

**Humane CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen:  
Charakterisierung von Subpopulationen und  
Identifizierung eines Markers**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Jan Kubach

Geboren am 06. April 1977

in Wiesbaden

Mainz, Juni 2007

Aus der  
Universitäts-Hautklinik der  
Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

Tag der mündlichen Prüfung:

30. Januar 2008

## Eigene Publikationen:

### **Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:**

1. **Human CD25<sup>+</sup> regulatory T cells: two subsets defined by the integrins alpha 4 beta 7 or alpha 4 beta 1 confer distinct suppressive properties upon CD4<sup>+</sup> T helper cells; Eur J Immunol. 2004;34(5):1303-11**

Stassen M, Fondel S, Bopp T, Richter C, Muller C, Kubach J, Becker C, Knop J, Enk AH, Schmitt S, Schmitt E, Jonuleit H.

2. **Human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells: proteome analysis identifies galectin-10 as a novel marker essential for their anergy and suppressive function; BLOOD 2007 May 14 [Epub ahead of print]; in press**

Jan Kubach, Petra Lutter, Tobias Bopp, Sabine Stoll, Christian Becker, Eva Huter, Christoph Richter, Petra Weingarten, Tobias Warger, Jürgen Knop, Stefan Müllner, John Wijdenes, Hansjörg Schild, Edgar Schmitt & Helmut Jonuleit

### **Weitere Publikationen:**

3. **Dendritic Cells: Sentinels of Immunity and Tolerance; Int J Hematol. 2005;81(3):197-203**

Jan Kubach, Christian Becker, Edgar Schmitt, Kerstin Steinbrink, Eva Huter, Andrea Tuettenberg and Helmut Jonuleit

4. **CD4-mediated functional activation of human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells; Eur.J.Immunol. 2007.37; in press**

Christian Becker, Jan Kubach, John Wijdenes, Jürgen Knop and Helmut Jonuleit

5. **cAMP is a component of regulatory T cell-mediated suppression; JEM 2007 May 14 [Epub ahead of print]; in press**

Tobias Bopp, Christian Becker, Mattias Klein, Stefan Klein-Heßling, Alois Palmeshofer, Edgar Serfling, Valeska Heib, Marc Becker, **Jan Kubach**, Steffen Schmitt, Sabine Stoll, Hansjörg Schild, Martin S. Staeger, Michael Stassen, Helmut Jonuleit and Edgar Schmitt

<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>12</b>
<b>Materialien.....</b>	<b>12</b>
<b>Laborgeräte.....</b>	<b>12</b>
<b>Plastikwaren.....</b>	<b>13</b>
<b>Chemikalien .....</b>	<b>14</b>
<b>Kulturmedien .....</b>	<b>14</b>
<b>Puffer, Lösungen und Reagenzien .....</b>	<b>15</b>
<b>Zytokine .....</b>	<b>17</b>
<b>Serologische Reagenzien .....</b>	<b>18</b>
<b>Neutralisierende Antikörper für die Zellkultur.....</b>	<b>18</b>
<b>Antikörper für Durchflusszytometrie und Immunfluoreszenz .....</b>	<b>18</b>
<b>Antikörper für Western-Blot Analysen.....</b>	<b>20</b>
<b>Antikörper für T-Zellstimulation .....</b>	<b>20</b>
<b>Antikörper für Zellseparation.....</b>	<b>20</b>
<b>Methoden.....</b>	<b>21</b>
<b>Methoden der Zellkultur .....</b>	<b>21</b>
<b>Ermittlung der Lebendzellzahl.....</b>	<b>21</b>
<b>Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen.....</b>	<b>22</b>
<b>Bestrahlung von PBMC .....</b>	<b>22</b>
<b>Verwendete Zellen .....</b>	<b>22</b>
<b>Isolierung humaner PBMC aus „BUFFY COATS“ .....</b>	<b>22</b>

Aufarbeitung von Leukaphereseprodukten.....	23
Aufreinigung humaner T-Zellpopulationen <i>ex vivo</i> .....	24
Proliferationstests und Suppressionsassays .....	25
Durchflusszytometrische Untersuchungen und Immunfluoreszenz.....	25
Markierung von Antikörpern mit dem Fluoreszenzfarbstoff	
Oregon-Green .....	25
CFSE-Markierung CD4 <sup>+</sup> T-Zellen .....	25
ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) .....	26
Cytometric Bead Array™ .....	26
Differenzielle Proteomanalysen und Proteinidentifizierung	
mittels MALDI-TOF .....	26
Immunoblot .....	26
Molekularbiologische Methoden .....	26
Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	26
Herstellung eines eukaryotischen Galectin-10- Expressionskonstruktes .....	27
siRNA und Transfektion von T-Zellen .....	27
Caspase-3/-7-Assay .....	27
<b>3. ERGEBNISSE .....</b>	<b>28</b>
3.1 Allgemeine Eigenschaften humaner CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> regulatorischer T-Zellen.....	28
3.2 Isolation von zwei CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Treg-Subpopulationen.....	32

3.2.1	$\alpha_4\beta_7^+$ und $\alpha_4\beta_1^+$ humane regulatorische T-Zellen induzieren unterschiedliche Subpopulationen von sekundären iTregs.....	35
3.3	FoxP3 ist kein zellspezifischer Marker für humane CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Tregs.....	40
3.4	Differentielle Proteomanalysen von CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Tregs und CD4 <sup>+</sup> T-Helferzellen .....	43
3.4.1	Identifizierung von Galectin-10 in humanen CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Tregs.....	48
3.4.2	Phänotypische Analysen von Galectin-10 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Tregs.....	49
3.4.3	Funktionelle Charakterisierung von Galectin-10 in CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Tregs.....	53
3.5	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	59
4.	DISKUSSION .....	60
5.	ZUSAMMENFASSUNG .....	71
6.	LITERATURVERZEICHNIS.....	72
7.	ABKÜRZUNGEN.....	85

**ANHANG 1** Human CD25<sup>+</sup> regulatory T cells: two subsets defined by the integrins alpha 4 beta 7 or alpha 4 beta 1 confer distinct suppressive properties upon CD4<sup>+</sup> T helper cells *Eur J Immunol.* 2004;34(5):1303-11

Stassen M, Fondel S, Bopp T, Richter C, Muller C, Kubach J, Becker C, Knop J, Enk AH, Schmitt S, Schmitt E, Jonuleit H.

**ANHANG 2** Human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells: proteome analysis identifies galectin-10 as a novel marker essential for their anergy and suppressive function *BLOOD* 2007 May 14 [Epub ahead of print]; in press

Jan Kubach, Petra Lutter, Tobias Bopp, Sabine Stoll, Christian Becker, Eva Huter, Christoph Richter, Petra Weingarten, Tobias Warger, Jürgen Knop, Stefan Müllner, John Wijdenes, Hansjörg Schild, Edgar Schmitt & Helmut Jonuleit

**ANHANG 3** Dendritic Cells: Sentinels of Immunity and Tolerance; *Int J Hematol.* 2005;81(3):197-203

Jan Kubach, Christian Becker, Edgar Schmitt, Kerstin Steinbrink, Eva Huter, Andrea Tuettenberg and Helmut Jonuleit

# 1. Einleitung

Das Immunsystem ist auf den Schutz des Organismus vor schädlichen Pathogenen spezialisiert. Dieses hocheffektive und dynamische System ist nicht nur in der Lage zwischen „eigenen“ und „fremden“, sondern auch zwischen harmlosen und gefährlichen Strukturen und Antigenen zu unterscheiden. Dadurch können unnötige und selbstzerstörerische Immunantworten verhindert werden. Die Immunologie differenziert zwischen angeborener und erworbener (adaptiver) Immunität. Bei der angeborenen Immunität bilden Haut und Schleimhäute eine primäre Barriere für Krankheitserreger. Zusätzlich besitzt dieses grundlegende Abwehrsystem besondere Abwehrzellen und Abwehrstoffe, die ubiquitäre Strukturen von Pathogenen erkennen<sup>1;2</sup>. Diese angeborenen Schutzmechanismen sind zwar von entscheidender Bedeutung, werden jedoch von vielen Krankheitserregern überwunden und können außerdem kein immunologisches Gedächtnis entwickeln. Die adaptive Immunität hingegen besitzt die Fähigkeit, Pathogene spezifisch zu erkennen und zu bekämpfen. Darüber hinaus gewährleistet die Bildung von Gedächtniszellen einen optimierten Schutz bei einer erneuten Infektion mit dem gleichen Erreger. Im Zusammenspiel von angeborener und adaptiver Immunität werden Antigene von Antigen-präsentierenden Zellen (APC = ANTIGEN PRESENTING CELL(S)) unspezifisch durch Phagozytose oder spezifisch durch Keimbahn-kodierte Rezeptoren, wie beispielsweise PATTERN RECOGNITION RECEPTORS (PRR)<sup>i</sup> aufgenommen und prozessiert. Verschiedene Populationen von dendritischen Zellen (DC) spielen hierbei eine essentielle Rolle, da sie strategisch an potentiellen Eintrittsstellen von Pathogenen positioniert sind. Diese professionellen APC formen ein Netzwerk aus Zellen, das eine hohe Kapazität an Antigenaufnahme, -prozessierung und -präsentation aufweist und somit effektive T-Zellantworten induzieren kann. Bei diesem Prozess erkennt der T-Zellrezeptor (TZR) sein spezifisches Antigen in Form von Peptid-MHC-Komplexen<sup>ii</sup>, welche von der APC präsentiert werden. Diese Antigen-spezifische

---

<sup>i</sup>PRR erkennen evolutionär stark konservierte, molekulare Muster von Pathogenen, sogenannte PATHOGEN ASSOCIATED MOLECULAR PATTERNS (PAMPs)

<sup>ii</sup> Als MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX **MHC** wird der Genkomplex auf Chromosom 6 (human) bezeichnet, der für die Antigene des HLA (HUMAN LEUKOCYTE ANTIGEN)-System kodiert. Der MHC nimmt an unterschiedlichen Formen der Antigenpräsentation teil. Man unterscheidet zwischen MHC-Klasse I und MHC-Klasse II. MHC-Klasse I Moleküle, exprimiert von allen kernhaltigen Zellen, präsentieren Peptide die bei dem Abbau von zelleigenen Proteinen im Proteasom gebildet werden. MHC-Klasse II Moleküle, exprimiert auf Antigen-präsentierenden Zellen, präsentieren prozessierte Peptide aus intrazellulären Vesikeln.

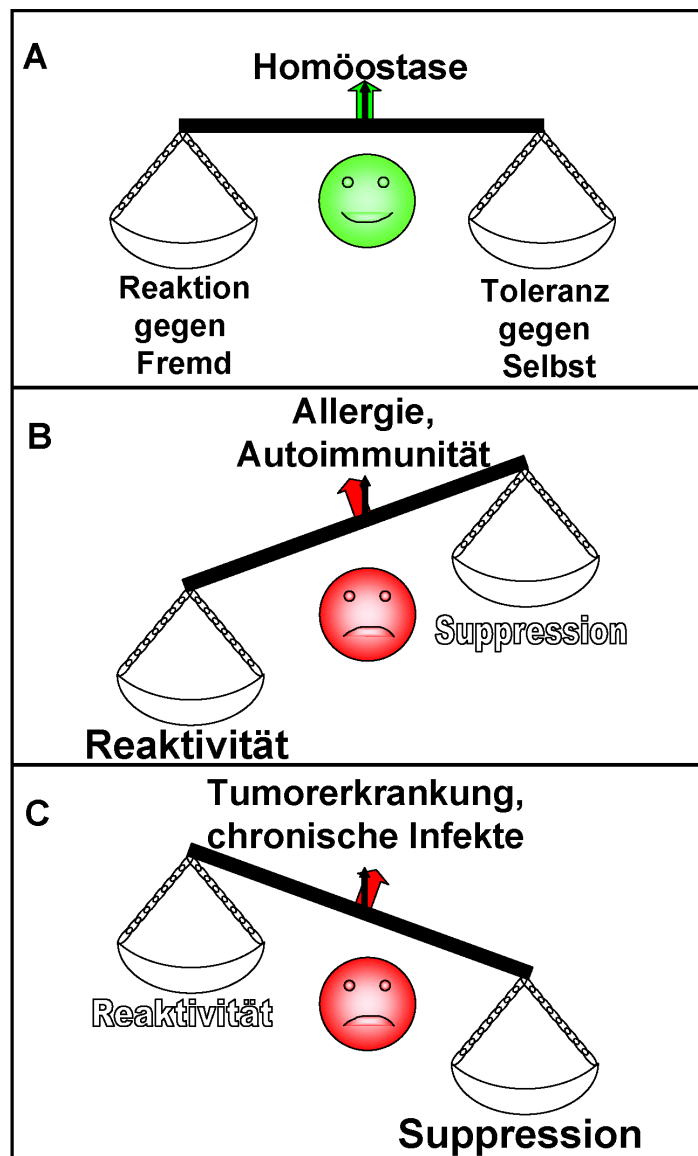


Bindung führt zu einer partiellen Aktivierung der T-Zelle, welche durch Interaktion von kostimulatorischen Molekülen zwischen APC und T-Zelle und sezernierten Zytokinen wie Interleukin-(IL-)2 und IFN- $\gamma$  komplettiert werden kann.

Aufgrund von Gen-Reorganisationen während der Entwicklung des T-Zellrezeptors (TZR) und der Erkennung verschiedener Peptid-MHC-Komplexe durch einen TZR (Plastizität des TZR)<sup>iii</sup> bei der Antigenerkennung steht dem Immunsystem somit ein Repertoire von spezifischen T-Lymphozyten zur Verfügung, welches die Bekämpfung jeglicher Pathogene zulassen sollte<sup>3-6</sup>. Allerdings birgt dieses System der Antigenerkennung auch die Gefahr körpereigene Proteine zu erfassen und würde in Abwesenheit weiterer Regulation potentiell zu einer Entstehung von Autoimmunerkrankungen führen. Zur Aufrechterhaltung der schützenden Immunität bei gleichzeitiger Toleranz gegenüber körpereigenen Strukturen haben sich im Laufe der Evolution verschiedene Mechanismen entwickelt. In gesunden Individuen stellt das Immunsystem daher ein ausbalanciertes System dar, in dem Reaktion und Suppression exakt reguliert werden (Abb. 1.1).

---

<sup>iii</sup> Unter **Plastizität des TZR** versteht man, dass ein TZR verschiedene Peptidsequenzen in Kombination mit MHC-Molekülen erkennen kann, die nicht unbedingt hohe Sequenzhomologien aufweisen müssen.



modifiziert nach H. Jonuleit

**Abbildung 1.1: Ein ausbalanciertes Verhältnis zwischen Reaktivität und Suppression ist essentiell für einen gesunden Organismus**

Die ausgeglichene Beziehung zwischen Reaktion gegenüber körperfremden und Toleranz gegenüber körpereigenen Strukturen ist essentiell für eine Aufrechterhaltung der Homöostase des Immunsystems (A). Kommt dieses Gleichgewicht aus der Balance in Richtung erhöhter Reaktivität (B) oder verstärkter Suppression (C), hat dies gravierende Folgen für den Organismus.

Um die Entwicklung und Aktivierung von potentiell autoreaktiven T-Zellen zu verhindern, hat das Immunsystem während der Evolution verschiedene aktive und passive Mechanismen entwickelt, die unter dem Begriff der *Toleranzinduktion* zusammengefasst sind. Diese Toleranzmechanismen werden in die zentrale und die periphere Toleranzinduktion unterteilt. T-Zellen durchlaufen bereits während

ihrer Entwicklung im Thymus erste Selektionsprozesse, die das Überleben der T-Zellen gewährleisten bzw. zu ihrer Depletion führen<sup>7</sup>. So überleben während der Positiv-Selektion im Kortex des Thymus nur solche T-Zellen, die eine ausreichende Affinität gegenüber körpereigenen MHC-Molekülen aufweisen<sup>8</sup>. Um die Entwicklung selbstreaktiver T-Zellen zu verhindern, werden diejenigen T-Zellen, die im Thymus Peptid-MHC-Komplexe (körpereigene Peptide) mit hoher Affinität erkennen, durch klonale Deletion aus dem Repertoire eliminiert (Negativ-Selektion)<sup>9-12</sup>.

Da die Aktivierung von T-Zellen die Erkennung von körpereigenen MHC-Molekülen voraussetzt, ist eine vollständige Entfernung aller potentiell autoaggressiven T-Zellen im Thymus nicht möglich. Ein Teil dieser T-Zellen erreicht die Peripherie und stellt hier grundsätzlich ein permanentes Risiko zur Entwicklung von Autoimmunität dar<sup>13;14</sup>. Aus diesem Grund war die Entwicklung zusätzlicher Mechanismen zur Kontrolle autoaggressiver T-Lymphozyten in der Peripherie essentiell.

Den einfachsten Mechanismus stellt die immunologische Ignoranz dar. Werden spezifische Autoantigene<sup>iv</sup> nur in bestimmten privilegierten Regionen (z.B. Plazenta, Hoden, Auge) des Körpers exprimiert oder nur in geringer Zahl präsentiert, führt dies zu einer immunologischen Ignoranz gegenüber diesen Antigenen<sup>15;16</sup>. Eine Antigen dosis-abhängige Ignoranz, bei der die Aktivierung autoreaktiver Zellen von der Antigen dosis und der Antigenpräsentation abhängig ist, konnte in murinen Diabetes-Modellen belegt werden<sup>17;18</sup>. Darüber hinaus führt eine partielle Aktivierung allein über den TZR zu einer funktionellen Ruhigstellung (Anergie) Autoantigen-spezifischer T-Zellen. Diese funktionell inaktivierten T-Zellen sind selbst nach Restimulation durch professionelle APC weder in der Lage zu proliferieren, noch den Wachstumsfaktor IL-2 zu produzieren<sup>19-21</sup>. Für eine maximale Aktivierung benötigen CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen (CD4<sup>+</sup> Th) drei Signale. Das erste Signal wird durch die Interaktion und Bindung des TZR-Komplexes an peptidbeladene MHC-Moleküle auf den APC vermittelt. Signal 2 erhält die T-Zelle durch kostimulatorische Moleküle<sup>v</sup>, deren Expression auf den APC induzierbar ist. Erst nach Vermittlung beider Signale induzieren sezernierte Zytokine eine vollständige Aktivierung der T-Zelle (Signal 3)<sup>22</sup>. Die Expression kostimulatorischer

---

<sup>iv</sup> **Autoantigene** sind körpereigene Peptide, die potentiell eine Immunantwort auslösen können.

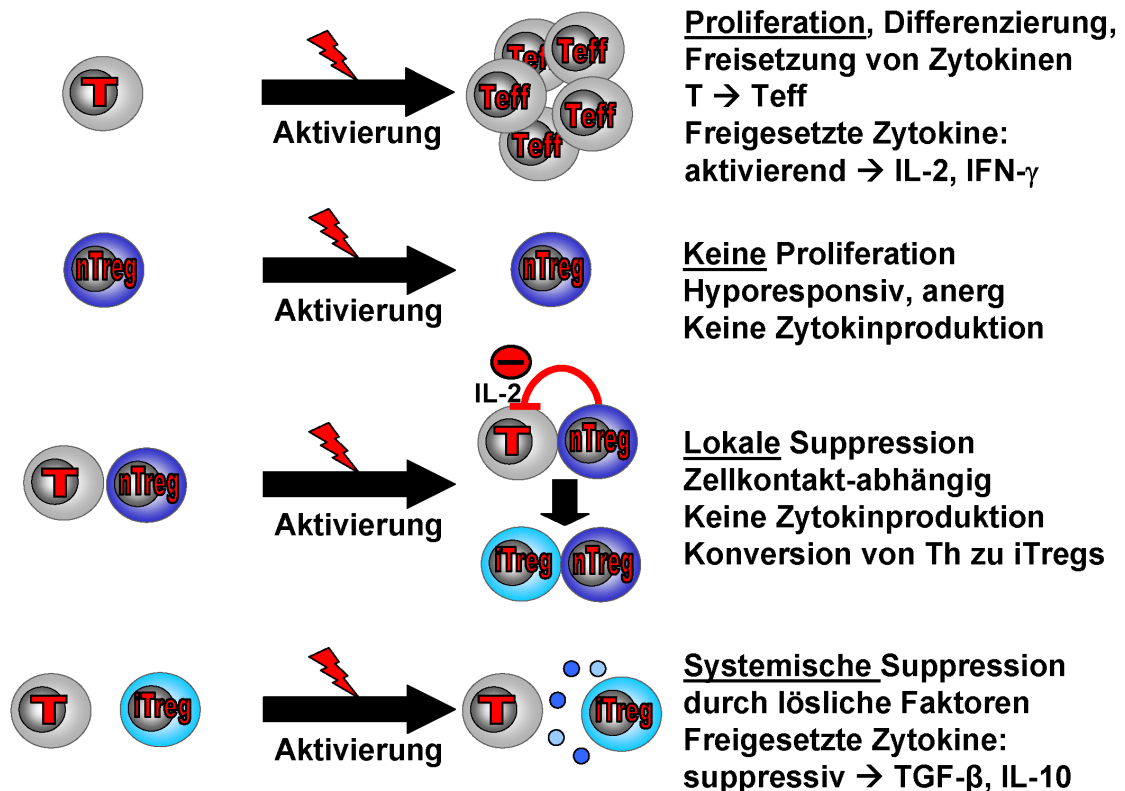
<sup>v</sup> **Kostimulatorische Moleküle**: hierunter versteht man z.B. die Bindung von Rezeptoren und Liganden der B-7 Familie, die aktivierungsfördernde Signale in die Zelle leiten.

Moleküle auf APC und die Induktion aktivierender Zytokine sind vom Aktivierungszustand der APC abhängig und werden durch Pathogenbindung und -prozessierung zusammen mit Signalen aus dem umgebenden Mikromilieu (entzündliche Stimuli) beeinflusst<sup>20;23</sup>. MHC-restringierte Antigenerkennung in Abwesenheit von kostimulatorischen Molekülen, wie sie im Fall einer potentiell autoreaktiven T-Zelle in Abwesenheit einer Entzündung stattfindet, führt daher nicht zu einer Aktivierung, sondern zu einer Anergisierung der T-Zelle. Verschiedene Populationen von DC, welche, wie bereits erwähnt, in allen Bereichen des Körpers vorkommen, spielen hierbei eine essentielle Rolle. DC prozessieren in Abwesenheit von Pathogenen fortwährend körpereigene Antigene und präsentieren diese in einer tolerogenen Weise<sup>23;24</sup>.

Da die bisher beschriebenen Mechanismen nicht in jedem Fall eine effektive Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz gewährleisten können, sind spezifische T-Zellpopulationen mit regulatorischen Eigenschaften essentiell an der peripheren Toleranzinduktion involviert. Diese regulatorischen T-Zellen können aktiv autoreaktive T-Zellen supprimieren und sind daher maßgeblich an der Prävention von Autoimmunkrankheiten beteiligt<sup>25-28</sup>.

Das Arbeitsfeld der regulatorischen T-Zellen ist derzeit eines der am intensivsten beforschten Gebiete der Immunologie. Charakterisiert durch ihre suppressiven Eigenschaften wurde so bereits eine Vielzahl an unterschiedlichen T-Zelltypen beschrieben<sup>29</sup>. Zur Zeit unterscheidet man zwei Hauptpopulationen: Zum einen die sogenannten natürlichen  $CD4^+CD25^+$  regulatorischen T-Zellen (nTregs), die bereits in einem sehr frühen Differenzierungsstadium im Thymus gebildet werden, zum anderen diverse Phänotypen regulatorischer T-Zellen, die aus dem Repertoire der T-Lymphozyten in der Peripherie induziert werden können (iTregs)<sup>30-34</sup>.

nTregs entstehen als distinkte T-Zellpopulation im Thymus und vermitteln ihre suppressiven Eigenschaften in der Peripherie über einen Zell-Zellkontakt-abhängigen Prozess<sup>35-37</sup>. Unter dem Begriff "iTregs" werden dagegen eine Vielzahl phänotypisch und funktionell distinkter T-Zellpopulationen mit suppressiven Eigenschaften zusammengefasst, die in der Regel T-Effektorzellantworten durch die Freisetzung löslicher Inhibitoren unterdrücken (Abb. 2)<sup>29-32</sup>.



**Abbildung 1.2: Distinkte Populationen regulatorischer T-Zellen im Vergleich zu T-Effektorzellen**

Dargestellt sind charakteristische Merkmale regulatorischer T-Zellen im Vergleich zu Effektorzellen. Aktivierte T-Zellen proliferieren, differenzieren zu T-Effektorzellen (Teff) und produzieren Zytokine, wie IL-2 und IFN- $\gamma$ . CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> nTregs zeigen dagegen eine deutlich gehemmte Proliferation und Zytokinbildung (Anergie), sind aber in der Lage, durch einen Zellkontakt-abhängigen Prozess die Bildung von Effektorzellen zu inhibieren und eine alternative Differenzierung der T-Zellen in iTregs einzuleiten. Diese iTregs können bei erneuter Aktivierung suppressive Faktoren freisetzen (z.B. IL-10 und TGF- $\beta$ ), die Immunantworten systemisch unterdrücken.

Erste Hinweise auf T-Zellpopulationen mit suppressiven Eigenschaften gegenüber anderen Lymphozyten und APC wurden bereits in den 70<sup>er</sup> Jahren des letzten Jahrhunderts von GERSHON und KONDO beschrieben<sup>38;39</sup>. Diese postulierten eine nicht genauer definierte Population an T-Zellen, die sie als Suppressorzellen bezeichneten, charakterisiert durch das Phänomen, dass eine einmal ausgelöste antigenspezifische Toleranz in einem Versuchstier, sich durch periphere Lymphozyten auf ein zweites Tier übertragen lässt. Diese Arbeit führte zu einer Intensivierung der Forschung und zu einer Vielzahl an Publikationen die sich mit Suppressor-T-Zellen befassten. So konnten hauptsächlich in Mausmodellen einige grundlegende Eigenschaften dieser bisher noch nicht näher abgegrenzten

Population beschrieben werden<sup>40</sup>. Letztlich fehlten jedoch die adäquaten Methoden und Reagenzien, um die postulierten Suppressorzellen zu isolieren und detailliert zu charakterisieren. Die letztlich falsche Annahme, die hypothetischen T-Suppressorzellen müssten über eigene Restriktionselemente verfügen, genetisch postuliert als "I-J-Region" im MHC-Lokus, brachte die T-Suppressorzellforschung schließlich zum Erliegen. Die aufkommenden, neuen Methoden der Molekularbiologie widerlegten eindeutig die Existenz einer I-J-Region im MHC<sup>41</sup>. Die Bezeichnung Suppressor-T-Zelle wurde von nun an als TERMINUS NON GRATIS (GREEN ET AL. SAYING THE S-WORD IN PUBLIC) angesehen und von den meisten Wissenschaftlern als nicht existent abgelehnt<sup>42;43</sup>.

Erst als SAKAGUCHI ET AL. 1995, unter Verwendung eines adoptiven Transfermodells bei NUDE-Mäusen<sup>vi</sup>, regulatorische Funktion eindeutig einer Subpopulation von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen zuordnen konnte, wurde die These von der Existenz der regulatorischen T-Zellen anerkannt<sup>44</sup>. Diese CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs) repräsentieren eine Subpopulation von ca. 5-10% der peripheren CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die in gesunden Individuen konstitutiv die  $\alpha$ -Kette des IL-2 Rezeptors (CD25) exprimieren. Die Autoren konnten eindeutig belegen, dass eine induzierte letale lymphoproliferative Autoimmunerkrankung, ausgelöst durch den Transfer von CD25<sup>-</sup> T-Zellen in T-Zelldefiziente Mäuse, durch Ko-Transfer von isolierten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs verhindert werden konnte. Des Weiteren führte die Depletion von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs in gesunden, adulten Mäusen ebenfalls zu verschiedenen gravierenden Autoimmunerkrankungen. Diese und folgende Arbeiten identifizierten den Thymus als essentielles Organ, welches an der Differenzierung und Entwicklung dieser spezifischen Population beteiligt ist und dessen Entnahme bei neonatalen Mäusen zu einem Fehlen von nTregs führt<sup>33;34;44</sup>.

Vom Thymus aus wandern diese Zellen in die Peripherie und tragen dort zur Aufrechterhaltung der Toleranz bei<sup>44</sup>.

Obwohl der funktionelle Mechanismus Treg-vermittelter Suppression intensiv untersucht wird, konnten die genauen Mechanismen und beteiligten Moleküle, welche die Suppression CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs vermitteln, bis heute nicht identifiziert werden. *In vitro* konnte zumindest klar gezeigt werden, dass die suppressiven Eigenschaften CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs über einen Zellkontakt-abhängigen

---

<sup>vi</sup> **Nude-Mäuse (nu/nu)**, sogenannte Nacktmäuse fehlt eine Thymusanlage, so dass in diesen Mäusen keine reifen T-Zellen in der Peripherie existieren.

