

„Funktionelle Charakterisierung der
Protein Kinase CK2 in der Suppression
Th2-vermittelter Immunantworten durch
regulatorische T-Zellen“

Dissertation

Zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Chemie, Pharmazie & Geowissenschaften

Der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

von Alexander Ulges

Geb. am 14.11.1984 in Koblenz

Mainz, 2013

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der Promotion: 15.09.2014

Inhalt

1	Einleitung.....	1
1.1	Das angeborene Immunsystem	1
1.2	Das adaptive Immunsystem	2
1.2.1	Lymphoide Gewebe.....	3
1.2.2	T-Zellaktivierung.....	4
1.2.3	T-Helferzellsubpopulationen.....	7
1.3	T-Zellentwicklung und Toleranz	10
1.4	Regulatorische T-Zellen	11
1.5	<i>Casein Kinase 2 (CK2)</i>	18
1.6	Zielsetzung der Arbeit	19
2	Material & Methoden.....	21
2.1	Verbrauchsmaterialien.....	21
2.2	Chemikalien	21
2.3	Geräte und Hilfsmittel.....	21
2.4	Tiere.....	23
2.5	Lösungen, Puffer und Reagenzien.....	23
2.5.1	Puffer und Reagenzien für die Isolation verschiedener T-Zellpopulationen.....	23
2.5.2	Reagenzien zur Vorbereitung und Durchführung von Proliferationsassays	25
2.5.3	Puffer und Reagenzien zur Genotypisierung und zum Nachweis der Deletion der CK2 in Tregs	26
2.5.4	Puffer und Reagenzien für Western Blots.....	27
2.5.5	Lösungen, Reagenzien und Puffer für die Durchflusszytometrie.....	30
2.5.6	Lösungen, Reagenzien und Puffer für ELISA.....	30
2.5.7	Reagenzien für die Durchführung von Asthma Experimenten.....	31
2.5.8	Reagenzien für RNA-Präparation, Reverse Transkription und quantitative Realtime PCR.....	33
2.6	Kulturmedien.....	33
2.7	Kits	34
2.8	Antikörper	35
2.8.1	Antikörper zur Isolation und <i>ex vivo</i> Stimulation von T-Zellen	35
2.8.2	Antikörper für Western Blots	36

2.8.3	Antikörper für die Durchflusszytometrie	36
2.8.4	Antikörper für ELISA	38
2.9	<i>Kinomarray</i>	39
2.10	Methoden der Zellkultur	40
2.11	Präparation verschiedener lymphatischer Gewebe und Herstellen von Einzelzellsuspensionen	41
2.11.1	Herstellen einer Einzelzellsuspension aus Thymi	41
2.11.2	Herstellen einer Einzelzellsuspension aus Lymphknoten.....	41
2.11.3	Herstellen einer Einzelzellsuspension aus Milzen	42
2.12	Isolation verschiedener T-Zellpopulationen.....	42
2.12.1	Isolation von CD25 ⁺ Tregs per Magnet-aktivierter-Zell-Sortierung (MACS).....	42
2.12.2	Isolation von CD4 ⁺ Tcons per MACS	44
2.12.3	Isolation von naiven CD4 ⁺ CD62L ⁺ CD44 ⁻ T-Zellen, CD4 ⁺ CD62L ⁻ Effektor T-Zellen und CD4 ⁺ CD25 ⁺ Tregs mittels durchflusszytometrischer Zellsortierung	44
2.13	Proliferations- bzw. Suppressionsassay	45
2.14	Methoden zur Genotypisierung von Mäusen	46
2.15	Proteinisolation, SDS-PAGE und Western Blot.....	47
2.16	Durchflusszytometrische Analyse	48
2.17	Enzyme-linked-Immunosorbend-Assays (ELISA)	50
2.18	Blutentnahme.....	54
2.19	Asthma <i>in vivo</i> Experimente.....	54
2.19.1	Versuchsplanung, Immunisierung und Vernebeln	54
2.19.2	Histologie.....	56
2.19.3	Analyse der bronchoalveolären Lavage (BAL)	59
2.19.4	Gewinnung von Seren	60
2.19.5	Restimulation der Zellen mit OVA <i>ex vivo</i>	60
2.19.6	Zytokin ELISAs.....	61
2.19.7	Antigenspezifische Antikörper ELISA.....	61
2.20	RNA Präparation.....	62
2.21	Reverse Transkription (RT)	62
2.22	Quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR).....	63
2.23	Statistik.....	64
3	Ergebnisse.....	65
3.1	Auswirkungen der pharmakologischen Inhibition der Casein Kinase 2 auf regulatorische T-Zellen	65

3.2	Generierung einer Treg-spezifischen konditionalen Casein Kinase 2 β <i>Knock Out</i> Maus (CK2 $\beta^{\text{Treg}/-}$ Mäuse)	67
3.2.1	Generierung einer Treg-spezifischen konditionalen Casein Kinase 2 β <i>Knock Out</i> Maus (CK2 $\beta^{\text{Treg}/-}$ Mäuse)	67
3.2.2	Verifizierung der Deletion der Casein Kinase 2 β UE in regulatorischen T-Zellen von CK2 $\beta^{\text{Treg}/-}$ -Mäusen	70
3.3	CK2 $\beta^{\text{Treg}/-}$ -Tiere zeigen einen aktivierten T-Zell Phänotyp	73
3.3.1	CK2 $\beta^{\text{Treg}/-}$ -Tiere weisen vergrößerte periphere lymphatische Organe auf	73
3.3.2	Die T-Zellentwicklung im Thymus von CK2 $\beta^{\text{Treg}/-}$ -Mäusen verläuft normal	75
3.3.3	Milzen von CK2 $\beta^{\text{Treg}/-}$ -Mäusen zeigen eine normale Zusammensetzung an verschiedenen Immunzellen	77
3.3.4	T-Zellen in CK2 $\beta^{\text{Treg}/-}$ -Tieren besitzen einen aktivierten T-Zell Phänotyp	78
3.4	Der aktivierte T-Zell Phänotyp in CK2 $\beta^{\text{Treg}/-}$ -Mäusen ist verschoben in Richtung einer Th2-vermittelten Immunantwort	81
3.5	CK2 $\beta^{\text{Treg}/-}$ -Mäuse entwickeln verstärkte Entzündungsreaktionen im Th2-vermittelten Asthma Modell <i>in vivo</i>	85
3.5.1	CK2 $\beta^{\text{Treg}/-}$ -Tiere zeigen histologisch massive asthmatische Entzündungsreaktionen ...	85
3.5.2	Gesteigerte Produktion von Th2 Zytokinen in asthmatischen CK2 $\beta^{\text{Treg}/-}$ -Mäusen	89
3.5.3	Erhöhte Antikörpertiter an OVA-spezifischem IgE in asthmatischen CK2 $\beta^{\text{Treg}/-}$ -Mäusen	91
3.6	Regulatorische T-Zellen aus CK2 $\beta^{\text{Treg}/-}$ -Tieren zeigen eine verringerte Expression des Transkriptionsfaktors Foxp3	94
3.6.1	Die Expression verschiedener, an der Treg-vermittelten Suppression beteiligter Moleküle in regulatorischen T-Zellen von CK2 $\beta^{\text{Treg}/-}$ -Mäusen ist unverändert	94
3.6.2	Regulatorische T-Zellen aus CK2 $\beta^{\text{Treg}/-}$ -Tieren zeigen eine verringerte Expression des Transkriptionsfaktors Foxp3	96
3.7	Regulatorische T-Zellen aus CK2 $\beta^{\text{Treg}/-}$ Mäusen weisen eine reduzierte Expression des Transkriptionsfaktors IRF4 auf	98
3.8	Zusammenfassung der Ergebnisse	100
4	Diskussion	102
4.1	Das therapeutische Potenzial regulatorischer T-Zellen	102
4.2	Pharmakologische CK2 Inhibitoren	105
4.3	CK2 als Zielmolekül bei der Krebstherapie	107
4.4	CK2-Inhibition als Mittel zur Blockade der Treg-vermittelten Suppression von Th2-basierten Immunantworten	108
5	Zusammenfassung	118
6	Literaturverzeichnis	120

7	Abbildungsverzeichnis.....	130
8	Abkürzungsverzeichnis.....	132

1 Einleitung

Während der Entstehung höherer Lebewesen im Laufe der Evolution bildete sich parallel der Bedarf eines Schutzes gegen Viren und pathogene Mikroorganismen, wie Bakterien, Pilze und Parasiten^{1,2}. Zu diesem Zweck entwickelte sich das Immunsystem. Seine Hauptaufgabe ist die Unterscheidung von "körperfremd" und "körpereigen", sowie die Entfernung pathogener "fremder" Substanzen aus dem Körper³. Es lässt sich in zwei Teile gliedern: Das angeborene Immunsystem, welches einen frühen Schutz gegen eine Vielzahl eindringender Erreger bildet, und das adaptive Immunsystem, dass gezielte Immunreaktionen gegen jegliche Pathogene erlaubt und in der Lage ist, durch die Bildung von Gedächtniszellen einen Langzeitschutz aufzubauen⁴. Der folgende Absatz 1.1 beschäftigt sich kurz mit den Grundlagen des angeborenen Immunsystems, während sich der Abschnitt 1.2 mit dem adaptiven Immunsystem und dem Fokus dieser Arbeit befasst.

1.1 Das angeborene Immunsystem

Wie bereits in Abschnitt 1 erwähnt stellt das angeborene Immunsystem eine erste Barriere gegen eindringende Pathogene dar⁴. Es umfasst sowohl lösliche Komponenten, wie z.B. kationische antimikrobielle Peptide (CAPs)⁵ und das Komplementsystem⁶, als auch zelluläre Bestandteile, wie Makrophagen, verschiedene Granulozyten, Mastzellen, Natürliche Killer Zellen (NK-Zellen) und Dendritische Zellen⁴. Die Zellen des angeborenen Immunsystems detektieren Pathogene über Rezeptoren, welche in der Keimbahn kodiert sind⁴. Diese Rezeptoren erkennen evolutionär konservierte Strukturen, sogenannte *Pathogen-assoziierte molekulare Muster* (PAMPs) auf der Oberfläche von Erregern, die gleichzeitig nicht auf körpereigenen Zellen zu finden sind⁴. Nachdem ein eindringender, pathogener Erreger über diese *Pathogen-Erkennungs-Rezeptoren* (PRRs)⁷ detektiert wurde, bekämpfen die Komponenten des angeborenen Immunsystems diesen Erreger durch Phagozytose⁸, Zelllyse^{9,10} und die Sekretion von Zytokinen¹¹. Letztere sind kleine Signalproteine und Peptide, die der interzellulären Kommunikation dienen und Immunreaktionen koordinieren¹¹. Durch diese Mechanismen ist das angeborene Immunsystem in der Lage, den Körper vor einer Vielzahl infektiöser Erreger zu verteidigen. Zahlreiche Mikroorganismen haben jedoch Strategien entwickelt, um sich dem Zugriff des angeborenen Immunsystems zu entziehen^{12,13}. In Vertebraten hat sich daher das so genannte adaptive Immunsystem entwickelt, welches, in Kooperation mit den Zellen des angeborenen Immunsystems, einen spezifischen Schutz gegen potentiell jeden Erreger bilden kann¹⁴.

Dendritische Zellen (DCs), unter anderem charakterisierbar durch die Oberflächenmarker CD11c und MHC-II, besitzen hier eine Sonderrolle, da sie auf die Einleitung der adaptiven Immunantwort spezialisiert sind¹⁵. Der folgende Abschnitt 1.2 erläutert die Struktur des adaptiven Immunsystems.

1.2 Das adaptive Immunsystem

Das adaptive Immunsystem bietet einen spezifischen Schutz vor Pathogenen¹⁶. Seine zellulären Bestandteile, die Lymphozyten, lassen sich in zwei Subpopulationen unterteilen. Die erste Population, die sogenannten B-Zellen, werden im Knochenmark gebildet. Ihre Hauptfunktion ist die Produktion von Antikörpern. Diese Antikörper, oder löslichen *B-Zellrezeptoren* (BZR), erkennen ihr Antigen^a in seiner nativen Form¹⁷. Binden Antikörper an ihr Antigen, so können sie dieses z.B. opsonisieren, wodurch das Antigen oder Antigen-tragende Zellen leichter durch Zellen des angeborenen Immunsystems entfernt werden können. Die zweite Population an Lymphozyten bilden die sogenannten T-Zellen. Ihre Vorläufer entstehen ebenfalls im Knochenmark, jedoch durchlaufen T-Zellen einen zusätzlichen Reifungsprozess, der im Thymus stattfindet¹⁸. Dort wird ihr spezifischer *T-Zellrezeptor* (TZR) generiert, der aus einer alpha- und einer beta-Kette besteht. Im Anschluss verlassen sie als reife, naive T-Zellen den Thymus in die Peripherie. Anders als bei B-Zellen erkennt der Rezeptor von T-Zellen deren Antigen in Form kleiner Peptide, die ihnen auf MHC-I und MHC-II Molekülen z.B. durch DCs präsentiert werden¹⁴. Auf den Mechanismus der Antigenerkennung durch T-Zellen und deren Funktion wird in Abschnitt 1.2.2 weiter eingegangen.

Das adaptive Immunsystem unterscheidet sich in seinen Funktionen grundlegend vom angeborenen Immunsystem. Letzteres bietet einen ersten Schutz gegen eindringende Erreger¹⁶, ist jedoch nicht in der Lage ein immunologisches Gedächtnis auszubilden. Im Falle, dass das angeborene Immunsystem alleine einen Erreger nicht aus dem Körper entfernen kann, greifen nach kurzer Zeit zusätzlich die Mechanismen des adaptiven Immunsystems. Diese helfen bei der Entfernung der Pathogene und erzeugen im Anschluss, durch die Bildung so genannter Gedächtniszellen, einen spezifischen Langzeitschutz gegen genau diesen Erreger¹⁹. Die Spezifität bei der Erkennung von Erregern durch das adaptive Immunsystem basiert dabei auf der Struktur der B- und T-Zell-Rezeptoren. Diese werden aus verschiedenen Gensegmenten durch somatische Rekombination in einem zufälligen Prozess zusammengesetzt²⁰. Innerhalb dieses Prozesses werden an den Verknüpfungsstellen dieser Segmente zusätzlich Nukleotide entfernt und/oder eingefügt²¹. So können potentiell $>10^{15}$ TZR

^a Antigen: (engl. „*Antibody generating*“): Stoff, der spezifisch an Rezeptoren von B- und T-Zellen binden kann und von diesen erkannt wird. T-Zellen erkennen ihre Antigene in Form kleiner Peptide auf MHC-Molekülen

verschiedener Spezifität pro Individuum gebildet werden²¹. Innerhalb dieser hohen Diversität verfügt jede T- und B-Zelle über Rezeptoren einer Spezifität, die jeweils nur ein bestimmtes Antigen mit maximaler Affinität detektieren können. Dadurch ist jedoch gleichzeitig die Zahl an T- und B-Zellen, die spezifisch ein eindringendes Pathogen mit hoher Affinität erkennen, sehr gering. Daher beginnen T- und B-Zellen, die ihr spezifisches Antigen detektieren, nach ihrer Aktivierung zu proliferieren, um einen wirksamen Schutz gegen die Pathogene sicher zu stellen. Diesen Prozess bezeichnet man als klonale Expansion¹⁹. Damit die geringe Anzahl an antigenspezifischen T- und B-Zellen den Schutz des gesamten Organismus gewährleisten kann, hat sich das Lymphatische Gefäßsystem entwickelt²². Durch dieses und das Blutsystem zirkulieren die T- und B-Zellen permanent und können so alle Bereiche des Körpers erreichen. Der folgende Abschnitt befasst sich mit der Struktur dieses Systems. Da für diese Arbeit speziell T-Zellen von besonderer Bedeutung sind, wird im weiteren Teil der Einleitung nur noch auf diesen Zelltyp des adaptiven Immunsystems eingegangen.

1.2.1 Lymphoide Gewebe

Wie bereits in Abschnitt 1.2 erwähnt, zirkulieren T-Zellen über die Lymphatischen Gefäße und Blutgefäße im gesamten Körper. In den Lymphknoten treffen sie dabei auf ihr Antigen und werden dort aktiviert. Ein Überblick über die Struktur der lymphatischen Gewebe und die Verteilung der Lymphknoten in Mensch und Maus ist in Abbildung 1.1 dargestellt.

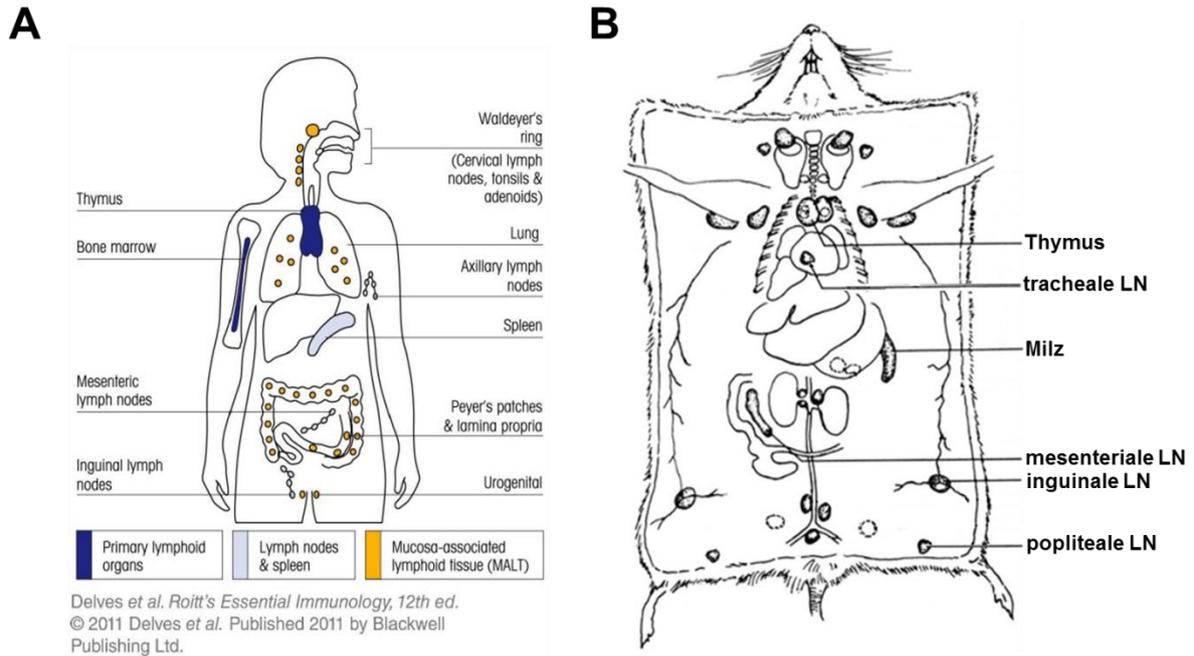


Abbildung 1.1: Verteilung lymphatischer Gewebe im Körper von Mensch (A) und Maus (B): A Delves et al. *Roitt's Essential Immunology*, 12th Edition ©2011 Delves et al. Published 2011 by Blackwell Publishing Ltd., Abbildung 7.2. B verändert nach Dunn, T.B. Normal and pathologic anatomy of the reticular tissue in laboratory mice, with a classification and discussion of neoplasms. *J. Nat. Cancer Inst.* **14**, 1281-1433 (1954).

Aus Abbildung 1.1 geht hervor, dass die Lymphknoten strategisch über den Körper verteilt sind. Sie bilden eine Art Kontrollzentrum für die verschiedenen drainierenden Gewebe. Während die Lymphknoten lokale Immunreaktionen steuern, reguliert die Milz, als Organ mit Anschluss ans Blutgefäßsystem aber ohne Lymphdrainage, die systemische Immunität. Naive T-Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche das Selektinmolekül CD62L²³. Dieses ermöglicht es T-Zellen in die lymphatischen Organe einzuwandern^{23,24}. Wie bereits im obigen Teil erwähnt, findet die Aktivierung der naiven T-Zellen durch DCs in den Lymphknoten statt. Dort treffen antigenbeladene DCs und T-Zellen zusammen. Der folgende Abschnitt 1.2.2 beschäftigt sich daher speziell mit der Aktivierung der T-Zellen durch DCs.

1.2.2 T-Zellaktivierung

Wie in Abschnitt 1.2.1 beschrieben, erfolgt die Aktivierung von T-Zellen durch DCs vor allem in den Lymphknoten. Während T-Zellen durch Blut- und Lymphsystem zirkulieren, bevölkern DCs die peripheren Gewebe, verstärkt in Bereichen, an denen Pathogene eindringen können, wie z.B. die

Haut, oder Lunge und Darm²⁵. Dort phagozytieren sie tote Zellen und eindringende Erreger, und prozessieren^b diese zu Peptiden²⁶. Diese Peptide werden auf MHC-I und MHC-II Moleküle geladen und auf der Oberfläche der DC präsentiert²⁶. Im Falle eindringender Pathogene erhält die DC über ihre PRRs zusätzlich Gefahrensignale, welche die DC aktivieren^{26,27}. Daraufhin exprimiert sie zusätzlich kostimulatorische Moleküle wie CD80 und CD86²⁶ und produziert, basierend auf der Art des eindringenden Erregers, verschiedene Zytokine^{28,29}. Ferner migriert die DC in die lokalen Lymphknoten, wo sie auf zahlreiche zirkulierende T-Zellen trifft¹⁹. Erkennt eine T-Zelle durch ihren TZR ein Peptidantigen in Kombination mit dem MHC-Molekül mit hoher Affinität, so tritt sie in engeren Kontakt mit der DC. T-Zellen lassen sich grundsätzlich in zwei verschiedene Subpopulationen unterteilen. CD8⁺ T-Zellen erkennen Antigene nur in Kombination mit MHC-I, während CD4⁺ T-Zellen ihre spezifischen Antigene nur im Kontext mit MHC-II Molekülen erkennen²⁶. Der Kontakt des TZR mit dem spezifischen Peptid-MHC-Komplex stellt ein erstes Aktivierungssignal dar, welches über den TZR-assoziierten CD3-Signalkomplex in die Zelle übermittelt wird²⁶. Für die vollständige Aktivierung der T-Zelle sind jedoch mindestens zwei Signale notwendig. Dieses zweite Signal in der T-Zelle wird u.a. durch den Kontakt der Moleküle CD80 und CD86 auf der DC mit dem Molekül CD28 auf der T-Zelloberfläche erzeugt²⁶. Die resultierende Aktivierung einer T-Zelle hat multiple Veränderungen zur Folge, die den Ablauf einer Immunantwort maßgeblich beeinflussen. Die Mechanismen der Aktivierung von T-Zellen und die beschriebenen Veränderungen sind exemplarisch in Abbildung 1.2 für die Aktivierung einer CD4⁺ T-Zelle dargestellt.

^b Prozessierung: Proteolytischer Abbau von Proteinen zu kleinen Peptiden

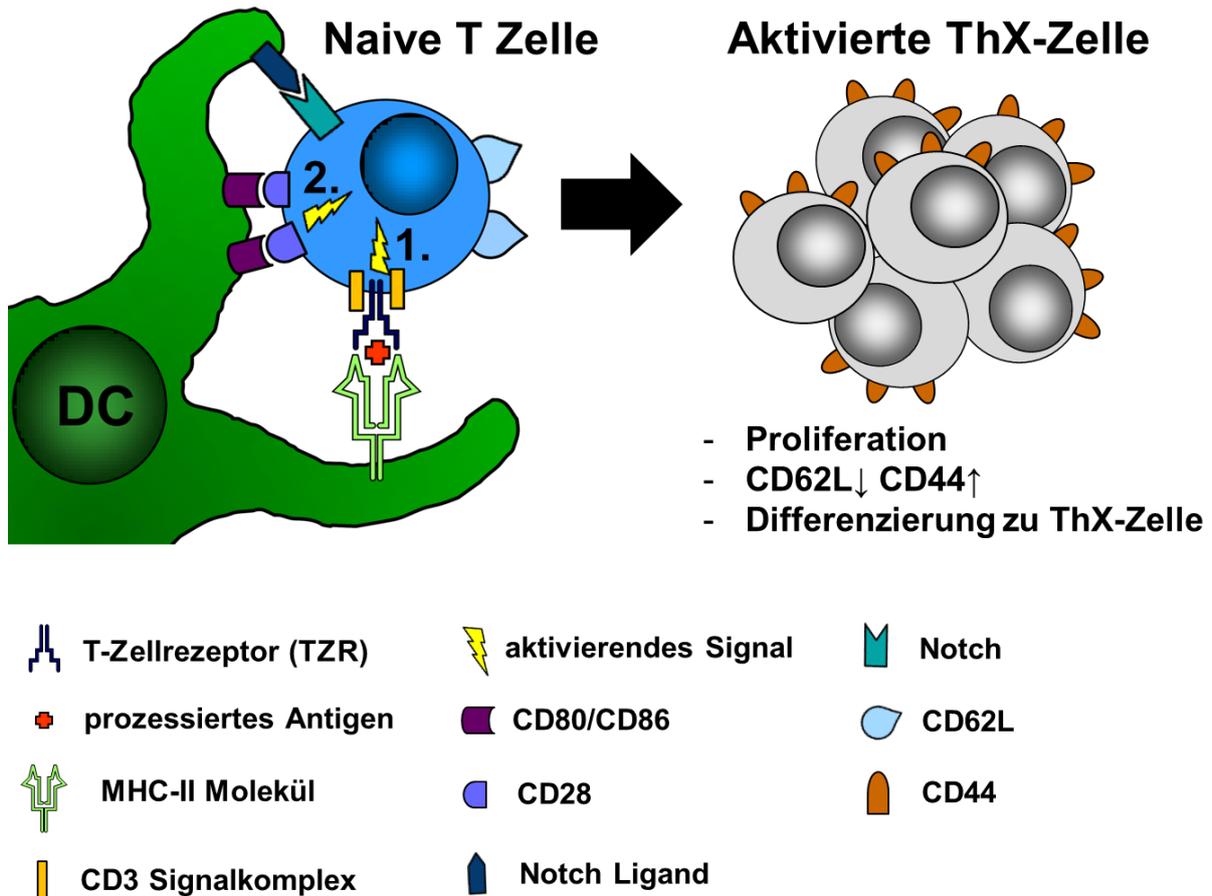


Abbildung 1.2: Aktivierung naiver CD4⁺ T-Zellen durch DCs und durch Aktivierung hervorgerufene Veränderungen der T-Zellen: Erkennt der TZR einer naiven T-Zelle ein auf MHC-Molekülen gebundenes Antigen auf der Oberfläche einer DC, so wird hierdurch ein erstes Aktivierungssignal in der T-Zelle ausgelöst. Dieses Signal ist jedoch unzureichend um in einer naiven T-Zelle eine Aktivierung herzurufen. Über den Kontakt der Oberflächenmoleküle CD80 und CD86 auf der DC mit CD28 auf der T-Zelloberfläche wird ein zweites Aktivierungssignal ausgelöst. Als Reaktion beginnt die T-Zelle zu proliferieren. Außerdem ändert sich das Expressionsmuster verschiedener Aktivierungsmarker auf der T-Zelloberfläche (CD62L ↓ CD44 ↑). Zusätzlich differenziert die aktivierte T-Zelle zu verschiedenen T-Helferzellpopulationen (ThX-Zellen), deren Subtyp durch das von der DC erzeugte Zytokinmilieu und Notch-Signale beeinflusst wird.

Wie aus Abbildung 1.2 hervorgeht, proliferieren T-Zellen nach ihrer Aktivierung, wodurch die Zahl der antigenspezifischen Zellen stark erhöht wird¹⁹. Zudem ändert sich auf ihrer Oberfläche die Expression verschiedener Aktivierungsmarker. So exprimieren sie nach Aktivierung z.B. CD44, während CD62L von ihrer Zelloberfläche verschwindet. Zusätzlich differenzieren die T-Zellen abhängig vom jeweiligen Erreger zu Effektorzellen, die diesen bestmöglich bekämpfen können^{30,31}. Dieser Differenzierungsschritt ist abhängig vom umgebenden Zytokinmilieu, das u.a. von der DC geschaffen wird. Des Weiteren können DCs über Impulse des Notch-Signalweges die Differenzierung von T-Zellen beeinflussen^{32,33}. CD4⁺ T-Zellen differenzieren zu verschiedenen Populationen von sogenannten *T-Helferzellen* (Th-Zellen)³¹. Th-Zellen steuern Immunreaktionen, insbesondere gegen

Bakterien, Pilze und Parasiten, über die gezielte Sekretion von Zytokinen und direkte Zell-Zell-Interaktion. Da die verschiedenen Th-Zellpopulationen eine wichtige Rolle in dieser Arbeit einnehmen, widmet sich ihnen der folgende Abschnitt 1.2.3. Im Gegensatz dazu differenzieren $CD8^+$ T-Zellen, deren Aktivierung ähnlich wie die der $CD4^+$ T-Zellen verläuft, zu *Zytotoxischen T-Lymphozyten* (CTLs)³⁴. Diese sind maßgeblich an der Bekämpfung von Virusinfektionen und entarteten Zellen beteiligt³⁴.

1.2.3 T-Helferzellsubpopulationen

Wie zuvor in Abschnitt 1.2.2 beschrieben, differenzieren naive $CD4^+$ T-Zellen nach ihrer Aktivierung in verschiedene Th-Zellpopulationen³¹. Die Differenzierung ist dabei stark abhängig vom umgebenden Zytokinmilieu und der Interaktion der T-Zelle mit der DC^{32,33}. Beides wird stark beeinflusst durch die Art des Pathogens, das die Immunreaktion auslöst. So lösen unterschiedliche Zytokinkombinationen und die direkte Kommunikation mit der DC in der T-Zelle verschiedene Differenzierungsprogramme aus, die in der Entwicklung eines bestimmten Th-Subtyps resultieren³¹. Alle diese Programme führen zur Expression eines Th-Subtyp-spezifischen Transkriptionsfaktors, der das jeweilige weitere Differenzierungsprogramm, sowie die Effektorfunktion dieser T-Helferzell-Subpopulation koordiniert^{31,35}. Während der neunziger Jahre gingen Immunologen noch vom strikten Paradigma der Existenz lediglich zweier Th-Zellpopulationen aus^{30,35}. Eine Vielzahl von Studien konnte inzwischen jedoch die Existenz weiterer Th-Zellpopulationen nachweisen. Neben den ursprünglichen Th1 und Th2 Zellen ist heute die Existenz mindestens zweier weiterer Populationen, Th17 Zellen und induzierbare, regulatorische T-Zellen (iTregs), unumstritten³⁰. Andere Th-Zellpopulationen wie Th9 und Th22 Zellen, sowie folliculäre Th-Zellen (Tfh) werden diskutiert^{30,35}. Ein Überblick über die verschiedenen, für diese Arbeit relevanten, Th-Zellpopulationen wird in Abbildung 1.3 gegeben. Die Abbildung umfasst die für die Differenzierung der einzelnen Th-Zellpopulationen wichtigen Zytokine und Notch-Signale. Ferner sind die Transkriptionsfaktoren, welche das jeweilige Th-Zellprogramm koordinieren, die verschiedenen Effektorzytokine, sowie deren wichtigste Funktionen dargestellt.

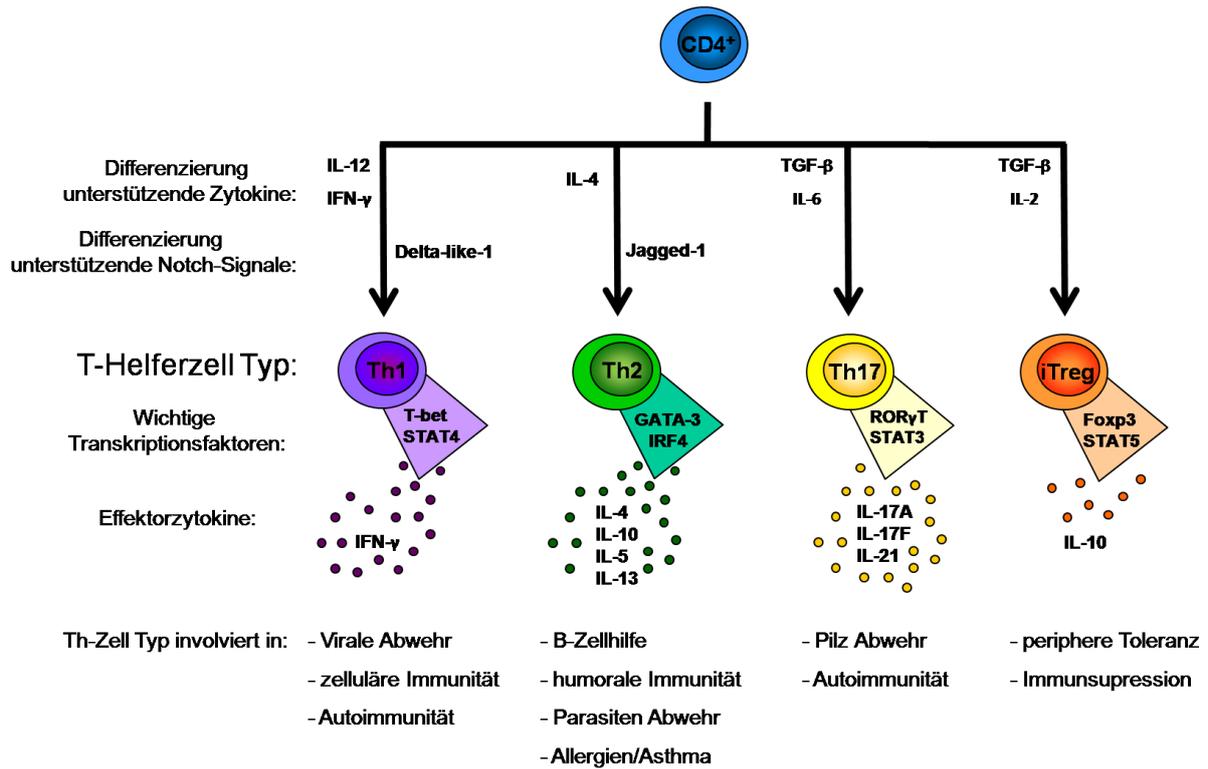


Abbildung 1.3: Zusammenfassung der wichtigsten Th-Zellpopulationen: Schematische Darstellung der Differenzierung naiver CD4⁺ T-Zellen zu verschiedenen Th-Zellpopulationen. Die für die Differenzierung notwendigen Zytokine und DC-vermittelten Notch-Signale sind angegeben. Ferner sind die Haupttranskriptionsfaktoren und Effektorzytokine der für diese Arbeit wichtigsten Th-Zellpopulationen aufgeführt. Ebenso dargestellt sind die wichtigsten immunologischen Prozesse, an denen die verschiedenen Th-Zellpopulationen beteiligt sind.

Th1 Zellen differenzieren in Gegenwart des Zytokins *Interleukin-12* (IL-12), das in Reaktion auf bestimmte Erreger von DCs produziert wird³⁶. IL-12 führt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors *Signal-Transduktor-und-Aktivator-der-Transkription 4* (STAT4)^{30,37}. Dieser leitet die Expression des Th1 Haupttranskriptionsfaktors *T-box-exprimiert-in-T-Zellen* (T-bet) ein³⁰. T-bet steuert die Produktion des Th1 Effektorzytokins *Interferon- γ* (IFN- γ)³⁰. Th1 Zellen sind Vermittler zellulärer Immunität und an der Entfernung intrazellulärer Pathogene beteiligt^{35,38}. Ferner sind diverse Autoimmunreaktionen auf eine verstärkte Aktivierung von Th1 Zellen zurückzuführen^{39,40}. Im Gegensatz dazu differenzieren CD4⁺ T-Zellen in Gegenwart von IL-4 zu Th2 Zellen³⁰. IL-4 aktiviert STAT6, welches die Expression des Th2 Haupttranskriptionsfaktors *GATA-Bindeprotein-3* (GATA-3) initiiert^{30,41}. Th2 Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr gegen extrazelluläre Pathogene, wie z.B. Parasiten⁴². Paradoxerweise ist die Quelle des nötigen IL-4 für die Th2 Differenzierung *in vivo* unklar³⁰. Neben Basophilen Granulozyten, die ebenfalls an der Bekämpfung von Parasiten beteiligt sind, können auch NK-Zellen, abhängig von äußeren Umständen, große Mengen an IL-4 produzieren^{42,43}. Von entscheidender Bedeutung ist jedoch die Abwesenheit von

IL-12, welches die Differenzierung zu Th2 Zellen inhibiert indem es die Entstehung von Th1 Zellen fördert⁴². Stoffwechselprodukte von Parasiten, die durch DCs über PRRs detektiert werden, sind z.T. in der Lage die IL-12 Produktion von DCs zu inhibieren⁴². Außerdem können DCs durch direkte Interaktion mit T-Zellen über Moleküle des Notch-Signalweges die Th-Zelldifferenzierung beeinflussen^{32,44}. So induziert die Interaktion von Jagged-1 auf der Oberfläche der DC mit Notch auf der T-Zelloberfläche die Differenzierung zu Th2 Zellen³². Th2 Zellen bilden große Mengen an IL-4, welches in einer autokrinen Schleife die weitere Th2 Differenzierung unterstützt⁴². Neben IL-4 produzieren Th2 Zellen IL-5, IL-13, und IL-10⁴². Mittels dieser Zytokine, sowie direkter Zell-Zellinteraktion leisten Th2 Zellen Hilfe für antikörperproduzierende B-Zellen und steuern die humorale Immunität⁴⁵. Das von Th2 Zellen produzierte IL-4, sowie IL-13 z.B. lösen in B-Zellen den Klassenwechsel zu Antikörpern des IgE Isotyps aus, die im Rahmen von Parasiteninfektionen die Funktion basophiler Granulozyten und Mastzellen steigern^{42,46}. Gleichzeitig sind Th2 Zellen an der Entstehung verschiedener allergischer Prozesse, wie z.B. Asthma, beteiligt⁴². Neben GATA3 besitzt auch der Transkriptionsfaktor *Interferon-regulierender-Faktor 4* (IRF4) eine wichtige Funktion bei der Differenzierung von Th2 Zellen^{30,47}. So produzieren Th2 Zellen aus IRF4 defizienten Mäusen nur geringe Mengen an IL-4³⁰. Durch die Überexpression von GATA3 in diesen Zellen wird der Effekt der IRF4 Defizienz jedoch aufgehoben⁴⁷. IRF4 spielt, neben Th2 Zellen, auch eine wichtige Rolle in der Differenzierung von Th17 Zellen⁴⁸. Diese Zellen differenzieren in Gegenwart der Zytokine *Transformierender-Wachstumsfaktor β* (TGF-β) und IL-6⁴⁹. Über die Aktivierung von STAT3, durch IL-6, wird die Expression des Haupttranskriptionsfaktors von Th17 Zellen *RAR-verwandter-Rezeptor-γ-T* (RORγT) gesteuert⁴⁹. Th17 Zellen produzieren die proinflammatorischen Zytokine IL-17A, IL-17F, IL-21, GM-CSF und IL-22^{49,50}. Durch die Produktion dieser Zytokine sind Th17 Zellen entscheidend an der Bekämpfung bakterieller sowie Pilzinfektionen beteiligt³¹. Allerdings kann die unkontrollierte Aktivierung von Th17 Zellen auch zur Entwicklung von Autoimmunerkrankungen wie Arthritis⁴⁵, Multipler Sklerose⁴⁵ und Colitis⁵¹ beitragen. Die bisher beschriebenen Th-Zellpopulationen bekämpfen verschiedene Arten eindringender Pathogene. Da unkontrollierte Reaktionen dieser verschiedenen Th-Zellen an der Entstehung unterschiedlicher Autoimmunkrankheiten beteiligt sind, ist eine strikte Regulation dieser Immunreaktionen jedoch unablässig^{39,40,45}. Um derartige Autoimmunreaktionen zu verhindern und überschießende Immunreaktionen zu kontrollieren haben sich die Mechanismen der Toleranz entwickelt, die in Abschnitt 1.3 behandelt werden. Einen aktiven Anteil an diesen Toleranzmechanismen nehmen die sogenannten regulatorische T-Zellen (Tregs) ein. Diese Zellen stehen in starkem Kontrast zu den bisher beschriebenen Th-Zellpopulationen. Während die bisherigen Th-Zellpopulationen eindringende Pathogene bekämpfen, besteht die Aufgabe von Tregs in der Suppression autoimmuner und der Kontrolle überschießender Immunreaktionen⁵². Die Funktion von Tregs, als T-Zellsubtyp,

Einleitung

wird dabei durch den Transkriptionsfaktor *Forkehead box P3* (Foxp3) kontrolliert. Foxp3 steuert die suppressiven Programme der Tregs und ist maßgeblich an der Entwicklung dieser Zellen beteiligt^{52,53}. Induzierbare Tregs (iTregs) stellen eine spezielle Form von Tregs dar. Sie differenzieren aus naiven CD4⁺ T-Zellen in Gegenwart von TGF- β und IL-2⁵³ und sind daher nur schwer mit den im Thymus generierten Tregs vergleichbar⁵². Letztere stehen im Fokus dieser Arbeit und werden daher in Abschnitt 1.4 detailliert behandelt.

