versetzt, 10 min bei 95 °C denaturiert und im Western Blot analysiert (siehe Kapitel 2.2.12).

2.2.14.2 Proteinkomplexe aus Fusionsproteinen in Hefe (*Yeast-2-Hybrid*)

Studien an eukaryotischen Transkriptionsfaktoren zeigten, dass die unabhängige Expression zweier funktionaler Domänen vom Hefegen *Gal4-activator-protein* die transkriptionelle Aktivierung auch dann reguliert, wenn beide Domänen mit Proteinen fusioniert werden, die *in vivo* miteinander interagieren [168]. Zur Untersuchung von Proteinkomplexen wurden Hefezellen mit einer Auswahl von Fusionsproteinen transfiziert, die aus gewebespezifischer cDNA generiert wurden. Die Fusionsproteine enthielten alle die Gal4 Transkriptionsaktivierungsdomäne (A-Domäne, Aminosäuren 771-881) und ein internes Kernlokalisierungssignal und wurden unter der Kontrolle des Promotors der konstitutiven Alkoholdehydrogenase-1 (ADH1) exprimiert. Ermöglichte man die physikalische Interaktion dieser Fusionsproteine mit Fusionsproteinen aus der Gal4 DNA-Bindungsdomäne (B-Domäne, Aminosäuren 1-147) und einem Zielgen wurde der Promotor des Galaktosidasegens aktiviert und ein Selektionsmarker (meist ein Gen, das der Hefe ein Wachstum auf Mangelnährböden ermöglicht) wurde exprimiert. Die B-Domäne kann dabei nur mit der A-Domäne wechselwirken, wenn das Zielgen mit dem Protein aus der cDNA einen Komplex bildet. Dieses Prinzip zweier Hefehybridmoleküle (*yeast-2-hybrid*, Y2H) wurde angewandt um Isoform-spezifische Bindungspartner von FOXP3 zu erkennen. Die drei Varianten wurden in das Plasmid pGBT9 kloniert, was eine Expression des Fusionsproteins B-Domäne-FOXP3 unter der Kontrolle des ADH1-Promotors in transfizierten Hefezellen ermöglicht. Erfolgreich transfizierte Hefezellen konnten durch ein Markergen auf Tryptophan-armen Nährböden selektioniert werden. Die Y2H-Versuche wurden von Dr. Manfred Koegl im Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg (DKFZ) durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 FOXP3 Isoformen in humanen Treg Zellen

3.1.1 Transkription und Expression von FOXP3 Isoformen

Bei der Klonierung des FOXP3 Gens aus cDNA, generiert aus humanen CD4+CD25+ Treg Zellen, wurden drei Isoformen des Transkriptionsfaktors nachgewiesen. Eine Sequenzierung der Klone ergab, dass das Genprodukt in den Zellen in voller Länge (FOXP3) und als Spleißvariante ohne Exon 2 (FOXP3 Δ 2) präsent gewesen ist, wie es bereits aus der Literatur bekannt war [125]. Darüber hinaus wurde jedoch noch eine dritte Isoform gefunden, bei der neben Exon 2 auch Exon 7 durch alternatives Spleißen entfernt wurde (FOXP3 Δ 2 Δ 7). Im Verlauf dieser Arbeit wurde dies auch von Smith *et al.* beobachtet und publiziert [169]. Interessanterweise konnte in neuesten Veröffentlichungen gezeigt werden, dass FOXP3 Δ 2 Δ 7 in Brustkarzinomzellen stärker transkribiert wird [162] und in malignen T-Zellen des Sézary Syndroms neben FOXP3 Δ 2 überwiegend FOXP3 Δ 2 Δ 7 exprimiert wird [163].

Abbildung 3 zeigt schematisch die Lage der Primer und die Ergebnisse der RT-PCR aus humanen CD4+CD25+ T-Zellen, die für diese Analyse mittels MACS Isolation aufgereinigt wurden. Die amplifizierten Produkte haben eine Größe von 231 Nukleotiden (nt) (FOXP3), 126 nt (FOXP3 Δ 2), 240 nt (FOXP3 & FOXP3 Δ 2) und 159 nt (FOXP3 Δ 2 Δ 7) und sind in Abbildung 3B gezeigt. Eine exemplarische Darstellung der RT-PCR Daten für die drei FOXP3 Isoformen und des *housekeeping genes* GAPDH zeigt Abbildung 3C. Die Verteilung der FOXP3 Isoformen auf Transkriptionsebene ist für fünf verschiedene Donoren in Abbildung 3D dargestellt.

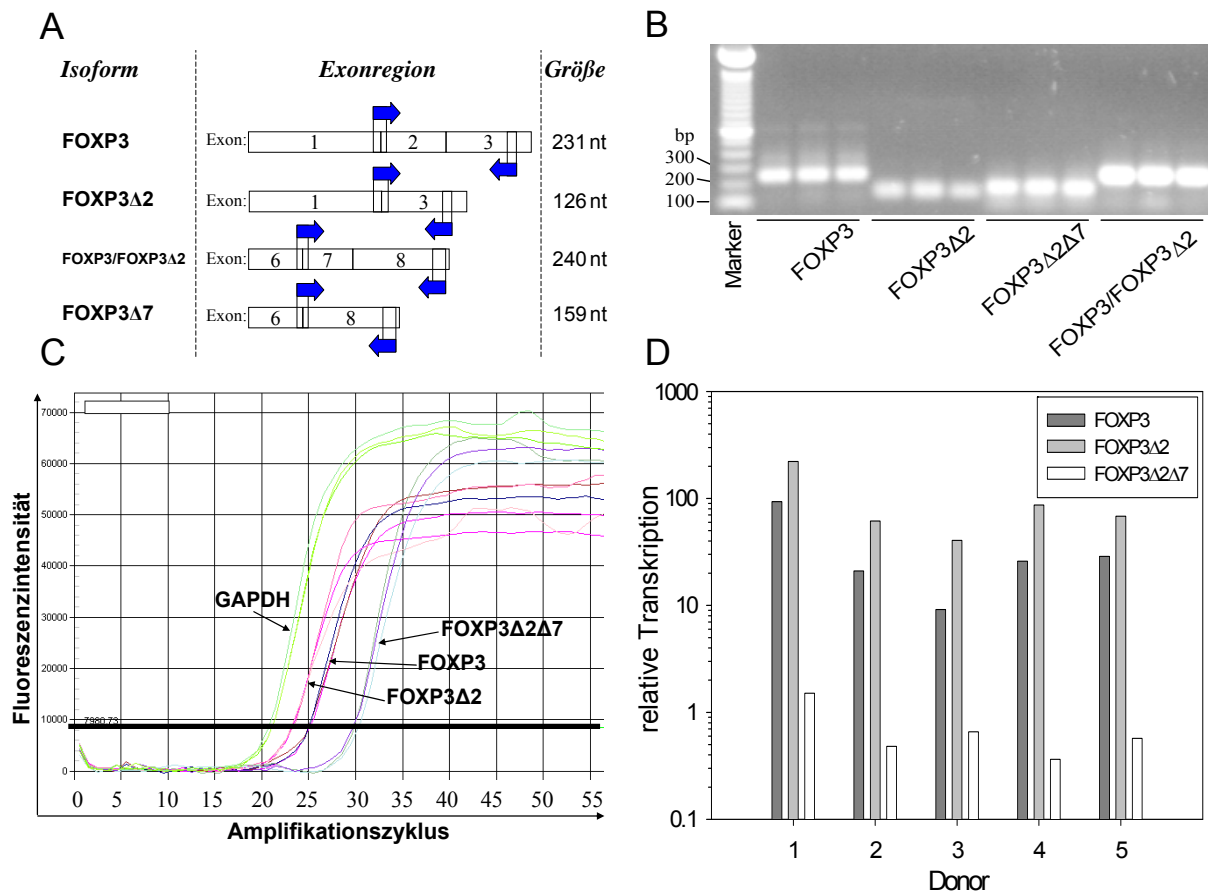


Abbildung 3: Isoformen von FOXP3 in humanen Treg Zellen

Realtime RT-PCR von CD4+CD25+ MACS isolierten T-Zellen aus humanem Blut. A) Schematische Darstellung der alternativ gespleißten Exonregionen und der verwendeten Primerpaare, die errechnete Anzahl der Nukleotide (nt) ist für jedes RT-PCR Produkt aufgelistet. B) Agarose Gelelektrophorese der RT-PCR Produkte mit den Primerpaaren aus A). C) Exemplarische Darstellung der RT-PCR Quantifizierungskurven von FOXP3 Isoformen und dem *housekeeping gene* Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Die Transkripte einer Probe sind in Triplikaten gemessen worden. D) Fünf Donoren wurden auf die differentielle Transkription von FOXP3 (dunkle Balken), FOXP3 Δ 2 (helle Balken) und FOXP3 Δ 2 Δ 7 (weiße Balken) untersucht.

Die Analyse der RT-PCR Produkte in der Gelelektrophorese in Abbildung 3B zeigt, dass die jeweilige Länge mit der errechneten Anzahl an Nukleotiden aus Abbildung 3A übereinstimmt. Wie aus Abbildung 3C und 3D ersichtlich, wird in allen fünf untersuchten Proben FOXP3 Δ 2 ungefähr zwei- bis dreimal stärker transkribiert als FOXP3. Die neue Isoform FOXP3 Δ 2 Δ 7 wird verglichen mit FOXP3 15 bis 70 Mal geringer transkribiert. Die individuelle Transkriptionsstärke variiert allgemein um den Faktor zehn.

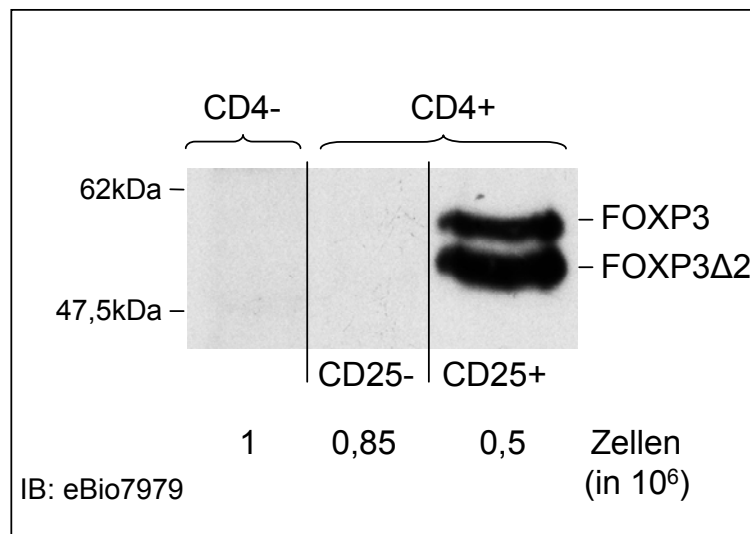


Abbildung 4: Expression von FOXP3 Isoformen in CD4+CD25+ T-Zellen

Western Blot Analyse von humanen PBMC nach MACS Isolation. $1 \cdot 10^6$ CD4- Zellen (Granulozyten, B-Zellen und CD8+ T-Zellen), $8,5 \cdot 10^5$ CD4+CD25- T-Zellen und $5 \cdot 10^5$ CD4+CD25+ T-Zellen wurden im Immunblot (IB) mit Hilfe eines Isoform-unspezifischen α -FOXP3 Antikörperklons (Klon eBio7979) untersucht.

Eine exemplarische Western Blot Analyse, gezeigt in Abbildung 4, verdeutlicht, dass die Expression des Transkriptionsfaktors FOXP3 in humanen, unstimulierten PBMCs auf die CD25+ Zellpopulation der CD4+ T-Zellen begrenzt ist. Weder $1 \cdot 10^6$ Zellen der CD4- Population, hauptsächlich bestehend aus Granulozyten, B-Zellen und CD8+ T-Zellen, noch $8,5 \cdot 10^5$ CD4+CD25- T-Zellen exprimieren eine der beiden FOXP3 Isoformen. Im Gegensatz dazu sind bei $5 \cdot 10^5$ CD4+CD25+ T-Zellen die Isoformen FOXP3 (ca. 58 kDa) und FOXP3 Δ 2 (ca. 54 kDa) klar erkennbar. Eine genauere Analyse von $1,6 \cdot 10^6$ bzw. $9 \cdot 10^5$ FACS isolierten CD8+ bzw. CD19+ Zellen (CTL- und B-Zellpopulation) bestätigte, dass keine der FOXP3 Isoformen von CD8+ T-Zellen oder B-Zellen exprimiert wird (Daten nicht gezeigt). Die spezifische Expression von FOXP3 in CD4+CD25+ T-Zellen stimmt mit dem gut dokumentierten charakteristischen Phänotyp der Treg Zellen in naiven PBMC überein [67]. Die tatsächliche Expression der Isoformen des Transkriptionsfaktors spiegelt dabei die beobachtete Verteilung bei der RT-PCR Analyse gut wider. So wurde im Western Blot häufig etwas mehr FOXP3 Δ 2 als FOXP3 detektiert, während FOXP3 Δ 2 Δ 7 im Western Blot nicht beobachtet werden konnte. Durch eine Titration von MACS isolierten, humanen CD25+ Zellen konnte eine Detektionsgrenze des Isoform-unspezifischen Antikörperklons eBio7979 mit $5 \cdot 10^4$ Zellen im Western Blot ermittelt werden (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der

Verhältnisse der FOXP3 Transkripte wäre damit eine Auftragung von bis zu $3,5 \cdot 10^6$ humanen CD25+ Zellen im Western Blot notwendig, um die entsprechende Bande detektieren zu können. Die starke Überladung des SDS-Gels und die Überblendung mit FOXP3 und FOXP3 Δ 2 Banden verhindern jedoch die Proteindetektion von FOXP3 Δ 2 Δ 7. Eine vor kurzem veröffentlichte Studie zeigte, dass die Expression der FOXP3 Isoformen in malignen T-Zellen entgegengesetzt zu CD4+CD25+ T-Zellen verläuft. Während FOXP3 in diesen Zellen nicht nachweisbar ist, wird neben FOXP3 Δ 2 auch FOXP3 Δ 2 Δ 7 ungewöhnlich stark exprimiert [163].

Die Möglichkeit einer Isoform-spezifischen posttranslationalen Modifikation von FOXP3 könnte ebenfalls Einfluss auf die Antikörperdetektion haben. Die bislang einzige bekannte Proteinmodifikation ist eine Acetylierung des Transkriptionsfaktors in Treg Zellen, die allerdings keinen Einfluss auf die Antikörpererkennung von FOXP3 und FOXP3 Δ 2 zu haben scheint [133]. Die Möglichkeit einer Modifikation oder Expressionsänderung von FOXP3 bzw. Foxp3 in Abhängigkeit von externen Stimuli wurde durch Inkubation von humanen PBMC und isolierten CD25+ T-Zellen der Maus mit Antikörpern und Phorbolster/Ionomycin untersucht. Nach 24 h ohne bzw. mit Aktivierung ist die Expression von FOXP3 in humanen Zellen in Abbildung 5A, von Foxp3 in Mauszellen in Abbildung 5B gezeigt.

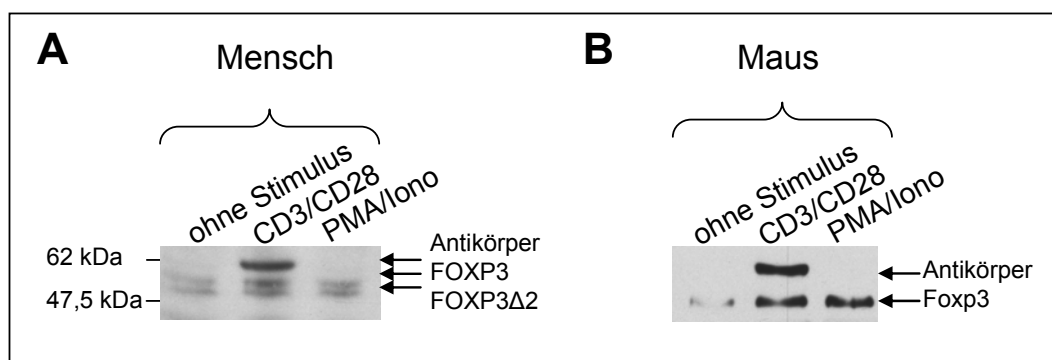


Abbildung 5: FOXP3 Expression in aktivierten Treg Zellen

Western Blot Analyse von A) humanen PBMC und B) CD25+ T-Zellen der Maus nach 24 h Kultivierung ohne Aktivierung, mit Antikörpern (CD3/CD28: 3 μ g/ml α -CD3, 1,5 μ g/ml α -CD28) oder Phorbolster/Ionomycin (PMA/Iono: 50 ng/ml / 1 μ M).

Wie in Abbildung 5 gezeigt, kann im Western Blot keine Veränderung der Expressionsstärke oder des Laufverhaltens von FOXP3 bzw. Foxp3 durch 24 h Aktivierung mit Antikörpern oder Phorbol ester/Ionomycin hervorgerufen werden.

In weiteren Versuchen konnte beobachtet werden, dass T-Zellen von Maus und Mensch in der Lage sind alle drei FOXP3 Isoformen zu exprimieren, wenn die minimalen cDNA Konstrukte unter Kontrolle der Vektorpromotoren durch retroviralen Gentransfer in die Zellen eingeschleust wurden (siehe Kapitel 3.4.1.2 & 3.4.2). Dies bedeutet, dass auf der Proteinebene keine intrinsischen Mechanismen in Treg Zellen vorhanden sind, die die Expression einer FOXP3 Isoform beeinflussen. Denkbar wäre jedoch eine Isoform-spezifische posttranskriptionelle Modifikation, infolge dessen die untranslatierten Enden der FOXP3 Transkripte differentiell prozessiert werden. Beispielsweise könnte die Expression der FOXP3 Isoformen über einen weiteren Spleißvorgang zwischen Exon 0 und Exon 1 reguliert werden. Aus diesem Grund wurde der untranslatierte Bereich der cDNA von den drei Isoformen mit Hilfe eines *Switching Mechanism At 5' end of RNA Transcript* (SMART) *Rapid Amplification of C-terminal Ends* (RACE) Kits (siehe Kapitel 2.1.5) amplifiziert und sequenziert.

5'-gatcctttctgtcagtcaccctcaccagCCTGCCCTTGGACAAGGACCCGATG-3'	FOXP3
5'-gatcctttctgtcagtcaccctcaccagCCTGCCCTTGGACAAGGACCCGATG-3'	FOXP3Δ2
5'-gatcctttctgtcagtcaccctcaccagCCTGCCCTTGGACAAGGACCCGATG-3'	FOXP3Δ2Δ7

Abbildung 6: 5'-untranslatierte Region von FOXP3 Isoformen

Ergebnis der RACE Sequenzierung mehrerer Klone unterschiedlicher FOXP3 Isoformen. Exon 0 ist klein gedruckt, Exon 1 in Großbuchstaben und das Startkodon ist dick markiert.

Wie in Abbildung 6 dargestellt, variieren die untranslatierten 5'-Bereiche der cDNA für die verschiedenen Isoformen nicht voneinander. Die Sequenz entspricht den ersten 52 Nukleotiden der publizierten Erstsequenzierung für FOXP3 cDNA (GenBank: NM_014009) und beinhaltet neben dem untranslatierten Bereich des Exons 1 auch einen weiteren Teil einer hinzugespleißten, genomischen Sequenz (Exon 0) (GenBank: NT_079573). Hauptsächlich liegt demnach die Expressionsstärke der Isoformen in der Häufigkeit der entsprechenden Transkripte begründet.

Zusammenfassend gilt, dass die FOXP3 Isoformen humaner Treg Zellen unterschiedlich stark transkribiert werden, wobei abgesehen von individuellen Schwankungen ein relativ konstantes Verhältnis der Spleißvarianten zueinander besteht. FOXP3 wird in naiven PBMC ausschließlich von Treg Zellen exprimiert, wobei eine Aktivierung mit Antikörpern oder Phorbolster/Ionomycin scheinbar keinen Einfluss auf posttranslationale Modifikationen oder veränderte Expressionsverhältnisse hat. Die Expressionsstärke wird nicht durch alternatives Spleißen innerhalb von Exon 0 und Exon 1 reguliert. Die konstanten Verhältnisse der FOXP3 Transkripte zueinander und deren direkter Einfluss auf die Proteinexpression lassen auf einen genau regulierten Spleißvorgang schließen und ermöglichen einer FOXP3 Isoform differentielle Aufgaben und Funktionen innerhalb der Treg Zelle zu erfüllen.

3.2 Lokalisation und Dimerisierung von FOXP3 Isoformen

3.2.1 FOXP3 Isoformen in transfizierten humanen Zellen

Um Isoform-spezifische Einflüsse untersuchen zu können, wurden alle drei humanen FOXP3 Varianten und das Mausprotein Foxp3 in Expressionsvektoren kloniert und in HEK293T Zellen transfiziert. Im Fall eines Vektors, der die Expression von FOXP3 mittels IRES an die von GFP koppelt, konnte die Transfektion direkt im Fluoreszenzmikroskop oder im Durchflusszytometer überprüft werden. Abbildung 7A und 7B zeigen exemplarisch eine Transfektion von HEK293T Zellen mit dem Vektor MIGR1, der eine FOXP3-IRES-GFP Kassette enthält. Dies ermöglicht eine Identifizierung erfolgreich transfizierter Zellen durch die emittierte, grüne Fluoreszenz im Fluoreszenzmikroskop (Abbildung 7A) oder in der Durchflusszytometrie (Abbildung 7B). Es wurde für alle Konstrukte eine standardisierte Transfektionsrate von ca. 70 % erzielt. Abbildung 7C zeigt die Proteinexpression von FOXP3 in transfizierten HEK293T Zellen mit Hilfe eines Western Blots. Es ist deutlich zu erkennen, dass eine transiente Überexpression für alle FOXP3 Isoformen erzielt werden konnte. Die längste FOXP3 Isoform mit 431 Aminosäuren hat ein apparentes Molekulargewicht von ca. 58 kDa, FOXP3 Δ 2 mit 35 Aminosäuren weniger ca. 54 kDa und FOXP3 Δ 2 Δ 7 mit insgesamt 62 Aminosäuren weniger ca. 50 kDa.

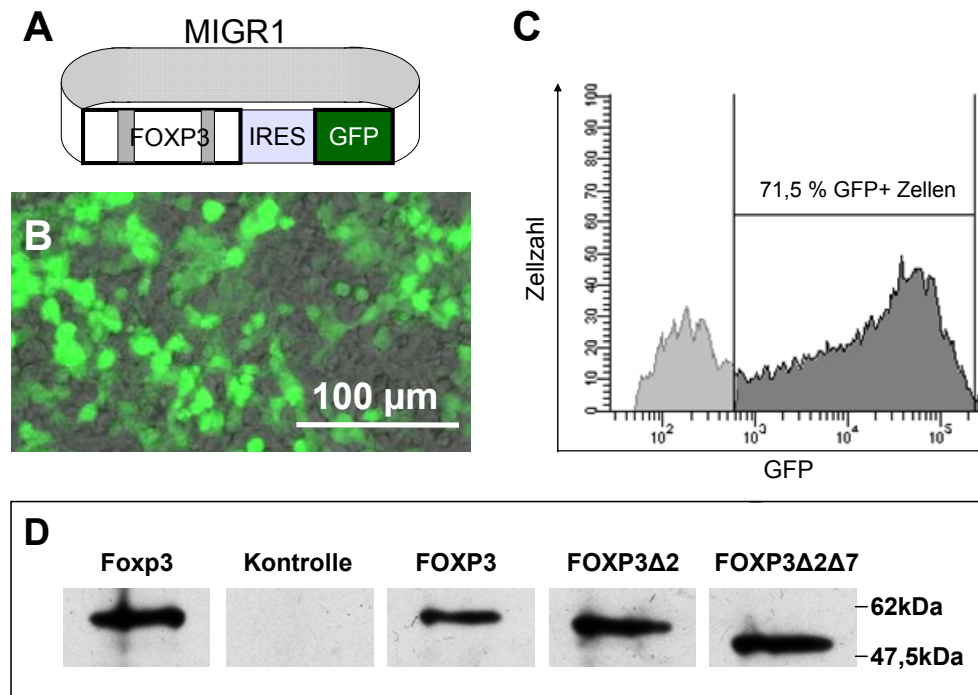


Abbildung 7: Transfektion von HEK293T Zellen mit FOXP3 Isoformen

A) Schematische Darstellung des MIGR1 Vektors mit der Kassette aus FOXP3 (alternativ gespleißte Exons sind grau markiert), der internen Ribosomen-Eintrittsstelle (IRES) und GFP. HEK293T Zellen wurden mit MIGR1-FOXP3 transfiziert und die mit FOXP3 korrelierte GFP Expression wurde B) im Fluoreszenzmikroskop und C) im Durchflusszytometer detektiert. Exemplarisch ist die prozentuale Transfektionseffizienz eines repräsentativen Experiments im Histogramm dargestellt. D) Western Blot Analyse transfizierter HEK293T Zellen mit Foxp3, dem Leervektor (Kontrolle) und den drei humanen Isoformen FOXP3, FOXP3 Δ 2 und FOXP3 Δ 2 Δ 7. FOXP3 Isoformen wurde mit dem Isoform-unspezifischen Antikörperklon eBio7979 detektiert.

3.2.2 Zelluläre Kompartimentierung der FOXP3 Isoformen

Es konnte gezeigt werden, dass ektopisches Foxp3 überwiegend im Zellkern exprimiert wird [137]. Um die Translokation der FOXP3 Isoformen zu untersuchen, wurden N-terminale GFP-FOXP3 Fusionsproteine hergestellt. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 8 zeigen, dass neben FOXP3 auch FOXP3 Δ 2 und FOXP3 Δ 2 Δ 7 im Nukleus akkumuliert werden (Abbildung 8A-C). Im Gegensatz zur nukleären Lokalisation der natürlichen Isoformen wird ein Fusionsprodukt, dem die FKH Domäne fehlt (GFP-FOXP3 Δ FKH), ausschließlich im Zytoplasma exprimiert.

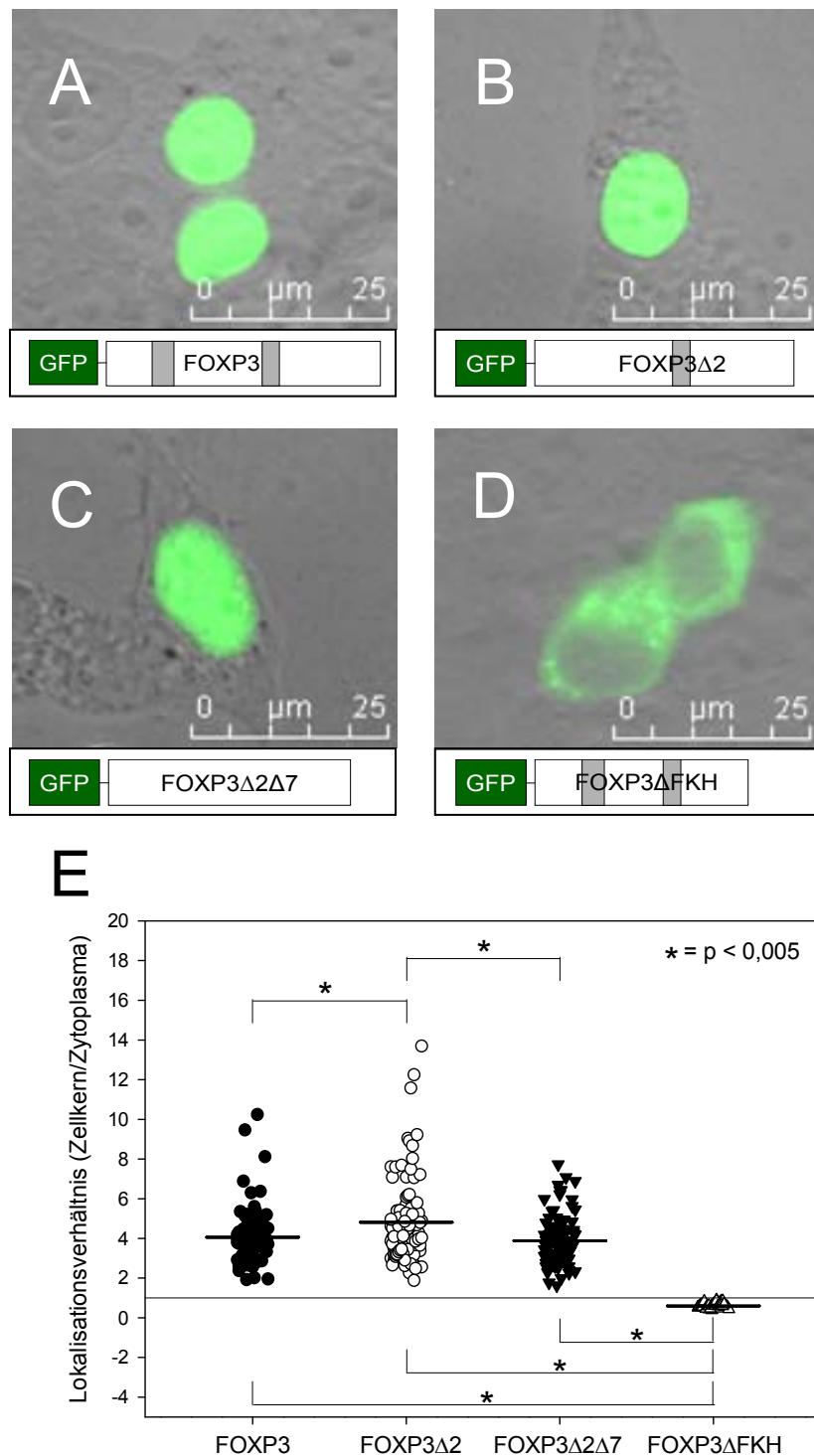


Abbildung 8: Translokation der FOXP3 Isoformen

HEK293T Zellen wurden mit Vektoren transfiziert, die für GFP-FOXP3 Fusionsproteine kodieren. Zellen, transfiziert mit A) GFP-FOXP3, B) GFP-FOXP3 Δ 2, C) GFP-FOXP3 Δ 2 Δ 7 und D) GFP-FOXP3 Δ FKH, wurden im Fluoreszenzmikroskop analysiert. Unter den Aufnahmen sind schematisch die entsprechenden Fusionsproteine dargestellt. E) Isoform-spezifische Zellkern/Zytoplasma Verteilung von FOXP3, durchschnittliche Fluoreszenzintensitäten von Zellkern und Zytoplasma der GFP-FOXP3 transfizierten Zellen wurden mittels LASAF Software errechnet.

Deutlich zu erkennen ist die generelle Abhängigkeit der Kerntranslokation von der FKH Domäne, die C-terminal das Kernlokalisierungssignal enthält. Eine detaillierte Analyse der durchschnittlichen Fluoreszenzintensitäten (*mean fluorescence intensity*, MFI) von GFP in Zellkern und Zytoplasma mittels LASAF Software offenbart eine signifikant stärkere Lokalisation von GFP-FOXP3 Δ 2 im Nukleus im Vergleich zu GFP-FOXP3 und GFP-FOXP3 Δ 2 Δ 7. Dieser Isoform-spezifische Unterschied der Kernlokalisierung ist in Abbildung 8E durch das zelluläre Konzentrationsverhältnis von [MFI FOXP3 (Zellkern)] zu MFI [FOXP3 (Zytoplasma)] dargestellt.