Mechanismus vermittelt werden, der eine Aktivierung der T-Zelle über den TZR voraussetzt<sup>29</sup>. Hierbei erfolgt die Aktivierung CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs Antigen-spezifisch, die suppressiven Eigenschaften dieser Zellen sind jedoch ausschließlich Aktivierungs-abhängig und verlaufen somit Antigen-unabhängig<sup>36;45</sup>. In einigen Arbeiten wurde eine Bedeutung von CTLA-4 (CYTOTOXIC T CELL ANTIGEN-4)<sup>46</sup> und membranständigem TGF- $\beta$  (TRANSFORMING GROWTH FACTOR- $\beta$ )<sup>47</sup> für diese funktionelle Aktivität postuliert. Diese konnte von anderen Arbeitsgruppen jedoch nicht bestätigt werden konnten<sup>37;48</sup>.

Im Gegensatz zu der Zellkontakt-abhängigen Suppression *in vitro* wird der suppressive Mechanismus *in vivo* noch kontrovers diskutiert<sup>35;49</sup>. Obwohl durch Analysen *in vitro* eine durch lösliche Faktoren vermittelte Suppression ausgeschlossen werden konnte, scheinen IL-10 und TGF- $\beta$  *in vivo* eine wichtige Rolle in einem durch Tregs reguliertem Netzwerk der Immunregulation zu spielen<sup>49</sup>. Da funktionelle CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs sowohl aus IL-10- als auch aus TGF- $\beta$ -defizienten Mäusen<sup>48;50</sup> isoliert werden können, lassen sich diese auf den ersten Blick kontroversen Ergebnisse mit der Hypothese zur "Infektiösen Toleranz" erklären<sup>29;32;51</sup>. Diese Hypothese beschreibt, dass *in vivo* möglicherweise nTregs und iTregs zusammenwirken müssen, um eine autoaggressive T-Zellantwort systemisch unterdrücken zu können<sup>29</sup>.

In diesem Prozess supprimieren CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs nicht nur die Aktivierung koaktivierter CD4<sup>+</sup> Th, sondern übertragen zudem auch suppressive Eigenschaften auf diese Zellen. Diese induzierten sekundären T-Helfersuppressorzellen vermitteln im Anschluss an diesen lokalen Prozess ihre suppressive Funktion systemisch durch Sezernierung löslicher Faktoren wie IL-10 und TGF- $\beta$ <sup>32;52</sup>.

Neben dem als "Infektiöse Toleranz" beschriebenen Mechanismus zur Induktion von iTregs konnten bereits weitere Populationen identifiziert werden, die durch eine Konversion von Th zu iTregs in der Peripherie an der Toleranzinduktion beteiligt sind. Diese wurden anhand ihrer Wirkungsweise und ihres Zytokinmusters als zwei distinkte Subpopulationen, sogenannte Tr1- und Th3-Zellen beschrieben<sup>30;31</sup>.

Die historisch zuerst charakterisierte induzierte CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation mit suppressiven Eigenschaften sind Th3-Zellen, deren essentielle Funktion von WEINER ET AL. in der oral vermittelten Toleranz bei Mäusen gezeigt wurde<sup>30</sup>. In diesen Studien zur Induktion von T-Zelltoleranz durch orale, tolerogene Gabe von

Antigenen erwies sich die Bildung von Th3-Zellen als entscheidend, um den Ausbruch einer experimentellen autoimmunen Enzephalitis (EAE, murines Modell der multiplen Sklerose) zu verhindern. Als orale Toleranz bezeichnet man die systemische Toleranz gegenüber einem Antigen, das vor einer Immunisierung oral in Abwesenheit einer Adjuvants verabreicht wurde. Dieser Mechanismus wurde bereits 1946 von CHASE ET AL. erstmals beschrieben<sup>53</sup>. Entscheidend für die suppressive Aktivität von Th3-Zellen ist die Sekretion großer Mengen an biologisch aktivem TGF- $\beta$ , das vor allem in der Mukosa inhibitorische Wirkung zeigt<sup>30;54</sup>. Eine weitere Population von iTregs konnte erstmals von GROUX ET AL. identifiziert werden<sup>55</sup>). Diese als Tr1 (T-regulatorische Zelle-1) bezeichnete Population zeichnet sich dadurch aus, dass sie nach Aktivierung große Mengen IL-10 freisetzt, ein Zytokin das insbesondere die stimulatorischen Eigenschaften von APC inhibiert und damit die Aktivierung von T-Effektorzellen indirekt unterdrückt<sup>56</sup>. Tr1 entstehen durch chronische Aktivierung aus CD4<sup>+</sup> Th in Gegenwart von IL-10. Dieser alternative Differenzierungsprozess CD4<sup>+</sup> T-Zellen wird vermutlich durch die inhibitorischen Eigenschaften von IL-10 auf die APC vermittelt. IL-10 führt nicht nur zu einer Herunterregulation von MHC-Molekülen, sondern auch zu einer verminderten Expression kostimulatorischer Moleküle wie CD80, CD86 und CD54. Darüber hinaus inhibiert IL-10 die Zytokinproduktion der APC<sup>31;56</sup>.

Im Gegensatz zu den diversen Populationen an iTregs bilden die nTregs – zumindest *in vitro* – keine wesentlichen Mengen an Zytokinen und benötigen, wie beschrieben, für die Suppression von T-Effektorzellen einen direkten Zellkontakt. Der genaue Mechanismus, durch den CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs weitere T-Zellpopulationen supprimieren, ist jedoch bis heute völlig unverstanden. Im Unterschied hierzu scheint der T-Zellwachstumsfaktor IL-2 maßgeblich an der Homöostase CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs *in vivo* beteiligt zu sein<sup>57</sup>. IL-2 ist ein autokriner Wachstumsfaktor aktivierter T-Zellen und die Hemmung der endogenen IL-2 Produktion in diesen Zellen scheint ein zentraler Mechanismus der Suppression durch CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs zu sein<sup>50</sup>. Die Aktivierung von CD4<sup>+</sup> Th und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs in Gegenwart von starken kostimulatorischen Signalen, wie hohen Dosen von IL-2 oder zusätzlicher Stimulation über CD28, durchbricht nicht nur die suppressiven Eigenschaften der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs, sondern führt auch zu einer teilweisen Aufhebung deren anergen Phänotyps und somit zur Expansion dieser Zellen<sup>50;58-61</sup>. Dieser Mechanismus erlaubt die Koexpansion regulatorischer T-



Zellen in einer frühen Phase der mikrobiellen Abwehr und somit eine optimierte Suppression aktivierter Effektorzellen in einer späteren Phase nach Beseitigung der Pathogene<sup>29</sup>.

Ein zentrales Problem der weiteren Erforschung CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs ist vor allem das Fehlen spezifischer Oberflächenmarker, welches eine Charakterisierung dieser Zellen und deren funktioneller Eigenschaften erschwert. Arbeiten zur phänotypischen Charakterisierung CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs zeigten, dass neben CD25 auch weitere Moleküle wie CTLA-4, Galectin-1, OX-40, L-Selektin (CD62-L) oder GITR (GLUCOCORTICOID-INDUCED TUMOR NECROSIS FACTOR RECEPTOR) konstitutiv von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs exprimiert werden<sup>62-66</sup>. Allerdings werden diese Treg-assoziierten Marker ähnlich wie CD25 nach Aktivierung auch von CD4<sup>+</sup> Th exprimiert<sup>62;66-70</sup>.

Zu Beginn dieser Arbeit stellte einzig FoxP3 einen molekularen Marker für murine CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs dar, dessen essentielle Bedeutung für die Entwicklung und Funktion von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs in der Maus eindeutig belegt werden konnte<sup>71;72</sup>. Die Überexpression von FoxP3 in CD4<sup>+</sup> Th führte zu funktionellen Eigenschaften, die mit denen von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs vergleichbar sind<sup>72;73</sup>. Das Fehlen von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs in Mäusen mit dem Autoimmunsyndrom SCURFY, welches zu lymphoproliferativen Autoimmunerkrankungen führt, konnte auf ein Defekt im FOXP3-Gen zurückgeführt werden<sup>74</sup>. FoxP3 gehört zu den Transkriptionsfaktoren der forkhead/winged-helix-Familie und eine Mutation des Gens im Menschen induziert ein dem SCURFY-SYNDROME ähnliches Krankheitsbild, das sogenannte IPEX-SYNDROM (IMMUNE DYSREGULATION POLYENDOCRINOPATHY, ENTEROPATHY, X-LINKED SYNDROME)<sup>75;76</sup>. FoxP3 ist ein transkriptioneller Repressor, der die Expression einer Vielzahl von Zytokinen, darunter IL-2, IL-4 und IFN- $\gamma$ , inhibiert und scheint zumindest in der Maus einen wichtigen Regulator für die Entwicklung und Funktion von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs darzustellen<sup>77-79</sup>.

### **Zielsetzung der Arbeit**

Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung und Charakterisierung von funktionell relevanten Proteinen in humanen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs. Hierbei stand die Untersuchung der funktionellen Eigenschaften von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg-

Subpopulationen und die Identifizierung und Analyse von differentiell exprimierten Proteinen, im Vergleich von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs und CD4<sup>+</sup> Th, im Vordergrund.

## 2. Material und Methoden

### Materialien

#### Laborgeräte

<b>Beta-Szintillations-Counter</b>	Betaplate <sup>®</sup> 1205 (Perkin Elmer Wallac GmbH, Freiburg, Deutschland)
<b>Bestrahlungsgerät</b>	Gammacell 2000 (Isgaard medical, Ris, Dänemark)
<b>Brutschrank</b>	Hera Cell 240 (Heraeus, Hanau)
<b>Computer für Videosystem</b>	Verwendet wurde ein PC-Arrangement der Firma PC-Team GmbH (Mainz) mit einem Pentium 800 MHz-Prozessor und den Betriebssystemen Microsoft Windows 98, Windows 2000 und Windows XP
<b>Depletionsmagnet</b>	DYNAL MPC-6 (Dynal Oslo, Norwegen) Dynal MPC- 50 (Dynal)
<b>ELISA-Fotometer</b>	Immunoreader NJ-2000 (Intermed, Nunc, Wiesbaden, Deutschland)
<b>FACScan-Zytofluorometer</b>	FACSCalibur, FACScan (Becton-Dickinson, Mountain View, Ca, USA) CellQuestPro™ Software V3.3 1994-1999
<b>Fluoreszenz Reader</b>	SpectraFluorreader (TECAM, Crailsheim, Deutschland)
<b>Chemilumineszenz-Imager</b>	ChemiDoc XRS (Bio-Rad, München, Deutschland)
<b>Laborwaage</b>	Scout Pro SPU601 (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland)
<b>Mikroskope</b>	Labormikroskop Leitz SM-LUX Labormikroskop Axiovert 135 (Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland)

<b>Kamerasystem für Mikroskop</b>	3 CCD Color VideokameraA-15014 (Firma AVT Horn, Aalen, Deutschland) Spot insight Camera (Model #3.1.0; Diagnostic Instruments Inc., Sterling Heights, USA)
<b>Software für Videosystem</b>	KS 400 V3.0©1997 (Carl Zeiss Vision GmbH) Meta Imaging Series 6.1 imaging software (Universal Imaging Corporation, Downingtown, USA)
<b>Magnetischer Zellseparator</b>	VarioMACS-Separator (Milteny-Biotech Bergisch Gladbach, Deutschland) MACS Separation Columns (Milteny-Biotech)
<b>Nukleofektions-Gerät</b>	Nucleofektor Device (AMAXA, Köln, Deutschland)
<b>PCR-Geräte</b>	i-Cycler (Biorad, München, Deutschland) Light-Cycler (Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland)
<b>Proben-Mixer</b>	Dynal Sempel-Mixer (Dynal Oslo, Norwegen)
<b>Schüttler</b>	Polymax 2040 (Heidolph, Schwabach, Deutschland)
<b>Zählkammer</b>	Neubauer Zählkammer improved (VWR, Darmstadt, Deutschland)
<b>Zellerntegerät</b>	Semiautomatic Cell Harvester (Skatron AS, N-3401, Norwegen)
<b>Zentrifugen</b>	Sorvall RT 6000D (Heraeus, Hanau, Deutschland) Multifuge 3L-R (Heraeus) Biofuge primo R (Heraeus) Sorvall RC5C Plus (Du Pont Instruments, Bad Homburg, Deutschland)

## **Plastikwaren**

Alle Plastikwaren wurden steril bezogen.

## Chemikalien

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

## Kulturbedien

Alle selbst angesetzte Medien wurden mit destilliertem Wasser angesetzt, sterilfiltriert und bei 4°C aufbewahrt.

### X-VIVO 15

X-VIVO 15 (Bio\*Whittaker Europe, Verviers, Belgien, #BE04-418Q)

### RPMI 1640

RPMI 1640 (ohne L-Glutamin) (Bio\*Whittaker, #12-167F)

### MEM (minimal essential medium)

(Ansatz für 5 Liter Medium)

1 Packung RPMI 1640 Trockenpulver (Gibco, Grand Island, USA)  
4,77 g/l HEPES (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)  
2,2 g/l Natriumhydrogencarbonat (Merk, Darmstadt, Deutschland)  
3,6 ml/l Mecaptoethanol (Serva, Heidelberg, Deutschland, #28625)

### RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute Medium)

(Ansatz für 10 Liter Medium)

1 Packung RPMI 1640 Trockenpulver (Gibco)  
3,6 g/l HEPES (Biochrom AG)  
10 ml/l Penicillin-Streptomycin (Biochrom AG)  
10 ml/l Sodium Pyroval (Biochrom AG)  
2 g/l Natriumhydrogencarbonat (Merk)  
10 ml/l Nicht-Essentielle Aminosäuren (Biochrom AG)  
3,5 ml/l Mecaptoethanol (Serva)  
100 µl/l Indomethacin

(pH 7,2)

### **Einfriermedium**

HSA (humanes Serum Albumin) (OCTAPHARMA, Langenfeld, Deutschland)

20% DMSO (Dimethylsulfoxid) (Sigma, Deisenhofen)

### **Medium zur Depletion mit Dynalbeads**

MEM+ 2% HSA (OCTAPHARMA)

## **Puffer, Lösungen und Reagenzien**

### **PBS** (phosphate buffered saline)

Stammlösung = 10-fach konzentriert

80,4 g/l NaCl (Roth)

15,6 g/l NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O (Merk)

mit 10N NaOH auf pH-Wert 6,6 einstellen, anschließend autoklavieren

### **PBS/EDTA**

1 x PBS

1 mM EDTA (GEBRU Biotechnik, Gailsberg, Deutschland)

### **PBS/EDTA** (für Leukaphereseaufarbeitung)

PBS/EDTA (Bio\*Whittaker Europe, #BESP170F)

### **PBS/EDTA/Liquemin**

1 x PBS

1 mM EDTA (GEBRU Biotechnik)

0,2% Liquemin N25000 (Roche)

### **PBS/ACD-A (ACID CITRATE DEXTROSE-ANTICOAGLUTINATION)**

1 x PBS (Bio\*Whittaker Europe, #BE17-512F)

10% ACD-A (Fresenius, Bad Homburg, Deutschland)

### **MACS-Puffer**

1 x PBS  
 0,5% HSA (OCTAPHARMA)  
 3 mM EDTA (GEBRU Biotechnik)

### **FACS-Puffer**

1 x PBS  
 0,5% HSA  
 1 mM EDTA  
 10 µg/ml Sandoglobin (Biotest Pharma GmbH, Dreieich, Deutschland)

### **FACS-Staining Puffer (Galectin-10 FACS-Färbung)**

1 x PBS  
 3% FCS  
 0,5% Tween-20

### **CFDASE (CFSE)**

5,6-CARBOXYFLUORESCEIN DIACETAT SUCCINIMIDYL ESTER(5-(6)-CFDASE; CFSE) wurde von Molecular Probes Europe BV, Niederlande bezogen. Und in einer Konzentration von 10mM gelöst. Die aliquotierte Stocklösung wurde bei -20°C aufbewahrt.

Der Vitalfarbstoff CFSE wurde für die Markierung von T-Zellen verwendet.

### **Ficoll (Biocoll Separating Solution)**

Biocoll Separating Solution Dichte: 1.077 (Biochrome, #L-6115)  
 LSM Separation Medium; Dichte: 1,077 (PAA, Pasching, Deutschland, # J15-004)

### **FCS (Fötales Kälberserum)**

FCS ChargeA01129-377 (PAA Laboratories #A15-649). Das Serum wurde zur Inaktivierung der Komplementkomponenten für 30min. bei 56°C im Wasserbad erhitzt und anschließend in 100ml Aliquots bei -20°C bis zum Gebrauch gelagert.

### **HSA (humanes Serum Albumin)**

OCTAPHARMA

### **Physiologische Trypanblaulösung**

Trypanblau ist ein sogenannter Vitalfarbstoff. Tote Zellen werden angefärbt, während lebende Zellen mit intakter Membran den Farbstoff nicht aufnehmen. Mit diesem Farbstoff wurde die Lebendzellzahl in Zellsuspension ermittelt.

Trypan blue solution (0,4%) (Sigma #T8154)

### **Szintillationsflüssigkeit**

Um die radioaktiven Emissionen der  $^3\text{H}$ -Tdr enthaltenen DNA in für den Beta-Szintillations-counter messbaren Lichtemissionen umzuwandeln, wurden die Glasfaserfilter mit der geernteten DNA in Plastikbeutel eingeschweißt, welche zuvor mit Szintillationsflüssigkeit befüllt wurden. Szintillationsflüssigkeit: Rotizint© eco (Roth, #9500.2)

### **Tritium-markierte Thymidin-Desoxyribose ( $^3\text{H}$ -Tdr)**

Für die Proliferationstests wurde  $^3\text{H}$ -Tdr mit einer Aktivität von  $1\mu\text{Ci/ml}$  eingesetzt. Die Aktivität der Stammlösung betrug  $35\mu\text{Ci/ml}$  (MP Biomedicals, Eschede, Deutschland)

### **Zytokine**

#### **rh IL-2** humanes rekombinantes Interleukin-2 (Proleukin)

#AI-96E0816 (Chiron-Behring, Marburg, Deutschland)

#### **rh IL-15** humanes rekombinantes Interleukin-15

Phosphat-buffered; aus CHO-Zellen, #5479-038 (Immunex Corp., WA-98101 Seattle, USA #5479-038)



## Serologische Reagenzien

### Neutralisierende Antikörper für die Zellkultur

#### **JES-19F1.1.1** (Maus anti-human-IL-10)

Der Klon JES-19F1.1.1 wurde von ATCC bezogen und die Blockierungskapazität in Proliferationsassays unter Verwendung von IL-10 Rezeptor transfizierten Baf3-Zellen bestimmt.

#### **TGF- $\beta$** (Maus-anti-human-TGF- $\beta$ )

monoklonal, Isotyp IgG<sub>1</sub>; Klon: 1D11 (R+D Systems, Hamburg, Deutschland)

### Antikörper für Durchflusszytometrie und Immunfluoreszenz

#### **CD3-FITC/PE** (Maus-anti-human-CD3-FITC)

monoklonal, Isotyp IgG<sub>1</sub>( $\kappa$ ); Klon: UCHT1 (Pharmigen #3105X)

#### **CD4-FITC/PE** (Maus-anti-human-CD4-FITC/PE)

monoklonal, Isotyp IgG<sub>1</sub>( $\kappa$ ); Klon: RPA-T4(Pharmigen #555347)

#### **CD8-PE** (Maus-anti-human CD8-PE)

monoklonal, Isotyp IgG<sub>1</sub>( $\kappa$ ); Klon: RPA-T8 (Pharmigen #30325X)

#### **CD25-FITC/PE/PE-Cy5** (Maus-anti-human CD25-FITC)

monoklonal, Isotyp IgG<sub>1</sub>( $\kappa$ ); Klon: M-A251 (Pharmigen #555431)

#### **CD45-RO-FITC** (Maus-anti-human CD45-RO-FITC)

monoklonal, Isotyp IgG<sub>2a</sub>( $\kappa$ ); Klon: UCHL1 (Pharmigen 555492)

#### **CD49d-FITC** (Maus-anti-human- $\alpha_4$ -Integrin-FITC)

monoklonal, Isotyp IgG<sub>1</sub>( $\kappa$ ); Klon: 9F10 (Pharmigen #556635)

**CD63-L-PE** (Maus-anti-human CD62-L-PE)

monoklonal, Isotyp IgG<sub>1</sub>(κ); Klon: DREG-56 (Pharmigen #32235X)

**CD29 (β<sub>1</sub>-Integrin)-FITC/PE** (Maus-anti-human- β<sub>1</sub>-Integrin-FITC)

monoklonal, Isotyp IgG<sub>1</sub>(κ); Klon: MAR4 (Pharmigen)

**β<sub>7</sub>-PE-Cy5** (Maus-anti-human- β<sub>7</sub>-Integrin-PE-Cy5)

monoklonal, Isotyp IgG<sub>1</sub>(κ); Klon: MAT4 (Pharmigen)

**FoxP3-PE** (Maus-anti-human FoxP3-PE)

monoklonal, Isotyp IgG<sub>1</sub>; Klon: 236A/E7 (eBioscience #72-5774)

**Galectin-10** (Maus-anti-human Galectin-10)

monoklonal, Isotyp IgG<sub>1</sub>; Klon: BF-42 (Diaclone)

Der Antikörper wurde mit Hilfe des FluoReporter Oregon Green 488 Labeling Kit (Pharmigen) Oregon-Green markiert.

**HLA-DR-FITC** (Ratte-anti-human HLA-DR-FITC)

monoklonal, Isotyp IgG<sub>2b</sub>; Klon: YD1/63.4.10 (Serotec #MCA72S)

**HLA-A2** (Maus-anti-human HLA-A2)

monoklonal, Isotyp IgG<sub>2b</sub>; Klon: BB7.2 (HB-82) (ATCC Rockville, MD, USA)

Der Antikörper wurde aus den Hybridom Kulturüberständen von Dr. E. Schmitt über Affinitätschromatographie aufgereinigt und mit Hilfe des FluoReporter Oregon Green 488 Labeling Kit (Molecular Probes/Invitrogen) Oregon-Green markiert.

**Anti-Maus-Oregon-Green**

Goat-anti-mouse IgG-Oregon Green (# 06380) (Invitrogen)

## **Antikörper für Western-Blot Analysen**

### **Galectin-10** (Kaninchen-anti-humanes rekombinantes Galectin-10)

Die IgG-Fraktion des Serums von immunisierten Kaninchen wurde im Rahmen der Kooperation mit dem Institut für Immunologie der Universität Mainz von Dr. C. Richter mit Hilfe von Dialyse aufgereinigt.

### **Anti-Kaninchen-IgG** (Meerrettichperoxidase-Konjugat)

Anti-Kaninchen-IgG-HRP (Sigma)

## **Antikörper für T-Zellstimulation**

### **CD3** (Maus-anti-human-CD3)

monoklonal, Isotyp IgG<sub>1</sub>(κ) Klon: OKT-3

### **CD28** (Maus-anti-human CD28)

monoklonal, Isotyp IgG<sub>1</sub>(κ) Klon: CD28.2 (Pharmigen #555725)

## **Antikörper für Zellseparation**

### **Anti-FITC-Multisort Kit** (Maus-anti-FITC Fluorochrom 1)

monoklonal, Isotyp IgG<sub>1</sub> (Miltenyi)

### **Anti-PE Microbeads** (Maus-anti-PE)

monoklonal, Isotyp IgG<sub>1</sub> (Miltenyi)

### **CD4-MicroBeads** (Maus-anti-human-CD4 Leu<sup>TM</sup>-3a)

monoklonal, Isotyp IgG<sub>1</sub> Klon: SK3 (Miltenyi)

### **CD4-Multisort Kit** (Maus-anti-human-CD4)

monoklonal, Isotyp: IgG<sub>1</sub>; Klon: MT-321 (Miltenyi)

### **CD25 Microbeads** (humanisierter AK-anti-human CD25)

monoklonal, Isotyp: IgG<sub>2a</sub> (Miltenyi)

**CD8-DynaBeads** (Maus-anti-human-CD8)

monoklonal, Isotyp IgG<sub>1</sub> (Dyna)

**CD14-DynaBeads** (Maus-anti-human-CD14)

monoklonal, Isotyp IgG<sub>2a</sub>, Klon: RMO-52 (Dyna)

**CD19-DynaBeads** (Maus-anti-human-CD19 panB)

(Dyna)

**CD25-DynaBeads** (Maus-anti-human-CD25)

monoklonal, Isotyp IgM, Klon: MEM-140 (Dyna)

## Methoden

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden an einer sterilen Werkbank und mit sterilen Reagenzien durchgeführt. Die Kultivierung von Zellen erfolgte in Inkubatoren bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt in gesättigter Wasserdampf-atmosphäre. Unter diesen Bedingungen bleibt der physiologische pH-Wert der CO<sub>2</sub>/Bicarbonat gepufferten Medien konstant.

### Methoden der Zellkultur

#### Ermittlung der Lebendzellzahl

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurden die Zellen mit einer physiologischen Trypanblau-Lösung verdünnt. Mittels einer Neubauer-Zählkammer wurde anschließend die Zahl lebender Zellen bestimmt. Nach Auszählung von mindestens einem Großquadrat (16 Einzelquadrate) errechnet sich diese nach folgender Formel:

$$\text{Zellen pro Großquadrat} \times V \times 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$$

V = Verdünnungsfaktor mit Trypanblau

$10^4$  = Kammerkonstante

### **Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen**

Die Konservierung der Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff bei  $-196^{\circ}\text{C}$ . Dafür wurden die Zellen abzentrifugiert, in Einfriermedium, bestehend aus 80% HSA und 20% DMSO, aufgenommen und in Aliquots von  $30\text{-}150 \times 10^6$  Zellen in Kryoröhrchen pipettiert. Anschließend wurden sie für 24h bei  $-70^{\circ}\text{C}$  eingefroren und danach in einem Tank mit flüssigem Stickstoff gelagert.

Zur Reaktivierung wurden die Zellen schnell bei  $37^{\circ}\text{C}$  aufgetaut, in ein 50ml Zentrifugenröhrchen überführt und mit kaltem Waschmedium (RPMI + 5% FCS) 10 min. bei  $200 \times g$  zentrifugiert. Das Zellsediment wurde anschließend in dem für die Zellen geeigneten Medium aufgenommen.

### **Bestrahlung von PBMC**

Um eine Proliferation, der für Stimulationszwecke eingesetzten PBMC zu unterbinden, wurden diese vor jedem Versuch mit 30 Gray bestrahlt. Hierfür wurden die Zellen in sterilen FACS-Röhrchen aufgenommen und mit dem Bestrahlungsgerät Gammacell 2000 bestrahlt. Anschließend konnten die Zellen für entsprechende Versuche verwendet werden.

### **Verwendete Zellen**

#### **Isolierung humaner PBMC (engl. PERIPHERAL BLOOD DERIVED MONONUCLEAR CELLS) aus "BUFFY COATS"**

Humanes Blut wurde als BUFFY COAT von der Transfusionszentrale Mainz bezogen. Die Herstellung der BUFFY COATS wurde von Mitarbeitern der Transfusionszentrale durchgeführt und beinhaltete folgende Arbeitsschritte: Die Frischblutspenden wurden mit Antikoagulans (1ml Citrat-Phosphat-Dextrose-Puffer pro 5ml Blut) versetzt und bei  $200 \times g$  zentrifugiert. Dies führte zur Aufteilung der zellulären Blutbestandteile in Erythrozyten/Ganulozyten, BUFFY-COAT (Leukozyten/Thrombozyten) und Plasma. Die Fraktionen wurden getrennt und zu den entsprechenden Blutprodukten weiterverarbeitet.

Aus den Zellen des BUFFY-COAT wurden anschließend mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC), mit Hilfe von Dichtegradientenzentrifugation gewonnen. Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass bei gleichbleibender Zentrifugalkraft und konstanter Viskosität des Gradientenmediums die Sedimentationsrate von Partikeln dem Verhältnis ihrer Dichte des umgebenden Mediums direkt proportional ist. Ficoll ist eine isotonische Lösung mit einer mittleren Dichte von  $1,077 \pm 0,001 \text{ g/ml}$  (bei  $20^\circ\text{C}$ ). Sowohl Dichte als auch Osmolarität dieser Lösung sind zur Isolierung von Leukozyten optimiert. Je 15ml Ficoll ( $20^\circ\text{C}$ ) wurden mit 20ml Blut (BUFFY-COAT-Zellen) überschichtet und bei Raumtemperatur für 30min. ohne Bremse zentrifugiert ( $200 \times g$ ). Anschließend waren 4 Phasen in den Zentrifugenröhrchen zu erkennen: 1. oberste Phase (Plasma = gelb), 2. Phase/Interphase (Leukozyten = weiß), 3. Phase (Ficoll = klar), 4. unterste Phase (Erythrozyten + Granulozyten = rot). Die 2. Phase (Interphase mit Leukozyten) wurde nun vollständig, jedoch möglichst ohne Ficoll-Lösung (3.Phase), in ein zweites 50ml Zentrifugenröhrchen überführt, in das zuvor 10-15ml  $1 \times \text{PBS} + 1\text{mM EDTA}$  vorgelegt wurde. Um die Zellen von Plasma-, Ficollresten und Thrombozyten zu reinigen, wurden diese 3-4-mal durch Auffüllen des Röhrchens mit  $1 \times \text{PBS} + 1\text{mM EDTA}$  und anschließendem Zentrifugieren ( $200 \times g$ , 7min.,  $4^\circ\text{C}$ ) gewaschen.