1.3 T-Zellentwicklung und Toleranz

Bisher wurde lediglich die Situation und Reaktion des Immunsystems bei Eindringen eines Erregers beschrieben. Aufgrund der zufälligen Rekombination von Gensegmenten im Zuge der TZR Generierung im Thymus wird eine hohe Diversität der Rezeptoren von T-Zellen garantiert. Jedoch besteht dabei die Gefahr, dass neben T-Zellen mit hoher Affinität gegen pathogene Antigene auch T-Zellen gebildet werden, die körpereigene Peptide mit hoher Affinität erkennen⁵⁴. Diese autoreaktiven T-Zellen können z.B. aktiviert werden, wenn in der Peripherie eine DC Antigene aus körpereigenen toten Zellen phagozytiert und präsentiert werden⁵⁵. Erhält die DC parallel über ihre PRRs Gefahrensignale, z.B. durch gleichzeitig anwesende Pathogene, so könnte sie autoreaktive T-Zellen, durch die resultierende Expression kostimulatorischer Moleküle, aktivieren⁵⁵. So konnten verschiedene Studien zeigen, dass es unter keimfreien Bedingungen nur bedingt zur Entstehung autoimmuner T-Zellreaktionen kommt^{56,57,58}. Derartige Autoimmunreaktionen werden jedoch durch zahlreiche, unter dem Begriff „Toleranz“ zusammengefasste, Mechanismen verhindert, die im Folgenden behandelt werden. So wird bereits im Thymus, durch einen zweistufigen Selektionsprozess, die Entstehung autoreaktiver T-Zellen reduziert und gleichzeitig die Bildung funktionaler T-Zellen mit hoher Diversität gewährleistet⁵⁹. Im Zuge der T-Zellentwicklung wandern zunächst sogenannte doppelt negative (DN) T-Zellvorläufer in den Thymus ein, die weder den Oberflächenmarker CD4 noch CD8 exprimieren⁵⁹. In diesem DN Stadium wird durch somatische Rekombination die beta-Kette des TZR generiert^{59,60}. Nachdem die Rekombination der beta-Kette erfolgreich abgeschlossen wurde, durchlaufen die Zellen einen Proliferationsschritt und gehen über in ein Doppelt Positives (DP) Stadium⁵⁹. In diesem DP Stadium wird darauf die TZR alpha-Kette rekombiniert⁵⁹. DP T-Zellen exprimieren sowohl CD4 als auch CD8⁵⁹. Im DP Stadium erfolgt der erste, positive Selektionsschritt. In diesem Prozess werden T-Zellen selektiert, die, mit geringer Affinität, mit körpereigenen Peptid-MHC Molekülen interagieren können⁶⁰. Nur diese Zellen, mit funktionsfähigem TZR, erhalten Überlebenssignale. Gleichzeitig legt die „Positive Selektion“ fest, ob die T-Zelle in eine CD8⁺ oder CD4⁺ T-Zelle differenziert. Bei besserer Interaktion mit MHC-I entsteht

eine CD8⁺ T-Zelle und bei passender Interaktion mit MHC-II eine CD4⁺ T-Zelle. Die TZR der Zellen im folgenden CD4⁺CD8⁻, bzw. CD8⁺CD4⁻ Einzelpositiven (SP) T-Zellstadium umfassen ein großes Repertoire, das sowohl körperfremde, als auch körpereigene Peptide erkennt^{54,59}. Im nächsten Schritt, der „Negativen Selektion“, werden daher potenziell stark autoreaktive T-Zellen eliminiert^{59,61}. Hierzu werden den jeweiligen SP T-Zellen zahlreiche körpereigene Peptide aus der Körperperipherie, infolge einer ektopischen Expression im medullären Thymusepithel, präsentiert⁶². T-Zellen, die diese körpereigenen Peptide mit hoher Affinität erkennen, erhalten Signale zur Apoptose⁶². Da dieser, als „zentrale Toleranz“ bezeichnete, Prozess jedoch nicht fehlerfrei funktioniert, verlassen auch z.T. potentiell autoreaktive T-Zellen den Thymus in die Peripherie⁶¹. Ergänzend zur Zentralen Toleranz verhindern in der Peripherie weitere Mechanismen die Aktivierung dieser autoaggressiven T-Zellen⁶¹. Hierzu zählt die Notwendigkeit eines zweiten kostimulatorischen Signals bei der Aktivierung naiver T-Zellen (siehe 1.2.2), in dessen Abwesenheit das Phänomen der Anergie auftritt^{53,61}. Dies bedeutet die funktionelle Ruhigstellung infolge eines hyporeaktiven Zustands der T-Zellen, wenn ihr TZR in Abwesenheit kostimulatorischer Signale dauerhaft körpereigenen Peptiden ausgesetzt wird⁵³. Weitere Mechanismen der peripheren Toleranz umfassen Ignoranz^{c,63} und der *Aktivierungs-induzierte-Zelltod* (AICD)^{d,64}. Zentrale und periphere Toleranzmechanismen allein sind jedoch unzureichend, um den Körper vor der Entstehung von Autoimmunität zu schützen⁵³. Ergänzend zu diesen Mechanismen konnte in den letzten zwei Dekaden eine T-Zellsubpopulation charakterisiert werden, die auf die aktive Suppression von Autoimmunreaktionen, sowie die Eindämmung überschießender Immunreaktionen spezialisiert ist⁵³. Die Funktionsweise dieser regulatorischen T-Zellen (Treg) ist Hauptthema dieser Arbeit und wird im folgenden Abschnitt 1.4 behandelt.

1.4 Regulatorische T-Zellen

Wie bereits aus Abschnitt 1.3 hervorgeht, leisten Tregs einen elementaren Beitrag zu Etablierung der Toleranz des Immunsystems gegen den eigenen Körper. Die Hauptaufgabe der Tregs ist die Suppression schädlicher Immunantworten gegen körpereigene Gewebe sowie kommensale Bakterien^{52,53}. Ferner besteht ihre Funktion in der Kontrolle überschießender Immunreaktionen, die chronische Entzündungen und Allergien, wie z.B. Asthma, verursachen können^{53,65}. Tregs kontrollieren aber auch Immunreaktionen gegen eindringende Pathogene. Immunreaktionen würden

^c Ignoranz: Autoantigene werden in zu geringer Zahl präsentiert, sodass es zu einer unzureichenden Aktivierung von antigenspezifischen T-Zellen kommt

^d AICD: Eliminierung autoreaktiver T-Zellen im Wesentlichen über Fas (auf T-Zellen), FasL (auf APCs) Wechselwirkung

Einleitung

daher ohne die Treg-vermittelte Suppression zu erheblichen Gewebeschäden führen⁶⁶. Ihre essenzielle Rolle bei der Erhaltung der peripheren Toleranz führt dazu, dass Tregs mittlerweile eine bedeutende medizinische Relevanz bei der Behandlung von Autoimmunerkrankungen wie Typ 1 Diabetes, Rheumatoider Arthritis, Multipler Sklerose und Systemischem Lupus Erythematoses zugesprochen wird^{65,67}. Zusätzlich stellen Tregs mögliche Zielobjekte bei der Behandlung von Allergien, Transplantatabstoßungen und Tumoren dar⁶⁷. Die erste Identifikation von Tregs gelang durch diverse Studien in den 90er Jahren⁶¹. Verschiedene Experimente konnten eine CD4⁺CD25⁺ T-Zellpopulation mit suppressiven Eigenschaften nachweisen^{68,69,70}. So löst der adoptive Transfer von CD4⁺CD25⁻ T-Zellen in immundefizienten Tieren schwere Autoimmunreaktionen aus⁶⁸. Der Ko-Transfer von CD4⁺CD25⁺ T-Zellen, gemeinsam mit dem von CD4⁺CD25⁻ T-Zellen, kann die Entstehung dieser Autoimmunreaktionen jedoch verhindern⁶⁸. Neben diesen CD4⁺CD25⁺ Tregs exprimieren konventionelle T-Zellen im Laufe ihrer Aktivierung ebenfalls die IL-2 Rezeptor alpha Kette (CD25) auf ihrer Oberfläche, wodurch die eindeutige Charakterisierung von Tregs erschwert wird. Mit der Entdeckung des Treg-spezifischen Transkriptionsfaktors *Forkehead box P3* (Foxp3) im Jahre 2003 konnten Tregs eindeutig als eigenständige T-Zellsubpopulation identifiziert werden^{71,72}. So entwickeln Tiere eines als „Scurfy“ bezeichneten Mausstammes im Alter von etwa 3 Wochen schwere X-chromosomal gekoppelte Autoimmunreaktionen⁷¹. Die Tiere dieses Mausstammes leiden an einer Defektmutation im *Foxp3* Gen. Im Menschen resultieren derartige Mutationen im sogenannten *immunodysregulation-polyendocrinopathy-enteropathy X-linked Syndrom* (IPEX)⁷¹. Ferner führt die ektopische Expression von Foxp3 in konventionellen CD4⁺CD25⁻ T-Zellen zur Entwicklung suppressiver Eigenschaften⁷². Diese Ergebnisse identifizieren Foxp3 als essenziellen Transkriptionsfaktor, der die Entwicklung der Tregs und ihre suppressiven Funktion koordiniert. Seit der Entdeckung von Foxp3 als charakteristischem Transkriptionsfaktor von Tregs konnte das Wissen um diese T-Zellpopulation massiv erweitert werden. Heute unterscheidet man zwei Subpopulationen an Tregs. Zum einen sogenannte natürlich vorkommende Tregs (nTregs), die im Thymus selektiert werden⁷³. Zum anderen die zuvor in Abschnitt 1.2.3 beschriebenen, induzierbaren Tregs (iTreg), die in der Peripherie aus naiven T-Zellen entstehen⁵³. Inzwischen konnte eine Vielzahl von suppressiven Mechanismen aufgedeckt werden, über welche Tregs Immunreaktionen kontrollieren^{53,74}. Zum einen exprimieren zahlreiche Tregs, wie bereits im vorherigen Verlauf dieses Abschnitts erwähnt, anders als konventionelle, naive T-Zellen (Tcons), CD25 auf ihrer Oberfläche. IL-2 ist ein wichtiger Proliferationsfaktor für Tcons. So wurde postuliert, dass Tregs durch ihre starke Expression von CD25 naiven T-Zellen im Zuge deren Aktivierung IL-2 entziehen, und so deren Proliferation inhibieren⁷⁵. Ein weiterer wichtiger Bestandteil der Treg-vermittelten Suppression besteht in der Inhibition der Aktivierung von DCs. So exprimieren Tregs große Mengen des Moleküls *Cytotoxisches T-Lymphozyten Antigen 4* (CTLA-4). Ebenso wie CD28 bindet CTLA-4 an die kostimulatorischen Moleküle CD80 und

CD86 auf DCs. Anders als CD28 ist CTLA-4 auf Tregs jedoch in der Lage ein suppressives Signal in der DC zu erzeugen, wodurch die Expression von CD80 und CD86 auf der Oberfläche der DC blockiert wird⁷⁶. Mäuse mit einer Treg spezifischen Deletion von CTLA-4 können einen Autoimmunen Phänotyp entwickeln⁷⁶. Dieser Phänotyp manifestiert sich jedoch nur in Tieren des genetischen BALB/c Hintergrunds, welche anfällig für die Entwicklung autoimmuner Krankheiten sind⁵³. In Mäusen des C57BL/6 Hintergrundes, die auf die gleiche Weise manipuliert wurden, kommt es nicht zu dieser Entwicklung⁵³. Analog zu CTLA-4 konnte für das Molekül *Lymphozyten Aktivierungs Gen 3* (LAG-3) eine inhibitorische Funktion auf die Aktivierung von DCs nachgewiesen werden⁷⁷. LAG-3 bindet an MHC-II und hemmt, wie CTLA-4, die Expression kostimulatorischer Moleküle durch die DC⁷⁸. Neben diesen besitzt das Adhäsionsmolekül *Leukozyten funktionelles Antigen 1* (LFA-1) ebenfalls einen wichtigen Anteil an der Suppression durch Tregs⁷⁹. LFA-1 wird stark auf der Treg Oberfläche exprimiert⁷⁹. Seine Expression ermöglicht Tregs eine intensive Adhäsion an DCs, wodurch gleichzeitig die Bindung anderer Tcons inhibiert wird⁷⁹. Des Weiteren induziert das Molekül *T-Zell Immunorezeptor mit Ig- und ITIM-Domänen* (TIGIT) auf der Oberfläche von Tregs die Produktion immunregulatorischer Zytokine wie IL-10 und TGF- β in DCs⁸⁰. Jedoch sind Tregs auch in der Lage, die immunregulierenden Zytokine IL-10 und TGF- β selbst zu sezernieren⁸¹. IL-10 ist speziell an der Suppression pathogener Immunreaktionen in mucosalen Organen, wie Darm und Lunge beteiligt⁸². TGF- β ist bedeutend für die Inhibition Th1-vermittelter Immunantworten⁸³. Parallel zur Suppression der Aktivierung von DCs sind Tregs in der Lage, DCs und Tcons in einem Granzym B abhängigen Prozess zu lysieren⁸⁴. Zusätzlich zu den beschriebenen Mechanismen können Tregs die Aktivierung von DCs und die Proliferation von T-Zellen durch suppressive Metabolite inhibieren. Zum einen konnte gezeigt werden, dass Tregs über „*Gap Junction Transfer*“ *cyclisches Adenosinmonophosphat* (cAMP) in T-Zellen und DCs transferieren^{85,86}. In T-Zellen führt dieser Transfer zur Aktivierung des sogenannten *inducible cAMP early repressor* (ICER), der die IL-2 Produktion hemmt⁸⁷. Ferner exprimieren Tregs große Mengen der Ektoenzyme CD39 und CD73⁸⁸. Diese katalysieren die Hydrolyse von extrazellulärem ATP, ADP oder AMP zu Adenosin^{88,89}. Dieses wiederum bindet auf Zielzellen an den Adenosin Rezeptor A2A, wodurch in den Zielzellen verstärkt cAMP gebildet wird⁹⁰. Ein Überblick über die verschiedenen, von Tregs verwendeten suppressiven Mechanismen ist in Abbildung 1.4 zusammengefasst.

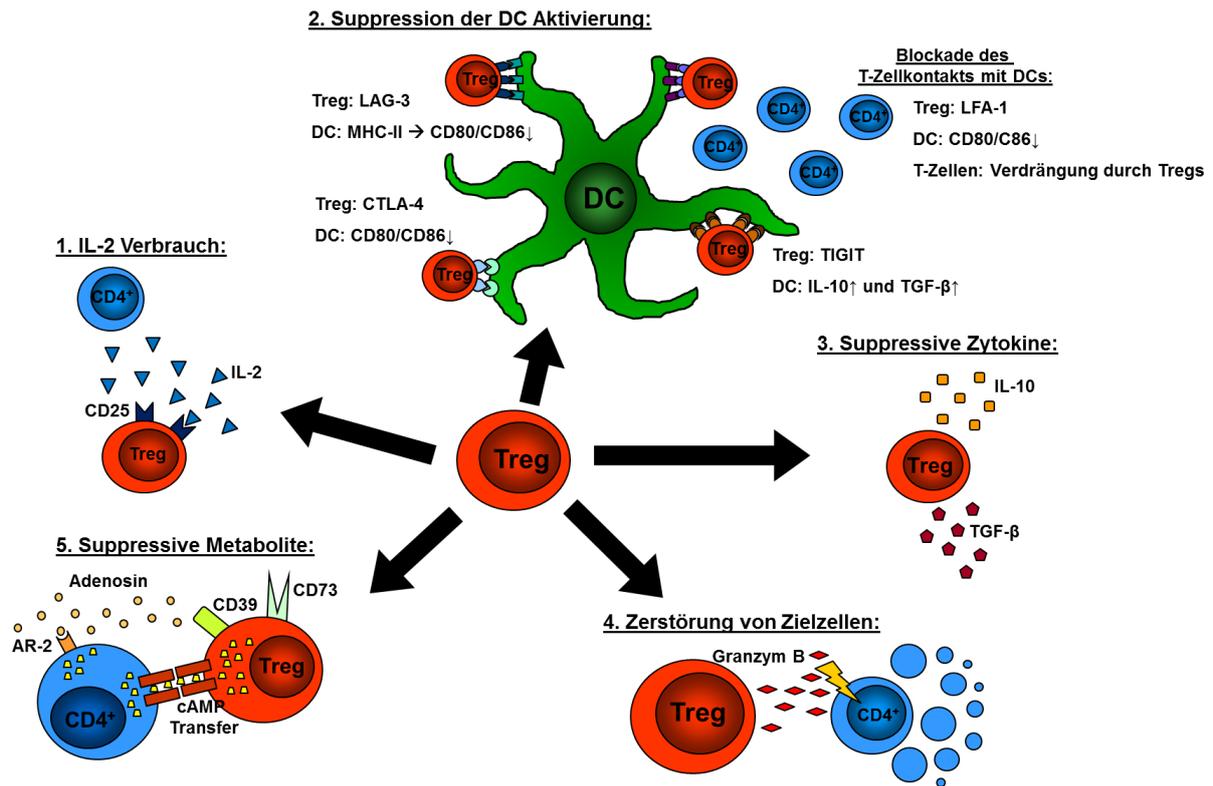


Abbildung 1.4: Suppressive Mechanismen von Tregs: 1. Inhibition der Proliferation von Tcons durch Verbrauch von IL-2. 2. Suppression der Aktivierung von DCs: CTLA-4 hemmt die Expression der Ko-Stimulatoren CD80 und CD86; LAG-3 bindet an MHC-II auf DCs und inhibiert die Expression von CD80/86. Das Adhäsionsmolekül LFA-1 ist wichtig für die Treg-DC Interaktion. Es supprimiert die Expression von CD80/86 und ist verantwortlich für die Verdrängung von Tcons durch Tregs an der DC. TIGT auf der Treg Oberfläche induziert in DCs die Expression antiinflammatorischer Zytokine. 3. Suppression durch Sezernierung der antiinflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF-β. 4. Granzym B abhängige Zerstörung von Zielzellen. 5. Suppression der Produktion von IL-2 in T-Zellen und der Expression von CD80/86 in DCs durch cAMP-Transfer, sowie Adenosin-abhängige Induktion von cAMP.

Jeder der beschriebenen Suppressormechanismen leistet einen Beitrag für die Treg-vermittelte Suppression. Jedoch kann keiner dieser Mechanismen als Kardinalsmechanismus bezeichnet werden, der alleinig essenziell für die durch Tregs-vermittelte Toleranz ist⁵³. Gleichzeitig gewährleisten Tregs die Kontrolle verschiedener gewebspezifischer Immunreaktionen⁵³. Während der letzten Jahre konnte aufgeklärt werden, wie Tregs diese durch verschiedene Th-Zellen-vermittelten Reaktionen regulieren können^{53,74,91}. So wie naive T-Zellen abhängig von der Art des Pathogens in verschiedene Th-Zellen differenzieren, können Tregs verschiedene Phänotypen annehmen, um so unterschiedliche Th-Zellantworten besser kontrollieren zu können. Hierzu adaptieren Tregs die Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren, die für die unterschiedlichen Th-Zellpopulationen von Bedeutung sind⁵³. Z.B. können Tregs den für Th2 Zellen bedeutenden Transkriptionsfaktor IRF4 exprimieren⁹². IRF4 bildet mit Foxp3 Proteinkomplexe, die einen Satz verschiedener Gene steuern⁹².

Die Expression dieser Gene ermöglicht Tregs spezifisch Th2 Antworten besser zu regulieren⁹². Mäuse mit Treg-spezifischer Deletion von IRF4 entwickeln einen autoimmunen Phänotyp, der auf der selektiven Fehlregulierung von Th2 Antworten basiert⁹². Ferner führt die Expression des Th1 spezifischen Transkriptionsfaktors T-bet in Tregs zur Expression des Chemokinrezeptors CXCR3⁹³. Dies ermöglicht Tregs in Gewebe einzuwandern, zu proliferieren und sich in Geweben anzureichern, in denen Th1-vermittelte Entzündungsprozesse stattfinden⁹³. Parallel dazu resultiert die Treg-spezifische Deletion des Transkriptionsfaktors STAT3 in der Entwicklung eines Th17-abhängigen, autoimmunen Krankheitsbildes⁹⁴. Wie zuvor bereits in Abschnitt 1.2.3 beschrieben, ist STAT3 erheblich an der Differenzierung von Th17 Zellen beteiligt. Ein Überblick über die Th-zellspezifische Suppression durch Tregs ist in Abbildung 1.5 dargestellt.

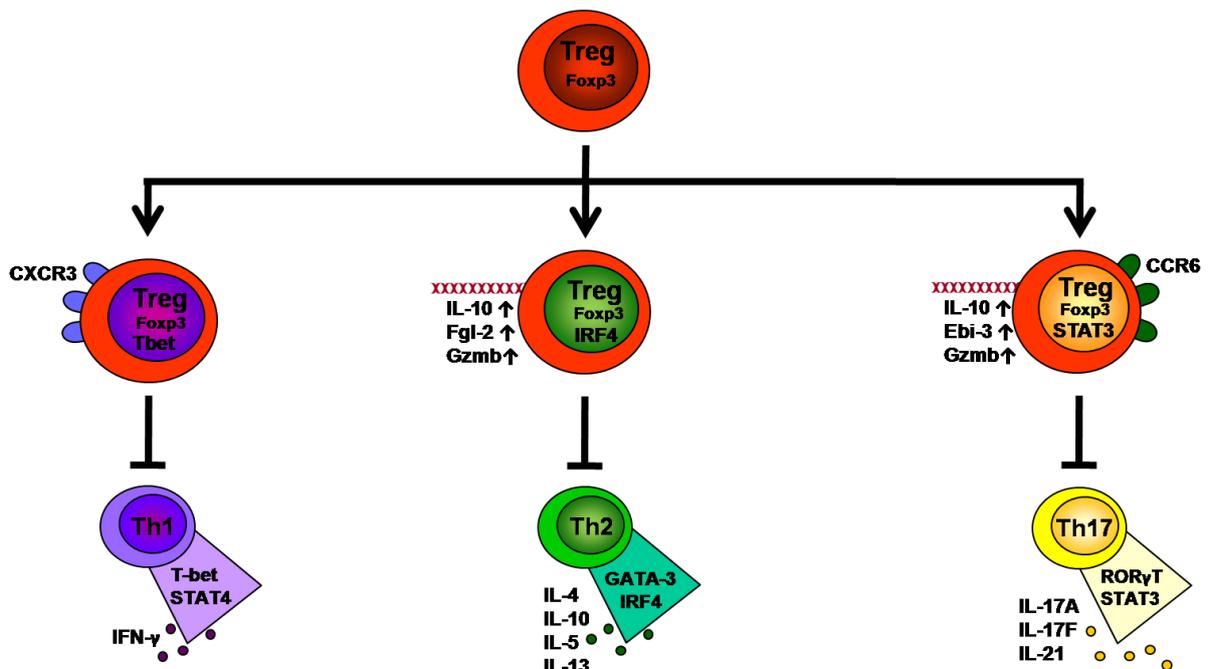


Abbildung 1.5: Th-Zellspezifische Suppression mittels Adaption von Transkriptionsfaktoren durch Tregs: Durch Expression von T-bet können Tregs CXCR3 exprimieren, wodurch sie in Gewebe mit Th1-spezifischen Immunreaktionen gelangen. Dort können sie Th1 Antworten besser kontrollieren. Weiterhin können Tregs IRF4 exprimieren, welcher mit Foxp3 interagiert und spezifische Gene in Tregs anschaltet, die zu einer spezifischen Suppression Th2-vermittelter Immunantworten beitragen. Die Expression von STAT3 erlaubt Tregs die bessere Kontrolle von Immunantworten, die auf einer überschießenden Aktivierung von Th17 Zellen basieren. STAT3 führt in Tregs ebenfalls zu einer gesteigerten Expression diverser Gene, wie auch des Chemokinrezeptors CCR6. CCR6 erlaubt es den Tregs in Gewebe einzuwandern in denen Th17-vermittelte Immunantworten ablaufen.

Einleitung

Tregs repräsentieren also eine heterogene, aber separate T-Zellsubpopulation, die über zahlreiche Mechanismen in der Lage ist, die Entstehung von Autoimmunkrankheiten zu supprimieren und überschießende Immunreaktionen zu kontrollieren. Ferner können Tregs, abhängig von der jeweiligen Natur der Immunreaktion, verschiedene phänotypische Subtypen annehmen, die unterschiedliche Th-Zellantworten regulieren. Ihre einzigartige Rolle in der Balance des Immunsystems machte Tregs in den letzten Jahren zu interessanten Forschungsobjekten. Viele Studien fokussierten sich dabei auf die Analyse des Transkriptom und Proteoms von Tregs^{95,96,97,98}. Der Vergleich der Tregs mit Tcons sollte Zielmoleküle identifizieren, anhand derer sich diese T-Zellen gezielt manipulieren lassen. Wenig Aufmerksamkeit wurde jedoch auf das Kinom der Tregs, und damit auf die Integration äußerer Signale, gelegt. Um ihrer Funktion gerecht zu werden und ihre suppressiven Mechanismen korrekt und bestmöglich einzusetzen sind Tregs jedoch gezwungen, schnell auf äußere Signale zu reagieren. Kinasen könnten sich daher in besonderem Maße eignen, um die Funktion von Tregs zu beeinflussen. Die spezifisch in Tregs aktiven Kinasen sind von besonderem Interesse, da für zahlreiche Kinasen bereits pharmakologische Inhibitoren existieren. Um die unterschiedliche Regulation der Kinasen in Tregs und Tcons zu untersuchen wurde daher in Vorarbeit zu diesem Projekt ein sogenannter *Kinomarray* durchgeführt. Details zur Handhabung dieses Arrays sind in Abschnitt 2.9 des Material & Methoden Teils beschrieben. In Abbildung 1.6 werden die für diese Arbeit grundlegenden Ergebnisse dieses Versuches dargelegt.

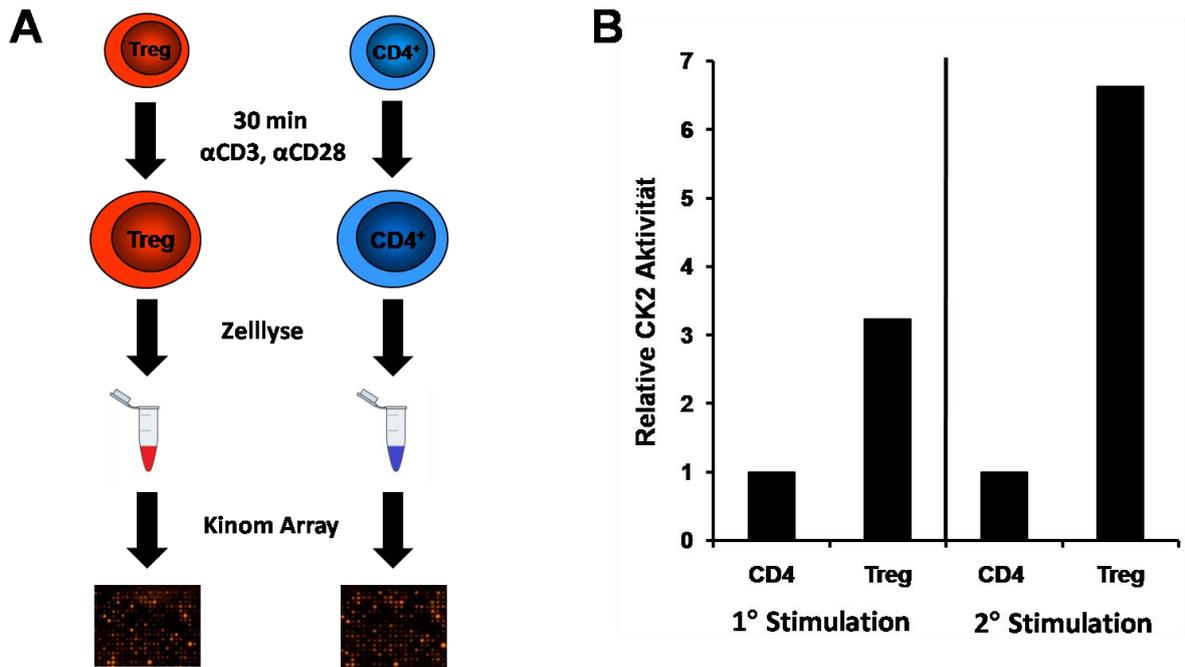


Abbildung 1.6: Tregs zeigen eine stark erhöhte Aktivität der Casein Kinase 2 im Vergleich zu konventionellen $CD4^+$ T-Zellen: **A** Prinzip der Durchführung des *Kinomarrays*. Aus den Milzen von C57BL/6 Mäusen wurden $CD4^+CD25^+$ Tregs und $CD4^+CD25^-$ Tcons isoliert. Die Zellen wurden für 30min auf mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern beschichteten Platten stimuliert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Zellysate mit den aktivierten Kinasen im *Kinomarray* eingesetzt. **B** Relative Aktivität der Casein Kinase 2 in $CD4^+$ und Treg Zellen nach primärer und sekundärer TZR Stimulation. Die Daten wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Tobias Bopp bereitgestellt.

Aus dem in Abbildung 1.6 behandelten *komparativen Kinomarray* geht hervor, dass die *Casein Kinase 2* (CK2) eine der, im Vergleich zu Tcons, am stärksten aktiven Kinasen nach TZR Stimulation in Tregs ist. Nach sekundärer Stimulation^e über den TZR ergibt sich eine fast siebenfach erhöhte Aktivität der CK2 in Tregs, im Vergleich zur Kontrolle. Basierend auf dem Resultat des *Kinomarrays*, das mit freundlicher Unterstützung von Prof. Dr. Tobias Bopp bereitgestellt wurde, sollte im Rahmen dieser Arbeit die Funktion der CK2 in Tregs untersucht werden. Der folgende Abschnitt 1.5 befasst sich daher mit grundlegenden Eigenschaften der CK2. Abschnitt 1.6 geht auf die genaue Zielsetzung dieser Arbeit ein.

^e Sekundäre TZR-abhängige Stimulation: Stimulation von T-Zellen über ihren TZR, die bereits vor einer gewissen Ruhephase ohne Stimulation über ihren TZR aktiviert wurden, und daher nicht mehr als naive T-Zellen angesehen werden können.

1.5 Casein Kinase 2 (CK2)

Aus dem in Abschnitt 1.4 beschriebenen *Kinomarray* geht hervor, dass die *Casein Kinase 2* (CK2) eine erhöhte Aktivität in Tregs aufweist. Dieser Abschnitt befasst sich daher mit allgemeinen Grundlagen und Funktionen der CK2. Die CK2 wurde zuerst als ubiquitäre Serin/Threonin-Kinase beschrieben, jedoch belegen Studien auch eine Tyrosin-Kinase-Aktivität⁹⁹. Während Serin/Threonin-Kinasen im Allgemeinen eher grundlegende Zellfunktionen wie Proliferation, Apoptose und Differenzierung regulieren, steuern Tyrosin-Kinasen häufig die von Rezeptoren ausgehende direkte Reizweiterleitung in der Zelle. Die CK2 aggregiert gewöhnlich in einem Holoenzymkomplex aus zwei katalytischen α - und zwei regulatorischen β -Untereinheiten (CK2 α UE und CK2 β UE)⁹⁹. Bereits im Jahr 2003 wurden über 300 potentielle Substrate der CK2 beschrieben¹⁰⁰. Das Enzym partizipiert demnach in zahlreichen Signalwegen und erfüllt eine Vielzahl von Funktionen innerhalb der Zelle¹⁰¹. Während die CK2 α UE die eigentliche Kinase-Aktivität erfüllt, besteht die Funktion der CK2 β UE in der Regulation des Enzyms. Die CK2 β UE koordiniert die Interaktion mit verschiedenen Substraten der CK2 und moduliert die Kinase-Aktivität des Enzyms¹⁰². Ferner stabilisiert die CK2 β UE den Holoenzymkomplex¹⁰². Die allgemeine Struktur und die grundlegenden Funktionen der CK2 sind in Abbildung 1.7 zusammengefasst.

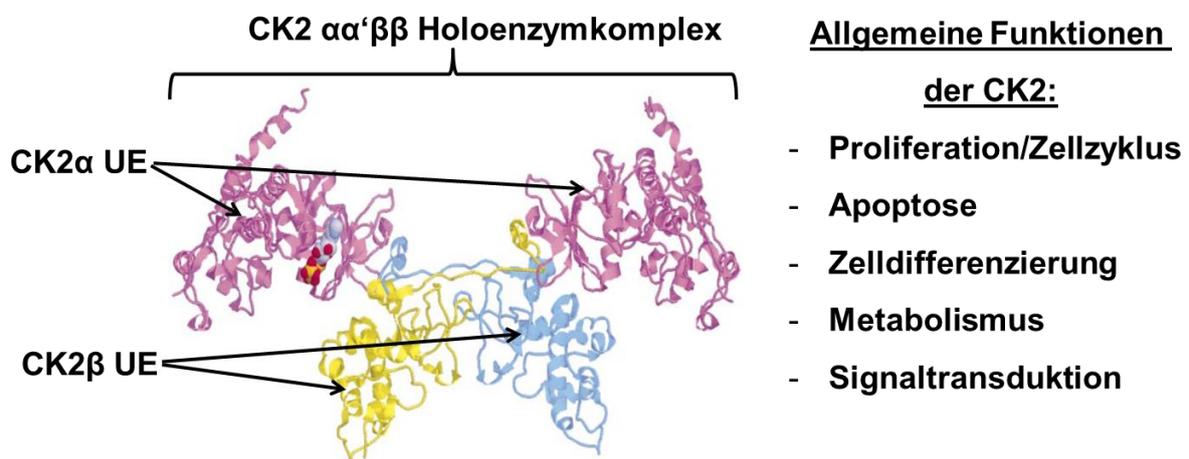


Abbildung 1.7: Struktur und allgemeine Funktionen der CK2: Verändert nach Litchfield, D.W. Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decision of life and death. *Biochem. J.* 2003; **369**: 1-15 © the Biochemical Society. Der Holoenzymkomplex der Ck2 besteht aus zwei katalytischen α - und zwei regulatorischen β -Untereinheiten. Innerhalb einer Zelle erfüllt die CK2 zahlreiche allgemeine Funktionen.

Neben den in Abbildung 1.7 behandelten grundlegenden Aufgaben der CK2 suggerieren diverse Hinweise eine bedeutende Rolle des Enzyms in der Entwicklung entzündlicher Prozesse¹⁰³. Dennoch ist bis heute wenig über die Funktion der CK2 in T-Zellen oder gar Tregs bekannt. Wie schon vor längerer Zeit aufgeklärt wurde, assoziiert die CK2 in T-Zellen mit dem Oberflächenmolekül CD5 und kann so Signale, die über den TZR in die T-Zelle übermittelt werden, modulieren¹⁰⁴. Die gleiche Studie konnte jedoch zeigen, dass die Kreuzvernetzung des CD3 Signalkomplexes keine Auswirkung auf die Aktivität der CK2 besitzt¹⁰⁴. Mäuse, in denen die Assoziation der CK2 an CD5 künstlich unterbunden wird, zeigen allerdings eine Resistenz gegenüber der Induktion der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE)¹⁰⁵. Ein Bezug zu Tregs wurde in der beschriebenen Studie jedoch nicht hergestellt. So existiert bis heute keine Literatur, die eine Verbindung der Protein-Kinase CK2 zu Foxp3 oder Tregs aufzeigt. Diese Arbeit diene also dazu, ein grundlegendes Verständnis der Funktion der CK2 in Tregs zu bekommen. Das Ziel der Arbeit ist daher im nächsten Abschnitt 1.6 genauer formuliert.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Im Laufe der letzten zwei Dekaden sind Foxp3 exprimierende regulatorische T-Zellen (Tregs) in den Mittelpunkt intensiver Forschung gerückt. Innerhalb des Immunsystems nehmen Tregs eine herausragende Rolle ein, da sie eine essenzielle Funktion zur Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz innehaben. So verhindern sie die Entwicklung von Autoimmunerkrankungen wie Diabetes Typ I, Multipler Sklerose und rheumatoider Arthritis. Zudem begünstigen dysfunktionale Tregs die Entstehung von allergischen Reaktionen wie z.B. allergischem Asthma. Andererseits können Tregs paradoxerweise Tumore vor der Erkennung durch das adaptive Immunsystem schützen, weil sie den Tumor als „selbst“ missdeuten und so eine vermeintlich autoaggressive Anti-Tumorreaktion supprimieren. Trotz intensiver Forschung konnte die Beeinflussung der Funktion von Tregs bisher nur in wenigen Fällen zur Bekämpfung der genannten Krankheiten nutzbar gemacht werden. Ein möglicher neuer Ansatz besteht in der Beeinflussung von Kinasen. In Vorarbeit zu dieser Arbeit wurde daher ein komparativer *Kinomarray* durchgeführt. Dieser *Kinomarray* identifizierte die *Casein Kinase 2* (CK2) als eine der selektiv in Tregs aktivsten Kinasen.