3.2.3 FOXP3 dimerisiert unabhängig von Exon 2 und Exon 7

Es konnte in Kopräzipitationsexperimenten gezeigt werden, dass FOXP3 Homodimere bildet. Interessanterweise waren mutierte Moleküle, denen Glutamat an Position 251 fehlte, nicht in der Lage Dimere zu bilden [137, 138]. Diese IPEX Mutation von FOXP3 betrifft das Exon 7 und somit die Ausprägung des *leucine zipper*. Aufgrund dieser Ergebnisse und der Homologie der Aminosäuresequenz dieser Struktur zu N-myc wurde ursprünglich angenommen, dass FOXP3 durch die wechselseitige *leucine zipper* Bindung dimerisiert [98] (siehe Kapitel 1.3.1). Wie zu erwarten, konnte in T-Zellen, die mit der IPEX Mutation FOXP3 Δ E251 transduziert wurden, keine Induktion des Treg Phänotyps und keine suppressive Kapazität beobachtet werden. Zudem konnte keine Repression der IL-2 Transkription durch FOXP3 Δ E251 beobachtet werden [137]. FOXP3 und FOXP3 Δ E251 konnten aber als Bestandteil eines supramolekularen Komplexes identifiziert werden [135]. Die Bildung von FOXP3 Heterodimeren aus unterschiedlichen Isoformen wurde bislang noch nicht untersucht. Die Assoziation der FOXP3 Isoformen wurde durch Western Blot Analysen von Immunpräzipitaten detektiert. Hierfür wurden zunächst HEK293T Zellen mit entsprechenden FOXP3 Vektoren und/oder dem Leervektor kotransfiziert. Der Nachweis von FOXP3 Komplexen aus unterschiedlichen Isoformen gelang auf zweierlei Art und Weise. Zum einen wurde das Zelllysate transfizierter Zellen mit α -FOXP3 Antikörpern inkubiert, die spezifisch Exon 2 erkennen (Klon FJK-16s). Die Isolation der Komplexe gelang durch die Bindung der Antikörper mit Protein G Agarose. FOXP3 Δ 2 bzw. FOXP3 Δ 2 Δ 7 konnten nicht von diesem Antikörper erkannt werden, da diesen Isoformen das Epitop – Exon 2 – fehlt. Eine Detektion dieser Spleißvarianten bei der Analyse der Immunpräzipitate mit α -FOXP3 Antikörpern, die

alle drei Isoformen erkennen können (Klon eBio7979), lässt deshalb darauf schließen, dass FOXP3 mit FOXP3 Δ 2 und FOXP3 Δ 2 Δ 7 Komplexe bildet.

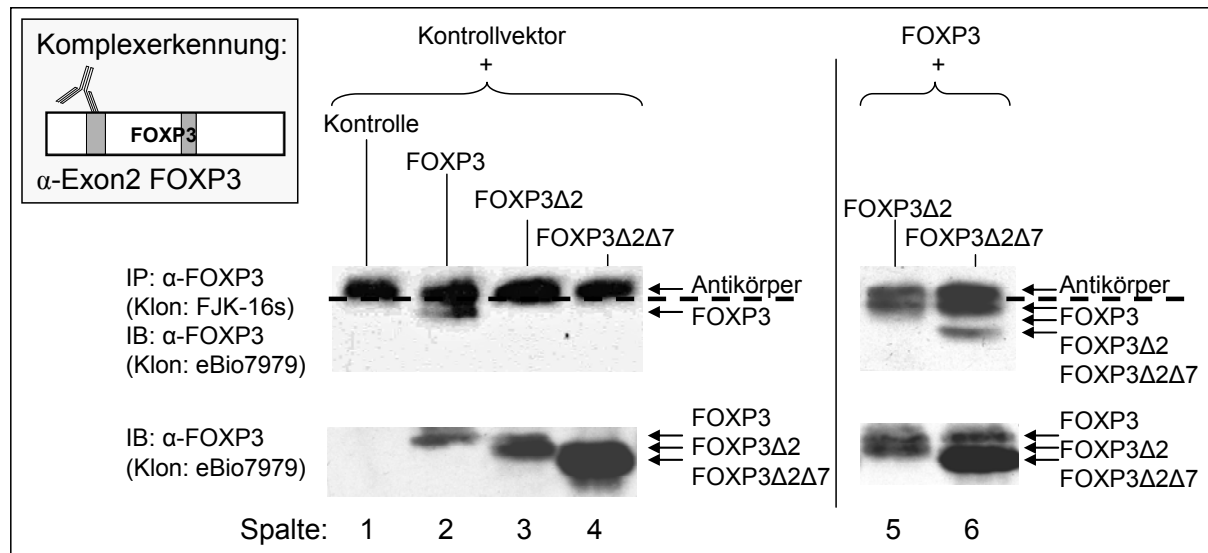


Abbildung 9: FOXP3 Koimmunpräzipitation durch Isoform-spezifische Antikörper

HEK293T Zellen wurden mit Kontrollvektor und FOXP3 Isoformen oder Leervektor transfiziert (linke Seite). Eine Immunpräzipitation (IP) mit dem α -FOXP3 Antikörperklon FJK-16s extrahiert nur die lange Isoform aus dem Zelllysats (Spalte 2, oberes Bild). In HEK293T Zellen, kotransfiziert mit FOXP3 und FOXP3 Δ 2 bzw. FOXP3 Δ 2 Δ 7 (Spalte 5 und 6, oberes Bild), können die Isoformen assoziieren. Ein Immunblot (IB) mit dem α -FOXP3 Antikörperklon eBio7979 detektiert kopräzipitierte Isoformen. IB des Zelllysats (jeweils unteres Bild) zeigt die überexprimierten Isoformen vor der Präzipitation. Die Koimmunpräzipitation wurde in unabhängigen Experimenten mindestens dreimal wiederholt.

In Abbildung 9 ist die Kopräzipitation von FOXP3 Heterodimeren mittels Exon 2 spezifischem Antikörper gezeigt. Zellen, die mit einer Isoform und dem Leervektor transfiziert wurden, überexprimierten die entsprechende Isoform (unteres Bild). Nur im Falle von FOXP3 in Spalte 2 des oberen, linken Bildes konnte ein präzipitiertes Protein detektiert werden, während FOXP3 Δ 2 und FOXP3 Δ 2 Δ 7 aufgrund des fehlenden Epitops nicht gebunden und präzipitiert werden konnten. In den Spalten 5 und 6 wurden die kürzeren Isoformen mit der vollständigen FOXP3 Variante kotransfiziert (Transfektionskontrolle im unteren Bild). Da im oberen Bild bei der Analyse sowohl FOXP3 Δ 2 (wenngleich auch nur schwach in Spalte 5) und FOXP3 Δ 2 Δ 7 (in Spalte 6) kopräzipitiert wurde, ist anzunehmen, dass die FOXP3 Isoformen Heterodimere bilden können und weder Exon 2 noch Exon 7 an

dieser Komplexbildung beteiligt sind. Im Vergleich zu den Spalten 3 und 4 wird deutlich, dass die Präzipitation der Heterodimere nur in Anwesenheit der vollständigen FOXP3 Spleißvariante stattfindet und der Antikörperklon FJK-16s Isoform-spezifisch für FOXP3 mit Exon 2 ist. Die relativ schwache FOXP3-FOXP3 Δ 2 Bindung ist auf eine geringere Transfektion dieser Probe zurückzuführen (unteres Bild, Spalte 5), verglichen mit den anderen Proben. Da der sekundäre Antikörper auch den Präzipitations-Antikörperklon FJK-16s erkennt, ist im Western Blot eine Antikörperbande bei ca. 50kDa zu erkennen.

Die Ergebnisse wurden in einem alternativen Koimmunpräzipitationsexperiment validiert. Dafür wurde das vollständige FOXP3 mit einem FLAG-Epitop verbunden und zusammen mit den kurzen, unmarkierten Isoformen überexprimiert. Das Binden spezifischer α -FLAG Antikörper (Klon M2), gebunden an Agarosepartikel, ermöglichte die Isolation von FLAG-FOXP3 und assoziierten FOXP3 Isoformen aus dem Zelllysat. Eine Detektion unterschiedlicher Spleißformen erfolgte wiederum mit Isoform-unspezifischen α -FOXP3 Antikörpern (Klon eBio7979). Abbildung 10 zeigt die FOXP3 Komplexe, die sich nach Überexpression von N-terminal FLAG-markierten FOXP3 Isoformen und unmarkierten FOXP3 Isoformen in HEK293T Zellen bilden können. Abbildung 10A verdeutlicht, dass der leere FLAG-Vektor nicht in der Lage ist, FOXP3 Isoformen zu kopräzipitieren, die, wie in der Transfektionskontrolle gezeigt (unteres Bild), exprimiert sind. FLAG-FOXP3, in Abbildung 10B, bindet hingegen koexprimiertes FOXP3 und FOXP3 Δ 2 aber auch FOXP3 Δ 2 Δ 7. Die gebildeten Heterodimere wurden über eine Immunpräzipitation mit α -FLAG Antikörperklon M2 isoliert und im Western Blot mit Isoform-unspezifischem α -FOXP3 Antikörperklon eBio7979 detektiert. Erneut zeigte sich, dass die Immunkomplexe, die über die Bindung mit FLAG-FOXP3 kopräzipitiert werden konnten, auch FOXP3 Isoformen ohne Exon 2 und ohne Exon 7 beinhalten. Um zu untersuchen, ob mindestens eine vollständige Spleißvariante für die Komplexbildung benötigt wird, wurden die Versuche mit FLAG-FOXP3 Δ 2 und FLAG-FOXP3 Δ 2 Δ 7 wiederholt. Diese Koimmunpräzipitationsexperimente ergaben, dass sowohl FOXP3 Δ 2 als auch FOXP3 Δ 2 Δ 7 an die FLAG-markierten Konstrukte FLAG-FOXP3 Δ 2 (Abbildung 10C) und FLAG-FOXP3 Δ 2 Δ 7 (Abbildung 10D) binden können.

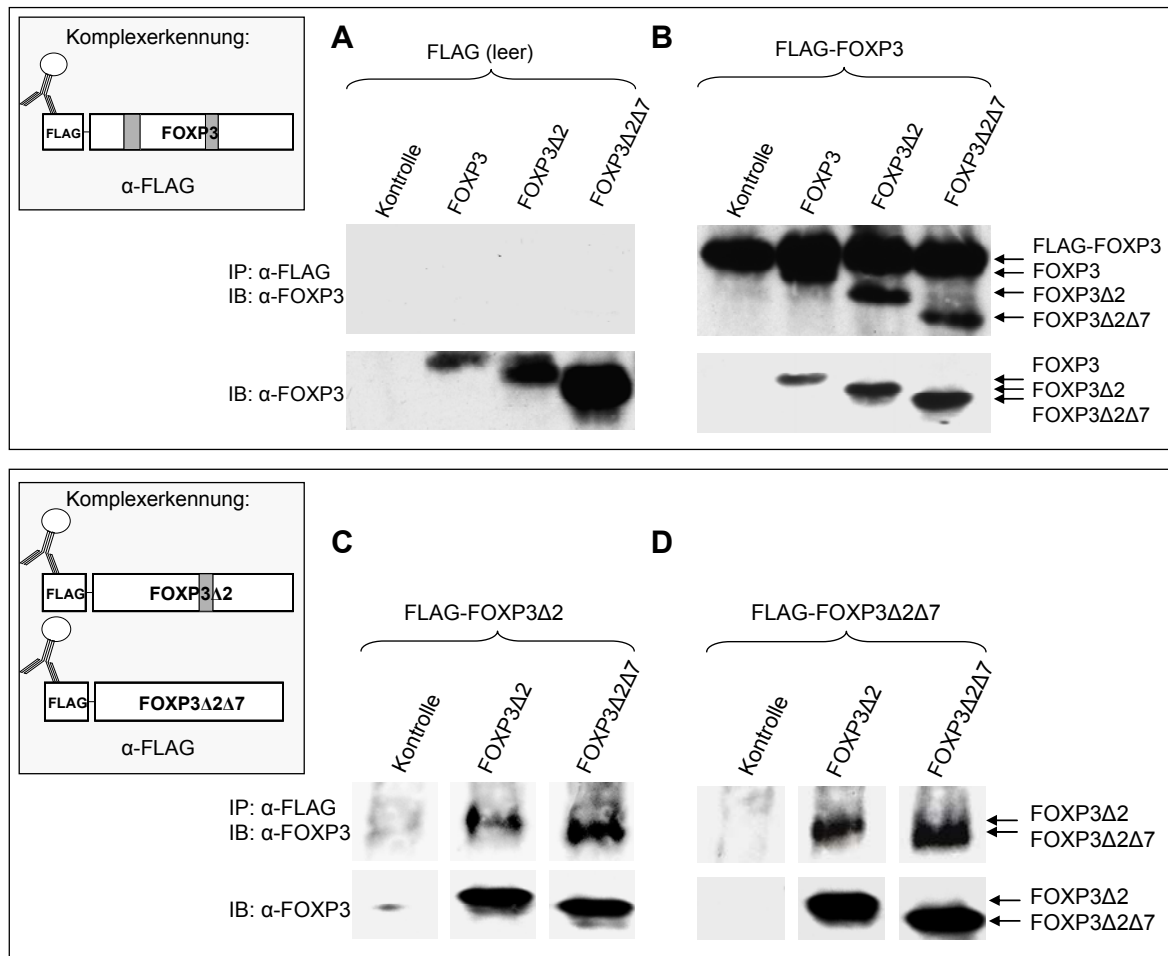


Abbildung 10: FOXP3 Koimmunpräzipitationen FLAG-markierter Proteine

HEK293T Zellen wurden mit Kontrollvektor oder FOXP3 Isoformen und FLAG-Vektoren kotransfiziert. Leerer FLAG-Vektor in A) und FLAG-FOXP3 in B) wurden im Verhältnis 1:1 mit unmarkierten FOXP3 Isoformen transfiziert. FLAG-FOXP3 Δ 2 in C) und FLAG-FOXP3 Δ 2 Δ 7 in D) wurden im Verhältnis 1:10 mit unmarkierten FOXP3 Isoformen transfiziert. Die Isolation der Komplexe erfolgte durch eine Immunpräzipitation (IP) mit α -FLAG Antikörperklon M2, die Detektion im Immunblot (IB) mit dem Isoform-unspezifischen α -FOXP3 Antikörperklon eBio7979. Zur Kontrolle der Transfektion wurde das Zelllysat im Immunblot analysiert (jeweils unteres Bild). Die Koimmunpräzipitationen wurden in unabhängigen Experimenten mindestens dreimal wiederholt.

Die Menge der detektierten Proteine im Präzipitat stimmt dabei überein mit der Transfektionsstärke der entsprechenden Proben (jeweils unteres Bild). Somit sind offensichtlich kaum Unterschiede in der Bindungsstärke der Isoformen zueinander vorhanden, so dass das relative Verhältnis der FOXP3 Homo- und Heterodimere der relativen FOXP3 Isoformtranskription in Treg Zellen entspricht (siehe Kapitel 3.1.1). Zusammenfassend gilt daher, dass die FOXP3 Δ 2 Isoform in der Lage ist, mit FOXP3, aber auch mit sich selbst und

FOXP3 Δ 2 Δ 7 Komplexe zu bilden. Exon 2 ist offenbar nicht an der Heterodimerisierung von FOXP3 beteiligt. Darüber hinaus kann selbst die kürzeste Isoform FOXP3 Δ 2 Δ 7 mit allen anderen Spleißvarianten und sich selbst assoziieren, womit bewiesen wurde, dass das Strukturmotiv *leucine zipper* in Exon 7 nicht für die Bildung der Dimere notwendig ist.

3.3 Isoform-unspezifische Proteinbindungen von FOXP3

3.3.1 Suppression der NFAT und NF- κ B vermittelten Transkription

Obwohl Treg Zellen zum großen Teil einen Phänotyp aktivierter Zellen aufweisen, unterscheiden sie sich von Effektor-T-Zellen zum einen durch die Suppression der Effektor-T-Zellproliferation und zum anderen durch die fehlende Produktion von Zytokinen, insbesondere IL-2. Beide Effekte konnten durch Gentransfer-Experimente auf die Expression des Transkriptionsfaktors FOXP3 zurückgeführt werden. Der IL-2 Promotor weist mehrere Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren NFAT, NF- κ B, AML-1 und AP-1 auf [132]. Untersuchungen ergaben, dass FOXP3 in der Lage ist, mit NFAT und AML-1 zu interagieren und als transkriptioneller Repressor die Expression von IL-2 zu regulieren [94, 132]. Ebenso konnte die NF- κ B vermittelte Transkription durch Foxp3 supprimiert werden [128]. Der Einfluss der drei humanen FOXP3 Isoformen auf die von NFAT und NF- κ B vermittelte Gentranskription wurde im Reporter-gen Assay untersucht. Hierzu wurden NIH3T3 Zellen mit endotoxinfreier DNA transfiziert. Ein entsprechender pcDNA3.1+ Vektor, kodierend für eine jeweilige FOXP3 Isoform und Expressionsvektoren für Biolumineszenz wurden kotransfiziert. Letztere Vektoren waren zum einen *Renilla* (pRL-CMV) für die Normalisierung der Transfektion und zum anderen entsprechende Reporter-gen-DNA (pNFAT-TA-luc bzw. pNF- κ B-TA-luc) zur abhängigen Expression von Leuchtkäfer-Luciferase.

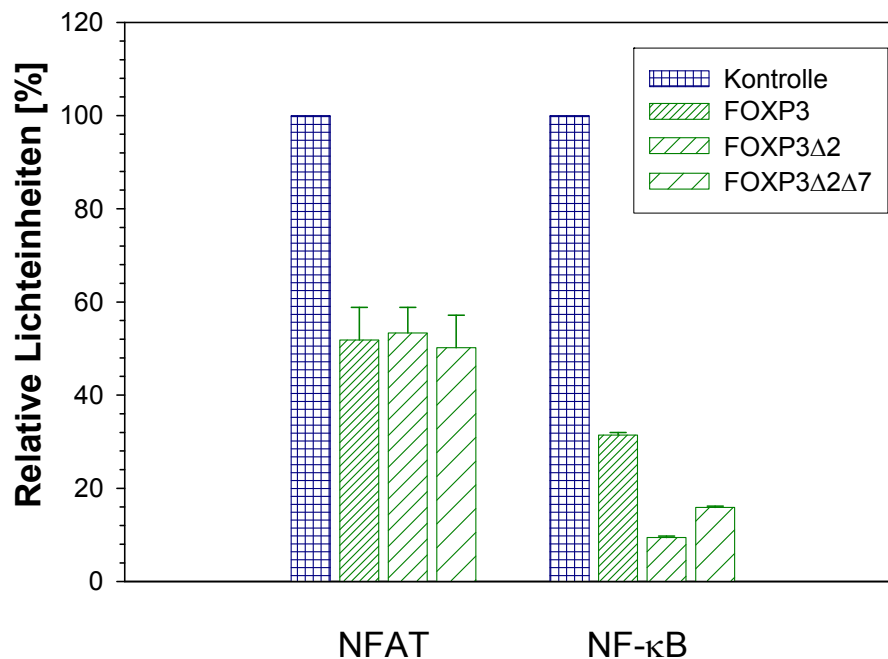


Abbildung 11: FOXP3 Isoformen im NFAT und NF- κ B Reporteragen Assay

NIH3T3 Zellen wurden mit 10 ng pRL-CMV (*Renilla*), 100 ng pNFAT-TA-luc oder pNF- κ B-TA-luc und 0,5 μ g FOXP3 kodierenden Vektor bzw. Leervektor kotransfiziert. Luciferaseaktivität des Zelllysats wurde normiert auf die Biolumineszenz der *Renilla* Reaktion, die Werte für den Leervektor (blau karierte Balken) wurden als Referenz 100% gesetzt. Grüne Balken repräsentieren FOXP3 transduzierte Proben (starke, mittlere und leichte Schraffur: FOXP3, FOXP3 Δ 2 und FOXP3 Δ 2 Δ 7). Von allen Proben wurden Triplikate durchgeführt, die Luciferasereaktion eines Probenlysates wurde dreimal unabhängig gemessen. Jeweils eine Versuchsreihe von mindestens drei unabhängigen Experimenten ist gezeigt.

Die NFAT bzw. NF- κ B regulierte Expression von Luciferase konnte mit allen Isoformen von FOXP3 supprimiert werden. Die NFAT vermittelte Transkription wurde unabhängig von der Präsenz des Exons 2 oder des Exons 7 im FOXP3 Protein halbiert. Da ein stabiler ternärer Komplex aus FOXP2, NFAT und DNA beobachtet wurde, kann man annehmen, dass auch FOXP3 und die beiden Isoformen FOXP3 Δ 2 und FOXP3 Δ 2 Δ 7 auf diese Weise einen Repressorkomplex bilden. Die Repression NFAT vermittelter Gentranskription durch alle FOXP3 Isoformen überrascht insofern nicht, da gezeigt werden konnte, dass die für die NFAT Interaktion notwendige Proteinregion die FKH Domäne ist und diese in allen FOXP3 Isoformen vorhanden ist [94]. Die NF- κ B vermittelte Transkription wird im Vergleich zu der Kontrolle durch FOXP3 Δ 2 auf ein Zehntel reduziert, FOXP3 Δ 2 Δ 7 inhibiert die Luciferaseexpression um bis zu 85 %. Isoformen, denen Exon 2 fehlt, weisen eine etwas stärkere Repression der NF- κ B kontrollierten transkriptionellen Aktivität auf, da FOXP3 die

Transkription der Luciferase lediglich um ca. 70 % verhindert. Da FOXP3 mit der Rel Homologie Domäne von NFAT und der RelA Domäne von NF- κ B interagiert [94, 128], ist anzunehmen, dass die Repressoraktivität von FOXP3 nicht auf dem Besetzen der entsprechenden DNA-Bindungsstellen beruht, sondern FOXP3 die anderen Transkriptionsfaktoren durch die Bildung eines Repressorkomplexes aus NFAT/NF- κ B, FOXP3 Isoform und DNA neutralisiert. Zudem enthalten die beschriebenen Konsensussequenzen von NFAT und NF- κ B keine Übereinstimmung und FOXP3 bindet allein nur schwach an DNA.

3.3.2 FOXP3 Isoformen binden AML-1

AML-1 wurde als wichtiger Bindungspartner von FOXP3 identifiziert, der im Zusammenhang mit der Ausprägung des Treg-typischen Phänotyps und der Funktion steht. Untersuchungen an FOXP3 Proteinfragmenten ergaben, dass AML-1 innerhalb einer Region der Aminosäuren 278 bis 336 von FOXP3 interagiert [132]. Damit besteht eine räumliche Nähe zum Exon 7 (Aminosäure 246-272). Um zu untersuchen, ob AML-1 auch von FOXP3 Isoformen ohne Exon 2 und Exon 7 gebunden wird, wurden Koimmunpräzipitationen durchgeführt. Hierfür wurden HEK293T Zellen mit FLAG-markiertem AML-1 und einem Vektor, kodierend für eine FOXP3 Isoform oder dem Leervektor, kotransfiziert. Immunpräzipitate wurden aus dem Zelllysat mit Hilfe des α -FLAG spezifischen Antikörperklon M2 isoliert und die Komplexe im Western Blot analysiert. Die Detektion der FOXP3 Spleißvarianten erfolgte mit dem Isoform-unspezifischen Antikörperklon eBio7979. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass AML-1 sowohl von FOXP3 und FOXP3 Δ 2 als auch von FOXP3 Δ 2 Δ 7 kopräzipitiert werden konnte. Diese Ergebnisse, dargestellt in Abbildung 12, zeigen, dass alle FOXP3 Isoformen mit AML-1 interagieren und somit weder Exon 2 noch Exon 7 an der Proteinbindung beteiligt sind. Trotz der Nähe der beschriebenen AML-1 Bindungsstelle zum *leucine zipper* innerhalb der FOXP3 Aminosäuresequenz beeinflusst die Abwesenheit dieses Motivs die AML-1 Bindung nicht sonderlich stark. Unter der Berücksichtigung der jeweiligen Transfektionsrate (unteres Bild in Abbildung 12) scheint verhältnismäßig etwas weniger FOXP3 Δ 2 Δ 7 von FLAG-AML-1 gebunden zu werden als beispielsweise von FOXP3 Δ 2. Allerdings sind die Unterschiede nur graduell und alle drei natürlichen Isoformen von FOXP3 binden AML-1.

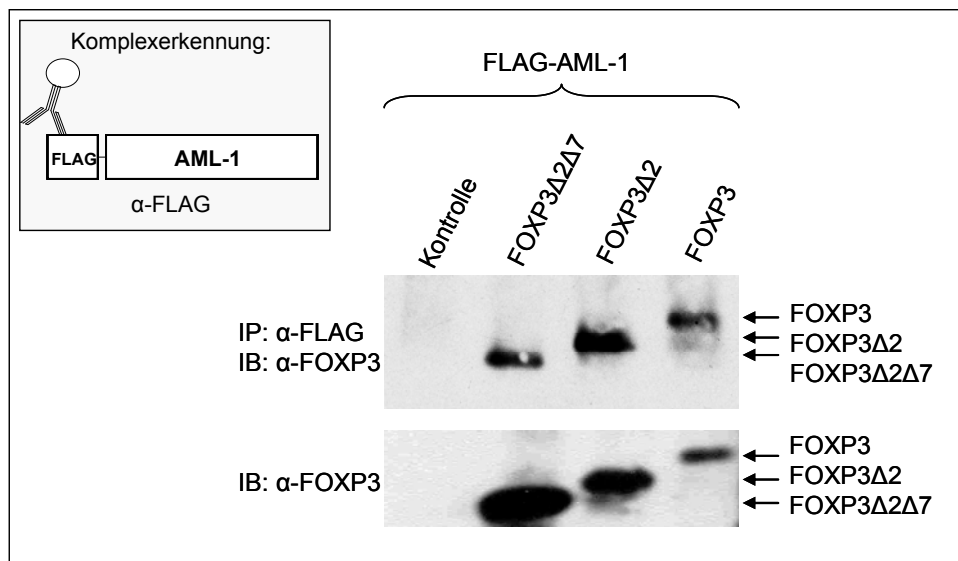


Abbildung 12: Alle FOXP3 Isoformen binden an AML-1

HEK293T Zellen wurden mit FOXP3 Isoformen oder Leervektor (Kontrolle) und FLAG-AML-1 transfiziert (im Verhältnis 10:1). Eine Immunpräzipitation (IP) mit dem α -FLAG Antikörperklon M2 isoliert Komplexe, die FOXP3 Isoformen enthalten. Die Detektion im Immunblot (IB) wurde mit Hilfe des Isoform-unspezifischen α -FOXP3 Antikörperklons eBio7979 durchgeführt. Zur Kontrolle der Transfektion wurde Zelllysate im Western Blot analysiert (unteres Bild). Eine Koimmunpräzipitation aus drei unabhängigen Experimenten ist dargestellt.

3.4 Phänotyp und Funktion der Treg Zellen induziert von FOXP3

3.4.1 Foxp3 und FOXP3 Isoformen in T-Zellen der Maus

Zur Untersuchung der Funktionen von FOXP3 Isoformen in T-Zellen wurden CD4⁺CD25⁻ T-Zellen der Maus mittels MACS isoliert und durch retroviralen Gentransfer transduziert. Die stabile Integration der retroviralen DNA gelingt dabei nur nach Stimulation und Proliferation der Zellpopulation, da bei proliferierenden Zellen die Kernmembran vorübergehend abgebaut wird und so die virale Gensequenz die genomische DNA erreichen kann. Bei humanen CD4⁺CD25⁻ T-Zellen wird durch eine Stimulation die Expression von endogenem FOXP3 stark erhöht, so dass es nicht möglich ist, spezifische Effekte einer exogenen FOXP3 Isoform zu untersuchen. Um solche Einflüsse von endogenem FOXP3 zu vermeiden, wurden zunächst

humane Isoformen und die einzige Isoform der Maus in CD4+CD25- T-Zellen der Maus retroviral transferiert. Im Vergleich dazu wurden ebenfalls humane CD4+CD25- T-Zellen retroviral transduziert (siehe Kapitel 3.4.2). Diese Ergebnisse zeigen aber nur die tendenziellen Isoform-spezifischen Effekte, da neben der Überexpression exogener Spleißvarianten auch immer ein Mix aus endogenen FOXP3 Isoformen exprimiert wird.

3.4.1.1 Phänotyp natürlicher CD4+CD25+ Foxp3+ Zellen der Maus

Aus Milz und Lymphknoten von Balb/c Mäusen wurden T-Zellen mittels MACS aufgereinigt und auf die Expression von regulatorischen und unspezifischen T-Zellmarkern untersucht. Naive CD4+CD25- T-Zellen und die Treg Population konnten über die MACS Technik routinemäßig mit einer Reinheit von 94 bis 99% isoliert werden. Das Schema einer MACS Isolation von CD4+CD25- und CD4+CD25+ T-Zellen ist in Abbildung 13A dargestellt.

Bei der Untersuchung des Phänotyps der beiden Populationen zeigte sich erwartungsgemäß eine erhöhte Expression von CD25, GITR, CTLA-4 und Foxp3 in Treg Zellen im Vergleich zu Effektorzellen. Die differentielle Expression von Treg-spezifischen Oberflächenmarkern und intrazellulären Molekülen sowie die unveränderte Expression unspezifischer T-Zellmarker wie CD44 und CD69 sind in Histogrammen in Abbildung 13B gezeigt. Die T-Zellmarker CD44 und CD69 stehen in keinem Zusammenhang mit regulatorischen Funktionen und dienten in Gentransferexperimenten als Kontrolle. CD44 ist ein Glykoprotein, das Extrazellulärmatrix bindet und von Gedächtniszellen exprimiert wird. Untersuchungen ergaben, dass sowohl CD4+CD25- als auch CD4+CD25+ T-Zellen eine Subpopulation von Gedächtniszellen beinhalten [170]. Die große Mehrheit der Zellen ist jedoch naiv, so dass die gemittelte Expressionsstärke von CD44, unabhängig von der CD25 Expression, vergleichbar ist. CD69, ebenfalls ein Glykoprotein, ist ein Aktivierungsmarker für T-Zellen und auf beiden naiven CD4+ Population gleich stark exprimiert.

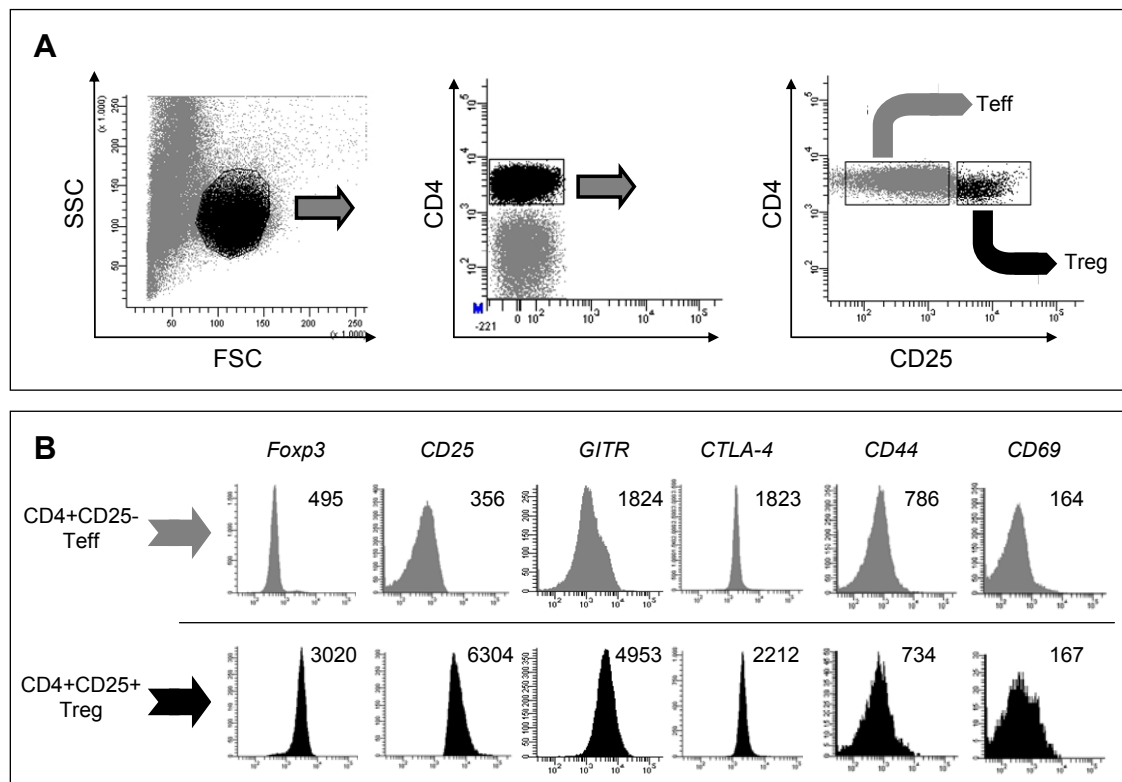


Abbildung 13: Isolierung und Phänotyp von Lymphozytenpopulationen der Maus

A) Die im FSC und SSC identifizierte Lymphozytenpopulation (Bild links) kann über α -CD4 Antikörperfärbung spezifiziert werden (Bild Mitte) und mittels α -CD25 Antikörperfärbung in CD4+CD25- Effektor-T-Zellen (Teff) und CD4+CD25+ Treg Zellen getrennt werden (Bild rechts). B) MACS aufgereinigte CD25- und CD25+ CD4+ T-Zellen exprimieren unterschiedlich stark regulatorische T-Zellmarker (*Foxp3*, *CD25*, *GITR* und *CTLA-4*), während allgemeine Marker (*CD44* und *CD69*) unverändert sind. Die Zahlenwerte repräsentieren die durchschnittliche Fluoreszenzintensität der Zellpopulation für den untersuchten Marker. *CTLA-4* (nach intrazellulärer Akkumulation) und *Foxp3* wurden intrazellulär gemessen, die übrigen Moleküle wurden an der Zelloberfläche gefärbt.