### **Aufarbeitung von Leukaphereseprodukten**

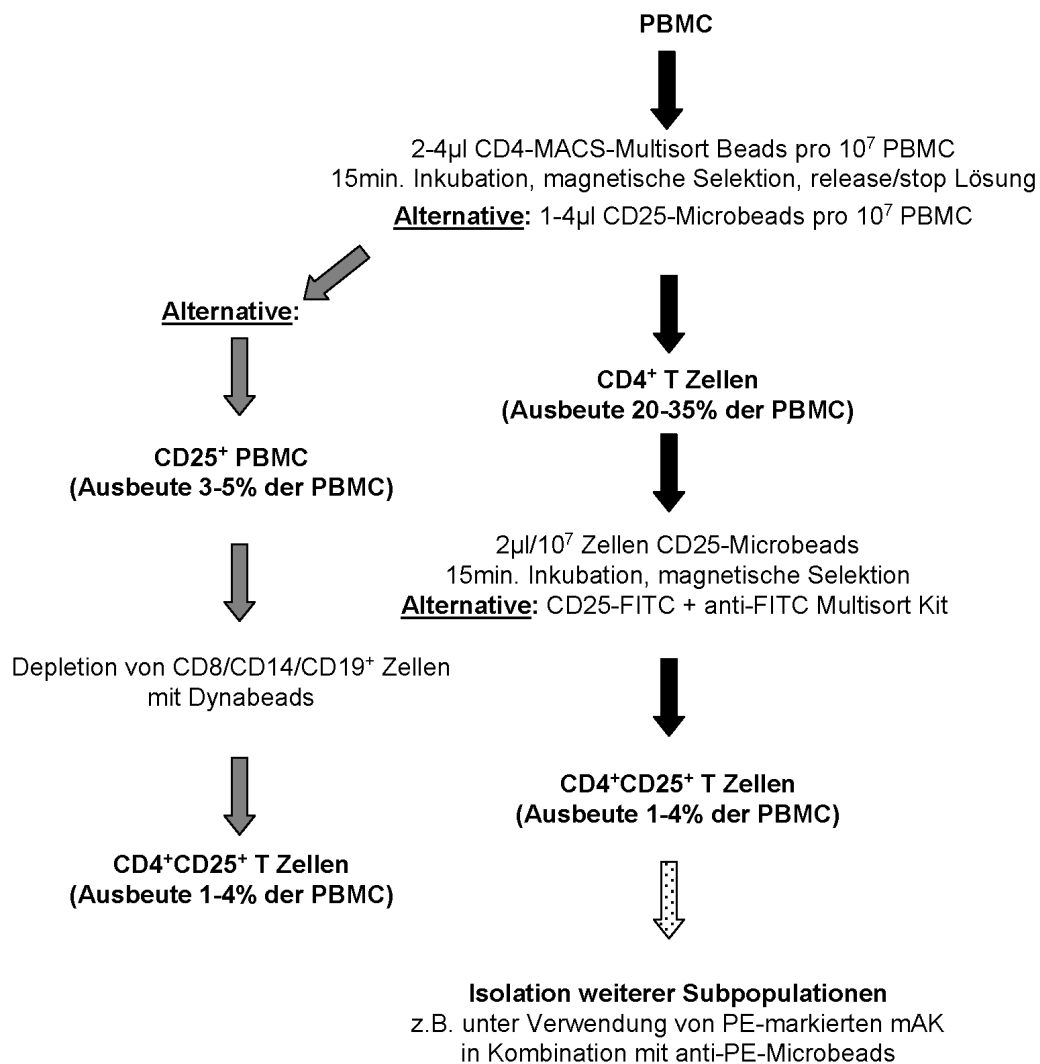
Mit Hilfe von Leukapheresen war es möglich große Mengen an PBMC ( $>6 \times 10^9$ ) aus einem Spender zu gewinnen. Hierbei wurden die mononukleären Zellen des peripheren Blutes in einem sterilen geschlossenen System direkt von den restlichen Blutbestandteilen getrennt und gesondert aufgefangen. Die übrigen Bestandteile wurden dem Spender durch einen zweiten intravenösen Zugang zurückgeführt.

Das Leukaphereseprodukt wurde in eine sterile 500ml Kulturflasche überführt und mit  $\text{PBS/ACD-A}$  auf 480ml aufgefüllt. Anschließend wurden 24 Zentrifugenröhrchen (50ml) mit 20ml Ficoll befüllt und die Ficoll-Lösung mit je 20ml des verdünnten Leukaphereseprodukts überschichtet. Nachdem die Zellen für 30min. bei  $24^\circ\text{C}$  und  $340 \times g$  ohne Bremse zentrifugiert wurden, konnte die PBMC enthaltende Leukozytenphase in 50ml Zentrifugenröhrchen, welche mit 15ml  $\text{PBS/EDTA}$  befüllt waren, überführt werden. Um die Zellen von Ficoll- und

Plasmaresten zu reinigen wurden diese 3-4 Mal durch Auffüllen der Röhrchen mit PBS/EDTA und anschließendem Zentrifugieren (200 x g, 7min., 4°C) gewaschen.

### Aufreinigung von T-Zellpopulationen *ex vivo*

Die Isolation verschiedener T-Zellsubpopulationen wurde je nach Protokoll aus einer Kombination von Microbeads (Miltenyi) und Dynabeads (Dyna/Invitrogen) durchgeführt. Hierbei wurden die Populationen wie in der Übersichtsgrafik 2.1 und im Anhang 1<sup>80</sup> und 2<sup>81</sup> dargestellt isoliert.



**Abbildung 2.1: Übersichtsschema zur Isolation humaner CD25<sup>+</sup> Treg-Populationen**

Dargestellt sind Isolationsstrategien zur Anreicherung humaner CD25<sup>+</sup> Treg-Populationen unter Verwendung von fluoreszenz-markierten mAK, Microbeads und Dynabeads.

### **Proliferationstests und Suppressionsassays**

Die funktionelle Testung der isolierten T-Zellpopulationen wurde wie in Anhang 1<sup>80</sup> und 2<sup>81</sup> beschrieben durchgeführt.

### **Durchflusszytometrische Untersuchungen und Immunfluoreszenz**

Zur Bestimmung der relativen Oberflächenexpression verschiedener Membranmoleküle auf einzelnen Zelltypen, erfolgte eine fluoreszenzserologische Untersuchung der Zellen im FACS ("FLUORESCENCE ACTIVATED CELL SORTER")<sup>82</sup>. Als Primärantikörper fanden die unter serologische Reagenzien beschriebenen Antikörper Verwendung.

In einem FACS werden die Fluoreszenzfarbstoffe mit einem Laserstrahl (488nm) angeregt und das abgestrahlte Licht der Fluorochrome gemessen (FITC bei 530nm, PE bei 585nm). Der FACS ermittelt den relativen Anteil gefärbter Zellen in der Zellsuspension und als Maß für die relative Zelldichte von Oberflächenmolekülen die Fluoreszenzintensität der Zellen. Die Färbung von Oberflächenmolekülen, intrazellulären Galectin-10 oder nuklearen FoxP3 für durchflusszytometrische oder Immunfluoreszenz-Analysen wurde mit den in Anhang 1<sup>80</sup> und 2<sup>81</sup> beschriebenen Methoden durchgeführt.

### **Markierung von Antikörpern mit dem Fluoreszenzfarbstoff Oregon-Green**

Oregon Green ist ein FITC-Derivat mit stabileren Emissionseigenschaften, dessen Absorptions- und Emissionsmaximum bei 496nm und 524nm liegt. Antikörper wurden mit Hilfe des FluoReporter Oregon Green 488 Protein Labeling Kits (Molecular probes-Invitrogen) nach den Angaben des Herstellers markiert.

### **CFSE-(5,6-Carboxyfluorescein diacetat succinimidyl ester) Markierung CD4<sup>+</sup> T-Zellen**

Zur Darstellung der Proliferation von Zellen im FACS wurden CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit dem Vitalfarbstoff CFSE markiert. Hierzu wurden die Zellen in ein 15ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei Raumtemperatur mit 200 x g für 8min. zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 1ml einer 1µM CFSE/PBS-Lösung aufgenommen und für 30min. bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Zentrifugenröhrchen mit warmen X-VIVO 15 aufgefüllt und die Zellen für 8min. mit 200 x g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die Zellen wurden daraufhin in 1ml



warmen X-VIVO 15 aufgenommen und konnten nach weiteren 30min. bei 37°C für die entsprechenden Versuche eingesetzt werden.

### **ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)**

Zum quantitativen Nachweis von Zytokinen in Kulturüberständen von T-Zell-Stimulationen wurde die ELISA-Methode wie in Anhang 1<sup>80</sup> und 2<sup>81</sup> beschrieben angewendet.

### **Cytometric Bead Array™**

Zur Bestimmung der Zytokinprofile von unbehandelten und siRNA transfizierten Zellen in Einzel- und Kokultur, wurden die Kulturüberstände mit Hilfe des Cytometric Bead Array (BD Pharmingen) nach Vorgabe des Herstellerprotokolls analysiert.

### **Differentielle Proteomanalysen und Proteinidentifizierung mittels MALDI-TOF**

Differentielle Proteomanalysen wurden, wie in Anhang 2<sup>81</sup> beschrieben in Kooperation mit der hierauf spezialisierten Firma Protagen-AG (Dortmund, Deutschland) durchgeführt.

### **Immunoblot**

Für die Validierung der Galectin-10-Expression mit Hilfe von Western-Blot Analysen wurden die in Anhang 2<sup>81</sup> beschriebenen Methoden zur Proteinextraktion, SDS Polyacrylamidgelelektrophorese und für den Western-Transfer verwendet.

### **Molekularbiologische Methoden**

#### **Polymerase Kettenreaktion (PCR)**

Für die Validierung der mRNA Expression verschiedener Gene mittels quantitativer RT-PCR wurden die in Anhang 1<sup>80</sup> und 2<sup>81</sup> beschriebenen Reagenzien, Kits und Methoden verwendet.

### **Herstellung eines eukaryotischen Galectin-10-Expressionskonstruktes**

Ein für Galectin-10 kodierender pc-DNA Vektor wurde in Kooperation mit dem Institut für Immunologie der Universität Mainz (Dr. C. Richter) hergestellt und wie in Anhang 2<sup>81</sup> beschrieben eingesetzt

### **siRNA und Transfektion von T-Zellen**

Die Transfektion von humanen T-Zellen mit siRNA oder pc-DNA-Vektoren wurde mit Hilfe der in Anhang 2<sup>81</sup> beschriebenen Reagenzien und Methoden durchgeführt.

### **Caspase-3/-7-Assay**

Zur Bestimmung der Apoptose-Induktion wurden, wie in Anhang 2<sup>81</sup> beschrieben, Caspase 3/7 Assays durchgeführt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Allgemeine Eigenschaften humaner CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorischer T-Zellen

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs) haben die Eigenschaft, die Aktivierung von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen aktiv zu unterdrücken<sup>44;45;83</sup>. Daher spielen sie eine entscheidende Rolle in der peripheren Toleranzinduktion und der Aufrechterhaltung der immunologischen Homöostase. Die funktionelle Charakterisierung dieser spezifischen T-Zellpopulation ist allerdings bei weitem noch nicht abgeschlossen. Bis heute sind die Proteine, welche an der Zellkontakt-vermittelten Suppression durch CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tregs beteiligt sind, nicht hinreichend charakterisiert.

Funktionelle Analysen von humanen Treg-Populationen und die Identifizierung von Proteinen, die an dem funktionellen Mechanismus der Suppression durch CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tregs beteiligt sind, waren die zentralen Zielsetzungen dieser Arbeit.

Sowohl die gesamte Population CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs, distinkte Treg-Subpopulationen als auch CD4<sup>+</sup> T-Zellen, wurden mittels "MAGNETIC ACTIVATED CELL SORTING" (MACS)<sup>vii</sup> isoliert. Obwohl bei der Gewinnung der verschiedenen Populationen unterschiedliche Strategien und Protokolle verwendet werden mussten (siehe Material und Methoden), war in jedem Fall die Verwendung von limitierenden Mengen an MICROBEADS essentiell für die Reinheit und Qualität der Zellen<sup>80;81;84</sup>.

Der Anteil CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs in gesunden Spendern beträgt ca. 3-5% der peripheren CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Abb. 3.1). Da jedoch auch CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen (CD4<sup>+</sup> Th) diesen Oberflächenrezeptor nach Aktivierung exprimieren, kann CD25 nur in gesunden, infektionsfreien Individuen als Isolationsmarker eingesetzt werden.

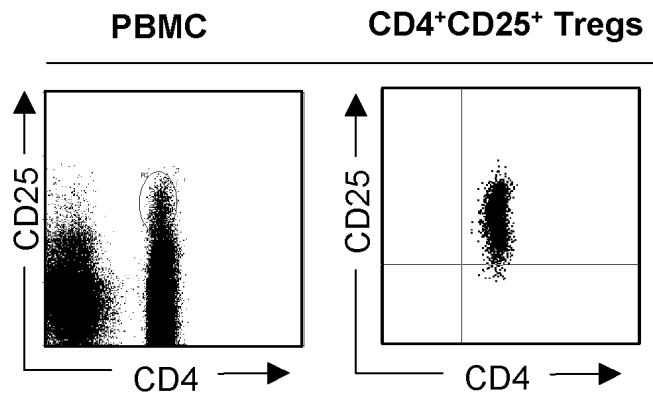
Die anschließende Analyse weiterer Treg-assoziiierter Marker mittels Durchflusszytometrie (Abb. 3.2) und die funktionelle Testung der isolierten Populationen sind aus dem gleichen Grund, zur eindeutigen Identifizierung von regulatorischen T-Zellen, obligat.

Bis heute sind keine exklusiven Oberflächenmarker für CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs bekannt. Da fast ausnahmslos alle CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg-assoziierten Marker ebenfalls von

---

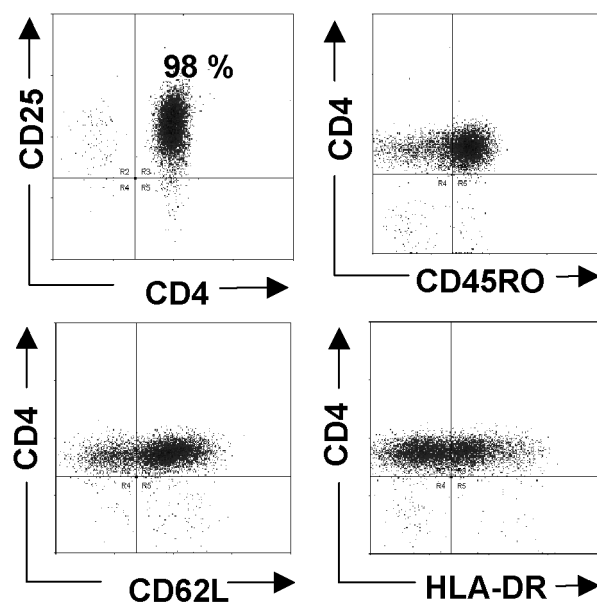
<sup>vii</sup> **MACS** (MAGNETIC ACTIVATED CELL SORTING) basiert auf der Verwendung magnetischer Beads, die gekoppelt an Antikörper zur Isolation von spezifischen Zellpopulationen eingesetzt werden.

aktivierten  $CD4^+$  Th exprimiert werden, kann eine Identifizierung und Charakterisierung dieser Population ausschließlich über deren funktionellen Eigenschaften vorgenommen werden.



**Abbildung 3.1: Durchflusszytometrische Analyse von  $CD4^+CD25^+$  Tregs vor und nach Isolation aus humanen PBMC**

$CD4^+CD25^-$  T-Helferzellen ( $CD4^+$  Th) und  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$  regulatorische T-Zellen ( $CD4^+CD25^+$  Tregs) wurden aus BUFFY COATS bzw. Leukapherisaten isoliert (bis zu  $1,5 \times 10^{10}$  PBMC Ausgangsmaterial<sup>84</sup>). PBMC (links) und frisch isolierte  $CD4^+CD25^+$  Tregs (rechts) wurden mit Hilfe von Fluoreszenz-markierten Antikörpern gegen CD4 und CD25 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

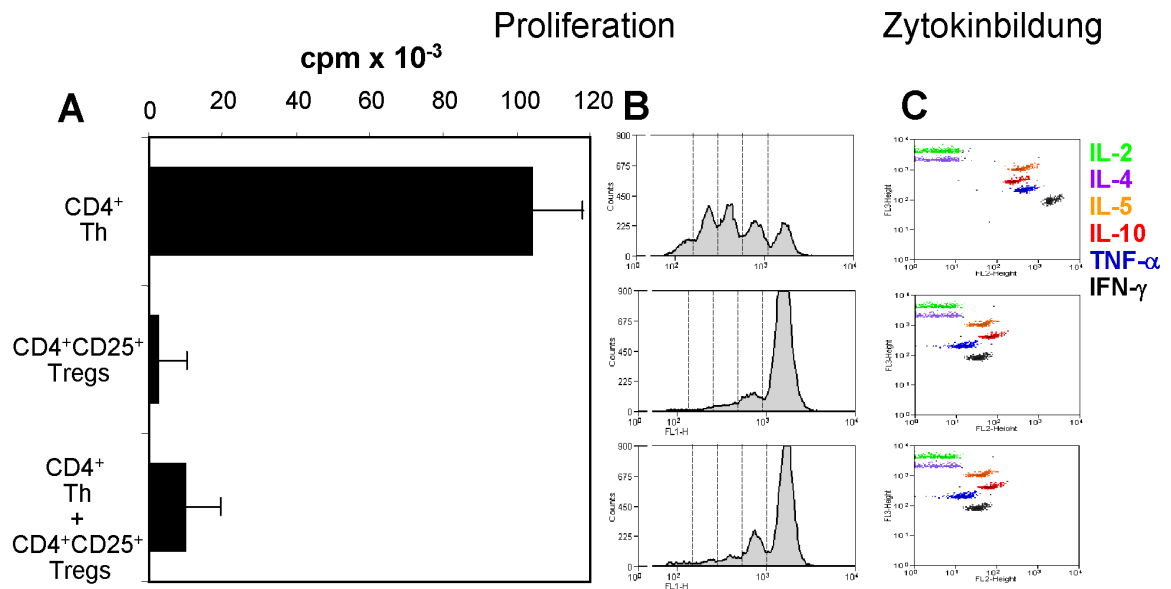


**Abbildung 3.2: Durchflusszytometrische Analyse von  $CD4^+CD25^+$  Treg-assoziierten Markern auf frisch isolierten  $CD4^+CD25^+$  Tregs**

Um die Expression von  $CD4^+CD25^+$  Tregs assoziierten Markern zu überprüfen, wurden frisch isolierte  $CD4^+CD25^+$  Tregs unter Verwendung von Fluoreszenz-markierten Antikörpern durchflusszytometrisch untersucht. Die Abbildung zeigt eine Dot-Blot-Analyse von viablen Zellen. Die toten Zellen (Propidium-Jodid-positiv) wurden zuvor mit Hilfe der Software ausgeschlossen.

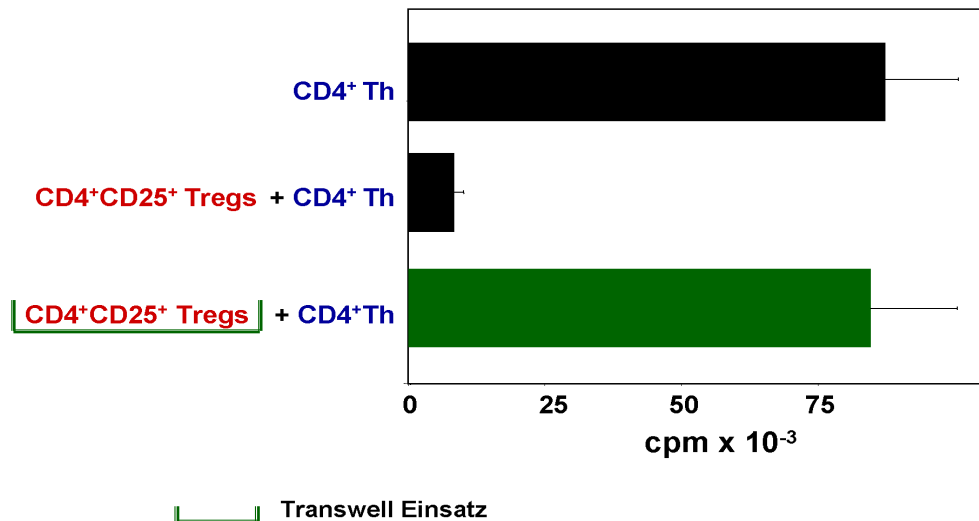
Wie in Abbildung 3.3 exemplarisch gezeigt, proliferieren  $CD4^+CD25^+$  Tregs im Gegensatz zu  $CD4^+$  Th nicht nach Aktivierung über ihren T-Zellrezeptor, d.h. sie besitzen einen anergen Phänotyp. In Kokultur mit  $CD4^+$  Th sind aktivierte  $CD4^+CD25^+$  Tregs allerdings in der Lage, die Proliferation der kokultivierten T-Helferzellen zu supprimieren, nachweisbar durch reduzierte  $^3H$ -Thymidinaufnahme bzw. verringerte Ausdünnung des Farbstoffs CFSE. Ein wesentlicher Mechanismus, der die suppressiven Eigenschaften von  $CD4^+CD25^+$  Tregs zumindest teilweise erklären kann, ist die Inhibition der Interleukin (IL)-2-Produktion in den Zielzellen. Dieser Prozess ist strikt Zellkontakt-abhängig (Abb. 3.4), wobei die funktionelle Aktivierung der  $CD4^+CD25^+$  Tregs Antigen-spezifisch, die suppressiven Eigenschaften jedoch Antigen-unspezifisch vermittelt werden. Die beteiligten Oberflächenmoleküle sind bis heute weitgehend unbekannt.

## Suppressive Funktion



**Abbildung 3.3: CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs inhibieren CD4<sup>+</sup> Th in ihrer Proliferation und Zytokinseznierung**

Zur funktionelle Analyse der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs wurden jeweils 1 x 10<sup>5</sup> frisch isolierte humane CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs und CD4<sup>+</sup> Th, allein oder in Kokultur mit 3 x 10<sup>5</sup> bestrahlten (50Gy) PBMC, in Anwesenheit von 0,5  $\mu$ g/ml anti-CD3 monoklonalen Antikörper inkubiert. **A**: Drei bis vier Tage nach Aktivierung wurde <sup>3</sup>H-Thymidin (37kBq pro Well) den Kulturen zugesetzt und nach weiteren 16 Stunden die Proliferation mit einem  $\beta$ -Szintillationszähler bestimmt. Abbildung 3.3**B** zeigt die Proliferation der CFSE-markierten CD4<sup>+</sup> Th in Einzel- und Kokultur sowie die der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs in Einzelkultur an Tag 4 nach Aktivierung. **C**: Die relative Zytokinfreisetzung in den Kulturen wurde an Tag 4 nach Aktivierung mit Hilfe des "CYTOMETRIC BEAD ARRAY" bestimmt. Hierfür wurden die Zytokinkonzentrationen von IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  im Kulturüberstand analysiert.



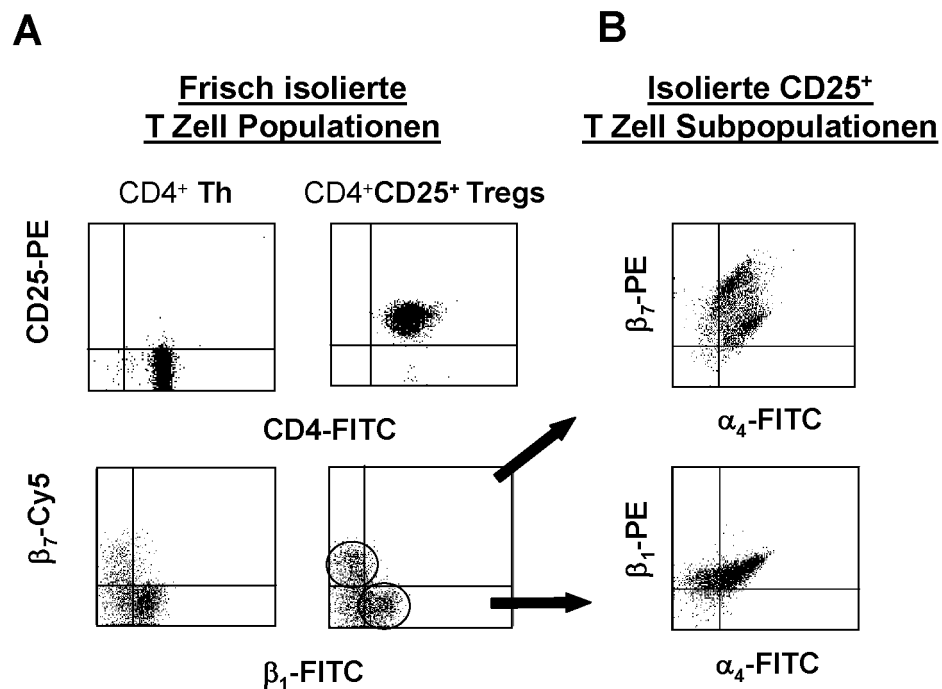
**Abbildung 3.4: CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs inhibieren Zellkontakt-abhängig die Proliferation von CD4<sup>+</sup> Th**

Um die Zellkontakt-abhängige Suppression der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs zu untersuchen, wurden die T-Zellpopulationen entweder wie in Abb. 3.3 beschrieben isoliert und stimuliert bzw. in Anwesenheit von 1 µg/ml anti-CD3 und 2 µg/ml anti-CD28 monoklonalen Antikörpern stimuliert. Zusätzlich wurden die beiden Populationen in den Kokulturen durch semipermeable Transwell-Einsätze voneinander getrennt, um einen direkten Zellkontakt zu verhindern.

### 3.2 Isolation von zwei CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg-Subpopulationen

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs sind wesentlich an der Toleranzinduktion in der Peripherie beteiligt. Da dieser Prozess der lokal notwendigen Immunreaktion angepasst werden muss, wurde von uns postuliert, dass möglicherweise gewebsspezifische Treg-Subpopulationen hierfür verantwortlich sein könnten. Arbeiten von BERLIN ET AL.<sup>85,86</sup> verwiesen bereits Mitte der 90<sup>er</sup> Jahre auf die essentielle Bedeutung von  $\alpha_4$ -Integrinen, welche mit unterschiedlichen  $\beta$ -Ketten assoziiert für die gewebsspezifische Migration von Lymphozyten essentiell sind. Expressionsanalysen humaner T-Zellpopulationen zeigten, dass sowohl CD4<sup>+</sup> Th als auch CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs jeweils zwei Subpopulationen enthalten, die entweder das Oberflächenintegrin  $\alpha_4\beta_1$  oder  $\alpha_4\beta_7$  exprimieren (Abb. 3.5A). Der relative Anteil der einzelnen Subpopulationen erwies sich als spenderspezifisch. Durchschnittlich exprimierten 15-30% der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs  $\alpha_4\beta_7$ , während die komplementäre Subpopulation  $\alpha_4\beta_1$ -positiv war. Vergleichbare Subpopulationen ließen sich auch bei CD4<sup>+</sup> Th nachweisen (Abb. 3.5A). Aufgrund der definierten Funktion dieser Integrine konnte angenommen werden, dass  $\alpha_4\beta_7^+$  CD25<sup>+</sup> Tregs *in vivo* in Mukosa-

assoziierte Gewebe (Lunge und Darm) wandern sollten, während  $\alpha_4\beta_1^+$   $CD25^+$  Tregs vorwiegend in Lymphknoten und Milz migrieren sollten<sup>85;86</sup>. Um die phänotypisch distinkten Treg-Subpopulationen auch funktionell charakterisieren zu können, mussten die Subpopulationen zunächst getrennt isoliert werden.