Ziel dieser Arbeit ist es daher, die Funktion der CK2 in Tregs zu analysieren und zu ermitteln, inwieweit eine Blockade der Funktion der CK2 in Tregs für die Behandlung der obigen Krankheiten genutzt werden kann. Um die Rolle der CK2 in Tregs aufzuklären sollte zunächst der pharmakologische Inhibitor *2-Dimethylamino-4,5,6,7-tetrabromo-1H-Benzimidazol* (DMAT) in

Einleitung

Treg-spezifischen Suppressionsassays getestet werden. Schließlich sollte durch Kreuzen entsprechender Mausstämmen eine konditionale Gen-defiziente Maus mit Treg-spezifischer Deletion der CK2 β Untereinheit hergestellt werden. Die Analyse dieser Tiere ermöglicht einen direkten Einblick in die Funktion der CK2 in Tregs.

2 Material & Methoden

2.1 Verbrauchsmaterialien

Alle Verbrauchsmaterialien wurden steril bezogen. Soweit nicht anders angegeben, stammen die verwendeten Plastik- und Verbrauchsmaterialien von den Firmen Greiner-Bio-One (Frickenhausen, Deutschland), VWR (Ismaning, Deutschland), Eppendorf (Hamburg, Deutschland), Nunc/Thermo (Karlsruhe, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland), sowie Miltenyi Biotec (Bergisch-Gladbach, Deutschland).

2.2 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden, falls nicht anders angegeben, von den Firmen Merck (Darmstadt, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland) und Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) bezogen.

2.3 Geräte und Hilfsmittel

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Geräte und Hilfsmittel verwendet. Ein Überblick über diese ist Tabelle 2.1 zusammengefasst.

<u>Gerät bzw. Hilfsmittel:</u>	<u>Hersteller:</u>
1205 Beta Plate Liquid Scintillation Counter	LKB Wallac (bzw. LKB Instruments, Australien)
Agarose-Gelelektrophoresekammer und -Kämme	Biorad (München, Deutschland)
Aluminiumhydroxid (Alum, Asthma)	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Analytische Waage CP64	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Ausgießstation Tissue-Tek TEC (Asthma)	Sakura Finetec (USA)
Biofuge pico Zentrifuge	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Bio Photometer Plus	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Block Thermostat Th23	Ditabis (Pforzheim, Deutschland)
Bunsen Brenner Fireboy eco	Integra Bioscience (Chur, Schweiz)
Cell Harvester Erntegerät	LKB Wallac (bzw. LKB Instruments, Australien)
Chirurgischer Faden	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
Dispenser Handy Step	Brand (Wertheim, Deutschland)
Durchflusszytometer ARIA II	BD Bioscience (Heidelberg, Deutschland)
Dynal Magnet	Dynal Biotec (Hamburg, Deutschland)
Einbettstation Tissue Tek VIP (Asthma)	Sakura Finetec (USA)

Material & Methoden

Electrophoresis Power Supply EPS 3501 XL	GE Healthcare (Freiburg, Deutschland)
Gel Dokumentationssystem Chemi Doc XRS	Biorad (München, Deutschland)
Gel Dokumentationssystem Gel Doc XR	Biorad (München, Deutschland)
Halbautomatisches Rotationsmikrotom Cut 5056	SLEE (Mainz, Deutschland)
iCycler	Biorad (München, Deutschland)
LSR II Durchflusszytometer	BD Bioscience (Heidelberg, Deutschland)
Kühlplatte MPS/C (Asthma)	SLEE (Mainz, Deutschland)
MACS Magnete Midi MACS und Quatro MACS	Milteny Biotec (Bergisch-Gladbach, Deutschland)
MCO-20AIC CO ₂ -Inkubator	Sanyo (Wood Dale, IL, USA)
Megafuge 10 Zentrifuge	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Mikroskop CKX41	Olympus (Hamburg Deutschland)
Mikroskop mit Kamera BX40 mit Colorview	Olympus (Hamburg Deutschland)
MSC-Advantage Sterile Werkbank	Thermo Scientific (Karlsruhe, Deutschland)
Multifuge 3L-R Zentrifuge	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Multifuge 10R Zentrifuge	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Neubauerzählkammer	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Narcoren® (Pentobarbital-Natrium 160mg/mL)	Merial (Halbermoos, Deutschland)
Ovalbumin aus Hühner Ei Grade VI	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
PAGE-Equipment (1D-PAGE) Mini Protean R	Biorad (München, Deutschland)
pH Meter, CG 840	Schott (Mainz, Deutschland)
Präparierbesteck	Hammacher (Solingen, Deutschland)
Protein Marker SM1812 Page Ruler™ Plus Prestained (10-250kDa)	Thermo Scientific (Karlsruhe, Deutschland)
PVDF Membran Immobilon®-P, 0,45 µm	Millipore (Billerica, USA)
Schwenkinkubator, Shaker DRS12	NeoLab (Heidelberg, Deutschland)
Semi-dry Apparatur, Transblot SD	Biorad (München, Deutschland)
Spectraflour Plus- und Genius-ELISA Reader	Tecan (Crailsheim, Deutschland)
SW1 Wasserbad	Julabo (Seelbach, Deutschland)
T3 Thermocycler	Biometra (Göttingen, Deutschland)
Trockenschrank T6030 (Asthma Experimente)	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Tubus (Asthma Experimente)	Eigenherstellung AG Buhl/Reuter
Ultraschallbad	Schalltec (Mörfelden-Walldorf, Deutschland)
Vacupak Folienschweißgerät	Krupps (Offenbach, Deutschland)
Vernebler Ultrasonic Nebuliser Modell NE-U17	Omron (Mannheim, Deutschland)
Verneblungskammer	Eigenherstellung AG Buhl/Reuter
Vortexer	VWR (Darmstadt, Deutschland)
Waage 1202 Sartorius	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Wärmeplatte MST (Asthma)	SLEE (Mainz, Deutschland)
Whatman Papier	Whatman (München, Deutschland)
Zytofuge Cytospin 4 (Asthma)	Thermo Electron Corporation

Tabelle 2.1: Zusammenfassung der im Rahmen der Arbeit verwendeten Geräte und Hilfsmittel, sowie deren Hersteller.

2.4 Tiere

Die verwendeten Versuchstiere wurden standardisiert in der zentralen Versuchstiereinrichtung Mainz unter SPF- („spezifisch pathogenfreien“) Bedingungen gehalten. Falls nicht anders angegeben waren alle verwendeten Tiere vom genetischen C57BL/6 Hintergrund. Zur Analyse der Funktion der CK2 in Tregs wurden unter Verwendung des Cre-loxP Systems konditionale „*Knockout*“ Mäuse gezüchtet. Diese Tiere tragen eine Deletion der Exons drei und vier des murinen *Cnsk2b* Gens, welches für die regulatorische CK2 β Untereinheit (UE) codiert. Um diese Mäuse mit konditionalem „*Knockout*“ der CK2 β in Tregs zu erhalten, wurden Tiere der folgenden beiden Mausstämme miteinander verpaart. Der erste Mausstamm, die sogenannten *Foxp3-IRES-Cre* (FIC) Mäuse tragen einen "*Knockin*", welcher dazu führt, dass unter der Kontrolle des *Foxp3*-Promoters die Cre Rekombinase exprimiert wird⁷⁶. Diese Tiere wurden im Labor von Shimon Sakaguchi auf dem genetischen BALB/c Hintergrund erzeugt. Im Institut für Immunologie der Universität Mainz wurden diese Tiere auf den genetischen C57BL/6 Hintergrund gekreuzt. In den Tieren des zweiten Mausstamms sind Teile des *Csnk2b* Gens von so genannten *loxP Sites* flankiert¹⁰². Alle verwendeten Tiere wurden im Alter zwischen 6-20 Wochen verwendet.

2.5 Lösungen, Puffer und Reagenzien

2.5.1 Puffer und Reagenzien für die Isolation verschiedener T-Zellpopulationen

Anti-CD8-, -B220 und –Mac1 DynaBeads (anti-CD8-, anti-B220- und anti-Mac1-Beads)

Für die Isolation reiner CD25⁺ Treg Populationen wurden anti-CD8-, anti-B220- und anti-Mac1-Beads der Firma Dymal Biotech (Hamburg, Deutschland) verwendet.

Anti-Phycoerythrin-Mikrobeads (anti-PE-Beads)

Zur Isolation CD25⁺ Tregs wurden anti-PE-Beads der Firma Miltenyi (Bergisch Gladbach, Deutschland), nach Angaben des Herstellers verwendet

Ethylendiamintetraacetat (EDTA)

EDTA wurde als 0,5 M Stammlösung angesetzt. Der pH wurde mit 10 M NaOH auf 8 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung autoklaviert.

Material & Methoden

Fötale Kälberserum (FCS)

Das verwendete FCS wurde zur Inaktivierung der Komplementkomponenten bei 56°C im Wasserbad für 30 Minuten erhitzt. Vor der Verwendung wurde das FCS 25 Minuten bei 800 xg zentrifugiert, um Partikel zu entfernen. Nur der Überstand wurde als Zusatz in Kulturmedien verwendet.

Gey's Lysepuffer

Zum lysieren von Erythrozyten durch einen osmotischen Schock wurde eine 0,83%ige Ammoniumchlorid-Lösung folgender Zusammensetzung verwendet.

8,29 g/L NH_4Cl

1 g/L KHCO_3

0,037 g/L EDTA

pH 7,4

Der Puffer wurde vor Verwendung im Wasserbad bei 37°C vorgewärmt.

Großer MACS Puffer (GM-Puffer)

In 1xPBS wurde folgende Lösung angesetzt:

0,5% BSA

5 mM EDTA

0,01% NaN_3

Natrium-Pyruvat

In VE-Wasser wurde eine 0,1 M Stammlösung Natrium-Pyruvat angesetzt und steril filtriert (0,2 μM).

Phosphate gepufferte Saline (1xPBS)

In VE-Wasser wurde folgende Lösung mit pH 7,2 angesetzt und autoklaviert

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

0,1 M NaH_2PO_4 (15,6 g/L)

1xPBS + 10% FCS

In 1xPBS wurde eine 10%ige FCS Lösung angesetzt

Rinderserumalbumin (BSA)

Es wurde eine 10%ige Lösung in PBS angesetzt und steril filtriert (0,2 µM)

Streptavidin-Mikrobeads (SA-Beads)

Zur Isolation CD4⁺ T-Zellen wurden SA-Beads der Firma Milteny (Bergisch Gladbach, Deutschland), nach Angaben des Herstellers verwendet

Streptavidin-gekoppeltes Phycoerythrin (SA-PE)

Zur Isolation CD25⁺ Tregs wurde SA-PE der Firma Jackson Immuno Research (Suffolk, United Kingdom), nach Angaben des Herstellers verwendet. Hierzu wurde das SA-PE in 1 mL Aqua ad iniectabilia der Firma Braun (Melsungen, Deutschland) gelöst.

Trypanblau-Lösung

Für die Bestimmung von Lebend/Tot Zellzahlen wurde eine Trypanblau-Lösung folgender Zusammensetzung verwendet

0,05% (w/v)	Trypanblau
140 mM	NaCl
10 mM	NaH ₂ PO ₄

2.5.2 Reagenzien zur Vorbereitung und Durchführung von Proliferationsassays**³H-Thymidin**

Zur Markierung von Proliferationsassays wurde ³H-Thymidin einer spezifischen Radioaktivität von 5mCi von Perkin Elmer (Boston, MA, USA) verwendet. Das Thymidin wurde dazu in Iscove's 1:50 vorverdünnt und anschließend im Test eingesetzt.

Mitomycin C

Zur Behandlung von A20 Zellen wurde eine Lösung von 600 µg/mL Mitomycin C in PBS verwendet.

2.5.3 Puffer und Reagenzien zur Genotypisierung und zum Nachweis der Deletion der CK2 in Tregs

2'-Desoxynukleosid-5'-Triphosphate (dNTPs)

dNTPs wurden als Set von je 25 µmol dATP, dCTP, dGTP und dTTP in einer Konzentration von 100 mM (Gibco, Rockville, MD, USA oder MBI Fermentas, Vilnius, Litauen) bezogen. Ausgehend hiervon wurde eine 10 mM Stammlösung in autoklaviertem Wasser angesetzt und bei -20°C gelagert.

70%iger Ethanol

Zum Waschen genomischer DNA und RNA wurde 100%iger Ethanol p.a. mit VE-Wasser zu einer 70%igen Ethanollösung verdünnt.

DreamTaq DNA-Polymerase und Puffer

Für Genotypisierungen und den Nachweis der Deletion der CK2 in Tregs wurde DreamTaq DNA-Polymerase und Puffer der Firma Fermentas/Thermo (Karlsruhe, Deutschland) verwendet.

Genomischer Lysepuffer

Zum Auflösen von Gewebebiopsien zur Genotypisierung wurde Genomischer Lysepuffer folgender Zusammensetzung in VE-Wasser verwendet

300 mM	NaCl
25 mM	EDTA
50 mM	Tris pH8
0,2%	SDS
0,5 mg/mL	Proteinase K (erst direkt vor Gebrauch zugegeben)

Isopropanol/2-Propanol

Isopropanol p.a. wurde zum Fällern genomischer DNA verwendet.

Proteinase K

Zum Auflösen von Gewebebiopsien zur Genotypisierung wurde Proteinase K 1:40 in Genomischem Lysepuffer verwendet. Proteinase K (aus *Tritirachium album*) wurde hierzu von Serva Electrophoresis (Heidelberg, Deutschland) bezogen

Tris-Acetat-EDTA Laufpuffer (TAE Laufpuffer)

Für Gelelektrophoresen wurde in VE Wasser eine 50x Stocklösung mit folgender Zusammensetzung angefertigt:

240 g/L	Tris-Base
47 mL/L	Essigsäure
100 mL/L	0,5 M EDTA

Für die Elektrophoresen wurde dieser Puffer 1:50 in VE-Wasser verdünnt.

Tris-EDTA-Puffer (TE-Puffer)

TE-Puffer wurde zur Lagerung von DNA verwendet. TE-Puffer wurde in VE-Wasser mit folgenden Zusätzen angesetzt.

10 mM	Tris
1 mM	EDTA (pH8)

Der hohe pH-Wert verbessert die Löslichkeit der DNA, während das EDTA die Aktivität von DNAsen inhibiert. Vor Gebrauch wurde die Lösung autoklaviert

2.5.4 Puffer und Reagenzien für Western Blots**10x Blot Puffer**

10x Blot Puffer wurde in VE-Wasser mit folgenden Zusätzen hergestellt:

250 mM	Tris
1,9 M	Glycin

Material & Methoden

1x Blot Puffer

1x Blot Puffer wurde aus 10x Blot Puffer unter Zugabe folgender Chemikalien verdünnt:

200 mL/L	Methanol
700 mL/L	VE-Wasser
100 mL/L	10x Blot Puffer
400 µL/L	10% (w/v) SDS in dH ₂ O

5x Ladepuffer für SDS-PAGE

Zum Beladen von Gelen für die SDS-PAGE wurde ein 5x konzentrierter Ladepuffer aus folgenden Chemikalien verwendet

40% (w/v)	Glycin
6,82% (w/v)	Tris Base
6,66% (w/v)	Tris HCl
8% (w/v)	SDS
0,06% (w/v)	EDTA
0,075% (w/v)	Bromphenolblau
0,025% (w/v)	Bromphenolrot

Blockpuffer für Western Blot

Als Blockpuffer für Western Blot wurde 5% Milchpulver in TBS-T verwendet

Merrettich-Peroxidase Substrat (HPO-Substrat)

Zum Entwickeln von Western Blots wurde Super Signal West Dura Chemiluminiscent Substrate (HPO-Substrat) der Firma Thermo Scientific (Bonn, Deutschland) verwendet

Harnstoffpuffer

Zur Lyse von Zellen zur Proteingewinnung wurde ein 8 M Harnstoffpuffer mit pH 8,5 aus folgenden Chemikalien gebraucht.

0,1 M	Tris
8 M	Harnstoff (Urea)

Sammelgel Reagenzien

Als Reagenzien für die Herstellung von Sammelgelen wurden folgende Chemikalien verwendet:

0,5 mL	Acrylamid (40% 1:29)
1,2 mL	Sammelgelpuffer
3,2 mL	H ₂ O
50 µL	SDS (10% w/v)
25 µL	APS (10% w/v)
5 µL	TEMED

Sammelgel Puffer

Als Basispuffer für die Herstellung von Sammelgelen für SDS-PAGE wurde eine Lösung 0,5 M Tris-HCl mit pH 6,8 in VE-Wasser verwendet

SDS-PAGE Elektrophoresepuffer

Als Laufpuffer für Elektrophoresen bei der SDS-PAGE wurde ein Puffer mit folgenden Zusätzen in VE-Wasser verwendet

25 mM	Tris
190 mM	Glycin
0,1% (w/v)	SDS

Trenngel Reagenzien

Als Reagenzien für die Herstellung von Trenngelen wurden folgende Chemikalien verwendet:

2,5 mL	Acrylamid (40%)
2,5 mL	Trenngelpuffer
4,8 mL	H ₂ O
100 µL	SDS (10% w/v)
50 µL	APS (10% w/v)
10 µL	TEMED

Trenngel Puffer

Als Basispuffer für die Herstellung von Trenngelen für SDS-PAGE wurde eine Lösung 1,5 M Tris-HCl mit pH 8,6 in VE-Wasser verwendet

Material & Methoden

Tris-gepufferte Salzlösung (TBS)

TBS wurde in VE-Wasser unter Verwendung der folgenden Chemikalien angesetzt und auf pH 7,4 eingestellt

150 mM	NaCl
12,7 mM	Tris

Tris-gepufferte Salzlösung mit TWEEN (TBS-T)

TBS wurde mit 1% (w/v) TWEEN 20 versetzt

2.5.5 Lösungen, Reagenzien und Puffer für die Durchflusszytometrie

1000x Monensin (Biolegend) für intrazelluläre Zytokinfärbungen

Zum Nachweis der Zytokinproduktion einzelner Zellen, wurde 1000x Monensin der Firma Biolegend (Fell, Deutschland) verwendet

2.5.6 Lösungen, Reagenzien und Puffer für ELISA

2,2-Azino-bis(3-Ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS)

Als farbiges Substrat für die Entwicklung von ELISAs wurde ABTS der Firma Roth (Karlsruhe, Deutschland) benutzt

2N H₂SO₄ (Schwefelsäure)

Als Abstopplösung für ELISA, die mit Hilfe von BD OptEIA Kits durchgeführt wurden, wurde 2N Schwefelsäure benutzt.

Blockpuffer für ELISA

Als Blockpuffer für ELISA wurden, zum einen eine Lösung von 1% BSA und 0,2% TWEEN 20 in 1x PBS verwendet. Für ELISA, die mit Hilfe von BD OptEIA Kits durchgeführt wurden, wurde zum anderen eine Lösung von 10% FCS in 1x PBS als Assay Diluent, nach Hersteller Angaben, verwendet

Kopplungspuffer für ELISA

Für die Bindung des Primärantikörpers im Zuge von ELISAs wurde eine Lösung mit pH 9,4 und folgendem Zusatz in VE-Wasser benutzt

0,1 M Na₂HPO₄

Ovalbumin (OVA) für ELISA

Für die Detektion OVA-spezifischer Antikörper Isotypen in Seren wurde Albumin aus Hühner Ei (OVA) *Grade VI* der Firma Sigma (Deisenhofen, Deutschland) im ELISA eingesetzt. Für den Nachweis OVA-spezifischen IgEs wurde biotinyliertes OVA der AG Buhl/Reuter verwendet.

Streptavidin-gekoppelte Meerrettich-Peroxidase (SA-HPO)

Für die Entwicklung von ELISAs wurde SA-HPO der Firmen Boehringer (Mannheim, Deutschland) und BD Biosciences Pharmingen (Heidelberg, Deutschland) verwendet

Substratpuffer für ELISA

Als Substratpuffer für die Farbentwicklung von ELISAs wurde Zitratpuffer unter Zusatz von 1 mg/mL ABTS (2,2-Azino-bis(3-Ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)) sowie 0,075 ‰ H₂O₂ verwendet

Waschpuffer für ELISA

Zum Waschen von ELISAs wurde eine 0,1%ige Lösung Tween 20 in 1x PBS verwendet

Zitratpuffer für ELISA

Als Basis für den Substratpuffer für die Farbentwicklung von ELISAs wurde Zitratpuffer mit pH 4,4 und folgenden Ingredienzien in VE-Wasser gebraucht:

40 mM Zitronensäure

60 mM Na₂HPO₄

2.5.7 Reagenzien für die Durchführung von Asthma Experimenten

99%ige Periodsäure

Zur Durchführung von PAS-Färbungen im Zusammenhang mit der Histologischen Untersuchung bei Asthma Versuchen wurde 2%ige Periodsäure, ausgehend von 99%iger Säure der Firma Roth (Karlsruhe, Deutschland) in VE-Wasser verdünnt und verwendet.

Eosin

Zur Durchführung von HE-Färbungen im Zusammenhang mit der Histologischen Untersuchung bei Asthma Versuchen wurde Eosin der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) benutzt.

Material & Methoden

Hämalaun

Zur Durchführung von HE-Färbungen im Zusammenhang mit der Histologischen Untersuchung bei Asthma Versuchen wurde Hämalaun der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) benutzt.

OVA-Sensibilisierungslösung

Zur Immunisierung (Sensibilisierung) von Versuchstieren im Rahmen von Asthma Versuchen wurde eine Lösung von 20 µg OVA zusammen mit 2 mg Aluminiumhydroxid in 1 mL 1x PBS angesetzt. Die Versuchstiere wurden entweder mit 100 µL dieser Lösung oder ggf. der gleichen Menge 1x PBS durch intraperitoneale Injektion immunisiert.

OVA-Vernebelungslösung

Zum Vernebeln von Versuchstieren im Rahmen von Asthma Experimenten wurde eine 1%ige (W/V) Ovalbuminlösung in 1x PBS verwendet

Paraffin, weiß DAB

Für die Erstellung histologischer Lungenschnitte wurde Paraffin, weiß DAB, der Firma Sasolwax (Hamburg, Deutschland) verwendet.

Roti®-Histofix 4,5%

Zur Fixierung der Lungen für die Histologie im Zusammenhang mit Asthma Experimenten wurde Roti®-Histofix der Firma Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) benutzt.

Schiffs Reagenz

Zur Durchführung von PAS-Färbungen im Zusammenhang mit der Histologischen Untersuchung bei Asthma Versuchen wurde Schiffsreagenz der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) benutzt.

Xylol

Zum Entwässern histologischer Lungenschnitte wurde Xylol der Firma Applichem (Darmstadt, Deutschland) verwendet.

2.5.8 Reagenzien für RNA-Präparation, Reverse Transkription und quantitative Realtime PCR

Chloroform für RNA-Präparation

Für RNA-Präparation wurde Chloroform der Firma Roth (Karlsruhe, Deutschland) verwendet

DEPC-Wasser für RNA-Präparation

Zur Aufbewahrung von RNA wurde VE-Wasser über Nacht mit 0,1% (v/v) DEPC (Diethylpyrocarbonat) gerührt und danach autoklaviert

Reverse Transkriptase (RT) und RT-Puffer

Für die reverse Transkription wurde M-MLV Reverse Transkriptase sowie 5x RT-Puffer der Firma Fermentas (Karlsruhe, Deutschland) verwendet.

SYBR GreenER für quantitative Realtime PCR (qRT-PCR)

Als Reagenz für die Durchführung der qRT-PCR wurde SYBR GreenER™ der Firma Life Technologies (Darmstadt, Deutschland) verwendet

TRI-flüssig Reagenz für RNA Isolation

Zur Isolation von RNA wurde TRI-flüssig Reagenz der Firma Bio&Sell (Feucht, Deutschland) benutzt

2.6 Kulturmedien

Iscove's modifiziertes Dulbecco's Medium (IMDM)

In VE-Wasser wurde folgendes Basismedium angesetzt und steril filtriert (0,2 µM):

17,67 g/L	IMDM Trockenpulver
3,02 g/L	NaHCO ₃
1%	Penicillin/Streptomycin
50 µM	β-Mercaptoethanol

Phenolrot als Indikator

Minimal Essential Medium (MEM)

MEM wurde aus MEM-Trockenpulver mit VE-Wasser und folgenden Zusätzen angesetzt und steril filtriert (0,2 µM).

1% Penicillin/Streptomycin

50µM β-Mercaptoethanol

2% FCS

Testmedium (TM5, T-Zell-Medium)

Zur Zellkultur und für *in vitro* Experimente wurde IMDM mit folgenden Zusätzen verwendet

5% FCS

1 mM Natrium-Pyruvat

2 mM Glutamin

Testmedium (TM10, T-Zell-Medium)

Für die *ex vivo* Stimulation von Lymphknotenzellen im Rahmen von Asthma Experimenten wurde IMDM mit folgenden Zusätzen verwendet

10% FCS

1 mM Natrium-Pyruvat

2 mM Glutamin

2.7 Kits

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die folgenden, käuflich erwerblichen Kit-Systeme verwendet:

Foxp3/Transcription Factor Staining Set, ebioscience (Frankfurt, Deutschland)

Pierce 660nm Protein Assay Kit, Thermo Scientific (Bonn, Deutschland)

BD OptEIA Reagent Set, BD Pharmingen (Heidelberg, Deutschland)

BD OptEIA Mouse IgE ELISA Kit, BD Pharmingen (Heidelberg, Deutschland)

BD OptEIA Mouse IL-5 ELISA Kit, BD Pharmingen (Heidelberg, Deutschland)

R&D Duo Set ELISA mouse IL-13, R&D Systems (Wiesbaden, Deutschland)

BD OptEIA Mouse IFN- γ ELISA Kit, BD Pharmingen (Heidelberg, Deutschland)

Hemacolor® (IVD)-Kit, Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)

Roti Histokit, Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)

2.8 Antikörper

2.8.1 Antikörper zur Isolation und *ex vivo* Stimulation von T-Zellen

Zur Isolation und Stimulation wurden verschiedene Antikörper verwendet. Die verwendeten Klone, ihre Antigene, die eingesetzte Konzentration und ihre Quelle sind in Tabelle 2.2 zusammengefasst. Zusätzlich sind in der Tabelle etwaige Kopplungen der Antikörper an Fluoreszenzfarbstoffe oder Biotinylierungen (-bio) angegeben. Nicht kommerziell erworbene Antikörper wurden aus den Kulturüberständen der jeweiligen Hybridome mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gefällt und mittels Protein G gereinigt.

Antigen:	Antikörper-Klon:	Eingesetzte Konzentration:	Antikörper bezogen von:
anti-CD4-bio	H129.19	0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Dr. H. Huber (Hautklinik der Johannes Gutenberg Universität Mainz). Pierres et al. ¹⁰⁶
anti-CD25-bio	7D4	5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	BD Pharmingen (Heidelberg, Deutschland)
anti-CD25-bio	7D4	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	M.D. E. M. Shevach (National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Bethesda, MA, USA) Shevach et al. ¹⁰⁷
anti-CD4-Pacific Blue	RM4-5	1,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Biolegend (Fell, Deutschland)
anti-CD62L-APC	MEL-14	0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$	ebioscience (Frankfurt, Deutschland)
anti-CD44-PE	IM-7	0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	ebioscience (Frankfurt, Deutschland)
anti-CD25-AF488	3C7	2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	ebioscience (Frankfurt, Deutschland)
anti-CD3	145-2C11	3 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Dr. J.A. Bluestone (Ben May Institute, Department of Pathology, Chicago, IL, USA) Samelson et al. ¹⁰⁸
anti-CD28	37.51	3 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Dr. J.P. Allison und Dr. J. Leclercq (Universität Gent, Belgien) J.A. Gross et al. ¹⁰⁹

Tabelle 2.2: Zusammenfassung der, für die Isolation und *ex vivo* Stimulation von T-Zellen verwendeten Antikörper. Antigene, Klone, eingesetzte Konzentrationen und die Quellen der benutzten Antikörper sind angegeben.

2.8.2 Antikörper für Western Blots

Für den Nachweis von Proteinen mittels Western Blot wurden verschiedene Antikörper verwendet. Die verwendeten Klone, ihre Antigene, die eingesetzte Konzentration und ihre Quelle sind in Tabelle 2.3 zusammengefasst. Zusätzlich sind in der Tabelle etwaige Kopplungen der Antikörper an Merrettichperoxidase (-HPO) angegeben.

Antigen:	Antikörper-Klon:	Eingesetzte Konzentration:	Antikörper bezogen von:
anti-CK2β	EP1995Y (Kanninchen)	1:500	Merck/Milipore (Darmstadt, Deutschland)
anti-IRF4	polyclonal IgG (Ziege)	2 µg/mL	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Deutschland)
anti-Kanninchen-HPO	polyclonal IgG-HPO (Ziege)	1:2000	Cell Signalling Technologies (Boston, MA, USA)
anti-Ziege-HPO	polyclonal IgG-HPO (Esel)	0,8 µg/mL	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Deutschland)
anti-β-Aktin-HPO	AC15 (Maus)	1:40.000	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

Tabelle 2.3: Zusammenfassung der, in Western Blots verwendeten Antikörper. Antigene, Klone, eingesetzte Konzentrationen und die Quellen der benutzten Antikörper sind angegeben.

2.8.3 Antikörper für die Durchflusszytometrie

Für durchflusszytometrische Analysen wurden verschiedene Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte Antikörper verwendet. Die folgende Tabelle 2.4 fasst die entsprechenden Antikörper nach ihren Antigenen zusammen. Ferner sind die Klone, die eingesetzte Antikörper Konzentration, sowie die Isotypen der Antikörper angegeben. Alle verwendeten Antikörper wurden, falls nicht anders angegeben von den Firmen ebioscience (Frankfurt, Deutschland), oder Biolegend (Fell, Deutschland) bezogen.

Antigen:	Antikörper-Klon:	Eingesetzte Konzentration:	Antikörper Isotyp:
anti-CD4-Pacific Blue	RM4-5	1,25 µg/mL	rat IgG2b κ
anti-CD62L-APC	MEL-14	0,2 µg/mL	rat IgG2a κ
anti-CD44-PE	IM-7	0,5 µg/mL	rat IgG1 κ
anti-CD25-Alexa Flour 488	3C7	2,5 µg/mL	rat IgG2b κ

anti-CD4-FITC	GK1.5	1 µg/mL	rat IgG2b κ
anti-CD8-PE-Cy7	53-6.7	0,5 µg/mL	rat IgG2a κ
anti-Foxp3-APC	FJK-16s	1 µg/mL	rat IgG2a κ
anti-Foxp3-PE	FJK-16s	1 µg/mL	rat IgG2a κ
anti-CD11c-APC-Cy7	N418	0,4 µg/mL	hamster IgG
anti-MHC-II-Pacific Blue	M5/114.15.2	0,5 µg/mL	rat IgG2b κ
anti-CD19-PE-Cy7	ebio1D3	0,4 µg/mL	rat IgG2a κ
anti-CD62L-PE	MEL-14	0,5 µg/mL	rat IgG2a κ
anti-CD44-APC	IM7	0,5 µg/mL	rat IgG1 κ
anti-IFN-γ-FITC	XMG1.2	1:400	rat IgG1 κ
anti-IFN-γ-APC	XMG1.2	0,5 µg/mL	rat IgG1 κ
anti-T-bet-PE	ebio4B10	0,5 µg/mL	mouse IgG1 κ
anti-GATA3-PE	TWAI	0,12 µg/mL	rat IgG2b κ
anti-IL-17-PE	ebio17B7	1 µg/mL	rat IgG2a κ
anti-RORγT-APC	AFKJS-9	1 µg/mL	rat IgG2a κ
anti-CTLA-4-PE	UC10-4F10-11	3 µg/mL	hamster IgG1 κ
anti-Granzym B-PE	16G6	1,5 µg/mL	rat IgG2b κ
anti-CD39-PE	24DMS1	1,5 µg/mL	rat IgG2b κ
anti-CD73-Pacific Blue	ebioTY/11.8	1 µg/mL	mouse IgG1 K
anti-pan TCRβ-PE	H57-597	0,5 µg/mL	hamster IgG2b κ
anti-CD3ε-Pacific Blue	17A2	1,25 µg/mL	rat IgG2b κ
anti-CD8-PE	53-6.7	0,4 µg/mL	rat IgG2a κ
ratIgG1 κ-FITC	eBRG1		
ratIgG1 κ-APC	eBRG1		
mouse IgG1 κ-PE	PB.6.2.8.1		
ratIgG2b-κ-PE	RTK4530		
ratIgG2a-κ-PE	RTK2758		
ratIgG2a-κ-APC	eBR2a		

Tabelle 2.4: Zusammenfassung der, für durchflusszytometrische Analysen verwendeten Antikörper. Antigene, Klone, eingesetzte Konzentrationen und die Isotypen der benutzten Antikörper sind angegeben.

2.8.4 Antikörper für ELISA

Zum Nachweis von Zytokinen in Kulturüberständen, oder von Antikörpertitern in Maus Seren, wurden im Rahmen von ELISAs verschiedene Antikörper verwendet. Die verwendeten Klone, ihre Antigene, die eingesetzte Konzentration und ihre Quelle sind in Tabelle 2.5 zusammengefasst. Zusätzlich sind in der Tabelle etwaige Biotinylierungen der Antikörper (-bio) angegeben.

Antigen:	Antikörper-Klon:	Eingesetzte Konzentration:	Antikörper bezogen von:
anti-IL-4	1D11.2	1 µg/mL	Dr. A. O'Garra (DNAX Research Institute, Palo Alto, CA, USA) Abrams J.S. et al. ¹¹⁰
anti-IL-4-bio	24G2-bio	0,6 µg/mL	Dr. A. O'Garra (DNAX Research Institute, Palo Alto, CA, USA) Abrams J.S. et al. ¹¹⁰
anti-IFN- γ	R46A2	2 µg/mL	Dr. M. Lohoff (Institut für med. Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, Philipps Universität Marburg, Deutschland) Abrams J.S. et al. ¹¹⁰
anti-IFN- γ -bio	AN18.17.24-bio	0,45 µg/mL	Dr. M. Lohoff (Institut für med. Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, Philipps Universität Marburg, Deutschland) Prat M. et al. ¹¹¹
anti-IL-10	JES5-2A5	4 µg/mL	BD Pharmingen (Heidelberg, Deutschland)
anti-IL-10-bio	SXC-1-bio	1 µg/mL	BD Pharmingen (Heidelberg, Deutschland)
anti-IL-5 (Abfang-Antikörper)	Keine Angaben	1:250	BD OptEIA Mouse IL-5 ELISA Kit, BD Pharmingen (Heidelberg, Deutschland)
anti-IL-5-bio (Detektions-Antikörper)	Keine Angaben	1:250	BD OptEIA Mouse IL-5 ELISA Kit, BD Pharmingen (Heidelberg, Deutschland)
anti-IL-13 (Abfang-Antikörper)	Keine Angaben	4µg/mL	R&D Duo Set ELISA mouse IL-13, R&D Systems (Wiesbaden, Deutschland)
anti-IL-13-bio (Detektions-Antikörper)	Keine Angaben	0,2µg/mL	R&D Duo Set ELISA mouse IL-13, R&D Systems (Wiesbaden, Deutschland)
anti-IFN- γ (Abfang-Antikörper)	Keine Angaben	1:250	BD OptEIA Mouse IFN- γ ELISA Kit, BD Pharmingen (Heidelberg, Deutschland)

anti-IFN- γ - bio (Detektions- Antikörper)	Keine Angaben	1:250	BD OptEIA Mouse IFN- γ ELISA Kit, BD Pharmingen (Heidelberg, Deutschland)
anti-IgE (Abfang- Antikörper)	Keine Angaben	1:250	BD OptEIA Mouse IgE ELISA Kit, BD Pharmingen (Heidelberg, Deutschland)
anti-IgE-bio (Detektions- Antikörper)	Keine Angaben	1:250	BD OptEIA Mouse IgE ELISA Kit, BD Pharmingen (Heidelberg, Deutschland)
anti-IgE (Abfang- Antikörper)	EMP95.3.1	4 μ g/mL	Dr. M. Stassen (Institut für Immunologie, Johannes-Gutenberg Universität Mainz), Baniyash M. et al. ¹¹²
anti-IgG1 (Abfang- Antikörper)	A85-1-bio	1:250	BD Pharmingen (Heidelberg, Deutschland)
anti-IgG2b (Abfang- Antikörper)	R13-3-bio	1:250	BD Pharmingen (Heidelberg, Deutschland)

Tabelle 2.5: Zusammenfassung der Antikörper, die für ELISA verwendet wurden. Antigene, Klone, eingesetzte Konzentrationen und die Quellen der benutzten Antikörper sind angegeben.