3.4.1.2 FOXP3 Transduktion in CD4+CD25- T-Zellen der Maus

Die Isolation der beiden CD4+ T-Zellpopulationen ermöglicht eine gezielte Transduktion von *Foxp3* bzw. FOXP3 Isoformen in *Foxp3*- Zellen. Die Isoform-spezifischen Effekte auf das Expressionsmuster können somit ohne die natürlichen *Foxp3*+ Zellen untersucht werden. Transduzierte Zellen exprimierten die entsprechenden FOXP3 Isoformen und gekoppelt über die IRES Sequenz das Markergen GFP. Die Beobachtung der GFP Fluoreszenz erlaubte eine quantitative Analyse der Transduktion im Fluoreszenzmikroskop und in der Durchflusszytometrie, dargestellt für jeweils eine Probe in Abbildung 14A und 14B. Beim retroviralen Gentransfer in CD4+CD25- Mauszellen wurden Transduktionsraten von über

30 % erzielt, was den Werten anderer retroviraler Gentransferexperimente mit MIGR1 und verwandter Vektoren entspricht [67, 171]. Der FOXP3 Proteinnachweis gelang mittels Western Blot Analyse von GFP⁺ FACS isolierten Zellen, zu sehen in Abbildung 14C. Unterschiede in der Expression einzelner Isoformen sind auf unterschiedliche Zellzahlen in den analysierten Proben zurückzuführen, die konstitutive Expression von β -Actin im unteren Bild gilt dabei als Normierungsstandard. Allgemein konnte kein Unterschied in der Expressionsstärke der verschiedenen FOXP3 Isoformen beobachtet werden.

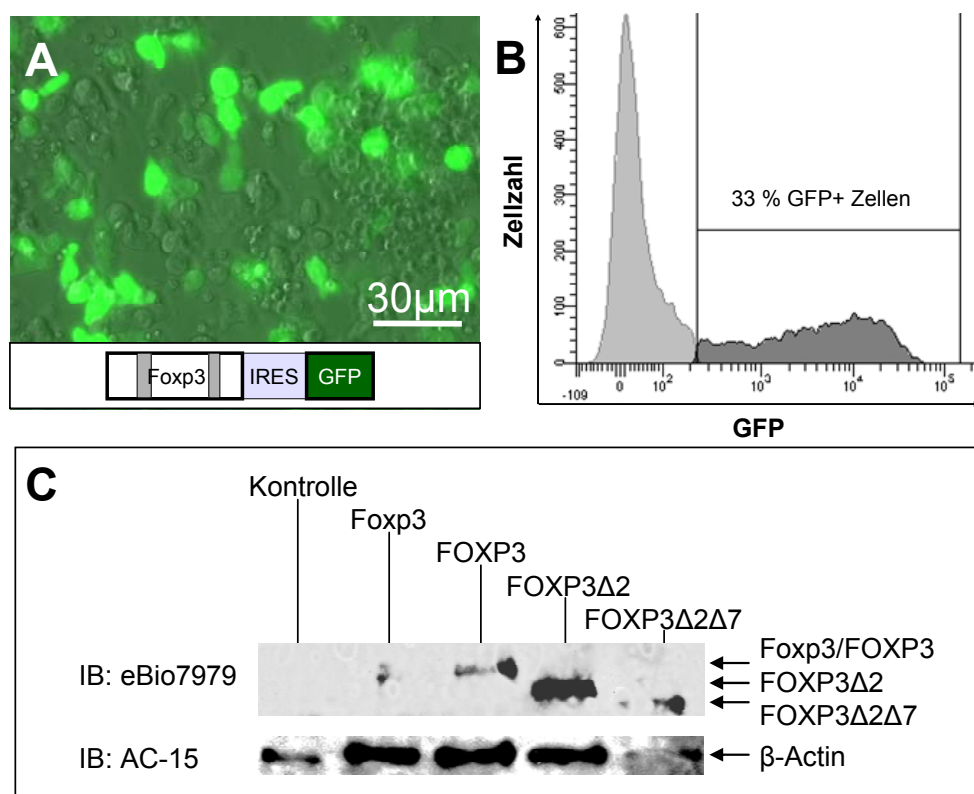


Abbildung 14: FOXP3 Transduktion in CD4+CD25- T-Zellen der Maus

A) Transduzierte CD4+CD25- Lymphozyten der Maus exprimieren die FOXP3-IRES-GFP Kasette, die unten schematisch dargestellt ist. Drei Tage nach dem retroviralen Gentransfer können erfolgreich transduzierte Zellen A) im Fluoreszenzmikroskop oder B) im FACS über die GFP Koexpression identifiziert und quantifiziert werden. Jeweils eine Probe FOXP3 transduzierter Zellen ist exemplarisch dargestellt. C) Western Blot Analyse von Zellen, die mit Leervektor (Kontrolle), Foxp3 oder einer humanen FOXP3 Isoform transduziert wurden. Fxp3/FOXP3 Detektion erfolgte mit dem Isoform-unspezifischen Antikörperklon eBio7979, β -Actin wurde mit dem Antikörperklon AC-15 detektiert.

3.4.1.3 Isoform-spezifische Induktion des regulatorischen Phänotyps

Nach einer retroviralen Transduktion konnte das kotransferierte Markergen GFP ab dem dritten Tag nach der letzten Virusinkubation detektiert werden. Genexpressionsanalysen wurden nach weiteren 2-3 Tagen durchgeführt, um sicher zu gehen, dass die Zellen sich nicht mehr in der Proliferationsphase befanden.

Im Gegensatz zum Einfluss auf die Transkriptionsaktivitäten von NFAT und NF- κ B zeigte sich bei der Induktion von CD25 eine Abhängigkeit von der jeweiligen FOXP3 Isoform. Abbildung 15 demonstriert, dass in CD4+CD25- Mausezellen nach Transduktion mit F_{oxp3} und ebenso mit den humanen Isoformen FOXP3 und FOXP3 Δ 2 die Expression von CD25 stark erhöht wurde. Das Expressionsniveau von CD25 in FOXP3 Δ 2 Δ 7 transduzierten Zellen blieb hingegen unverändert, vergleichbar mit der Transduktion des Leervektors.

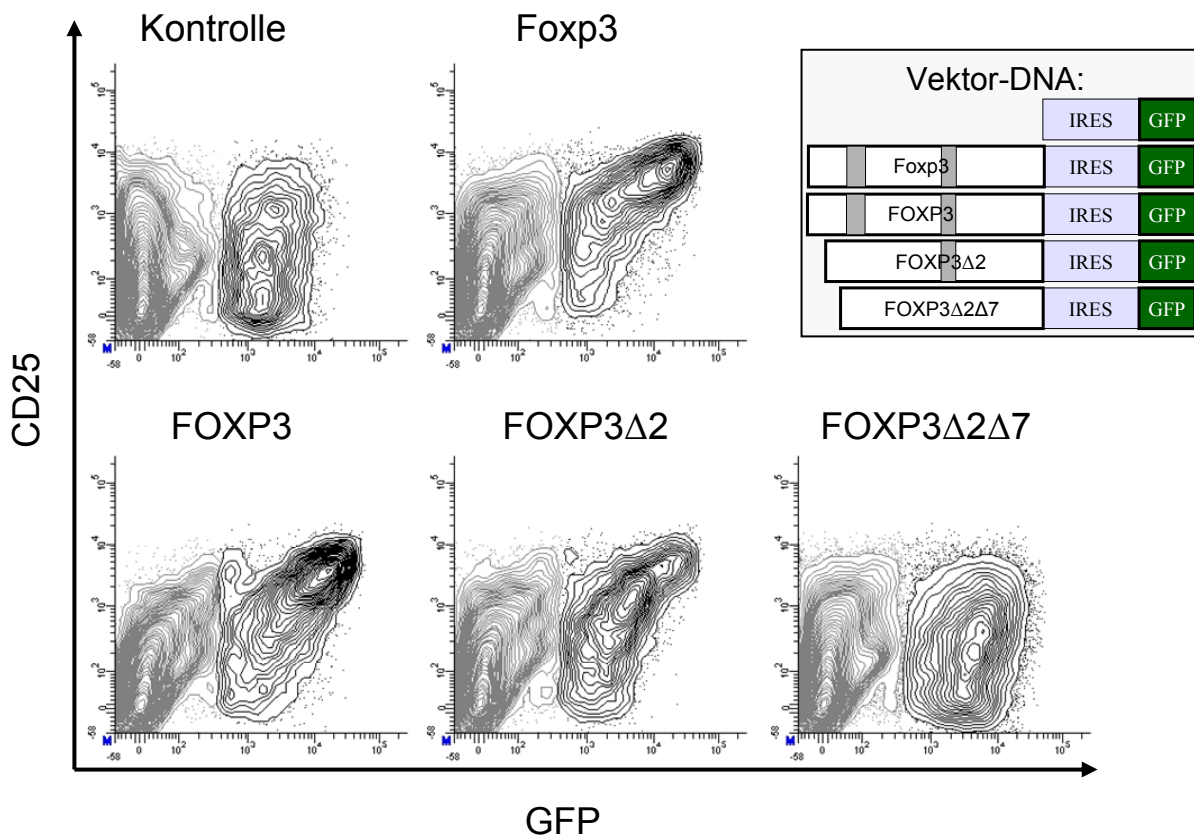
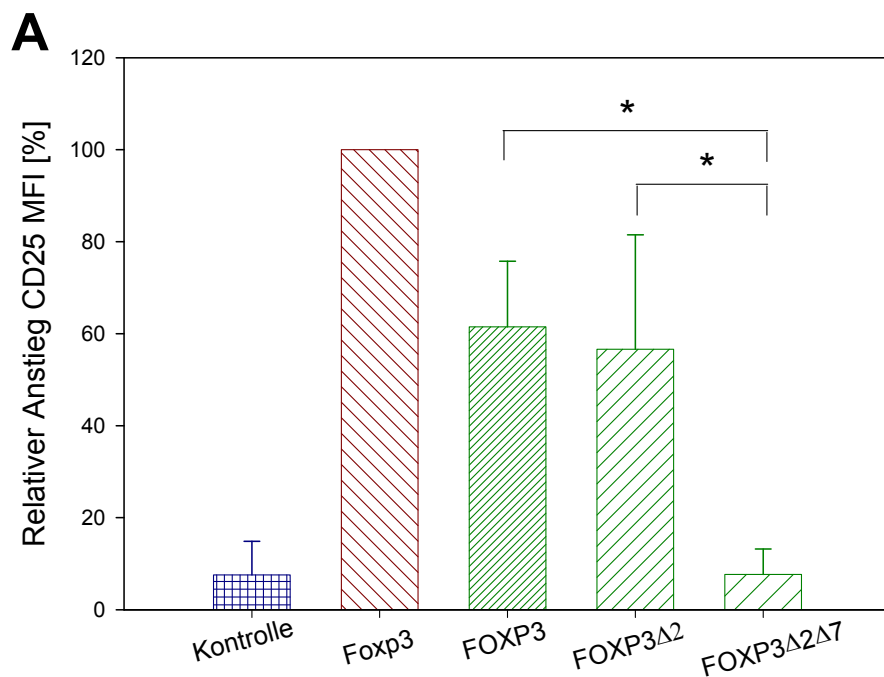


Abbildung 15: CD25 Induktion nach FOXP3 Transduktion in Mausezellen

CD4+CD25- Mausezellen wurden durch die abgebildeten MIGR1 Vektoren mit FOXP3-IRES-GFP Kassetten retroviral transduziert. Die Proben, transduziert mit Leervektor (Kontrolle), FOXP3 oder humanen FOXP3 Isoformen, wurden drei Tage nach dem Gentransfer im Durchflusszytometer auf die Expression von CD25 untersucht. Die transduzierten Zellen befanden sich zum Zeitpunkt der Analyse nicht mehr in der Proliferationsphase.

Deutlich ist eine Korrelation der Expression von CD25 und der Transduktion von Foxp3, wie auch von humanem FOXP3 und FOXP3 Δ 2 zu erkennen. Diese Induktion von CD25 findet oberhalb einer bestimmten Transduktionsrate statt, ist demnach abhängig von einer Mindestkonzentration an Foxp3 bzw. FOXP3. Daher sind Zellen, die nur schwach transduziert wurden und daher eine geringe GFP Expression zeigen, in der CD25 Expression vergleichbar mit untransduzierten Zellen. Im Vergleich dazu stieg die CD25 Expression in stark transduzierten Zellen mit hoher GFP Expression proportional mit GFP an.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Transduktion des Mausproteins Foxp3 in CD4+CD25- Mauseellen die Expression Treg-spezifischer Marker induziert [67]. Im Vergleich zur Transduktion mit dem Transkriptionsfaktor der Maus (Foxp3) konnte dieser Effekt auch mit den humanen Isoformen FOXP3 und FOXP3 Δ 2 erzielt werden. Aus der Berechnung des prozentualen Zuwachses der durchschnittlichen CD25 Fluoreszenzintensität von GFP-hoch zu GFP-niedrig exprimierenden Zellen ergibt sich die Darstellung im Balkendiagramm von Abbildung 16A. Die Abhängigkeit der Induktion Treg-spezifischer Marker durch FOXP3 Isoformen wurde neben CD25 auch mit CTLA-4 und GITR getestet (Abbildung 16B und 16C).



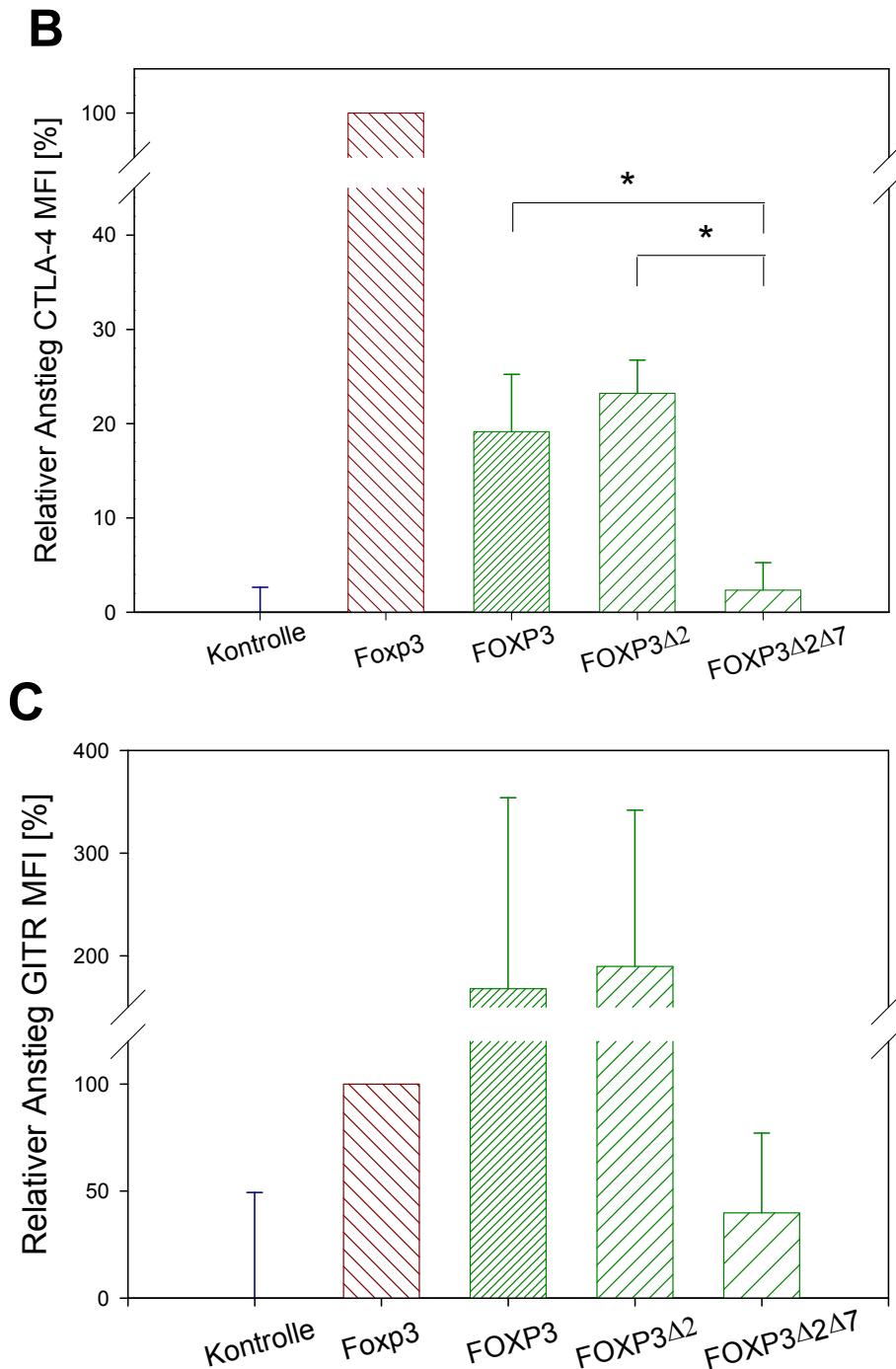


Abbildung 16: Induktion Treg-spezifischer Marker durch FOXP3 Transduktion

CD4⁺CD25⁻ Mauseellen wurden mit retroviralen Vektoren, die die FOXP3-IRES-GFP Kasette beinhalten, transduziert (siehe Abbildung 15). Induktion Treg-spezifischer Marker wurde durch den relativen Anstieg des Expressionsniveaus in GFP-niedrig zu GFP-hoch exprimierenden Zellen untersucht. In Zellen, transduziert mit Leervektor (Kontrolle, blau karierte Balken), Foxp3 der Maus (rot schraffiert) oder einer humanen FOXP3 Isoform (grün schraffiert), wurde die Induktion von A) CD25, B) CTLA-4 und C) GITR gemessen. Der prozentuale MFI Anstieg von Foxp3 diente als Referenzwert und wurde gleich 100 % gesetzt. CTLA-4 wurde intrazellulär nach Stimulation und Blockade des Vesikeltransports gemessen. Statistisch signifikante Unterschiede in der Induktion Treg-spezifischer Marker durch Transduktion humaner FOXP3 Isoformen sind hervorgehoben (*).

Wie in Abbildung 16A und 16B dargestellt, können FOXP3 und FOXP3 Δ 2 das Expressionsniveau von CD25 um ca. 60 % und das von CTLA-4 um ca. 20 % erhöhen. Die neu entdeckte Isoform FOXP3 Δ 2 Δ 7 ist im Gegensatz dazu nicht in der Lage CD25 oder CTLA-4 in den Zellen zu induzieren. Die Kontrolle mit transduziertem Leervektor beeinflusst ebenfalls nicht die Expression dieser Treg-spezifischen Marker. Als weiteres Treg-spezifisches Molekül konnte auch GITR durch die Transduktion der vollständigen FOXP3 Isoform und der Spleißvariante FOXP3 Δ 2 induziert werden, während FOXP3 Δ 2 Δ 7 das Expressionsniveau von GITR nicht über das der Leervektorkontrolle steigern konnte (Abbildung 16C). Aufgrund einer stärkeren Streuung der Einzelwerte sind die Ergebnisse für GITR allerdings nicht signifikant. Diese differentielle Induktion der Oberflächenmoleküle von Suppressorzellen weist erneut daraufhin, dass die FOXP3 Isoformen bestimmte, nicht redundante Effekte auf Treg Zellen ausüben können.

Im Gegensatz zu CD25 und CTLA-4 wird deutlich, dass ausschließlich die untersuchten Treg-spezifischen Marker durch eine Transduktion mit FOXP3 induziert werden können, nicht aber CD44 und CD69 (Abbildung 17A und 17B).

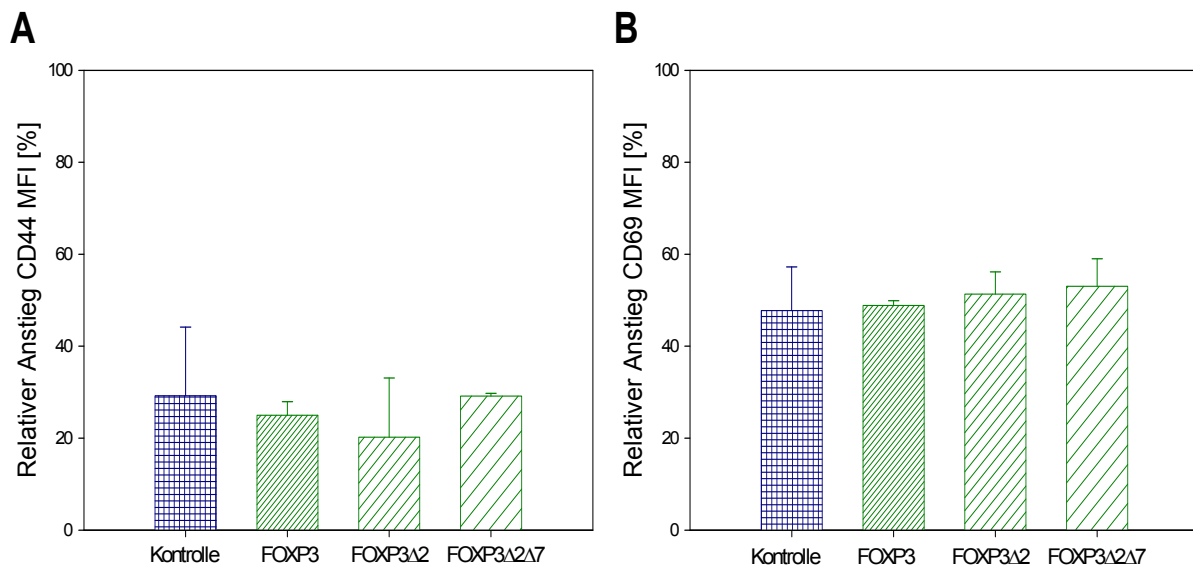


Abbildung 17: FOXP3 Isoform-unabhängige Lymphozytenmarker der Maus

CD4+CD25- Mausexpressoren wurden mit retroviralen Vektoren, die die FOXP3-IRES-GFP Kassetten beinhalten, transduziert (siehe Abbildung 15). Die Geninduktion wurde durch den relativen Anstieg des Expressionsniveaus in GFP-niedrig zu GFP-hoch exprimierenden Zellen untersucht. In Zellen, transduziert mit Leervektor (Kontrolle, blau karierte Balken) oder einer humanen FOXP3 Isoform (grün schraffiert), wurde die Induktion von A) CD44 und B) CD69 gemessen.

Das Expressionsniveau von CD44 oder CD69 ist unabhängig von einer FOXP3 Transduktion und kann nicht durch eine oder mehrere Isoformen spezifisch erhöht werden. Dies demonstriert die gerichtete, FOXP3 abhängige Induktion von Markermolekülen der Suppressorzellen.

3.4.2 FOXP3 Isoformen in humanen CD4+CD25- T-Zellen

Humane T-Zellen können ebenfalls retroviral transduziert werden, doch verursacht die dafür notwendige Stimulation der Zellen bereits eine vermehrte Expression von endogenem FOXP3, so dass Effekte einer exogenen Isoform überlagert werden können. Die Transduktion von MACS isolierten humanen CD4+CD25- T-Zellen wurde im FACS analysiert, eine Transduktionseffizienz von mindestens 20 % wurde erreicht (Abbildung 18A).

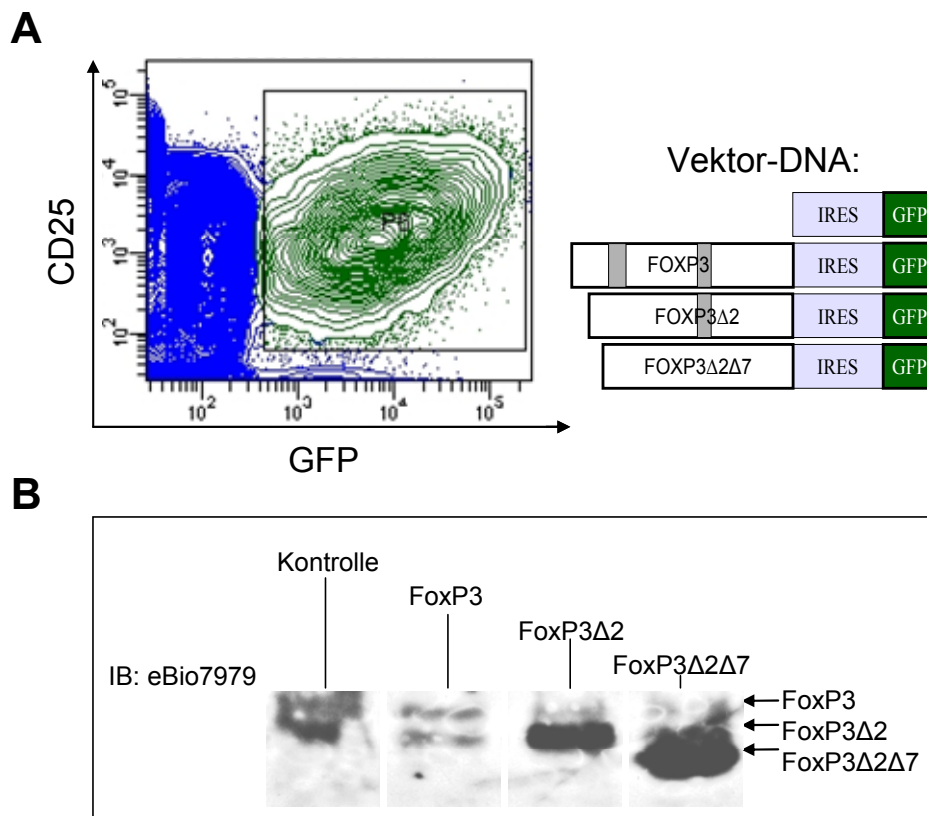


Abbildung 18: Retrovirale Transduktion humaner Effektorzellen

Humane CD4+CD25- Zellen wurden retroviral mit Vektoren transduziert. A) FACS Analyse einer exemplarischen Transduktion humaner Zellen, die blaue Zellpopulation entspricht CD4+GFP- Zellen, die grüne entspricht CD4+GFP+ Zellen. Die FOXP3-IRES-GFP Kassetten der Vektoren ist schematisch dargestellt. B) Immunblot (IB) von transduzierten humanen T-Zellen, FOXP3 Detektion erfolgte mit dem Isoform-unspezifischen Antikörperklon eBio7979.

Obwohl nur jeweils eine humane FOXP3 Isoform bzw. der Leervektor transduziert wurde, sind auch andere Isoformen im Western Blot auszumachen, die stimulationsbedingt exprimiert wurden (Abbildung 18B). Besonders deutlich wird dies bei der Kontrolle mit Leervektor transduzierter Zellen, wo Banden von FOXP3 und FOXP3 Δ 2 detektiert wurden. Unterschiede in der Expressionsstärke sind durch leicht variierende Zellzahlen und Transduktionseffizienzen zu erklären.

Bei der Analyse der CD25 Induktion in Abhängigkeit zur FOXP3 Transduktion wird im Vergleich zu den Experimenten in Mauszellen auch ein stärkerer Anstieg der CD25 Expression bei Leervektor und FOXP3 Δ 2 Δ 7 transduzierten Zellen sichtbar (ca. 40 %) (Abbildung 19).

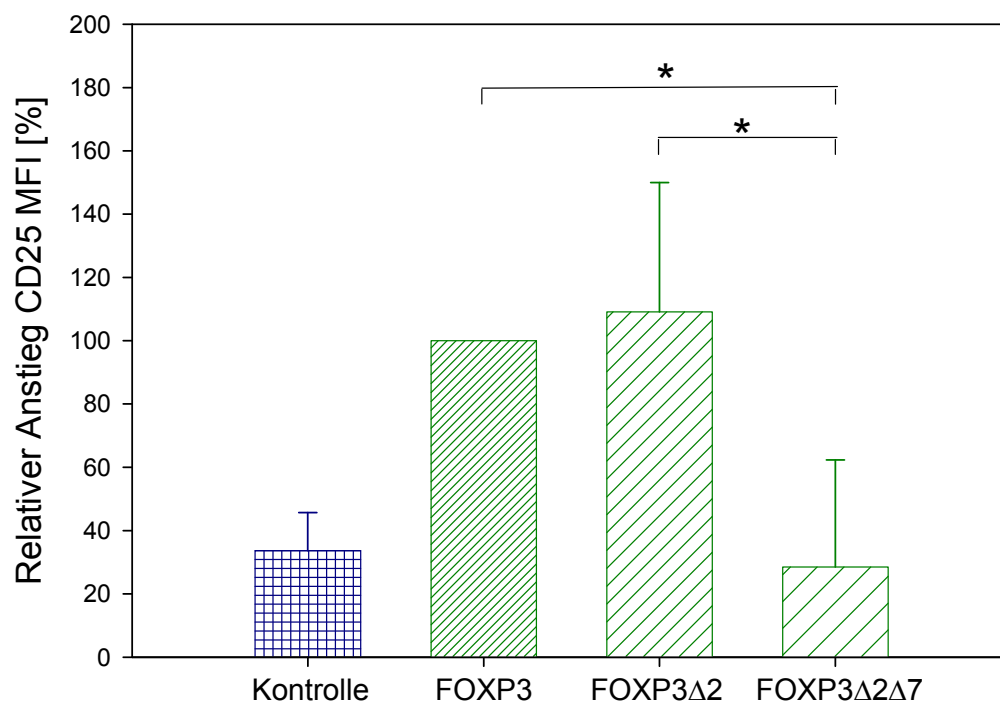


Abbildung 19: CD25 Induktion durch FOXP3 Transduktion in humanen T-Zellen

Humane CD4⁺CD25⁻ T-Zellen wurden mit retroviralen Vektoren, die die FOXP3-IRES-GFP Kasette beinhalten, transduziert (siehe Abbildung 18). Im Durchflusszytometer wurde die Induktion von CD25 durch die Transduktion mit Leervektor (Kontrolle, blau karierte Balken) oder humanen FOXP3 Isoformen (grün schraffiert) untersucht. Transduzierte Zellen befanden sich zum Zeitpunkt der Analyse nicht mehr in der Proliferationsphase. Die Induktion von CD25 wurde durch den relativen Anstieg des Expressionsniveaus in GFP-niedrig zu GFP-hoch exprimierenden Zellen gemessen. Die Induktion von FOXP3 wurde gleich 100% gesetzt. Statistisch signifikante Unterschiede der CD25 Induktion sind hervorgehoben (*).

Trotz der Expression von endogenen FOXP3 Isoformen durch die Aktivierung der Zellen, konnte beobachtet werden, dass die Überexpression von exogenem FOXP3 und FOXP3 Δ 2 eine signifikant stärkere Induktion der CD25 Expression hervorruft. Wie schon in Experimenten mit Mauszellen gezeigt, konnte das Expressionsniveau des Treg-spezifischen Markers CD25 nur durch diese beiden Spleißvarianten induziert werden, nicht aber durch FOXP3 Δ 2 Δ 7. In beiden Spezies ist demnach die funktionelle Geninduktion von FOXP3 abhängig von der *leucine zipper* Struktur des Exons 7.

3.4.3 Inhibitorische Funktion der FOXP3 Isoformen

Eine Foxp3 Transduktion vermittelt in CD4+CD25⁻ T-Zellen der Maus die Kapazität die Proliferation von stimulierten Effektorzellen zu supprimieren [67]. Die Übertragung einer zumindest partiellen suppressiven Funktion durch Transduktion der humanen FOXP3 Isoformen konnte bisher nur für die vollständige Isoform und FOXP3 Δ 2 nachgewiesen werden [125, 126]. Um die Isoform-spezifischen Effekte gesondert beobachten zu können, wurden CD4+CD25⁻ T-Zellen der Maus retroviral transduziert, mit Hilfe des FACS isoliert und im Proliferationsassay mit CFSE-gefärbten CD4+CD25⁻ Effektorzellen kokultiviert. Abbildung 20 zeigt die Verdünnung des Farbstoffes CFSE mit fortschreitender Zellteilung für die Proben, in denen die Effektorzellen mit Leervektor-transduzierten Zellen kokultiviert wurden (obere Reihe, links). Eine fehlende Proliferation ist bei den Proben sichtbar, die mit frisch isolierten Treg Zellen (obere Reihe, Mitte) oder aber mit Foxp3 der Maus transduzierten Zellen (obere Reihe, rechts) supprimiert werden konnten. In der unteren Reihe von Abbildung 20 ist zu erkennen, dass auch die humanen FOXP3 Isoformen eine suppressive Funktion in Mauszellen vermitteln. Sowohl FOXP3 als auch FOXP3 Δ 2 verhindern effektiv die Proliferation der CFSE-gefärbten Effektorzellen (untere Reihe, links und Mitte). Interessanterweise ist die neue FOXP3 Δ 2 Δ 7 Isoform nicht in der Lage eine suppressive Kapazität auf CD4+CD25⁻ Zellen zu übertragen; die kokultivierten Zellen proliferieren und haben zum Zeitpunkt der Analyse schon mehrere Tochtergenerationen entwickelt (untere Reihe, rechts).