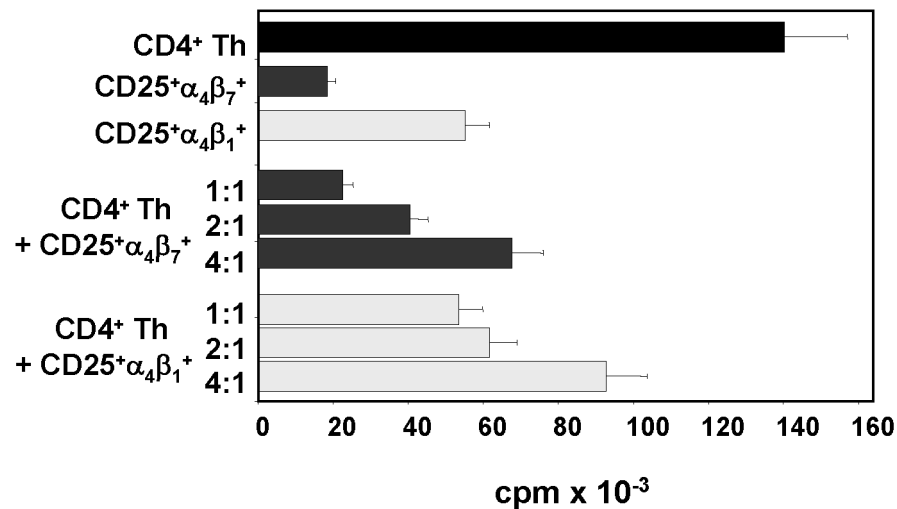
**Abbildung 3.5: Durchflusszytometrische Analyse der Integrinexpression auf humanen  $CD4^+$  T-Zellen**

Frisch isolierte T Zellpopulationen wurden mit Hilfe von Fluoreszenz-markierten Antikörpern für die angegebenen Marker gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.  $CD4^+$  Th und  $CD4^+CD25^+$  Treg-Subpopulationen wurden wie in Kapitel 2 und Anhang 1<sup>80</sup> mit Hilfe von immunomagnetischen MICROBEADS isoliert. **A:** Frisch isolierte  $CD4^+$  Th und  $CD4^+CD25^+$  Tregs. **B:**  $CD4^+CD25^+$  Treg-Subpopulationen, isoliert mit Hilfe von anti- $\beta_7$ -PE-markierten Antikörpern in Kombination mit anti-PE-MIKROBEADS.

Zur getrennten Anreicherung ( $\beta_7^-$  versus  $\beta_7^+$  Zellen) der Treg-Subpopulationen wurden die  $\beta_7^+$  Tregs mit Hilfe von Integrin-spezifischen, PE-markierten monoklonalen Antikörpern (mAk) und anti-PE-spezifischen MICROBEADS aus der Gesamtpopulation sortiert. Wie Abbildung 3.5B zeigt, war es möglich, beide Subpopulationen zu trennen und  $\alpha_4\beta_7^+$  Tregs bzw.  $\alpha_4\beta_1^+$  Tregs hochrein zu isolieren. Anschließend erfolgte die funktionelle Analyse der Subpopulationen in den entsprechenden Experimenten. Es zeigte sich, dass  $\alpha_4\beta_7^+$  Tregs und  $\alpha_4\beta_1^+$  Tregs *in vitro* eine vergleichbare inhibitorische, Zellkontakt-abhängige Aktivität



aufwiesen (Abb. 3.6). Populationsabhängige Unterschiede konnten nicht beobachtet werden.



**Abbildung 3.6: Suppressive Aktivität von aktivierten humanen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg-Subpopulationen**

CD4<sup>+</sup> Th und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg-Subpopulationen wurden wie in Kapitel 2 und Anhang 1<sup>80</sup> beschrieben mit Marker-spezifischen mAk in Kombination mit immunomagnetischen MICROBEADS isoliert. CD4<sup>+</sup> Th wurden alleine bzw. in Kokultur (Verhältnis 1:1 bis 4:1) mit CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg-Subpopulationen, in Anwesenheit von 1 µg/ml anti-CD3 und 2 µg/ml anti-CD28 mAk aktiviert. Die Proliferation wurde an Tag 4, 16 Stunden nach Zugabe von 37 kBq/well <sup>3</sup>H-Thymidin, mit einem β-Szintillationszähler bestimmt.

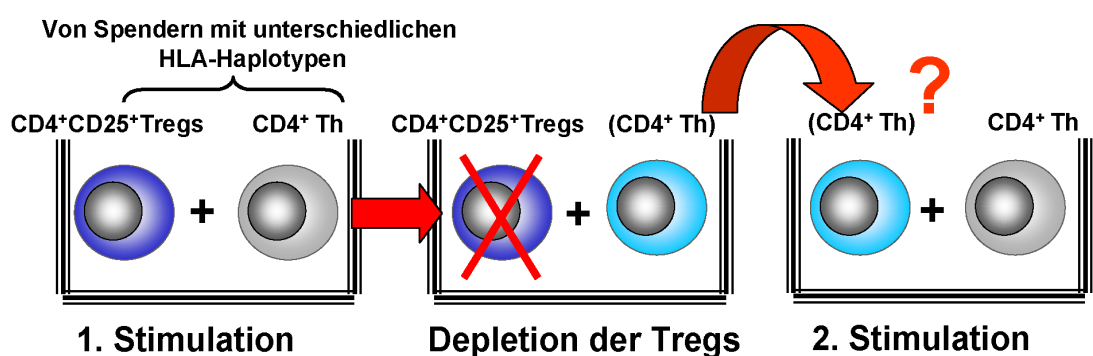
Zu diesem Zeitpunkt der Arbeit entstand in der Literatur eine kontroverse Diskussion zum funktionellen Mechanismus von Tregs. Einerseits konnte, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit, von diversen Forschergruppen gezeigt werden, dass die Suppression von Th durch Tregs *in vitro* strikt Zellkontakt-abhängig ist<sup>48;50;83</sup>. Andererseits zeigten funktionelle Analysen zur Aktivität von Tregs in der Maus, dass die löslichen Zytokine TGF-β und IL-10 - zumindest *in vivo* - für die Funktionalität der Tregs essentiell sind<sup>87</sup>. Aufgrund dieser Kontroverse postulierten wir, dass möglicherweise das Phänomen der "Infektiösen Toleranz", beschrieben durch die Arbeitsgruppe von H. WALDMAN<sup>51</sup>, die scheinbar widersprüchlichen Ergebnisse erklären könnte.

Der Mechanismus der "Infektiösen Toleranz" beschreibt die Tatsache, dass CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs nicht nur die Proliferation und Zytokinbildung von kokultivierten CD4<sup>+</sup> Th supprimieren, sondern dass im Verlauf der Suppression auch CD4<sup>+</sup> Th zu sekundären T-Helfersuppressorzellen konvertiert werden können. Diese

induzierten regulatorischen T-Zellen (iTregs) vermitteln ihre suppressiven Eigenschaften in einem Zellkontakt-unabhängigen Prozess, durch die Freisetzung von TGF- $\beta$  und IL-10.

### 3.2.1 $\alpha_4\beta_7^+$ und $\alpha_4\beta_1^+$ humane regulatorische T-Zellen induzieren unterschiedliche Subpopulationen von sekundären iTregs

Arbeiten, die sich zu diesem Zeitpunkt mit der Charakterisierung von  $CD4^+CD25^+$  Tregs induzierten iTregs im humanen System beschäftigten, führten in Bezug auf die Beteiligung von IL-10 und TGF- $\beta$  an einer Zellkontakt-unabhängigen Suppression zu kontroversen Ergebnissen. Während JONULEIT ET AL.<sup>32</sup> einen partiell über TGF- $\beta$ -vermittelten Mechanismus zeigten, schrieben DIEKMANN ET AL.<sup>52</sup> IL-10 eine essentielle Rolle für die Suppressoraktivität von iTregs zu. Dies führte uns zu der These, dass eventuell die distinkten Subpopulationen  $\alpha_4\beta_7^+$  und  $\alpha_4\beta_1^+$  Tregs diese Kontroverse erklären könnten. Aus diesem Grund wurden die funktionellen Eigenschaften von iTregs, die entweder in Abhängigkeit von  $\alpha_4\beta_7^+$  Tregs oder  $\alpha_4\beta_1^+$  Tregs *in vitro* induziert wurden, untersucht. Um eine Trennung der Tregs von den Th in diesen Kokulturen zu ermöglichen, in Unkenntnis eines zellspezifischen Oberflächenmarkers, wurden die Th aus HLA-A2<sup>+</sup> Blutspendern und die Tregs aus HLA-A2<sup>-</sup> Blutspendern isoliert (Abb. 3.7).

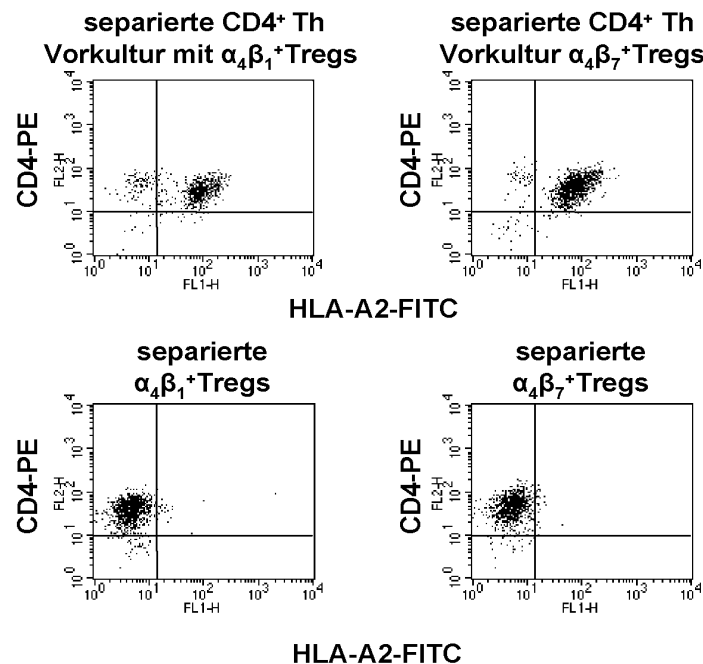


modifiziert nach H. Jonuleit

**Abbildung 3.7: Versuchsmodell der „infektiösen Toleranz“**

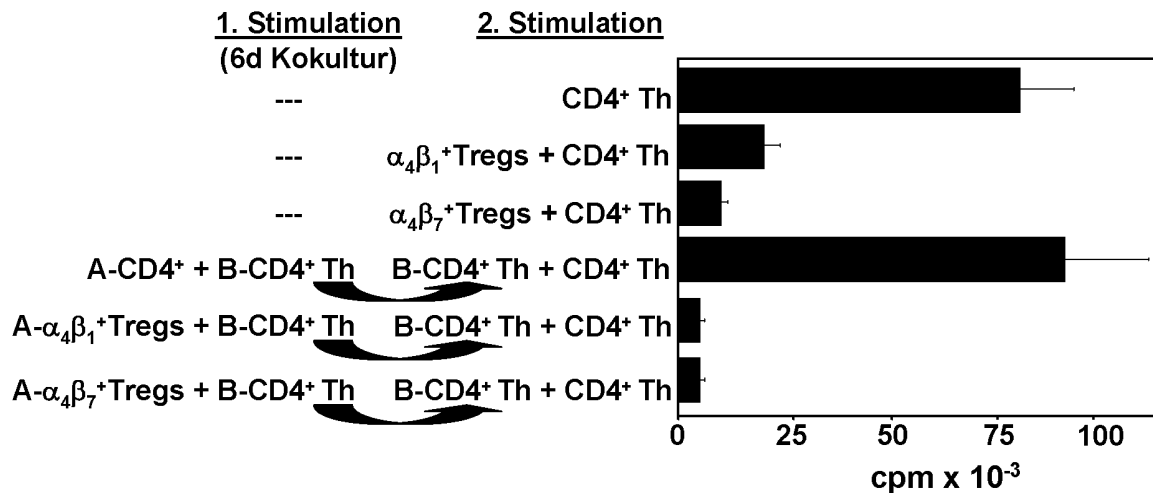
Gezeigt ist das Kulturmodell zur Induktion sekundärer T-Helfersuppressorzellen (iTregs), welches eine Untersuchung der These zur „infektiösen Toleranz“ *in vitro* zulässt.

Nach sechs Tagen Kokultur wurden die iTregs von  $\alpha_4\beta_7^+$  bzw.  $\alpha_4\beta_1^+$  Tregs mit Hilfe eines HLA-A2-spezifischen mAk und entsprechenden MICROBEADS getrennt (Abb. 3.8) und erneut in Suppressionsassays mit frisch isolierten  $CD4^+$  Th eines dritten Spenders funktionell getestet.



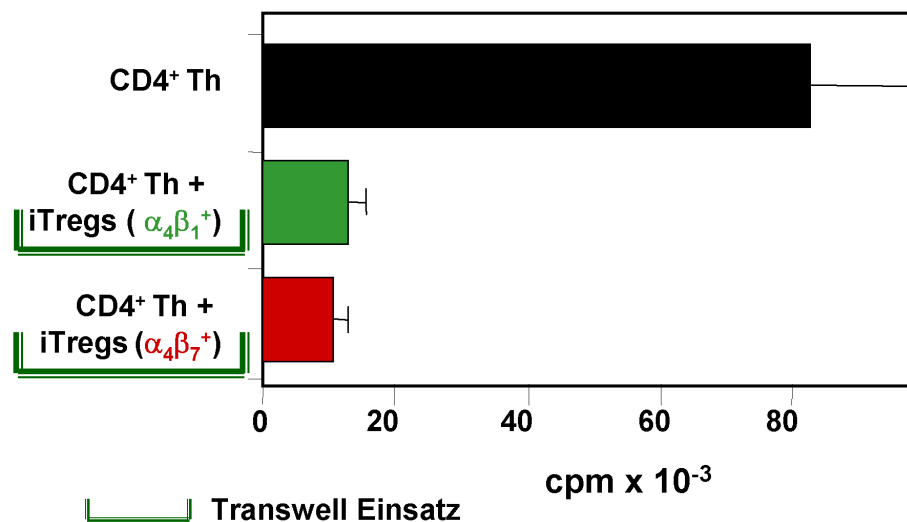
**Abbildung 3.8: Rückgewinnung der  $CD4^+CD25^+$  Treg-Subpopulationen und Th nach Kokultur**  
Kokultivierte HLA-A2 $^-CD4^+CD25^+$  Treg-Subpopulationen (Donor A) und HLA-A2 $^+CD4^+$  Th (Donor B) wurden in einem Verhältnis von 1:1 in Anwesenheit von 1  $\mu\text{g/ml}$  anti-CD3 und 2  $\mu\text{g/ml}$  anti-CD28 mAk stimuliert. HLA-A2 $^-CD4^+$  Th dienten zusätzlich als Kontrolle. Nach 6 Tagen Kokultur wurden die T-Zellpopulationen mit Hilfe eines HLA-A2-spezifischen mAk (BB7.2-biotiniliert) in Kombination mit Streptavidin-gekoppelten MICROBEADS zurückgewonnen und separiert.

Wie in Abbildung 3.9 dargestellt, sind beide Subpopulationen von iTregs in der Lage, die Proliferation der kokultivierten  $CD4^+$  Th des dritten Spenders zu supprimieren. Im Gegensatz zur Suppressoraktivität der  $CD4^+CD25^+$  Tregs ließ sich allerdings die Proliferations-inhibierende Wirkung der iTregs nicht durch den Einsatz von Transwell-Kammern aufheben (Abb. 3.10). Das heißt, dass auch nach physikalischer Trennung von iTregs und  $CD4^+$  Th die Zellteilung der Th fast vollständig supprimiert wurde. Dieses Ergebnis führte zu der Schlussfolgerung, dass der Suppressormechanismus von iTregs Zellkontakt-unabhängig sein muss. Aus diesem Grund erfolgte die Analyse der potentiell inhibitorischen Zytokine TGF- $\beta$  und IL-10 in den Kulturüberständen aktivierter iTregs.



**Abbildung 3.9:  $\alpha_4\beta_1^+$  und  $\alpha_4\beta_7^+$  Tregs übertragen suppressive Eigenschaften auf CD4<sup>+</sup> Th**

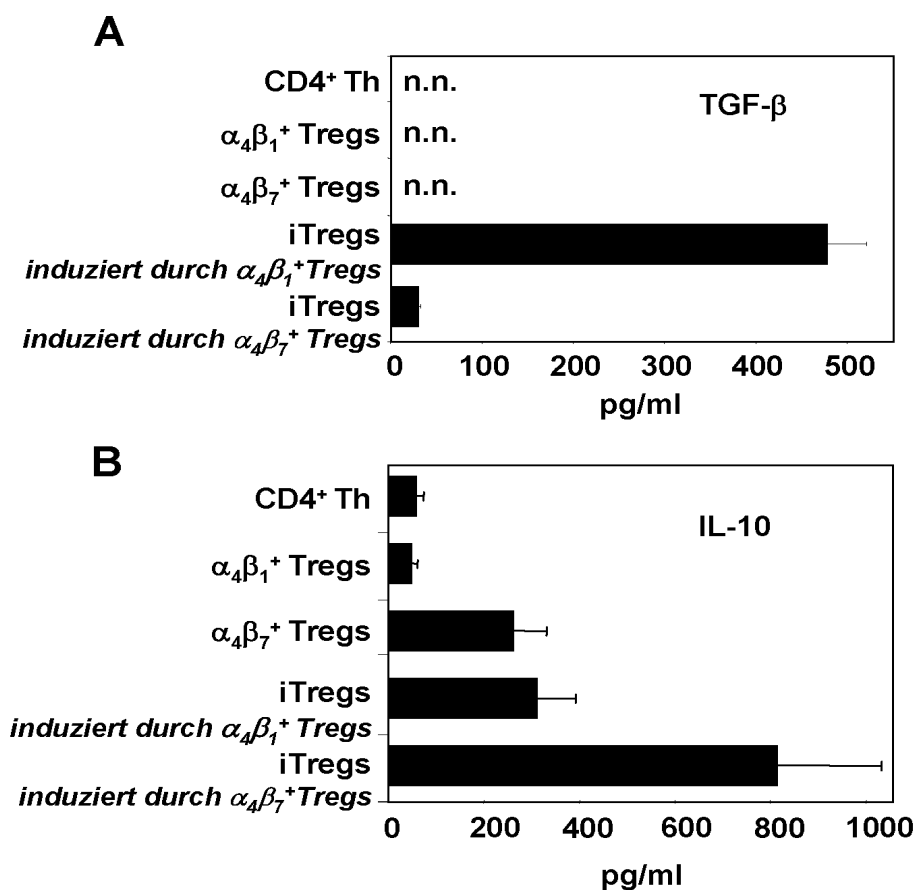
Die in Abbildung 3.8 beschriebenen T-Zellpopulationen wurden nach ihrer Isolation funktionellen Tests zugeführt. Die Analyse der suppressiven Eigenschaften der iTregs erfolgte in Kokulturen mit frisch isolierten CD4<sup>+</sup> Th eines dritten Spenders. Hierzu wurden die Populationen mit 1 µg/ml anti-CD3 und 2 µg/ml anti-CD28 mAk stimuliert. Als zusätzliche Kontrolle der Suppressoraktivität dienten frisch isolierte CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg-Subpopulationen. Die Proliferation der CD4<sup>+</sup> Th wurde an Tag 4, 16 Stunden nach Zugabe von 37 kBq/well <sup>3</sup>H-Thymidin, mit einem  $\beta$ -Szintillationszähler bestimmt.



**Abbildung 3.10: iTregs, die durch  $\alpha_4\beta_1^+$  bzw.  $\alpha_4\beta_7^+$  Tregs induziert wurden, supprimieren CD4<sup>+</sup> Th Zellkontakt-unabhängig**

iTreg-Subpopulationen wurden nach ihrer Isolation funktionellen Tests zugeführt und die suppressiven Eigenschaften in "TRANSWELL"-Kulturen mit frisch isolierten CD4<sup>+</sup> Th eines dritten Spenders getestet. Hierzu wurden die Populationen mit 1 µg/ml anti-CD3 und 2 µg/ml anti-CD28 mAk stimuliert. Die Proliferation wurde an Tag 4, 16 Stunden nach Zugabe von 37 kBq/well <sup>3</sup>H-Thymidin, mit einem  $\beta$ -Szintillationszähler bestimmt.

Die Bestimmung von biologisch aktivem TGF- $\beta$  in den Kulturüberständen der polyklonal aktivierten iTregs zeigte eine hohe Produktion dieses Zytokins, wenn die iTregs durch Kokultur mit  $\alpha_4\beta_1^+$  Tregs induziert wurden. Demgegenüber produzierten  $\alpha_4\beta_7^+$  Treg-induzierte iTregs nur geringfügige Mengen an TGF- $\beta$  (Abb. 3.11A). Im Gegensatz hierzu produzierten weder  $\alpha_4\beta_7^+$  Tregs bzw.  $\alpha_4\beta_1^+$  Tregs noch CD4 $^+$  Th nachweisbare Mengen von biologisch aktivem TGF- $\beta$ . Bei Betrachtung der IL-10-Produktion wird deutlich, dass beide iTregs-Subpopulationen dieses Zytokin produzierten. Die IL-10-Konzentration in Kulturüberständen aktivierter iTregs, die in Gegenwart von  $\alpha_4\beta_7^+$  Tregs induziert wurden, war allerdings deutlich höher (Abb. 3.11B). Geringe Mengen an IL-10 konnten zudem auch in den Kulturüberständen aktivierter  $\alpha_4\beta_7^+$  Tregs detektiert werden, während  $\alpha_4\beta_1^+$  Tregs und CD4 $^+$  Th fast kein IL-10 sezernierten.

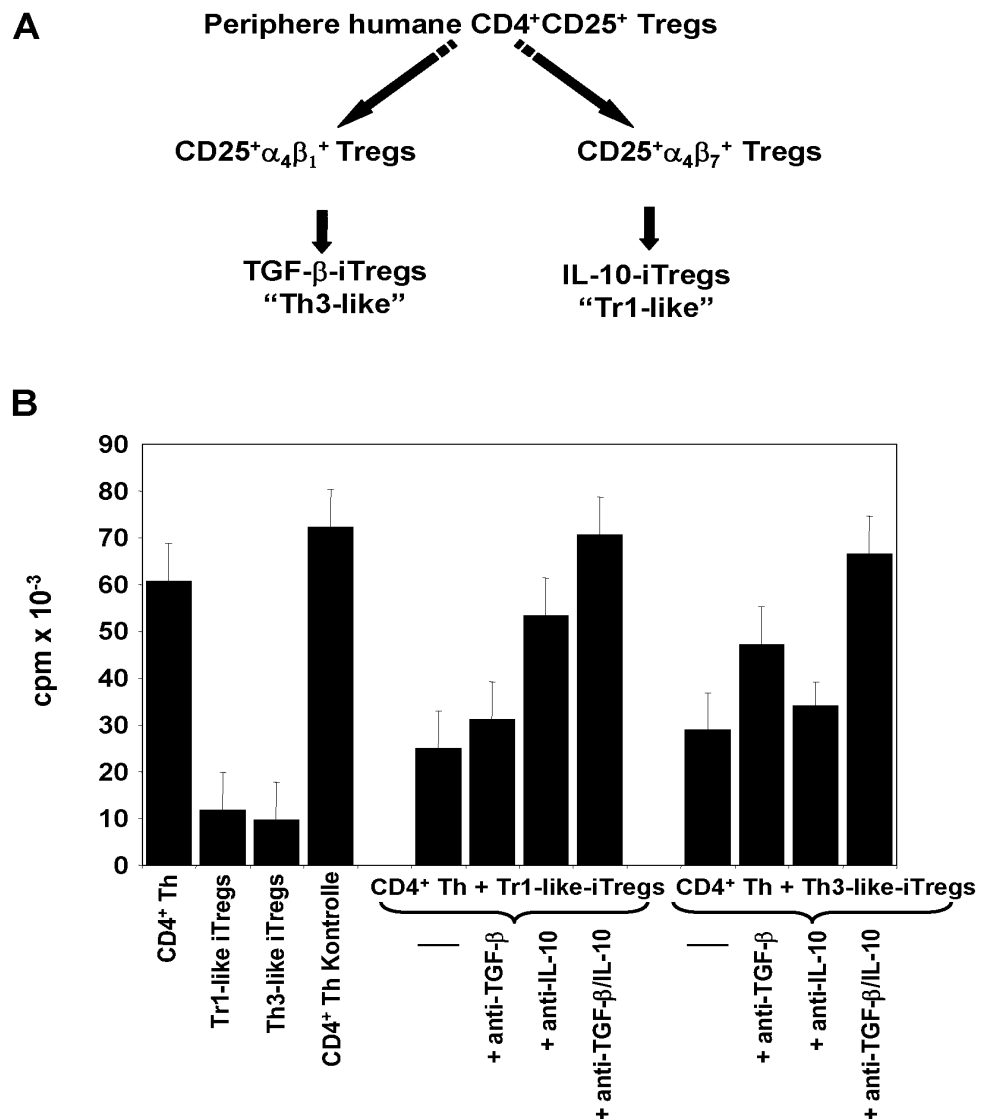


**Abbildung 3.11:  $\alpha_4\beta_1^+$  und  $\alpha_4\beta_7^+$  Tregs induzieren distinkte Subpopulationen von iTregs**

Die TGF- $\beta$ - (A) und IL-10-Produktion (B) in den Kulturüberständen wurde mit Hilfe von Zytokin-spezifischen ELISA nach 48 Stunden Stimulation untersucht, n.n. = nicht nachweisbar.

Diese Daten zeigten, dass die beschriebenen Subpopulationen humaner  $CD4^+CD25^+$  Tregs sich nicht nur phänotypisch ( $\alpha_4\beta_1^+$  versus  $\alpha_4\beta_7^+$ ) unterscheiden, sie induzieren auch distinkte Populationen sekundärer Suppressorzellen (Abb. 3.12A).  $\alpha_4\beta_1^+$  Tregs induzieren dabei  $IL-10^{low}TGF-\beta^{high}$  produzierende iTregs, die dem sogenannten Th3-Typ<sup>30</sup> entsprechen, wohingegen  $\alpha_4\beta_7^+$  Tregs iTregs vom Tr1-Typ<sup>31</sup> induzieren, die große Mengen an IL-10 und geringere Mengen TGF- $\beta$  freisetzen ( $IL-10^{high}TGF-\beta^{low}$ ). Beide iTreg-Subpopulationen sind anergisch und inhibieren kokultivierte  $CD4^+$  Th durch einen Zellkontakt-unabhängigen Mechanismus. Somit lag es nahe, die Bedeutung von TGF- $\beta$  und IL-10 für diesen suppressiven Mechanismus durch blockierende mAk zu untersuchen.

Bei Betrachtung der funktionellen Aktivität wurde deutlich, dass die suppressive Kapazität beider iTreg-Subpopulationen synergistisch von TGF- $\beta$  und IL-10 vermittelt wird, da nur die Blockierung beider Zytokine zu einer vollständigen Wiederherstellung der proliferativen Kapazität von kokultivierten  $CD4^+$  Th führte. Hierbei scheint TGF- $\beta$  der dominante inhibitorische Faktor bei Th3-ähnlichen iTregs zu sein, wohingegen die Neutralisation von IL-10 (und nicht TGF- $\beta$ ) allein die Suppression durch Tr1-like iTregs nur teilweise aufhebt (Abbildung 3.12B).



**Abbildung 3.12: Durch Kokultur mit  $\alpha_4\beta_1^+$  bzw.  $\alpha_4\beta_7^+$  Tregs generierte iTregs zeigen funktionelle Eigenschaften von Tr1- oder Th3-Zellen**

**A:** Übersicht zu den verschiedenen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg-Subpopulationen und ihren Eigenschaften. **B:** Die wie in Abbildung 3.8 beschriebenen, zurückgewonnenen T-Zellpopulationen wurden in Einzelkultur bzw. zusammen mit frisch isolierten CD4<sup>+</sup> Th im Verhältnis 1:1, in An- und Abwesenheit von blockierenden Antikörpern gegen TGF-β und/oder IL-10 stimuliert. Die Proliferation der CD4<sup>+</sup> Th wurde an Tag 4, 16 Stunden nach Zugabe von 37 kBq/well <sup>3</sup>H-Thymidin, mit einem β-Szintillationszähler bestimmt.