2.9 Kinomarray

Als Grundlage dieser Arbeit wurde ein komparativer *Kinomarray* vom Institut für Immunologie der Universität Mainz in Zusammenarbeit mit der Firma Pepscan Presto (Lelystadt, Niederlande) durchgeführt. In diesem *Kinomarray* sollte die Aktivität verschiedener Kinasen in Tregs und Tcons nach TZR Stimulation analysiert werden. Hierzu wurden mittels FACS-Sort reine Tregs und Tcons isoliert (siehe Abschnitt 2.12). Die isolierten Zellen wurden für 30 min auf, mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern beschichteten Platten bei 37°C und 5% CO₂ stimuliert. Anschließend wurden die Zellen in Übereinstimmung mit dem von Pepscan Presto bereitgestellten Protokoll lysiert. Die Zelllysate inklusive der aktivierten Kinasen wurden darauf im *Kinomarray* gemessen. Der Array besteht aus einem Objektträger, der mit 1024 verschiedenen, in Flecken angeordneten, Peptiden, beschichtet ist. Die Peptidfelder sind zudem in Triplikaten angelegt. Die Zelllysate wurden mit radioaktivem γ -³³P markiertem ATP versetzt und auf die Objektträger gegeben. Die in den Zelllysaten aktiven Kinasen phosphorylieren anschließend die für sie spezifischen Peptidsubstrate auf dem Objektträger. Durch Messung der Radioaktivität lassen sich Rückschlüsse auf die phosphorylierten

Material & Methoden

Peptide und damit auf die in den Zelllysaten aktiven Kinasen ziehen. Somit erhält man eine Liste der aktiven Kinasen in Tregs und in Tcons. Der Vergleich dieser Listen erlaubt Rückschlüsse auf die relative Aktivität der Kinasen in Tregs im Vergleich zu Tcons.

2.10 Methoden der Zellkultur

Alle Arbeiten der Zellkultur wurden an einer sterilen Werkbank (Vertikalflow) mit sterilen Glas- und Plastikmaterialien und Geräten durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem CO₂-Inkubator bei 37 °C und 5% CO₂.

Bestimmung der Lebendzellzahl

Um die Lebendzellzahl in verschiedenen Zellsuspensionen zu bestimmen, wurden kleine Aliquotes dieser Zellsuspensionen mit physiologischer Trypanblau-Lösung verdünnt. Trypanblau färbt tote Zellen, aufgrund ihrer fehlenden Membranintegrität, blau an. Lebende Zellen werden nicht gefärbt. Mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer (Tiefe 0,1 mm) wurde die Zahl der lebenden Zellen bestimmt. Durch Auszählung der 16 Einzelquadrate wird die Zellzahl (N) ermittelt. Durch Multiplikation von N mit dem Verdünnungsfaktor (V) und dem Kammerfaktor (10⁴) ergibt sich die Anzahl der lebenden Zellen pro Milliliter ($N \times V \times 10^4 = \text{Zellzahl/mL}$).

Kultur A20 Tumorzellen

Bei der Zelllinie A20 handelt es sich um eine B-Zell-Tumorlinie. Sie diente, nach Behandlung mit dem Zytostatikum Mitomycin C, als Ersatz für *Antigen-präsentierende-Zellen* (APC) und wurde in Proliferationsassays eingesetzt. A20 Zellen wurden in TM5 bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert.

Behandlung von A20 Zellen mit Mitomycin C

Um die starke Proliferation der A20 Zellen in Proliferationsassays zu verhindern, wurden diese Zellen vor Einsatz im Assay mit dem Zytostatikum Mitomycin C behandelt. Hierzu wurden 2x10⁷ A20 Zellen/mL in MEM + 2% FCS aufgenommen. Die Zellen wurden mit 60 µg/ml (Endkonzentration) Mitomycin C in einem 15 mL Reaktionsgefäß bei 37 °C im Wasserbad für 30 min inkubiert.

Anschließend wurden die behandelten Zellen fünfmal mit 10 mL MEM + 2% FCS durch Zentrifugation bei 300xg und Abnahme des Überstandes gewaschen. Abschließend wurde die Zellzahl bestimmt und die Zellen in TM5 auf 4×10^4 /mL eingestellt.

2.11 Präparation verschiedener lymphatischer Gewebe und Herstellen von Einzelzellsuspensionen

Zur Analyse zentraler und peripherer lymphatischer Gewebe wurden Mäuse durch zervikale Dislokation getötet. Anschließend wurden in verschiedenen Experimenten Thymi, Milzen, sowie popliteale, inguinale, mesenteriale und tracheale Lymphknoten aus den Tieren präpariert. Ein Überblick über die Lage der präparierten Organe findet sich in Abbildung 1.1. Im nächsten Schritt wurde aus den verschiedenen, präparierten Organen Einzelzellsuspensionen gefertigt. Die erhaltenen Einzelzellsuspensionen wurden in durchflusszytometrischen Analysen verwendet, oder dienten, im Falle der Milzen, als Basis für die Isolation verschiedener T-Zellpopulationen.

2.11.1 Herstellen einer Einzelzellsuspension aus Thymi

Um eine Einzelzellsuspension aus präparierten Thymi zu erhalten wurde ein $40 \mu\text{M}$ Zellsieb mit 2 mL MEM + 2 % FCS auf einem 50 mL Reaktionsgefäß angefeuchtet. Die Thymi wurden anschließend auf dem Zellsieb, mit dem Stempel einer 1mL Spritze, zerrieben. Das Zellsieb wurde darauf mit 8mL MEM + 2 % FCS gespült und die Zellzahl der Thymozytensuspension bestimmt.

2.11.2 Herstellen einer Einzelzellsuspension aus Lymphknoten

Um Einzelzellsuspensionen aus Lymphknoten zu gewinnen, wurde pro Lymphknotenart ein Well einer 6 Wellplatte mit 3 mL MEM + 2 % FCS gefüllt. Die Lymphknoten wurden anschließend zwischen den rauen Seiten zweier angefeuchteter Objektträger zerrieben. Die entstehende Zellsuspension wurde im Well aufgefangen und die Flächen der Objektträger mit 3 mL MEM + 2% FCS abgespült. Um Gewebereste zu entfernen, wurde die Zellsuspension über ein, mit 1 mL MEM + 2% FCS befeuchtetes, $40 \mu\text{M}$ Zellsieb gegeben. Das Well wurde anschließend erneut mit 3 mL MEM + 2% FCS gespült. Die gesammelten 10 mL Zellsuspension wurden für 5 min bei 600xg zentrifugiert, in 500 μL TM5 aufgenommen und die Zellzahl bestimmt.

2.11.3 Herstellen einer Einzelzellsuspension aus Milzen

Zur Herstellung einer Einzelzellsuspension aus Milzen wurden diese, mit dem Stempel einer 1 mL Spritze, auf einem befeuchteten Stahlsieb zerrieben. Der Stempel und das Stahlsieb wurde mit MEM + 2% FCS gespült. Die zerkleinerte Milzzellsuspension wurde über ein, mit 1 mL MEM + 2% FCS befeuchtetes, 40 μ M Zellsieb gegeben, um Gewebereste zu filtern. Anschließend wurde die Suspension für 5 min bei 600xg zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in 1 mL/Milz Geys'schem Lysepuffer aufgenommen. Durch 2,5minütige Inkubation in dem hypotonen Puffer wurden die Erythrozyten lysiert. Anschließend wurde die Einzelzellsuspensionen erneut über ein 40 μ M Zellsieb gegeben, um entstehende Zelltrümmer zu filtern. Abschließend wurde die Lebendzellzahl bestimmt.

2.12 Isolation verschiedener T-Zellpopulationen

2.12.1 Isolation von CD25⁺ Tregs per Magnet-aktivierter-Zell-Sortierung (MACS)

Aus den aus Milzen gewonnenen Einzelzellsuspensionen wurden mittels MACS CD25⁺ Tregs isoliert. Hierzu wurden 1×10^8 /mL Milzzellen für 20 min (4°C) mit 5 μ g/mL anti-CD25 Antikörper (7D4-bio) inkubiert. Ungebundener 7D4-bio wurde durch zweimalige Zugabe von 10 mL kaltem GM-Puffer gewaschen. Hierzu wurde die Zellsuspension abwechselnd 5 min bei 600xg zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet anschließend erneut in GM-Puffer aufgenommen. Im nächsten Schritt wurden die, auf 1×10^8 /mL eingestellten, Milzzellen mit Streptavidin-R-Phycoerythrin (SA-PE) in einer 1:400 Verdünnung versetzt. Die Zellsuspension wurde darauf für 15 min (4°C) inkubiert. Ungebundenes SA-PE wurde zweimal, durch Zugabe von 10 mL kaltem GM-Puffer gewaschen (s.o.). Schließlich wurde die Zellsuspension in 1 mL kaltem GM-Puffer aufgenommen und pro 1×10^8 Zellen mit 10 μ L anti-PE Mikrobeads (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland) versetzt. Damit die anti-PE-Antikörper binden konnten, wurden die Zellen zunächst 10 min bei 4°C und anschließend 10 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Während dieses Zeitraums wurden frische LS-Separationssäulen (Miltenyi Biotch, Bergisch-Gladbach, Deutschland) vorbereitet, indem die Säulen in einem Magneten eingespannt und mit 5 mL 1xPBS + 0,5% BSA gespült wurden. Im nächsten Schritt erfolgte die magnetische Separation der CD25⁺ Zellen. Bei dieser verbleiben die markierten, magnetisierten CD25⁺ Zellen im Magnetfeld auf der Säule, während alle unmarkierten Zellen eluiert werden (Durchlauf der CD25⁺ Isolation). Für die magnetische Separation wurden die Milzzellen pro 5×10^8 Zellen und Säule in je 5 mL GM-Puffer

aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde milliliterweise (5 mL/Säule) über die magnetisierte Säule gegeben. Um Zellverluste zu vermeiden wurde das Reaktionsgefäß mit der Zellsuspension mit 2 mL/Säule GM-Puffer gespült und diese Spüllösung ebenfalls über die Säule gegeben. Abschließend wurde die Säule zweimal mit 3 mL GM-Puffer gespült. Die Zellen wurden aus der Säule eluiert, indem diese aus dem Magnetfeld entfernt und mit 5 mL GM-Puffer versetzt wurde. Diese 5 mL wurden sofort mit Hilfe eines sterilen Stempels in ein neues Reaktionsgefäß eluiert. Um reinere Zellen zu erhalten wurde dieser magnetische Separationsschritt über eine zweite LS-Separationssäule wiederholt. Zur Entfernung der üblichen 30% Verunreinigung durch CD25⁺: CD8⁺ T-Zellen, Makrophagen und B-Zellen wurden im folgenden Dynalbeads (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Hierzu wurde die Zellzahl bestimmt und die Zellen, nach 5minütiger Zentrifugation bei 600xg, in 1 mL PBS + 0,5% BSA aufgenommen. Ausgehend von der Gesamtzellzahl wurde durch Multiplikation die Zahl der unerwünschten 30% Zellen errechnet (ZUZ). Die Verunreinigung setzt sich zusammen aus 50% B-Zellen, 25% Makrophagen und 25% CD8⁺ T-Zellen. Aus ZUZ lässt sich durch Multiplikation mit 0,5 bzw. 0,25 die spezifische Zahl der unerwünschten B-Zellen, sowie Makrophagen-Zellen und CD8⁺ T-Zellen berechnen (sZUZ). Da nach Herstellerangaben statistisch 8 Dynalbeads an eine Zelle binden, wird sZUZ mit 8 multipliziert um die Zahl der nötigen anti-CD8-, anti-Mac1- und anti-B220-Dynalbeads zu bestimmen. Die Zellen wurden, aus der 4×10^8 Beads/mL konzentrierten Stocklösung, mit der entsprechend, berechneten Zahl an Beads versetzt und erneut 20 min auf dem Schüttler inkubiert. Die nun markierten, unerwünschten Zellen wurden entfernt, indem die Zelllösung zunächst mit 5 mL 1xPBS + 10% FCS versetzt wurde. Darauf wurde die Lösung 2 min in einem Magneten inkubiert, wodurch die Dynalbead-markierten Zellen an die Gefäßwand wandern. Die saubere CD25⁺ Treg Fraktion wurde mit einer Pasteurpipette abgenommen. Das Reaktionsgefäß mit den Dynalbead-markierten Zellen wurde erneut mit 5 mL 1xPBS + 10% FCS gespült und erneut im Magneten für 2 min inkubiert. Die restlichen CD25⁺ Tregs wurden mit den Tregs des vorigen Separationslaufs vereinigt. Die vereinigten Zellen wurden gezählt, für 5 min bei 600xg zentrifugiert und wie gewünscht in TM5 aufgenommen. Mittels durchflusszytometrischer Analyse wurde die Reinheit der Zellen bestimmt. Es wurden nur Zellsuspensionen einer Reinheit von 85-95% CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T-Zellen verwendet.

2.12.2 Isolation von CD4⁺ Tcons per MACS

Aus den Einzelzellsuspensionen, die aus Milzen gewonnen wurden, oder aus den MACS-Durchläufen der Isolation CD25⁺ Tregs wurden mittels MACS CD4⁺ Tcons isoliert. Hierzu wurden 1×10^8 /mL Milzzellen für 15 min (4°C) mit 0,5 µg/mL anti-CD4 Antikörper (H129.19-bio) inkubiert. Ungebundener H129.19-bio wurde durch zweimalige Zugabe von 10 mL kaltem GM-Puffer gewaschen. Hierzu wurde die Zellsuspension abwechselnd 5 min bei 600xg zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet anschließend erneut in GM-Puffer aufgenommen. Im nächsten Schritt wurden die in GM-Puffer, auf 1×10^8 /mL eingestellten, Milzzellen mit Streptavidin-Microbeads (SA-Beads) in einer 1:40 Verdünnung versetzt. Die Zellsuspension wurde darauf für 15 min (4°C) inkubiert. Während dieses Zeitraums wurden gesäuberte LS-Separationssäulen (Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach, Deutschland) vorbereitet, indem die sterilen Säulen in einem Magneten eingespannt und mit 5 mL 1xPBS + 0,5% BSA gespült wurden. Im nächsten Schritt erfolgte die magnetische Separation der CD4⁺ Zellen. Das Prinzip der magnetischen Separation und ihre Durchführung wurde bereits in Abschnitt 2.12.1 beschrieben. Die CD4⁺ T-Zellen wurden über zwei LS-Separationssäulen hinweg isoliert. Die sauberen CD4⁺ T-Zellen wurden gezählt, für 5 min bei 600xg zentrifugiert und wie gewünscht in TM5 aufgenommen. Mittels durchflusszytometrischer Analyse wurde die Reinheit der Zellen bestimmt. Es wurden nur Zellsuspensionen einer Reinheit von 95-99% CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ T-Zellen verwendet. Die derart vorgereinigte Suspension CD4⁺ T-Zellen diente in manchen Experimenten als Basis für die Isolation naiver CD4⁺CD62L⁺CD44⁻ T-Zellen, CD4⁺CD62L⁻ Effektor T-Zellen, sowie CD4⁺CD25⁺ Tregs. Die Isolation der letzten drei Populationen wird im Folgenden beschrieben.

2.12.3 Isolation von naiven CD4⁺CD62L⁺CD44⁻ T-Zellen, CD4⁺CD62L⁻ Effektor T-Zellen und CD4⁺CD25⁺ Tregs mittels durchflusszytometrischer Zellsortierung

Zur Isolation naiver CD4⁺CD62L⁺CD44⁻ T-Zellen, CD4⁺CD62L⁻ Effektor T-Zellen, sowie CD4⁺CD25⁺ Tregs für diverse Experimente wurde die durchflusszytometrische Zellsortierung in einem Aria II FACS-Sorter verwendet. Als Basis hierfür diente die in 2.12.2 beschriebene Fraktion CD4⁺ vorgereinigter T-Zellen. Für die durchflusszytometrische Zellsortierung wurde die CD4⁺ Zellsuspension zunächst für 5 min bei 600xg zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 1 mL GM-Puffer aufgenommen. Für die Sortierung naiver und Effektor T-Zellen wurden die Zellen mit den Fluoreszenzfarbstoff markierten Antikörpern anti-CD4-Pacific Blue (RM4-5, 1:400), anti-CD62L-APC (Mel-14, 1:1000), anti-CD44-PE (nur naive T-Zellen, IM7, 1:400) versetzt,

resuspendiert und für 15 min inkubiert. Im Falle der Sortierung $CD4^+CD25^+$ Tregs wurde die vorgereinigte $CD4^+$ Zellsuspension zusätzlich mit anti-CD25-FITC (3C7, 1:200) inkubiert. In allen Fällen wurden die Zellen anschließend zweimal mit 10 mL GM-Puffer gewaschen. Hierzu wurde die Zellsuspension abwechselnd 5 min bei 600xg zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet anschließend erneut in GM-Puffer aufgenommen. Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Zellsortierung im Aria II FACS-Sorter. Die gewünschten, sortierten Zellen wurden dabei in verschiedenen Reaktionsgefäßen aufgefangen, deren Gefäßwände zuvor mit TM5 angefeuchtet wurden. Abschließend wurden die Zellen 5 min bei 600xg zentrifugiert und wie gewünscht in TM5 aufgenommen.

2.13 Proliferations- bzw. Suppressionsassay

Tregs sind in der Lage die Proliferation von Tcons zu supprimieren. Der folgende Proliferationsassay dient als Standardmethode, um die Suppression der Proliferation durch Tregs zu messen. Hierzu wurden je 2×10^4 $CD4^+$ T-Zellen mit 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ anti-CD3, sowie 2×10^3 Mitomycin C behandelten A20 Zellen, in einer 96-Well-Rundboden-Platte in 200 μL Gesamtvolumen, für 4 Tage stimuliert. Durch Zugabe von Tregs in einem Verhältnis zu $CD4^+$ T-Zellen von 1:1, 2:1, 4:1 und 8:1, lässt sich das Suppressionsvermögen der Tregs darstellen. Die parallele Zugabe von CK2 Inhibitoren ermöglicht den Einfluss der Blockade der CK2 auf die T-Zell Proliferation sowie die Treg-vermittelte Suppression zu testen. Zur Messung der Proliferation wurde das Medium in den letzten 20 Stunden der Stimulation mit ^3H -Thymidin versetzt. Dieses wird in die DNA der sich teilenden Zellen eingebaut. Zur Messung der Proliferation wurde der Inhalt der Wells mittels eines *Cell Harvester* Erntegerätes durch einen Glasfaserfilter gesaugt. Zellreste inklusive der radioaktiv markierten DNA bleiben auf diesem Filter hängen. Darauf wurde der Filter in einer Mikrowelle getrocknet und mit 10 mL Szintillationsflüssigkeit in einem Plastikbeutel eingeschweißt. Die von der radioaktiv markierten DNA ausgehende β -Strahlung wird über die Anregung von Lösungsmittelmolekülen auf einen primären Szintillator übermittelt. Der primäre Szintillator gibt die aufgenommene Energie in Form elektromagnetischer Strahlung ab. Diese lässt sich mit Hilfe eines Szintillationszählers detektieren und wird als Impulse pro Million (*counts per million* = CPM) angegeben.

2.14 Methoden zur Genotypisierung von Mäusen

Zur Bestimmung des Genotyps von Versuchsmäusen wurde den Tieren mit einem sterilen Skalpell Schwanzbiopsien entnommen. Diese wurden in 20 µL, mit Proteinase K (1:40) versetztem, Genomischen Lyse Puffer über Nacht bei 55°C aufgelöst. Anschließend wurden 480 µL autoklaviertes Wasser zugegeben und die Proteinase K durch 10minütige Inkubation bei 95°C deaktiviert. Die Lösung wurde 5 min bei 1500xg zentrifugiert und der Überstand in drei verschiedenen Polymerase Kettenreaktionen (PCR) eingesetzt, um den Genotyp der Versuchstiere festzustellen. Die folgende Tabelle umfasst die jeweiligen PCR-Ansätze und –Protokolle.

CK2β-fl PCR:				
5x DreamTaq-Puffer	2,5 µL	Initiale Denaturierung	94 °C 5 min	
dNTPs	0,5 µL	Denaturierung	94 °C 30 sec	40x
PrimerArbeitslsg.	1 µL	Annealing	55 °C 30 sec	
H ₂ O	18 µL	Elongation	72 °C 2 min	
DreamTaq Polymerase	0,125 µL	Finale Elongation	72 °C 8 min	
DNA Probe	3 µL			
Foxp3-Cre Wildtyp bzw. Neo PCR:				
5x DreamTaq-Puffer	2,5 µL	Initiale Denaturierung	94 °C 2,5 min	
dNTPs	0,5 µL	Denaturierung	94 °C 30 sec	35x
PrimerArbeitslsg.	1 µL	Annealing	58 °C 30 sec	
H ₂ O	20 µL	Elongation	72 °C 1 min	
DreamTaq Polymerase	0,125 µL	Finale Elongation	72 °C 5 min	
DNA Probe	1 µL			

Tabelle 2.6: Überblick über PCR-Programm und –Ansatz der nötigen PCRs zur Genotypisierung der CK2β^{Tregx/x} Mäuse.

Folgende Primer wurden aus 100 pmol/µL Stocklösungen, in Arbeitslösungen 1:20 in VE-Wasser verdünnt in den verschiedenen PCRs eingesetzt:

CK2β-fl.for: 5'-CTA GCT CGA GAT GAG TAG CTC TGA GGA GGT G-3'

CK2β-fl.rev: 5'-GGA TAG CAA ACT CTC TGA G-3'

Foxp3-Cre-WT.for: 5'-TGT GTG ATA GTG CCC GTG GTT C-3'

Foxp3-Cre –WT.rev: 5'-TTC GCA AGA AGA GGA GCC AAC G-3'

Foxp3-Cre-Neo.for: 5'-CTG CTT CCT TCA CGA CAT TCA AC-3'

Foxp3-Cre-Neo.rev: 5'-AAG TGC TTT GTG CGA GTG GAG AGC-3'

Die mittels PCR amplifizierte DNA-Bereiche wurden anschließend durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Die Trennung erfolgte für ca. 15 min bei 150 V auf einem 1,5%igen Agarosegel. Anschließend wurde das Gel im Gel Dokumentationssystem Gel Doc XR fotografiert.

2.15 Proteinisolation, SDS-PAGE und Western Blot

Zum Nachweis verschiedener Proteine in Zellen wurde die Methode des Western Blots verwendet. Die Proteine wurden dabei aus den Zellen wie folgt isoliert. Die Zellen wurden zunächst in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß durch 5minütige Zentrifugation bei 1500xg pelletiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in 1 mL 1xPBS resuspendiert. Erneut wurden die Zellen 5 min bei 1500xg zentrifugiert und anschließend in 8 M Harnstoffpuffer lysiert. Die Zellyse wurde unterstützt, indem die Zellen dabei zweimal 5 min im Ultraschallbad inkubiert wurden. Zur Entfernung unlöslicher Bestandteile wurde das Lysat 5 min bei 12.500xg zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand mit den Proteinen abgenommen und der Proteingehalt mit Hilfe des Pierce 660 nm Protein Assay Kit bestimmt. Mittels Sodium-dodecyl-sulfat-polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurden die Proteine im Zellysate nach ihrer relativen Molekülmasse aufgetrennt. Hierzu werden zunächst die Proteine mit 4x Ladepuffer versetzt. Das im Puffer enthaltene 1,4-Dithiothreitol (DTT) löst Disulfidbrücken auf. Durch 5minütiges Erhitzen auf 95 °C werden die Proteine linearisiert. Der Ladepuffer enthält zudem SDS, welches sich an die linearisierten Proteine anlagert und deren Eigenladung durch eine negative Gesamtladung überdeckt. Bei der folgenden Gelelektrophorese wandern die Proteine daher zur Anode. Das Trenngel wirkt dabei wie ein Sieb, durch das kleine Proteine schneller als große wandern können. Dem Trenngel vorgeschaltet ist ein sogenanntes Sammelgel. Dieses besitzt nur eine geringe Acrylamidkonzentration. Hierdurch wird bewirkt, dass die Proben auf gleicher Höhe am Beginn des Trenngels gesammelt werden. Das Trenngel wurde gemäß den Reagenzien aus 2.5.4 hergestellt, in einer Gießapparatur gegossen und sofort mit Isopropanol überschichtet. Hierdurch wird eine planare Gelgrenze erzeugt. Nach der Polymerisation wurde das Isopropanol entfernt und die Gießapparatur mit dem Sammelgel gefüllt. Ein Kamm wurde eingesetzt um Ladetaschen zu formen. Das polymerisierte Gel wurde anschließend in eine Elektrophoresekammer gegeben. Diese wurde mit Elektrophoresepuffer gefüllt. Die Proben, sowie ein Standard mit Proteinen definierter Größe, wurden in die Taschen gefüllt. Anschließend wurde die Kammer ca. 45 min, bei einer Spannung von 200 V und einer variablen Stromstärke von ≥ 55 mA pro Gel, unter Strom gesetzt. Nach der größenabhängigen Auftrennung der Proteine wurde der Stromfluss abgestellt und das Gel aus der Apparatur ausgebaut. Um die Proteine nach der Größenauftrennung durch die SDS-PAGE nachzuweisen, wurden die Proteine mittels Western Blot

auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF) Membran transferiert. Auf dieser können Proteine gezielt über Antikörper nachgewiesen werden. Die Western Blots wurden nach dem sogenannten Semi-dry Verfahren aufgebaut. Demnach werden auf die Anode zunächst zwei in Blot Puffer getränkte Whatman Papiere gelegt. Es folgt die mit Methanol aktivierte Membran und darauf das in Blot Puffer getränkte Gel. Auf das Gel werden erneut, zwei in Blot Puffer getränkte Whatman Papiere aufgelegt, gefolgt von der Kathode. Die Konstruktion wird dabei luftblasenfrei angefertigt. Für 2,5-4 h wird bei einer Spannung von 5-10 V und einer Stromstärke von $\geq 3 \text{ mA/cm}^2$ erneut Strom angelegt. Hierdurch wandern die immer noch negativ geladenen Proteine aus dem Gel Richtung Anode. Auf der engmaschigen Membran werden sie dabei festgehalten. Der Nachweis definierter Proteine auf der Membran erfolgt über die Bindung eines spezifischen Primäantikörpers. An diesen bindet im nächsten Schritt ein an Merrettichperoxidase (*horseradish peroxidase* HPO) gekoppelter Sekundäantikörper. Letzterer erkennt dabei spezifisch einen spezieeigenen Bereich des Primäantikörpers. Die Antikörperbindungen wurden dabei wie folgt durchgeführt. Zunächst wurde die Membran für 1 h bei RT auf einem Schwenker in Blockpuffer inkubiert. Hierdurch werden unspezifische Bindungsstellen durch die im Milchpulver des Puffers enthaltenen Proteine abgedeckt. Anschließend wurde die Membran dreimal für je 5 min durch Inkubation mit TBS-T gewaschen. Schließlich wurde der Primäantikörper in Blockpuffer zugegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Ungebundener Primäantikörper wurde durch erneutes dreimaliges Waschen mit TBS-T (s.o.) entfernt. Darauf wurde die Membran für 1 h bei RT mit dem Sekundäantikörper, gelöst in Blockpuffer, inkubiert. Erneut wurde ungebundener Antikörper durch zweimaliges Waschen mit TBS-T (s.o.), gefolgt von einmaligem Waschen mit TBS (s.o.), entfernt. Anschließend wurde der Blot entwickelt, indem die Membran mit HPO-Substratlösung (Thermo) versetzt wurde. Die über Antikörper ans gesuchte Protein gekoppelte HPO setzt das in der Substratlösung enthaltene Luminol zu 3-Aminophthalat um. Dieses emittiert Licht einer Wellenlänge von 425 nm, welches im Bio-Rad ChemiDoc XRS+ über eine Kamera detektiert wird. Die entstehenden Bilder wurden mit Hilfe der Computerprogramme Quantity One oder Image Lab 3 bearbeitet. Eine Liste der verwendeten Antikörper, sowie deren eingesetzte Konzentration und der Hersteller sind in Abschnitt 2.8.2 aufgelistet.

2.16 Durchflusszytometrische Analyse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden durchflusszytometrische Analysen verwendet um die Verteilung verschiedener Zellpopulationen und die Expression verschiedener Zellmarker in unterschiedlichen Einzelzellsuspensionen zu bestimmen. Die Unterscheidung unterschiedlicher Zellpopulationen erfolgt

dabei anhand der Zellgröße, -granularität, sowie der Markierung von Oberflächen- oder intrazellulären Proteinen über Fluoreszenzmarkierte Antikörper. Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht darauf, dass zunächst Zellen in einer Suspension durch ein druckreguliertes Flüssigkeitssystem perlenschnurartig aufgereiht werden. So passieren die Zellen einzeln einen Laserstrahl. Dabei wird das Licht des Strahls an der Zelle gestreut. Das sogenannte Seitwärtsstreulicht (*Side Scatter* SSC), das in einem Winkel von 90° aufgefangen wird, dient als Maß für die Granularität der Zelle. Im Gegensatz dazu gilt das sogenannte Vorwärtsstreulicht (*Forward Scatter* FSC), das in Richtung des ursprünglichen Laserstrahls detektiert wird, als Maß für die Zellgröße. Wie zuvor bereits erwähnt können zudem verschiedene Oberflächenmoleküle oder intrazelluläre Proteine mittels Fluoreszenzfarbstoff markierter Antikörper nachgewiesen werden. Auf diese Weise können zahlreiche Zelltypen bestimmt oder die Expression verschiedener Zellmarker quantifiziert werden. Die Färbung der Zellpopulationen wurde dabei nach folgendem Prinzip durchgeführt. Zunächst wurde die Oberfläche der Zellen gefärbt. Hierzu wurden 2×10^5 - 2×10^6 Zellen in eine 96-Well Spitzbodenplatte überführt. Durch 2minütige Zentrifugation bei 600xg, anschließendes Ausklopfen und resuspendieren in 200 µL 1xPBS wurden die Zellen gewaschen. Dieser Waschschrift wurde zweimal durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen in 50 µL PBS mit diversen Antikörperkombinationen und ggf. einem fixierbaren Lebend-Tot-Farbstoff resuspendiert und für 15-30 min bei 4 °C inkubiert. Nach dem Ende der Inkubation wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen (s.o.), um ungebundenen Antikörper zu entfernen. Abhängig vom Experiment wurden die Zellen zudem intrazellulär gefärbt, andernfalls wurden sie in 110 µL GM-Puffer resuspendiert, in 500 µL Rundboden-Röhrchen überführt und gemessen. Die intrazelluläre FACS-Färbung wurde mit Hilfe des FoxP3 Staining-Buffer Sets (ebioscience) in zwei Schritten durchgeführt. Zunächst wurden die Zellen nach Angaben des Herstellers in 50 µL Fixierungs/Permeabilisierung Lösung durch 30minütige Inkubation bei 4 °C fixiert und permeabilisiert. Darauf wurden die Zellen analog zum, im oberen Teils dieses Abschnitts beschriebenen Waschschrift, zweimal mit 1x Permeabilisierungspuffer gewaschen. Im Folgenden wurden die gewünschten intrazellulären Antigene gefärbt. Hierzu wurden die Zellen in 50 µL einer Lösung der entsprechenden Antikörper in 1x Permeabilisierungspuffer für 30 min bei 4 °C inkubiert. Zur Entfernung ungebundener Antikörper wurden die Zellen zweimal mit 200 µL 1x Permeabilisierungspuffer gewaschen (s.o.). Ein weiterer Waschschrift mit GM-Puffer diente dazu, die reversible Permeabilisierung der Zellen wieder aufzulösen, sodass keine Proteine aus der Zelle heraus diffundieren konnten. Abschließend wurden die Zellen, wie bei der reinen Oberflächen Färbung, in 110 µL GM-Puffer aufgenommen und in 500 µL Rundboden-Röhrchen überführt. Im Falle des Nachweises von Zytokinen, wurden die Zellen zuvor stimuliert. Die Stimulation erfolgte entweder über Nacht auf mit anti-CD3 und anti-CD28 beschichteten Platten oder durch 5-stündige Stimulation mit dem Calciumionophor Ionomycin (1 µM) zusammen mit dem Protein Kinase C Aktivator Phorbol-

12-Myristat-13-acetat (PMA 20 ng/mL). In beiden Fällen wurden die Zellen, während der letzten 5 h der Stimulation, aus einer 1000x Stocklösung (1:1000) mit 1x Monensin versetzt. Monensin inhibiert die Aktivität des Golgi Apparats und verhindert so, dass produzierte Zytokine sezerniert werden. Es bewirkt also eine Akkumulation produzierter Zytokine in der Zelle. Mit dieser Technik kann demnach die Zytokinproduktion einzelner Zellen innerhalb einer heterogenen Zellsuspension bestimmt werden. Alle Proben wurden mit Hilfe eines LSR II Durchflusszytometers der Firma BD (Franklyn Lakes, USA) vermessen. Sowohl Dubletten, als auch tote Zellen und Zelltrümmer wurden mit Hilfe verschiedener FSC/SSC Darstellungen aus der Messung ausgeschlossen. Für einen Teil der Experimente wurden die toten Zellen zudem mit Hilfe einer Lebend/Tot Färbung aus der Analyse ausgeschlossen. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der BD FACS Diva Software. Wie zuvor bereits in Abschnitt 2.12.3 beschrieben, wurde die Durchflusszytometrie auch zur Isolation hochreiner T-Zellpopulationen verwendet. Hierzu wurden die Zellen, wie in Abschnitt 2.12.3 erläutert gefärbt und anschließend in einem Aria II FACS-Sorter der Firma BD sortiert. Dabei werden zunächst, wie beim gewöhnlichen Durchflusszytometer, die gewünschten Zellparameter gemessen. Zellen, welche die gewünschten Kriterien erfüllen können darauf sortiert werden. Dazu wird der Flüssigkeitsstrahl, durch den die Zellen geleitet werden, durch ein spezielles Keramikteil, die so genannte *Nozzle*, in Schwingung versetzt. Es kommt zum abreißen des Strahls, der darauf in Tropfen zerfällt. Tropfen, die die gewünschten Zellen enthalten, werden zwischen zwei Plattenkondensatoren polarisiert und in die gewünschte Richtung abgelenkt. Anschließend werden die Tropfen mit den gewünschten Zellen in einem Reaktionsgefäß aufgefangen.

2.17 Enzyme-linked-Immunsorbent-Assays (ELISA)

Um die Produktion verschiedener Zytokine durch T-Zellen in Kulturüberständen, oder Antikörpertiter in Seren quantitativ zu bestimmen, wurde die Methode des „Enzym-linked Immunosorbent Assay“ (ELISA) angewendet. Alle ELISA wurden nach dem Prinzip der Sandwich Methode durchgeführt. Dabei lassen sich die im Rahmen der Arbeit durchgeführten ELISA, wie in Abbildung 2.1 dargestellt, in drei Gruppen einteilen: Zytokin-spezifische ELISA, ELISA zur Detektion unterschiedlicher OVA-spezifischer Antikörper-Isotypen, sowie ELISA zum Nachweis von Gesamt- und OVA-spezifischem IgE. Die Gruppe der Zytokin-spezifischen ELISA umfassen IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 ELISA, während OVA-spezifische IgG1 und IgG2b ELISA zur zweiten Gruppe gehören. In die Gruppe der IgE-spezifischen ELISA lassen sich die ELISA zum Nachweis des totalen und OVA-spezifischen IgE einteilen. Alle ELISA sind dabei in ihrer Durchführung mit gewissen Modifikationen versehen, die in

Abbildung 2.1 sowie Tabelle 2.7 schematisch dargestellt sind. Die grundsätzlichen Einzelschritte der verschiedenen ELISA sind jedoch vom Prinzip her identisch und werden im Folgenden erläutert.

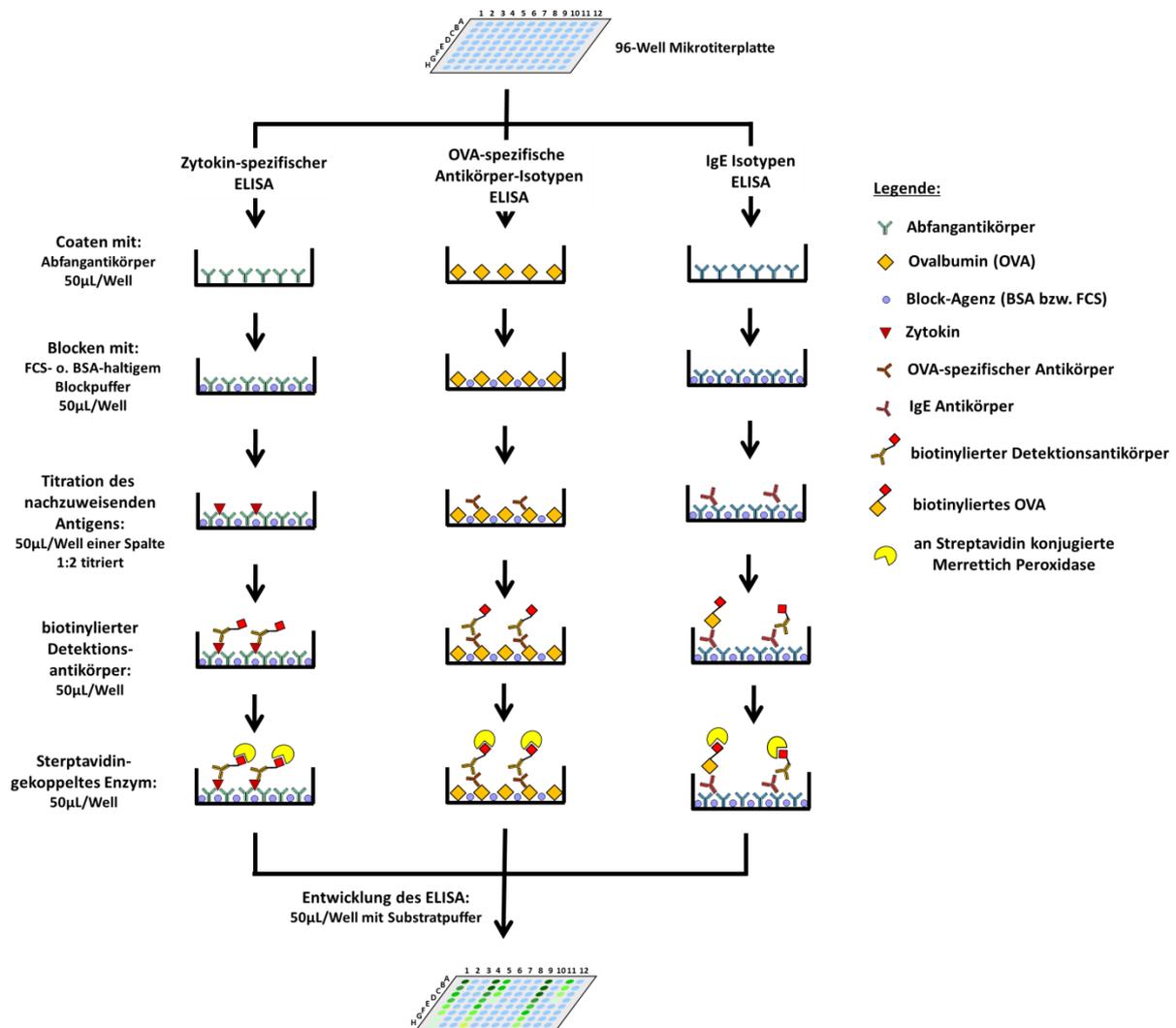


Abbildung 2.1: Schema zur Durchführung verschiedener ELISA. Im Rahmen der Arbeit wurden unterschiedliche ELISA durchgeführt, die sich in drei Gruppen einteilen lassen: Zytokin-spezifische (IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13), OVA-spezifische Antikörper-Isotypen (IgG1 und IgG2b) und IgE-spezifische ELISA (totales und OVA-spezifisches IgE). Die Durchführung für jeden dieser ELISA ist schematisch dargestellt.