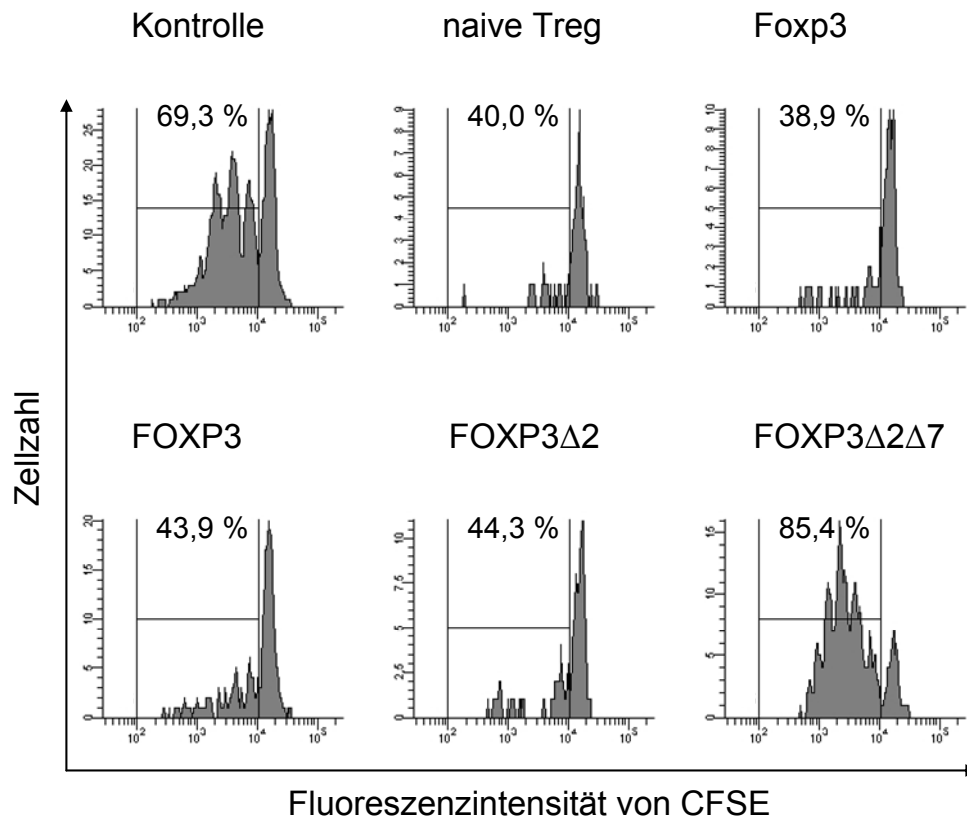


Abbildung 20: Suppressive Kapazität transduzierter Zellen

Im Suppressionsassay wurden CFSE-markierte Effektorzellen mit α -CD3 Antikörper (3 μ g/ml) stimuliert und mit bestrahlten APC (30 Gy) im Verhältnis 1:2 kokultiviert. Zusätzlich wurden frisch isolierte Treg Zellen bzw. FOXP3 transduzierte Zellen, die zuvor FACS isoliert wurden, im Verhältnis 1:1, 1:3, 1:9 oder 1:27 (Treg Zelle : Effektorzelle) hinzugegeben. Die Proliferation wurde nach 72-96 h im Durchflusszytometer gemessen. Die retrovirale Transduktion erfolgte mit Fxp3 der Maus oder den humanen Isoformen FOXP3, FOXP3 Δ 2 und FOXP3 Δ 2 Δ 7 oder dem Leervektor (Kontrolle). Exemplarische Histogramme einer Kokultivierung von Treg Zellen bzw. transduzierter Zelle und Effektorzelle im Verhältnis 1:3 sind gezeigt. Die Ergebnisse wurden in insgesamt drei unabhängigen Experimenten beobachtet.

3.5 Dominant negative Effekte durch FOXP3 Δ 2 Δ 7

3.5.1 Retrovirale Transduktion humaner Treg Zellen mit FOXP3 Isoformen

Da FOXP3 Δ 2 Δ 7 in CD4⁺CD25⁻ T-Zellen keine CD25 Induktion hervorrufen konnte, wurde untersucht, ob die CD25 Expression humaner Treg Zellen durch Transduktion der neuen Isoform verringert werden kann.

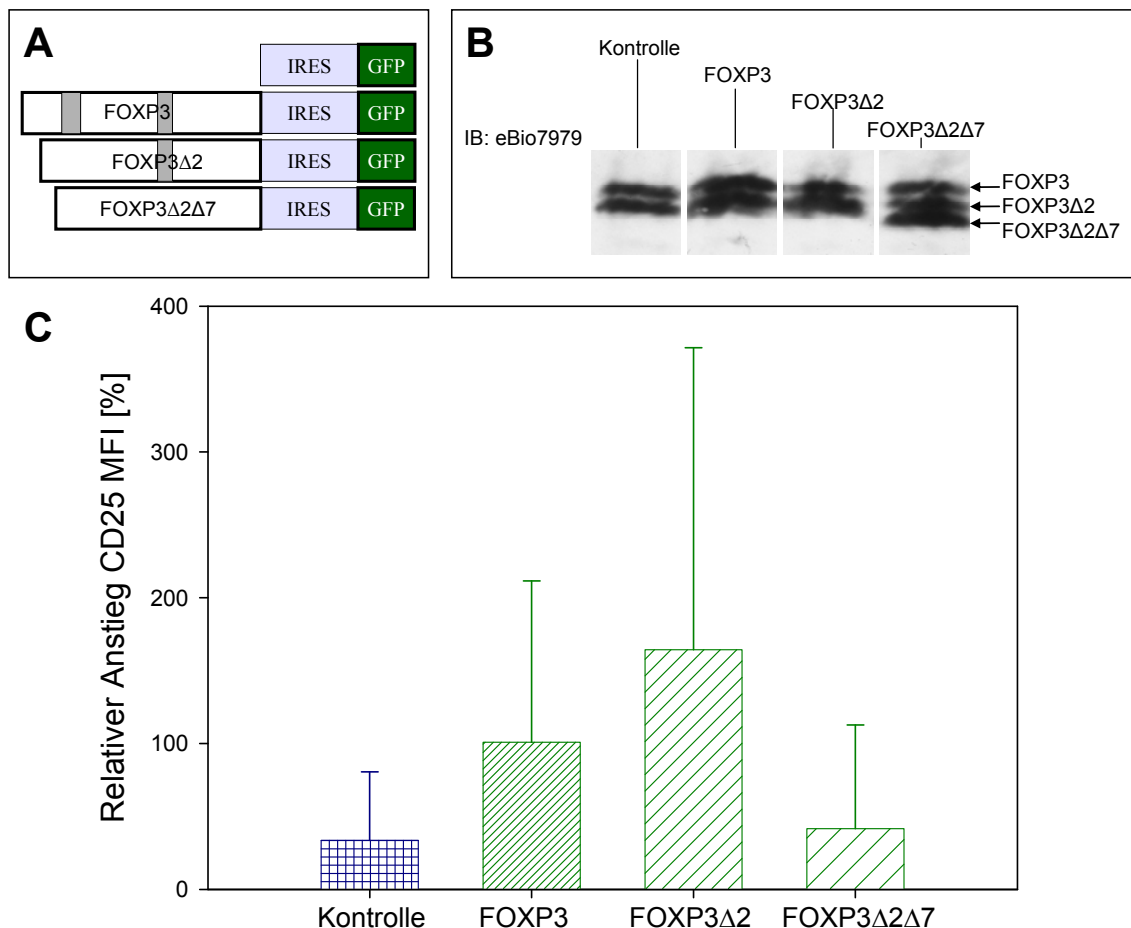


Abbildung 21: FOXP3 Transduktion in humanen Treg Zellen

A) Schematische Darstellung der FOXP3-IRES-GFP Kassetten der retroviralen Vektoren. B) Immunblot (IB) retroviral transduzierter, humaner CD4⁺CD25⁺ T-Zellen; FOXP3 Detektion erfolgte mit dem Isoform-unspezifischen Antikörperklon eBio7979. C) Im Durchflusszytometer wurde die Induktion von CD25 durch die Transduktion mit Leervektor (Kontrolle, blau karierte Balken) oder humanen FOXP3 Isoformen (grün schraffiert) untersucht. Transduzierte Zellen befanden sich zum Zeitpunkt der Analyse nicht mehr in der Proliferationsphase. Die Induktion von CD25 wurde durch den relativen Anstieg des Expressionsniveaus in GFP-niedrig zu GFP-hoch exprimierenden Zellen gemessen. Insgesamt drei unabhängige Versuche wurden durchgeführt.

Abbildung 21B zeigt erneut, dass in humanen Treg Zellen die endogenen Isoformen FOXP3 und FOXP3 Δ 2 exprimiert werden. Im Vergleich zur Kontrollvektor transduzierten Probe konnte eine exogene Überexpression von FOXP3, FOXP3 Δ 2 und FOXP3 Δ 2 Δ 7 mit Hilfe des retroviralen Gentransfers erreicht werden. Dies wird besonders bei FOXP3 Δ 2 Δ 7 transduzierten Zellen durch die zusätzlich detektierte Bande im Immunblot deutlich. Wie aus Abbildung 21C ersichtlich, ist FOXP3 Δ 2 Δ 7 nicht in der Lage die Expression von CD25 in Treg Zellen signifikant zu vermindern. Dies ist angesichts der hohen Expressionsrate der beiden anderen Isoformen in Treg Zellen zu erwarten gewesen, da zum Zeitpunkt der Transduktion der Phänotyp der Treg Zellen bereits etabliert und durch FOXP3 bzw. FOXP3 Δ 2 epigenetisch festgelegt ist [64]. Tendenziell konnte selbst in humanen Treg Zellen die CD25 Expression durch exogenes FOXP3 bzw. FOXP3 Δ 2 gesteigert werden, nicht aber durch FOXP3 Δ 2 Δ 7.

3.5.2 Dominant negativer Effekt von FOXP3 Δ 2 Δ 7

FOXP3 Δ 2 Δ 7 ist zum einen in der Lage mit allen anderen Isoformen zu dimerisieren (siehe Kapitel 3.2), die transkriptionelle Aktivität von NFAT und NF- κ B zu kontrollieren und AML-1 zu binden (siehe Kapitel 3.3). Zum anderen wird allerdings weder der Treg-spezifische Phänotyp noch die suppressive Kapazität durch Transduktion von FOXP3 Δ 2 Δ 7 vermittelt (siehe Kapitel 3.4). Es erscheint unter diesen Voraussetzungen wahrscheinlich, dass diese Isoform die Funktionen von FOXP3 und FOXP3 Δ 2 negativ beeinflussen kann, z.B. durch Neutralisation oder Konkurrenz um Interaktionspartner. Um dieses Wirkungsweise genauer zu untersuchen, wurden CD4⁺CD25⁻ Mausezellen mit je zwei retroviralen Vektoren transduziert, die beide auf dem MIGR1 Retrovirus basierten. Die Transduktion des einen Konstruktes wurde über die FOXP3-IRES-GFP Kasette detektiert, die andere mittels einer FOXP3-IRES-CFP Kasette. Zum Zeitpunkt der Analyse der CD25 Induktion befanden sich die transduzierten Zellen nicht mehr in der Proliferationsphase. Abbildung 22A zeigt exemplarisch eine Transduktion mit FOXP3 Δ 2 Δ 7 (GFP⁺ Zellen) und FOXP3 (CFP⁺ Zellen), die entsprechende Transduktion mit FOXP3 Δ 2 Δ 7 (GFP⁺ Zellen) und FOXP3 Δ 2 (CFP⁺ Zellen) ist in Abbildung 22B gezeigt. Die nummerierten Regionen repräsentieren einfach bzw. doppelt transduzierte Zellen, deren CD25 Expression in Histogrammen dargestellt ist. Die jeweiligen MFI-Werte entsprechen der CD25 Expression der Zellpopulationen.

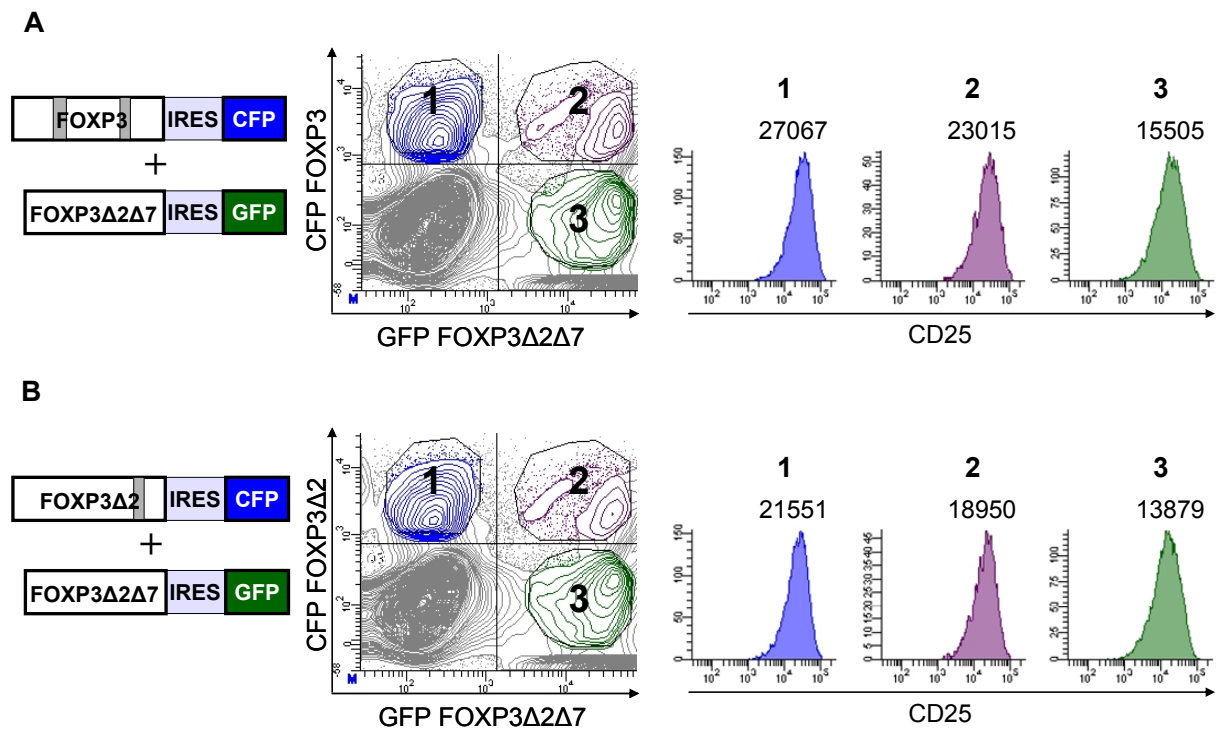


Abbildung 22: CD25 Induktion nach Transduktion mit zwei FOXP3 Isoformen

CD4⁺CD25⁻ Mauseellen wurden mit zwei retroviralen Vektoren, deren FOXP3-IRES-GFP bzw. FOXP3-IRES-CFP Kassetten schematisch dargestellt sind, transduziert. Einfach und doppelt transduzierte CD4⁺CD25⁻ Mauseellen wurden im Durchflusszytometer analysiert. Markiert sind Regionen mit einfach transduzierten Zellen (Region 1, blau: CFP⁺ Zellen, Region 3, grün: GFP⁺ Zellen) und doppelt transduzierten Zellen (Region 2, violett: CFP⁺GFP⁺ Zellen). Die Stärke der jeweiligen CD25 Induktion für die Regionen ist im Histogramm mit dem dazugehörigen MFI-Wert dargestellt. A) Transduktion mit FOXP3 (korreliert mit CFP) und FOXP3Δ2Δ7 (korreliert mit GFP); B) Transduktion mit FOXP3Δ2 (korreliert mit CFP) und FOXP3Δ2Δ7 (korreliert mit GFP).

Anhand der MFI-Werte lässt sich erkennen, dass sowohl in FOXP3 als auch in FOXP3Δ2 einfach transduzierten Zellen CD25 stärker exprimiert wird als in FOXP3Δ2Δ7 einfach transduzierten Zellen (Region 1 gegen Region 3). Darüber hinaus bewirkt eine Transduktion mit FOXP3 oder FOXP3Δ2 keine vergleichbare Induktion von CD25, wenn gleichzeitig FOXP3Δ2Δ7 transduziert wurde (Region 1 gegen Region 2).

Im Folgenden wurde die Induktion von CD25 in doppelt transduzierten Zellen untersucht, wobei der Referenzwert durch die Leervektor oder FOXP3Δ2Δ7 einfach transduzierte Zellpopulation ermittelt wurde. Auf diese Art und Weise konnten die mit FOXP3 und Kontrollvektor doppelt transduzierten Populationen mit FOXP3 und FOXP3Δ2Δ7 doppelt transduzierten Populationen verglichen werden. Gleichmaßen wurden die Populationen von

FOXP3 Δ 2 und Kontrollvektor doppelt transduzierten Zellen mit FOXP3 Δ 2 und FOXP3 Δ 2 Δ 7 doppelt transduzierten Zellen verglichen (Abbildung 23).

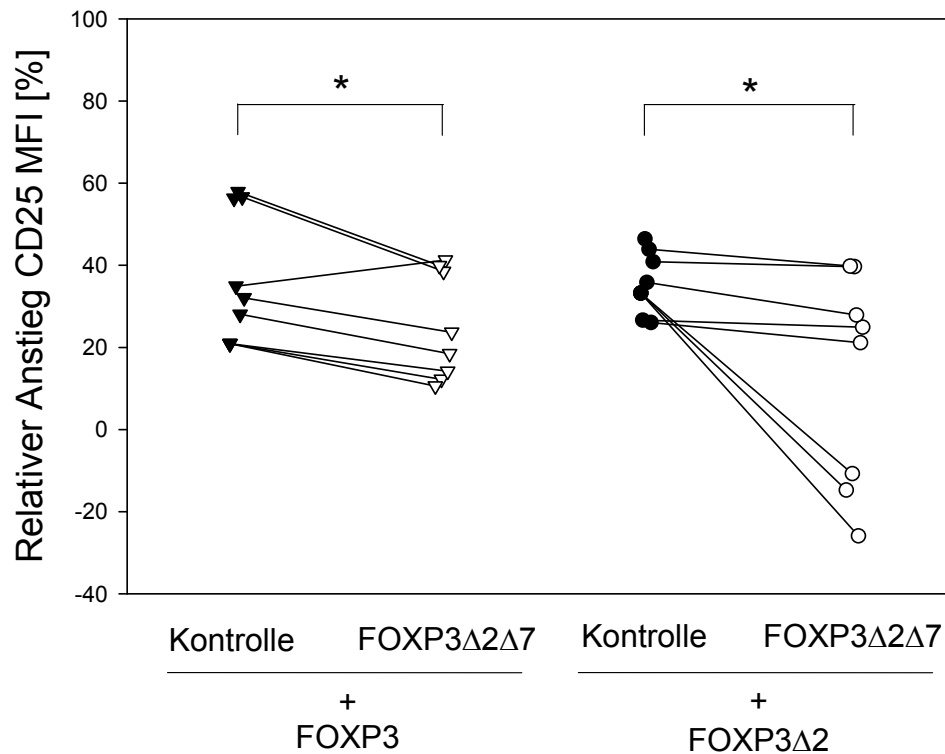


Abbildung 23: FOXP3 Δ 2 Δ 7 beeinflusst die FOXP3-abhängige Induktion von CD25

CD4⁺CD25⁻ Mauseellen wurden mit zwei Retroviren kotransduziert. Die Transduktion erfolgte mit Vektoren, die die Genkassetten FOXP3-IRES-CFP (linke Seite) oder FOXP3 Δ 2-IRES-CFP (rechte Seite), besitzen. Zusätzlich zur ersten Isoform wurde entweder ein leerer Kontrollvektor (Kontrolle) mit IRES-GFP Kasette oder FOXP3 Δ 2 Δ 7 über einen Vektor mit FOXP3 Δ 2 Δ 7-IRES-GFP Kasette transduziert. Die CD25 Expression der doppelt transduzierten Zellen wurde im Durchflusszytometer gemessen und die prozentuale CD25 Induktion in Bezug auf Kontrollvektor bzw. FOXP3 Δ 2 Δ 7 einfach transduzierte Zellen ermittelt. Schwarze Symbole kennzeichnen FOXP3/Kontrollvektor bzw. FOXP3 Δ 2/Kontrollvektor kotransduzierte Zellen, weiße Symbole die Proben mit FOXP3/FOXP3 Δ 2 Δ 7 bzw. FOXP3 Δ 2/FOXP3 Δ 2 Δ 7. Alle Datenpunkte repräsentieren unabhängige Kotransduktionsexperimente. Statistisch signifikante Unterschiede sind hervorgehoben (*).

Wie in Abbildung 23 gezeigt, konnte gegenüber dem Kontrollvektor eine statistisch signifikant geringere Induktion von CD25 beobachtet werden, wenn stattdessen die FOXP3 Δ 2 Δ 7 Isoform kotransduziert wurde. Demnach ist die neue Isoform FOXP3 Δ 2 Δ 7 in der Lage, die durch FOXP3 und FOXP3 Δ 2 vermittelte Induktion von CD25 zu hemmen und fungiert somit als dominant negativer Inhibitor für FOXP3 und FOXP3 Δ 2.

3.6 Identifizierung Isoform-spezifischer FOXP3 Bindungspartner

3.6.1 Differentielle Kontrolle der AP-1 Aktivität durch FOXP3 Isoformen

Im Gegensatz zur qualitativ vergleichbaren Suppression von NFAT und NF- κ B kontrollierten Reportergenen durch alle drei FOXP3 Isoformen (siehe Kapitel 3.3.1), konnte für die AP-1 vermittelte Transkription eine Suppression nur durch die Kotransfektion mit FOXP3 Δ 2 oder FOXP3 Δ 2 Δ 7 beobachtet werden (Abbildung 24).

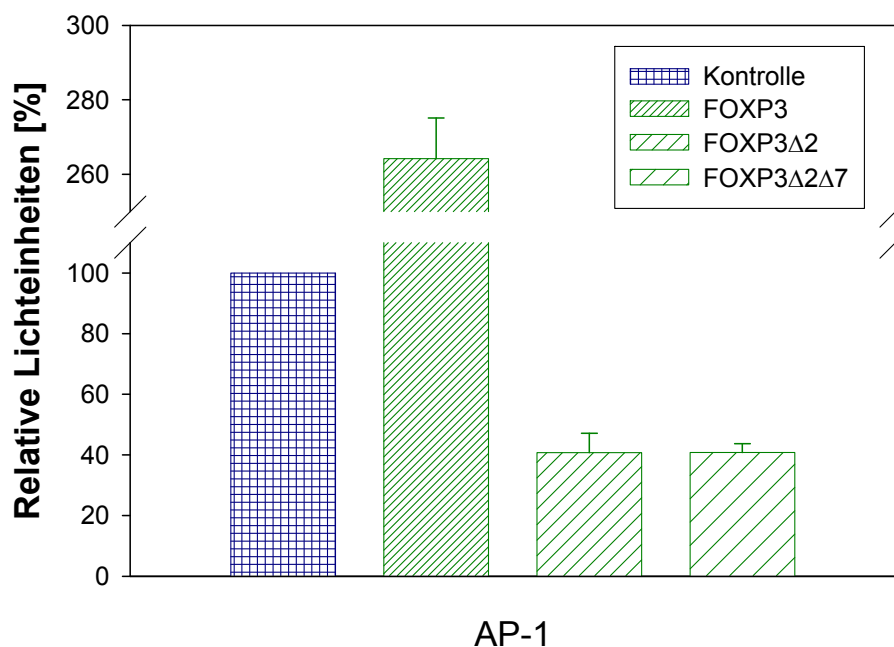


Abbildung 24: FOXP3 Isoformen im AP-1 Reportergen Assay

NIH3T3 Zellen wurden mit 10 ng pRL-CMV (*Renilla*), 100 ng pAP-1-TA-luc und 0,5 μ g FOXP3 kodierenden Vektor bzw. Leervektor kotransfiziert. Luciferaseaktivität des Zelllysats wurde normiert auf die Biolumineszenz der *Renilla* Reaktion, die Werte für den Leervektor (blau karierte Balken) wurden als Referenz 100% gesetzt. Grüne Balken repräsentieren FOXP3 transduzierte Proben (starke, mittlere und leichte Schraffur: FOXP3, FOXP3 Δ 2 und FOXP3 Δ 2 Δ 7). Von allen Proben wurden Triplikate durchgeführt, die Luciferasereaktion eines Probenlysates wurde dreimal unabhängig gemessen. Jeweils eine Versuchsreihe von mindestens drei unabhängigen Experimenten ist gezeigt.

Wie in Abbildung 24 dargestellt, führte ausschließlich die Expression von FOXP3 Isoformen, denen Exon 2 fehlt, zu einer Reduktion der transkriptionellen Aktivität um ca. 60 %, während die Isoform FOXP3 die AP-1 vermittelte Transkription um den Faktor 2,6 verstärkte.

AP-1 ist ein heterodimerer Transkriptionsfaktor bestehend aus c-Jun und c-Fos, die über einen *leucine zipper* miteinander verbunden sind. AP-1 ist in der Lage, allein oder in Kooperation mit NFAT DNA zu binden, wobei die Konsensussequenzen von NFAT, AP-1 oder FOXP3 keine Homologien zeigen, so dass eine denkbare Competition um DNA-Bindungsstellen unwahrscheinlich ist. Anhand der Kristallstrukturanalyse von NFAT-AP-1-DNA-Komplexen wird angenommen, dass FOXP3 in der Lage ist, AP-1 aus dem Komplex zu verdrängen und stabile NFAT-FOXP3-DNA-Komplexe zu bilden [94]. Eine vor kurzem veröffentlichte Studie zeigte, dass Foxp3 aus der Maus an phosphoryliertes c-Jun binden kann und dadurch die AP-1 vermittelte Transkription inhibiert wird [136]. Die hier gezeigten Resultate favorisieren die Annahme, dass zum einen alle FOXP3 Isoformen endogenes AP-1 aus Komplexen freisetzen, zum anderen aber nur FOXP3 Isoformen ohne Exon 2, namentlich FOXP3 Δ 2 und FOXP3 Δ 2 Δ 7, Bindungspartner und/oder Inhibitoren von AP-1 sind.

3.6.2 FOXP3 Isoformen ohne Exon 2 interagieren mit c-Jun

Die AP-1 vermittelte Transkription konnte durch die Expression von FOXP3 Δ 2 und FOXP3 Δ 2 Δ 7 inhibiert werden. Da der Transkriptionsfaktor c-Jun neben c-Fos ein Bestandteil des Transkriptionskomplexes AP-1 ist und Foxp3 bzw. ein N-terminales Fragment von Foxp3 in der Maus an c-Jun bindet [136], wurden Koimmunpräzipitationen mit FLAG-markiertem c-Jun durchgeführt, um zu untersuchen, ob die humanen Isoformen von FOXP3 direkt an AP-1 binden können. HEK293T Zellen wurden mit FOXP3 Isoformen und FLAG-markiertem c-Jun kotransfiziert, nach drei Tagen lysiert und die Komplexe mit Hilfe des α -FLAG Antikörperklons M2 isoliert. Die Analyse im Immunblot offenbarte, dass nur FOXP3 Δ 2 und FOXP3 Δ 2 Δ 7 an c-Jun binden, nicht aber die vollständige, 11 Exon lange Isoform FOXP3 (Abbildung 25). Während das alternative Spleißen von Exon 2 die Proteinbindung erst ermöglicht, so führt die weitere Deletion von Exon 7 in der natürlichen Spleißform FOXP3 Δ 2 Δ 7 zu keiner verminderten Protein-Protein-Wechselwirkung. Somit wird die c-Jun-FOXP3-Bindung entweder direkt durch eine Proteinstruktur im Bereich der Verknüpfung von Exon 1 und Exon 3 vermittelt oder ein weiterer Kofaktor, der mit Exon 2 interagiert, blockiert das Binden von c-Jun durch sterische Hinderung. Der von Exon 7 gebildete *leucine zipper* hat keinen Einfluss auf die Interaktion mit c-Jun. Übereinstimmend damit konnte auch keine Sequenzhomologie der *leucine zipper* von FOXP3 und c-Fos gefunden werden.

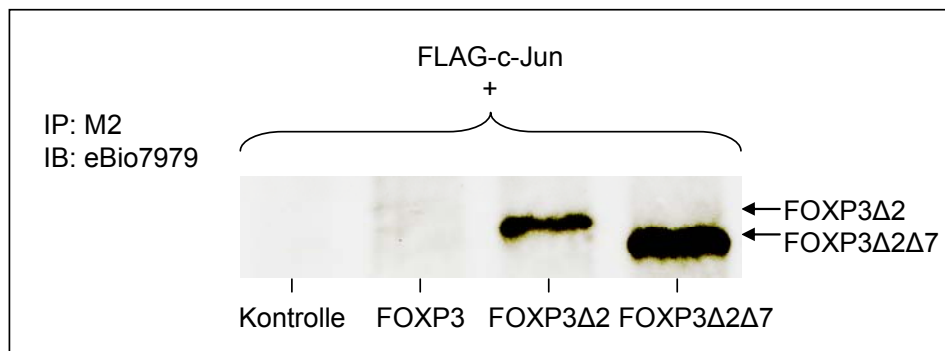


Abbildung 25: FOXP3 Isoformen ohne Exon 2 binden an c-Jun

HEK293T Zellen wurden mit FOXP3 Isoformen oder Leervektor und FLAG-c-Jun kotransfiziert (im Verhältnis 10:1). Eine Immunpräzipitation (IP) mit dem α -FLAG Antikörperklon M2 isolierte Proteinkomplexe, die FOXP3 Isoformen enthalten. Die Detektion im Immunblot (IB) wurde mit Hilfe des Isoform-unspezifischen α -FOXP3 Antikörperklons eBio7979 durchgeführt. Eine Koimmunpräzipitation aus fünf unabhängigen Experimenten ist dargestellt.

3.6.3 Isoform-spezifische Interaktionen im *Yeast-2-Hybrid*

Die bisherigen Resultate ergeben ein differentielles Bild von den Aufgaben und Funktionen der FOXP3 Isoformen. Teilweise stimmen dabei die Bindungspartner und die transkriptionelle Kontrolle überein, andererseits zeigt insbesondere FOXP3 Δ 2 Δ 7 Unterschiede bei der Induktion Treg-spezifischer Marker und der Vermittlung der suppressiven Funktion. Aus diesem Grund wurde ein *Yeast-2-Hybrid* Assay in Zusammenarbeit mit Dr. Manfred Koegl am Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg (DKFZ) durchgeführt, um weitere Isoform-spezifische Bindungspartner zu ermitteln. Zu diesem Zweck wurden Fusionsproteine aus FOXP3 Isoformen und der Gal4 DNA-Bindungsdomäne hergestellt. Neben den Isoformen wurden auch jeweils Deletionen der FKH Domäne C-terminal mit dem Hefeprotein verbunden, um eine potentiell störende DNA-Bindung von FOXP3 zu vermeiden. Eine physikalische Interaktion der FOXP3 Fusionsproteine mit Fusionsproteinen aus dem gesuchten Zielgen und der Gal4 Transkriptionsaktivierungsdomäne aktiviert im Hefeklon einen Metabolismus, der ein Überleben auf Mangelböden ermöglicht [168]. Die Anzahl erhaltener Klone spiegelt dabei indirekt die Qualität der gefundenen Bindungen wider. Die Interaktionen wurden nach Wahrscheinlichkeit der Relevanz (z.B. Gewebespezifität, Bindungsaufkommen in anderen

Assays, etc.) gewichtet. Die aussichtsreichsten Kandidaten einer spezifischen FOXP3 Bindung sind in Abbildung 26 gezeigt.