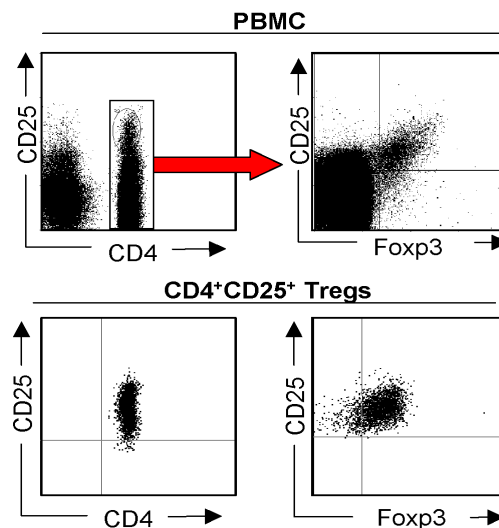
### 3.3 FoxP3 ist kein zellspezifischer Marker für humane CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs

Obwohl mit  $\alpha_4\beta_1$  und  $\alpha_4\beta_7$  zwei Oberflächenintegrine identifiziert werden konnten, deren Expression charakteristisch für distinkte Subpopulationen von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs ist, konnten diese Marker nicht zur Identifizierung von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tregs in heterogenen Zellpopulationen eingesetzt werden, da CD4<sup>+</sup> Th ein vergleichbares

Expressionsmuster zeigten. Zu dieser Zeit erschienen erste Publikationen die zeigten, dass der Transkriptionsfaktor FoxP3 im murinen System offensichtlich ausschließlich von  $CD4^+CD25^+$  Tregs exprimiert wird und damit diese T-Zellpopulation eindeutig definiert<sup>71;72</sup>. FoxP3 ist essentiell an der Entstehung und Funktion muriner und humaner  $CD4^+CD25^+$  Tregs beteiligt. FoxP3 gehört zu den Transkriptionsfaktoren der FORKHEAD/WINGED-HELIX-Familie und Defekte im FOXP3-Gen führen in der Maus zur systemischen Autoimmunität, dem "SCURFY-SYNDROME", welches auf ein vollständiges Fehlen von  $CD4^+CD25^+$  Tregs in der Peripherie zurückzuführen ist<sup>88;89</sup>. Auch im Menschen führen solche Gendefekte zu einer fatalen lymphoproliferativen Erkrankung, dem "IPEX-SYNDROME"<sup>90</sup>.

Somit lag nahe, da mit FoxP3 ein zentraler zellspezifischer Regulator für *murine*  $CD4^+CD25^+$  Tregs identifiziert worden war, dessen Expression in *humanen*  $CD4^+CD25^+$  Tregs zu analysieren.

Die Analyse frisch isolierter PBMC und gereinigter  $CD4^+CD25^+$  Tregs aus gesunden Spendern bestätigte, dass auch humane  $CD4^+CD25^+$  Tregs konstitutiv FoxP3 exprimieren (Abb. 3.13).

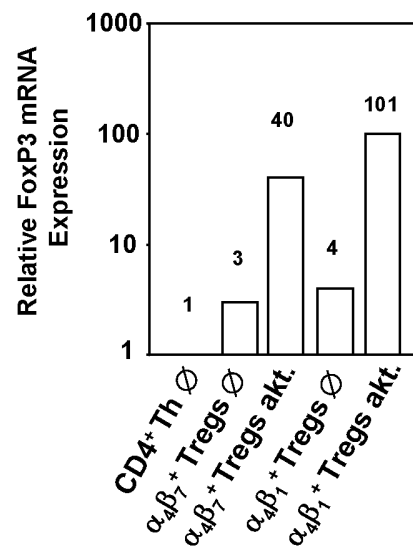


**Abbildung 3.13: In nicht stimulierten PBMC wird FoxP3 ausschließlich von  $CD4^+CD25^+$  Tregs exprimiert**

Die durchflusszytometrische Analyse der FoxP3-Expression in PBMC und isolierten  $CD4^+CD25^+$  Tregs bestätigte die postulierte präferentielle Expression von FoxP3 in  $CD4^+CD25^+$  Tregs. Für die Analyse wurden frisch isolierte PBMC und isolierte  $CD4^+CD25^+$  Tregs aus gesunden Spendern mit Hilfe von Fluoreszenz-markierten mAk spezifisch für die angegebenen Marker gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht.

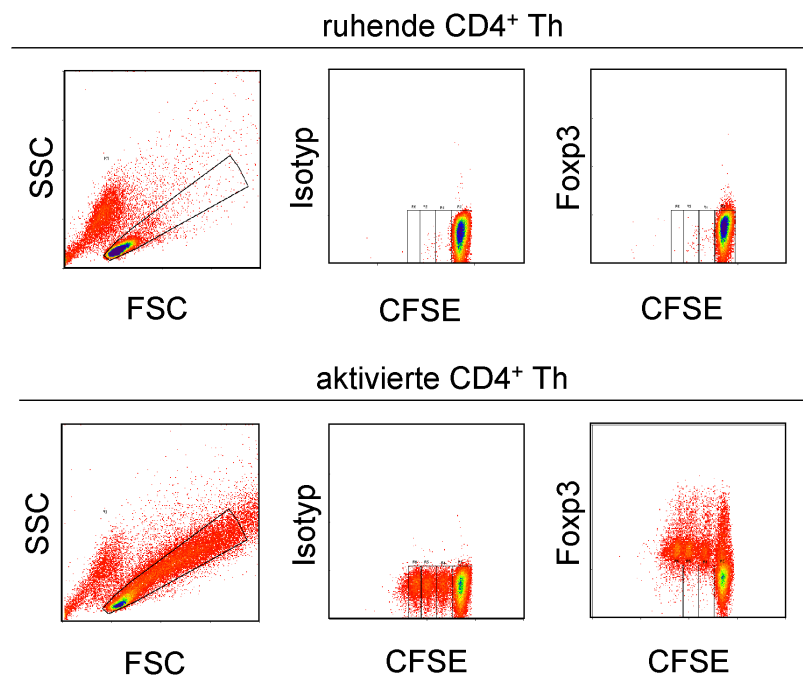


Diese Resultate wurden durch quantitative mRNA-Analysen gestützt (Abb. 3.14). Allerdings zeigte sich, dass die Hypothese einer zellspezifischen Expression von FoxP3 in  $CD4^+CD25^+$  Tregs, im humanen System nur für ruhende T-Zellpopulationen gültig ist. Durchflusszytometrische Analysen von voraktivierten  $CD4^+$  Th zeigten, dass nach Stimulation über den T-Zellrezeptor, humane proliferierende  $CD4^+$  Th ebenfalls FoxP3 exprimieren (Abb. 3.15). Somit sind FoxP3 und CD25 im humanen System nur bedingt geeignet, um Tregs in heterogenen Zellpopulationen eindeutig zu identifizieren. Nach Aktivierung des Immunsystems werden beide Proteine auch von  $CD4^+$  Th exprimiert.



**Abbildung 3.14: Ruhende und aktivierte humane  $\alpha_4\beta_1^+$  bzw.  $\alpha_4\beta_7^+$   $CD25^+$  Tregs exprimieren FoxP3**

Zur Analyse der FoxP3-Expression wurde die mRNA von frisch isolierten und 24 Stunden aktivierten (1  $\mu$ g/ml anti-CD3 und 2  $\mu$ g/ml anti-CD28 mAk)  $CD4^+$  Th und  $CD4^+CD25^+$  Treg-Subpopulationen isoliert. Anschließend erfolgte nach reverser Transkription eine REALTIME-PCR zum Nachweis von FoxP3 und  $\beta$ -Actin. Die relativen Werte für FoxP3 wurden auf die Expression des HOUSKEEPING GENE  $\beta$ -Actin normalisiert und ruhende  $CD4^+$  Th als Bezugsgröße verwendet.



Mit freundlicher Genehmigung von C. Becker

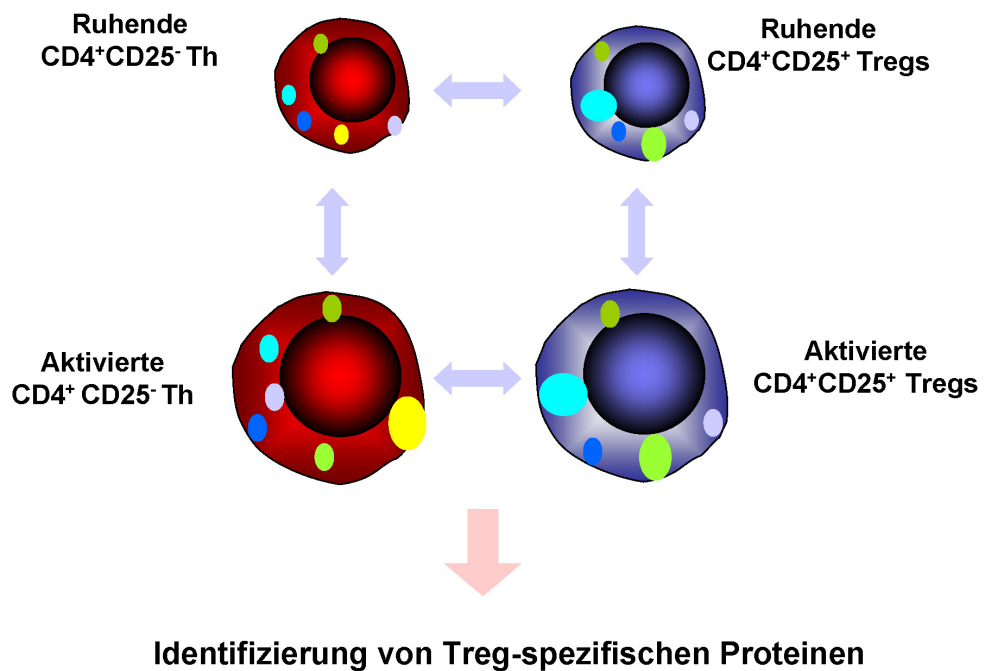
**Abbildung 3.15: FoxP3-Induktion in humanen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Th durch T-Zellrezeptor-abhängige Stimulation**

Durchflusszytometrische Analyse der FoxP3-Expression in ruhenden und aktivierten CD4<sup>+</sup>CFSE<sup>+</sup> Th. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Th wurden mit dem Vitalfarbstoff CFSE markiert und in Abwesenheit bzw. in Gegenwart von 1 µg/ml anti-CD3 und 2 µg/ml anti-CD28 mAk für drei Tage kultiviert. Anschließend wurde die Proliferation und FoxP3-Expression durchflusszytometrisch untersucht.

### 3.4 Differentielle Proteomanalysen von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs und CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen

Da trotz intensiver Analyse diverser Oberflächenmoleküle kein Markermolekül zur eindeutigen Identifizierung humaner Tregs gefunden werden konnte, entschlossen wir uns, vergleichende Proteomanalysen von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs und CD4<sup>+</sup> Th durchzuführen. Ziel dieser Untersuchungen war es, Proteine zu identifizieren, die präferentiell von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs exprimiert werden und möglicherweise für deren funktionellen Eigenschaften von Bedeutung sind. Hierzu wurden große Mengen hochreiner CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Th aus Leukapherisaten isoliert (Abb. 3.1 und 3.2). Ein Teil der Populationen wurde anschließend polyklonal mit anti-CD3 und anti-CD28 mAk für 48h stimuliert (Abb. 3.16). Es folgte

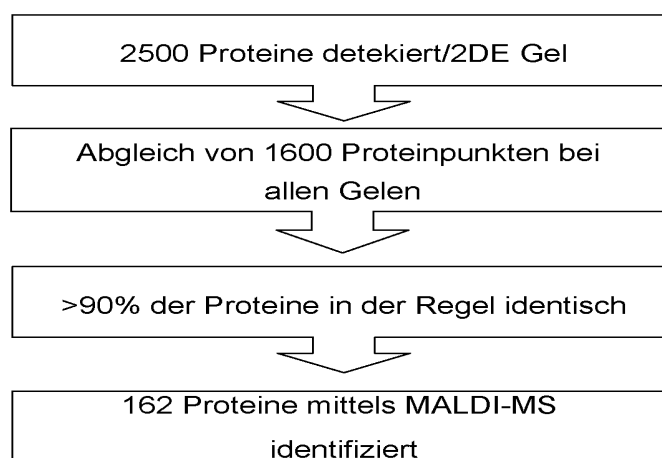
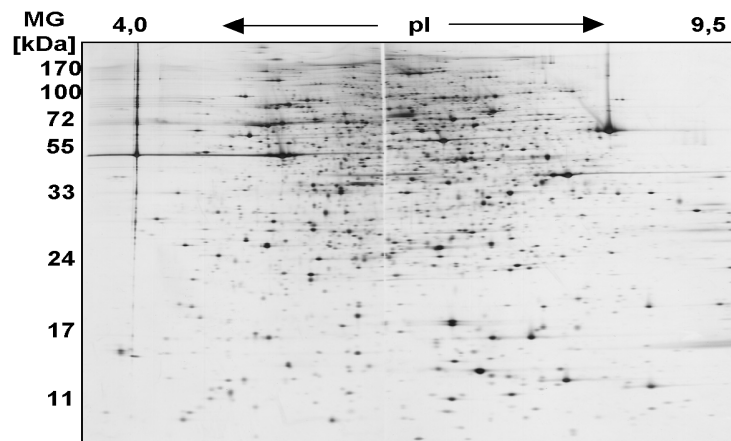
die Durchführung der Proteomanalysen in Kooperation mit der Firma Protagen, die auf derartige Analysen spezialisiert ist (Abb. 3.17).



modifiziert nach P. Lutter, Protagen AG, Dortmund, Deutschland

**Abbildung 3.16: Schema der differentiellen Proteomanalysen von humanen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs**

Darstellung der verwendeten Populationen zur Identifikation von differentiell exprimierten Proteinen, im Vergleich von humanen CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> Th und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs



### Abbildung 3.17: Proteinexpressionsmuster von humanen $CD4^+CD25^+$ Tregs nach 2D-PAGE

Mittels einer 2D-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE) wurden Proteinextrakte aus kruden Zellysaten, von ruhenden und aktivierten  $CD4^+CD25^+$  Tregs bzw.  $CD4^+$  Th, nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI) und dem Molekulargewicht (MG) aufgetrennt. Das so entstandene Expressionsmuster wurde anschließend in einer Silberfärbung dargestellt und die einzelnen Protein-Spots der jeweiligen Populationen Software-gestützt verglichen. Proteine, die eine differentielle Expression in  $CD4^+$  Th bzw.  $CD4^+CD25^+$  Tregs zeigten, wurden anschließend ausgestanzt und mittels MALDI-Massenspektrometrie (MALDI-MS) identifiziert.

Serielle Vergleiche der Proteinspotmuster und -Intensitäten von individuellen Populationen wiesen auf eine hohe Reproduzierbarkeit der einzelnen Experimente hin. Differentiell exprimierte Proteine konnten erfolgreich isoliert und in der MALDI-Massenspektrometrie identifiziert werden. Die Tabelle 3.1 zeigt die relative Expression identifizierter Proteine, die in aktivierten Tregs im Vergleich zu aktivierten  $CD4^+$  Th differentiell exprimiert waren. Neun Proteine zeigten eine höhere Expression in  $CD4^+CD25^+$  Tregs, 14 waren im Vergleich zu aktivierten  $CD4^+$  Th schwächer exprimiert. Bekanntermaßen differentiell exprimierte Proteine

wie CD25 oder FoxP3 waren mit dieser Methode nicht detektierbar, da die verwendete Methodik im wesentlichen die Auftrennung von zytosolischen Proteinen erlaubt.

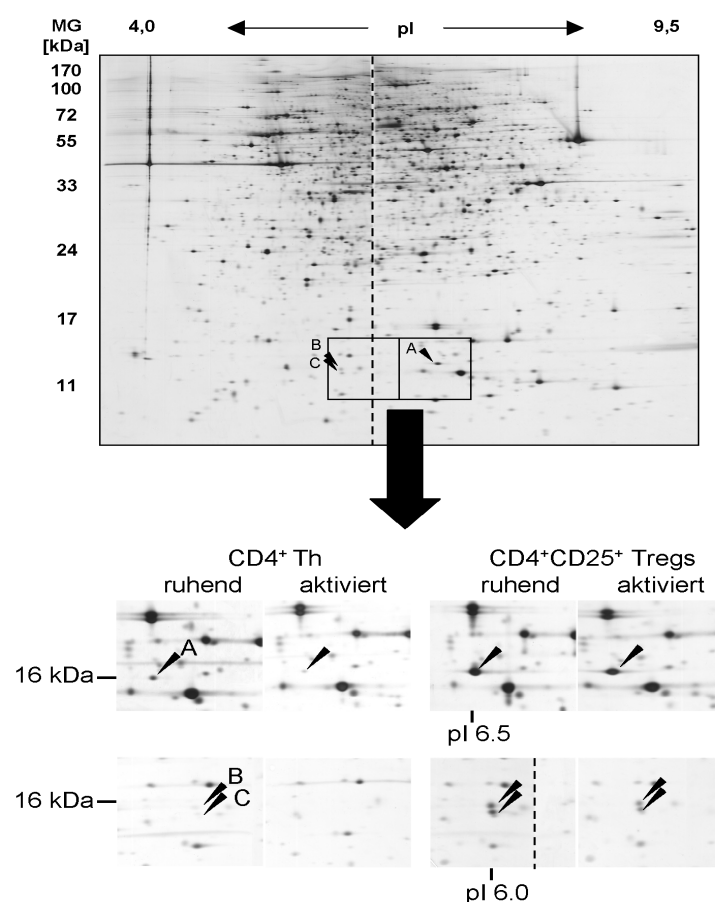
**Tabelle 3.1: Differenziell exprimierte Proteine: Ein Vergleich zwischen aktivierten CD4<sup>+</sup> Th und aktivierten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs**

Nr.	Protein	Gen	Zugangs Nr.	Genlokus	Expressionsverhältnis (n = 3) CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Tregs: CD4 <sup>+</sup> Th
8	Galectin-10	CLC	17942629	19q13.1	42
12	Tropomyosin 3	TPM3	24119203	1q21.2	4
69	Actin, beta, cytoplasmic isoform A	ACTB	14250401	7p15-p12	3,3
14	Actin, beta cytoplasmic isoform B	ACTB	14250401	7p15-p12	3,2
15	Actin, beta cytoplasmic isoform C	ACTB	14250401	7p15-p12	2,4
42	EH domain-containing 1	EHD1	9956076	11q13	1,7
36	Galectin 1	LGALS1	4504981	22q13.1	1,6
89	Actin gamma	ACTG1	178045	17q25.3	1,4
129	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 isoform 2	HNRPA2B	4504447	7p15.2	1,2
112	Tumor protein, translationally-controlled 1	TPT1	4507669	13q12-q14	0,8
135	Homeobox prox 1	PROX1	7706322	14q22.1	0,8
103	FK506-binding protein 4	FKBP4	4503729	12p13.33	0,8
26	Stathmin 1	STMN1	5031851	1p36.1-p35	0,6
2460	MO25 protein	MO25	7706481	2q37.1	0,6
22	Proteasome subunit beta type 7	PSMB7	21465650	9q34.11-q34.12	0,6
115b	Nucleoside Diphosphate Kinase A isoform A	NME1	4557797	17q21.3	0,6
115a	Nucleoside Diphosphate Kinase A isoform B	NME1	4557797	17q21.3	0,6
39	Ribonucleoside-diphosphate reductase isoform A	RRM1	4506749	11p15.5	0,5
38	Ribonucleoside-diphosphate reductase isoform B	RRM1	4506749	11p15.5	0,5
48	Flap structure-specific endonuclease 1	FEN1	4758356	11q12	0,5
3	dUTP pyrophosphatase - isoform A	DUT	4503423	15q15-q21.1	0,4
30	Eukaryotic translation initiation factor 5A	EIF5A	4503545	17p13-p12	0,3
25	dUTP pyrophosphatase - isoform B	DUT	4503423	15q15-q21.1	0,3

Gezeigt sind die Ratio der Protein-Spotintensitäten im Vergleich von aktivierten CD4<sup>+</sup> Th zu aktivierten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs. Die Proteinextrakte der Populationen wurden, wie in Kapitel 2 und Anhang 2<sup>81</sup> beschrieben, in 2D-PAGE aufgetrennt. Die Intensitäten der korrespondierenden Protein-Spots wurden mit Hilfe der ProteomWeaver™ Bildbearbeitungssoftware ermittelt. Die Berechnung der dargestellten Ratio der Intensitäten basieren auf den Daten der 2D-PAGE von T-Zellpopulationen aus drei verschiedenen Spendern, die jeweils in dreifacher Ausfertigung durchgeführt wurden. Die Bezeichnung der Proteine, Gene und Zugangsnummern erfolgte nach internationaler Nomenklatur.

### 3.4.1 Identifizierung von Galectin-10 in humanen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs

Das als CHARCOT-LEYDEN-CRYSTAL-PROTEIN bekannte Galectin-10, zuvor ausschließlich in Granulozyten nachgewiesen, zeigte die höchsten Expressionsunterschiede zwischen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs und CD4<sup>+</sup> Th (Abb. 3.18). Drei Isoformen (A-C) von Galectin-10 konnten identifiziert werden, welche sich in Molekulargewicht (MG) und isoelektrischer Fokussierung (pI) unterschieden. Alle Isoformen wurden in den Lysaten von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs nachgewiesen, dagegen war das Protein in Lysaten von CD4<sup>+</sup> Th nur sehr schwach exprimiert bzw. in einzelnen Präparationen nicht nachweisbar.

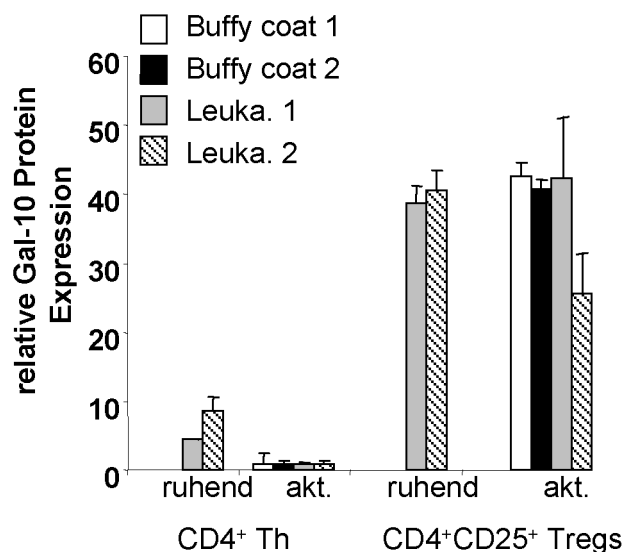


**Abbildung 3.18: Differenzielle Expression von Galectin-10 in humanen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs im Vergleich zu CD4<sup>+</sup> Th**

Der obere Teil der Abbildung zeigt das charakteristische Expressionsmuster von Proteinen nach einer 2D-PAGE von Extrakten aus CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs. Die Pfeile und Buchstaben zeigen die Lage der 3 Isoformen (A-C) von Galectin-10 im Gel, die in dem unteren Teil der Abbildung detaillierter und im Vergleich zu Gelausschnitten von ruhenden und aktivierten Th dargestellt sind.

Ruhende CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs zeigten eine hohe Expression der Isoform A, welche nur schwach in CD4<sup>+</sup> Th nachweisbar war. Zudem wird diese Isoform von

Galectin-10 nach Aktivierung in den Th herunterreguliert, während aktivierte Tregs Galectin-10 weiterhin exprimierten. (Abb. 3.19). Die zuvor völlig unbekanntenen Isoformen B und C waren fast ausschließlich in  $CD4^+CD25^+$  Tregs nachweisbar. Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass in ruhenden humanen T-Zellen Galectin-10 prädominant von  $CD4^+CD25^+$  Tregs exprimiert wird. Nach Aktivierung beschränkt sich die Expression dieses Proteins fast ausschließlich auf  $CD4^+CD25^+$  Tregs.



**Abbildung 3.19: Quantitative Galectin-10-Proteinbestimmung in humanen T-Zellpopulationen**

Die Berechnung der relativen Proteinmengen von Galectin-10 basieren auf den Daten der 2D-PAGE von T-Zellpopulationen aus vier verschiedenen Spendern, die jeweils in dreifacher Ausfertigung durchgeführt wurden. Für die Proteomanalysen wurden sowohl frisch isolierte (nur Leukapherese-Produkten) als auch stimulierte (aus Leukapherese-Produkten und BUFFY COATS) T-Zellpopulationen verwendet.

**3.4.2 Phänotypische Analysen von Galectin-10<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs**

Obwohl Galectin-10 bereits vor mehr als 100 Jahren erstmals von CHACOT und LEYDEN<sup>91;92</sup> beschrieben wurde, war die Funktion dieses Proteins weitgehend unbekannt. Erschwerend für die funktionellen Analysen war es, dass bisher kein analoges Protein in der Maus charakterisiert werden konnte, der Nachweis von Galectin-10 gelang zuvor ausschließlich in menschlichen Granulozyten<sup>93-96</sup>. Wie in Tabelle 3.2 zusammengefasst, zeigte Galectin-10 unter allen Galectinen, die auf mRNA-Ebene in humanen T-Zellen untersucht wurden, die höchste Spezifität für  $CD4^+CD25^+$  Tregs. Quantitative PCR-Analysen bestätigten diese Beobachtung,

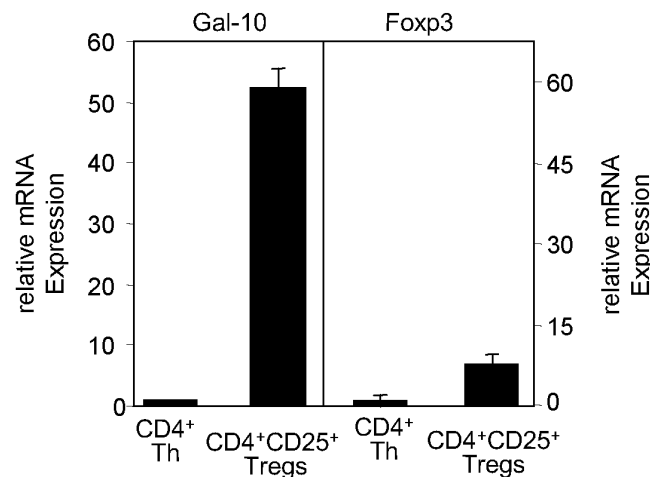


wobei Galectin-10 ca. 50-mal stärker von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs als von CD4<sup>+</sup> Th exprimiert wurde (Abb. 3.20). Der Vergleich mit Foxp3 verdeutlichte die Spezifität von Galectin-10 als humanen Treg-Marker.

**Tabelle 3.2: Expression von verschiedenen Galectinen in humanen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs und CD4<sup>+</sup> Th**

	ruhend		aktiviert	
	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Tregs	CD4 <sup>+</sup> Th	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Tregs	CD4 <sup>+</sup> Th
Galectin-1	+	+/-	++	+
Galectin-2	-	-	-	-
Galectin-3	-	-	-	-
Galectin-4	-	-	-	-
Galectin-7	-	-	-	-
Galectin-8	+/-	+	+	++
Galectin-9	-	+/-	-	+
Galectin-10	+++	+/-	+++	+/-
Galectin-12	-	-	-	-
Galectin-13	-	-	-	-

Gezeigt ist die relative Expression der angegebenen Galectine auf mRNA-Ebene von ruhenden und aktivierten humanen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs und CD4<sup>+</sup> Th. [- = keine Expression; +/- = in einigen Spendern schwach exprimiert; + = Schwache Expression / einheitliche Schmelzkurve bei qRT-PCR; ++ = 1,5- - 2,5-fach höhere Expression als in Vergleichspopulation (im Vergleich CD4<sup>+</sup> Th und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs); +++ = ≥ 2,5-fach höhere Expression als in Vergleichspopulation (im Vergleich CD4<sup>+</sup> Th und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs)]

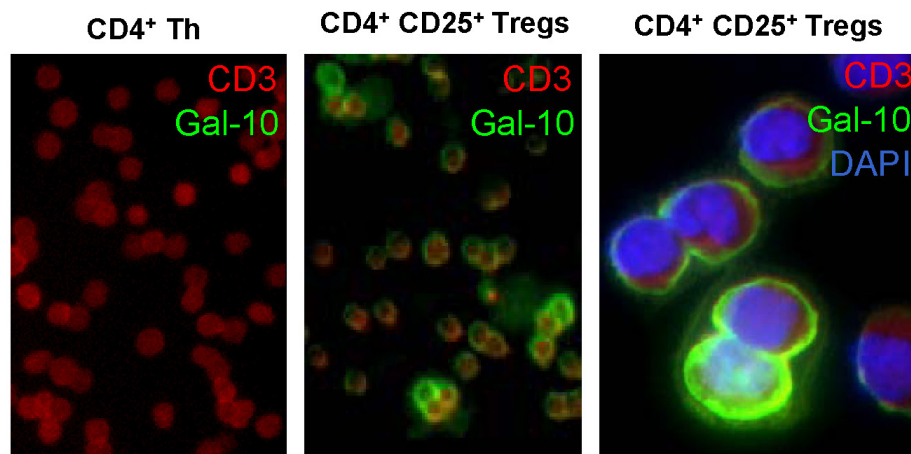


**Abbildung 3.20: Expression von Galectin-10 in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tregs auf mRNA-Ebene**

Relative Galectin-10 mRNA-Expression im Vergleich zur Foxp3 mRNA aus frisch isolierten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs und CD4<sup>+</sup> Th. Nach Gewinnung der mRNA- und cDNA-Synthese wurde eine REALTIME PCR zum spezifischen Nachweis der Expression von Galectin-10, Foxp3 und dem Elongationsfaktor-1alpha (EF-1α) als HOUSEKEEPING GENE zur Normalisierung der Werte durchgeführt. Als Bezugsgröße für die relative Expression dienten ruhende CD4<sup>+</sup> Th.