Im ersten Schritt dem sogenannten „Coaten“ wird die Oberfläche jedes Wells einer Mikrotiterplatte mit einem Abfangantikörper oder einem Stoff beschichtet, der das später Nachzuweisende Antigen (Zytokin oder Antikörper) aus einer Lösung abfängt. Hierzu wird die Platte mit je 50 µL einer Lösung, des jeweiligen Abfangantikörpers bzw. Ovalbumin inkubiert, wodurch dieser(s) an die Platte adsorbiert. Ungebundener Antikörper wird durch zweimaliges Waschen mit einem Detergenz

Material & Methoden

haltigen Waschpuffer entfernt. Hierzu wird die Platte abwechselnd ausgeklopft und jedes Well mit ca. 200 μL Waschpuffer gefüllt. Im zweiten Schritt, dem „Blocken“ werden unspezifische Bindungsstellen auf der Platte abgedeckt, indem jedes Well mit Proteinen ohne Bezug zum Antigen (im allgemeinen BSA oder FCS) inkubiert wird. Die Proteine im Blockpuffer adsorbieren an diese unspezifischen Bindestellen, wodurch das Hintergrundsignal bei der späteren Detektion des Antigens reduziert wird. Im folgenden Schritt wird das nachzuweisende Antigen durch den spezifischen Abfang-Antikörper oder im Falle OVA-spezifischer Antikörper deren spezifische Bindung an Ovalbumin, an die Platte gebunden. Hierzu werden 50 μL der zu untersuchenden Kulturüberstände oder vorverdünnter Seren in je eine Spalte der 96Well-Mikrotiterplatte gefüllt. Anschließend werden diese gemeinsam mit einem Standard des Antigens bekannter Konzentration seriell 1:2 über die Spalte hinweg titriert. Durch die Titration des Standards lässt sich später die Konzentration des Zytokins/Antikörpers in den Proben mittels linearer Regression bestimmen. Zusätzlich wird durch die Titration erreicht, dass auch Proben mit extrem hoher Antigenkonzentration in einen Bereich gelangen, indem sich das spätere Detektionssignal proportional mit der Antigenkonzentration seriell 1:2 verdünnt. Es folgen erneut zwei Waschschrte, bei denen unspezifische Bestandteile gewaschen werden. Im nächsten Schritt erfolgt die Bindung eines biotinylierten Detektionsantikörpers, der jedoch an ein anderes Epitop des Antigens bindet als der Abfang-Antikörper. Im Falle des Nachweises von verschiedenen Antikörper-Isotypen, bindet der Detektionsantikörper an Bereiche des nachzuweisenden Antikörpers, die für den jeweiligen Isotyp spezifisch sind. Die ELISA zum Nachweis Ovalbumin-spezifischen IgEs unterscheiden sich an dieser Stelle, da hier biotinyliertes Ovalbumin zur Detektion eingesetzt wird (siehe Abbildung 2.1, IgE Isotypen ELISA, linke Hälfte des Wells). Auf die Besonderheit des Ovalbumin-spezifischen IgE ELISA wird daher in Abschnitt 2.19.7 genauer eingegangen. Durch erneutes zweimaliges Waschen (s.o.) wird ungebundener Detektions-Antikörper entfernt. Die Biotinylierung des Detektions-Antikörpers erlaubt im nächsten Schritt die Bindung eines an Streptavidin gekoppelten Enzyms (im Allgemeinen Merrettich Peroxidase). Hierzu wird die gewaschene Platte erneut mit 50 μL der entsprechend verdünnten Enzymlösung inkubiert. Es folgen erneut zwei Waschschrte, bei denen ungebundenes Enzym gewaschen wird. Im letzten Schritt, der „Entwicklung des ELISA“, wird jedes Well der Platte mit 50 μL einer Substratlösung inkubiert. Dabei setzt die Merrettich Peroxidase das Substrat in einer Oxidation um, wodurch es zu einem Farbumschlag kommt. Die Stärke der Farbreaktion ist dabei direkt proportional zur Menge des an die Platte fixierten Antigens bzw. Enzyms. Nach Inkubation erfolgt die photometrische Messung im Tecan Reader, einem für Mikrotiterplatten geeigneten Photometer. Alle Inkubationsschritte erfolgten in einem Volumen von 50 μL /Well. Die Dauer der einzelnen Inkubationsschritte, sowie deren Temperatur, Antikörperkonzentrationen, Farbsubstrat und Puffer unterscheiden sich bei jedem ELISA. Die spezifischen Eigenheiten jedes

ELISAs sind daher in der folgenden Tabelle 2.7 zusammengefasst. Beispielsweise wurden ELISAs, die im Zusammenhang mit Asthma-Experimenten durchgeführt wurden, mit FCS-haltigem Puffer geblockt, während das Blocken der restlichen ELISA mit BSA erfolgte. Des Weiteren wurde die Farbentwicklung bei ersteren ELISAs, mit einem anderen Substrat (TMB) durchgeführt, weshalb in diesem Fall die Farbreaktion durch Zugabe einer Abstopplösung mit saurem pH Wert vor der Messung beendet wurde. Im Falle der Zytokin-spezifischen IL-4, IL-5, IL-13, IFN- γ und IL-10 erfolgte die Auswertung der ELISA in Excel (Microsoft Corp., Redmont, WA, USA) mit Hilfe eines Makros, für dessen Entwicklung zu wesentlichen Teilen S. Jin (Institut für Immunologie, Universität Mainz) verantwortlich war. ELISA zur Bestimmung der Titer von Antikörper Isotypen wurden wie folgt ausgewertet. Mittels Tecan Reader wurde in jedem Well der Platte die Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt. Unter Durchführung der linearen Regression wurde anschließend der antigenspezifische Antikörpertiter der Seren bestimmt, bei dem eine Absorption von 0,2 vorliegt. ELISA, die unter Zuhilfenahme von Kit Systemen durchgeführt wurden, wurden nach Vorgaben des Herstellers durchgeführt und für das im Rahmen dieser Arbeit verwendete jeweilige Versuchssystem optimiert.

Zytokin/Isotyp:	Primärantikörper:	Standard	Sekundärantikörper:	Substrat:
IL-4 (ex vivo und Asthma)	Klon 1D11.2 1 μ g/mL (1:4000) 1 h 37°C oder ü.N. 4 °C	Standard 500U/mL 1:2 im 1.Well 1 h 37 °C	Klon 24G2-bio 0,6 μ g/mL (1:1666) 1 h 37 °C	ABTS 1mg/mL in Citratpuffer 1:4000 30%ig H ₂ O ₂ Messung 410nm
IFN- γ	Klon R46A2 2 μ g/mL (1:500) 1 h 37 °C oder ü.N. 4 °C	Standard 50pg/mL 1:2 im 1.Well 1 h 37 °C	Klon AN18.17.24-bio 0,45 μ g/mL (1:2222) 1 h 37 °C	ABTS 1mg/mL in Citratpuffer 1:4000 30%ig H ₂ O ₂ Messung 410nm
IL-10	Klon JES5-2A5 (BD Pharmingen) 4 μ g/mL (1:250) 1 h 37 °C oder ü.N. 4 °C	Standard 400ng/mL 1:2 im 1.Well 1 h 37 °C	Klon SXC-1-bio (BD Pharmingen) 1 μ g/mL (1:500) 1 h 37 °C	ABTS 1mg/mL in Citratpuffer 1:4000 30%ig H ₂ O ₂ Messung 410nm
IL-5 (Asthma)	(BD, OptEIA Mouse IL-5 ELISA Kit) (1:250) ü.N. 4 °C	Standard 1ng/mL 1:2 im 1.Well 2 h RT	(BD, OptEIA Mouse IL-5 ELISA Kit) (1:250) 1 h RT Gemeinsam mit Enzym- reagent (1:250)	BD Pharmingen Substrat OptEIA
IL-13 (Asthma)	(R&D, Duo Set ELISA mouse IL-13) 4 μ g/mL (1:180) ü.N. 4 °C	Standard 4ng/mL 1:2 im 1.Well 2 h RT	(R&D, Duo Set ELISA mouse IL-13) 0,2 μ g/mL (1:180) 2 h RT	BD Pharmingen Substrat OptEIA
IFN- γ (Asthma)	(BD, OptEIA Mouse IFN- γ ELISA Kit) (1:250) ü.N. 4 °C	Standard 200pg/mL 1:2 im 1.Well 2 h RT	(BD, OptEIA Mouse IFN- γ ELISA Kit) (1:250) 1 h RT Gemeinsam mit Enzym- reagent (1:250)	BD Pharmingen Substrat OptEIA
Totales IgE	(BD, OptEIA Mouse IgE ELISA Kit) (1:250) ü.N. 4 °C	Standard 100ng/mL 1:2 im 1.Well 2 h RT	(BD, OptEIA Mouse IgE ELISA Kit) (1:250) 1 h RT	BD Pharmingen Substrat OptEIA

			Gemeinsam mit Enzym-reagent (1:250)	
OVA-spezifisches IgE (Asthma)	α IgE Klon EM95.3.1 4 μ g/mL ü.N. 4 °C	Serumkontrolle AG Buhl/ Reuter 1:2 im 1.Well 2 h RT	Biotinyliertes OVA 8 μ g/mL 1 h RT AG Buhl/ Reuter	BD Pharmingen Substrat OptEIA
OVA-spezifisches IgG1 (Asthma)	Ovalbumin (25 μ g/mL) ü.N. 4 °C	Serumkontrolle AG Buhl/ Reuter 1:2 im 1.Well 2 h RT	Klon A85-1-bio (BD Pharmingen) 1:250 1h RT	BD Pharmingen Substrat OptEIA
OVA-spezifisches IgG2b (Asthma)	Ovalbumin (25 μ g/mL) ü.N. 4 °C	Serumkontrolle AG Buhl/ Reuter 1:2 im 1.Well 2 h RT	Klon R13-3-bio (BD Pharmingen) 1:250 1h RT	BD Pharmingen Substrat OptEIA

Tabelle 2.7: Zusammenfassung der Klone verschiedener Primär- und Sekundärantikörper, Konzentrationen, Temperaturen, Inkubationszeiten, sowie Substrate zur ELISA Entwicklung

2.18 Blutentnahme

Zur Analyse der Titer verschiedener Antikörper Isotypen in unbehandelten Tieren, sowie im Rahmen von Asthma Experimenten, wurde CK2 β ^{Tregx/x} Mäusen verschiedenen Alters Blut entnommen. Die Blutentnahme an unbehandelten CK2 β ^{Tregx/x} Mäusen erfolgte über Inzision der Schwanzvene. Im Rahmen von Asthma Experimenten, wurde CK2 β ^{Tregx/x} Mäusen die *Vena cava inferior* durchtrennt, wobei sich das Blut in der Brusthöhle sammelte. In beiden Fällen wurde das Blut in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß gesammelt und für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Blutkuchen entnommen und das Serum bei 1500xg für 10 min zentrifugiert. Darauf wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Aus diesem Serum wurden mittels ELISA die Titer verschiedener Antikörper-Isotypen ermittelt.

2.19 Asthma *in vivo* Experimente

2.19.1 Versuchsplanung, Immunisierung und Vernebeln

Zur Untersuchung der Treg-vermittelten Suppression wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit folgende *in vivo* Versuche durchgeführt. Es wurde das Modell des murinen Asthma-bronchiales (Asthma) als Th2-vermitteltes Krankheitsmodell gewählt. Beim Asthma handelt es sich um eine komplexe Erkrankung der Atemwege, die mit chronischen Entzündungen, sowie einer Überempfindlichkeitsreaktion der Atemwege („Airway hyperresponsiveness“ AHR) einhergeht¹¹³. Für die Entstehung von Asthma sind neben eosinophilen Granulozyten und Mastzellen vor allem Th2-Zellen verantwortlich. Letztere produzieren Zytokine wie z.B. IL-4, IL-5 und IL-13. Während IL-4

kritisch für die Differenzierung weiterer Th-2 Zellen ist¹¹⁴, wirkt IL-5 vor allem chemotaktisch und führt zur Einwanderung und Aktivierung von eosinophilen Granulozyten in die Lunge¹¹⁵. Dort entleeren die eosinophilen Granulozyten ihre zytotoxischen Granula, wodurch die, aus den Granula freigesetzten, zytotoxischen, Substanzen das Lungenepithelgewebe zerstören¹¹⁶. Das von Th2-Zellen produzierte IL-4 bewirkt zudem, gemeinsam mit IL-13, den Klassenwechsel und die Produktion von Antikörpern des IgE Isotyps durch antigenspezifische B-Zellen^{114,115}. Dieses wiederum führt zur weiteren Aktivierung von Mastzellen und basophilen Granulozyten, durch die Kreuzvernetzung membranständiger IgE Rezeptoren (FcεRI)¹¹⁴. IL-13 fördert zusätzlich eine erhöhte Schleimproduktion des Lungenepithels und die Entwicklung von Becherzellmetaplasien¹¹⁴. Als Folge kommt es zu einer Entzündung des Lungengewebes, sowie der im oberen Textverlauf beschriebenen AHR. Für die Durchführung eines, möglichst Th2-basierten, Asthma Modells, wurde das in Abbildung 2.2 dargestellte Versuchsschema verwendet. Durch antigenspezifische Immunisierung mit Ovalbumin (OVA) wird dabei die T-Zellabhängigkeit des Modells gewährleistet.

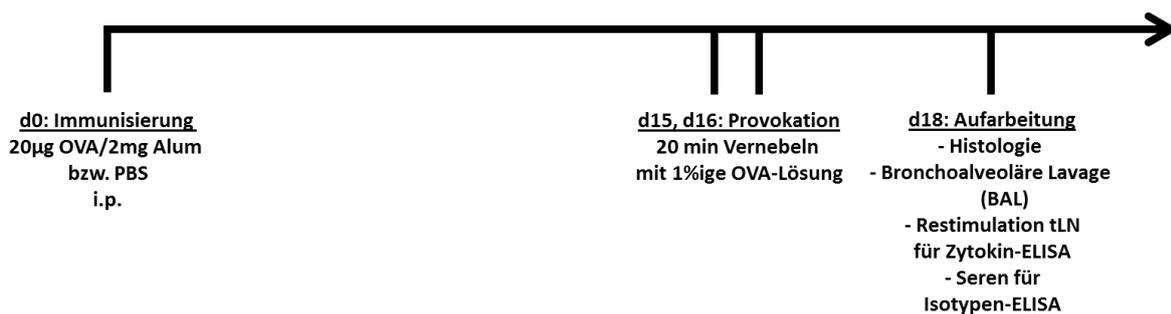


Abbildung 2.2: Schema zur Durchführung von Asthma Experimenten. An Versuchstag d0 wurden die Versuchstiere durch intraperitoneale Injektion von 20 µg OVA zusammen mit 2 mg Aluminiumhydroxid in 100 µL 1xPBS immunisiert. Unsensibilisierten Kontrolltieren wurde lediglich 1xPBS verabreicht. Zwei Wochen später erfolgte die erneute, zweimalige Provokation aller Versuchstiere mit 1%iger OVA-Lösung, mittels 20minütigen Vernebelns. An Versuchstag 18 erfolgte die Aufarbeitung der Versuchstiere und die Charakterisierung der Entzündung der Atemwege über, Histologische Schnitte, der Analyse der bronchoalveolären Lavage (BAL), der Charakterisierung der Titer OVA-spezifischer Antikörper Isotypen im Blut, sowie der Zytokinproduktion trachealer Lymphknotenzellen.

Der erste Schritt in der Durchführung der Asthma Experimente besteht in der antigenspezifischen Immunisierung der Versuchstiere mit einer Mischung aus OVA und Aluminiumhydroxid (Alum) durch intraperitoneale Injektion an Versuchstag d0. Durch diese Immunisierung kommt es zur antigenspezifischen Expansion von T- und B-Zellen, die spezifisch auf OVA reagieren.

Material & Methoden

Aluminiumhydroxid wirkt dabei als Adjuvanz^f, das die Immunreaktion gegen OVA noch verstärkt. An den Versuchstagen d15 und d16 werden die Tiere durch 20minütiges vernebeln mit OVA, über die Lunge, erneut dem spezifischen Antigen ausgesetzt. Hierdurch kommt es zur gezielten Entzündungsreaktion in der Lunge. Die Analyse der Versuchstiere erfolgt an Tag d18, während der die Entzündungsreaktion durch verschiedene Parameter charakterisiert wird. Im Folgenden wird die Durchführung der verschiedenen Techniken beschrieben, welche zur Charakterisierung der Entzündungsreaktion in der Lunge angewendet wurden. Die folgende Tabelle fasst die in den Experimenten unterschiedenen Versuchsgruppen und ihre jeweilige Behandlung zusammen.

Versuchsgruppe:	Immunisierung d0:	Provokation d15,d16:
CK2 β ^{Treg+/+} unsens	1xPBS	1%ige OVA-Lösung
CK2 β ^{Treg-/-} unsens	1xPBS	1%ige OVA-Lösung
CK2 β ^{Treg+/+} sens	20 μ g OVA/ 2 mg Alum in 1xPBS	1%ige OVA-Lösung
CK2 β ^{Treg-/-} sens	20 μ g OVA/ 2 mg Alum in 1xPBS	1%ige OVA-Lösung

Tabelle 2.8: Auführung der in Asthma Experimenten unterschiedenen Versuchsgruppen und ihre individuelle Behandlung

2.19.2 Histologie

Zum Nachweis der pathologischen Veränderungen der Lunge im Rahmen der Asthma Versuche wurden Gewebeschnitte von Lungen angefertigt. Der erste Schritt bestand in der Präparation der Lungen.

Präparation der Lungen und Fixierung des Gewebes

Zur Präparation der Lungen wurde den Versuchsmäusen zunächst wie folgt ein Tubus gelegt. Hierzu wurden Fell und Haut durch einen Schnitt vom Kinn bis zum Schlüsselbein zur Seite präpariert und entfernt. Anschließend wurde die Luftröhre freigelegt, indem Speicheldrüsen und Musculus sternohyoideus mit Hilfe zweier Pinzetten auseinandergezogen wurden. Das die Luftröhre umschließende Gewebe wurde mit einer Präparierschere angeritzt und entfernt. Die Trachea wurde darauf vorsichtig mit Hilfe einer Pinzette angehoben und unter ihr ein chirurgischer Faden durchgeführt. Durch einen Querschnitt unterhalb des Kehlkopfs wurde die Trachea dann zur Hälfte

^f Adjuvanz: Hilfsstoff, der die Ausbildung von Immunreaktion gegen Antigene, verstärkt.

geöffnet. In diese Öffnung wurde der Tubus eingeführt und mit Hilfe des chirurgischen Fadens in der Trachea fixiert. Die Lunge wurde wie folgt präpariert. Zunächst wurde die Haut vom Schnitt am Kinn ausgehend Richtung Bauchraum aufgeschnitten und zur Seite präpariert. Anschließend wurde der Bauchraum unterhalb des Brustkorbs geöffnet. Das Zwerchfell wurde zerschnitten, wodurch die Lunge kollabiert. Darauf wurde der Brustkorb herauspräpariert. Wie folgend in Abschnitt 2.19.3 beschrieben, wurde die bronchoalveoläre Lavage entnommen. Anschließend wurden über den Tubus 10 mL Histofix® in die Lunge injiziert. Hierdurch wurden die Lungen entfaltet, wodurch später eine möglichst homogene und entfaltete Gewebestruktur erhalten wird. Der im Histofix® enthaltene Formaldehyd bildet zwischen den Aminogruppen von Proteinen Hydroxymethylbrücken, wodurch die Fixierung erfolgt. Darauffolgend wurde die Lunge unterhalb des Tubus mit chirurgischem Garn abgebunden, der Tubus entfernt und die Lunge aus der Brusthöhle herauspräpariert. Bis zur weiteren Verarbeitung wurde die Lunge in ein mit Histofix® befülltes 15 mL Reaktionsgefäß überführt.

Einbettung der Lungen in Paraffin und Anfertigen von Gewebeschnitten

Der nächste Schritt bestand in der Einbettung der Schnitte in Paraffin. Dieser Schritt gewährleistet die Stabilität der Gewebeschnitte auch bei geringer Schichtdicke. Dazu wurden die Lungen aus dem Histofix® entnommen und auf eine beschriftete Eindeckkapsel gelegt. Über Nacht wurden die Kapseln in einem Automaten entwässert. Anschließend wurden die Eindeckkapseln inklusive der entwässerten Lungen auf eine Wärmeplatte gelegt. Parallel wurde der Boden eines Ausgießförmchen mit warmem Paraffin bedeckt. Die Lunge wurde in das weiche Paraffin überführt und dort ausgerichtet. Die beschriftete Eindeckkapsel wurde auf das Ausgießförmchen gelegt und über dessen Löcher die Lunge vollständig mit Paraffin bedeckt. Zum Aushärten wurde das Förmchen für 30 min bei -20 °C auf einer Kühlplatte inkubiert. Anschließend wurden die gehärteten Paraffinblöcke aus den Förmchen entnommen und überschüssiges Paraffin mit entsprechendem Werkzeug entfernt. Der folgende Schritt bestand in der Anfertigung der Schnitte. Dazu wurden die Paraffinblöcke zunächst für 30 min bei -15 °C auf der Kühlplatte abgekühlt und darauf in ein halbautomatisches Rotationsmikrotom eingespannt. Bei einem Vorschub von 20 µm wurden die Blöcke so lange geschnitten, bis eine geeignete Schnittebene erreicht wurde. Erneut wurden die Blöcke kurz bei -15 °C abgekühlt und darauf wieder ins Mikrotom eingespannt. Der Vorschub wurde auf 4 µm reduziert und die Blöcke geschnitten. Die erhaltenen Gewebeschnitte wurden in ein Miniwasserbad überführt, wodurch sich die Schnitte strecken. Im Wasserbad wurden je zwei Schnitte auf einen Objektträger gelegt. Anschließend wurden die Objektträger für 30 min bei 50 °C auf einer Wärmeplatte getrocknet. Darauffolgend wurden die Schnitte 20 min in einem Trockenschrank bei 60 °C inkubiert und anschließend abgekühlt.

Entparaffinierung der Gewebeschnitte

Im letzten Schritt wurden die Gewebeschnitte gefärbt. Dazu mussten die Schnitte jedoch zunächst entparaffiniert werden. Die Entparaffinierung erfolgte, indem die Schnitte zunächst zweimal für 5 min in Xylol inkubiert wurden. Anschließend wurden sie in verschiedenen alkoholischen Bädern gewaschen. Hierzu wurden die Schnitte je zweimal in 100%igem, dann 96%igem und abschließend einmal in 70%igem Alkohol für je 2 min inkubiert. Abschließend wurden die Schnitte noch einmal für 2 min in Aqua dest. inkubiert. Für die histologische Untersuchung der Lungen wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei verschiedene Färbemethoden verwendet.

Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Mit Hilfe der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) wurden entparaffinierte Gewebeschnitte der Lunge eingefärbt um krankhafte, inflammatorische Infiltrate sichtbar zu machen. Hämatoxylin, welches zur Färbung zu Hämalan aufbereitet wird, färbt alle sauren bzw. basophilen Strukturen blau. Hierdurch werden vor allem Zellkerne, inklusive der enthaltenen DNA, sowie das raue Endoplasmatische Retikulum gefärbt. Eosin dagegen färbt acidophile Strukturen, wie Zellplasma und dessen Proteine rot an. Für die Färbung wurden die Schnitte in einem Färbegestell einsortiert. Hämalan Stammlösung (Merck, Darmstadt) wurde 1:5 mit Aqua dest. verdünnt. Diese Färbelösung wurde in einen Färbeglastasten gefüllt. Die Schnitte im Gestell wurden in dieser Lösung 5-7 min inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte in einem weiteren, mit Aqua dest. befüllten Färbeglastasten überführt. Während der 5minütigen Inkubation unter fließendem Wasser wurde dabei überschüssige Färbelösung entfernt. Darauffolgend wurden die Schnitte für 40 sek in Eosinfärbelösung in einem weiteren Färbeglastasten inkubiert. Die Eosinfärbelösung wurde zuvor aus Eosinstammlösung unter Zugabe von 6 Tropfen Eisessig hergestellt. Nach kurzem Abspülen unter Leitungswasser wurden die gefärbten Schnitte dann wieder eingedeckt. Hierzu wurden die Schnitte in alkoholischen Lösungen aufsteigender Alkoholkonzentration entwässert. Dazu wurden die Schnitte kurz in 70%igen, 96%igen und 100%igen Alkohol gehalten. Zwischen den Alkoholbädern wurden die Schnitte jeweils sorgfältig abtropfen gelassen. Abschließend wurden die Gewebeschnitte zweimal in Xylol getaucht und darauf mit Entelan eingedeckt. Das Ausmaß der Inflammation wurde in einer Lichtmikroskopischen Analyse anhand der Infiltration von Entzündungszellen in einem „Lungen Inflammations Score“ vergleichend bestimmt.

Periodsäure-Leukofuchsin-Färbung (PAS-Färbung)

Mit Hilfe der Periodsäure-Leukofuchsin-Färbung (PAS-Färbung: *Periodic acid-schiff stain*) wurden entparaffinierte Gewebeschnitte der Lunge eingefärbt. Die PAS-Färbung ermöglicht den Nachweis von Becherzellularhyperplasien und der Mukusproduktion von Lungenepithelzellen. Zunächst werden durch Periodsäure freie Glycolgruppen zu zwei Aldehydgruppen oxidiert. Anschließend werden die Proben mit Schiff'schem Reagenz inkubiert. Dieses enthält Fuchsin-schweflige Säure. Die Säure reagiert mit den oxidierten Aldehydgruppen, wodurch es schließlich zu einer rot-violetten Färbung der Fuchsin-schwefligen Säure kommt. Durch PAS-Färbung werden Glykogen, Cellulose, neutrale Mukopolysaccharide, Muko- und Glykoproteine, sowie Glykolipide gefärbt. Wie zur HE-Färbung wurden die Schnitte in ein Färbegestell eingelegt und für 10 min in 2%iger-Periodsäure inkubiert. Darauf wurden die Schnitte mit Wasser abgespült und kurz in einem Färbegaskasten mit Aqua dest. zwischengelagert. Anschließend wurden die Gewebeschnitte in einem weiteren Färbegaskasten mit Schiff'schem Reagenz für 20 min inkubiert. Um überschüssige Fuchsin-schweflige Säure zu entfernen wurden die Proben zweimal für 1 min in SO₂-haltigem Wasser gewaschen und darauf 10 min unter fließendem Wasser gewässert. Erneut wurden die Schnitte in einem Färbegaskasten mit Aqua dest. zwischengelagert. Zur weiteren Färbung wurden die Gewebeproben abschließend für 45 sek in einem weiteren, mit Hämalaun gefüllten, Färbegaskasten inkubiert. Überschüssiges Hämalaun wurde durch 5minütige Inkubation unter fließendem Wasser entfernt. Schließlich wurden die Schnitte entwässert. Hierzu wurden sie zweimal in 100%igem Alkohol und zweimal in Xylol für je 2 min inkubiert und abschließend mit Entellan eingedeckt. Unter dem Mikroskop wurde mit Hilfe der *analySIS*[®] 3.2 Software (Soft Imaging Systems GmbH, Münster, Deutschland), die Anzahl der PAS⁺ Zellen pro mm Bronchus, als Maß der pathologischen Mukusproduktion und Becherzellularhyperplasie, ermittelt.

2.19.3 Analyse der bronchoalveolären Lavage (BAL)

Um die zelluläre Zusammensetzung in den Atemwegen zu untersuchen wurde bei den Versuchstieren eine bronchoalveoläre Lavage (BAL) durchgeführt. Hierzu wurde den mit Narcoren betäubten Versuchstieren wie in Abschnitt 2.19.2 beschrieben ein Tubus in die Luftröhre gelegt. Zur Gewinnung der BAL, wurde über den Tubus 1 mL 1xPBS in die Lunge gespritzt. Von diesem 1 mL konnten, durch langsames Herausziehen über eine Spritze, 500-900 µL BAL gewonnen werden. Die BAL wurde in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und 10 min bei 1500xg zentrifugiert. Die Überstände wurden in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und bei -80 °C gelagert. Das Zellpellet wurde in 200 µL 1xPBS aufgenommen. Um die zelluläre Zusammensetzung dieser, in die

Material & Methoden

BAL infiltrierten, Zellen zu ermitteln wurden Zytospins angefertigt. Hierbei wurden Objektträger, sowie Filterpapier und ein Trichter auf einem Zytofugenhalter befestigt und entsprechend in der Zytofuge (einer Zentrifuge mit einem Rotor für Zytofugenhalter) angebracht. 100 µL der BAL-Zellsuspension wurden in den Trichter pipettiert und die Proben bei 75xg für 10 min zentrifugiert. Hierbei werden die Zellen in einem kleinen Bereich auf dem Objektträger fokussiert und anschließend für 10 min an der Luft getrocknet. Mit Hilfe des Hemacolor® (IVD)-Kits wurden die Zellen auf dem Zytospin fixiert und eine HE-Färbung durchgeführt. Hierzu wurden die Zytospins nacheinander je 5 mal für 1 sek in Fixier-, Hämalan-Färb- und Eosin-Färbelösung getaucht. Zwischen den Fixier- bzw. Färbeschritten wurden die Zytospins gründlich abtropfen lassen und abschließend mit destilliertem Wasser abgespült. Abschließend wurde die zelluläre Zusammensetzung der BAL mit Hilfe eines Lichtmikroskops bestimmt. Anhand ihrer charakteristischen Morphologie wurden hierbei alveoläre Makrophagen, Lymphozyten, sowie Neutrophile und Eosinophile Granulozyten unterschieden. Pro Zytospin wurden 200 Zellen bestimmt und anhand der gewonnenen BAL Menge die absolute und relative Zellzusammensetzung berechnet.

2.19.4 Gewinnung von Seren

Zur Bestimmung der Titer von OVA-spezifischen Antikörpern in den Seren von Versuchstieren wurde den Tieren der Asthma Experimente Blut entnommen. Die Durchführung der Blutentnahme im Rahmen von Asthma Experimenten wurde bereits in Abschnitt 2.18 beschrieben.

2.19.5 Restimulation der Zellen mit OVA *ex vivo*

Zur Analyse der antigenspezifischen Produktion von Zytokinen im Rahmen der Asthma Experimente wurden den Versuchsmäusen die trachealen Lymphknoten entnommen. Wie in Abschnitt 2.11.2 beschrieben, wurden aus diesen Einzelzellsuspensionen hergestellt. Diese Zellen wurden 5 min bei 1500xg zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen zu je 1×10^7 Zellen/mL in TM5 aufgenommen. 100 µL dieser Zellsuspension wurden in bis zu 8 Wells einer 96Well-Rundbodenplatte überführt. Je 4 Wells mit Lymphknoten zellen wurden mit bzw. ohne OVA Protein restimuliert. Hierzu wurden entweder 100 µL OVA-Lösung (50 µg/ml in TM5) zur Stimulation mit OVA, oder 100 µL TM10 zur Stimulation ohne OVA zu den entsprechenden Wells gegeben. Die Zellen wurden darauf für 72 h im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Überstände gewonnen, aus denen Mittels ELISA die Konzentration verschiedener Zytokine bestimmt werden konnten.

2.19.6 Zytokin ELISAs

Zur Analyse der antigenspezifischen Produktion der Zytokine IL-4, IL-5, IL-13 und IFN- γ wurde die Methode des ELISA verwendet. Auf die zugrundeliegenden Prinzipien des ELISA wurde zuvor in Abschnitt 2.17 eingegangen. Tabelle 2.7 enthält die für jeden ELISA individuellen Eigenheiten. Um die spezifische, durch die Reaktion auf das Antigen OVA entstehende Produktion von Zytokinen, von der unspezifischen Produktion zu trennen, wurden bei der Auswertung wie folgt verfahren. Die ELISA wurden jeweils mit Kulturüberständen von Zellen durchgeführt, die mit und ohne OVA, wie unter 2.19.5 beschrieben, stimuliert wurden. Durch Subtraktion der Zytokinkonzentration der ohne OVA restimulierten Kulturüberstände, von der Zytokinkonzentration der mit OVA restimulierten Kulturüberstände wurde die antigenspezifische Zytokinproduktion errechnet.

2.19.7 Antigen-spezifische Antikörper ELISA

Im Rahmen von Asthma Experimenten wurden ELISA zur Analyse der antigenspezifischen Antikörperproduktion durchgeführt. Hierbei wurden die Titer der OVA-spezifischen Antikörper-Isotypen IgG1, IgG2b und IgE bestimmt. Die ELISA zur Bestimmung an OVA-spezifischem IgG1 und IgG2b wurden wie in Abschnitt 2.17 beschrieben durchgeführt. Tabelle 2.7 enthält die für diese ELISA individuellen Eigenheiten. Da die Titer an OVA-spezifischem IgE in der Regel extrem niedrig sind und daher schwierig zu bestimmen, wurden ELISA zur Bestimmung OVA-spezifischen IgEs nach einem abgewandelten Protokoll nachgewiesen. Das abgewandelte Protokoll ist notwendig, da sonst beim ELISA alle OVA-spezifischen Antikörper im Serum miteinander um Bindungsstellen an OVA konkurrieren. Daher wurde bei diesem ELISA jedes Well der Mikrotiterplatte zunächst mit 50 μ L eines IgE spezifischen Antikörpers beschichtet. Analog zu den bisher beschriebenen ELISA wurde die Platte gewaschen und unspezifische Bindungsstellen mit einem BSA-haltigen Puffer blockiert (siehe 2.17). Im nächsten Schritt wurden die Seren, in geeigneter Vorverdünnung, über die Mikrotiterplatte seriell 1:2 titriert. Durch fünfmaliges Waschen wurden alle Bestandteile der Seren, die keine IgE Antikörper sind, gewaschen. Es folgte die Zugabe von 50 μ L/Well an biotinyliertem OVA. Dieses wurde für 1 h auf der Platte inkubiert, wodurch das OVA durch die Bindung an die spezifischen IgE Antikörper an die Platte fixiert wurde. Erneut folgten fünf Waschritte um ungebundenes Antigen zu entfernen. Schließlich wurde die Platte mit 50 μ L/Well Streptavidin-gekoppelter Meerrettich-Peroxidase inkubiert. Durch fünfmaliges Waschen wurde ungebundenes Enzym von der Platte entfernt. Abschließend wurde der ELISA mit Substratlösung entwickelt. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe 2 N Schwefelsäure gestoppt und die Absorption bei 450 nm im Tecan Reader gemessen. Die

individuellen Eigenheiten dieses ELISA, wie z.B. verwendete Antikörper, Inkubationszeiten und Substrat sind in Tabelle 2.7 aufgeführt.

2.20 RNA Präparation

Für quantitative Realtime PCR wurde totale RNA aus Tregs und Tcons isoliert. Dazu wurden die Zellen zunächst bei 1500xg für 5 min pelletiert. Nach der Zentrifugation wurden die Pellets in 1 mL Tri-Flüssig (Bio&Sell, Feucht, Deutschland) aufgenommen. Zur Isolation wurde im Folgenden eine Phenol-Chloroform Extraktion angewendet. Hierzu wurde das Tri-Flüssig gründlich mit 200 µL Chloroform vermischt. Nach 5 minütiger Inkubation trennte man die Mischung durch 15 minütige Zentrifugation bei 12.500xg (4 °C) in drei Phasen auf. 550 µL der oberen, wässrigen Phase, mit der enthaltenen RNA, wurden abgenommen und mit 1,5 µL Glykogen, sowie 500 µL Isopropanol versetzt und durchmischt. Erneut wurde 10 min inkubiert. Anschließend wurde die RNA durch erneutes 10minütiges Zentrifugieren bei 12.500xg (4 °C) pelletiert. Das RNA Pellet wurde zweimal mit 1 mL 70%igem Ethanol in DEPC Wasser gewaschen. Anschließend wurde die saubere RNA vom Ethanol befreit, getrocknet und wieder in 20 µL DEPC-Wasser gelöst. Durch photometrische Messung wurde schließlich die Konzentration der RNA bestimmt. Wie in Abschnitt 2.21 beschrieben, wurde die RNA durch reverse Transkription in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben.