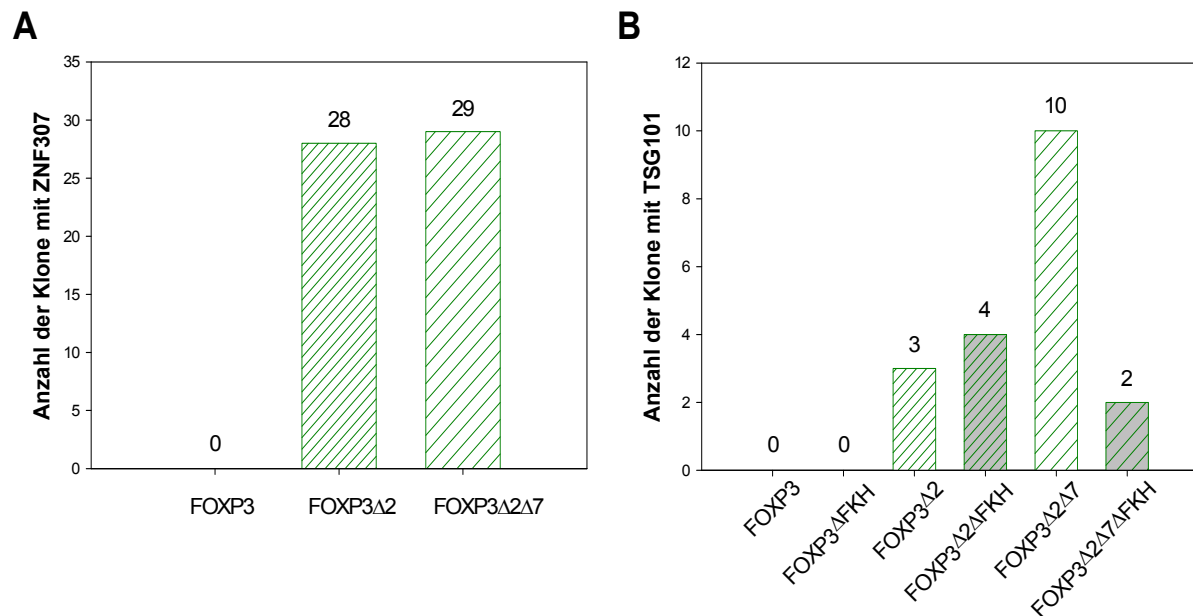


Abbildung 26: Bindungspartner von FOXP3 im *Yeast-2-Hybrid* Assay

Anzahl der Hefeklone, die nach Transfektion mit FOXP3 Konstrukten isoliert werden konnten und zuvor mit A) Zinkfinger 307 (ZNF307) oder B) *tumor susceptibility gene 101* (TSG101) transfiziert wurden. Humane FOXP3 Isoformen (mittlere bzw. leichte Schraffur: FOXP3 Δ 2 bzw. FOXP3 Δ 2 Δ 7) und FOXP3 Konstrukte ohne FKH (grau unterlegt) sind dargestellt, Zahlenwerte entsprechen der jeweiligen Anzahl unabhängiger Klone.

Die beiden Gene, Zinkfinger 307 (ZNF307) und *tumor susceptibility gene 101* (TSG101), binden dabei ausschließlich die FOXP3 Isoformen, die Exon 2 alternativ herausgespleißt haben. Eine Überprüfung in der *Realtime* RT-PCR bestätigte dabei die Transkription der beiden Gene in humanen CD4⁺ T-Zellen, wobei keine signifikanten Unterschiede in der Transkription beider Gene in CD4⁺CD25⁻ und CD4⁺CD25⁺ T-Zellen beobachtet werden konnten (Abbildung 27).

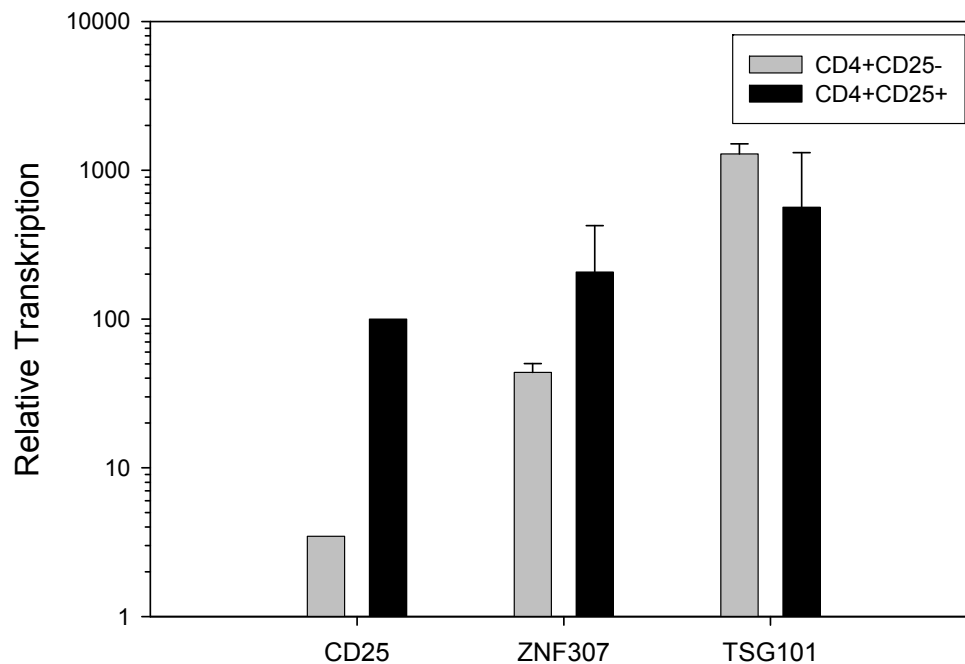


Abbildung 27: Transkription von ZNF307 und TSG101 in humanen T-Zellpopulationen
Realtime RT-PCR von MACS isolierten CD4+CD25- T-Zellen (graue Balken) und CD4+CD25+ T-Zellen (schwarze Balken) aus Blut von zwei gesunden Donoren. Untersucht wurde die Transkription von CD25 (in CD4+CD25+ T-Zellen 100% gesetzt), dem Zinkfinger 307 (ZNF307) und dem *tumor susceptibility gene 101* (TSG101).

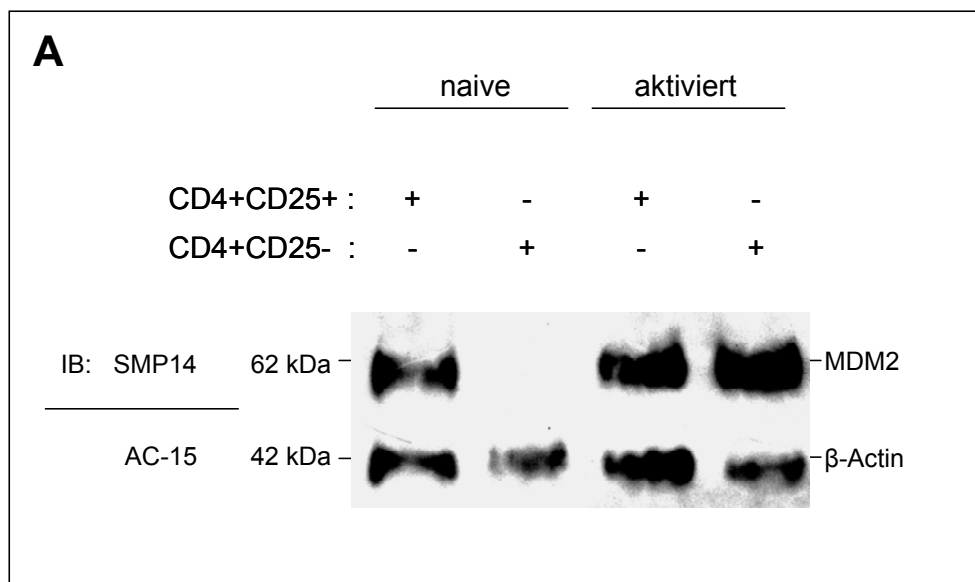
Der Zinkfinger 307 ist ein Transkriptionsfaktor, der sieben Zinkfinger, eine Krüppel-assoziierte Box und eine SCAN Domäne beinhaltet. Es konnte gezeigt werden, dass ZNF307 die transkriptionelle Aktivität von p53 und p21 supprimiert. Darüber hinaus wurde in ZNF307 transfizierten Zellen eine negative Regulation der p53 Expression über die Induktion des Proteins *murine double minute 2* (MDM2) beobachtet [172].

3.6.4 MDM2 in naiven T-Zellen und Treg Zellen

Da in zwei unabhängigen Studien zur Untersuchungen der genomischen Verteilung von Foxp3 Bindungsstellen mit Hilfe der Mikrochip-gestützten Chromatin-Immünpräzipitation nachgewiesen wurde, dass Foxp3 unter anderem den MDM2 Promotor bindet [142, 143], beeinflusst Foxp3 zum einen die Transkription von MDM2, zum anderen könnte über die im Y2H-Assay identifizierte Interaktion von FOXP3 mit ZNF307 MDM2 induziert werden. Bei der Analyse der humanen MDM2 Promotorsequenz konnte zudem mindestens eine FOXP3

bzw. NFAT-FOXP3 Konsensussequenz gefunden werden. Dieses Motiv, TGTTTCA, wurde auch zur Aufklärung der Röntgenkristallstrukturanalyse von NFAT-FOXP2 Komplexen verwendet [94] und befindet sich an einer Position 2826 Nukleotide vor dem MDM2 Startkodon im humanen Chromosom 12.

Die MDM2 Expression in MACS isolierten CD4+CD25⁻ und CD4+CD25⁺ T-Zellen der Maus und des Menschen wurde im Western Blot detektiert. Abbildung 28A zeigt, dass im naiven Zustand Treg Zellen der Maus mehr MDM2 exprimieren als naive CD4+CD25⁻ T-Zellen (linke Seite). Nach Stimulation der Zellen mit α -CD3 und α -CD28 konnte dieser Unterschied nicht mehr beobachtet werden, was dafür spricht, dass MDM2 einen weiteren Aktivierungsmarker darstellt, der in Treg Zellen höher exprimiert ist. In humanen T-Zellen wurde statt der Zunahme der absoluten MDM2 Proteinmenge eine größere Form von MDM2 in Treg Zellen detektiert. Abbildung 28B zeigt einen Western Blot, bei dem diese Bande ausschließlich in Proben mit aufgereinigten CD4+CD25⁺ T Zellen bei ca. 80 kDa beobachtet werden kann. Zusätzlich zur MDM2 Detektion wurde die Blotmembran auch mit spezifischen Antikörpern gegen FOXP3 und β -Actin inkubiert (2. bzw. 3. Reihe der Abbildung 28B).



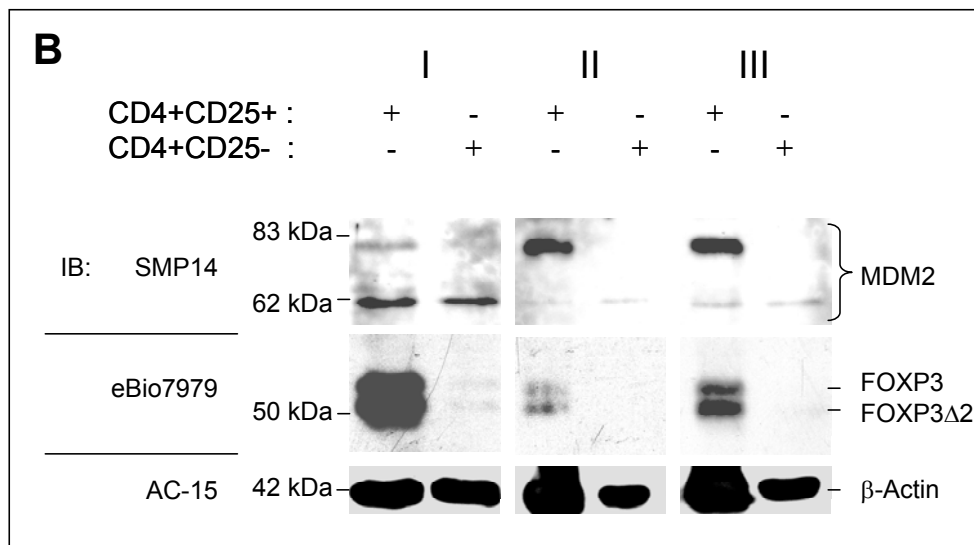


Abbildung 28: Differentielle MDM2 Expression in naiven CD25+ und CD25-T-Zellen

MACS isolierte CD4+CD25+ und CD4-CD25- Mausezellen in A) bzw. humane T-Zellen aus drei gesunden Donoren (I-III) in B) wurden im Immunblot (IB) auf die Expression von MDM2 analysiert. Aktivierung der Zellen in A) erfolgte mit α -CD3 und α -CD28 Antikörpern (3 μ g/ml) für 24 h; in B) wurden MDM2, FOXP3 und β -Actin nacheinander mit den Antikörperklonen SMP14, eBio7979 und AC-15 detektiert.

Während in naiven CD4+CD25- T-Zellen der Maus im Gegensatz zu Treg Zellen kein MDM2 detektiert wird, kann bei humanen FOXP3+ Zellen MDM2 mit größerer apparenter molekularer Masse als in FOXP3- Zellen beobachtet werden. Es ist daher anzunehmen, dass eine Treg-spezifische MDM2 Spleißvariante oder posttranslationale Modifikation von MDM2 in humanen Treg Zellen existiert. Bislang konnte diese Form von MDM2 nicht durch FOXP3 Transfektionen induziert werden, was allerdings auch mit der unterschiedlichen Suszeptibilität einzelner Zelllinien zusammenhängen könnte. Weiterführende Experimente könnten in Zukunft die Zusammenhänge von FOXP3 und MDM2 offenlegen und dabei helfen die Unterschiede von MDM2 in beiden T-Zellpopulationen zu charakterisieren.

3.6.5 FOXP3 Isoformen ohne Exon 2 interagieren mit TSG101

3.6.5.1 Koimmunpräzipitation von TSG101 und FOXP3Δ2

Auch für das zweite im Y2H-Assay identifizierte Gen TSG101 kann eine Verbindung zu MDM2 hergestellt werden. So ist bekannt, dass TSG101 im Zellkern den Abbau von MDM2 verhindert, was wiederum eine beschleunigte Degradation von p53 zur Folge hat [173].

Sowohl TSG101 als auch MDM2 sind Onkogene, die in mutierter Form besonders in Brustkrebszellen auftreten, wo sie die Kontrolle über Zellzyklus und kontrollierten Zelltod aufheben [174, 175]. Interessanterweise exprimieren Brustkarzinome ebenfalls FOXP3 [162], so dass ein Zusammenspiel dieser Faktoren denkbar ist.

Neben der intranukleären Funktion von TSG101 kontrolliert dieses Protein als Teil des ESCRT-I Komplexes (*endosomal sorting complex required for transport*) auch die Bildung und den Transport von Vesikeln (Übersicht in [176]). Dabei bindet TSG101 über eine nicht aktive Variante der Ubiquitin E2 Ligaseregion (UEV) Ubiquitin bzw. Hrs (*hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate*), ein Ubiquitin-erkennendes Protein. Die UEV Domäne interagiert dabei zum einen mit Ubiquitin, zum anderen wird eine spezifische tetramere Aminosäuresequenz - P(S/T)AP - gebunden. Die Relevanz der letzteren Wechselwirkung wird verdeutlicht durch die Beobachtung, dass virale Proteine mit P(S/T)AP Sequenzen die Bindung zu TSG101 zur Knospung viraler Partikel ausnutzen [177].

Um die in Hefezellen nachgewiesene TSG101-FOXP3 Δ 2 Interaktion in Säugertierzellen zu testen, wurden Koimmunpräzitationsexperimente mit FLAG-markiertem TSG101 und FOXP3 Isoformen in HEK293T Zellen durchgeführt (Abbildung 29).

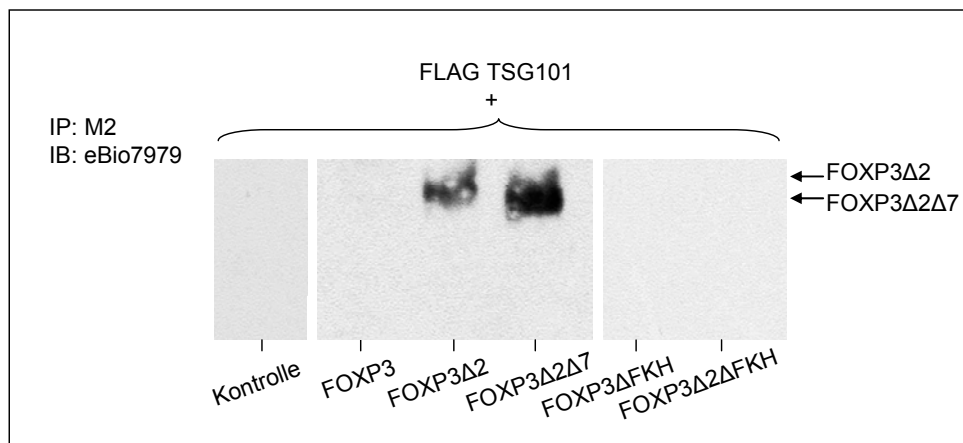


Abbildung 29: Komplexbildung von FOXP3 Δ 2 Isoformen mit TSG101

HEK293T Zellen wurden mit FOXP3 Isoformen, FOXP3 Deletionsmutanten (Δ FKH) oder Leervektor (Kontrolle) und FLAG-TSG101 kotransfiziert (im Verhältnis 10:1). Eine Immunpräzitation (IP) mit dem α -FLAG Antikörperklon M2 isoliert Komplexe, die FOXP3 Δ 2 und FOXP3 Δ 2 Δ 7 enthalten. Die Detektion im Immunblot (IB) wurde mit Hilfe des Isoform-unspezifischen α -FOXP3 Antikörperklons eBio7979 durchgeführt.

Wie in Abbildung 29 gezeigt, bindet auch in diesen humanen Zellen TSG101 die FOXP3 Isoformen FOXP3 Δ 2 und FOXP3 Δ 2 Δ 7, während die vollständige Isoform FOXP3 nicht kopräzipitiert werden konnte. FOXP3 Deletionsmutanten, denen die FKH Domäne fehlt, werden ebenfalls nicht gebunden. Der Einfluss von dieser Region auf die Interaktion mit TSG101 wird verdeutlicht durch die fehlende Komplexbildung mit FOXP3 Δ 2 Δ FKH.

3.6.5.2 *Yeast-2-Hybrid* Assay von TSG101 und FOXP3 Δ 2

Um die Isoform-spezifische Interaktion von FOXP3 an TSG101 zu validieren, wurden Y2H-Assays mit Fusionsproteinen aus FOXP3 Isoformen und Gal4 DNA-Bindungsdomäne sowie TSG101 und Gal4 Transkriptionsaktivierungsdomäne bzw. Kontrollvektor durchgeführt. Eine positive Interaktion führte in diesem Fall zur Expression von Luciferase, so dass in den Zelllysaten eine Lichtreaktion gemessen wurde. Die Y2H-Assays wurden von Dr. Manfred Koegl am Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg (DKFZ) durchgeführt. Abbildung 30 zeigt einen von drei unabhängigen Y2H-Assays mit Hefeklonen, die mit entsprechenden Fusionsproteinen transfiziert wurden.

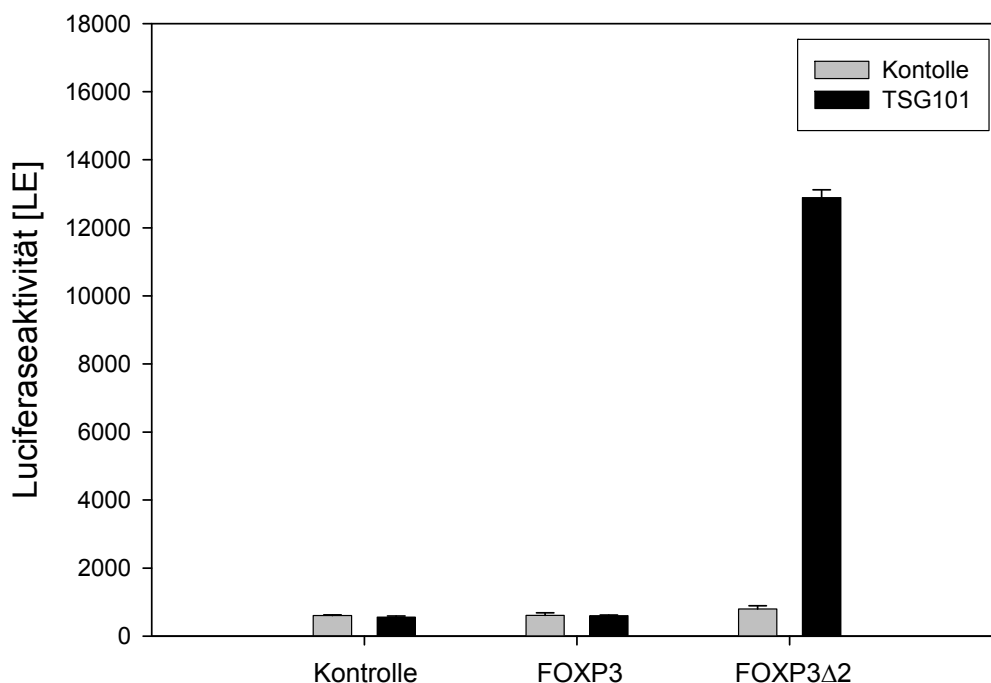


Abbildung 30: Interaktion von FOXP3 Δ 2 und TSG101 in Hefezellen

Yeast-2-Hybrid Assay mit Kontrollvektor- bzw. TSG101-Transfektanten (graue bzw. schwarze Balken) und entsprechenden FOXP3 Isoformen. Datenpunkte entsprechen der Luciferaseaktivität in gemessenen Lichteinheiten (LE). Ein Experiment von insgesamt drei unabhängigen Versuchen ist dargestellt.

Wie in Abbildung 30 gezeigt, bestätigte sich erneut die Isoform-spezifische Bindung von FOXP3 Δ 2 an TSG101. Die vollständige Spleißvariante FOXP3 kann nicht mit TSG101 wechselwirken. Möglicherweise wird die Proteinbindung entweder direkt durch die Struktur der Exonregionen 1 und 3 vermittelt oder aber die Bindungsregion ist in der Isoform, die Exon 2 nicht gespleißt hat, durch sterische Hinderung nicht zugänglich für TSG101. Eine weitere Erklärung wäre die Bindung eines anderen Moleküls an Exon 2 von FOXP3, das sowohl in Hefezellen beim Y2H-Assay als auch in humanen Zellen bei der Koimmunpräzipitation die TSG101 Bindungsstelle besetzt und/oder blockiert.

3.6.5.3 Analyse der FOXP3 Δ 2 Bindungsregion an TSG101

Es konnte gezeigt werden, dass TSG101 andere Proteine über die UEV Domäne binden kann, wenn diese die Erkennungssequenz P(S/T)AP besitzen. Dabei ist die Interaktion der UEV Domäne mit der Tetrapeptidsequenz für die Motive PSAP oder PTAP qualitativ gleich [177]. Da sich in der Aminosäuresequenz von FOXP3 zwei PSAP Motive befinden, könnte die Interaktion mit TSG101 ebenfalls über diese Motive vermittelt sein (Abbildung 31A).

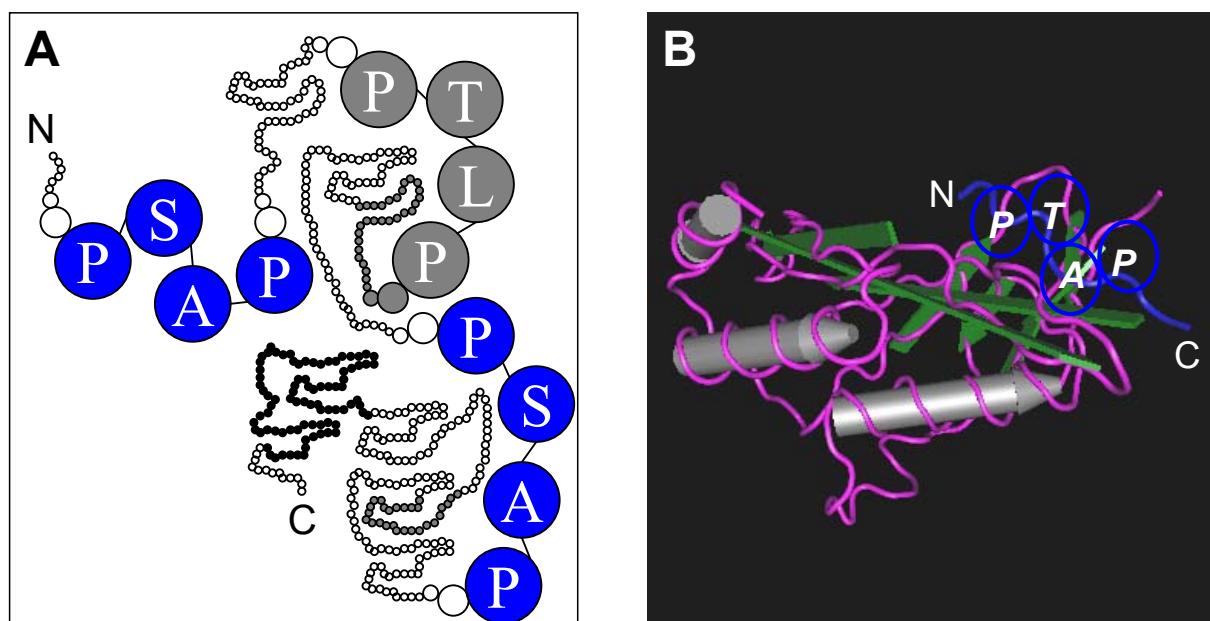
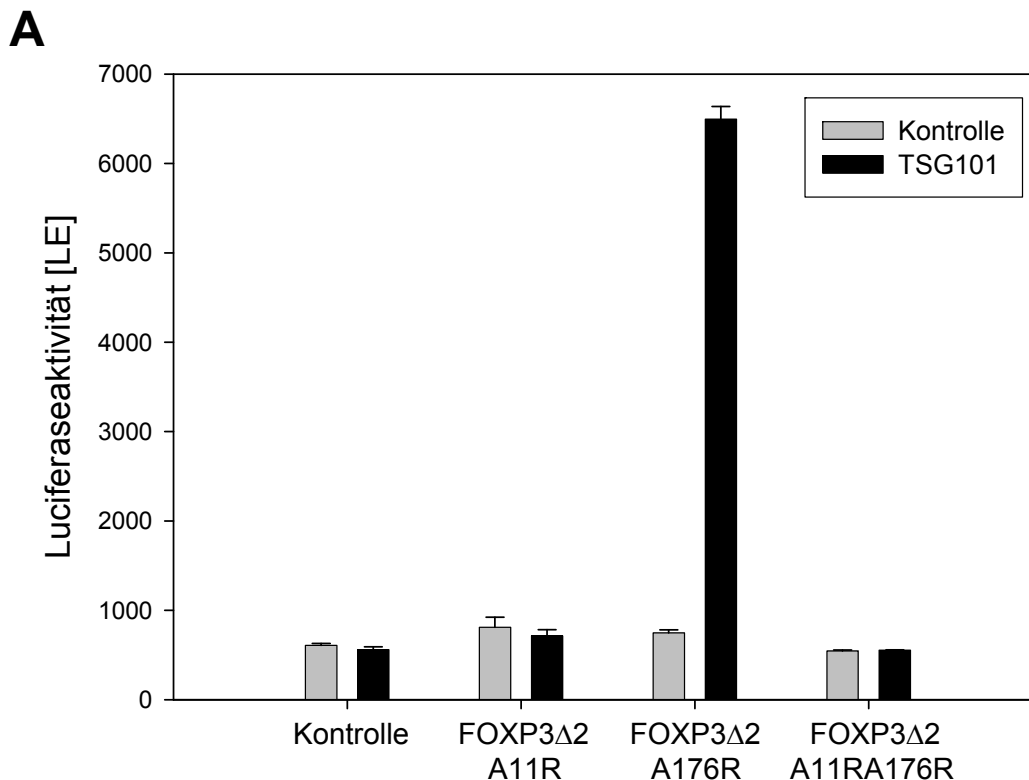


Abbildung 31: Übersicht der PSAP Motive in FOXP3 und der Struktur von TSG101

A) Schema der PSAP Bindungsmotive (blau) und dem PTLP Pseudomotiv (grau) von FOXP3. Die alternativ gespleißten Exon 2 und Exon 7 sind grau hervorgehoben, die FKH Domäne ist schwarz dargestellt. B) Modell der Sekundärstruktur der UEV Domäne von TSG101 (rosa) und einem HIV-1 *late domain peptide* mit dem Bindungsmotiv PTAP (blau, gesamte Peptidsequenz: PEPTAPPEE) anhand einer Röntgenkristallstrukturanalyse [177].

Das erste PSAP Motiv von FOXP3 ist N-terminal in Exon 1 gelegen (aa 9-12), das zweite C-terminal in Exon 4 (aa 174-177). Interessanterweise befindet sich in Exon 2 zusätzlich ein Pseudomotiv PTLP (aa 72-75).

Für die Interaktion der UEV Domäne mit viralen PTAP-Hüllproteinen konnte gezeigt werden, dass eine Mutation zu PTRP die Bindung verhindert [178]. Um die Bindungsstelle von FOXP3 Δ 2 und humanem TSG101 genauer zu analysieren wurden verschiedene Mutationen in die PSAP-Motive eingefügt. Zum einen wurde jedes PSAP einzeln in das nicht funktionale PSRP oder in die Pseudosequenz PSLP mutiert, zusätzlich wurde eine Doppelmutante mit zwei PSRP- bzw. PSLP-Motiven generiert. Durch die sukzessive Mutation beider PSAP Motive konnte gezeigt werden, dass FOXP3 Δ 2 über die N-terminale PSAP Sequenz in Exon 1 mit TSG101 interagiert. Abbildung 32A zeigt deutlich, dass eine Mutation von Alanin auf Position 11 in Arginin (A11R) ausreichend ist um die TSG101 Bindung zu blockieren. Ebenso verhält es sich bei der doppelt mutierten FOXP3 Δ 2 Mutante, FOXP3 Δ 2 A11R A176R, während bei der Mutation von PSAP in Exon 4 zu PSRP (A176R) keine verminderte TSG101 Interaktion detektierbar ist.



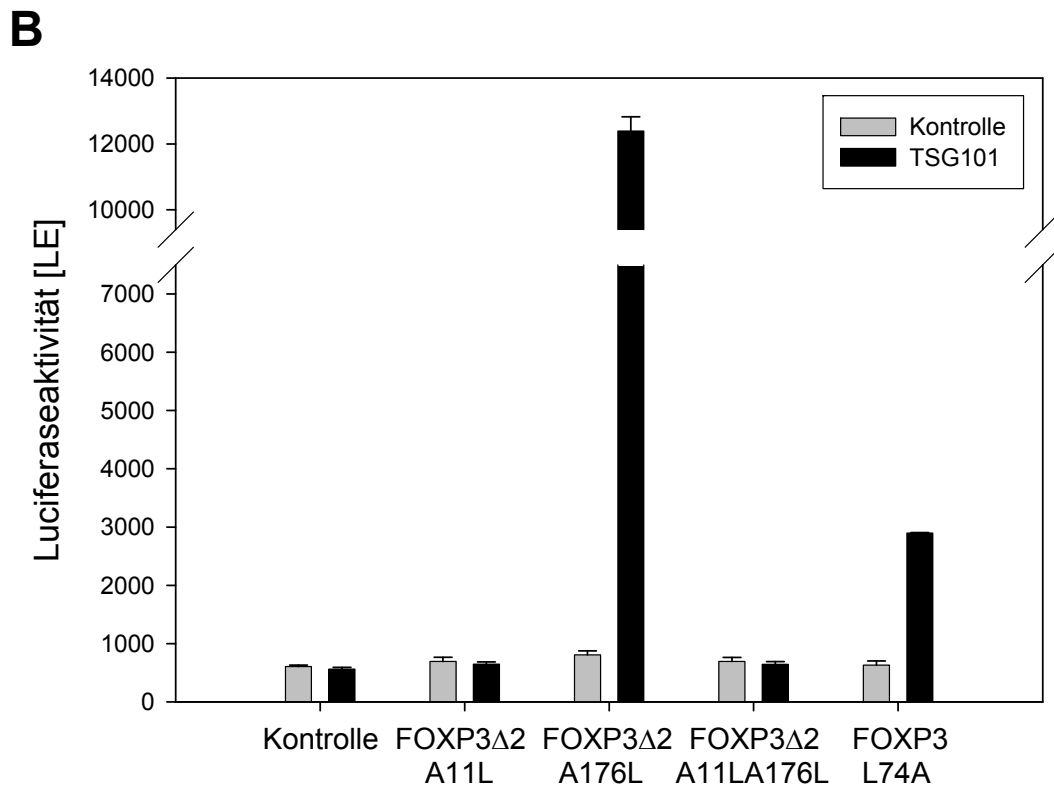


Abbildung 32: FOXP3Δ2 interagiert mit TSG101 über das PSAP-Motiv in Exon 1

Yeast-2-Hybrid Assay mit Kontrollvektor- bzw. TSG101-Transfektanten (graue bzw. schwarze Balken) und entsprechenden FOXP3 Isoformen und Mutationen. Datenpunkte entsprechen der Luciferaseaktivität in gemessenen Lichteinheiten (LE). A) Analyse der TSG101 Bindung mit FOXP3Δ2 Mutationen, die an Position 11 bzw. 176 im PSAP Motiv statt Alanin Arginin (A11R bzw. A176R) exprimieren. B) Analyse der TSG101 Bindung mit FOXP3Δ2 Mutationen, die an Position 11 bzw. 176 im PSAP Motiv statt Alanin Leucin (A11L bzw. A176L) exprimieren und einer FOXP3 Mutation, die an Position 74 im Pseudomotiv statt Leucin Alanin (L74A) exprimiert. Ein Experiment von insgesamt drei unabhängigen Versuchen ist dargestellt.