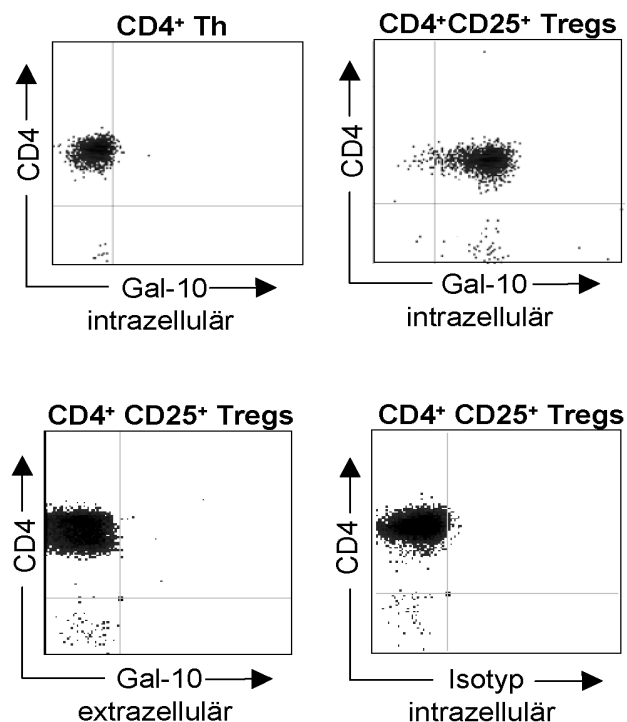
Ziel der im Folgenden dargestellten Experimente war es, die Expression von Galectin-10 auf Einzelzellebene und die potentielle Funktion des Proteins zu charakterisieren. Hierfür wurde zunächst ein Galactin-10-spezifisches polyklonales Kaninchen-Antiserum (in Kooperation mit dem Institut für Immunologie, Universität Mainz; Christoph Richter) und anschließend ein mAk in der Maus (B-F42, hergestellt in Kooperation mit der Firma Diaclone SAS, Besancon Cedex, Frankreich). Mit Hilfe dieser Reagenzien konnten die notwendigen Analysen durchgeführt werden.

Die Abbildungen 3.21 und 3.22 zeigen spezifische Färbungen von Galectin-10 mit den generierten Antikörpern. Die Analyse der Daten bestätigte die postulierte zytoplasmatische Expression von Galectin-10. Im Fluoreszenzmikroskop waren zwei Populationen Galectin-10-positiver Tregs zu erkennen, die das Protein mit unterschiedlicher Intensität exprimierten. In CD4<sup>+</sup> Th konnte in diesen Antikörperfärbungen kein Galectin-10 nachgewiesen werden. Durch spezifische Oberflächenfärbungen und Analysen der Kulturüberstände konnte sowohl die Expression an der Zelloberfläche als auch die Sekretion von löslichem Galectin-10 durch die Tregs ausgeschlossen werden (letzteres nicht gezeigt).



**Abbildung 3.21: Validierung der Galectin-10-Expression mittels Immunfluoreszenzfärbungen**

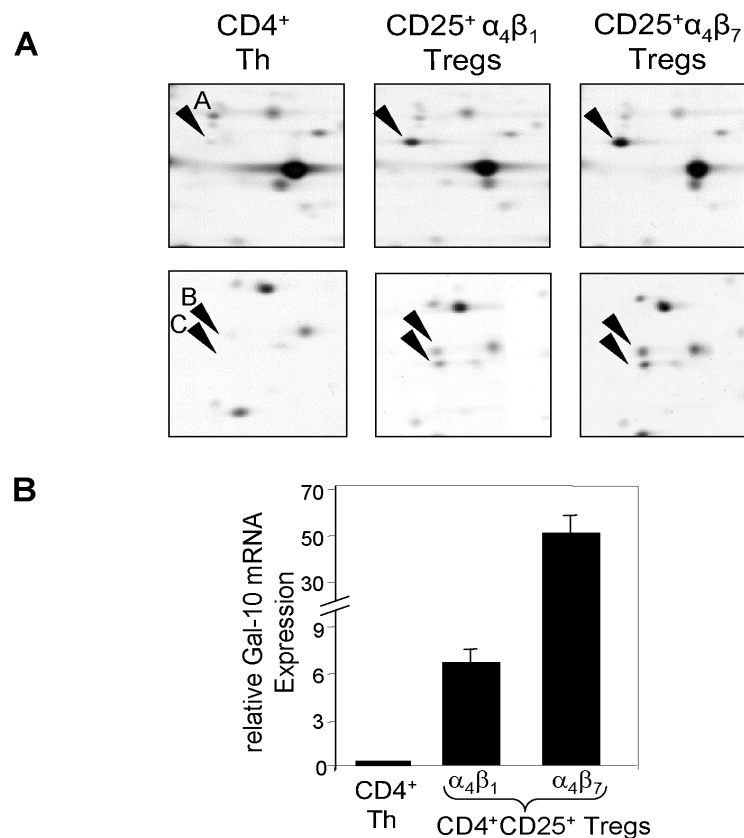
Zur Analyse der Galectin-10-Expression wurden Zytospinpräparate von ruhenden CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs bzw. CD4<sup>+</sup> Th angefertigt. Die Färbung erfolgte mit Hilfe eines Galectin-10-- spezifischen mAK (B-F42) in Kombination mit einem sekundären Oregon-Green-markierten anti-Maus-IgG-Antikörper (grüne Fluoreszenz). Zusätzlich wurden die Zellen mit einem anti-CD3-PE (rote Fluoreszenz) gefärbt und einer DAPI-Kernfärbung (blaue Fluoreszenz, nur auf der rechten Seite) unterzogen.



**Abbildung 3.22: Validierung der Galectin-10-Expression mittels Durchflusszytometrie**

Zur Analyse der Galectin-10-Expression wurden fixierte CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs bzw. CD4<sup>+</sup> Th eingesetzt. Die Färbung erfolgte mit Hilfe eines direkt-markierten Galectin-10-spezifischen mAk (B-F42-Oregon-Green) in Kombination mit einem PE-markierten anti-CD4 mAk. Anschließend wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Zur intrazellulären Darstellung der Marker wurden die Zellmembranen vor der Färbung entsprechend permeabilisiert (rechte Seite).

Durch zusätzliche Färbungen und quantitative PCR-Analysen an isolierten Treg-Subpopulationen konnten die  $\alpha_4\beta_7^+$  Tregs als diejenigen Zellen identifiziert werden, die aufgrund ihrer 7-fach höheren Expression an Galectin-10 im Vergleich zu  $\alpha_4\beta_1^+$  Tregs im Fluoreszenzmikroskop besonders intensiv leuchteten (Abb. 3.23A und B).



**Abbildung 3.23: Expression von Galectin-10 in  $\alpha_4\beta_1^+$  und  $\alpha_4\beta_7^+$  Tregs auf Protein- und mRNA-Ebene**

**A:** Die Ausschnitte der 2D Gele zeigen die Spotintensitäten für die Galectin-10-Isoformen A-C bei stimulierten CD4<sup>+</sup> Th und  $\alpha_4\beta_1^+$  bzw.  $\alpha_4\beta_7^+$  Tregs nach einer Silberfärbung. **B:** Relative Galectin-10 mRNA-Expression von frisch isolierten CD4<sup>+</sup> Th, CD25<sup>+</sup> $\alpha_4\beta_1^+$  Tregs und CD25<sup>+</sup> $\alpha_4\beta_7^+$  Tregs. Nach Gewinnung der cDNA wurde eine REALTIME PCR zum spezifischen Nachweis von Galectin-10 und EF-1 $\alpha$  mRNA als HOUSEKEEPING GENE durchgeführt. Die gewonnenen Werte für Galectin-10 wurden zur Expression von EF-1 $\alpha$  normalisiert und ruhende CD4<sup>+</sup> Th dienten als Bezugsgröße zur Berechnung der relativen Expression.

### 3.4.3 Funktionelle Charakterisierung von Galectin-10 in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs

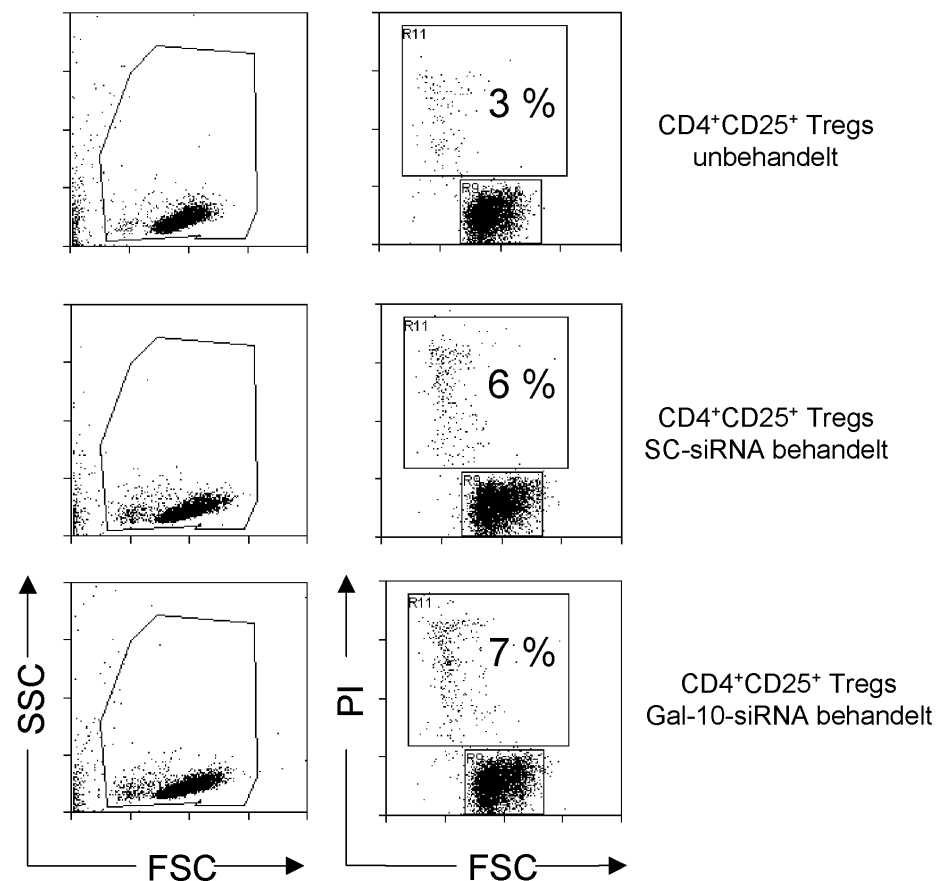
Die potentiell funktionelle Relevanz von Galectin-10 in humanen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs konnte nicht in Blockierungsstudien mit den spezifischen mAk untersucht werden, da das Protein nur im Zytoplasma exprimiert wird. Zur Bindung der mAk

an Galectin-10 ist eine Fixierung und Permeabilisierung der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs notwendig, folglich konnten lebende Tregs nicht gefärbt werden. Deshalb wurden für funktionelle Analysen der Tregs die RNAi-Technik<sup>viii</sup> (RNA-Interferenz) eingesetzt.

Zur Etablierung der RNAi-Technik für Galectin-10 wurden zunächst verschiedene, siRNAs (siRNA = SMALL INTERFERING RNA) im Vergleich zu einer Kontroll-siRNA (SC = SCRAMBLED CONTROL) ausgetestet. Da diese Methode die Transfektion durch Nukleofektion, beruhend auf dem Prinzip der Elektroporation voraussetzt, musste zusätzlich der Einfluss der Elektroporation auf die Viabilität der Zellen berücksichtigt werden. Letztlich gelang es mit Hilfe von Annexin-gekoppelten MICROBEADS die toten Zellen (Annexin-V<sup>+</sup>) vor der funktionellen Analyse transfizierter Tregs aus den Populationen zu entfernen. Erst hierdurch konnte sichergestellt werden, dass die einzelnen Treg-Populationen einen vergleichbaren Anteil viabler Zellen enthielten (>90%,. siehe Abb. 3.24).

---

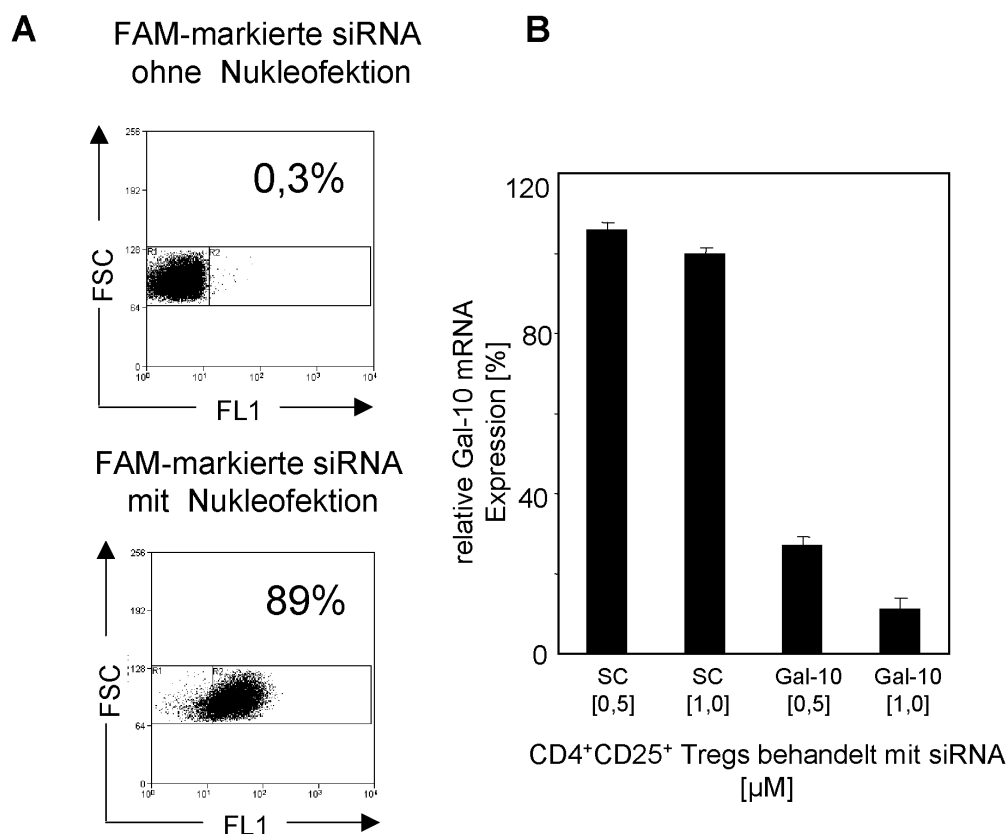
<sup>viii</sup> Unter **RNA-Interferenz (RNAi)**, oder auch *RNA SILENCING*) versteht man einen natürlichen Mechanismus in eukaryotischen Zellen, der die Genexpression einzelner Gene hemmt. Durch Verwendung von spezifischer siRNA (SMALL INTERFERING RNA) ist eine sequenzspezifische, post-transkriptionelle Inhibition einzelner Gene möglich.



**Abbildung 3.24: Viabilität der siRNA-behandelten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs**

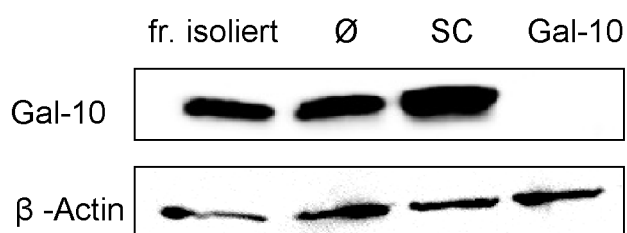
Die Abbildung zeigt die Analyse von siRNA-behandelten Zellen 48 Stunden nach Transfektion und Depletion von toten Zellen mit Hilfe von Annexin-gebundenen MICROBEADS. Das Ergebnis wurde in einer Propidium-Jodid Färbung überprüft. Für funktionelle Analysen konnten Populationen mit einer Viabilität >90% eingesetzt werden.

Durch die Nukleofektion konnten Transfektionsraten mit Galectin-10-spezifischer siRNA von bis zu 90% und in der Folge eine Dosis-abhängige Degradation der Galectin-10-spezifischen mRNA erreicht werden (Abb. 3.25A und B). Als zusätzliche Kontrolle wurden Western Blot-Analysen von siRNA-behandelten Zellen durchgeführt. Diese bestätigten die Ergebnisse der quantitativen RT-PCR-Untersuchungen. Mit Hilfe der RNAi-Technik war es möglich, die Expression von Galectin-10 in humanen Tregs spezifisch zu inhibieren, ohne dass ein signifikanter Einfluss auf die Bildung von Galectin-10 in den Kontroll-siRNA-behandelten Zellen feststellbar war (Abb. 3.26). Somit waren die Voraussetzungen geschaffen, um den potentiellen Einfluss von Galectin-10 auf die funktionellen Eigenschaften der Tregs zu testen.



**Abbildung 3.25: Analysen von siRNA-behandelten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs**

**A:** Gezeigt ist die Transfektionseffizienz von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs nach Behandlung mit Fluoreszenzmarkierter siRNA. **B:** Frisch isolierte CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs wurden mit 0,5 μM bzw. 1 μM Kontroll-siRNA (SC) oder Galectin-10-spezifischer siRNA (Gal-10) transfiziert. 24 Stunden später wurde die mRNA der Zellen präpariert und einer PCR-Analyse unterzogen. Die Galectin-10 mRNA-Expression wurde normalisiert auf die Expression des HOUSEKEEPING GENES EF-1α und 1 μM SC-behandelte CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs als Bezugsgröße verwendet.

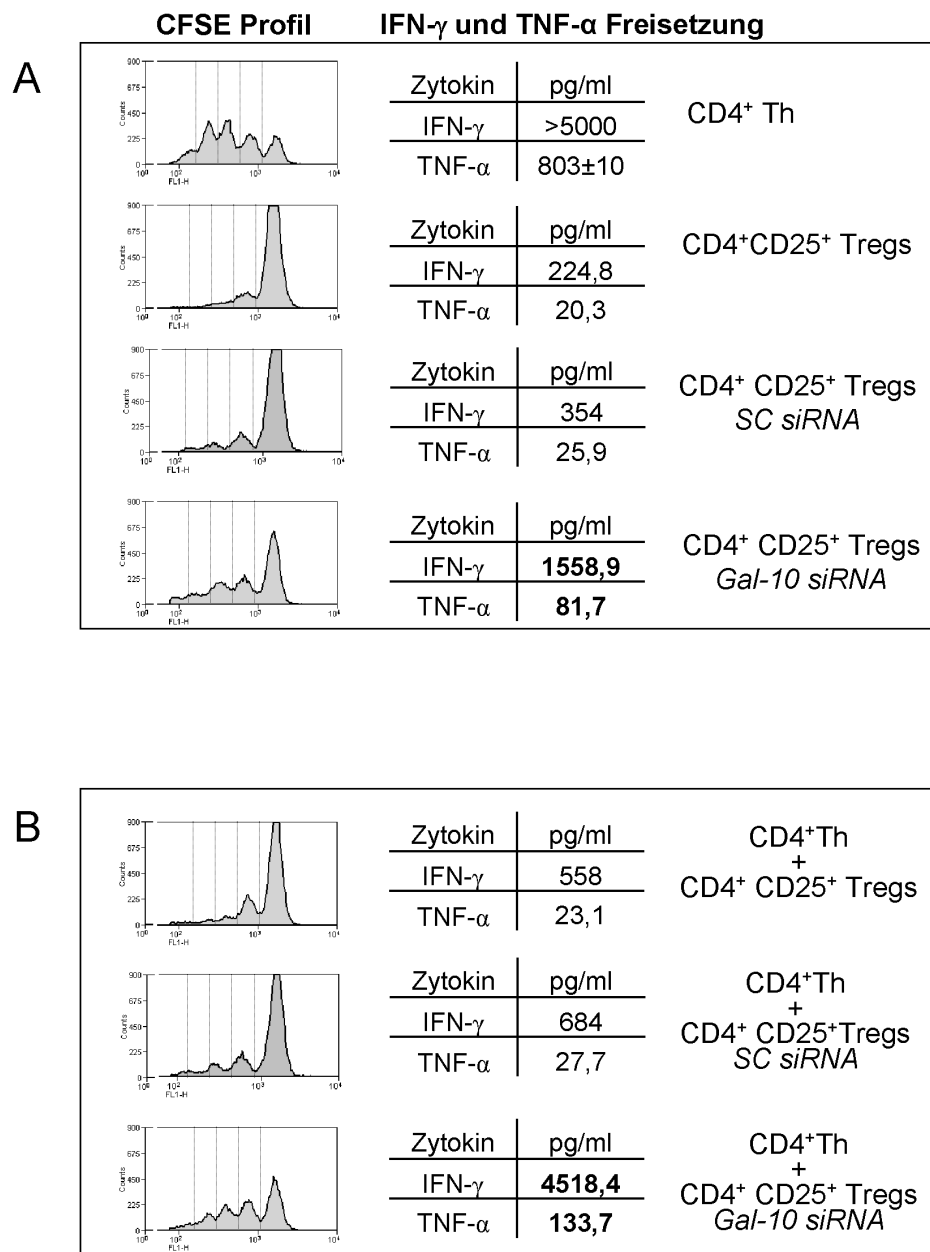


**Abbildung 3.26: Galectin-10-Proteinexpression in siRNA-behandelten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs**

Frisch isolierte CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs wurden mit Galectin-10 spezifischer siRNA, Kontroll siRNA oder in Abwesenheit von siRNA nukleofiziert. 48 Stunden später wurden die Proteinextrakte mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und die Galectin-10-Expression in Western Blot-Analysen untersucht.

Zu diesem Zweck wurde die Proliferation und Zytokinbildung von siRNA-behandelten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs in Einzel- und Kokulturen mit CD4<sup>+</sup> Th nach Aktivierung durchflusszytometrisch untersucht (Abb.3.27A und B). Die Analyse der Proliferation von siRNA-behandelten Zellen zeigte interessanterweise, dass durch die Inhibition der Galectin-10-Expression der anerge, hypoproliferative Phänotyp von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs *in vitro* teilweise aufgehoben wurde. Die siRNA-vermittelte Suppression der Galectin-10-Expression führte zu einer gesteigerten Eigenproliferation und Zytokinproduktion der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs (Abb. 3.27A). Die Behandlung mit Kontroll-siRNA hatte hingegen keinen Einfluss. Diese Daten wiesen auf eine essentielle Bedeutung von Galectin-10 bei der Aufrechterhaltung des anergen Phänotyps bei CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs hin. Um die Frage zu beantworten, ob Galectin-10 ebenfalls in den suppressiven Mechanismus von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs involviert ist, wurden siRNA-behandelte CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs in Kokultur mit frisch isolierten CFSE-markierten CD4<sup>+</sup> Th untersucht. Wie in Abbildung 3.27B dargestellt, kam es nach Inhibition der Galectin-10-Expression zu einer teilweisen Aufhebung der suppressiven Aktivität der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs, resultierend in einer gesteigerten Proliferation und erhöhten Zytokinproduktion der kokultivierten CD4<sup>+</sup> Th. Diese Beobachtungen zeigten, dass Galectin-10 essentiell an der Funktion humaner CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs beteiligt ist.





**Abbildung 3.27: Galectin-10 spezifische siRNA hebt die Anergie und die suppressive Aktivität von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs teilweise auf**

Frisch isolierte CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs blieben unbehandelt bzw. wurden mit 1  $\mu$ M Kontroll-siRNA (SC) oder Galectin-10-spez. siRNA (Gal-10) transfiziert. 48 Stunden nach Transfektion wurden CFSE-markierte und unmarkierte Zellen in Einzel- und Kokultur mit 0,5  $\mu$ g/ml anti-CD3 mAk und bestrahlten PBMC aktiviert. **Abschnitt A** zeigt die Proliferation der T-Zellpopulationen in Einzelkultur. CFSE-Profil: Die durchflusszytometrische Analyse der CFSE<sup>+</sup> T-Zellen an Tag 3 der Stimulation. *IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  Freisetzung*: Die Analyse der Zytokinfreisetzung wurde mit Hilfe des CYTOMETRIC BEAD-ARRAYS in Kulturüberständen, drei Tage stimulierter Zellen durchgeführt. **Abschnitt B**: CFSE-Profil von CD4<sup>+</sup> Th in Kokultur mit unmarkierten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs (unbehandelt  $\pm$  siRNA) im Verhältnis von 1:2. Die Analyse der Zytokinfreisetzung wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

### 3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Es konnte gezeigt werden, dass aus peripherem Blut isolierte humane CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs mindestens zwei Subpopulationen enthalten, die sich in der Expression von Integrinen unterscheiden. Es wurden  $\alpha_4\beta_1^+$  Tregs und  $\alpha_4\beta_7^+$  Tregs identifiziert.

Diese CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg-Subpopulationen supprimieren Zellkontakt-abhängig kokultivierte CD4<sup>+</sup> Th und können diese gleichzeitig zu unterschiedlichen iTregs, welche die Aktivierung von CD4<sup>+</sup> Th in einem sekundären Zellkontakt-unabhängigen Prozess supprimieren, konvertieren.

Zytokinanalysen der Kulturüberstände und die Verwendung von neutralisierenden mAk in funktionellen Tests zeigten, dass  $\alpha_4\beta_1^+$  Tregs CD4<sup>+</sup> Th zu TGF- $\beta$ -produzierenden iTregs des "Th3-ähnlichen" Phänotyps konvertieren.  $\alpha_4\beta_7^+$  Tregs induzieren dagegen IL-10-produzierende iTregs des „Tr1-ähnlichen“ Phänotyps.

Darüber hinaus wurde der Transkriptionsfaktor FoxP3, im murinen System spezifisch für CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs, als nicht Treg-spezifisch für humane T-Zellen identifiziert. Humane CD4<sup>+</sup> Th exprimieren ebenfalls FoxP3, nach Stimulation über den T-Zellrezeptor.

Da mit phänotypischen Analysen kein Marker zur eindeutigen Identifikation von humanen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tregs in heterogenen Zellpopulationen identifiziert werden konnte, folgten differenzielle Proteomanalysen von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs und CD4<sup>+</sup> Th zur Charakterisierung bisher unbekannter Treg-assoziiierter Marker. Diese Untersuchungen führten zur Identifizierung von Galectin-10 als Markerprotein für humane CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tregs. Es konnten drei Isoformen von Galectin-10 beschrieben werden, die sich in ihrem Molekulargewicht und isoelektrischen Fokussierung unterscheiden. Analysen der mRNA- und Proteinexpression von Galectin-10 zeigten darüber hinaus, dass  $\alpha_4\beta_7^+$  Treg-Subpopulationen höhere Mengen an Galectin-10 exprimieren als  $\alpha_4\beta_1^+$  Treg-Subpopulationen. Galectin-10 wird ausschließlich intrazellulär exprimiert. Funktionelle Untersuchungen unter Verwendung von Galectin-10-spezifischer RNA-Interferenz belegten eine essentielle Rolle von Galectin-10 für die Anergie und den suppressiven Eigenschaften von humanen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs.

## 4. Diskussion

Das adaptive Immunsystem höherer Vertebraten ist ein hocheffektives und dynamisches System, welches auf den Schutz vor schädlichen Pathogenen spezialisiert ist. Daher muss das Immunsystem nicht nur in der Lage sein zwischen "EIGENEN" und "FREMDEN", sondern auch zwischen gefährlichen und harmlosen Strukturen zu unterscheiden, um unnötige und selbstzerstörerische Immunantworten zu verhindern. Für die Aufrechterhaltung der immunologischen Toleranz gegenüber körpereigenen Strukturen, als auch für die schützende Immunität gegen Pathogene, ist ein ausbalanciertes Immunsystem, in dem sowohl die Generierung von antigenspezifischen Effektorzellen als auch antigenspezifische Toleranzinduktion gewährleistet sind, essentiell. Um diese Toleranz aufrecht zu erhalten, stehen dem Immunsystem neben zentralen Mechanismen im Thymus, der Apoptose autoreaktiver T-Zellen, verschiedene passive und aktive Möglichkeiten in der Peripherie zur Verfügung.