2.21 Reverse Transkription (RT)

Die RT dient der Überführung von RNA, insbesondere messenger RNA (mRNA), in komplementäre DNA (cDNA), mit Hilfe der Reversen Transkriptase. Die cDNA kann schließlich in der quantitativen Realtime PCR eingesetzt werden, um z.B. die mRNA Expression verschiedener Gene zu analysieren. Bei der RT wurden zwei Priming Strategien verwendet um speziell mRNA in cDNA umzuschreiben. Beim sogenannten Oligo(dT)_n Priming wird ein Oligo(dT)_n Primer verwendet. Dieser bildet mit dem Poly(A) Schwanz von mRNA Molekülen den nötigen, doppelsträngigen Startbereich für die Reverse Transkriptase. Diese Strategie gewährleistet die zuverlässige Synthese der cDNA im Bereich des 3'-Endes des mRNA Moleküls. Mit zunehmender Entfernung zum Startbereich nimmt jedoch die Effizienz der RT ab. Bei der Strategie des Random Priming hingegen verwendet man ein Gemisch aus Hexanukleotiden jeglicher theoretisch denkbarer Sequenzabfolgen. Durch die Verwendung dieser (dN)₆ Primermischung wird die cDNA Synthese an verschiedenen Stellen der mRNA initiiert. Die Random Priming Strategie garantiert, dass alle mRNA Sequenzen aus einer heterogenen Population gleichmäßig in cDNA Moleküle überschrieben werden. Bei dieser Methode ist der Anteil der

vollständig kopierten mRNA Moleküle jedoch gering. Um die mRNA jedoch effizient in cDNA umzuschreiben, wurde in der RT eine Mischung aus Oligo(dT)_n- und (dN)₆-Primern verwendet. In den RT Experimenten im Rahmen dieser Arbeit wurden 300 ng totale RNA in folgendem RT Ansatz eingesetzt:

300 ng	RNA
1 µL	p(dN) ₆ [20 ng/µL]
1 µL	Oligo(dT) _n [100 ng/µL]
2 µL	dNTPs 100 nM
1 µL	M-MLV Reverse Transkriptase
4 µL	5x RT-Puffer

Die Proben wurden mit DEPC-Wasser auf ein Reaktionsvolumen von 20 µL aufgefüllt. Die RT erfolgte durch 1 stündige Inkubation bei 37 °C im Wasserbad. Anschließend wurden die Proben mit autoklaviertem Wasser auf 100 µL Gesamtvolumen aufgefüllt.

2.22 Quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur Amplifikation von DNA. Sie besteht aus vier Reaktionsschritten. Im ersten Schritt, der DNA-Denaturierung, werden die DNA Doppelstränge thermisch in Einzelstränge getrennt. Dies ermöglicht im zweiten Schritt, der Primerhybridisierung (*Annealing*), die Anlagerung eines *Primers* an einen spezifischen Teil eines DNA-Einzelstranges. Im nächsten Schritt, der Elongation, kommt es zur Synthese des gegenläufigen Stranges mit Hilfe einer DNA-Polymerase. Durch gezielte thermisch regulierte Wiederholung dieser Schritte kommt es zur spezifischen, exponentiellen Amplifikation eines DNA Bereiches, der durch die zugegebenen Oligonukleotide flankiert wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die qRT-PCR genutzt, mit deren Hilfe sich das relative Verhältnis von mRNA Molekülen in verschiedenen Zellproben vergleichen lässt. Im Zuge der Arbeit wurde die mRNA von IRF4, sowie des Haushaltsgens HGPRT (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase) unter Verwendung des Farbstoffs SYBR GreenER in einem Cyler (iCycler myIQ, BioRad, Darmstadt, Deutschland) amplifiziert. Der Farbstoff SYBR GreenER kann sich an doppelsträngige DNA anlagern und gibt dabei ein Fluoreszenzsignal ab. Über dieses Signal kann man auf die Menge amplifizierter DNA in der Probe schließen. Das Haushaltsgen sollte dabei zwischen den Proben möglichst unabhängig äußerer Einflüsse exprimiert sein. Es kann daher als interner Standard verwendet werden. Nach Normalisierung der gemessenen Fluoreszenz auf die des Haushaltsgens,

Material & Methoden

lässt sich durch Vergleich der Proben die relative mRNA Expression ermitteln. Diese wurde mit Hilfe von Excel (Microsoft Corp., Redmont, WA, USA) berechnet. Für ein Triplikat wurde folgender PCR Ansatz pipettiert. Zur Amplifikation der cDNA wurde das in Tabelle 2.9 verwendete Programm benutzt.

Ansatz für Triplikat (3,2x Ansatz)		Verwendetes Cyclor Programm		
Autoklaviertes H ₂ O	28,8 µL	Präinkubation	50 °C	
SYBR GreenER	40 µL	Aktivierung der <i>Hot-start Taq DNA Polymerase</i>	95 °C 15 min	
Jeweilige cDNA	8 µL	Denaturierung	95 °C 30 sec	50x
Spezifisches Oligonukleotid	3,2 µL	Annealing	57 °C 30 sec	
		Elongation	72 °C 1 min	
		Denaturierung	95 °C 1 min	
			10 sek Temp. um je 0,5 °C gesenkt	60x

Tabelle 2.9: PCR-Ansatz und PCR-Programm der qRT-PCR

Jeder PCR-Ansatz wurde in Triplikaten durchgeführt.

2.23 Statistik

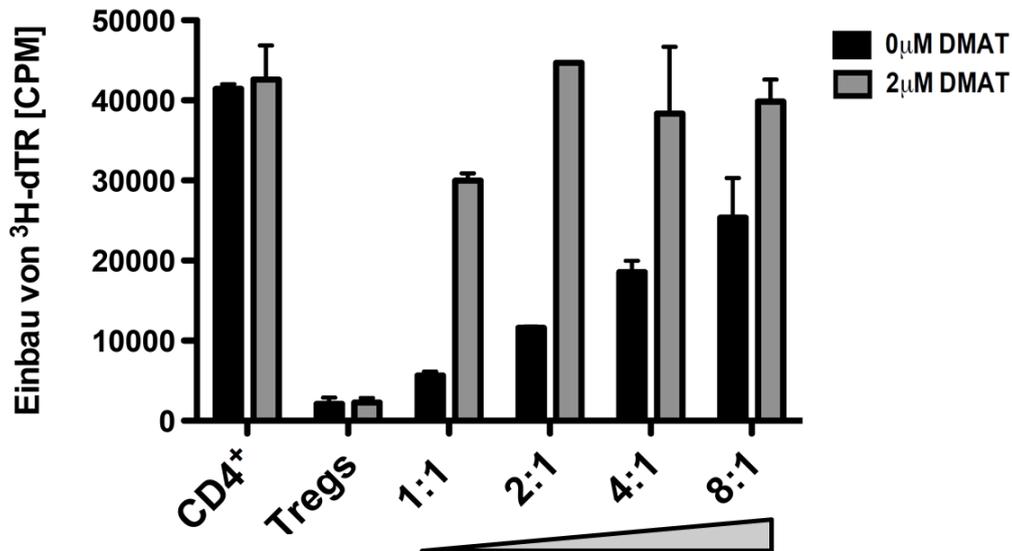
Die statistische Auswertung der Versuche erfolgte via students t-Test mittels Prism (GraphPad für Mac). *P*-Werte über 0,05 wurden hierbei als nicht signifikant (n.s.), *P*-Werte kleiner oder gleich 0,05 als signifikant (*), *P*-Werte kleiner oder gleich 0,01 als signifikanter (**) und *P*-Werte kleiner oder gleich 0,001 als hochsignifikant (***) angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Auswirkungen der pharmakologischen Inhibition der Casein Kinase 2 auf regulatorische T-Zellen

Gemäß der in 1.6 dargelegten Zielsetzung dieser Arbeit und basierend auf den in Abschnitt 1.4 beschriebenen Erkenntnissen des komparativen *Kinomarrays* sollte die Funktion der CK2 in Tregs charakterisiert werden. Zunächst wurde der CK2 Inhibitor DMAT eingesetzt, um die Aktivität der CK2 in einem klassischen Treg-basierten Suppressionstest zu blockieren. Hierzu wurden Tregs aus den Milzen von C57BL/6 Mäusen anhand ihrer erhöhten CD25 Proteinexpression (siehe Abschnitt 2.12.1) mittels MACS isoliert. Per Durchflusszytometrie wurde der Anteil der CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs in dieser CD25-angereicherten Zellpopulation bestimmt, wobei die CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs nur in den Suppressionstests eingesetzt wurden, falls ihr Anteil in dieser Zellpopulation 90% überstieg. Zusätzlich wurden aus dem MACS-Durchlauf der Treg-Aufreinigung CD4⁺ Tcons isoliert (siehe Abschnitt 2.12.2). Anschließend wurden Tregs und CD4⁺ Tcons jeweils alleine oder gemeinsam in einem Tcon:Treg-Verhältnis von 1:1, 2:1, 4:1 und 8:1 kokultiviert. Mit Hilfe von löslichem anti-CD3-Antikörper in Kombination mit Mitomycin C behandelten akzessorischen A20 Zellen, wurden die CD4⁺ Tcons in den verschiedenen Ansätzen zur Proliferation angeregt. Um die Auswirkung der pharmakologischen Inhibition der CK2 auf die Proliferation und Suppression der T-Zellen (in Kokultur mit Tregs) zu analysieren wurde je eine Versuchsreihe in An- und Abwesenheit von DMAT (2 µM) angesetzt. Die Proliferation der Zellen wurde, wie in 2.13 beschrieben, durch den Einbau von radioaktivem ³H-Thymidin (³H-TdR) in die DNA gemessen. 3.1 zeigt das repräsentative Resultat eines solchen Proliferationsassays.

Ergebnisse



3.1: Die pharmakologische Inhibition der Aktivität der CK2 blockiert die Treg-vermittelte Suppression der Proliferation CD4⁺ T-Zellen. Aus 8 Wochen alten C57BL/6-Mäusen wurden Milzen präpariert. Aus den Milzen wurden gemäß der Anleitungen in den Abschnitten 2.12.1 und 2.12.2 Tregs und Tcons isoliert. Parallel wurden, wie unter 2.10 angegeben, A20 Zellen mit Mitomycin C behandelt. Die jeweiligen Zellpopulationen wurden in Proliferationsassays, gemäß Abschnitt 2.13, in An- und Abwesenheit des CK2 Inhibitors DMAT, in einer Konzentration von 2 μM, eingesetzt. Für jeden Ansatz mit und ohne DMAT wurden die Tregs und CD4⁺ Tcons jeweils alleine oder in Kokultur in einem Tcon:Treg-Verhältnis von 1:1, 2:1, 4:1 und 8:1 stimuliert. Wie in Abschnitt 2.13 erläutert, wurde die Proliferation der Zellen, durch den Einbau radioaktiven ³H-TdRs in die DNA in „counts per million“ [CPM] gemessen.

Aus den Ergebnissen in Abbildung 3.1 geht zunächst hervor, dass CD4⁺ Tcons, in Abwesenheit von Tregs und unabhängig von DMAT, eine hohe Proliferation aufweisen. Tregs alleine zeigen hingegen nur eine schwache eigene Proliferation. Zudem zeigt Abbildung 3.1, dass Tregs in der Lage sind, die Proliferation CD4⁺ Tcons abhängig vom jeweiligen Tcon/Treg-Verhältnis zu supprimieren. Durch Inhibition der CK2 über die Zugabe von DMAT lässt sich die Treg-vermittelte Suppression der Proliferation CD4⁺ Tcons dagegen aufheben. Der CK2 Inhibitor DMAT weist jedoch ein gewisses Maß an Unspezifität auf und inhibiert neben der CK2 auch weitere Kinasen. Als zusätzliches Werkzeug zur Charakterisierung der Funktion der CK2 in Tregs wurden daher, für die weiteren Experimente, Mäuse mit konditionaler Deletion der CK2β in Tregs verwendet. Der folgende Abschnitt 3.2 befasst sich mit der Generierung dieser Tiere. Der restliche Ergebnissteil beschäftigt sich mit der Charakterisierung des Phänotyps und der Analyse der Funktion der CK2 in den Tregs dieser Mäuse.

3.2 Generierung einer Treg-spezifischen konditionalen Casein Kinase 2 β *Knock Out* Maus (CK2 β ^{Treg-/-} Mäuse)

3.2.1 Generierung einer Treg-spezifischen konditionalen Casein Kinase 2 β *Knock Out* Maus (CK2 β ^{Treg-/-} Mäuse)

Pharmakologische Inhibitoren stellen ein wichtiges Instrument zur Untersuchung der Funktion von Kinasen dar, jedoch ist ihre Wirksamkeit nicht strikt auf die Inhibition einer einzelnen Kinase beschränkt. Solche Kinase-Inhibitoren zeigen also ein gewisses Maß an unspezifischer Inhibition. Der in den vorherigen Experimenten verwendete CK2 Inhibitor DMAT z.B. blockiert in der verwendeten Konzentration (2 μ M) neben der CK2 auch die Aktivität der Kinasen PIM-1, PIM-3 sowie HIPK-2 in gleichem Ausmaß¹¹⁷. Somit können die in Abschnitt 3.1 erhaltenen Ergebnisse nicht eindeutig auf eine Blockade der Funktion der CK2 zurückgeführt werden. Ein alternatives Werkzeug zur Untersuchung der Funktion der CK2 in Tregs stellen sogenannte "*Knockout*"-Mäuse dar. Mäuse mit einer Deletion der CK2 in allen Zelltypen des Organismus konnten jedoch nicht zur Untersuchung der zugrunde liegenden Fragestellungen verwendet werden, da sich eine derartige genetische Mutation bereits in frühen Entwicklungsstadien der Tiere als embryonal lethal auswirkt^{118,102}. Aus diesem Grund wurden mit Hilfe des „Cre-loxP Systems“ sogenannte konditionale "*knockout*" Mäuse erzeugt, in denen lediglich Tregs defizient für die CK2 β Untereinheit (UE) sind. Hierzu wurden, wie in Abschnitt 2.4 des Material & Methoden Teils beschrieben, zwei verschiedene Mausstämmen miteinander verpaart. Der erste Mausstamm, die sogenannten Foxp3-IRES-Cre Mäuse tragen einen "*Knock in*", der dazu führt, dass unter der Kontrolle des Foxp3-Promoters die Cre Rekombinase exprimiert wird⁷⁶. In den Tieren des zweiten Mausstamms sind Teile des Gens der CK2 β UE (*Csnk2b*) von sogenannten *loxP sites* flankiert (CK2 β -*flxed*)¹⁰². Werden diese beiden Mausstämmen, wie in Abbildung 3.2 A schematisch dargestellt, miteinander verpaart, so werden Tiere generiert, welche in Foxp3 exprimierenden Zellen keine funktionelle CK2 β UE bilden können.

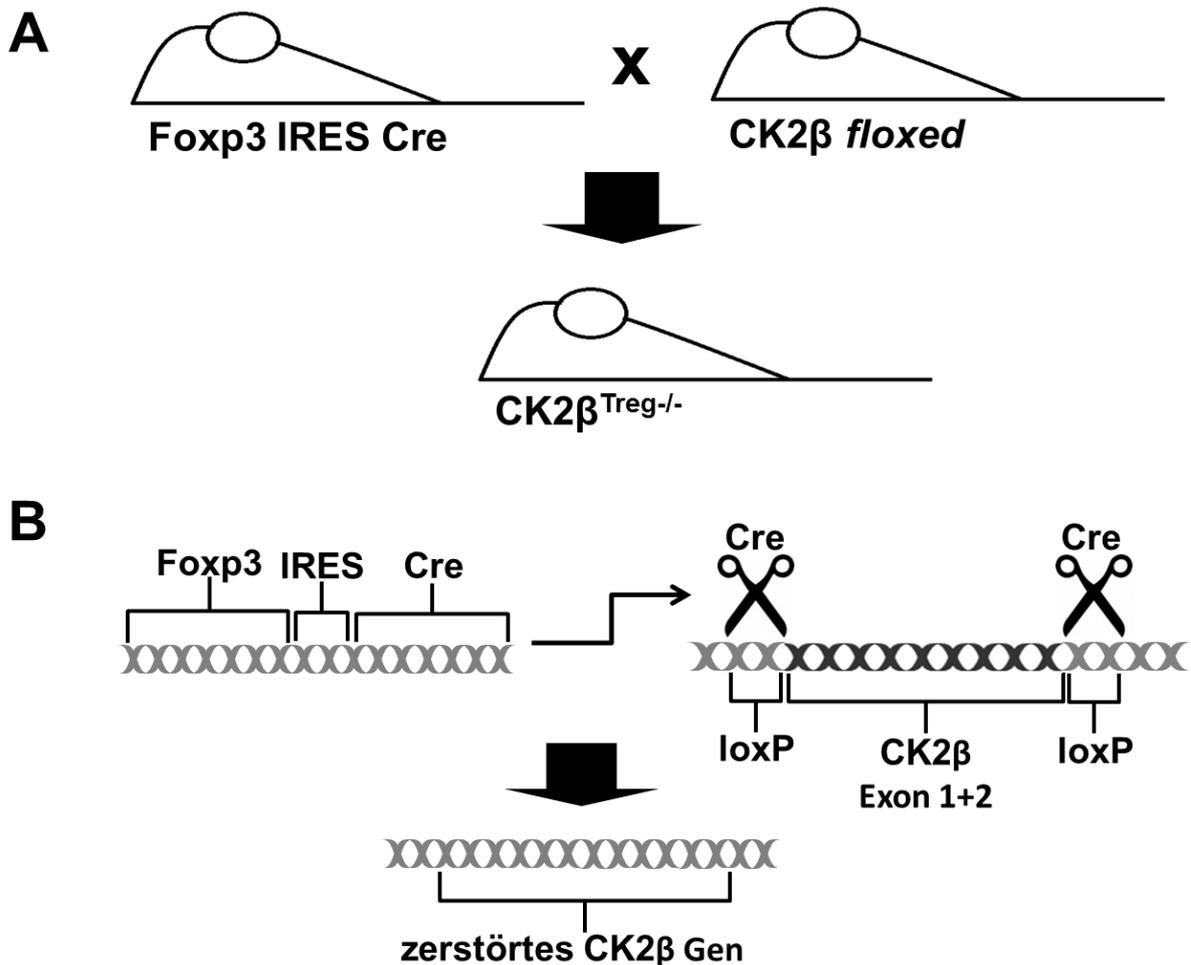


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der Generierung Treg-spezifischer konditionaler CK2β "knockout" Mäuse:
A Schematische Darstellung der Verpaarung von Foxp3-IRES-Cre und CK2β-*floxed* Mäusen, wodurch die gewünschten CK2β^{Treg-/-}-Mäuse erhalten werden, in denen die CK2β UE spezifisch in Tregs deletiert ist. **B** Schematische Darstellung der Wirkungsweise der Cre Rekombinase in CK2β^{Treg-/-}-Mäusen. Unter der Kontrolle des Foxp3 Promotors wird die Cre Rekombinase exprimiert. Diese erkennt im Folgenden ihre Rekombinationssignalsequenzen (*loxP sites*) um das *Csnk2b* Gen und schneidet die dazwischenliegenden Bereiche spezifisch in Foxp3 exprimierenden Tregs aus der DNA.

Wie aus Abbildung 3.2 hervorgeht, wurden CK2β^{Treg-/-} Mäuse gezüchtet, die in Foxp3 exprimierenden Zellen auch die Cre Rekombinase exprimieren. Parallel dazu sind in allen Zellen dieser Tiere Teile des Gens der CK2β UE (*Csnk2b*) von *loxP sites* flankiert. In den Tregs dieser Mäuse erkennt die Cre Rekombinase im Folgenden die gleichzeitig in den Zellen enthaltenen Rekombinationssignalsequenzen (*loxP sites*) um das *Csnk2b* Gen. Wie in Abbildung 3.2 B dargestellt bindet die Rekombinase an diese *loxP sites* und entfernt die dazwischen liegenden Bereiche aus der DNA. Hierdurch werden die Exons 1 und 2 des *Csnk2b* Gens und damit auch der transkriptionelle Startpunkt der CK2β aus der DNA entfernt. Weil der Transkriptionsfaktor Foxp3 spezifisch in Tregs exprimiert wird, sind spezifisch diese Zellen der Mäuse defizient für die CK2β UE, während die CK2β

UE in anderen Zellen der Tiere intakt bleibt. Diese konditionalen „knockout“ Mäuse werden im Folgenden nur noch als $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Mäuse bezeichnet und die nächsten Abschnitte befassen sich mit der Analyse dieser Tiere. Für die weiteren Experimente wurden als $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Mäuse nur Tiere mit folgenden Genotypen verwendet:

Geschlecht der Maus:	Foxp3-Cre Status:	$CK2\beta$ -floxed Status:
Weibchen	+/+	+/+
Männchen	+	+/+

Tabelle 3.1: Zulässige Genotypen für die Verwendung von Tieren als $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Maus

Als wildtypische Kontrolltiere, im Folgenden bezeichnet als $CK2\beta^{Treg+/+}$ -Mäuse, wurden ausschließlich Mäuse folgender Genotypen verwendet:

Geschlecht der Maus:	Foxp3-Cre Status:	$CK2\beta$ -floxed Status:
Weibchen	-/-	+/+
Weibchen	-/-	+/-
Weibchen	-/-	-/-
Männchen	-	+/+
Männchen	-	+/-
Männchen	-	-/-
Weibchen	+/+	-/-
Weibchen	+/-	-/-
Weibchen	-/-	-/-
Männchen	+	-/-
Männchen	-	-/-

Tabelle 3.2: Zulässige Genotypen für die Verwendung von Tieren als wildtypische $CK2\beta^{Treg+/+}$ -Kontrolltiere

Alle weiteren genotypischen Kombinationen könnten dazu führen, dass die $CK2\beta$ UE nicht in allen Foxp3 exprimierenden Tregs der Mäuse deletiert wird, sondern nur beispielsweise in 50% der Tregs. Die Verwendung solcher Mäuse würde demnach zu Mischeffekten führen, daher wurden diese Tiere für die weitere Versuchsführung ausgeschlossen. Der folgende Abschnitt befasst sich mit der Verifizierung des „knockout“ in $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Mäusen, also der Untersuchung, ob eine erfolgreiche Deletion der $CK2\beta$ in den Tregs der Tiere stattgefunden hat.

3.2.2 Verifizierung der Deletion der Casein Kinase 2 β UE in regulatorischen T-Zellen von $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Mäusen

In Abschnitt 3.2.1 wurde die Erzeugung der $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Mäuse beschrieben. Diese Tiere dienen im Folgenden als entscheidendes Werkzeug, um die Funktion der $CK2\beta$ UE in Tregs zu untersuchen. Der erste notwendige Schritt in der Analyse der $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Mäuse bestand jedoch in der Verifizierung der Deletion der $CK2\beta$ in Tregs. Hierzu wurden $CD25^+$ Tregs aus den Milzen von $CK2\beta^{Treg+/+}$ - und $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Mäusen mittels MACS isoliert (siehe Abschnitt 2.12.1) und per Durchflusszytometrie der Anteil der $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Tregs in dieser $CD25$ -angereicherten Zellpopulation bestimmt. Bei einem Anteil der $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Tregs von über 85% wurde genomische DNA aus den Zellen gewonnen. Mittels drei verschiedener Polymerasekettenreaktionen (PCR) sollte die Deletion von Teilen des *Csnk2b* Gens in der DNA nachgewiesen werden¹⁰². Abbildung 3.3 A zeigt schematisch die in den verschiedenen PCR Reaktionen durch Amplifikation von Teilen des *Csnk2b* Gens entstehenden DNA Fragmente. Für jede PCR wird ein eigenständiges Paar „Primer“ verwendet.

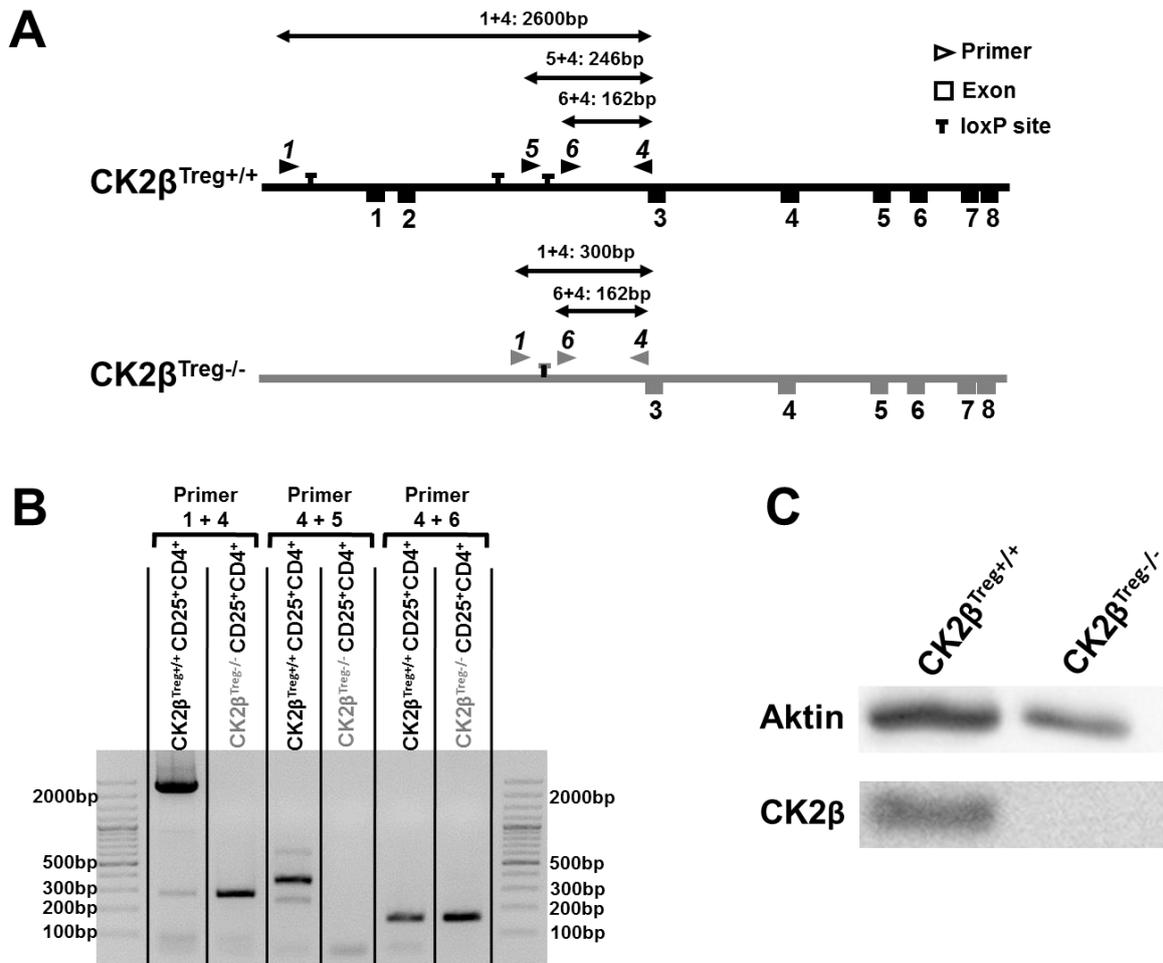


Abbildung 3.3: Verifizierung der Deletion der CK2β UE in Tregs von CK2β^{Treg-/-} Mäusen: **A** Schematische Darstellung des intakten, sowie nach Cre Rekombination funktionsunfähigen *Csnk2b* Gens in CK2β^{Treg+/+}- und CK2β^{Treg-/-}-Mäusen. Die Rekombinationssignalsequenzen sowie Primer-Bindungsstellen und Längen der in den PCRs entstehenden DNA Fragmente sind angegeben. Durch Entstehung verschieden langer PCR-Fragmente bei den unterschiedlichen Zuständen des *Csnk2b* Gens lässt sich die Deletion von Teilen des *Csnk2b* Gens in Tregs von CK2β^{Treg-/-}-Mäusen nachweisen. Insbesondere das Fehlen einer Bande bei Tregs aus CK2β^{Treg-/-}-Mäusen in der PCR unter Verwendung der Primer 4+5 dient der Kontrolle der vollständigen Cre vermittelten Deletion von Teilen des *Csnk2b* Gens. **B** CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs aus 7-10 Wochen alten CK2β^{Treg+/+}- und CK2β^{Treg-/-}-Mäusen wurden gemäß Abschnitt 2.12.1 isoliert und genomische DNA aus den Zellen gewonnen. Unter Verwendung dieser DNA Proben wurden 3 verschiedene PCRs durchgeführt. Hierzu wurden die Primer 1+4, 4+5 und 4+6 benutzt. Anschließend erfolgte die gelelektrophoretische Trennung der PCR Fragmente. Das in den verschiedenen PCRs entstehende Bandenmuster gibt Aufschluss über den Zustand des *Csnk2b* Gens. **C** CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs aus CK2β^{Treg+/+}- und CK2β^{Treg-/-}-Mäusen wurden entsprechend nach Abschnitt 2.12.1 isoliert und aus den Zellen Proteine gewonnen. Diese Proben wurden im Western Blot zum Nachweis der CK2β in Tregs von CK2β^{Treg-/-}-Tieren verwendet.

Wie Abbildung 3.3 A zeigt, entsteht in der PCR unter Verwendung der Primer 1+4 im wildtypischen *Csnk2b* Gen ein 2600 bp großes Fragment. Ist das *Csnk2b* Gen jedoch auch nur in einem Teil der isolierten Treg Zellen durch Cre Rekombination zerstört, entsteht ein favorisiertes, nur 300 bp großes

Ergebnisse

DNA Fragment. Im Falle eines unvollständigen „knockout“ ist also die Bildung des letzteren PCR-Fragment aufgrund seiner geringeren Größe und der dadurch kürzeren Synthesezeit stark begünstigt, sodass diese PCR allein nicht als Beweis des vollständigen „knockouts“ dienen kann. Dieser Nachweis kann jedoch durch zwei weitere PCRs unter Verwendung der Primer Paare 5+4 und 6+4 erfolgen. Hierzu macht man sich zu Nutze, dass der Primer 5 an einen DNA Bereich bindet, der durch die Cre-vermittelte Rekombination der DNA deletiert wird. Proben aus Tregs von $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Mäusen bilden demnach in dieser PCR (Primer 5+4) keine Bande, während die Tregs von $CK2\beta^{Treg+/+}$ -Tieren ein 264 bp großes DNA Stück aufweisen. In der PCR unter Verwendung der Primer 6+4 hingegen wird, unabhängig vom Genotyp, ein 162 bp großes DNA Fragment amplifiziert. Diese PCR (Primer 6+4) dient also als Kontrolle, um auszuschließen, dass im Falle der Tregs aus $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Mäusen keine DNA in der Probe enthalten ist. In Abbildung 3.3 B ist das Ergebnis dieser drei PCRs und der anschließenden Agarosegelelektrophorese dargestellt. Tregs aus $CK2\beta^{Treg+/+}$ -Mäusen (schwarz) zeigen hier in den jeweiligen PCRs das für ein intaktes *Cnsk2b* Gen erwartete Bandenmuster (siehe Abbildung 3.3 A). Im Gegensatz dazu weisen Tregs aus $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Mäusen (grau) das Bandenmuster eines durch Cre-vermittelte Rekombination funktionsunfähigen *Cnsk2b* Gens auf (siehe Abbildung 3.3 A). So zeigen $CK2\beta$ defiziente Tregs insbesondere in der PCR unter Verwendung der Primer 4+5 keine DNA Bande bei 246 bp, sowie eine Bande bei 300 bp in der PCR unter Verwendung der Primer 1+4. Anhand des Bandenmusters lässt sich demnach eindeutig feststellen, dass die Deletion des *Cnsk2b* Gens in den Tregs der $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Mäuse erfolgreich ist. Zur weiteren Kontrolle der Deletion der $CK2\beta$ in Tregs wurden erneut $CD25^+$ Tregs aus den Milzen von $CK2\beta^{Treg+/+}$ - und $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Mäusen mittels MACS isoliert (siehe Abschnitt 2.12.1) und per Durchflusszytometrie der Anteil der $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Tregs in dieser $CD25$ -angereicherten Zellpopulation bestimmt. Aus den Zellen wurden wie in Abschnitt 2.15 beschrieben die Proteine isoliert, die nur bei einer Reinheit von über 85% der $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Tregs an den $CD25$ -angereicherten Zellen verwendet wurden. Mittels Western Blot Analyse wurde die Proteinexpression der $CK2\beta$ UE in diesen Proteinproben getestet. Das Ergebnis des Western Blots ist in Abbildung 3.3 C dargestellt. Auch hier lässt sich die $CK2\beta$ in den Tregs der $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Tiere nicht nachweisen. Zusammenfassend kann somit festgehalten werden, dass die Deletion von Teilbereichen des *Cnsk2b* Gens in den Tregs der $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Mäusen zu einem vollständigen Verlust der $CK2\beta$ UE führt.

3.3 CK2 β ^{Treg^{-/-}}-Tiere zeigen einen aktivierten T-Zell Phänotyp

3.3.1 CK2 β ^{Treg^{-/-}}-Tiere weisen vergrößerte periphere lymphatische Organe auf

Im vorherigen Abschnitt 3.2.2 wurde festgestellt, dass in Tregs von CK2 β ^{Treg^{-/-}}-Mäusen ein vollständiger Verlust der CK2 β UE vorliegt. Die folgenden Abschnitte befassen sich nun mit der Analyse der Folgen dieser Treg-spezifischen Deletion auf das Immunsystem der Tiere. Um zunächst einen ersten Überblick über die Konstitution der CK2 β ^{Treg^{-/-}}-Mäuse zu erhalten, wurden wichtige lymphatische Organe der Tiere untersucht. In Abbildung 3.4 sind exemplarisch Milzen sowie popliteale, inguinale und mesenteriale Lymphknoten abgebildet, die aus CK2 β ^{Treg^{+/-}}- und CK2 β ^{Treg^{-/-}}-Mäusen präpariert wurden.

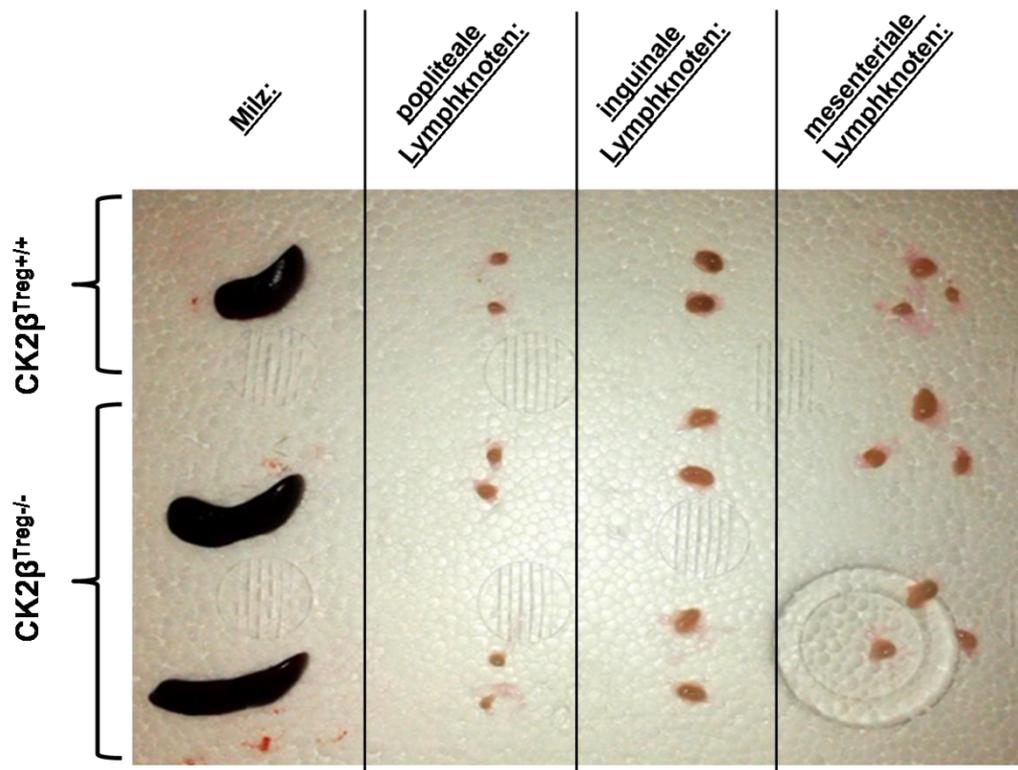


Abbildung 3.4: CK2 β ^{Treg^{-/-}}-Tiere weisen vergrößerte periphere lymphatische Organe auf. Milzen sowie popliteale, inguinale und mesenteriale Lymphknoten wurden aus 10-14 Wochen alten CK2 β ^{Treg^{+/-}}- und CK2 β ^{Treg^{-/-}}-Mäusen präpariert. Die Organe von zwei CK2 β ^{Treg^{-/-}}-Mäusen und einer CK2 β ^{Treg^{+/-}}-Maus wurden exemplarisch fotografiert.

Ergebnisse

Wie aus Abbildung 3.4 hervorgeht, weisen $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Mäuse eine sichtbare Splenomegalie auf. Außerdem sind die Lymphknoten der Tiere leicht vergrößert. Die Vergrößerung der peripheren lymphatischen Organe spiegelt sich noch deutlicher in einer erhöhten Gesamtzellzahl in diesen Organen wider. Die Gesamtzellzahl der unterschiedlichen lymphatischen Organe aus $CK2\beta^{Treg+/+}$ - und $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Mäuse sind daher in Abbildung 3.5 aufgeführt.

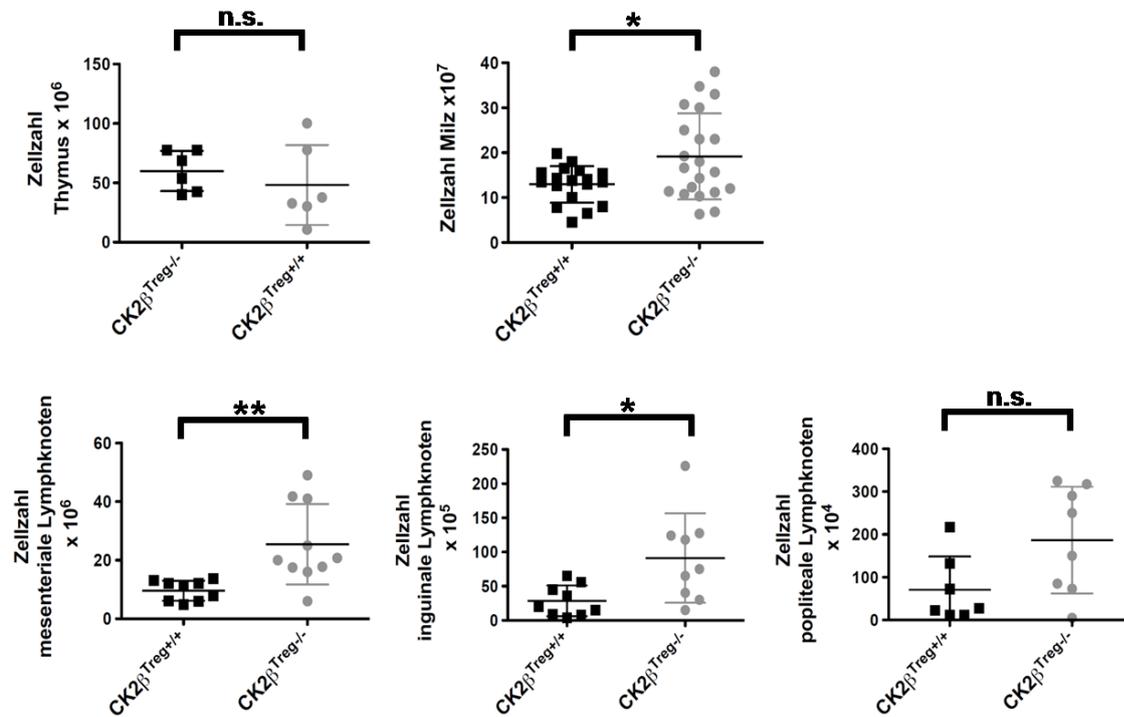


Abbildung 3.5: Die Zellzahlen in den peripheren lymphatischen Organen von $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Tieren sind erhöht. Thymi, Milzen sowie popliteale, inguinale und mesenteriale Lymphknoten von 8-14 Wochen alten $CK2\beta^{Treg+/+}$ - und $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Mäusen wurden präpariert. Aus den zentralen (Thymus) und peripheren lymphatischen Organen (Milz und Lymphknoten) wurden Einzelzellsuspensionen hergestellt (siehe Abschnitte 2.11.1-2.11.3) und die Zellzahl in den verschiedenen Organen bestimmt. Die Milzen wurden zuvor einer hypotonen Erythrozytenlyse unterzogen.