In Abbildung 32B wurden die Ergebnisse der Bindungsanalyse auch für die Mutationen des PSAP Motivs zu PSLP bestätigt. Die etwas größere Aminosäure Arginin scheint bei der FOXP3Δ2 A176R Mutante in Abbildung 32A die TSG101 Bindung partiell zu behindern, die bindungsabhängige Transkription von Luciferase führte ca. zur Halbierung der Lichteinheiten, die bei der FOXP3Δ2 A176L Mutante in Abbildung 32B beobachtet wurde. Möglicherweise wurde durch den Austausch der Aminosäure Alanin zu Arginin die korrekte FOXP3Δ2 Proteinfaltung gestört, die durch die Mutation zu Leucin weniger beeinflusst wurde. Auch das Einfügen eines zusätzlichen P(S/T)AP Motivs in Exon 2 durch die Mutation von Leucin zu Alanin (L74A) im PTLP Pseudomotiv befähigt FOXP3 L74A nur zu einer geringen TSG101 Bindung im Vergleich zu FOXP3Δ2 (Abbildung 32B).

Zusammenfassend gilt, dass, neben c-Jun, mit TSG101 ein weiterer Interaktionspartner von FOXP3 gefunden wurde, der spezifisch nur an FOXP3 Isoformen ohne Exon 2 bindet, wobei auch die FKH Domäne, vermutlich zur Stabilisierung der Proteinfaltung, vorhanden sein muss. Die Protein-Protein-Wechselwirkung wird vermittelt durch das PSAP-Motiv in Exon 1 von FOXP3 Δ 2. Die physiologische Bedeutung dieser Bindung für Funktion und Homöostase der Treg Zellen wird Bestandteil zukünftiger Forschungsarbeit sein.

4. Diskussion

Die im Ergebnisteil beschriebenen Resultate zeigen, dass der Transkriptionsfaktor FOXP3 eine Vielzahl unterschiedlicher Funktionen in Treg Zellen ausübt. Einige dieser Aufgaben können von allen drei beschriebenen Isoformen wahrgenommen werden. Diese Isoform-unabhängigen Eigenschaften beschränken sich auf die Bildung von Repressorkomplexen (NFAT, NF- κ B und AML-1) und der Suppression ihrer transkriptionellen Aktivität (NFAT, NF- κ B) im Zellkern. Isoform-abhängige Eigenschaften sind hingegen bei der Expression Treg-spezifischer Marker, dem Transfer der suppressiven Kapazität und der Assoziation mit weiteren Interaktionspartnern beobachtet worden. Diese Verteilung lässt den Schluss zu, dass auch FOXP3 Δ 2 Δ 7, eine Isoformen bei der Exon 2 und Exon 7 alternativ gespleißt sind, in der Lage ist, DNA und primär assoziierte Faktoren zu binden, vergleichbar mit den Isoformen FOXP3 und FOXP3 Δ 2. Diese Interaktionen vermitteln jedoch nicht die stabile Entwicklung der CD4⁺ T-Zelle zur Treg Zelle. Im Gegensatz zu diesen Isoform-unabhängigen Wechselwirkungen existieren offensichtlich weitere Faktoren, die eine höhere Komplexität an Proteininteraktionen ermöglichen. Durch die Untersuchung der differentiellen Wirkung in CD4⁺CD25⁻ T-Zellen, die mit natürlichen FOXP3 Spleißformen transduziert wurden, konnte direkt ein Zusammenhang zwischen der Treg-induzierenden Funktion und einer genau definierten Region im FOXP3 Protein hergestellt werden. Interessanterweise bewirkt das Fehlen des *leucine zipper* bzw. des Exons 7 von FOXP3, dass keine Determinierung zur Treg Zelle stattfindet. Anhand dieser Studie konnte deutlich gezeigt werden, dass die FOXP3 Dimerisierung nicht von Exon 7 abhängt und somit nicht Ursache der fehlenden Treg Induktion sein kann. Welche wichtigen sekundären Faktoren direkt oder indirekt an Exon 7 binden, wird Gegenstand der zukünftigen Forschung sein.

Darüber hinaus konnte auch ein Unterschied des FOXP3 Bindungsverhaltens in Abhängigkeit zu Exon 2 nachgewiesen werden. So ermöglicht das alternative Spleißen von Exon 2 eine Protein-Protein-Interaktion mit den Transkriptionsfaktoren c-Jun und ZNF307 und mit TSG101. Die genaue Bedeutung dieser Isoform-spezifischen Wechselwirkungen für Treg Zellen bedarf weiterer Analysen. Vermutlich steht die Komplexbildung mit diesen Faktoren in Zusammenhang mit der zellulären Homöostase der Treg Zellen und nicht mit der Induktion des Treg-spezifischen Phänotyps, da sowohl eine Transduktion mit der Isoform FOXP3 als

auch mit FOXP3Δ2 in beiden Fällen funktionale Suppressorzellen induzierte. Eine Übersicht der Isoform-unabhängigen und -abhängigen Eigenschaften der FOXP3 Spleißvarianten ist in Tabelle 8 gezeigt.

Tabelle 8: Übersicht der Eigenschaften und Funktionen von FOXP3 Isoformen

		<i>Isoform</i>		
		FOXP3	FOXP3Δ2	FOXP3Δ2Δ7
<i>Isoform-unabhängig</i>	Eigenschaften und Funktionen			
	RNA Transkripte	identische Sequenz der 5'-untranslatierten Region		
	Expression	Translokation in den Nukleus		
	Dimerisierung	Homo- und Heterodimere aller Isoformen		
	AML-1	Komplexbildung		
	NFAT	Repression der transkriptionellen Aktivität		
NF-κB	Repression der transkriptionellen Aktivität			
<i>Isoform-abhängig</i>	CD25	Induktion	-	
	CTLA-4	Induktion	-	
	GITR	(Induktion)	(-)	
	Suppression	Induktion	-	
	dominant negativer FOXP3Δ2Δ7 Effekt	CD25 Inhibierung		
	AP-1	Verstärkung der transkriptionellen Aktivität	Repression der transkriptionellen Aktivität	
	c-Jun	-	Komplexbildung	
	ZNF307	-	Komplexbildung	
	TSG101	-	Komplexbildung	

4.1 Expressionsmuster der FOXP3 Isoformen

In humanen Treg Zellen werden verschiedene Isoformen des Transkriptionsfaktors FOXP3 exprimiert. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass nach Transduktion der vollständigen Isoform FOXP3 humane CD4⁺CD25⁻ Zellen einen Treg-spezifischen Phänotyp exprimierten [68, 125, 126], wobei von Allan *et al.* im Gegensatz zu den beiden anderen Arbeiten eine relativ geringe suppressive Kapazität der transduzierten Zellen beschrieben wurde, die nur nach Kotransduktion mit FOXP3 und FOXP3 Δ 2 etwas deutlicher beobachtet werden konnte. Analog zu FOXP3 konnte auch infolge einer Transduktion mit FOXP3 Δ 2 eine starke [126] bzw. schwache [125] Induktion von Treg Funktion und Phänotyp beobachtet werden. Bislang ist keine vergleichbare Untersuchung mit der Isoform FOXP3 Δ 2 Δ 7 bekannt. Auffallend ist der konstant geringere Anteil dieser Spleißvariante an den FOXP3 Transkripten, was suggeriert, dass FOXP3 Δ 2 Δ 7 eine differentielle Aufgabe in Treg Zellen besitzt und daher das alternative Spleißen ein genau kontrollierter Vorgang ist, der die Isoformen anhand der spezifischen Aufgabenstellung bereitstellt. Ein Beispiel für differentielle Aufgaben durch Isoformen des gleichen Proteins in T-Zellen ist CD45, welches abhängig vom Aktivierungsstatus der Zelle als bestimmte Spleißvariante mit spezifischer Bindungskapazität und damit einhergehender Phosphataseaktivität exprimiert wird [179]. Eine gleichzeitige Expression verschiedener Isoformen eines Proteins mit unterschiedlichen Funktionen konnte auch für Proteinkinase C in T-Zellen nachgewiesen werden [180]. Des Weiteren sind auch von Zytokinrezeptoren (z.B. IL-7R α) und Adapterproteinen (z.B. IRAK1) Isoformen bekannt, die in der T-Zelle verschiedene Aufgaben übernehmen (Übersicht in [181]).

Da FOXP3 Δ 2 Δ 7 den gleichen 5'-untranslatierten Bereich wie FOXP3 und FOXP3 Δ 2 aufweist (siehe Kapitel 3.1), ist es unwahrscheinlich, dass die Expression der Isoformen neben dem kontrollierten Spleißen zusätzlich über eine differentielle Translation reguliert wird. Zudem folgt am 3'-Ende des Transkripts auf das letzte translatierte Exon kein weiteres untranslatiertes, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die 3'-untranslatierte Region für alle Isoformen die gleiche Sequenz hat. Denkbar wäre allenfalls eine differentielle Polyadenylierung in Abhängigkeit zur Isoform, was Auswirkungen auf die jeweilige Stabilität der Transkripte haben könnte (Übersicht in [182]). Da sich die FOXP3 Isoformen im letzten Exon jedoch nicht unterscheiden, ist diese Annahme eher unwahrscheinlich.

4.2 Isoform-unabhängige Funktionen von FOXP3

4.2.1 FOXP3 Isoformen dimerisieren im Zellkern

Die in Kapitel 3.2 gezeigte Translokation aller FOXP3 Isoformen in den Nukleus weist daraufhin, dass die Spleißvarianten funktionelle Transkriptionsfaktoren sind, die zum einen Isoform-unspezifische Wirkungen gegenseitig verstärken und zum anderen bei Isoform-spezifischen Aufgaben untereinander um Bindungspartner konkurrieren können. Die etwas stärkere Präferenz für die Lokalisation von FOXP3 Δ 2 im Zellkern deutet daraufhin, dass zusätzlich Faktoren existieren, die Isoform-spezifische Komplexe bilden.

Die in Kapitel 1.3.1 beschriebene Homologie der *leucine zipper* von FOXP3 und N-myc führte zu der Annahme, dass beide Strukturen ähnliche Aufgaben – wie z.B. die Homodimerisierung - im Protein erfüllen könnten [98]. Die Vorstellung, dass der *leucine zipper* in N-myc die Homodimerisierung vermittelt, wurde inzwischen allerdings revidiert [99, 100]. Unter physiologischen Bedingungen konnten ausschließlich Heterodimere mit dem Transkriptionsfaktor Max beobachtet werden. Zum anderen wurden Untersuchungen mit zwei beschriebenen IPEX Mutationen, FOXP3 Δ E251 und FOXP3 Δ K250, durchgeführt. Beiden Mutationen fehlt jeweils eine Aminosäure im Exon 7, was die Dimerisierung mit der vollständigen Isoform verminderte bzw. ganz verhinderte [135, 138]. Erwähnenswert ist allerdings, dass bei der Röntgenkristallstrukturanalyse des homologen FOXP2 bereits eine Dimerisierung des stark konservierten C-terminalen Fragmentes, der FKH Domäne, beobachtet werden konnte [127]. Eine weitere Studie zeigte ebenfalls eine Koimmunpräzipitation sowohl von der FKH Domäne als auch von FOXP3 Δ E251 mit der vollständigen Isoform FOXP3, wenngleich auch weniger Protein präzipitiert wurde als beispielsweise mit unmutiertem FOXP3 [137].

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass alle Isoformen von FOXP3 in der Lage sind, miteinander Dimere zu bilden. Die homo- bzw. heterodimeren Komplexe aus verschiedenen FOXP3 Isoformen wurden dabei mit Hilfe zweier unabhängiger Koimmunpräzipitationsexperimente nachgewiesen. Im Gegensatz zu den oben genannten Studien wurden statt der FOXP3 Mutationen und Proteinfragmente erstmals die natürlichen Isoformen auf ihr Bindungsverhalten untersucht. Da auch FOXP3 Δ 2 Δ 7 die Fähigkeit zur Komplexbildung zeigte, ist anzunehmen, dass der *leucine zipper* keinen Einfluss auf die

Dimerisierung hat. Die schwächere Bindung mutierter FOXP3 Proteine beruht daher wahrscheinlich eher auf einer komplexen Strukturänderung und einer damit einhergehenden sterischen Hinderung der Assoziation, als dass sie ein Hinweis auf die Funktion des *leucine zipper* wäre.

4.2.2 Repressorkomplexe von FOXP3 mit NFAT, NF- κ B und AML-1

Zusätzlich zur eingeschränkten Bildung der FOXP3 Dimere wurde bei der IPEX Mutante FOXP3 Δ E251 auch eine verminderte Repression der NFAT vermittelten Aktivität gezeigt [138]. Bei der genaueren Untersuchung der transkriptionellen Kontrolle durch verkürzte FOXP3 Konstrukte wurde eine für NFAT relevante Repressorregion definiert (aa 67-132) [137]. Anhand dieser Ergebnisse wäre zu erwarten, dass die natürlichen FOXP3 Isoformen FOXP3 Δ 2 (ohne aa 72-106) und FOXP3 Δ 2 Δ 7 (ohne aa 72-106 und aa 246-272) ebenfalls nicht in der Lage sind, die von NFAT regulierte Transkription zu inhibieren. Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass die Repression der IL-2 Promotoraktivität zumindest für FOXP3 Δ 2 qualitativ nicht von der Isoform FOXP3 zu unterscheiden ist [125]. Zudem assoziiert NFAT zusammen mit DNA mit der C-terminalen FKH Domäne, nicht mit dem N-terminalen Bereich von FOXP3 [94].

Die in Kapitel 3.3.1 beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass NFAT und NF- κ B vermittelte Transkriptionsaktivität Isoform-unabhängig inhibiert werden kann. Da weder das Spleißen von Exon 2 noch von Exon 7 Einfluss auf die Regulation der transkriptionellen Aktivität von NFAT und NF- κ B hatte, sollten beide Regionen keine Rolle für die von diesen Transkriptionsfaktoren kontrollierte Genexpression spielen. Dies verdeutlicht noch einmal die wohl tiefgreifenden strukturellen Veränderungen in der FOXP3 Δ E251 Mutante, die ungleich der FOXP3 Δ 2 und FOXP3 Δ 2 Δ 7 Isoformen lediglich schwach dimerisiert und wenig transkriptionelle Kontrolle ausübt. Darüber hinaus zeigt sich, dass die mit Hilfe von FOXP3 Proteinfragmenten gewonnenen Erkenntnisse nicht die tatsächlichen Eigenschaften der FOXP3 Regionen widerspiegeln. Exon 2 kann nicht Bestandteil einer Repressorregion sein, da die natürliche Spleißvarianten ohne Exon 2, FOXP3 Δ 2 und FOXP3 Δ 2 Δ 7, weiterhin in der Lage sind, die NFAT und NF- κ B vermittelte transkriptionelle Aktivität zu supprimieren. Vermutlich entspricht die Proteinfaltung in FOXP3 Fragmenten nicht der in den natürlichen Isoformen, so dass diese Fragmente funktionell beeinträchtigt sind, obwohl die relevanten Sequenzbereiche des Proteins vorhanden sind.

Neben NFAT und NF- κ B ist FOXP3 auch ein Repressor des Transkriptionsfaktors AML-1, dessen Assoziation in Präzipitationsexperimenten gezeigt wurde [132]. In Untersuchungen mit AML-1 und FOXP3 Fragmenten wurde die Interaktionsdomäne von FOXP3 bestimmt (aa 278-336). Die Bindung von AML-1 an FOXP3 zeigte in dieser Studie einen direkten Einfluss auf die IL-2 Promotoraktivität, die Induktion von Treg-assoziierten Molekülen und der suppressiven Kapazität. In der vorliegenden Arbeit konnte bestätigt werden, dass für die Komplexbildung aus AML-1 und FOXP3 offenbar weder Exon 2 noch Exon 7 beteiligt ist. Vor dem Hintergrund der Isoform-abhängigen Induktion des Treg Phänotyps und der Treg Funktion (siehe folgendes Kapitel) lässt sich allerdings erkennen, dass eine AML-1 Bindung an FOXP3 nicht hinreichend ist, um aus CD4+CD25- T-Zellen Treg Zellen zu generieren. Eine Übersicht zu Isoform-unabhängigen Funktionen von FOXP3 ist in Abbildung 33 dargestellt.

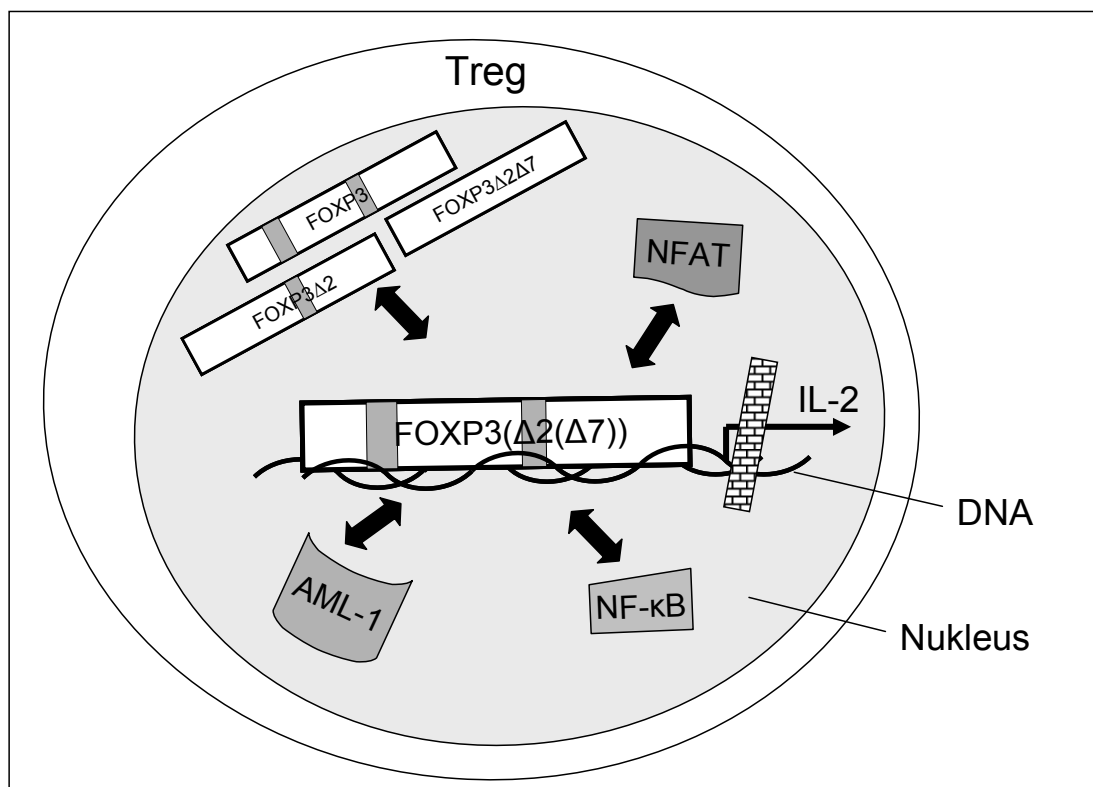


Abbildung 33: Gemeinsame Funktionen aller FOXP3 Isoformen

Schematische Darstellung verschiedener Transkriptionsfaktoren in Treg Zellen. Die Isoformen FOXP3, FOXP3 Δ 2 und FOXP3 Δ 2 Δ 7 dimerisieren mit anderen FOXP3 Isoformen und bilden mit NFAT, NF- κ B und AML-1 Repressorkomplexe, die beispielsweise die Transkription des IL-2 Promotors blockieren können. Exon 2 und Exon 7 sind grau markiert, fakultativ gespleißtes Exon 2 und Exon 7 ist grau schraffiert.

4.3 Isoform-abhängige Funktionen von FOXP3

4.3.1 FOXP3 Induktion des Treg Phänotyps ist abhängig von Exon 7

Obwohl FOXP3 Δ 2 Δ 7 in der Lage ist transkriptionelle Kontrolle über NFAT und NF- κ B vermittelte Genexpression auszuüben, konnte die Induktion Treg-spezifischer Marker wie CD25 und CTLA-4 nur durch Transduktion von FOXP3 und FOXP3 Δ 2 erzielt werden. Exon 7 ist mit 15 Aminosäuren größtenteils an der Bildung des *leucine zipper* in FOXP3 beteiligt. Da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass dieses Strukturmotiv nicht die Bindung weiterer FOXP3 Proteine vermittelt, ist anzunehmen, dass ein anderer Kofaktor mit entsprechendem *leucine zipper* Motiv interagiert. Demnach würde erst durch diese Wechselwirkung die verstärkte Expression von CD25, CTLA-4 und tendenziell auch die von GITR ermöglicht werden. Im Y2H-Assay wurden überraschenderweise kaum unterschiedliche Bindungspartner von FOXP3 bzw. FOXP3 Δ 2 und FOXP3 Δ 2 Δ 7 gefunden, so dass auch eine alternative Erklärung in Betracht gezogen werden kann. FOXP3 Δ 2 Δ 7 könnte wie die anderen Isoformen an einem unbekanntem Adapterprotein binden, würde aber im Gegensatz zu diesen einen antagonistischen Komplex bilden, der die Induktion von CD25 und CTLA-4 nicht vermitteln kann. In beiden Fällen wird es Aufgabe weiterführender Versuche sein den Faktor zu identifizieren. Die Abhängigkeit der CD25 Induktion von Exon 7 des FOXP3 Proteins zeigte sich sowohl in humanen transduzierten CD4+CD25- T-Zellen als auch in CD4+CD25- Mauszellen. Dies deutet darauf hin, dass entsprechende Prozesse in Treg Zellen beider Spezies auf die gleiche Art und Weise reguliert sind und die in Mauszellen gewonnenen Ergebnisse in diesem Fall auf humane Zellen übertragbar sind. Selbst in humanen Treg Zellen konnte eine Transduktion von FOXP3 Isoformen noch die Expression von CD25 steigern (Kapitel 3.5.1). Allerdings konnten Isoform-spezifische Unterschiede in der Induktion nicht signifikant nachgewiesen werden, was darauf zurückzuführen ist, dass diese Zellen schon durch die hohe Expression von endogenem FOXP3 und FOXP3 Δ 2 viel CD25 an der Oberfläche aufweisen und die Entwicklung zur Treg Zelle bereits abgeschlossen und epigenetisch über DNA-Demethylierung fest verankert ist [64].

Analog zur Induktion der Treg-spezifischen Marker ist auch der Transfer der suppressiven Kapazität in T-Zellen von Exon 7 des FOXP3 Proteins abhängig. Die Transduktion mit FOXP3 Δ 2 Δ 7 konnte ebenso wenig wie mit dem leeren Kontrollvektor eine suppressive

Funktionalität in die Zellen übertragen. Wahrscheinlich steht dies wie bei der Induktion von Treg-spezifischen Markern in Verbindung mit der Komplexbildung eines Adapterproteins, entweder vermittelt durch den *leucine zipper* oder als antagonistischer FOXP3 Δ 2 Δ 7-Komplex. Da FOXP3 Δ 2 Δ 7 in jedem Fall nicht die induktive Funktion der beiden anderen Isoformen aufweist und auch nicht den Ausfall dieser Isoformen kompensieren kann, erklärt sich, dass eine Korrelation der Autoimmunerkrankung IPEX mit Mutationen des Exons 7 besteht. FOXP3 Δ K250 und FOXP3 Δ E251 besitzen nicht die Möglichkeit entsprechend der unmutierten FOXP3 Isoform die Transkription und Bildung von Repressorkomplexen zu regulieren [135], was vermutlich auf einer fehlerhaften Proteinfaltung beruht. Darüber hinaus wird nach dem Spleißvorgang vom mutierten Exon 7 das so entstandene FOXP3 Δ 2 Δ 7 keine Treg-spezifischen Eigenschaften vermitteln können.

4.3.2 FOXP3 Δ 2 Δ 7 wirkt dominant negativ auf andere FOXP3 Isoformen

In doppelt transduzierten CD4+CD25- T-Zellen konnte beobachtet werden, dass FOXP3 Δ 2 Δ 7 die CD25 Induktion, ausgelöst durch die Isoformen FOXP3 oder FOXP3 Δ 2, inhibiert. Dies favorisiert die Bildung eines antagonistischen Komplexes durch FOXP3 Δ 2 Δ 7, der mit den anderen Isoformen um Bindungsstellen an Interaktionspartnern, die an der CD25 Induktion beteiligt sind, kompetieren. Ebenfalls denkbar wäre die Neutralisierung von funktionellem FOXP3 und FOXP3 Δ 2, da in Kapitel 3.2.3 gezeigt wurde, dass FOXP3 Δ 2 Δ 7 an beiden Isoformen binden kann. In FOXP3 Δ 2 Δ 7 transduzierten humanen Treg Zellen konnte keine Verringerung des Expressionsniveaus von CD25 beobachtet werden. Ob die Suppression in Treg Zellen durch exogenes FOXP3 Δ 2 Δ 7 beeinflusst werden kann, wird genauer untersucht werden müssen. Zusammenfassend gilt für die Isoform FOXP3 Δ 2 Δ 7, dass sie die Induktion von Treg-spezifischen Markern und den Transfer suppressiver Kapazität zum einen nicht unterstützt, zum anderen der CD25 Induktion der anderen Spleißvarianten entgegenwirkt. Vor diesem Hintergrund ist es augenscheinlich, dass der Spleißvorgang von FOXP3 sehr genau reguliert werden muss, so dass sichergestellt ist, dass in Treg Zellen ausreichend FOXP3 und FOXP3 Δ 2 zur Etablierung des Phänotyps und der Suppression vorhanden ist.

4.3.3 Alternatives Spleißen ermöglicht eine differentielle Komplexbildung

4.3.3.1 Interaktion von FOXP3 Isoformen ohne Exon 2 mit c-Jun

Die in Kapitel 3.6.1 beschriebenen Ergebnisse müssen im Zusammenhang mit der bereits erwähnten NFAT-FOXP3 Bindung diskutiert werden. Die im Reporter-gen Assay beobachtete verstärkte Transkription von Luciferase durch FOXP3, nicht aber von den anderen Isoformen, deutet daraufhin, dass endogenes AP-1 aus dem Transkriptionskomplex NFAT-AP-1-DNA durch FOXP3 verdrängt wird. Wenngleich FOXP3 Isoformen geringe Unterschiede in der Stärke der Suppression der NFAT vermittelten Transkription zeigten (FOXP3 < FOXP3 Δ 2 Δ 7 < FOXP3 Δ 2), wurde in jedem Fall eine Reduktion von über 60% erreicht, so dass man annehmen kann, dass alle Isoformen eine vergleichbare Affinität zu NFAT haben. Folglich sind alle Isoformen in der Lage AP-1 aus NFAT-AP-1-Repressorkomplexen zu verdrängen. Auf diese Art freigesetztes AP-1 bewirkte nur im Reporter-gen Assay mit der vollständigen Isoform FOXP3 eine verstärkte AP-1 vermittelte Transkription, während FOXP3 Δ 2 und FOXP3 Δ 2 Δ 7 diese inhibierten. Das lässt darauf schließen, dass nur Isoformen ohne Exon 2 Repressorkomplexe mit AP-1 bilden können. Die beiden sich überlagernden Effekte, verstärkte Transkription durch Freisetzung von AP-1 und Repressorkomplexbildung liefern eine Erklärung für die beobachteten Ergebnisse.

Tatsächlich konnte die Bildung Isoform-spezifischer Komplexe aus FOXP3 Δ 2 bzw. FOXP3 Δ 2 Δ 7 und c-Jun, einem Bestandteil des AP-1 Transkriptionskomplexes, nachgewiesen werden. Da die humane Isoform FOXP3 nicht mit c-Jun interagiert, scheint die Spleißstelle zwischen Exon 1 und Exon 3 für die Wechselwirkung beider Transkriptionsfaktoren von entscheidender Bedeutung zu sein. Interessanterweise konnte für das 11 Exon lange Foxp3 der Maus, von dem keine weiteren Isoformen bekannt sind, eine Komplexbildung mit phosphoryliertem c-Jun gezeigt werden [136]. Inwieweit c-Jun bzw. AP-1 ursächlich für die Expression bestimmter Gene in Treg Zellen verantwortlich ist, konnte bislang nicht dokumentiert werden. Allerdings wurde in NFAT defizienten Mäusen eine Treg Population über die Expression von GITR definiert, da aufgrund eines erhöhten Aktivierungsgrads dieser T-Zellen alle anderen Treg-spezifischen Marker nicht zu deren Identifizierung beitragen konnten. Vermutlich können in diesen Zellen durch die Abwesenheit von NFAT mehr FOXP3-AP-1 Komplexe gebildet werden, was unter anderem zur erhöhten GITR Expression befähigen könnte [183].

4.3.3.2 Interaktion von FOXP3 Isoformen ohne Exon 2 mit TSG101

Exon 2 von FOXP3 beinhaltet ein LXXLL Bindungsmotiv, das mit dem Transkriptionsfaktor ROR α und vermutlich auch mit ROR γ t interagiert [104, 105]. Die vollständige Isoform FOXP3 ist damit in der Lage die Generierung von proinflammatorischen Th17-Zellen zu blockieren und den Treg-Status einer Zelle zu implementieren. Die antagonistische Isoform FOXP3 Δ 2 Δ 7 erlaubt der Treg Zelle die Wirkung des Transkriptionsfaktors FOXP3 zumindest in Bezug auf die CD25 Induktion genau zu regulieren. Daraus resultiert die Frage nach der spezifischen Aufgabe der Isoform FOXP3 Δ 2. Die Koimmunpräzitationsexperimente in Kapitel 3.6.5 zeigen, dass das alternative Spleißen von Exon 2 des FOXP3 Transkripts die Proteinbindung von TSG101 an FOXP3 Δ 2 bzw. FOXP3 Δ 2 Δ 7 ermöglicht. Y2H-Versuche bestätigten, dass FOXP3 Spleißvarianten ohne Exon 2 mit den Transkriptionsfaktoren TSG101 und ZNF307 interagieren. Beide Proteine beeinflussen positiv die Expression von MDM2 [172, 173]. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass CD4+CD25+ T-Zellen der Maus mehr MDM2 exprimieren als CD4+CD25- T-Zellen und auch bei humanen T-Zellen konnte eine differentielle MDM2 Expression beider Populationen beobachtet werden (Kapitel 3.6.4). Interessanterweise ist MDM2 ein Onkogene, das bei Deregulierung die Konzentration von p53 so weit erniedrigen kann, dass betroffene Zellen entarten [184]. In neueren Studien gelang der Nachweis von mehreren FOXP3 Isoformen in Brustkrebsepithelzellen [162], sowie von einem generellen Zusammenhang zwischen vermehrt auftretenden Spleißvarianten und der Transformation von Zellen [185]. Als Interaktionsregion von TSG101 an FOXP3 Δ 2 konnte im Y2H-Assay mittels mutierter FOXP3 Δ 2 Proteine ein Bindungsmotiv identifiziert werden. Diese Tetrapeptidsequenz, PSAP, die N-terminal im ersten FOXP3 Exon zu finden ist, ist auch in anderen Proteinen vorhanden um eine TSG101 Bindung zu erzielen. Neben dieser Domäne zeigte auch die FKH Einfluss auf die korrekte Proteinfaltung bzw. Komplexbildung von FOXP3 bei Koimmunpräzitationen. Somit haben als Alleinstellungsmerkmal nur FOXP3 Isoformen ohne Exon 2 die Möglichkeit Komplexe mit TSG101 zu bilden. Inwieweit FOXP3 Δ 2 und FOXP3 Δ 2 Δ 7 durch Bindung an TSG101 oder aber ZNF307 die Proteinexpression von MDM2 und in der Folge von p53 beeinflussen, müssen weitere Versuche belegen. Eine Übersicht der Isoform-abhängigen Funktionen von FOXP3 und FOXP3 Δ 2 ist in Abbildung 34A dargestellt, Abbildung 34B zeigt die spezifischen Eigenschaften von FOXP3 Δ 2 und FOXP3 Δ 2 Δ 7.