Die Renaissance der Suppressorzellen, eingeleitet durch die Arbeiten von SAKAGUCHI et al.<sup>44</sup> 1995, führten zu der Erkenntnis, dass eine spezifische Subpopulation CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die konstitutiv die  $\alpha$ -Kette des IL-2-Rezeptors (CD25) exprimieren, für die periphere Toleranz wesentlich ist. Zahlreiche Publikationen in den folgenden Jahren belegten das enorme Potential dieser als CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs) bezeichneten T-Zellen zur Unterdrückung von Autoimmunerkrankungen und allergischen T-Zellreaktionen<sup>45;50;83;97</sup>.

Eine wesentliche Schwierigkeit bei der eindeutigen Charakterisierung von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs ist das Fehlen eines zellspezifischen Oberflächenmarkers. Trotz der Identifizierung zahlreicher Marker, die mit dem Phänotyp von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs assoziiert sind, konnte kein Oberflächenprotein beschrieben werden, das von dieser T-Zellpopulation exklusiv exprimiert wird. Nur in Abwesenheit einer T-Zellaktivierung, können Tregs aufgrund ihrer konstitutiven Expression von CD25 aus dem Blut von gesunden Spendern bzw. Mäusen identifiziert und isoliert werden<sup>44;45</sup>.

Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung und Charakterisierung von humanen Treg-Subpopulationen und neuer Markermoleküle, die exklusiv von Tregs exprimiert

werden und idealerweise von funktioneller Relevanz für deren suppressive Aktivität sind.

Natürliche CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs, die bereits im Thymus als distinkte FoxP3<sup>+</sup> Population entstehen, sind funktionell dadurch charakterisiert, dass sie Zellkontakt-vermittelt die Aktivierung von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Effektorzellen verhindern und darüber hinaus über den Prozess der "Infektiösen Toleranz" sekundäre T-Helfersuppressorzellen (iTregs) induzieren können<sup>32;52</sup>. Untersuchungen an murinen T-Zellen zeigten, dass die Expression des Integrins  $\alpha_E\beta_7$  (CD103), welches an Cadherin auf Epithelzellen bindet, charakteristisch für bestimmte Subpopulationen muriner Tregs ist<sup>98</sup>. LEHMANN et al. postulierten, dass in der Maus die  $\alpha_E$ CD25<sup>+</sup> Tregs, die Subpopulation mit den größten suppressiven Eigenschaften unter den Tregs darstellt<sup>98</sup>. Im Gegensatz dazu wird im Menschen das Integrin CD103 kaum von CD4<sup>+</sup> T-Zellen exprimiert. Auf humanen T-Zellen sind die  $\alpha_4$ -Integrine, in Kombination mit verschiedenen  $\beta$ -Ketten, die analogen Strukturen<sup>85;86</sup>. Innerhalb dieser Arbeit konnten zwei Subpopulationen humaner CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs identifiziert werden, phänotypisch charakterisiert durch die Expression der Integrine  $\alpha_4\beta_1$  bzw.  $\alpha_4\beta_7$  (Abb. 3.5).

Die Wanderung von Leukozyten *in vivo* wird wesentlich durch Adhäsionsmoleküle (Selektin und Integrine) reguliert<sup>99</sup>. Die  $\alpha_4\beta_1$ - und  $\alpha_4\beta_7$ -Integrine stellen wichtige "HOMING-REZEPTOREN"<sup>ix</sup> zur Migration von T-Zellen aus dem Blut bzw. der Lymphe, in entzündetes Gewebe bzw. den Schleimhäuten dar. Für diesen Prozess bindet das  $\alpha_4\beta_1$ -Integrin an VCAM1 (VASCULAR CELL ADHESION MOLECULE-1), welches unter dem Einfluss der Entzündung von Endothelzellen exprimiert wird<sup>86</sup>.  $\alpha_4\beta_7$ -Integrine hingegen binden vaskuläre Addressine, die selektiv in den Venen der Schleimhäute exprimiert werden<sup>85</sup>. Es ist folglich anzunehmen, dass  $\alpha_4\beta_1$ <sup>+</sup> Tregs *in vivo* vorwiegend im Verlauf einer Entzündung in lymphoide Areale wandern.  $\alpha_4\beta_7$ <sup>+</sup> Tregs sollten andererseits spezifisch in mukosale Gewebe einwandern, um dort die Immunantworten zu regulieren. Diese Hypothese wird durch die Tatsache gestützt, dass neutralisierende Antikörper gegen  $\alpha_4$ -Integrine im Modell der murinen chronischen Diabetes die Entzündung im Darm der Tiere verstärken, während die Migration fördernde Antikörper zur signifikanten Linderung der Symptome führen<sup>100</sup>. Neben den CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs, die als distinkte Population bereits im Thymus gebildet werden, können CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit suppressiven Eigenschaften auch in der

---

<sup>ix</sup> **HOMING REZEPTOREN** sind Adhäsionsmoleküle auf Lymphozyten, die an Liganden auf Endothelzellen binden und somit eine Gewebs-spezifische Migration der Zellen ermöglichen.

Peripherie durch funktionelle Konversion aus CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen (CD4<sup>+</sup> Th) entstehen<sup>101</sup>. Innerhalb dieser induzierten regulatorischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen (iTregs), konnten in verschiedenen Spezies anhand ihrer Wirkungsweise und ihres Zytokinmusters, mindestens zwei distinkte Subpopulationen identifiziert werden. Dies sind die sogenannten Tr1- und Th3-Zellen<sup>30;31</sup>.

Th3-Zellen sind die historisch ältesten induzierten CD4<sup>+</sup> Suppressor-T-Zellen, essentiell zur Induktion der oralen Toleranz bei Mäusen<sup>30</sup>. In diesen Studien von WEINER ET AL. zur Induktion von Toleranz durch orale, tolerogene Gabe von Antigenen erwiesen sich die Th3-Zellen als entscheidend, um den Ausbruch einer experimentellen autoimmunen Enzephalitis (EAE, murines Modell der multiplen Sklerose) zu verhindern. Entscheidend für die tolerogene Aktivität von Th3-Zellen war die Sekretion großer Mengen an biologisch aktivem TGF- $\beta$ . Th3-Zellen werden bis heute als TGF- $\beta$ -produzierende iTregs beschrieben, die Zellkontakt-unabhängig Entzündungen, vor allem in der Mukosa, inhibieren können<sup>70;101</sup>.

Arbeiten von Groux et al. führten zur Charakterisierung von Tr1-Zellen, die große Mengen IL-10 freisetzen und durch chronische Aktivierung von CD4<sup>+</sup> Th in Gegenwart von IL-10 *in vitro* induzierbar sind<sup>55</sup>. Bei diesem Prozess ist die Wirkung von IL-10 in Bezug auf die Konversion der Th zu Tr1-Zellen indirekt, vermittelt durch reduzierte stimulatorische Kapazität antigenpräsentierender Zellen (APC = ANTIGEN PRESENTING CELL). IL-10 führt nicht nur zu einer Herunterregulation von MHC-Molekülen, sondern auch zu einer verminderten Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80, CD86 und CD54. Darüber hinaus inhibiert IL-10 die Zytokinsekretion der APC<sup>56</sup>.

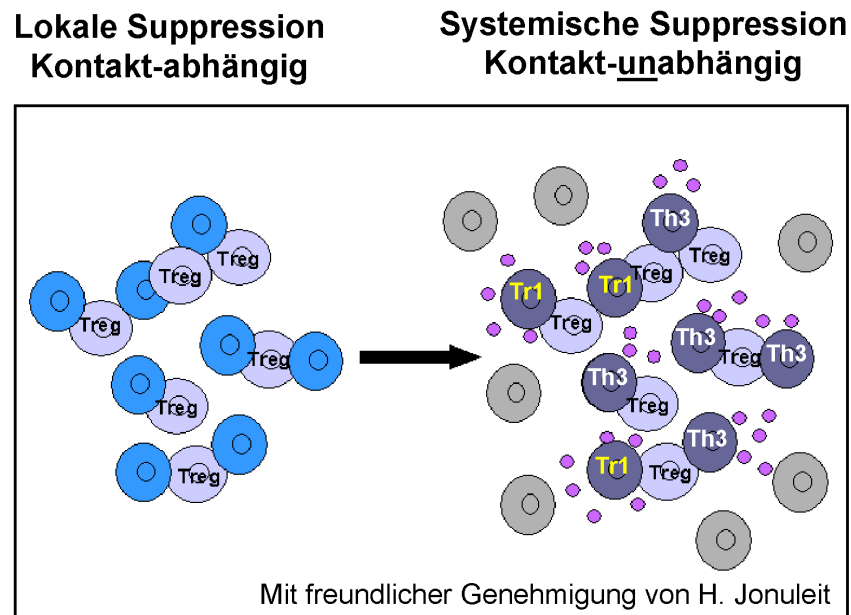
Ein weiterer, essentieller Mechanismus zur Toleranzinduktion konnte durch JONULEIT ET AL. identifiziert werden<sup>19</sup>. Die wiederholte Stimulation von naiven<sup>x</sup> CD4<sup>+</sup> Th durch unreife dendritische Zellen (DC) führte in diesen Experimenten zur Induktion IL-10-produzierender regulatorischer T-Zellen, die allerdings im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Tr1-Zellen strikt Zellkontakt-abhängig Effektorzellen supprimieren. Die Induktion dieser Tregs ist keine Konversion von CD4<sup>+</sup> Th in der Peripherie, sondern setzt einen Differenzierungsprozess naiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen voraus. Damit wurde erstmals gezeigt, dass DC nicht nur als "SENTINALS OF IMMUNITY" effizient T-Zellimmunität einleiten können, sondern auch essentiell in Abhängigkeit ihres Reifungsgrads zur peripheren Toleranz beitragen<sup>23</sup>.

---

<sup>x</sup> Als **naiv** bezeichnet man eine T-Zelle, die noch keinen Kontakt mit dem von ihr spezifisch erkannten Peptid-MHC-Komplex hatte.

Im Gegensatz zu der von löslichen Faktoren vermittelten Suppression durch Tr1- und Th3-Zellen, ist die Zellkontakt-vermittelte Suppression von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs zumindest *in vitro*, unabhängig von IL-10 und TGF-β<sup>83</sup>. Funktionelle CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs können sowohl aus IL-10- als auch aus TGF-β-defizienten Mäusen isoliert werden<sup>48;50</sup>. Im Gegensatz hierzu steht die Beobachtung, dass die durch CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs vermittelte Suppression bei entzündlichen Darmerkrankungen in Mäusen *in vivo*, eindeutig von der Produktion von IL-10 und TGF-β abhängig ist<sup>30;87</sup>. Diese auf den ersten Blick kontroversen Ergebnisse, lassen sich mit den Resultaten in dieser Arbeit und den Thesen zur "Infektiösen Toleranz" erklären<sup>51</sup>. So könnte die Regulation aktivierter oder autoaggressiver T-Zellen in der Peripherie durch zwei ineinandergreifende Prozesse erklärt werden. Nach einer zunächst kontaktabhängigen Suppression durch natürlich vorkommende CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs (nTregs) im Frühstadium der T-Zellaktivierung, folgt eine durch lösliche Faktoren wie IL-10 und TGF-β vermittelte systemische Inhibierung der autoaggressiven T-Zellen durch induzierte T-Helfersuppressorzellen<sup>101</sup> (Abb. 4.1). Eine Beteiligung von iTregs, induziert durch nTregs an der systemischen Immunregulation wurde durch eine kürzlich im Mausmodell publizierte Studie weiter gestützt<sup>102</sup>.

### Model der Infektiösen Toleranz



**Abbildung 4.1: Potentielle Wirkungsweise von nTregs und iTregs *in vivo***

Der Mechanismus der Suppression unterscheidet nTregs von iTregs<sup>101</sup>. Zur Etablierung einer systemischen Toleranzinduktion könnten jedoch beide Populationen essentiell sein. nTregs supprimieren lokal potentiell autoaggressive Effektor-T-Zellen und konvertieren diese zu sekundären iTregs. Diese könnten anschließend durch die Freisetzung von IL-10 und TGF- $\beta$  die systemische Suppression der T-Zellantwort vermitteln.

Ein besseres Verständnis der Funktionsweisen von T-Zellsubpopulationen ist maßgeblich für eine Optimierung von Therapieansätzen bei immunologisch relevanten Krankheiten. Die neuesten Erkenntnisse über die Interaktionen zwischen einzelnen T-Zellpopulationen aber auch zwischen T-Zellen und weiteren zellulären Mitgliedern des Immunsystems sind grundlegende Voraussetzungen zur effektiven Entwicklung neuer Strategien zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen, Allergien oder Tumoren. Ein wesentliches Ziel der derzeitigen Forschung ist daher die phänotypische und funktionelle Charakterisierung von Zellpopulationen die an der Regulation von Immunantworten beteiligt sind. Obwohl mit  $\alpha_4\beta_1$  und  $\alpha_4\beta_7$  zwei Integrine identifiziert werden konnten, deren Expression charakteristisch für distinkte Subpopulationen humaner CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs ist, konnten diese Marker nicht zur Identifizierung von Tregs in heterogenen Zellpopulationen eingesetzt werden, da CD4<sup>+</sup> Th ein vergleichbares Expressionsmuster der Integrine zeigten. Auch der Transkriptionsfaktor FoxP3 stellt in diesem Zusammenhang keinen optimalen

Marker dar, wird er doch nur Zellkern exprimiert und ist darüber hinaus, zumindest im humanen System, ein Aktivierungsmarker für alle CD4<sup>+</sup> T-Zellen<sup>103;104</sup>.

Da trotz umfangreicher phänotypischer Analysen kein Markermolekül identifiziert werden konnte, dass ausschließlich von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tregs und nicht von T-Helferzellen exprimiert wird, erfolgte ein Strategiewechsel und die Durchführung von differentiellen Proteomanalysen zur Identifizierung bislang unbekannter Proteine.

Verschiedene Technologien zur Analyse von differentiell exprimierten Proteinen bzw. Genen wurden bereits beschrieben<sup>62;105</sup>. Wir entschieden uns für die Durchführung von vergleichenden Proteomanalysen, da diese Methodik im Vergleich zu klassischen mRNA-MIROARRAYS auch die Identifizierung von Protein-Isoformen und –Splicevarianten zulässt. Da regulatorische T-Zellen erst nach Aktivierung funktionell aktiv sind, wurden für diese Analysen die Proteinmuster von ruhenden und aktivierten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs im Vergleich zu CD4<sup>+</sup> Th untersucht. Die Proteome der T-Zellpopulationen wurden in hochauflösenden 2D-SDS-PAG(E)lektrophoresen nach einer modifizierten Methode von KLOSE ET AL.<sup>106;107</sup> aufgetrennt und die einzelnen Proteine mittels MALDI-Massenspektrometrie charakterisiert. Im Durchschnitt konnten 1600 Proteine pro Gel identifiziert werden. Mehr als 90% dieser Proteine waren erwartungsgemäß in allen T-Zellpopulationen identisch.

Membranassoziierte Proteine, Transmembranproteine und Rezeptoren trennen sich aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften in der Regel nur sehr schlecht in 2D-Gelen, mit isoelektrischer Fokussierung in der ersten Dimension und SDS-PAGE in der zweiten Dimension, auf. Doch obwohl die verwendete Methode der Proteomanalyse folglich fast ausschließlich die Auftrennung zytosolischer Komponenten zuließ, konnten neun Proteine identifiziert werden, die Spender-unabhängig in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs deutlich höher exprimiert waren, als dies in den CD4<sup>+</sup> Th der Fall war. Das am deutlichsten differentiell exprimierte Protein in diesen Analysen war Galectin-10.

Sowohl ruhende als auch aktivierte CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs zeigten eine hohe Expression von Galectin-10, wohingegen in CD4<sup>+</sup> Th dieses Protein kaum zu detektieren war. Bislang war die Expression von Galectin-10 ausschließlich aus humanen eosinophilen und basophilen Granulozyten bekannt<sup>93;94;96</sup>. In humanen Eosinophilen bildet Galectin-10 einen Hauptbestandteil des Gesamtproteins, mit einem Anteil von 7-10% und bildet hexagonale, bipyramidale Kristalle (CHARCOT-LEYDEN-



CRYSTAL)<sup>93;95</sup>. Da Galectin-10 von diesen Zellen sezerniert wird, war es schon früher als Nachweis der Beteiligung von Eosinophilen und Basophilen an allergischen Entzündungen im Sputum von Patienten verwendet worden<sup>91;92;96</sup>. Die Expression von Galectin-10 in humanen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs war dagegen völlig neu. Allerdings konnte die Bildung von Proteinkristallen nicht beobachtet werden. Darüber hinaus konnte eine Oberflächenexpression oder Sezernierung dieses Proteins durch CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs ausgeschlossen werden, was eine strikt intrazelluläre Expression von Galectin-10 andeutete.

Obwohl Galectin-10 bereits vor über 100 Jahren zum ersten Mal beschrieben wurde, war dessen Funktion bisher völlig unbekannt<sup>91;92;94</sup>. Abgesehen von der Interaktion mit einer Lysophospholipase in Eosinophilen, blieb die Regulation und Funktion dieses Protein ungeklärt<sup>108</sup>. Die Beobachtung, dass humane CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs Galectin-10 exprimieren ist ungewöhnlich. Im Gegensatz zu anderen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs assoziierten Markern wie CD25, CTLA4 oder FoxP3 ist Galectin-10 kein T-Zellaktivierungsmarker und kann selbst nach Aktivierung des Immunsystems wertvoll zur Unterscheidung von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs und CD4<sup>+</sup> Th sein, selbst wenn bereits aktivierte CD4<sup>+</sup> T-Effektorzellen gebildet worden sind.

Insgesamt konnten drei Isoformen von Galectin-10 in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs identifiziert werden, die sich in ihrer isoelektrischen Fokussierung (pI) und ihrem Molekulargewicht unterscheiden (Abb. 3.18). Die Expression der markanten Isoform A (16kD; pI6,5) ist hierbei bis zu 40-fach höher in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs, verglichen zu CD4<sup>+</sup> Th exprimiert. Die beiden anderen Isoformen werden fast ausschließlich von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs gebildet.

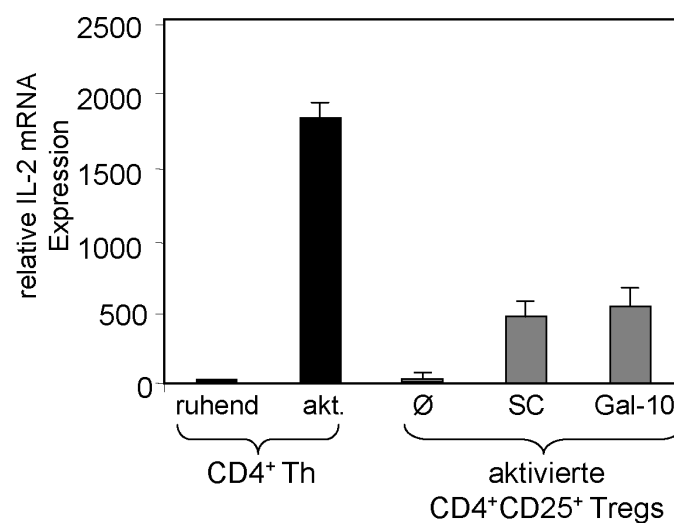
Die Färbung von Galectin-10 auf Einzelzellebene zeigte zwei Subpopulationen, die sich in ihrer Expressionsintensität unterschieden. Diese Subpopulationen ließen sich den  $\alpha_4\beta_1^+$  und  $\alpha_4\beta_7^+$  Tregs zuordnen. Eine bis zu siebenfach höhere Expression von Galectin-10 konnte in  $\alpha_4\beta_7^+$  Tregs im Vergleich zu  $\alpha_4\beta_1^+$  Tregs festgestellt werden (Abb. 3.23).

Um eine mögliche funktionelle Rolle von Galectin-10 in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs zu analysieren, wurde dessen Expression durch spezifische siRNA (siRNA = SMALL INTERFERING RNA) inhibiert (RNA-Interferenz)<sup>xi</sup>. Die verminderte Expression von

---

<sup>xi</sup> Unter **RNA-Interferenz (RNAi)**, oder auch *RNA SILENCING*) versteht man einen natürlichen Mechanismus in eukaryotischen Zellen, der die Genexpression einzelner Gene hemmt. Durch Verwendung von spezifischer siRNA (SMALL INTERFERING RNA) ist eine sequenzspezifische, post-transkriptionelle Inhibition einzelner Gene möglich.

Galectin-10 auf mRNA- und Proteinebene hatte eine teilweise Aufhebung des anergen Phänotyps und der suppressiven Eigenschaften von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs zur Folge. Darüber hinaus führte die Blockade der Galectin-10-Synthese zu einer gesteigerten Zytokinproduktion in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs und den kokultivierten CD4<sup>+</sup> Th. Damit kann postuliert werden, dass Galectin-10 wesentlich für den funktionellen Phänotyp humaner CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs ist (Abb. 3.27). Die messbare Induktion von IL-2-mRNA verdeutlicht zusätzlich, dass Galectin-10 für die Anergie von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs wesentlich ist (Abb. 4.2). Allerdings muss betont werden, dass die Elektroporation selbst schon – wenn auch schwächer – zur IL-2-Induktion beiträgt.

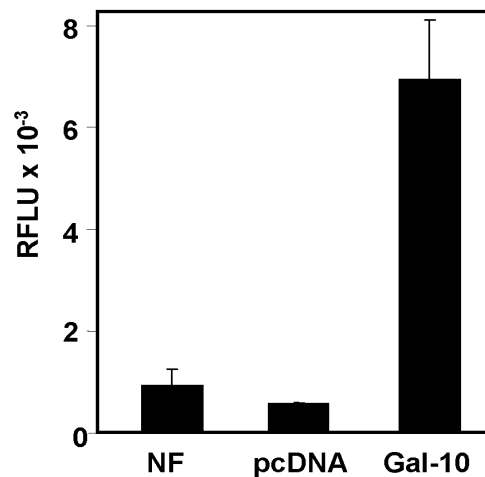


**Abbildung 4.2: IL-2 mRNA-Expression in transfizierten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs und unbehandelten CD4<sup>+</sup> Th**

Frisch isolierte CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs blieben unbehandelt bzw. wurden mit 1 µM Kontroll-siRNA (SC) oder Galectin-10- (Gal-10) spezifischer siRNA transfiziert. 48 Stunden nach Transfektion wurden CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs und unbehandelte CD4<sup>+</sup> Th für 4 Stunden mit 1 µg/ml anti-CD3 und 2 µg/ml anti-CD28 mAk aktiviert und anschließend die präparierte mRNA für qRT-PCR-Analysen eingesetzt. Die IL-2 mRNA-Expression wurde normalisiert auf die Expression des HOUSEKEEPING GENES EF-1α und ruhende CD4<sup>+</sup> Th dienten als Bezugsgröße zur Berechnung der relativen Expression.

Hinsichtlich der Regulation von Galectin-10 konnte eine durch Buttersäure induzierbare Expression von Galectin-10 in promyelotischen Leukämiezellen beobachtet werden<sup>109;110</sup>. Die Zugabe von Buttersäure zu Kulturen von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs und / oder CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen zeigte jedoch keinen Einfluss auf deren funktionelle Eigenschaften bzw. der Galectin-10-Expression (nicht gezeigte Daten). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass Galectin-10 in Tregs anders reguliert wird, als es für Granulozyten beschrieben wurde. Ein weiterer Hinweis zur Funktion von

Galectin-10 in humanen T-Zellen beschrieb eine Arbeit, in der eine verstärkte Expression dieses Proteins in stimulierten Th2-Gedächtniszellen gezeigt werden konnte<sup>111</sup>. Da die Bildung von Tregs und Th2-Zellen einige Gemeinsamkeiten aufweist, könnte dieser Befund darauf hinweisen, dass Galectin-10 für die Bildung beider T-Zellpopulationen von Bedeutung ist. Eine ektopische Expression von Galectin-10 könnte hierbei wichtige Hinweise geben. Allerdings führte die Transfektion von CD4<sup>+</sup> Th mit einem Galectin-10 codierenden Vektor unmittelbar zur Aktivierung von Caspasen und zur Induktion von Apoptose in diesen Zellen<sup>112;113</sup> (Abb. 4.3). D.h., die unregulierte, induzierte Expression von Galectin-10 in CD4<sup>+</sup> Th scheint mit der Homöostase der Zellen unvereinbar zu sein.



**Abbildung 4.3: Erhöhte Caspaseaktivität in CD4<sup>+</sup> Th nach Transfektion mit Galectin-10**

CD4<sup>+</sup> Th wurden mit 2,5 µg des Expressionskonstruktes für Galectin-10 (Gal-10) bzw. eines Kontrollkonstrukts (pc-DNA 3.1) transfiziert. Als weitere Kontrolle dienten Zellen, die nur mit Nukleofektionslösung behandelt wurden (NF). Nach Beseitigung der toten Zellen mittels Annexin-gekoppelten MICROBEADS und 15-stündiger Inkubation, wurde die Caspase-3/7-Aktivität photometrisch ermittelt. Zur Bestimmung der Netto-Caspase-Aktivität wurde die Aktivität von unbehandelten CD4<sup>+</sup> Th von allen Messdaten subtrahiert. RFLU = REALTIVE FLUORESCENCE LIGHT UNITS.

Ein spezielles transkriptionelles Umfeld könnte für die Galectin-10-Bildung und deren funktioneller Eigenschaften in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs obligatorisch sein, in Abwesenheit solcher Strukturen scheint die Expression von Galectin-10 eher proapoptotisch zu wirken. Diese ambivalenten Wirkungsweisen sind für verschiedene Mitglieder der Galectin-Familie bekannt<sup>114</sup>. So fördern oder inhibieren z.B. Galectin-1 und -3 je nach Konzentration die Proliferation von T-Zellen<sup>114-116</sup>. PERILLO ET AL.

zeigten zudem, dass dimeres Galectin-1, welches von Bindegewebszellen des Thymus und der Lymphknoten exprimiert wird, an der Induktion von Apoptose in reifen T-Zellen beteiligt ist<sup>117</sup>. Im Gegensatz dazu, führt eine verstärkte Produktion und Sezernierung von monomerem Galectin-1 zu einer Aufhebung der T-Zell-Effektorfunktion durch einen Zellzyklusarrest im S- und G2/M-Stadium, wobei Galectin-1 hier als autokriner Negativregulator fungiert<sup>115;118;119</sup>. Des Weiteren zeigte sich, dass Galectin-1 in der Lage ist, eine experimentelle autoimmune Uveitis (EAU) zu supprimieren, indem es die Ausbildung von Th2- und Treg-vermittelten anti-inflammatorischen Immunantworten fördert<sup>120</sup>. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen verhinderte ein adoptiver Transfer von CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus Galectin-1-behandelten Mäusen die Entwicklung einer aktiven EAU in syngenen Empfängern. Hierbei scheint Galectin-1 die Expansion von Subpopulationen IL-10- und TGF- $\beta$ -produzierender CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> iTregs zu fördern. Vor kurzem konnte eine direkte Rolle von Galectin-1 für die Funktion von Tregs belegt werden<sup>121</sup>. In diesen Untersuchungen führte die Blockierung von Galectin-1 durch spezifische mAk zu einer Abnahme der suppressiven Aktivität von humanen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs *in vitro* und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs aus Galectin-1-defizienten Mäusen weisen signifikant schwächere suppressive Eigenschaften auf als Tregs aus Wildtyp Mäusen.

Es gibt Hinweise, dass Galectin-3 ebenfalls in ambivalenter Weise agieren kann, durch Schutz von T-Zellen vor Apoptose oder Induktion Apoptose, je nach dem ob das Protein intrazellulär exprimiert wird oder seine Funktion extrazellulär vermittelt<sup>116;122</sup>. Welches Galectin oder Galectin-10-ähnliches Protein ein Analog zum humanen Galectin-10 in der Maus darstellt, muss jedoch noch erforscht werden. Die Identifizierung funktionell relevanter Proteine in humanen Tregs ist nur der erste Schritt. Ziel muss eine Charakterisierung von weiteren Proteinen in Bezug auf ihre Funktion im molekularen Netzwerk der Tregs sein. Die Identifikation von Bindungspartnern und deren Eingliederung in funktionelle Abläufe sind zukünftige Etappen, in die Ergebnisse der aktuellen Forschung integriert werden müssen.

Zwei kürzlich veröffentlichte Arbeiten zeigten, dass WASP (WISKOTT-ALDRICH SYNDROME PROTEIN) für CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs essentiell zu sein scheint, belegt durch schwere Autoimmunerkrankungen in WASP-defizienten Menschen und Tieren, die mit einer gestörten Entwicklung und Funktion der Tregs korreliert<sup>123;124</sup>.