Abbildung 3.5 macht neben einer Zunahme der Zellzahlen in Milzen und Lymphknoten von $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Mäusen deutlich, dass von diesem Effekt nur die peripheren lymphatischen Gewebe betroffen sind. Der Thymus von $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Mäusen als zentrales lymphatisches Organ weist keine Veränderungen im Vergleich zu den wildtypischen Kontrolltieren auf. Zudem fällt weiter auf, dass in besonderem Maße die mesenterialen Lymphknoten von der Zunahme der Zellzahlen in den peripheren lymphatischen Organen von $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Tieren betroffen sind. Mesenteriale Lymphknoten sind, wie auch aus Abbildung 1.1 hervorgeht, die drainierenden Lymphknoten des Darms. Um diesen Befund nun weiter zu charakterisieren wurden in Abschnitt 3.3.2 zunächst die Thymi von wildtypischen $CK2\beta^{Treg+/+}$ - und $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Mäusen genauer untersucht.

3.3.2 Die T-Zellentwicklung im Thymus von $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Mäusen verläuft normal

Die in Abschnitt 3.3.1 beschriebene Vergrößerung der peripheren lymphatischen Organe könnte potentiell auf eine fehlerhafte Entwicklung der Tregs in $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Mäusen zurückzuführen sein. Um dies zu überprüfen wurden Thymi von $CK2\beta^{Treg+/+}$ - und wildtypischen $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Tieren mittels Durchflusszytometrie genauer untersucht. Auf die verschiedenen Entwicklungsstadien der T-Zellen wurde bereits in Abschnitt 1.3 des Einleitungsteils eingegangen. Abbildung 3.6 zeigt das Resultat dieser Analyse.

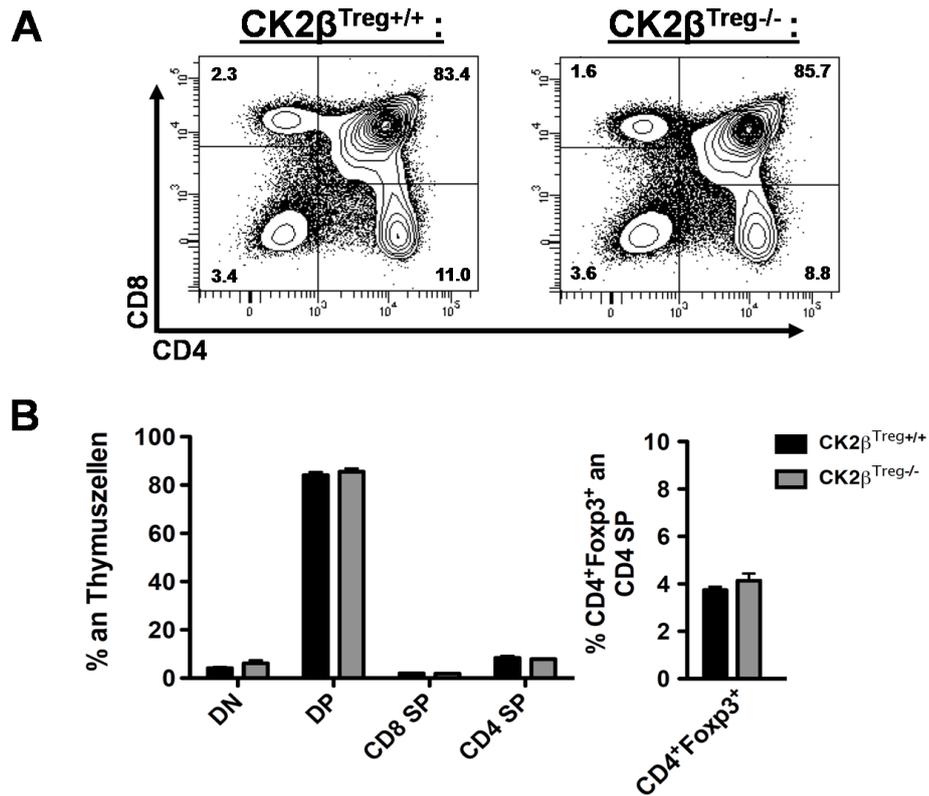


Abbildung 3.6: Die T-Zellentwicklung im Thymus von CK2β^{Treg-/-} Mäusen verläuft normal. Thymi von 6-10 Wochen alten CK2β^{Treg+/-} und CK2β^{Treg-/-}-Mäusen wurden präpariert. Aus den Thymi wurden gemäß Abschnitt 2.11.1 Einzelzellsuspensionen hergestellt, die mit Antikörpern gegen die Oberflächenmarker CD4 und CD8 sowie intrazellulär gegen Foxp3 gefärbt und mittels Durchflusszytometrie untersucht wurden. **A** Durchflusszytometrische Darstellung der Oberflächenmarker CD8 gegen CD4 auf Thymozyten von CK2β^{Treg+/-} und wildtypischen CK2β^{Treg-/-}-Tieren. **B** Prozentuale Anteile der verschiedenen T-Zellentwicklungsstadien (CD4/CD8 doppelt Negative (DN), doppelt Positive (DP), CD4 und CD8 Einzelpositive (SP)) an den gesamten Thymozyten, sowie der Anteil der CD4⁺Foxp3⁺ Tregs an den CD4 Einzelpositiven T-Zellen.

Wie aus Abbildung 3.6 hervorgeht weisen CK2β^{Treg-/-}-Mäuse eine normale T-Zellentwicklung im Thymus auf. Es sind keine Unterschiede in den verschiedenen Entwicklungsstadien CD4/CD8 doppelt negativer (DN), CD4/CD8 doppelt positiver (DP), sowie CD4 und CD8 einzelpositiver (SP) T-Zellen zu erkennen. Von Bedeutung sind zudem die in Abbildung 3.6 B dargestellten Anteile der CD4⁺Foxp3⁺ Tregs an den CD4 Einzelpositiven T-Zellen. Dass die Anteile dieser CD4⁺Foxp3⁺ Tregs in CK2β^{Treg+/-}- und CK2β^{Treg-/-}-Mäusen gleich sind, ist ein starkes Indiz dafür, dass sich die Tregs in CK2β^{Treg-/-}-Mäusen normal entwickeln und dass sich der Defekt nicht auf die Frequenz dieser Zellen im Thymus auswirkt. Der nächste Schritt bestand daher in der Untersuchung der Tregs in der Peripherie, der in Abschnitt 3.3.3 beschrieben ist.

3.3.3 Milzen von $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Mäusen zeigen eine normale Zusammensetzung an verschiedenen Immunzellen

In Abschnitt 3.3.2 konnte festgestellt werden, dass die Entwicklung der T-Zellen insbesondere der Tregs in $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Mäusen normal verläuft. Als Erklärung für die Hypertrophie der peripheren lymphatischen Organe kann eine fehlerhafte Entwicklung der Tregs somit ausgeschlossen werden. Um ein fehlerhaftes Auswandern der Tregs aus dem Thymus oder eine defekte Treg-Homöostase in der Peripherie auszuschließen, wurden die Milzen von $CK2\beta^{Treg+/+}$ - und $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Mäusen genauer analysiert. Außerdem sollten weitere Erkenntnisse über einen möglichen Zusammenhang zwischen der Vergrößerung der peripheren lymphatischen Organe und dem Beitrag einzelner Immunzellpopulationen gewonnen werden. Hierzu wurden Milzen von $CK2\beta^{Treg+/+}$ - und $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Mäusen hinsichtlich der Frequenz verschiedener Immunzellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abbildung 3.7 aufgeführt.

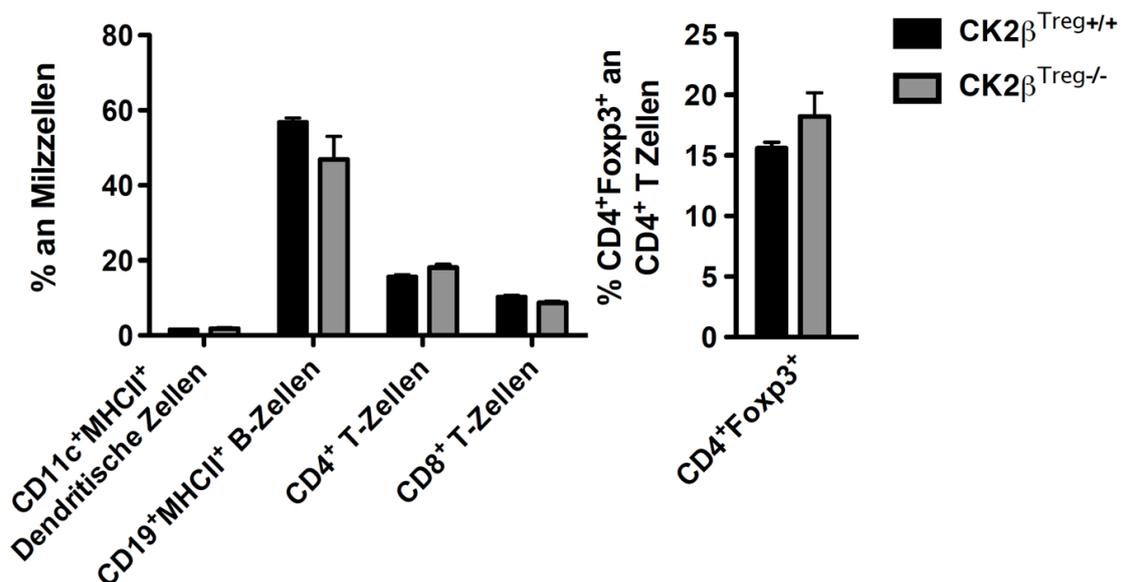


Abbildung 3.7: Milzen von $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Mäusen zeigen eine normale Zusammensetzung an verschiedenen Immunzellen.

Milzen von 6-11 Wochen alten $CK2\beta^{Treg+/+}$ - und $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Mäusen wurden präpariert. Aus den Milzen wurden Einzelzellsuspensionen hergestellt und die Erythrozyten lysiert (siehe Abschnitt 2.11.3). Die Zellsuspensionen wurden darauffolgend mit Antikörpern gegen die Oberflächenmarker CD11c, MHCII, CD19, CD4 und CD8 sowie intrazellulär gegen Foxp3 gefärbt und mittels Durchflusszytometrie untersucht. Dargestellt ist die prozentuale Verteilung von $CD11c^+MHCII^+$ Dendritischen Zellen, $CD19^+MHCII^+$ B-Zellen sowie CD4 und CD8 positiven T-Zellen in der Milz, sowie der Anteil der $CD4^+Foxp3^+$ Tregs an den CD4 positiven T-Zellen.

Ergebnisse

Insgesamt zeigen $CK2\beta^{Treg^{-/-}}$ -Mäuse keine gravierenden Veränderungen in der Verteilung von Dendritischen Zellen, B-Zellen, sowie $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen in der Milz. $CK2\beta^{Treg^{-/-}}$ -Mäuse weisen lediglich eine leichte Reduktion des B-Zellkompartiments auf. Zusätzlich ist der Anteil an $CD4^+$ T-Zellen in $CK2\beta^{Treg^{-/-}}$ -Mäusen im Vergleich zu den wildtypischen Kontrolltieren geringfügig erhöht. Außerdem demonstriert Abbildung 3.7, dass $CK2\beta^{Treg^{-/-}}$ -Tiere in der Milz einen unveränderten Anteil $CD4^+Foxp3^+$ Tregs an den $CD4^+$ T-Zellen aufweisen. Die Vergrößerung der peripheren lymphatischen Organe in $CK2\beta^{Treg^{-/-}}$ -Tieren ist demnach nicht auf die Expansion eines einzelnen Zelltyps zurückzuführen. Wie die Ergebnisse zeigen, sind zudem sowohl die Entwicklung der Tregs (siehe Abschnitt 3.3.2), als auch deren Homöostase sowie ihr Migrationsvermögen in die Körperperipherie durch die Defizienz der $CK2\beta$ unbeeinflusst. Die Hypertrophie der Lymphknoten und Milzen in $CK2\beta^{Treg^{-/-}}$ -Mäusen deutet stattdessen auf eine gesteigerte Proliferation der Immunzellen infolge einer unkontrollierten Aktivierung der Zellen hin. Im folgenden Abschnitt 3.3.4 exemplarisch der Aktivierungsstatus der T-Zellen in $CK2\beta^{Treg^{-/-}}$ -Mäusen genauer untersucht werden.

3.3.4 T-Zellen in $CK2\beta^{Treg^{-/-}}$ -Tieren besitzen einen aktivierten T-Zell Phänotyp

In den vorherigen Abschnitten 3.3.2 und 3.3.3 wurde festgestellt, dass die Deletion der $CK2\beta$ in Tregs keinen Einfluss auf deren Entwicklung sowie Homöostase und Migrationsverhalten besitzt. Von der Deletion der $CK2\beta$ können jedoch nur $Foxp3$ exprimierende Zellen betroffen sein. Dennoch weisen $CK2\beta^{Treg^{-/-}}$ -Mäuse eine Hypertrophie der peripheren lymphatischen Organe auf, die daher auf einem Defekt der suppressiven Eigenschaften der Tregs basieren muss. Diese mangelhafte Suppression würde sich vor Allem durch einen gesteigerten Aktivierungsstatus der Immunzellen bemerkbar machen. Da die Suppression der Aktivierung von T-Zellen einen entscheidenden Teil der Treg-vermittelten Suppression ausmacht, sollte daher exemplarisch der Aktivierungsstatus der T-Zellen in $CK2\beta^{Treg^{-/-}}$ -Mäusen genauer untersucht werden. Dieser wurde anhand der Oberflächenmarker $CD62L$ für naive T-Zellen und $CD44$ für Effektor-T-Zellen im Kompartiment der $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen in den Milzen von $CK2\beta^{Treg^{-/-}}$ -Mäusen mittels Durchflusszytometrie untersucht. Abbildung 3.8 zeigt das Ergebnis dieser Analyse.

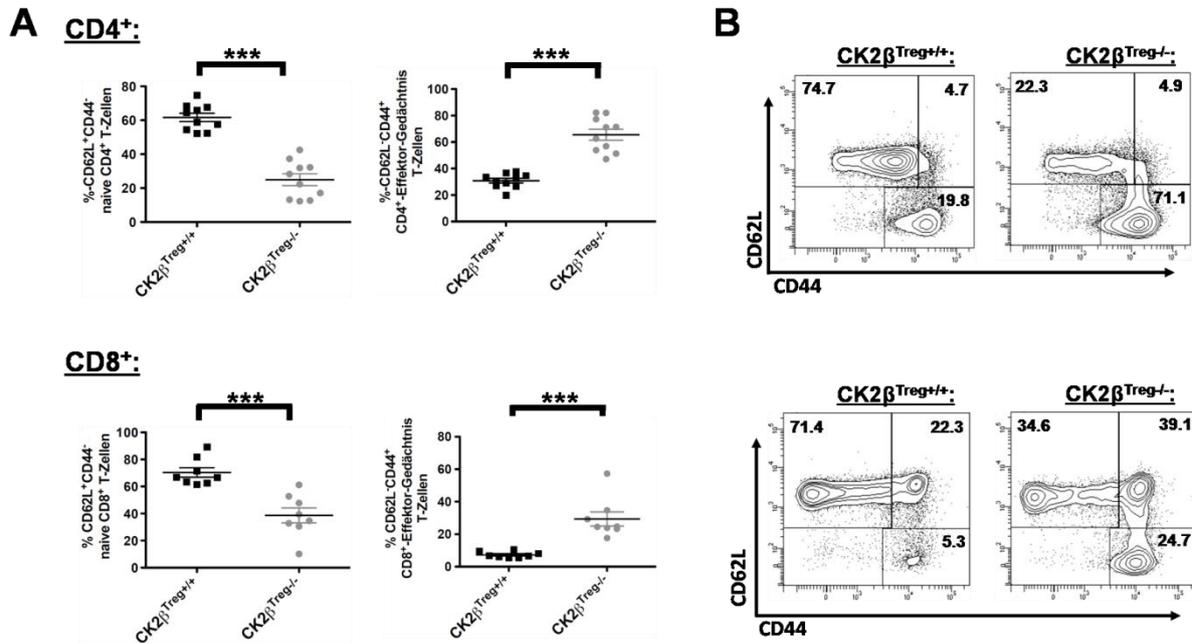


Abbildung 3.8: T-Zellen in $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Tieren besitzen einen stark aktivierten T-Zell Phänotyp. Milzen von 8-15 Wochen alten $CK2\beta^{Treg-/-}$ und $CK2\beta^{Treg+/+}$ -Mäusen wurden präpariert. Aus den Milzen wurden Einzelzellsuspensionen hergestellt und die Erythrozyten lysiert (siehe Abschnitt 2.11.3). Die Zellsuspensionen wurden anschließend mit Antikörpern gegen die Oberflächenmarker CD4, CD8, CD62L und CD44 gefärbt und per Durchflusszytometer analysiert. **A** Prozentuale Verteilung naiver $CD62L^+CD44^-CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen sowie $CD62L^-CD44^+CD4^+$ und $CD8^+$ Effektor-Gedächtnis T-Zellen in den Milzen von je 7-10 $CK2\beta^{Treg+/+}$ und $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Mäusen. **B** Exemplarische durchflusszytometrische Abbildung der Marker CD62L gegen CD44 von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen je einer $CK2\beta^{Treg+/+}$ und $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Maus.

Abbildung 3.8 zeigt eindeutig einen erhöhten Aktivierungsstatus der T-Zellen in $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Mäusen. Die Tiere weisen im Kompartiment der $CD4^+$ wie auch $CD8^+$ T-Zellen einen deutlich erhöhten Anteil der $CD62L^-CD44^+$ Effektor-Gedächtniszellen auf. Außerdem lassen sich in beiden T-Zellkompartimenten erheblich weniger $CD62L^+CD44^-$ naive T-Zellen finden. Basierend auf diesen Ergebnissen sollte überprüft werden, ob der erhöhte Aktivierungsstatus der T-Zellen in $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Mäusen auch zu einer gesteigerten Zytokinproduktion der Zellen führt. Hierzu wurden verschiedene Lymphknoten und Milzen aus $CK2\beta^{Treg+/+}$ und $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Tieren präpariert und Einzelzellsuspensionen dieser Organe angefertigt. Gleiche Mengen dieser Zellsuspensionen wurden darauf mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern beladenen Beads stimuliert. Von den stimulierten Zellkulturen wurden anschließend Überstände gewonnen, welche mittels ELISA auf die Produktion des Zytokins IFN- γ getestet wurden. Das Resultat des Versuchs ist in Abbildung 3.9 zu finden.

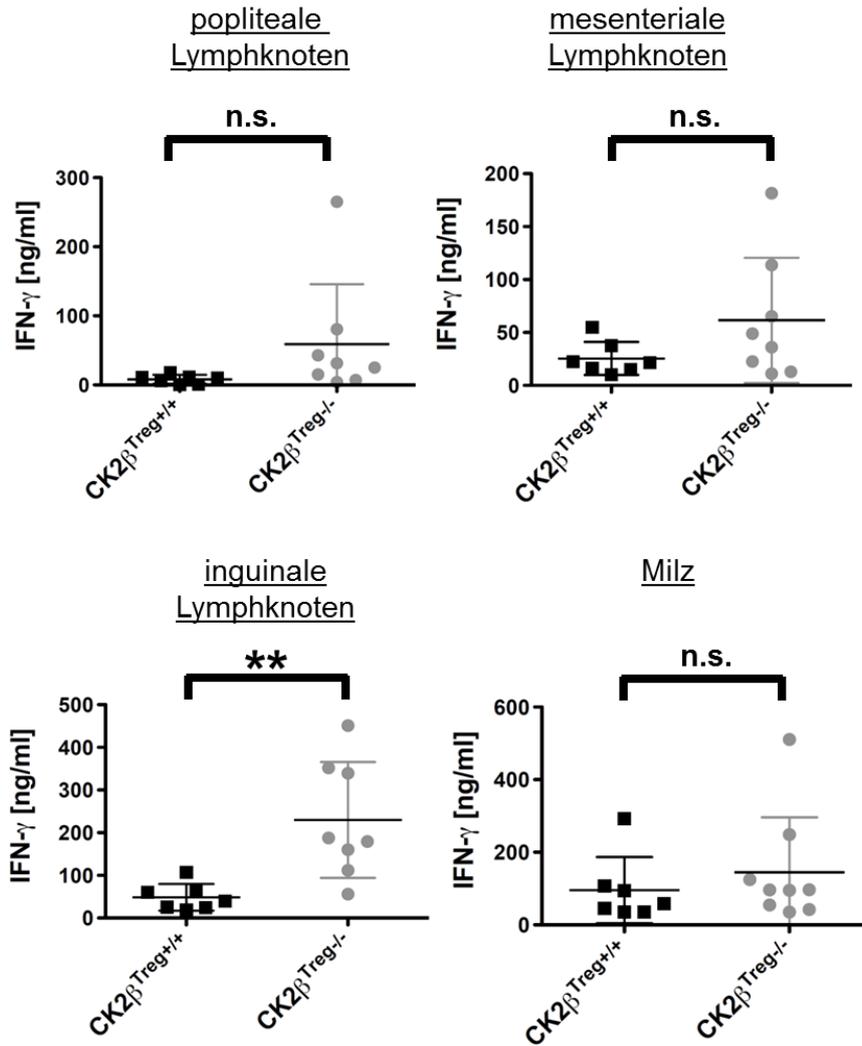


Abbildung 3.9: Die stark aktivierten T-Zellen in CK2β^{Treg-/-}-Tieren produzieren mehr IFN-γ. Milzen, sowie popliteale, inguinale und mesenteriale Lymphknoten von 10-18 Wochen alten CK2β^{Treg-/-}- und CK2β^{Treg+/+}-Mäusen wurden präpariert. Aus den Geweben wurden Einzelzellsuspensionen hergestellt und im Falle der Milzen die Erythrozyten lysiert. Die Zellsuspensionen wurden mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern beladenen Beads stimuliert. Nach 44 h Stimulation wurden Kulturüberstände gewonnen in denen mittels ELISA das Zytokin IFN-γ nachgewiesen wurde.

Aus Abbildung 3.9 geht hervor, dass, nach T-Zell spezifischer Stimulation, die Zellen aus Milzen und Lymphknoten von einem Teil der CK2β^{Treg-/-}-Mäuse mehr IFN-γ produzieren, als die Zellen der wildtypischen Kontrolltiere. Bezüglich der inguinalen Lymphknoten bildet eine signifikante Anzahl von CK2β^{Treg-/-}-Mäusen eine erhöhte Konzentration an IFN-γ. Zu dieser erhöhten IFN-γ Produktion nach TZR-basierter Stimulation tragen neben Th1 Zellen im wesentlichen CD8⁺ T-Zellen bei. Neben IFN-γ wurde zusätzlich die Konzentration des Zytokins IL-4 in den Kulturüberständen bestimmt, wobei das *ex vivo* schwer nachzuweisende IL-4 im ELISA nicht detektiert werden konnte. Zu den nach TZR-basierter Stimulation IL-4-produzierenden Zellen in Milz und Lymphknoten können jedoch im wesentlichen nur Th2-Zellen gezählt werden. Insgesamt belegen die in den Abbildung 3.8 und

Abbildung 3.9 dargelegten Ergebnisse den aktivierten Phänotyp der T-Zellen aus $CK2\beta^{Treg/-}$ -Mäusen. Trotz der gravierenden Differenzen in der Zahl der Effektor-Gedächtnis T-Zellen sind die aus Abbildung 3.9 hervorgehenden Unterschiede in der Produktion von $IFN-\gamma$ jedoch nicht sehr deutlich. Aus diesem Grund sollten speziell die $CD4^+CD62L^-$ -Effektor-Gedächtnis T-Zellen in $CK2\beta^{Treg/-}$ -Mäusen näher charakterisiert werden. Der folgende Abschnitt 3.4 geht explizit auf die Untersuchung dieser Effektor-Gedächtnis T-Zellen ein.

3.4 Der aktivierte T-Zell Phänotyp in $CK2\beta^{Treg/-}$ -Mäusen ist verschoben in Richtung einer Th2-vermittelten Immunantwort

Im vorherigen Abschnitt 3.3.4 konnte eine gesteigerte Aktivierung der T-Zellen in $CK2\beta^{Treg/-}$ -Mäusen festgestellt werden. Diese Aktivierung basierte auf einer veränderten Expression der Aktivierungsmarker CD44 und CD62L und der damit verbundenen vergrößerten T-Zellsubpopulation an $CD44^+CD62L^-$ -Effektor-Gedächtniszellen. Ferner produzierten die Zellen von einem Teil der $CK2\beta^{Treg/-}$ -Mäuse nach T-Zell spezifischer Stimulation *ex vivo* geringfügig mehr $IFN-\gamma$. Die Ergebnisse deuten also auf eine unkontrollierte Immunreaktion in $CK2\beta^{Treg/-}$ -Mäusen hin, die nicht durch den Kontakt der Tiere mit einem pathogenen Erreger ausgelöst wird. Um diese unkontrollierte Immunreaktion näher zu charakterisieren sollten daher die $CD4^+CD62L^-$ -Effektor-Gedächtnis T-Zellen der $CK2\beta^{Treg/-}$ -Tiere genauer untersucht werden. Die Analyse dieser T-Zellen sollte Aufschluss darüber geben, ob die Effektor-Gedächtnis T-Zellen in $CK2\beta^{Treg/-}$ -Mäusen präferentiell zur Differenzierung zu einem bestimmten T-Helferzelltypus tendieren. Auf diese Weise sollte die Natur der in $CK2\beta^{Treg/-}$ -Mäusen beobachteten Immunreaktion aufgedeckt werden. Dazu wurden $CD4^+$ T-Zellen aus den Milzen von $CK2\beta^{Treg/+}$ -Kontrolltieren und $CK2\beta^{Treg/-}$ -Mäusen mittels MACS isoliert (siehe Abschnitt 2.12.2). Aus diesen $CD4$ vorgereinigten Zellsuspensionen wurden $CD4^+CD62L^-$ Effektor-Gedächtnis T-Zellen gemäß Abschnitt 2.12.3 durch durchflusszytometrische Zellsortierung isoliert. Die gewonnenen $CD4^+CD62L^-$ Zellen wurden, auf einer mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern beschichteten Mikrotiterplatte für 18 h und 72 h stimuliert. Zu diesen Zeitpunkten wurden Kulturüberstände gewonnen. Zusätzlich wurden die Zellen per durchflusszytometrischer Analyse auf die Expression verschiedener T-Helferzell-spezifischer Zytokine und Transkriptionsfaktoren untersucht. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Abbildung 3.10 dargestellt.

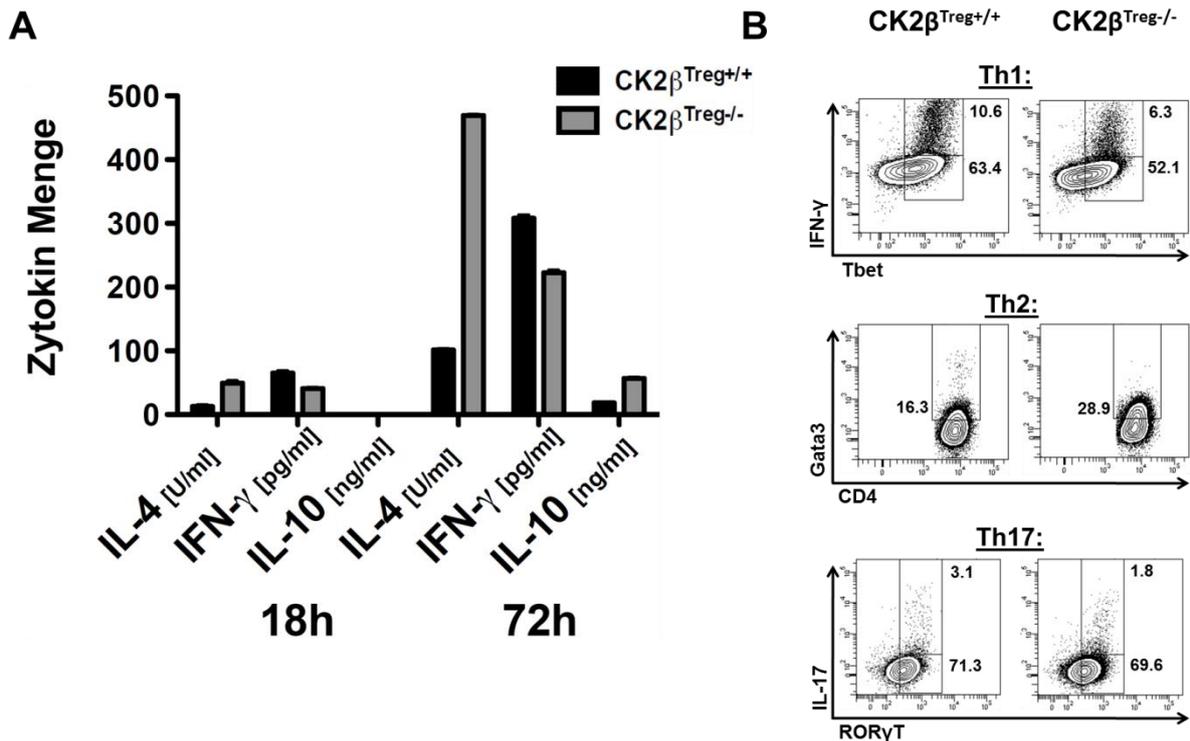


Abbildung 3.10: Der aktivierte T-Zell Phänotyp in CK2β^{Treg-/-}-Mäusen ist verschoben in Richtung einer Th2-vermittelten Immunantwort. Milzen von 7-12 Wochen alten CK2β^{Treg+/+}- und CK2β^{Treg-/-}-Mäusen wurden präpariert. Aus den Milzen wurden entsprechend Abschnitt 2.11.3 Einzelzellsuspensionen hergestellt und die Erythrozyten lysiert. Anschließend wurden CD4⁺ T-Zellen mittels MACS vorangereichert (siehe Abschnitt 2.12.2). Aus diesen CD4⁺ Zellen wurden per durchflusszytometrischer Zellsortierung CD4⁺CD62L⁻-Effektor-Gedächtnis T-Zellen weiter isoliert (nach Abschnitt 2.12.3). Diese wurden darauf für 18 h bzw. 72 h mit Hilfe einer Kombination von anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern stimuliert. **A** Nach 18 h bzw. 72 h wurden Kulturüberstände gewonnen in denen mittels ELISA die Zytokine IL-4 und IL-10, als Beispiele für Th2-spezifische Zytokine, sowie IFN-γ, als Beispiel eines Th1-spezifischen Zytokins, nachgewiesen wurden (1 U IL-4 entspricht 100 pg). **B** Nach 18 h Stimulation wurden die Effektor-Gedächtnis T-Zellen hinsichtlich der Expression verschiedener T-Helferzell-spezifischer Zytokine und Transkriptionsfaktoren mittels Durchflusszytometrie untersucht. Im Einzelnen wurden folgende Färbungen unternommen: IFN-γ als Beispiel eines Th1 Zytokins gegen den Th1-spezifischen Transkriptionsfaktor T-bet. Der Th2-spezifische Transkriptionsfaktor Gata-3 gegen den Oberflächenmarker CD4. Das Th17-spezifische Zytokin IL-17 gegen den Th17-spezifischen Transkriptionsfaktor RORγT. Um störende Nebeneffekte auszuschließen wurden alle Proben mit einem Lebend-Tot-Farbstoff, sowie einem Antikörper gegen CD4 gefärbt und auf diese Lebenden CD4⁺ T-Zellen vorselektiert.

Die Resultate in Abbildung 3.10 belegen, dass die stärker aktivierten T-Zellen aus CK2β^{Treg-/-}-Mäusen zu einer Th2-vermittelten T-Helferzellantwort tendieren. So lassen sich in der durchflusszytometrischen Analyse in Abbildung 3.10 B unter den Effektor-Gedächtniszellen aus CK2β^{Treg-/-}-Mäusen weniger IFN-γ produzierende und ebenso weniger T-bet⁺ T-Zellen detektieren. Im Gegensatz dazu ist die Zahl der GATA3⁺ T-Zellen und damit die Zahl der T-Zellen, die zu einer Th2-vermittelten Immunantwort tendieren, erhöht. Ein gleiches Bild zeichnet sich in Abbildung 3.10 A

ab. In den Überständen der T-Zellkultur aus $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Tieren lassen sich verstärkt die Th2 Zytokine IL-4 und IL-10 nachweisen, während weniger $IFN-\gamma$ gebildet wird. Dieses Ergebnis ist auch deshalb überraschend, da der genetische Hintergrund von C57BL/6 Tieren in den meisten Experimentalmodellen die Entwicklung einer Th1-vermittelten Immunantwort begünstigt¹¹⁹. Neben den Ergebnissen, die durch *in vitro* Kultur der T-Zellen (siehe Abbildung 3.10) gewonnen wurden, sollten im Folgenden Experimente durchgeführt werden, welche die Tendenz zu einer verstärkten Th2 Antwort der $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Mäuse *in vivo* belegen können. Hierzu wurde sich die Tatsache zu Nutze gemacht, dass sich Th2-vermittelte Immunreaktionen im Allgemeinen durch eine verstärkte B-Zell-basierende Antikörperproduktion auszeichnen. Außerdem kommt es unter dem Einfluss von Th2-generiertem IL-4 zu einem Wechsel des Antikörper-Isotyps von IgM über IgG1 final zu IgE. Deshalb ist das erhöhte Auftreten von Antikörpern des IgE Isotyps als ein charakteristisches Merkmal einer Th2-vermittelten Immunantwort zu werten. Um also die spontane, gesteigerte Th2 Antwort der $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Mäuse zusätzlich *in vivo* zu belegen, sollten Antikörper des IgE Typs im Blut der Tiere untersucht werden. Daher wurden Seren aus $CK2\beta^{Treg+/+}$ -Kontrolltieren und $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Mäusen gewonnen. Mittels IgE-spezifischem ELISA wurde anschließend die Titer der IgE Antikörper in den Seren der Mäuse bestimmt. Das Resultat des ELISA ist in Abbildung 3.11 dargestellt.

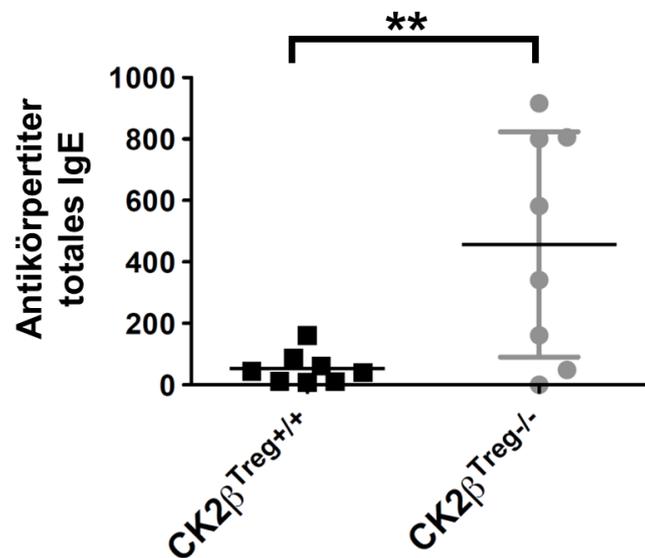


Abbildung 3.11: $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Mäuse zeigen im Blut stark erhöhte IgE Titer. Aus 9-18 Wochen alten $CK2\beta^{Treg+/+}$ -Kontrolltieren und $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Mäusen wurden Seren gewonnen. Mittels IgE-spezifischem ELISA wurden anschließend die Titer der IgE Antikörper in den Seren der Tiere bestimmt.