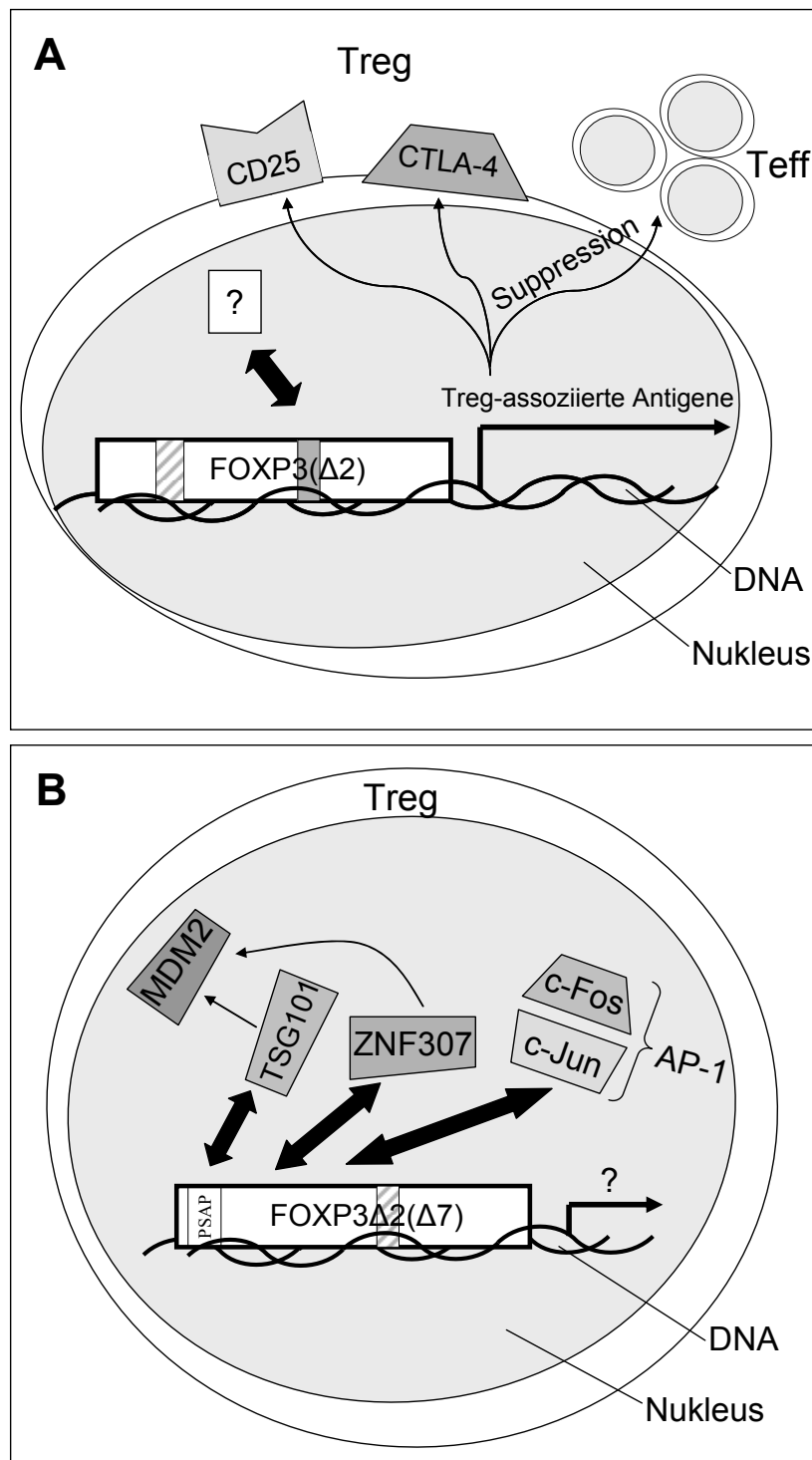


Abbildung 34: Spezifische Funktionen der FOXP3 Isoformen

Schematische Darstellung von Isoform-spezifischen Aufgaben von FOXP3 in Treg Zellen. Exon 2 und Exon 7 sind grau markiert, fakultativ gespleißtes Exon 2 und Exon 7 ist grau schraffiert. A) FOXP3 und FOXP3Δ2 regulieren mit einem oder mehreren unbekanntem Kofaktor(en) die Transkription von Treg-assoziierten Antigenen (z.B. CD25, CTLA-4). Beide Spleißformen vermitteln die Kapazität Effektorzellen (Teff) zu supprimieren. B) FOXP3Δ2 und FOXP3Δ2Δ7 binden TSG101 über das PSAP Motiv in Exon 1. Beide Spleißformen binden ZNF307 und bilden mit c-Jun bzw. AP-1 Repressorkomplexe.

4.4 Ausblick

Die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse zeigen erstmalig weitreichend differentielle Funktionen der FOXP3 Isoformen in Treg Zellen. Eine Transduktion von FOXP3 und FOXP3 Δ 2 in CD4+CD25- T-Zellen hat die Generierung einer suppressiven Zellpopulation mit verstärkter CD25 und CTLA-4 Expression zur Folge, während FOXP3 Δ 2 Δ 7 keine dieser Eigenschaften vermittelt. Die Bedeutung von Exon 7 für die Induktion des Treg-spezifischen Phänotyps und der Suppression liefert zugleich die wichtige Erkenntnis, dass beispielsweise die Repression der NFAT und NF- κ B vermittelter Transkription oder die Bindung von AML-1 nicht ausreichend ist, um in CD4+CD25- T-Zellen einen Treg-Status zu induzieren. Gleiches gilt auch für die Bindung von c-Jun bzw. der Suppression der transkriptionellen Aktivität von AP-1; Funktionen, die nur von FOXP3 Isoformen ohne Exon 2 vermittelt werden. Die genaue Erforschung der spezifischen Aufgabe von Exon 7 auf molekularer Ebene könnte in Zukunft helfen wichtige Bindungspartner und Mediatoren, sowie die betreffende physiologische Kaskade, die zur Etablierung der Treg Zelllinie führt, aufzuklären. Da FOXP3 Δ 2 Δ 7 mit den anderen Isoformen interagiert und mit diesen um die Bindung an Kofaktoren konkurriert, wirkt FOXP3 Δ 2 Δ 7 antagonistisch zur CD25 Induktion durch FOXP3 und FOXP3 Δ 2. Dieser Mechanismus könnte genutzt werden um die Funktionsweise der Treg Population und somit die Stärke der Immunantwort zu modulieren, indem Medikamente entweder direkt die Exon 7 vermittelte Funktion oder das Verhältnis der FOXP3 Spleißvarianten zugunsten von FOXP3 Δ 2 Δ 7 beeinflussen. Der weitreichende Einfluss von Treg Zellen auf den Krankheitsverlauf von Autoimmunerkrankungen, Krebs und der Akzeptanz von Transplantaten verdeutlicht die Dringlichkeit mit der dieses Feld der Immunologie aufgeklärt werden muss.

Der Transkriptionsfaktor FOXP3 gewinnt zunehmend an Bedeutung in der Tumormunologie. So sind beispielsweise FOXP3+ Treg Zellen durch Suppression der Effektorzellen in der Lage, der Tumorabstoßung entgegenzuwirken. Darüber hinaus wird FOXP3 auch von Tumorzellen exprimiert. Die in dieser Arbeit dokumentierte Assoziation von TSG101 an FOXP3 Δ 2 und FOXP3 Δ 2 Δ 7 zeigt zum ersten Mal eine Interaktion des FOXP3 Proteins mit einem Onkogen. Die genaue Analyse der Bindung von FOXP3 Δ 2/FOXP3 Δ 2 Δ 7 mit TSG101, sowie mit ZNF307, könnte in Zukunft zum Verständnis über die zellulären Mechanismen in Tumorzellen und Treg Zellen beitragen.

5. Referenzen

1. Barnes, D.W., and J.F. Loutit. 1967. Haemopoietic stem cells in the peripheral blood. *Lancet* 2:1138-1141.
2. Dudley, E.C., H.T. Petrie, L.M. Shah, M.J. Owen, and A.C. Hayday. 1994. T cell receptor beta chain gene rearrangement and selection during thymocyte development in adult mice. *Immunity* 1:83-93.
3. Oettinger, M.A., D.G. Schatz, C. Gorka, and D. Baltimore. 1990. RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science* 248:1517-1523.
4. Bogue, M., S. Gilfillan, C. Benoist, and D. Mathis. 1992. Regulation of N-region diversity in antigen receptors through thymocyte differentiation and thymus ontogeny. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:11011-11015.
5. Kisielow, P., H.S. Teh, H. Bluthmann, and H. von Boehmer. 1988. Positive selection of antigen-specific T cells in thymus by restricting MHC molecules. *Nature* 335:730-733.
6. Sha, W.C., C.A. Nelson, R.D. Newberry, D.M. Kranz, J.H. Russell, and D.Y. Loh. 1988. Positive and negative selection of an antigen receptor on T cells in transgenic mice. *Nature* 336:73-76.
7. Burnet, F.M. 1961. Immunological recognition of self. *Science* 133:307-311.
8. von Boehmer, H., J. Kirberg, and B. Rocha. 1991. An unusual lineage of alpha/beta T cells that contains autoreactive cells. *J Exp Med* 174:1001-1008.
9. Filion, M.C., A.J. Bradley, D.V. Devine, F. Decary, and P. Chartrand. 1995. Autoreactive T cells in healthy individuals show tolerance in vitro with characteristics similar to but distinct from clonal anergy. *Eur J Immunol* 25:3123-3127.
10. Silverstein, A.M. 2001. Autoimmunity versus horror autotoxicus: the struggle for recognition. *Nat Immunol* 2:279-281.
11. Schwarz, B.A., A. Sambandam, I. Maillard, B.C. Harman, P.E. Love, and A. Bhandoola. 2007. Selective thymus settling regulated by cytokine and chemokine receptors. *J Immunol* 178:2008-2017.
12. Rothenberg, E.V., J.E. Moore, and M.A. Yui. 2008. Launching the T-cell-lineage developmental programme. *Nat Rev Immunol* 8:9-21.
13. Bill, J., and E. Palmer. 1989. Positive selection of CD4+ T cells mediated by MHC class II-bearing stromal cell in the thymic cortex. *Nature* 341:649-651.
14. Surh, C.D., and J. Sprent. 1994. T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus. *Nature* 372:100-103.
15. Kaye, J., M.L. Hsu, M.E. Sauron, S.C. Jameson, N.R. Gascoigne, and S.M. Hedrick. 1989. Selective development of CD4+ T cells in transgenic mice expressing a class II MHC-restricted antigen receptor. *Nature* 341:746-749.
16. Liston, A., S. Lesage, J. Wilson, L. Peltonen, and C.C. Goodnow. 2003. Aire regulates negative selection of organ-specific T cells. *Nat Immunol* 4:350-354.
17. Danke, N.A., D.M. Koelle, C. Yee, S. Beheray, and W.W. Kwok. 2004. Autoreactive T cells in healthy individuals. *J Immunol* 172:5967-5972.
18. Hardardottir, F., J.L. Baron, and C.A. Janeway, Jr. 1995. T cells with two functional antigen-specific receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:354-358.

19. Zhao, Z.S., F. Granucci, L. Yeh, P.A. Schaffer, and H. Cantor. 1998. Molecular mimicry by herpes simplex virus-type 1: autoimmune disease after viral infection. *Science* 279:1344-1347.
20. Alegre, M.L., K.A. Frauwirth, and C.B. Thompson. 2001. T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nat Rev Immunol* 1:220-228.
21. Tzachanis, D., E.M. Lafuente, L. Li, and V.A. Boussiotis. 2004. Intrinsic and extrinsic regulation of T lymphocyte quiescence. *Leuk Lymphoma* 45:1959-1967.
22. Chen, A., G. Zheng, and M.L. Tykocinski. 2003. Quantitative interplay between activating and pro-apoptotic signals dictates T cell responses. *Cell Immunol* 221:128-137.
23. Tivol, E.A., F. Borriello, A.N. Schweitzer, W.P. Lynch, J.A. Bluestone, and A.H. Sharpe. 1995. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* 3:541-547.
24. Read, S., V. Malmstrom, and F. Powrie. 2000. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med* 192:295-302.
25. Phan, G.Q., J.C. Yang, R.M. Sherry, P. Hwu, S.L. Topalian, D.J. Schwartzentruber, N.P. Restifo, L.R. Haworth, C.A. Seipp, L.J. Freezer, K.E. Morton, S.A. Mavroukakis, P.H. Duray, S.M. Steinberg, J.P. Allison, T.A. Davis, and S.A. Rosenberg. 2003. Cancer regression and autoimmunity induced by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:8372-8377.
26. Alderson, M.R., T.W. Tough, T. Davis-Smith, S. Braddy, B. Falk, K.A. Schooley, R.G. Goodwin, C.A. Smith, F. Ramsdell, and D.H. Lynch. 1995. Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes. *J Exp Med* 181:71-77.
27. Manetti, R., P. Parronchi, M.G. Giudizi, M.P. Piccinni, E. Maggi, G. Trinchieri, and S. Romagnani. 1993. Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *J Exp Med* 177:1199-1204.
28. Kamogawa, Y., L.A. Minasi, S.R. Carding, K. Bottomly, and R.A. Flavell. 1993. The relationship of IL-4- and IFN gamma-producing T cells studied by lineage ablation of IL-4-producing cells. *Cell* 75:985-995.
29. Bendelac, A., O. Lantz, M.E. Quimby, J.W. Yewdell, J.R. Bennink, and R.R. Brutkiewicz. 1995. CD1 recognition by mouse NK1+ T lymphocytes. *Science* 268:863-865.
30. Neurath, M.F., I. Fuss, B.L. Kelsall, D.H. Presky, W. Waegell, and W. Strober. 1996. Experimental granulomatous colitis in mice is abrogated by induction of TGF-beta-mediated oral tolerance. *J Exp Med* 183:2605-2616.
31. Sakaguchi, S., T. Takahashi, and Y. Nishizuka. 1982. Study on cellular events in postthymectomy autoimmune oophoritis in mice. I. Requirement of Lyt-1 effector cells for oocytes damage after adoptive transfer. *J Exp Med* 156:1565-1576.
32. Fowell, D., and D. Mason. 1993. Evidence that the T cell repertoire of normal rats contains cells with the potential to cause diabetes. Characterization of the CD4+ T cell subset that inhibits this autoimmune potential. *J Exp Med* 177:627-636.
33. Gershon, R.K., and K. Kondo. 1971. Infectious immunological tolerance. *Immunology* 21:903-914.

34. Penhale, W.J., A. Farmer, and W.J. Irvine. 1975. Thyroiditis in T cell-depleted rats. Influence of strain, radiation dose, adjuvants and antilymphocyte serum. *Clin Exp Immunol* 21:362-375.
35. Penhale, W.J., A. Farmer, R.P. McKenna, and W.J. Irvine. 1973. Spontaneous thyroiditis in thymectomized and irradiated Wistar rats. *Clin Exp Immunol* 15:225-236.
36. Nishizuka, Y., and T. Sakakura. 1969. Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. *Science* 166:753-755.
37. Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, and M. Toda. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155:1151-1164.
38. Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, J. Shimizu, S. Yamazaki, T. Sakihama, M. Itoh, Y. Kuniyasu, T. Nomura, M. Toda, and T. Takahashi. 2001. Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol Rev* 182:18-32.
39. Groux, H., A. O'Garra, M. Bigler, M. Rouleau, S. Antonenko, J.E. de Vries, and M.G. Roncarolo. 1997. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389:737-742.
40. Chen, Y., V.K. Kuchroo, J. Inobe, D.A. Hafler, and H.L. Weiner. 1994. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* 265:1237-1240.
41. Maynard, C.L., L.E. Harrington, K.M. Janowski, J.R. Oliver, C.L. Zindl, A.Y. Rudensky, and C.T. Weaver. 2007. Regulatory T cells expressing interleukin 10 develop from Foxp3+ and Foxp3- precursor cells in the absence of interleukin 10. *Nat Immunol* 8:931-941.
42. Suri-Payer, E., and B. Fritzsching. 2006. Regulatory T cells in experimental autoimmune disease. *Springer Semin Immunopathol* 28:3-16.
43. Boitard, C., R. Yasunami, M. Dardenne, and J.F. Bach. 1989. T cell-mediated inhibition of the transfer of autoimmune diabetes in NOD mice. *J Exp Med* 169:1669-1680.
44. Salomon, B., D.J. Lenschow, L. Rhee, N. Ashourian, B. Singh, A. Sharpe, and J.A. Bluestone. 2000. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* 12:431-440.
45. Nishimura, E., T. Sakihama, R. Setoguchi, K. Tanaka, and S. Sakaguchi. 2004. Induction of antigen-specific immunologic tolerance by in vivo and in vitro antigen-specific expansion of naturally arising Foxp3+CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int Immunol* 16:1189-1201.
46. Nishikawa, H., T. Kato, K. Tanida, A. Hiasa, I. Tawara, H. Ikeda, Y. Ikarashi, H. Wakasugi, M. Kronenberg, T. Nakayama, M. Taniguchi, K. Kuribayashi, L.J. Old, and H. Shiku. 2003. CD4+ CD25+ T cells responding to serologically defined autoantigens suppress antitumor immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:10902-10906.
47. Aluvihare, V.R., M. Kallikourdis, and A.G. Betz. 2004. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat Immunol* 5:266-271.

48. Belkaid, Y., C.A. Piccirillo, S. Mendez, E.M. Shevach, and D.L. Sacks. 2002. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania* major persistence and immunity. *Nature* 420:502-507.
49. Lindley, S., C.M. Dayan, A. Bishop, B.O. Roep, M. Peakman, and T.I. Tree. 2005. Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 54:92-99.
50. Balandina, A., S. Lecart, P. Dartevelle, A. Saoudi, and S. Berrih-Aknin. 2005. Functional defect of regulatory CD4(+)CD25+ T cells in the thymus of patients with autoimmune myasthenia gravis. *Blood* 105:735-741.
51. Sugiyama, H., R. Gyulai, E. Toichi, E. Garaczi, S. Shimada, S.R. Stevens, T.S. McCormick, and K.D. Cooper. 2005. Dysfunctional blood and target tissue CD4+CD25high regulatory T cells in psoriasis: mechanism underlying unrestrained pathogenic effector T cell proliferation. *J Immunol* 174:164-173.
52. Kriegel, M.A., T. Lohmann, C. Gabler, N. Blank, J.R. Kalden, and H.M. Lorenz. 2004. Defective suppressor function of human CD4+ CD25+ regulatory T cells in autoimmune polyglandular syndrome type II. *J Exp Med* 199:1285-1291.
53. Viglietta, V., C. Baecher-Allan, H.L. Weiner, and D.A. Hafler. 2004. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* 199:971-979.
54. McIntire, K.R., S. Sell, and J.F. Miller. 1964. Pathogenesis of the Post-Neonatal Thymectomy Wasting Syndrome. *Nature* 204:151-155.
55. Sakaguchi, S., T. Yamaguchi, T. Nomura, and M. Ono. 2008. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 133:775-787.
56. Jordan, M.S., A. Boesteanu, A.J. Reed, A.L. Petrone, A.E. Hohenbeck, M.A. Lerman, A. Naji, and A.J. Caton. 2001. Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol* 2:301-306.
57. Ribot, J., G. Enault, S. Pilipenko, A. Huchenq, M. Calise, D. Hudrisier, P. Romagnoli, and J.P. van Meerwijk. 2007. Shaping of the autoreactive regulatory T cell repertoire by thymic cortical positive selection. *J Immunol* 179:6741-6748.
58. Ribot, J., P. Romagnoli, and J.P. van Meerwijk. 2006. Agonist ligands expressed by thymic epithelium enhance positive selection of regulatory T lymphocytes from precursors with a normally diverse TCR repertoire. *J Immunol* 177:1101-1107.
59. Hsieh, C.S., Y. Zheng, Y. Liang, J.D. Fontenot, and A.Y. Rudensky. 2006. An intersection between the self-reactive regulatory and nonregulatory T cell receptor repertoires. *Nat Immunol* 7:401-410.
60. Pacholczyk, R., J. Kern, N. Singh, M. Iwashima, P. Kraj, and L. Ignatowicz. 2007. Nonsel-antigens are the cognate specificities of Foxp3+ regulatory T cells. *Immunity* 27:493-504.
61. Pacholczyk, R., H. Ignatowicz, P. Kraj, and L. Ignatowicz. 2006. Origin and T cell receptor diversity of Foxp3+CD4+CD25+ T cells. *Immunity* 25:249-259.
62. Wong, J., R. Obst, M. Correia-Neves, G. Losyev, D. Mathis, and C. Benoist. 2007. Adaptation of TCR repertoires to self-peptides in regulatory and nonregulatory CD4+ T cells. *J Immunol* 178:7032-7041.
63. Kimura, A., T. Naka, and T. Kishimoto. 2007. IL-6-dependent and -independent pathways in the development of interleukin 17-producing T helper cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:12099-12104.
64. Floess, S., J. Freyer, C. Siewert, U. Baron, S. Olek, J. Polansky, K. Schlawe, H.D. Chang, T. Bopp, E. Schmitt, S. Klein-Hessling, E. Serfling, A. Hamann, and J. Huehn. 2007. Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells. *PLoS Biol* 5:e38.

65. Baron, U., S. Floess, G. Wieczorek, K. Baumann, A. Grutzkau, J. Dong, A. Thiel, T.J. Boeld, P. Hoffmann, M. Edinger, I. Turbachova, A. Hamann, S. Olek, and J. Huehn. 2007. DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3(+) conventional T cells. *Eur J Immunol* 37:2378-2389.
66. Marsland, B.J., and M. Kopf. 2007. Toll-like receptors: paving the path to T cell-driven autoimmunity? *Curr Opin Immunol* 19:611-614.
67. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299:1057-1061.
68. Yagi, H., T. Nomura, K. Nakamura, S. Yamazaki, T. Kitawaki, S. Hori, M. Maeda, M. Onodera, T. Uchiyama, S. Fujii, and S. Sakaguchi. 2004. Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int Immunol* 16:1643-1656.
69. Kim, J.Y., H.J. Kim, E.M. Hurt, X. Chen, O.M. Howard, and W.L. Farrar. 2007. Functional and genomic analyses of FOXP3-transduced Jurkat-T cells as regulatory T (Treg)-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 362:44-50.
70. Allan, S.E., S.Q. Crome, N.K. Crellin, L. Passerini, T.S. Steiner, R. Bacchetta, M.G. Roncarolo, and M.K. Levings. 2007. Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *Int Immunol* 19:345-354.
71. Wang, J., A. Ioan-Facsinay, E.I. van der Voort, T.W. Huizinga, and R.E. Toes. 2007. Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells. *Eur J Immunol* 37:129-138.
72. Takahashi, T., Y. Kuniyasu, M. Toda, N. Sakaguchi, M. Itoh, M. Iwata, J. Shimizu, and S. Sakaguchi. 1998. 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* 10:1969-1980.
73. North, R.J. 1982. Cyclophosphamide-facilitated adoptive immunotherapy of an established tumor depends on elimination of tumor-induced suppressor T cells. *J Exp Med* 155:1063-1074.
74. Awwad, M., and R.J. North. 1988. Cyclophosphamide (Cy)-facilitated adoptive immunotherapy of a Cy-resistant tumour. Evidence that Cy permits the expression of adoptive T-cell mediated immunity by removing suppressor T cells rather than by reducing tumour burden. *Immunology* 65:87-92.
75. Fisson, S., G. Darrasse-Jeze, E. Litvinova, F. Septier, D. Klatzmann, R. Liblau, and B.L. Salomon. 2003. Continuous activation of autoreactive CD4+ CD25+ regulatory T cells in the steady state. *J Exp Med* 198:737-746.
76. Brode, S., T. Raine, P. Zaccane, and A. Cooke. 2006. Cyclophosphamide-induced type-1 diabetes in the NOD mouse is associated with a reduction of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol* 177:6603-6612.
77. Fruman, D.A. 2004. Phosphoinositide 3-kinase and its targets in B-cell and T-cell signaling. *Curr Opin Immunol* 16:314-320.
78. Crellin, N.K., R.V. Garcia, and M.K. Levings. 2007. Altered activation of AKT is required for the suppressive function of human CD4+CD25+ T regulatory cells. *Blood* 109:2014-2022.
79. Battaglia, M., A. Stabilini, and M.G. Roncarolo. 2005. Rapamycin selectively expands CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells. *Blood* 105:4743-4748.
80. Zeiser, R., D.B. Leveson-Gower, E.A. Zambricki, N. Kambham, A. Beilhack, J. Loh, J.Z. Hou, and R.S. Negrin. 2008. Differential impact of mammalian target of rapamycin inhibition on CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells compared with conventional CD4+ T cells. *Blood* 111:453-462.

81. Schorle, H., T. Holtschke, T. Hunig, A. Schimpl, and I. Horak. 1991. Development and function of T cells in mice rendered interleukin-2 deficient by gene targeting. *Nature* 352:621-624.
82. Malek, T.R., A. Yu, V. Vincek, P. Scibelli, and L. Kong. 2002. CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2Rbeta-deficient mice. Implications for the nonredundant function of IL-2. *Immunity* 17:167-178.
83. Sakaguchi, S. 2004. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 22:531-562.
84. Misra, N., J. Bayry, S. Lacroix-Desmazes, M.D. Kazatchkine, and S.V. Kaveri. 2004. Cutting edge: human CD4+CD25+ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells. *J Immunol* 172:4676-4680.
85. Fallarino, F., U. Grohmann, K.W. Hwang, C. Orabona, C. Vacca, R. Bianchi, M.L. Belladonna, M.C. Fioretti, M.L. Alegre, and P. Puccetti. 2003. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol* 4:1206-1212.
86. Tang, Q., J.Y. Adams, A.J. Tooley, M. Bi, B.T. Fife, P. Serra, P. Santamaria, R.M. Locksley, M.F. Krummel, and J.A. Bluestone. 2006. Visualizing regulatory T cell control of autoimmune responses in nonobese diabetic mice. *Nat Immunol* 7:83-92.
87. Collison, L.W., C.J. Workman, T.T. Kuo, K. Boyd, Y. Wang, K.M. Vignali, R. Cross, D. Sehy, R.S. Blumberg, and D.A. Vignali. 2007. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 450:566-569.
88. Deaglio, S., K.M. Dwyer, W. Gao, D. Friedman, A. Usheva, A. Erat, J.F. Chen, K. Enjyoji, J. Linden, M. Oukka, V.K. Kuchroo, T.B. Strom, and S.C. Robson. 2007. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med* 204:1257-1265.
89. Pae, H.O., G.S. Oh, B.M. Choi, S.C. Chae, and H.T. Chung. 2003. Differential expressions of heme oxygenase-1 gene in CD25- and CD25+ subsets of human CD4+ T cells. *Biochem Biophys Res Commun* 306:701-705.
90. Brusko, T.M., C.H. Wasserfall, A. Agarwal, M.H. Kapturczak, and M.A. Atkinson. 2005. An integral role for heme oxygenase-1 and carbon monoxide in maintaining peripheral tolerance by CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 174:5181-5186.
91. Gondek, D.C., L.F. Lu, S.A. Quezada, S. Sakaguchi, and R.J. Noelle. 2005. Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J Immunol* 174:1783-1786.
92. Zelenay, S., A. Chora, M.P. Soares, and J. Demengeot. 2007. Heme oxygenase-1 is not required for mouse regulatory T cell development and function. *Int Immunol* 19:11-18.
93. Banerjee-Basu, S., and A.D. Baxevanis. 2004. Structural analysis of disease-causing mutations in the P-subfamily of forkhead transcription factors. *Proteins* 54:639-647.
94. Wu, Y., M. Borde, V. Heissmeyer, M. Feuerer, A.D. Lapan, J.C. Stroud, D.L. Bates, L. Guo, A. Han, S.F. Ziegler, D. Mathis, C. Benoist, L. Chen, and A. Rao. 2006. FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell* 126:375-387.
95. Rhodes, D., and A. Klug. 1986. An underlying repeat in some transcriptional control sequences corresponding to half a double helical turn of DNA. *Cell* 46:123-132.
96. Pavletich, N.P., and C.O. Pabo. 1991. Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å. *Science* 252:809-817.
97. Landschulz, W.H., P.F. Johnson, and S.L. McKnight. 1988. The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* 240:1759-1764.

98. Chatila, T.A., F. Blaeser, N. Ho, H.M. Lederman, C. Voulgaropoulos, C. Helms, and A.M. Bowcock. 2000. JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome. *J Clin Invest* 106:R75-81.
99. Nair, S.K., and S.K. Burley. 2003. X-ray structures of Myc-Max and Mad-Max recognizing DNA. Molecular bases of regulation by proto-oncogenic transcription factors. *Cell* 112:193-205.
100. Lebel, R., F.O. McDuff, P. Lavigne, and M. Grandbois. 2007. Direct visualization of the binding of c-Myc/Max heterodimeric b-HLH-LZ to E-box sequences on the hTERT promoter. *Biochemistry* 46:10279-10286.
101. Wildin, R.S., F. Ramsdell, J. Peake, F. Faravelli, J.L. Casanova, N. Buist, E. Levy-Lahad, M. Mazzella, O. Goulet, L. Perroni, F.D. Bricarelli, G. Byrne, M. McEuen, S. Proll, M. Appleby, and M.E. Brunkow. 2001. X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat Genet* 27:18-20.
102. Bennett, C.L., J. Christie, F. Ramsdell, M.E. Brunkow, P.J. Ferguson, L. Whitesell, T.E. Kelly, F.T. Saulsbury, P.F. Chance, and H.D. Ochs. 2001. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 27:20-21.
103. Torgerson, T.R., A. Linane, N. Moes, S. Anover, V. Mateo, F. Rieux-Laucat, O. Hermine, S. Vijay, E. Gambineri, N. Cerf-Bensussan, A. Fischer, H.D. Ochs, O. Goulet, and F.M. Ruemmele. 2007. Severe food allergy as a variant of IPEX syndrome caused by a deletion in a noncoding region of the FOXP3 gene. *Gastroenterology* 132:1705-1717.
104. Kobayashi, I., R. Shiari, M. Yamada, N. Kawamura, M. Okano, A. Yara, A. Iguchi, N. Ishikawa, T. Ariga, Y. Sakiyama, H.D. Ochs, and K. Kobayashi. 2001. Novel mutations of FOXP3 in two Japanese patients with immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked syndrome (IPEX). *J Med Genet* 38:874-876.
105. Wildin, R.S., S. Smyk-Pearson, and A.H. Filipovich. 2002. Clinical and molecular features of the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome. *J Med Genet* 39:537-545.
106. Levy-Lahad, E., and R.S. Wildin. 2001. Neonatal diabetes mellitus, enteropathy, thrombocytopenia, and endocrinopathy: Further evidence for an X-linked lethal syndrome. *J Pediatr* 138:577-580.
107. Owen, C.J., C.E. Jennings, H. Imrie, A. Lachaux, N.A. Bridges, T.D. Cheetham, and S.H. Pearce. 2003. Mutational analysis of the FOXP3 gene and evidence for genetic heterogeneity in the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 88:6034-6039.
108. Bennett, C.L., M.E. Brunkow, F. Ramsdell, K.C. O'Briant, Q. Zhu, R.L. Fuleihan, A.O. Shigeoka, H.D. Ochs, and P.F. Chance. 2001. A rare polyadenylation signal mutation of the FOXP3 gene (AAUAAA-->AAUGAA) leads to the IPEX syndrome. *Immunogenetics* 53:435-439.
109. Brunkow, M.E., E.W. Jeffery, K.A. Hjerrild, B. Paeper, L.B. Clark, S.A. Yasayko, J.E. Wilkinson, D. Galas, S.F. Ziegler, and F. Ramsdell. 2001. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet* 27:68-73.
110. Schubert, L.A., E. Jeffery, Y. Zhang, F. Ramsdell, and S.F. Ziegler. 2001. Scurfin (FOXP3) acts as a repressor of transcription and regulates T cell activation. *J Biol Chem* 276:37672-37679.