Die überraschende Entdeckung von BOPP ET AL., dass es zur Ausbildung von GAP-JUNCTIONS<sup>xii</sup> zwischen T-Effektorzellen und Tregs kommt, die wesentlich für die zellvermittelte Suppression sind, zeigt erneut, dass der Mechanismus der Suppression noch keineswegs im Detail aufgeklärt ist<sup>125</sup>. Bei dem Zell-Zellkontakt kommt es zur Übertragung von cAMP<sup>xiii</sup> und möglicherweise weiteren essentiellen Faktoren von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs auf CD4<sup>+</sup> Th. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs enthalten, verglichen zu CD4<sup>+</sup> Th sehr hohe Mengen an cAMP, ein klassischer "SECOND MESSENGER"<sup>xiv</sup> mit anti-proliferativer Wirkung in T-Zellen. Die Blockierung der cAMP-Übertragung durch geeignete Antagonisten bzw. GAP JUNCTION-Inhibitoren, führt zur vollständigen Aufhebung der Suppression. Zukünftige Analysen müssen zeigen, ob die Regulation von cAMP und Galectin-10 in einem molekularen Zusammenhang stehen.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Galectin-10 essentiell für die Funktion von humanen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs ist und innerhalb der T-Zellen fast ausschließlich von den CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs exprimiert wird. Die Blockade der Galectin-10-Bildung durch RNAi führte zur Aufhebung der Anergie und einer signifikanten Verminderung der suppressiven Eigenschaften von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs. Sowohl die weitere Charakterisierung von Galectin-10 als auch die Identifizierung von neuen Bindungspartnern und analogen Proteinen in anderen Spezies, sollten in zukünftigen Studien unser Verständnis der physiologischen Rolle von Galectin-10 und dessen Bedeutung in der T-Zellregulation wesentlich verbessern.

---

<sup>xii</sup> **GAP JUNCTIONS** sind Zell-Zell-Kanäle, die durch kanalbildende Proteinkomplexe initiiert werden können und somit die zytoplasmatischen Kompartimente benachbarter oder in Kontakt tretender Zellen direkt miteinander verbinden.

<sup>xiii</sup> Zyklisches Adenosinmonophosphat (**cAMP**) ist ein vom Adenosintriphosphat abgeleitetes körpereigenes Molekül, das als **SECOND MESSENGER** an der Signaltransduktion beteiligt ist und insbesondere zu einer Aktivierung von Proteinkinasen führt.

<sup>xiv</sup> Als **SECOND MESSENGER** bezeichnet man intrazelluläre chemische Substanzen, deren Konzentration als Antwort auf ein von außen kommendes (extrazelluläres) Primärsignal (**FIRST MESSENGER**) verändert wird. Hierbei steht der **SECOND MESSENGER** häufig nur am Anfang einer längeren intrazellulären Signalkette, die zu einer Zellantwort auf das Primärsignal führt.

## 5. Zusammenfassung

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs) sind essentiell an der Homöostase des Immunsystems beteiligt, indem sie eine antigenspezifische Toleranzinduktion in der Peripherie vermitteln und vor der Entstehung von Autoimmunerkrankungen schützen. Darüber hinaus sind diese Zellen wesentlich an der Kontrolle von Allergien, Infektionen und Tumoren beteiligt.

Innerhalb dieser Arbeit konnten zwei bisher unbekannte Subpopulationen humaner CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs, isoliert aus dem peripheren Blut des Menschen, nachgewiesen werden. Diese Subpopulationen unterscheiden sich in ihrer Oberflächenexpression der Integrine  $\alpha_4\beta_1$  und  $\alpha_4\beta_7$ . Beide Treg-Subpopulationen supprimieren kokultivierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen Zellkontakt-abhängig und konvertieren gleichzeitig einen Teil dieser Zellen in sekundäre Suppressorzellen (iTregs).  $\alpha_4\beta_1^+$  Tregs induzieren TGF- $\beta$ -sezernierende iTregs,  $\alpha_4\beta_7^+$  Tregs führen zur Bildung von IL-10-produzierenden iTregs.

Differentielle Proteomanalysen von humanen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs im Vergleich zu CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Helferzellen führten zur Identifizierung von Galectin-10 als Markerprotein, das fast ausschließlich von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs exprimiert wird, und nicht von CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen. Galectin-10 ist ein intrazelluläres Protein, das essentiell für die funktionellen Eigenschaften humaner CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs ist. Die Blockade der Galectin-10-Bildung in den CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs durch RNA-Interferenz führte zu wesentlichen funktionellen Veränderungen der Tregs. In Abwesenheit von Galectin-10 verlieren humane CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs ihre suppressiven Eigenschaften und ihren anergischen Phänotyp. Somit konnte mit Galectin-10 erstmals ein spezifischer Marker für humane Tregs identifiziert werden, der wesentlich für den funktionellen Phänotyp dieser Regulatoren peripherer T-Zelltoleranz ist.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Trinchieri G, Sher A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat.Rev.Immunol.* 2007;7:179-190.
2. Fujita T. Evolution of the lectin-complement pathway and its role in innate immunity. *Nat.Rev.Immunol.* 2002;2:346-353.
3. Arstila TP, Casrouge A, Baron V et al. A direct estimate of the human alphabeta T cell receptor diversity. *Science* 1999;286:958-961.
4. Wucherpfennig KW, Strominger JL. Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* 1995;80:695-705.
5. Kersh GJ, Allen PM. Structural basis for T cell recognition of altered peptide ligands: a single T cell receptor can productively recognize a large continuum of related ligands. *J.Exp.Med.* 1996;184:1259-1268.
6. Mason D. A very high level of crossreactivity is an essential feature of the T-cell receptor. *Immunol.Today* 1998;19:395-404.
7. Kisielow P, von BH. Negative and positive selection of immature thymocytes: timing and the role of the ligand for alpha beta T cell receptor. *Semin.Immunol.* 1990;2:35-44.
8. Starr TK, Jameson SC, Hogquist KA. Positive and negative selection of T cells. *Annu.Rev.Immunol.* 2003;21:139-176.
9. Kappler JW, Roehm N, Marrack P. T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell* 1987;49:273-280.
10. Palmer E. Negative selection--clearing out the bad apples from the T-cell repertoire. *Nat.Rev.Immunol.* 2003;3:383-391.
11. Derbinski J, Schulte A, Kyewski B, Klein L. Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nat.Immunol.* 2001;2:1032-1039.

12. Mariathasan S, Jones RG, Ohashi PS. Signals involved in thymocyte positive and negative selection. *Semin.Immunol.* 1999;11:263-272.
13. Mason D. Some quantitative aspects of T-cell repertoire selection: the requirement for regulatory T cells. *Immunol.Rev.* 2001;182:80-88.
14. Bouneaud C, Kourilsky P, Bousso P. Impact of negative selection on the T cell repertoire reactive to a self-peptide: a large fraction of T cell clones escapes clonal deletion. *Immunity.* 2000;13:829-840.
15. Miller JF, Heath WR. Self-ignorance in the peripheral T-cell pool. *Immunol.Rev.* 1993;133:131-150.
16. Alferink J, Tafuri A, Vestweber D et al. Control of neonatal tolerance to tissue antigens by peripheral T cell trafficking. *Science* 1998;282:1338-1341.
17. Kurts C, Sutherland RM, Davey G et al. CD8 T cell ignorance or tolerance to islet antigens depends on antigen dose. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1999;96:12703-12707.
18. Andre I, Gonzalez A, Wang B et al. Checkpoints in the progression of autoimmune disease: lessons from diabetes models. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1996;93:2260-2263.
19. Jonuleit H, Schmitt E, Schuler G, Knop J, Enk AH. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J.Exp.Med.* 2000;192:1213-1222.
20. Jonuleit H, Schmitt E, Steinbrink K, Enk AH. Dendritic cells as a tool to induce anergic and regulatory T cells. *Trends Immunol.* 2001;22:394-400.
21. Mondino A, Whaley CD, DeSilva DR et al. Defective transcription of the IL-2 gene is associated with impaired expression of c-Fos, FosB, and JunB in anergic T helper 1 cells. *J.Immunol.* 1996;157:2048-2057.
22. Janeway C.A., Travers P., Walport M., and Shlomchik M. *Immunobiology.* 5<sup>th</sup> edition. 2001. Garland Publishing



23. Kubach J, Becker C, Schmitt E et al. Dendritic cells: sentinels of immunity and tolerance. *Int.J.Hematol.* 2005;81:197-203.
24. Mahnke K, Schmitt E, Bonifaz L, Enk AH, Jonuleit H. Immature, but not inactive: the tolerogenic function of immature dendritic cells. *Immunol.Cell Biol.* 2002;80:477-483.
25. Akbari O, Stock P, DeKruyff RH, Umetsu DT. Role of regulatory T cells in allergy and asthma. *Curr.Opin.Immunol.* 2003;15:627-633.
26. Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J.Exp.Med.* 2004;199:971-979.
27. Lindley S, Dayan CM, Bishop A et al. Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 2005;54:92-99.
28. Ehrenstein MR, Evans JG, Singh A et al. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy. *J.Exp.Med.* 2004;200:277-285.
29. Becker C, Stoll S, Bopp T, Schmitt E, Jonuleit H. Regulatory T cells: present facts and future hopes. *Med.Microbiol.Immunol.* 2006;195:113-124.
30. Weiner HL. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol.Rev.* 2001;182:207-214.
31. Roncarolo MG, Bacchetta R, Bordignon C, Narula S, Levings MK. Type 1 T regulatory cells. *Immunol.Rev.* 2001;182:68-79.
32. Jonuleit H, Schmitt E, Kakirman H et al. Infectious tolerance: human CD25(+) regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4(+) T helper cells. *J.Exp.Med.* 2002;196:255-260.
33. Seddon B, Mason D. The third function of the thymus. *Immunol.Today* 2000;21:95-99.

34. Itoh M, Takahashi T, Sakaguchi N et al. Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J.Immunol.* 1999;162:5317-5326.
35. Shevach EM. CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat.Rev.Immunol.* 2002;2:389-400.
36. Thornton AM, Shevach EM. Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J.Immunol.* 2000;164:183-190.
37. Shevach EM, McHugh RS, Piccirillo CA, Thornton AM. Control of T-cell activation by CD4+ CD25+ suppressor T cells. *Immunol.Rev.* 2001;182:58-67.
38. Gershon RK, Kondo K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* 1970;18:723-737.
39. Gershon RK, Kondo K. Infectious immunological tolerance. *Immunology* 1971;21:903-914.
40. Knop J, Stremmer R, Neumann C, De ME, Macher E. Interferon inhibits the suppressor T cell response of delayed-type hypersensitivity. *Nature* 1982;296:757-759.
41. Kronenberg M, Steinmetz M, Kobori J et al. RNA transcripts for I-J polypeptides are apparently not encoded between the I-A and I-E subregions of the murine major histocompatibility complex. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1983;80:5704-5708.
42. Green DR, Webb DR. Saying the 'S' word in public. *Immunol.Today* 1993;14:523-525.
43. Moller G. Do suppressor T cells exist? *Scand.J.Immunol.* 1988;27:247-250.
44. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-

- chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J.Immunol.* 1995;155:1151-1164.
45. Jonuleit H, Schmitt E, Stassen M et al. Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J.Exp.Med.* 2001;193:1285-1294.
  46. Read S, Malmstrom V, Powrie F. 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.* 2000;192:295-302.
  47. Nakamura K, Kitani A, Strober W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J.Exp.Med.* 2001;194:629-644.
  48. Piccirillo CA, Letterio JJ, Thornton AM et al. CD4(+)CD25(+) regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor beta1 production and responsiveness. *J.Exp.Med.* 2002;196:237-246.
  49. Maloy KJ, Salaun L, Cahill R et al. CD4+CD25+ T(R) cells suppress innate immune pathology through cytokine-dependent mechanisms. *J.Exp.Med.* 2003;197:111-119.
  50. Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J.Exp.Med.* 1998;188:287-296.
  51. Qin S, Cobbold SP, Pope H et al. "Infectious" transplantation tolerance. *Science* 1993;259:974-977.
  52. Dieckmann D, Bruett CH, Ploettner H, Lutz MB, Schuler G. Human CD4(+)CD25(+) regulatory, contact-dependent T cells induce interleukin 10-producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells. *J.Exp.Med.* 2002;196:247-253.

53. Chase, M. Inhibition of experimental drug allergy by prior feeding of the sensitizing agent. *J. Clin. Invest.* 61, 257-259. 1946.
54. Inobe J, Slavin AJ, Komagata Y et al. IL-4 is a differentiation factor for transforming growth factor-beta secreting Th3 cells and oral administration of IL-4 enhances oral tolerance in experimental allergic encephalomyelitis. *Eur.J.Immunol.* 1998;28:2780-2790.
55. Groux H, O'Garra A, Bigler M et al. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 1997;389:737-742.
56. Moore KW, de Waal MR, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu.Rev.Immunol.* 2001;19:683-765.
57. Thornton AM, Donovan EE, Piccirillo CA, Shevach EM. Cutting edge: IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4+CD25+ T cell suppressor function. *J.Immunol.* 2004;172:6519-6523.
58. Hoffmann P, Eder R, Kunz-Schughart LA, Andreesen R, Edinger M. Large-scale in vitro expansion of polyclonal human CD4(+)CD25high regulatory T cells. *Blood* 2004;104:895-903.
59. Lin CH, Hunig T. Efficient expansion of regulatory T cells in vitro and in vivo with a CD28 superagonist. *Eur.J.Immunol.* 2003;33:626-638.
60. Boyman O, Kovar M, Rubinstein MP, Surh CD, Sprent J. Selective stimulation of T cell subsets with antibody-cytokine immune complexes. *Science* 2006;311:1924-1927.
61. Yamazaki S, Iyoda T, Tarbell K et al. Direct expansion of functional CD25+ CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *J.Exp.Med.* 2003;198:235-247.
62. McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA et al. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity.* 2002;16:311-323.

63. Sakaguchi S. Naturally arising CD4<sup>+</sup> regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu.Rev.Immunol.* 2004;22:531-562.
64. Valzasina B, Guiducci C, Dislich H et al. Triggering of OX40 (CD134) on CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells blocks their inhibitory activity: a novel regulatory role for OX40 and its comparison with GITR. *Blood* 2005;105:2845-2851.
65. Lepault F, Gagnerault MC. Characterization of peripheral regulatory CD4<sup>+</sup> T cells that prevent diabetes onset in nonobese diabetic mice. *J.Immunol.* 2000;164:240-247.
66. Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y, Sakaguchi S. Stimulation of CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat.Immunol.* 2002;3:135-142.
67. Takeda I, Ine S, Killeen N et al. Distinct roles for the OX40-OX40 ligand interaction in regulatory and nonregulatory T cells. *J.Immunol.* 2004;172:3580-3589.
68. Ermann J, Hoffmann P, Edinger M et al. Only the CD62L<sup>+</sup> subpopulation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells protects from lethal acute GVHD. *Blood* 2005;105:2220-2226.
69. Singh B, Read S, Asseman C et al. Control of intestinal inflammation by regulatory T cells. *Immunol.Rev.* 2001;182:190-200.
70. Jonuleit H, Schmitt E. The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. *J.Immunol.* 2003;171:6323-6327.
71. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nat.Immunol.* 2003;4:330-336.
72. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003;299:1057-1061.
73. Khattri R, Cox T, Yasayko SA, Ramsdell F. An essential role for Scurfin in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatory cells. *Nat.Immunol.* 2003;4:337-342.

74. Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA et al. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat.Genet.* 2001;27:68-73.
75. Wildin RS, Smyk-Pearson S, Filipovich AH. Clinical and molecular features of the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome. *J.Med.Genet.* 2002;39:537-545.
76. Gambineri E, Torgerson TR, Ochs HD. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis. *Curr.Opin.Rheumatol.* 2003;15:430-435.
77. Schubert LA, Jeffery E, Zhang Y, Ramsdell F, Ziegler SF. Scurfin (FOXP3) acts as a repressor of transcription and regulates T cell activation. *J.Biol.Chem.* 2001;276:37672-37679.
78. Yagi H, Nomura T, Nakamura K et al. Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int.Immunol.* 2004;16:1643-1656.
79. Zheng Y, Rudensky AY. Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. *Nat.Immunol.* 2007;8:457-462.
80. Stassen M, Fondel S, Bopp T et al. Human CD25+ regulatory T cells: two subsets defined by the integrins alpha 4 beta 7 or alpha 4 beta 1 confer distinct suppressive properties upon CD4+ T helper cells. *Eur.J.Immunol.* 2004;34:1303-1311.
81. Kubach J, Lutter P, Bopp T et al. Human CD4+CD25+ regulatory T cells: proteome analysis identifies galectin-10 as a novel marker essential for their energy and suppressive function. *Blood* 2007
82. Bonner WA, Hulett HR, Sweet RG, Herzenberg LA. Fluorescence activated cell sorting. *Rev.Sci.Instrum.* 1972;43:404-409.

83. Shevach EM, McHugh RS, Piccirillo CA, Thornton AM. Control of T-cell activation by CD4+ CD25+ suppressor T cells. *Immunol.Rev.* 2001;182:58-67.
84. Jonuleit H, Schmitt E. Regulatory T-cells in antitumor therapy: isolation and functional testing of CD4+CD25+ regulatory T-cells. *Methods Mol.Med.* 2005;109:285-296.
85. Berlin C, Berg EL, Briskin MJ et al. Alpha 4 beta 7 integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1. *Cell* 1993;74:185-195.
86. Berlin C, Bargatze RF, Campbell JJ et al. alpha 4 integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow. *Cell* 1995;80:413-422.
87. Asseman C, Mauze S, Leach MW, Coffman RL, Powrie F. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J.Exp.Med.* 1999;190:995-1004.
88. Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA et al. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat.Genet.* 2001;27:68-73.
89. Fontenot JD, Rudensky AY. Molecular aspects of regulatory T cell development. *Semin.Immunol.* 2004;16:73-80.
90. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat.Genet.* 2001;27:20-21.
91. Charcot, JM and Robin, C. Observation de Leucocythiémie. *CR.Mem.Soc.Biol.* 5, 44. 1853.
92. Leyden, E. Zur Kenntnis des Bronchialen-Asthma. *Arch.Pathol.Anat.* 54, 324. 1872.
93. Ackerman SJ, Weil GJ, Gleich GJ. Formation of Charcot-Leyden crystals by human basophils. *J.Exp.Med.* 1982;155:1597-1609.

94. Archer GT, Blackwood A. Formation of Charcot-Leyden crystals in human eosinophils and basophils and study of the composition of isolated crystals. *J.Exp.Med.* 1965;122:173-180.
95. Ackerman SJ, Loegering DA, Gleich GJ. The human eosinophil Charcot-Leyden crystal protein: biochemical characteristics and measurement by radioimmunoassay. *J.Immunol.* 1980;125:2118-2126.
96. Ackerman SJ, Corrette SE, Rosenberg HF et al. Molecular cloning and characterization of human eosinophil Charcot-Leyden crystal protein (lysophospholipase). Similarities to IgE binding proteins and the S-type animal lectin superfamily. *J.Immunol.* 1993;150:456-468.
97. Suri-Payer E, Amar AZ, Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells. *J.Immunol.* 1998;160:1212-1218.
98. Lehmann J, Huehn J, de la RM et al. Expression of the integrin alpha Ebeta 7 identifies unique subsets of CD25+ as well as. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2002;99:13031-13036.
99. Berg EL, Goldstein LA, Jutila MA et al. Homing receptors and vascular addressins: cell adhesion molecules that direct lymphocyte traffic. *Immunol.Rev.* 1989;108:5-18.
100. Aspod C, Czerkinsky C, Durand A, Stefanutti A, Thivolet C. alpha4 integrins and L-selectin differently orchestrate T-cell activity during diabetes prevention following oral administration of CTB-insulin. *J.Autoimmun.* 2002;19:223-232.
101. Stassen M, Schmitt E, Jonuleit H. Human CD(4+)CD(25+) regulatory T cells and infectious tolerance. *Transplantation* 2004;77:S23-S25.
102. Qiao M, Thornton AM, Shevach EM. CD4+ CD25+ regulatory T cells render naive CD4+. *Immunology* 2007;120:447-455.



103. Ziegler SF. FOXP3: not just for regulatory T cells anymore. *Eur.J.Immunol.* 2007;37:21-23.
104. Allan SE, Crome SQ, Crellin NK et al. Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *Int.Immunol.* 2007;19:345-354.
105. Mitchell TC, Hildeman D, Kedl RM et al. Immunological adjuvants promote activated T cell survival via induction of Bcl-3. *Nat.Immunol.* 2001;2:397-402.
106. Klose J, Kobalz U. Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. *Electrophoresis* 1995;16:1034-1059.
107. Weingarten P, Lutter P, Wattenberg A et al. Application of proteomics and protein analysis for biomarker and target finding for immunotherapy. *Methods Mol.Med.* 2005;109:155-174.
108. Ackerman SJ, Liu L, Kwatia MA et al. Charcot-Leyden crystal protein (galectin-10) is not a dual function galectin with lysophospholipase activity but binds a lysophospholipase inhibitor in a novel structural fashion. *J.Biol.Chem.* 2002;277:14859-14868.
109. Dyer KD, Rosenberg HF. Transcriptional regulation of galectin-10 (eosinophil Charcot-Leyden crystal protein): a GC box (-44 to -50) controls butyric acid induction of gene expression. *Life Sci.* 2001;69:201-212.
110. Gomolin HI, Yamaguchi Y, Paulpillai AV et al. Human eosinophil Charcot-Leyden crystal protein: cloning and characterization of a lysophospholipase gene promoter. *Blood* 1993;82:1868-1874.
111. Wang YH, Ito T, Wang YH et al. Maintenance and polarization of human TH2 central memory T cells by thymic stromal lymphopoietin-activated dendritic cells. *Immunity.* 2006;24:827-838.

112. Garcia-Calvo M, Peterson EP, Rasper DM et al. Purification and catalytic properties of human caspase family members. *Cell Death.Differ.* 1999;6:362-369.
113. Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA et al. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 1995;376:37-43.
114. Rubinstein N, Ilarregui JM, Toscano MA, Rabinovich GA. The role of galectins in the initiation, amplification and resolution of the inflammatory response. *Tissue Antigens* 2004;64:1-12.
115. Vespa GN, Lewis LA, Kozak KR et al. Galectin-1 specifically modulates TCR signals to enhance TCR apoptosis but inhibit IL-2 production and proliferation. *J.Immunol.* 1999;162:799-806.
116. Yang RY, Hsu DK, Liu FT. Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1996;93:6737-6742.
117. Perillo NL, Pace KE, Seilhamer JJ, Baum LG. Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. *Nature* 1995;378:736-739.
118. Allione A, Wells V, Forni G, Mallucci L, Novelli F. Beta-galactoside-binding protein (beta GBP) alters the cell cycle, up-regulates expression of the alpha- and beta-chains of the IFN-gamma receptor, and triggers IFN-gamma-mediated apoptosis of activated human T lymphocytes. *J.Immunol.* 1998;161:2114-2119.
119. Blaser C, Kaufmann M, Muller C et al. Beta-galactoside-binding protein secreted by activated T cells inhibits antigen-induced proliferation of T cells. *Eur.J.Immunol.* 1998;28:2311-2319.
120. Toscano MA, Commodaro AG, Ilarregui JM et al. Galectin-1 suppresses autoimmune retinal disease by promoting concomitant th2- and T regulatory-mediated anti-inflammatory responses. *J.Immunol.* 2006;176:6323-6332.

121. Garin MI, Chu CC, Golshayan D et al. Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells. *Blood* 2006
122. Fukumori T, Takenaka Y, Yoshii T et al. CD29 and CD7 mediate galectin-3-induced type II T-cell apoptosis. *Cancer Res.* 2003;63:8302-8311.
123. Marangoni F, Trifari S, Scaramuzza S et al. WASP regulates suppressor activity of human and murine CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) natural regulatory T cells. *J.Exp.Med.* 2007;204:369-380.
124. Maillard MH, Cotta-de-Almeida V, Takeshima F et al. The Wiskott-Aldrich syndrome protein is required for the function of CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells. *J.Exp.Med.* 2007;204:381-391.
125. Bopp T, Becker C, Klein M et al. Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J.Exp.Med.* 2007

## 7. Abkürzungen

AICD	<u>A</u> CTIVATION I <u>N</u> DUCED <u>C</u> ELL <u>D</u> EATH
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
APC	antigenpräsentierende Zelle(n) <u>A</u> NTIGEN <u>P</u> RESENTING <u>C</u> ELLS
bp	Basenpaare
CD	<u>C</u> LUSTER OF <u>D</u> IFFERENTIATION (standardisierte Nomenklatur für Zelloberflächenstrukturen)
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Tregs	regulatorische T-Zellen
cDNA	complementary DNA
CFDASE	Carboxyfluoreszein Diacetat Succinimidyl Ester
CTL	<u>C</u> YTOTOXIC- <u>T</u> - <u>L</u> YMPHOCYTES
CTLA	<u>C</u> YTOTOXIC- <u>T</u> - <u>L</u> YMPHOCYTE- <u>A</u> NTIGEN
DAB	Diaminobenzidin
DC	dendritische Zelle(n) <u>D</u> ENDRITIC <u>C</u> ELLS
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-Triphosphat
E.coli	Echerischia coli
EAE	experimentelle allergische Enzephalomyelitis
EDTA	DISODIUM <u>E</u> THYLENE <u>D</u> IAMIN <u>T</u> ERTAA <u>C</u> ETIC <u>A</u> CID
EF-1a	Elongationsfaktor-1alpha
ELISA	<u>E</u> NZYME- <u>L</u> INKED- <u>I</u> MMUNOSORBENT- <u>A</u> SSAY
FACS	<u>F</u> LOURESZENZ- <u>A</u> CTIVATED- <u>C</u> ELL- <u>S</u> ORTER
FCS	fötales Kälberserum <u>F</u> ETAL- <u>C</u> ALF- <u>S</u> ERUM
FITC	Fluoreszein 5-isothiozyanat
FoxP3	FORKHEAD BOX PROTEIN 3
g	Erdbeschleunigung
Gal-10	Galectin-10
<sup>3</sup> H-Tdr	Tritium-markiertes Thymidin
HLA	<u>H</u> UMAN <u>L</u> EUKOCYTE <u>A</u> NTIGEN
hr	human rekombinant

IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ICAM	<u>I</u> ntrac <u>e</u> llular <u>A</u> dhesion <u>M</u> olecule
IPEX	<u>I</u> MMUNE <u>D</u> YSREGULATION <u>P</u> OLYENDOCRINOPATHY, <u>E</u> ENTEROPATHY, <u>X</u> -LINKED SYNDROME
iTreg	induzierte regulatorische T-Zelle
pl	isoelektrischer Punkt
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharide
mAK	monoklonaler Antikörper
MACS	<u>M</u> AGNETIC <u>A</u> CTIVATED <u>C</u> ELL <u>S</u> ORTER
MALDI-TOF	<u>M</u> ATRIX <u>A</u> SSISTED <u>L</u> ASER <u>D</u> ESORPTION/ <u>I</u> ONISATION- <u>T</u> IME <u>O</u> F <u>F</u> LIGHT
MEM	<u>M</u> INIMAL <u>E</u> SSENTIAL <u>M</u> EDIUM
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex <u>M</u> AJOR <u>H</u> ISTOCOMPATIBILITY <u>C</u> OMPLEX
min.	Minute
mRNA	<u>M</u> ESSENGER RNA
MS	Massenspektrometrie
MW	Mittelwert
NFAT	<u>N</u> UCLEAR <u>F</u> ACTOR OF <u>A</u> CTIVATED <u>T</u> CELLS
nTreg	natürlich vorkommende regulatorische T-Zelle
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBMC	periphere mononukleare Blutzellen <u>P</u> ERIPHERAL <u>B</u> LOOD <u>M</u> ONONUCLEAR <u>C</u> ELLS
PBS	<u>P</u> HOSPHATE <u>B</u> UFFERED <u>S</u> ALINE
PCR	<u>P</u> OLYMERASE <u>C</u> HAIN <u>R</u> EACTION
PE	Phycoerytrin
qRT-PCR	<u>Q</u> UANTITATIV <u>R</u> EVERSE <u>T</u> RANSSCRIPTION PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RT	<u>R</u> EVERSE <u>T</u> RANSSCRIPTION
SDS	<u>S</u> ODIUM <u>D</u> ODECYL <u>S</u> ULFATE
siRNA	<u>S</u> MALL <u>I</u> NTERFERING RNA

TGF- $\beta$	<u>T</u> RANSFORMING <u>G</u> ROWTH <u>F</u> ACTOR-BETA
Th	CD4 <sup>+</sup> T-Helferzelle
TNF- $\alpha$	<u>T</u> umor <u>N</u> ekrose <u>F</u> aktor-alpha
Tregs	regulatorische T-Zellen
TZR	T-Zellrezeptor
U	UNIT (internationale Einheit)