111. Horak, I., J. Lohler, A. Ma, and K.A. Smith. 1995. Interleukin-2 deficient mice: a new model to study autoimmunity and self-tolerance. *Immunol Rev* 148:35-44.
112. Kramer, S., A. Schimpl, and T. Hunig. 1995. Immunopathology of interleukin (IL) 2-deficient mice: thymus dependence and suppression by thymus-dependent cells with an intact IL-2 gene. *J Exp Med* 182:1769-1776.
113. Willerford, D.M., J. Chen, J.A. Ferry, L. Davidson, A. Ma, and F.W. Alt. 1995. Interleukin-2 receptor alpha chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment. *Immunity* 3:521-530.
114. Suzuki, H., T.M. Kundig, C. Furlonger, A. Wakeham, E. Timms, T. Matsuyama, R. Schmits, J.J. Simard, P.S. Ohashi, H. Griesser, and et al. 1995. Deregulated T cell activation and autoimmunity in mice lacking interleukin-2 receptor beta. *Science* 268:1472-1476.
115. Waterhouse, P., J.M. Penninger, E. Timms, A. Wakeham, A. Shahinian, K.P. Lee, C.B. Thompson, H. Griesser, and T.W. Mak. 1995. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctl4. *Science* 270:985-988.
116. Burchill, M.A., J. Yang, C. Vogtenhuber, B.R. Blazar, and M.A. Farrar. 2007. IL-2 receptor beta-dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol* 178:280-290.
117. Yao, Z., Y. Kanno, M. Kerenyi, G. Stephens, L. Durant, W.T. Watford, A. Laurence, G.W. Robinson, E.M. Shevach, R. Moriggl, L. Hennighausen, C. Wu, and J.J. O'Shea. 2007. Nonredundant roles for Stat5a/b in directly regulating Foxp3. *Blood* 109:4368-4375.
118. Shull, M.M., I. Ormsby, A.B. Kier, S. Pawlowski, R.J. Diebold, M. Yin, R. Allen, C. Sidman, G. Proetzel, D. Calvin, and et al. 1992. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 359:693-699.
119. Kuhn, R., J. Lohler, D. Rennick, K. Rajewsky, and W. Muller. 1993. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 75:263-274.
120. Setoguchi, R., S. Hori, T. Takahashi, and S. Sakaguchi. 2005. Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *J Exp Med* 201:723-735.
121. Takahashi, T., T. Tagami, S. Yamazaki, T. Uede, J. Shimizu, N. Sakaguchi, T.W. Mak, and S. Sakaguchi. 2000. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med* 192:303-310.
122. Taguchi, O., and T. Takahashi. 1996. Administration of anti-interleukin-2 receptor alpha antibody in vivo induces localized autoimmune disease. *Eur J Immunol* 26:1608-1612.
123. McHugh, R.S., and E.M. Shevach. 2002. Cutting edge: depletion of CD4+CD25+ regulatory T cells is necessary, but not sufficient, for induction of organ-specific autoimmune disease. *J Immunol* 168:5979-5983.
124. Shimizu, J., S. Yamazaki, T. Takahashi, Y. Ishida, and S. Sakaguchi. 2002. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol* 3:135-142.
125. Allan, S.E., L. Passerini, R. Bacchetta, N. Crellin, M. Dai, P.C. Orban, S.F. Ziegler, M.G. Roncarolo, and M.K. Levings. 2005. The role of 2 FOXP3 isoforms in the generation of human CD4+ Tregs. *J Clin Invest* 115:3276-3284.

126. Aarts-Riemens, T., M.E. Emmelot, L.F. Verdonck, and T. Mutis. 2008. Forced overexpression of either of the two common human Foxp3 isoforms can induce regulatory T cells from CD4(+)CD25(-) cells. *Eur J Immunol* 38:1381-1390.
127. Stroud, J.C., Y. Wu, D.L. Bates, A. Han, K. Nowick, S. Paabo, H. Tong, and L. Chen. 2006. Structure of the forkhead domain of FOXP2 bound to DNA. *Structure* 14:159-166.
128. Bettelli, E., M. Dastrange, and M. Oukka. 2005. Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:5138-5143.
129. Grant, C., U. Oh, K. Fugo, N. Takenouchi, C. Griffith, K. Yao, T.E. Newhook, L. Ratner, and S. Jacobson. 2006. Foxp3 represses retroviral transcription by targeting both NF-kappaB and CREB pathways. *PLoS Pathog* 2:e33.
130. Ichiyama, K., H. Yoshida, Y. Wakabayashi, T. Chinen, K. Saeki, M. Nakaya, G. Takaesu, S. Hori, A. Yoshimura, and T. Kobayashi. 2008. Foxp3 inhibits RORgamma t-mediated IL-17A mRNA transcription through direct interaction with RORgamma t. *J Biol Chem*
131. Du, J., C. Huang, B. Zhou, and S.F. Ziegler. 2008. Isoform-Specific Inhibition of ROR{alpha}-Mediated Transcriptional Activation by Human FOXP3. *J Immunol* 180:4785-4792.
132. Ono, M., H. Yaguchi, N. Ohkura, I. Kitabayashi, Y. Nagamura, T. Nomura, Y. Miyachi, T. Tsukada, and S. Sakaguchi. 2007. Foxp3 controls regulatory T-cell function by interacting with AML1/Runx1. *Nature* 446:685-689.
133. Li, B., A. Samanta, X. Song, K.T. Iacono, K. Bembas, R. Tao, S. Basu, J.L. Riley, W.W. Hancock, Y. Shen, S.J. Saouaf, and M.I. Greene. 2007. FOXP3 interactions with histone acetyltransferase and class II histone deacetylases are required for repression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:4571-4576.
134. Chen, C., E.A. Rowell, R.M. Thomas, W.W. Hancock, and A.D. Wells. 2006. Transcriptional regulation by Foxp3 is associated with direct promoter occupancy and modulation of histone acetylation. *J Biol Chem* 281:36828-36834.
135. Li, B., A. Samanta, X. Song, K.T. Iacono, P. Brennan, T.A. Chatila, G. Roncador, A.H. Banham, J.L. Riley, Q. Wang, Y. Shen, S.J. Saouaf, and M.I. Greene. 2007. FOXP3 is a homo-oligomer and a component of a supramolecular regulatory complex disabled in the human XLAAD/IPEX autoimmune disease. *Int Immunol* 19:825-835.
136. Lee, S.M., B. Gao, and D. Fang. 2008. FoxP3 maintains Treg unresponsiveness by selectively inhibiting the promoter DNA-binding activity of AP-1. *Blood* 111:3599-3606.
137. Lopes, J.E., T.R. Torgerson, L.A. Schubert, S.D. Anover, E.L. Ocheltree, H.D. Ochs, and S.F. Ziegler. 2006. Analysis of FOXP3 reveals multiple domains required for its function as a transcriptional repressor. *J Immunol* 177:3133-3142.
138. Chae, W.J., O. Henegariu, S.K. Lee, and A.L. Bothwell. 2006. The mutant leucine-zipper domain impairs both dimerization and suppressive function of Foxp3 in T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:9631-9636.
139. Singh, R.P., A. La Cava, M. Wong, F. Ebling, and B.H. Hahn. 2007. CD8+ T cell-mediated suppression of autoimmunity in a murine lupus model of peptide-induced immune tolerance depends on Foxp3 expression. *J Immunol* 178:7649-7657.
140. Kim, J.M., J.P. Rasmussen, and A.Y. Rudensky. 2007. Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nat Immunol* 8:191-197.

141. Williams, L.M., and A.Y. Rudensky. 2007. Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3. *Nat Immunol* 8:277-284.
142. Zheng, Y., S.Z. Josefowicz, A. Kas, T.T. Chu, M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky. 2007. Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells. *Nature* 445:936-940.
143. Marson, A., K. Kretschmer, G.M. Frampton, E.S. Jacobsen, J.K. Polansky, K.D. MacIsaac, S.S. Levine, E. Fraenkel, H. von Boehmer, and R.A. Young. 2007. Foxp3 occupancy and regulation of key target genes during T-cell stimulation. *Nature* 445:931-935.
144. Mantel, P.Y., N. Ouaked, B. Ruckert, C. Karagiannidis, R. Welz, K. Blaser, and C.B. Schmidt-Weber. 2006. Molecular mechanisms underlying FOXP3 induction in human T cells. *J Immunol* 176:3593-3602.
145. Tone, Y., K. Furuuchi, Y. Kojima, M.L. Tykocinski, M.I. Greene, and M. Tone. 2008. Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer. *Nat Immunol* 9:194-202.
146. Chen, M.L., M.J. Pittet, L. Gorelik, R.A. Flavell, R. Weissleder, H. von Boehmer, and K. Khazaie. 2005. Regulatory T cells suppress tumor-specific CD8 T cell cytotoxicity through TGF-beta signals in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:419-424.
147. Antony, P.A., C.A. Piccirillo, A. Akpınarli, S.E. Finkelstein, P.J. Speiss, D.R. Surman, D.C. Palmer, C.C. Chan, C.A. Klebanoff, W.W. Overwijk, S.A. Rosenberg, and N.P. Restifo. 2005. CD8+ T cell immunity against a tumor/self-antigen is augmented by CD4+ T helper cells and hindered by naturally occurring T regulatory cells. *J Immunol* 174:2591-2601.
148. Ko, K., S. Yamazaki, K. Nakamura, T. Nishioka, K. Hirota, T. Yamaguchi, J. Shimizu, T. Nomura, T. Chiba, and S. Sakaguchi. 2005. Treatment of advanced tumors with agonistic anti-GITR mAb and its effects on tumor-infiltrating Foxp3+CD25+CD4+ regulatory T cells. *J Exp Med* 202:885-891.
149. Yu, P., Y. Lee, W. Liu, T. Krausz, A. Chong, H. Schreiber, and Y.X. Fu. 2005. Intratumor depletion of CD4+ cells unmasks tumor immunogenicity leading to the rejection of late-stage tumors. *J Exp Med* 201:779-791.
150. Viguier, M., F. Lemaitre, O. Verola, M.S. Cho, G. Gorochoy, L. Dubertret, H. Bachelez, P. Kourilsky, and L. Ferradini. 2004. Foxp3 expressing CD4+CD25(high) regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells. *J Immunol* 173:1444-1453.
151. Sasada, T., M. Kimura, Y. Yoshida, M. Kanai, and A. Takabayashi. 2003. CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with gastrointestinal malignancies: possible involvement of regulatory T cells in disease progression. *Cancer* 98:1089-1099.
152. Curiel, T.J., G. Coukos, L. Zou, X. Alvarez, P. Cheng, P. Mottram, M. Evdemon-Hogan, J.R. Conejo-Garcia, L. Zhang, M. Burow, Y. Zhu, S. Wei, I. Kryczek, B. Daniel, A. Gordon, L. Myers, A. Lackner, M.L. Disis, K.L. Knutson, L. Chen, and W. Zou. 2004. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 10:942-949.
153. Nishikawa, H., E. Jager, G. Ritter, L.J. Old, and S. Gnjatic. 2005. CD4+ CD25+ regulatory T cells control the induction of antigen-specific CD4+ helper T cell responses in cancer patients. *Blood* 106:1008-1011.

154. Marshall, N.A., L.E. Christie, L.R. Munro, D.J. Culligan, P.W. Johnston, R.N. Barker, and M.A. Vickers. 2004. Immunosuppressive regulatory T cells are abundant in the reactive lymphocytes of Hodgkin lymphoma. *Blood* 103:1755-1762.
155. Stanislawski, T., R.H. Voss, C. Lotz, E. Sadovnikova, R.A. Willemsen, J. Kuball, T. Ruppert, R.L. Bolhuis, C.J. Melief, C. Huber, H.J. Stauss, and M. Theobald. 2001. Circumventing tolerance to a human MDM2-derived tumor antigen by TCR gene transfer. *Nat Immunol* 2:962-970.
156. Kessels, H.W., M.C. Wolkers, M.D. van den Boom, M.A. van der Valk, and T.N. Schumacher. 2001. Immunotherapy through TCR gene transfer. *Nat Immunol* 2:957-961.
157. Willimsky, G., and T. Blankenstein. 2005. Sporadic immunogenic tumours avoid destruction by inducing T-cell tolerance. *Nature* 437:141-146.
158. Willimsky, G., M. Czeh, C. Loddenkemper, J. Gellermann, K. Schmidt, P. Wust, H. Stein, and T. Blankenstein. 2008. Immunogenicity of premalignant lesions is the primary cause of general cytotoxic T lymphocyte unresponsiveness. *J Exp Med* 205:1687-1700.
159. Ebert, L.M., B.S. Tan, J. Browning, S. Svobodova, S.E. Russell, N. Kirkpatrick, C. Gedye, D. Moss, S.P. Ng, D. MacGregor, I.D. Davis, J. Cebon, and W. Chen. 2008. The regulatory T cell-associated transcription factor FoxP3 is expressed by tumor cells. *Cancer Res* 68:3001-3009.
160. Hinz, S., L. Pagerols-Raluy, H.H. Oberg, O. Ammerpohl, S. Grussel, B. Sipos, R. Grutzmann, C. Pilarsky, H. Ungefroren, H.D. Saeger, G. Kloppel, D. Kabelitz, and H. Kalthoff. 2007. Foxp3 expression in pancreatic carcinoma cells as a novel mechanism of immune evasion in cancer. *Cancer Res* 67:8344-8350.
161. Zuo, T., R. Liu, H. Zhang, X. Chang, Y. Liu, L. Wang, P. Zheng, and Y. Liu. 2007. FOXP3 is a novel transcriptional repressor for the breast cancer oncogene SKP2. *J Clin Invest* 117:3765-3773.
162. Zuo, T., L. Wang, C. Morrison, X. Chang, H. Zhang, W. Li, Y. Liu, Y. Wang, X. Liu, M.W. Chan, J.Q. Liu, R. Love, C.G. Liu, V. Godfrey, R. Shen, T.H. Huang, T. Yang, B.K. Park, C.Y. Wang, P. Zheng, and Y. Liu. 2007. FOXP3 is an X-linked breast cancer suppressor gene and an important repressor of the HER-2/ErbB2 oncogene. *Cell* 129:1275-1286.
163. Krejsgaard, T., L.M. Gjerdrum, E. Ralfkiaer, B. Lauenborg, K.W. Eriksen, A.M. Mathiesen, L.F. Bovin, R. Gniadecki, C. Geisler, L.P. Ryder, Q. Zhang, M.A. Wasik, N. Odum, and A. Woetmann. 2008. Malignant Tregs express low molecular splice forms of FOXP3 in Sezary syndrome. *Leukemia* 22:2230-2239.
164. Pear, W.S., J.P. Miller, L. Xu, J.C. Pui, B. Soffer, R.C. Quackenbush, A.M. Pendergast, R. Bronson, J.C. Aster, M.L. Scott, and D. Baltimore. 1998. Efficient and rapid induction of a chronic myelogenous leukemia-like myeloproliferative disease in mice receiving P210 bcr/abl-transduced bone marrow. *Blood* 92:3780-3792.
165. Uckert, W., C. Becker, M. Gladow, D. Klein, T. Kammertoens, L. Pedersen, and T. Blankenstein. 2000. Efficient gene transfer into primary human CD8+ T lymphocytes by MuLV-10A1 retrovirus pseudotype. *Hum Gene Ther* 11:1005-1014.
166. Wahlers, A., O. Kustikova, P.F. Zipfel, K. Itoh, M. Koester, C. Heberlein, Z. Li, B. Schiedlmeier, C. Skerka, B. Fehse, and C. Baum. 2002. Upstream conserved sequences of mouse leukemia viruses are important for high transgene expression in lymphoid and hematopoietic cells. *Mol Ther* 6:313-320.
167. Morita, S., T. Kojima, and T. Kitamura. 2000. Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses. *Gene Ther* 7:1063-1066.

168. Fields, S., and O. Song. 1989. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340:245-246.
169. Smith, E.L., H.M. Finney, A.M. Nesbitt, F. Ramsdell, and M.K. Robinson. 2006. Splice variants of human FOXP3 are functional inhibitors of human CD4+ T-cell activation. *Immunology* 119:203-211.
170. Kleinewietfeld, M., F. Puentes, G. Borsellino, L. Battistini, O. Rotzschke, and K. Falk. 2005. CCR6 expression defines regulatory effector/memory-like cells within the CD25(+)CD4+ T-cell subset. *Blood* 105:2877-2886.
171. Leisegang, M., B. Engels, P. Meyerhuber, E. Kieback, D. Sommermeyer, S.A. Xue, S. Reuss, H. Stauss, and W. Uckert. 2008. Enhanced functionality of T cell receptor-redirected T cells is defined by the transgene cassette. *J Mol Med* 86:573-583.
172. Li, J., Y. Wang, X. Fan, X. Mo, Z. Wang, Y. Li, Z. Yin, Y. Deng, N. Luo, C. Zhu, M. Liu, Q. Ma, K. Ocorr, W. Yuan, and X. Wu. 2007. ZNF307, a novel zinc finger gene suppresses p53 and p21 pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 363:895-900.
173. Li, L., J. Liao, J. Ruland, T.W. Mak, and S.N. Cohen. 2001. A TSG101/MDM2 regulatory loop modulates MDM2 degradation and MDM2/p53 feedback control. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:1619-1624.
174. Turpin, E., B. Dalle, A. de Roquancourt, L.F. Plassa, M. Marty, A. Janin, Y. Beuzard, and H. de The. 1999. Stress-induced aberrant splicing of TSG101: association to high tumor grade and p53 status in breast cancers. *Oncogene* 18:7834-7837.
175. Copson, E.R., H.E. White, J.P. Blaydes, D.O. Robinson, P.W. Johnson, and D.M. Eccles. 2006. Influence of the MDM2 single nucleotide polymorphism SNP309 on tumour development in BRCA1 mutation carriers. *BMC Cancer* 6:80.
176. Slagsvold, T., K. Pattni, L. Malerod, and H. Stenmark. 2006. Endosomal and non-endosomal functions of ESCRT proteins. *Trends Cell Biol* 16:317-326.
177. Pornillos, O., S.L. Alam, D.R. Davis, and W.I. Sundquist. 2002. Structure of the Tsg101 UEV domain in complex with the PTAP motif of the HIV-1 p6 protein. *Nat Struct Biol* 9:812-817.
178. Huang, M., J.M. Orenstein, M.A. Martin, and E.O. Freed. 1995. p6Gag is required for particle production from full-length human immunodeficiency virus type 1 molecular clones expressing protease. *J Virol* 69:6810-6818.
179. Lynch, K.W., and A. Weiss. 2000. A model system for activation-induced alternative splicing of CD45 pre-mRNA in T cells implicates protein kinase C and Ras. *Mol Cell Biol* 20:70-80.
180. von Essen, M., M.W. Nielsen, C.M. Bonefeld, L. Boding, J.M. Larsen, M. Leitges, G. Baier, N. Odum, and C. Geisler. 2006. Protein kinase C (PKC) alpha and PKC theta are the major PKC isoforms involved in TCR down-regulation. *J Immunol* 176:7502-7510.
181. Lynch, K.W. 2004. Consequences of regulated pre-mRNA splicing in the immune system. *Nat Rev Immunol* 4:931-940.
182. Zhao, J., L. Hyman, and C. Moore. 1999. Formation of mRNA 3' ends in eukaryotes: mechanism, regulation, and interrelationships with other steps in mRNA synthesis. *Microbiol Mol Biol Rev* 63:405-445.
183. Bopp, T., A. Palmethofer, E. Serfling, V. Heib, S. Schmitt, C. Richter, M. Klein, H. Schild, E. Schmitt, and M. Stassen. 2005. NFATc2 and NFATc3 transcription factors play a crucial role in suppression of CD4+ T lymphocytes by CD4+ CD25+ regulatory T cells. *J Exp Med* 201:181-187.
184. Barboza, J.A., T. Iwakuma, T. Terzian, A.K. El-Naggar, and G. Lozano. 2008. Mdm2 and Mdm4 loss regulates distinct p53 activities. *Mol Cancer Res* 6:947-954.

185. Ritchie, W., S. Granjeaud, D. Puthier, and D. Gautheret. 2008. Entropy measures quantify global splicing disorders in cancer. *PLoS Comput Biol* 4:e1000011.

6. Zusammenfassung

Die Kontrolle der Immunantwort durch CD4⁺CD25⁺ regulatorische T-Zellen (Treg) wird durch die Expression des Transkriptionsfaktors FOXP3 in diesen Zellen sichergestellt. Neben der 11 Exon langen, vollständigen FOXP3 Isoform können in humanen Treg Zellen Exon 2 und Exon 7 alternativ zu den Isoformen FOXP3 Δ 2 und FOXP3 Δ 2 Δ 7 gespleißt werden. Die genaue Analyse der Funktion dieser natürlichen Spleißvarianten zeigte, dass weder Exon 2 noch ein von Exon 7 gebildeter *leucine zipper* Einfluss auf die Dimerisierung des Transkriptionsfaktors hat, so dass jede FOXP3 Isoform Dimere mit jeder anderen Isoform bilden kann. Darüber hinaus ist auch die durch FOXP3 vermittelte Repression der transkriptionellen Aktivität von NFAT (*nuclear factor of activated T-cells*) und NF- κ B (*nuclear factor κ B*) Isoform-unabhängig, ebenso wie die Bindung des Kofaktors AML-1 (*acute myeloid leukaemia-1*).

Besonders wichtig erscheint Exon 7 für die Induktion des Treg-spezifischen Phänotyps und der Übertragung der suppressiven Kapazität durch FOXP3. Die retrovirale Transduktion mit FOXP3 Δ 2 Δ 7 führte im Gegensatz zu den anderen Isoformen in humanen CD4⁺CD25⁻ T-Zellen nicht zur verstärkten Expression von CD25. In Mauszellen, die mit FOXP3 Δ 2 Δ 7 retroviral transduziert wurden, fehlte zudem die Induktion von CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4*) und die Fähigkeit zur Suppression, während die anderen Isoformen beides vermittelten. Darüber hinaus ist eine Überexpression von FOXP3 Δ 2 Δ 7 in der Lage, die Induktion von CD25 durch jede der beiden anderen Isoformen zu inhibieren.

Im Gegenzug konnten auch wichtige Isoform-spezifische Funktionen in Abhängigkeit von der Abwesenheit des Exons 2 beobachtet werden. Die Bindung von c-Jun und infolgedessen die Repression der AP-1 (*activator protein-1*) vermittelten Transkription findet nur bei FOXP3 Δ 2 und FOXP3 Δ 2 Δ 7 statt. Durch das alternative Spleißen von Exon 2 sind diese Isoformen außerdem in der Lage einen Komplex mit Zinkfinger 307 zu bilden und über ein in Exon 1 gelegenes PSAP-Motiv mit TSG101 (*tumor susceptibility gene 101*) zu assoziieren.

Die differentiellen Funktionen der FOXP3 Spleißvarianten können eine genau abgestimmte Reaktion in humanen Treg Zellen ermöglichen. Die Erkenntnisse darüber könnten in Zukunft dazu beitragen durch gezielte Modulation der Isoform-spezifischen FOXP3 vermittelten Funktionen das Ausmaß von Immunreaktionen zu regulieren.

7. Summary

The control of immune responses through CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells (Treg) is assured by their expression of the transcription factor FOXP3. Human Treg cells perform alternative splicing of exon 2 and exon 7 to generate the isoforms FOXP3 Δ 2 and FOXP3 Δ 2 Δ 7 among the complete, 11 Exon containing FOXP3. The functional analysis of these natural splice variants revealed, that neither exon 2 nor a leucine zipper, composed by exon 7, influence the transcription factor's dimerisation, so that any FOXP3 isoform can build dimers with any other isoform. Furthermore, the repression of transcriptional activity of NFAT (nuclear factor of activated T cells) and NF- κ B (nuclear factor κ B) by FOXP3 is isoform-independent, likewise the binding of the cofactor AML-1 (acute myeloid leukaemia-1).

Particularly exon 7 seems to have an important role in the induction of the Treg-specific phenotype and the transfer of suppressive capacity by FOXP3. Contrary to the other isoforms, retroviral transduction of human CD4⁺CD25⁻ T cells with FOXP3 Δ 2 Δ 7 does not increase the expression of CD25. Murine cells, retrovirally transduced with FOXP3 Δ 2 Δ 7, failed to induce CD25 and CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4) expression and could not suppress lymphoproliferation, whereas the other isoforms did. Furthermore, overexpression of FOXP3 Δ 2 Δ 7 inhibits the induction of CD25 by other FOXP3 splice variants.

In return, important isoform-specific functions could be observed for FOXP3 proteins, which lack exon 2. The binding of c-Jun and hence the repression of AP-1 (activator protein-1) mediated transcription is observed with FOXP3 Δ 2 and FOXP3 Δ 2 Δ 7 only. Additionally, the loss of exon 2 enables the formation of complexes with zinc finger protein 307 and association with TSG101 (tumor susceptibility gene 101) by a PSAP motif in FOXP3 exon 1. These differential functions of FOXP3 isoforms provide the opportunity for Treg cells to properly adjust their reactions. Knowledge about these mechanisms could contribute to intended regulation of immune reactions by modulation of isoform-specific FOXP3 mediated functions in the future.

8. Abkürzungen

Einheiten, Elementsymbole, sowie Buchstabenkodes für Aminosäuren und Nukleotide wurden gemäß der Internationalen Union für reine und angewandte Chemie verwendet.

aa	Aminosäuren
ADH1	Alkoholdehydrogenase-1
AML-1	<i>acute myeloid leukaemia-1</i> , Antigen der akuten myeloischen Leukämie
AP-1	Aktivatorprotein-1
APC	<i>Antigen presenting cell</i> , antigenpräsentierende Zelle
BSA	bovines Serumalbumin
CCR	Chemokinrezeptor
CD	<i>Cluster of differentiation</i> , Differenzierungsmarker
cDNA	<i>complementary DNA</i> , komplementäre DNA
CFP	cyanblau fluoreszierendes Protein
CFSE	Carboxy-Fluoreszein-diacetat-succinimidyl-ester
CMV	Cytomegalovirus
Ct	<i>threshold cycle</i> , Grenzyklus
CTL	<i>cytotoxic T lymphocyte</i> , zytotoxischer T-Lymphozyt
CTLA-4	<i>cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4</i> , zytotoxisches T-Lymphozytenantigen
Da	Dalton
DC	dendritische Zelle
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
EAE	<i>experimental autoimmune encephalomyelitis</i> , experimentelle Autoimmunerkrankung der Myelinscheiden
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i> , Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierer
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fötales Kälberserum
FKH	<i>forkhead domain</i> , DNA-Bindungsdomäne von FOXP3
Foxp3, FOXP3	Transkriptionsfaktor <i>forkhead box P3</i>
FSC	<i>forward scatter</i> , Vorwärtsstreulicht
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GITR	glukocorticoid-induzierter TNF-Rezeptor
h	Stunde(n)
HEK	<i>Human embryonic kidney cells</i> , humane embryonale Nierenzellen
HEPES	N-2Hydroxyethyl-N'2'piperazinethylsulfonat
Her-2	<i>human epidermal growth factor receptor-2</i> , humaner Rezeptor des Epidermiswachstumsfaktors-2
HRP	<i>horse raddish peroxidase</i> , Meerrettich Peroxidase

IE	Internationale Einheiten
IL	Interleukin
IB	Immunblot
IP	Immunpräzipitation
IPEX	<i>immune dysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked syndrome</i> , multiple Autoimmunerkrankungen durch Mutationen im FOXP3 Gen
IRES	Interne Ribosomen-Eintrittsstelle
LE	Lichteinheiten
LTR	Lange terminale repetitive Sequenzen
MACS	<i>magnetic cell sorting</i> , magnetische Sortierung der Zellen
MDM2	<i>murine double minute 2</i> , extrachromosomales Onkogen der Maus
MFI	<i>mean fluorescence intensity</i> , durchschnittliche Fluoreszenzintensität
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> , Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute(n)
NFAT	<i>nuclear factor of activated T cells</i> , nuklearer Faktor aktivierter T-Zellen
NF- κ B	<i>nuclear factor κB</i> , Kernfaktor κ B
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nt	Nukleotide
O.D.	optische Dichte
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i> , periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat gepufferte Saline
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
RACE	<i>rapid amplification of C-terminal ends</i> , schnelle Amplifizierung C-terminaler Enden
RAG	Rekombinationsaktivierende Gene
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
ROR	<i>retinoid orphan receptor</i> , Retinolsäurerezeptorhomolog
RT	Reverse Transkriptase
SDS	<i>Sodium dodecylsulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde(n)
SSC	<i>sideward scatter</i> , Seitwärtsstreulicht
TCR	<i>T-cell receptor</i> , T-Zellrezeptor
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF- β	<i>transforming growth factor-β</i> , transformierender Wachstumsfaktor- β
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	natürliche regulatorische T-Zellen
TSG101	<i>Tumor susceptibility gene 101</i> , Tumor Suszeptibilitätsgen 101
UEV	Ubiquitin Ligase E2 Variante
upm	Umdrehungen pro Minute
Y2H	<i>Yeast-2-Hybrid</i> , Hefehybridisierung
ZNF307	Zinkfinger 307
β -ME	β -Mercaptoethanol

9. Danksagung

Diese Doktorarbeit wurde in den Laboratorien von Dr. Kirsten Falk und Dr. Olaf Rötzschke am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin in Berlin-Buch durchgeführt. Beiden Arbeitsgruppenleitern gilt mein Dank für die Möglichkeit dieses interessante Gebiet der Immunologie erforschen zu dürfen und für ihre professionelle wissenschaftliche Betreuung.

Des Weiteren danke ich:

- Prof. Dr. Thomas Blankenstein für die Betreuung der Arbeit
- Prof. Dr. Wolfgang Uckert für die Übernahme des Koreferates
- Prof. Dr. Thomas Blankenstein und Prof. Dr. Wolfgang Uckert für die zur Verfügungstellung des S2-Labors zur retroviralen Transduktion humaner Zellen
- für die Hilfe zur Etablierung der humanen retroviralen Transduktion und der Western Blot Assays Dr. Matthias Leisegang und Sebastian Diecke
- Dr. Hans-Peter Rahn für die Hilfe bei der FACS Sortierung
- Dr. Manfred Kögl für die Durchführung der Y2H-Assays
- für die Bereitstellung von Forschungsmaterialien Dr. Daniel Besser, Dr. Manfred Gossen, Prof. Shimon Sakaguchi und Dr. Ulrike Ziebold
- allen Personen, die ihr Blut freiwillig zur Analyse spendeten
- allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Falk/Rötzschke für die wissenschaftlichen Anregungen und Diskussionen

Mein spezieller Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden für die moralische Unterstützung während dieser Arbeit, ganz besonders Tina Mailer, Maja, Vincent und Gonzo.

10. Anhang

10.1 Publikationen und Kongressteilnahmen

10.1.1 Publikationen

Bischoff SC., Mailer R., Pabst O., Weier G., Sedlik W., Li Z., Chen JJ., Murphy DL., Gershon MD. Role of serotonin in intestinal inflammation: knockout of serotonin reuptake transporter exacerbates 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid colitis in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2009 Mar;296(3):G685-95

Mailer, KW R., Falk K., Rotzschke O. 2009. Absence of leucine zipper in the natural FOXP3 Δ 2 Δ 7 isoform does not affect dimerization but abrogates suppressive capacity. (*zur Veröffentlichung eingereicht*)

Mailer, KW R., Falk K., Rotzschke O. 2009. Alternative splicing of exon 2 in human FOXP3 enables binding and repression of transcriptional activity of c-Jun. (*Manuskript in Bearbeitung*)

Mailer, KW R., Koegl M., Falk K., Rotzschke O. 2008. Alternative splicing of FOXP3 allows its PSAP motif to associate with TSG101. (*Manuskript in Bearbeitung*)

10.1.2 Kongressteilnahmen

16th European congress of immunology, Paris, France, 2006

(poster)

World immune regulation meeting, Davos, Switzerland, 2007

(poster)

7th MDC/FMP PhD Student Retreat, Berlin, Germany, 2007

(talk)

Natural FOXP3 isoform represses NF- κ B and NFAT gene induction but lacks immune-suppressive capacity

World immune regulation meeting, Davos, Switzerland, 2008

(talk)

Natural FOXP3 isoform represses NF- κ B and NFAT gene induction but lacks immune-suppressive capacity

Keystone symposia for regulatory T cells, Keystone, USA, 2009

(poster)

10.2 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt zu haben.

Bei der Verfassung der Dissertation wurden keine anderen als die im Text aufgeführten Hilfsmittel verwendet.

Ein Promotionsverfahren zu einem früheren Zeitpunkt an einer anderen Hochschule oder bei einem anderen Fachbereich wurde nicht beantragt.

Reiner Karl Walter Mailer, Berlin am 31.03.2009