Abbildung 3.11 bestätigt die vermutete unkontrollierte, Th2-vermittelte Immunreaktion in $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Mäusen *in vivo*. So lassen sich deutlich erhöhte Titer des Antikörper-Isotyps IgE in den

Ergebnisse

Seren der $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Mäusen nachweisen. Dies ist ein klarer Hinweis für einen Th2-vermittelten Antikörperklassenwechsel und damit auf eine Th2-vermittelte Immunreaktion. Zusammenfassend zeigen $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Mäuse also eine starke und unkontrollierte Th2-vermittelte Autoimmunreaktion. Diese Immunreaktion ist gekennzeichnet durch eine Hypertrophie der peripheren lymphatischen Organe mit einer massiven Zunahme der Zahl der in den Organen befindlichen Zellen. Von dieser Hypertrophie sind in besonderem Maße die mesenterialen Lymphknoten, die drainierenden Lymphknoten des Darms, betroffen. Der Darm hingegen stellt, wie z.B. auch die Lunge, eines der mukosalen Organe des Körpers dar. Hier kommt es verstärkt zu Th2-vermittelten Immunantworten. Die unkontrollierte Th2-vermittelte Autoimmunreaktion in $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Mäusen führt ferner zu einer enormen Steigerung des Aktivierungsstatus der T-Zellen und zu einer massiven Expansion des Kompartiment der Effektor-Gedächtnis T-Zellen. Unter diesen Effektor-Gedächtnis T-Zellen finden sich im Vergleich zu den wildtypischen Kontrolltieren zahlreiche Zellen, die charakteristische Merkmale von Th2 Zellen aufweisen. So produzieren diese Zellen größere Mengen der Th2 Zytokine IL-4 und IL-10, und exprimieren in großer Zahl den Th2-spezifischen Transkriptionsfaktor Gata-3. Zusätzlich finden sich im Serum der $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Mäuse erhöhte Titer des Antikörper-Isotyps IgE. Da vom $CK2\beta$ Defekt in $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Mäusen ausschließlich die Tregs betroffen sind, muss die beobachtete Immunreaktion auf einer fehlgesteuerten suppressiven Funktion der Tregs beruhen. Dennoch kommt es in $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Mäusen nicht zur Ausbildung eines letalen autoimmunen Phänotyps, wie z.B. im Falle *Foxp3* defizienter Tiere, die keine funktionsfähigen Tregs besitzen^{71,72}. Möglicherweise bewirkt der $CK2\beta$ Defekt in Tregs von $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Mäusen, dass ihre suppressive Kapazität nur geschwächt ist, so dass sie durchaus noch regulatorische Funktionen ausüben können, wobei diese allerdings weniger effizient sind als in wildtypischen Tregs. Von dieser $CK2$ -abhängigen Dysfunktion ist offensichtlich in besonderem Maße das Vermögen der Tregs zur Suppression von Th2-vermittelten Immunreaktionen betroffen. Um diesen Ansatz zu untermauern sollten die suppressiven Funktionen $CK2\beta$ defizienter Tregs, in einem Th2-basierten Krankheitsmodell *in vivo* untersucht werden. Als solches Th2-basiertes Krankheitsmodell wurde das Modell des murinen *Asthma-bronchiale* gewählt. Der Folgende Abschnitt 3.5 befasst sich mit den Ergebnissen dieser Versuche.

3.5 CK2 β ^{Treg^{-/-}}-Mäuse entwickeln verstärkte Entzündungsreaktionen im Th2-vermittelten Asthma Modell *in vivo*

Im vorherigen Abschnitt 3.4 konnte eine spontane Th2-vermittelte Autoimmunreaktion in CK2 β ^{Treg^{-/-}}-Mäusen nachgewiesen werden. Durch die konditionale genetische Deletion der CK2 β UE in Foxp3 exprimierenden Zellen in diesen Tieren können jedoch ausschließlich die Funktionen der Tregs betroffen sein. Der Verlust der CK2 β UE in Tregs ist demnach direkt für die beobachtete, sublethale Th2-vermittelte Autoimmunreaktion verantwortlich. Um die mangelhafte Suppression von Th2 Antworten durch die Tregs in CK2 β ^{Treg^{-/-}}-Mäusen in einem *in vivo* Modell zu bestätigen, wurden CK2 β ^{Treg^{-/-}}-Tiere sowie wildtypische CK2 β ^{Treg^{+/+}}-Kontrollmäuse, wie in Abschnitt 2.19 beschrieben, einem Asthma Experiment unterzogen. Die folgenden Abschnitte fassen die Ergebnisse dieser Versuche zusammen.

3.5.1 CK2 β ^{Treg^{-/-}}-Tiere zeigen histologisch massive asthmatische Entzündungsreaktionen

Gemäß den Beschreibungen in Abschnitt 2.19.1 wurden wildtypische Kontrolltiere und CK2 β ^{Treg^{-/-}}-Mäuse für ein vergleichendes Asthma-Experiment verwendet. Tiere der sensibilisierten Gruppen wurden dabei an d0 mit einem Ovalbumin/Aluminiumhydroxid Gemisch immunisiert (Sensibilisierung bzw. sens). Zusätzlich wurden CK2 β ^{Treg^{+/+}}- und CK2 β ^{Treg^{-/-}}-Mäusen als unsensibilisierte Kontrollgruppen (unsens) mitgeführt, denen an d0 durch intraperitoneale Injektion 1xPBS appliziert wurde. Die Tiere aller Versuchsgruppen wurden zusätzlich an d15 und d16 mit vernebeltem Ovalbumin behandelt. Dabei wird das Ovalbumin beim Einatmen präferentiell über die Atemwege aufgenommen und sorgt so für die Entstehung einer Immunreaktion in der Lunge der immunisierten Tiere, die zu weiten Teilen Th2-vermittelte Charakteristika zeigt. An d18 wurden die Versuchstiere präpariert, wobei auch histologische Schnitte der Lungen angefertigt wurden. Von diesen Schnitten wurden wie in Abschnitt 2.19.2 erläutert HE- und PAS-Färbungen hergestellt. Anhand dieser Färbungen wurde die Infiltration von Entzündungszellen in die Lunge (HE-Färbung), sowie eine pathologische, erhöhte Schleimproduktion des Lungenepithels, und etwaige Becherzellmetaplasien (PAS-Färbung) sichtbar gemacht. Abbildung 3.12 fasst die pathologischen Veränderungen in den Lungen der Versuchstiere zusammen. Das Ausmaß der Infiltration von Entzündungszellen in die Lunge wurde anhand eines „lung inflammation score“ bestimmt. Die Schleimproduktion ist durch die Zahl der schleimproduzierenden, PAS⁺ Zellen/mm Bronchus angegeben. Zudem sind für HE- und PAS-Färbung repräsentative Bilder je einer Versuchsmaus pro Gruppe dargestellt.

Ergebnisse

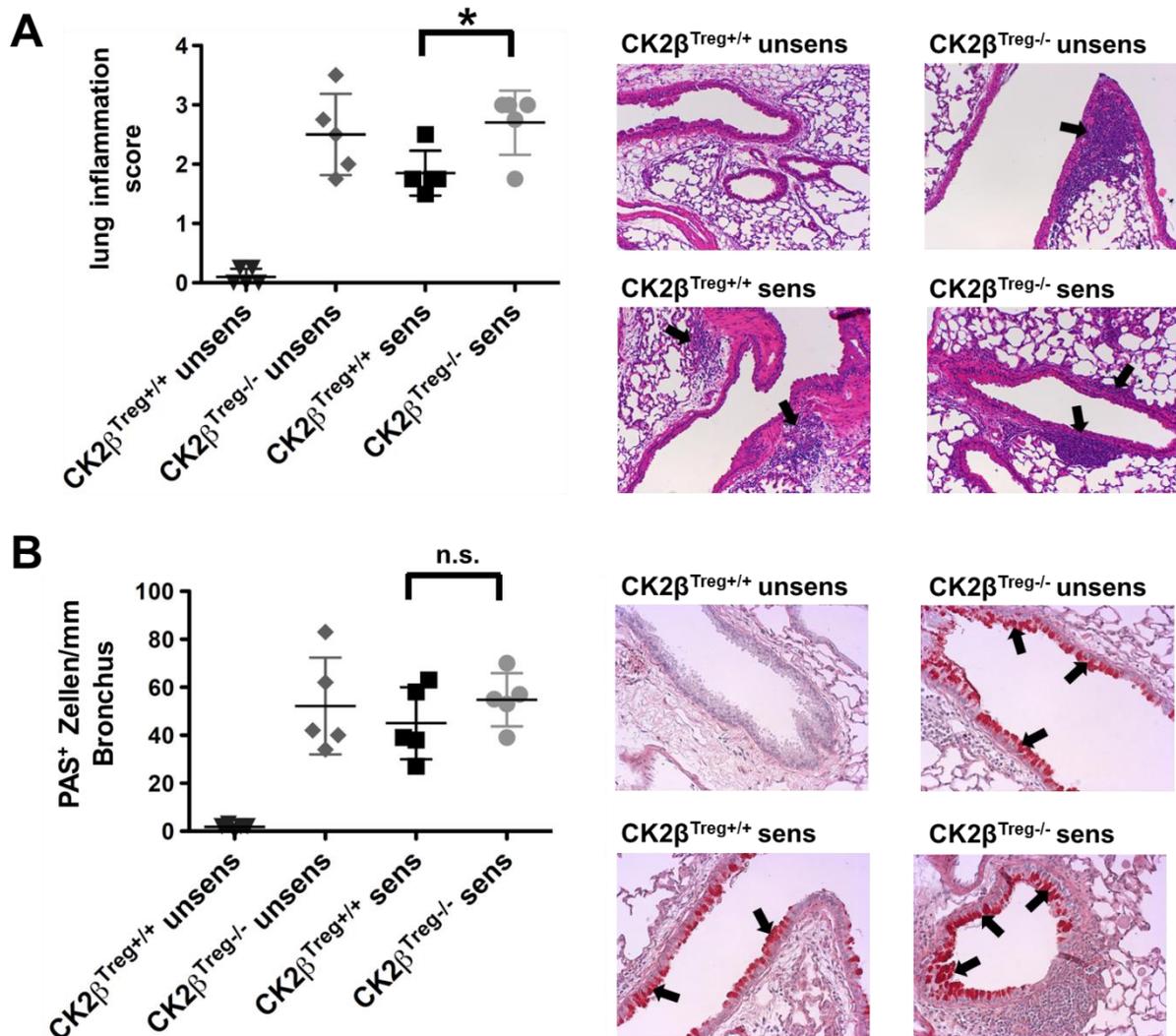


Abbildung 3.12: CK2β^{Treg-/-} Mäuse zeigen eine massive Infiltration von Entzündungszellen und weisen eine erhöhte Schleimproduktion in der Lunge auf. Gemäß der Anleitung in Abschnitt 2.19.1 wurden wildtypische Kontrolltiere und CK2β^{Treg-/-} Mäuse einem Asthma-Experiment unterzogen und wie in Abschnitt 2.19.2 beschrieben Lungenschnitte der einzelnen Versuchstiere angefertigt und gefärbt. **A** Infiltration von Entzündungszellen in die Lunge anhand einer HE-Färbung. Der Grad der Infiltration an Entzündungszellen wurde für jede Maus nach einem Scoring System (0=keine Infiltrate bis 4=massive Infiltration) bewertet. Zusätzlich sind für jede Gruppe repräsentative Fotos abgebildet. Schwarze Pfeile heben die violett gefärbte Infiltration von Entzündungszellen in die Lunge hervor. **B** PAS Färbung der Lungenschnitte unsensibilisierter (unsens) und sensibilisierter (sens) CK2β^{Treg-/-} Mäuse und wildtypischer CK2β^{Treg+/+} Tiere. Die pathologische Schleimproduktion ist als Zahl der PAS⁺, also Mucus produzierenden Zellen/mm Bronchus aufgeführt. Außerdem sind exemplarisch Fotos der Lungenschnitte für je ein Tier pro Gruppe abgebildet. Schwarze Pfeile heben die rot/bräunlich gefärbten PAS⁺ Zellen hervor.

Aus Abbildung 3.12 A geht zunächst hervor, dass die Gruppe der unsensibilisierten CK2β^{Treg+/+}-Mäuse keine pathologische Infiltrationen aufweisen. Im Vergleich hierzu zeigen die sensibilisierten CK2β^{Treg+/+}-Kontrolltiere eine starke Infiltration von Entzündungszellen in der Lunge. In dem verwendeten Modell lässt sich demnach eine gezielte Immunreaktion in der Lunge hervorrufen.

Gemessen an der Infiltration von Entzündungszellen fällt diese Immunreaktion in $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Mäusen sogar deutlich höher aus. So zeigen sensibilisierte $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Mäuse signifikant mehr Lungeninfiltrate. Im Vergleich hierzu lassen sich in unsensibilisierten $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Mäusen ebenso starke Infiltrationen von Entzündungszellen nachweisen, die zum Teil sogar stärker als in sensibilisierten Kontrolltieren ausfallen. Abbildung 3.12 B bestätigt die Beobachtungen aus Teil A für die pathologische Produktion von Mucus in den Tieren. Auch hier kommt es durch das Asthma-Protokoll zu einer erhöhten Mucusproduktion in den sensibilisierten Kontrollmäusen. Sensibilisierte $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Mäuse weisen jedoch auch hier im Vergleich zu sensibilisierten wildtypischen Tieren eine tendenziell höhere Mucusproduktion auf. Auffällig ist auch hier, dass unsensibilisierte $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Mäuse bereits eine massive pathologische Mucusproduktion des Lungenepithels zeigen. Als nächstes sollten die Zellen näher charakterisiert werden, die durch die Induktion des Asthmas in die Lunge einwandernden. Hierdurch sollten etwaige Prävalenzen für die Infiltration eines bestimmten Zelltyps in die Lunge aufgedeckt werden. Den Versuchstieren wurden daher, gemäß Abschnitt 2.19.3 Zellen, eine bronchoalveoläre Lavage (BAL) entnommen. Dabei werden die im Lungenlumen befindlichen Zellen aus der Lunge gespült und nach einem Zytospin[§] anhand ihrer charakteristischen Zellmorphologie im Lichtmikroskop identifiziert. Die Ergebnisse der Analyse der BAL sind in Abbildung 3.13 zusammengefasst.

[§] Zytospin: Zentrifugation von Zellen auf einen Objektträger mit anschließender HE-Färbung (siehe auch Abschnitt 2.19.3)

Ergebnisse

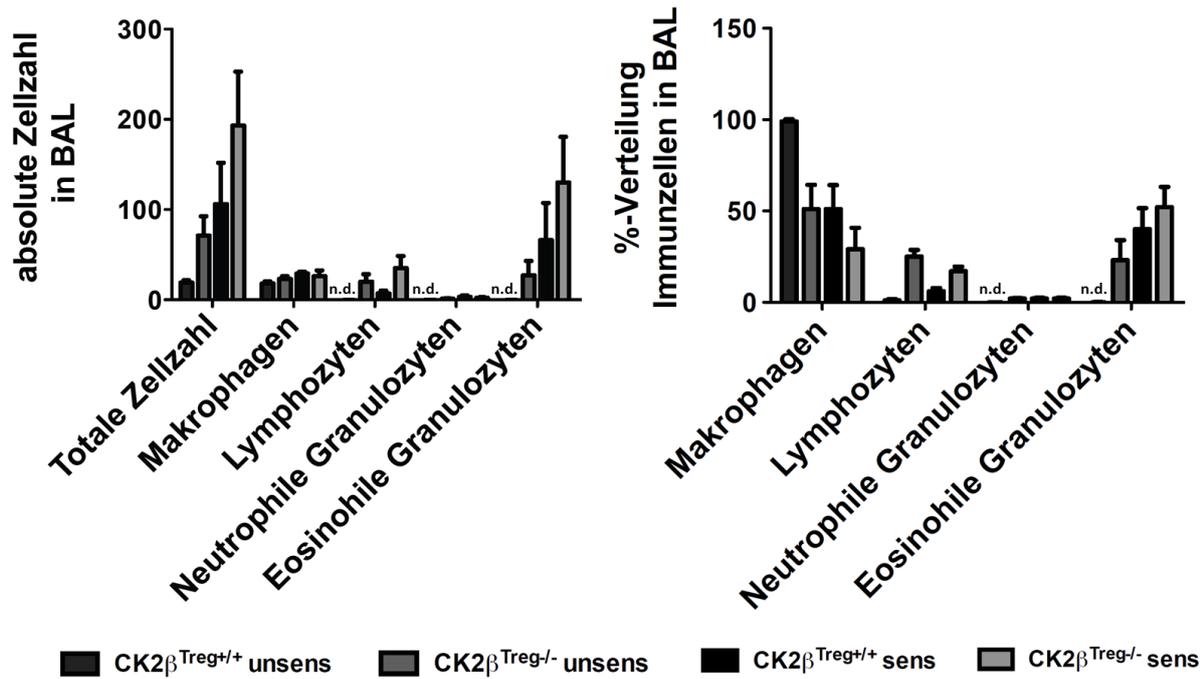


Abbildung 3.13: Die bronchoalveoläre Lavage von $CK2\beta^{Treg-/-}$ Mäusen enthält zahlreiche infiltrierte Entzündungszellen. Gemäß der Anleitung in Abschnitt 2.19.1 wurden wildtypische Kontrolltiere und $CK2\beta^{Treg-/-}$ Mäuse einem vergleichenden Asthma-Experiment unterzogen. Wie in Abschnitt 2.19.3 beschrieben wurde die Lunge der Tiere durch bronchoalveoläre Lavage (BAL) gespült. Die Zellen wurden mittels Cytospin auf einem Objektträger fokussiert, fixiert und einer HE-Färbung unterzogen. Bis zu 200 Zellen der BAL wurden ausgezählt und der jeweilige Zelltyp anhand ihrer charakteristischen Morphologie bestimmt. Dargestellt sind die absolute und prozentuale Verteilung der Zellen in der BAL der Versuchsmäuse aus den verschiedenen Gruppen (n.d. $\hat{=}$ nicht detektierbar).

Wie Abbildung 3.13 zeigt, lassen sich in der BAL unsensibilisierter $CK2\beta^{Treg+/+}$ -Kontrollmäuse nur eine geringe Anzahl an Zellen nachweisen, die hauptsächlich alveoläre Makrophagen repräsentieren. Durch Sensibilisierung kommt es in den wildtypischen Kontrolltieren jedoch zu einem verstärkten Einwandern eosinophiler Granulozyten und weniger Lymphozyten ins Lungenlumen der Tiere. Im Vergleich hierzu zeigen bereits unsensibilisierte $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Mäuse eine erhöhte Zahl an Zellen in der BAL, unter denen sich eosinophile Granulozyten und im besonderen Maße Lymphozyten identifizieren lassen. Durch die vorherige Sensibilisierung kommt es jedoch in $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Mäusen zu einer weiter gesteigerten Infiltration von Zellen ins Lungenlumen der Tiere. Diese fällt zudem bedeutend stärker aus als in sensibilisierten $CK2\beta^{Treg+/+}$ -Mäusen. Im Falle der sensibilisierten $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Mäuse lassen sich unter den Zellen in der BAL neben erneut zahlreichen Lymphozyten auch massive Anteile eosinophiler Granulozyten ausmachen. Zusammenfassend zeigen sensibilisierte $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Mäuse eine massive Entzündungsreaktion in der Lunge, einhergehend mit einer erhöhten Schleimproduktion des Lungenepithels. Diese pathologischen Veränderungen fallen zudem größer aus als in sensibilisierten $CK2\beta^{Treg+/+}$ -Kontrolltieren. Auffallend ist zudem, dass bereits

unsensibilisierte CK2 $\beta^{\text{Treg}^{-/-}}$ -Mäuse, im Vergleich zu unsensibilisierten Kontrolltieren, bereits starke Entzündungsmerkmale in der Lunge aufweisen. Im folgenden Abschnitt sollte nun weiter festgestellt werden, inwieweit die beobachtete Entzündung auf eine erhöhte Th2-vermittelte Immunreaktion zurückzuführen ist.

3.5.2 Gesteigerte Produktion von Th2 Zytokinen in asthmatischen CK2 $\beta^{\text{Treg}^{-/-}}$ -Mäusen

Zuvor in Abschnitt 3.5.1 wurde eine pathologische Entzündungsreaktion in sensibilisierten Versuchstieren festgestellt. Diese Entzündungsreaktion war im Falle der CK2 $\beta^{\text{Treg}^{-/-}}$ -Mäuse wesentlich stärker ausgeprägt als in den wildtypischen Kontrolltieren. Zudem konnten bereits in unsensibilisierten CK2 $\beta^{\text{Treg}^{-/-}}$ -Mäusen pathologische Veränderungen in der Lunge nachgewiesen werden. Dabei kann die beobachtete Präsenz von eosinophilen Granulozyten in der BAL der Versuchstiere bereits als Indiz für eine Th2-vermittelte Immunreaktion gewertet werden. Um diesen Befund jedoch weiter zu untermauern, sollte zudem die antigenspezifische Produktion verschiedener Zytokine in den betroffenen Organen, den trachealen Lymphknoten und der Lunge (Daten nicht gezeigt), analysiert werden. Als Kontrollorgan wurde zusätzlich die Zytokinproduktion in den Milzen der Versuchstiere (Daten nicht gezeigt) untersucht. Ein besonderer Fokus wurde dabei auf die Produktion von Zytokinen in den trachealen Lymphknoten gelegt, da in diesen die Immunreaktionen in der Lunge koordiniert werden. Hierzu wurden tracheale Lymphknoten von Versuchstieren aller Gruppen entnommen und gemäß den Erläuterungen in Abschnitt 2.11.2 zu Einzelzellsuspensionen verarbeitet. Die Einzelzellsuspensionen wurden darauffolgend mit und ohne das Antigen Ovalbumin, gemäß Abschnitt 2.19.5, für drei Tage stimuliert. Anschließend wurden die Kulturüberstände der Zellen gewonnen und in diesen die Th2-spezifischen Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13, sowie das Th1-spezifische Zytokin IFN- γ mittels ELISA nachgewiesen. Um dabei auf die antigenspezifische Zytokinproduktion zu schließen, wurde die etwaige, bei der *ex vivo* Kultur ohne Ovalbumin gemessene Zytokinkonzentration, von der Konzentration an Zytokinen in der Kultur mit Ovalbumin abgezogen. Die Ergebnisse der ELISA sind in Abbildung 3.14 zusammengefasst.

Ergebnisse

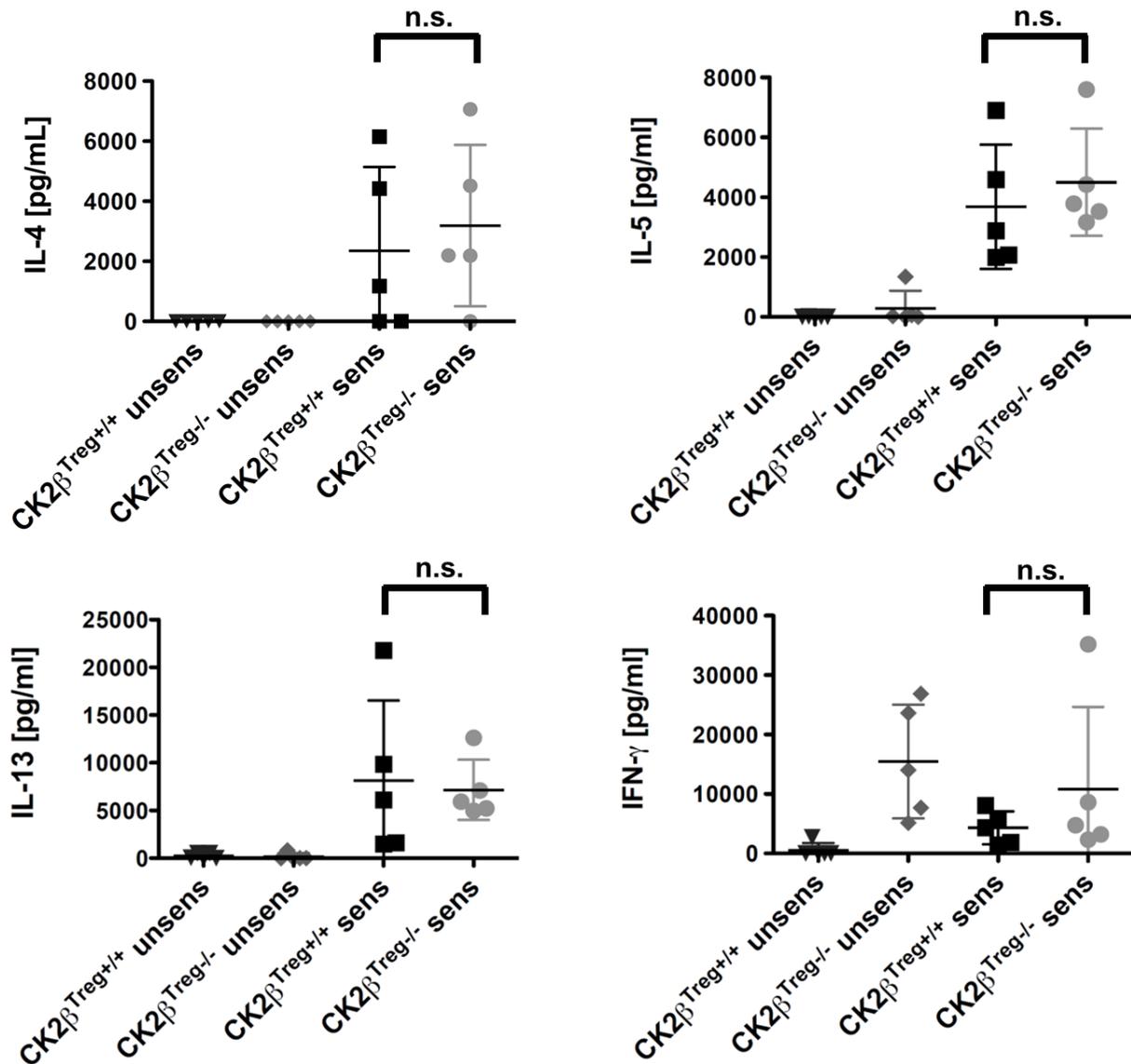


Abbildung 3.14: Zellen aus trachealen Lymphknoten asthmatischer CK2 β ^{Treg-/-}-Mäuse produzieren vermehrt Th2 Zytokine. Gemäß der Anleitung in Abschnitt 2.19.1 wurden wildtypische Kontrollmäuse und CK2 β ^{Treg-/-}-Mäuse einem Asthma-Experiment unterzogen. Die trachealen Lymphknoten aller Versuchstiere wurden getrennt voneinander gemäß der Anleitung in Abschnitt 2.11.2 zu Einzellsuspensionen verarbeitet. Gleiche Mengen dieser Zellen wurden für drei Tage mit und ohne OVA, wie in Abschnitt 2.19.5 beschrieben, stimuliert und die Kulturüberstände gewonnen. Mittels spezifischer ELISA wurde aus diesen Überständen, wie unter den Abschnitten 2.19.6 und 2.17 zusammengefasst, die antigen-spezifische Zytokinproduktion der Zytokine IL-4, IL-5, IL-13 und IFN- γ ermittelt.

Wie aus Abbildung 3.14 hervorgeht, lassen sich in den Kulturüberständen der Zellen aus den trachealen Lymphknoten unsensibilisierter CK2 β ^{Treg+/+}-Mäuse nahezu keine Zytokine nachweisen. Im Vergleich dazu zeigen die Zellen aus den sensibilisierten CK2 β ^{Treg+/+}-Kontrolltieren eine deutliche Produktion der Th2-vermittelten Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13. Ebenso lässt sich das Th1-vermittelte Zytokin IFN- γ nachweisen. Die Sensibilisierung der CK2 β ^{Treg-/-}-Mäuse hingegen führt im Vergleich zu

den sensibilisierten Kontrolltieren zu einer tendenziell noch stärkeren Produktion an IL-4 und IL-5. Von diesem Effekt scheint das Zytokin IL-13 nicht betroffen zu sein, zudem sind die gemessenen Unterschiede nicht signifikant. Abgesehen von einer Versuchsmaus weisen sensibilisierte $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Mäuse eine annähernd gleiche IFN- γ Produktion auf wie die sensibilisierten Kontrolltiere. Die tendenziell gesteigerte, antigenspezifische Produktion Th2-spezifischer Zytokine in sensibilisierten $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Mäusen ließ sich jedoch auch bei der Stimulation der Zellen aus Lunge und Milz der Tiere beobachten (Daten nicht gezeigt). Zudem zeigt Abbildung 3.14, dass unsensibilisierte $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Mäuse eine erhöhte Produktion des Th1 Zytokins IFN- γ zeigen. Diese konnte bereits zuvor in Abbildung 3.9 des Abschnitts 3.3.4 beobachtet werden und ist vermutlich auf den erhöhten Anteil aktivierter $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen in den Lymphknoten dieser Tiere zurückzuführen. Im Besonderen $CD8^+$ T-Zellen sind in der Lage große Mengen an IFN- γ zu produzieren. Zusammenfassend zeigen $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Mäuse also nach antigenspezifischer Aktivierung eine tendenziell verstärkte Produktion der Th2-spezifischen Zytokine IL-4 und IL-5. Neben der Produktion T-Zell-spezifischer Zytokine lassen sich Th2-vermittelte Immunantworten jedoch vor allem über die Produktion verschiedener Antikörper charakterisieren. Im folgenden Abschnitt 3.5.3 wurden daher die Titer verschiedener Antikörper-Isotypen in den Seren der Versuchstiere untersucht.

3.5.3 Erhöhte Antikörpertiter an OVA-spezifischem IgE in asthmatischen $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Mäusen

Neben der in Abschnitt 3.5.2 untersuchten Produktion von Zytokinen trägt im Besonderen die Th2-vermittelte Produktion von Antikörpern durch B-Zellen zur pathologischen Inflammation im Rahmen von Asthma-Experimenten bei. Speziell die Produktion antigenspezifischer IgE Antikörper verstärkt die Entzündungsreaktion in der Lunge, indem die Kreuzvernetzung membrangebundener IgE Antikörper zur Aktivierung von Mastzellen beiträgt. Die IgE Antikörper werden dabei über den hochaffinen $Fc\epsilon RI$ an die Oberfläche der Mastzellen gebunden. Eine erneute Exposition mit Antigen führt dann zur Kreuzvernetzung der Antikörper, die eine massive Aktivierung der Mastzelle zur Folge hat und zur Freisetzung zahlreicher Entzündungsmediatoren durch Degranulation führt. Um nun die weitere Th2-vermittelte Immunantwort weiter bewerten zu können, wurden die Titer verschiedener Ovalbumin-spezifischer Antikörper-Isotypen in den Seren der Versuchstiere mittels ELISA gemessen. Abbildung 3.15 fasst die Ergebnisse dieser ELISA zusammen.

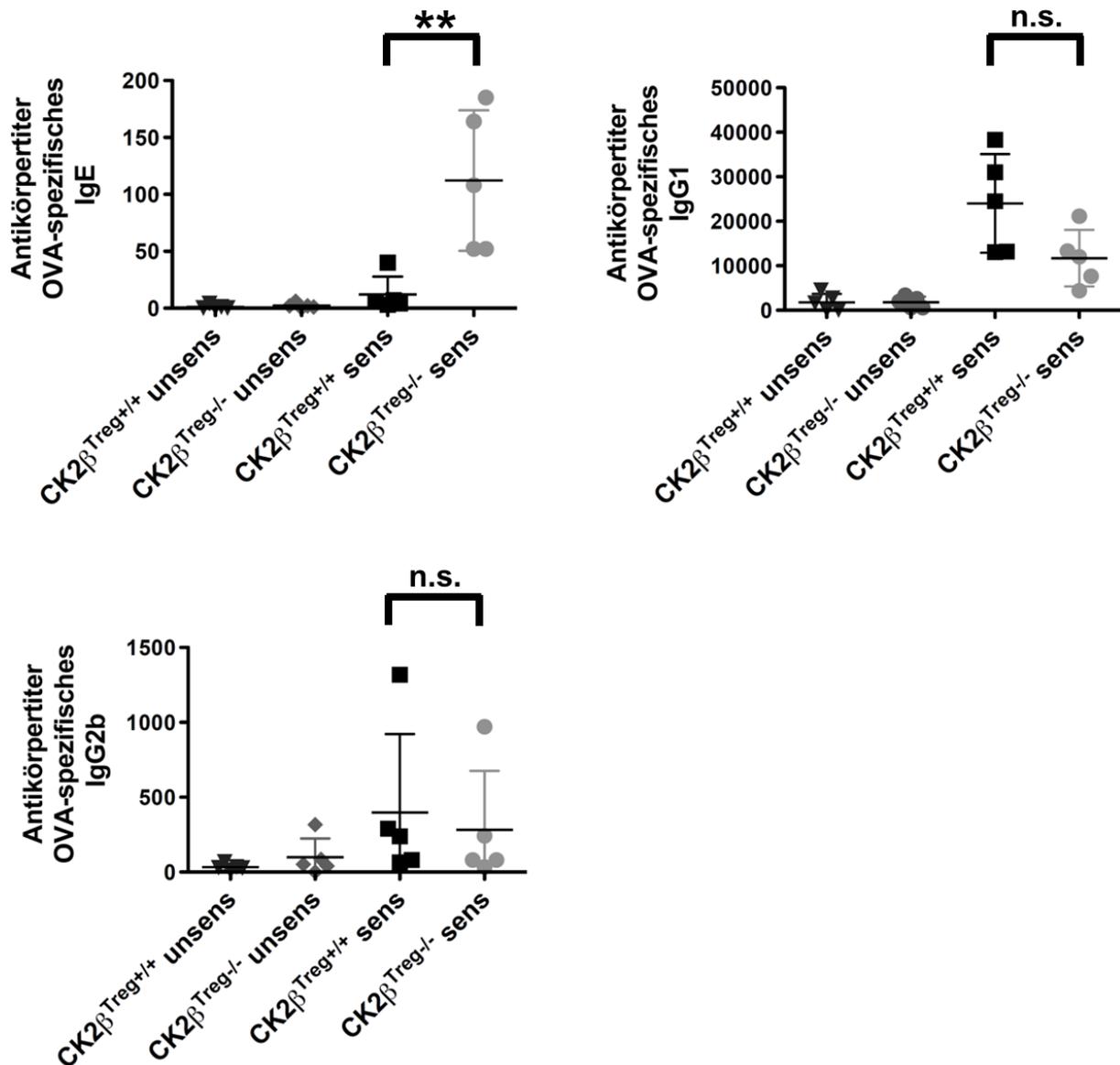


Abbildung 3.15: Asthmatische CK2 β ^{Treg-/-}-Mäuse zeigen stark erhöhte Titer an antigen-spezifischen IgE Antikörpern. Gemäß der Anleitung in Abschnitt 2.19.1 wurden wildtypische CK2 β ^{Treg+/+}- und CK2 β ^{Treg-/-}-Mäuse einem Asthma-Experiment unterzogen. Von allen Versuchstieren wurden, wie in den Abschnitten 2.18 und 2.19.4 beschrieben, Seren entnommen. Mittels OVA-spezifischer Antikörper ELISA wurden, gemäß den Abschnitten 2.19.7 und 2.17, die Titer der Antigen-spezifischen Antikörper-Isotypen IgE, IgG1 und IgG2b bestimmt.

Aus Abbildung 3.15 lässt sich zunächst ableiten, dass die Produktion OVA-spezifischer Antikörper erst durch Sensibilisierung, also nach Immunisierung mit Ovalbumin/Aluminiumhydroxid, einsetzt. In unsensibilisierten CK2 β ^{Treg-/-}-Mäusen, wie auch den entsprechenden wildtypischen Kontrolltieren lassen sich so gut wie keine OVA-spezifischen Antikörper nachweisen. Im Gegensatz dazu sind in den sensibilisierten Tieren eindeutig gesteigerte Titer an OVA-spezifischen Antikörpern aller untersuchten Isotypen detektierbar. Der Vergleich der sensibilisierten CK2 β ^{Treg-/-}-Mäuse und der zugehörigen

sensibilisierten Kontrollgruppe lässt zunächst keine signifikanten Unterschiede im Titer OVA-spezifischer IgG1 und IgG2b Antikörper erkennen. Es zeigt sich lediglich eine Tendenz zu einem höheren Titer an OVA-spezifischem IgG1 in $CK2\beta^{Treg^{+/+}}$ -Mäusen. IgG2b Antikörper sind dabei auf einen durch TGF- β kontrollierten Isotypen Klassenwechsel zurückzuführen, einem Zytokin, welches besonders in mucosalen Geweben von Bedeutung ist¹²⁰. IgG1 und im Besonderen der Isotypenwechsel zu IgE werden durch die Th2 Zytokine IL-4 und, im Falle von IgE, zusätzlich IL-13 reguliert^{114,120}. Abbildung 3.15 zeigt speziell im Falle von IgE einen deutlichen Anstieg der OVA-spezifischen Antikörpertiter in $CK2\beta^{Treg^{-/-}}$ -Mäusen. Diese gesteigerte Produktion OVA-spezifischer IgEs kann als weiteres starkes Indiz für eine gesteigerte Th2-vermittelte Immunreaktion in sensibilisierten $CK2\beta^{Treg^{-/-}}$ -Tieren gewertet werden. Zusammenfassend konnte, unter Betrachtung aller im Rahmen des Asthma-Versuchs untersuchten Parameter, die in Abschnitt 3.4 beobachtete massive Th2 Antwort in sensibilisierten $CK2\beta^{Treg^{-/-}}$ -Tieren eindeutig belegt werden. Neben einer erhöhten Präsenz OVA-spezifischer IgE Antikörper wird die stärkere Th2 Antwort zudem durch die Tendenz zu einer erhöhten Produktion Th2-spezifischer Zytokine, wie IL-4 und IL-5 (siehe Abschnitt 3.5.2) untermauert. Wie in Abschnitt 3.5.1 histologisch belegt, führt diese gesteigerte Th2-vermittelte Immunreaktion in $CK2\beta^{Treg^{-/-}}$ -Mäusen im Asthma-Modell zudem zu einer massiven Infiltration von Entzündungszellen in die Lunge. Auffälligerweise konnten im Asthma-Versuch bereits in unsensibilisierten $CK2\beta^{Treg^{-/-}}$ -Mäusen Zeichen einer Th2-vermittelten Immunreaktion gefunden werden. Demnach wird die bestehende Entzündungsreaktion in der Lunge der $CK2\beta^{Treg^{-/-}}$ -Tiere durch die Induktion asthmatischer Symptome weiter potenziert. Dies führt schließlich zu einer noch stärkeren Infiltration von Entzündungszellen in die Lunge (siehe Abbildung 3.12 und Abbildung 3.13), zu einer gesteigerten Produktion von Th2-spezifischen Zytokinen (siehe Abbildung 3.14), sowie zu erhöhten Antigen-spezifischen Titern an IgE Antikörpern (siehe Abbildung 3.15). Insgesamt ist die mangelnde Kontrolle von Th2-Zellen in $CK2\beta^{Treg^{-/-}}$ -Mäusen, wie zuvor in Abschnitt 3.4 erläutert, ausschließlich durch eine reduzierte Suppression durch $CK2\beta$ defiziente Tregs zu erklären. Im Folgenden sollte daher die molekulare Ursache dieser fehlerhaften Suppression in den Tregs untersucht werden.

3.6 Regulatorische T-Zellen aus $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Tieren zeigen eine verringerte Expression des Transkriptionsfaktors Foxp3

3.6.1 Die Expression verschiedener, an der Treg-vermittelten Suppression beteiligter Moleküle in regulatorischen T-Zellen von $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Mäusen ist unverändert

In den vorherigen Abschnitten 3.4 und 3.5 konnte eine mangelhafte Suppression Th2-vermittelter Immunreaktionen durch $CK2\beta$ defiziente Tregs nachgewiesen werden. Die folgenden Abschnitte befassen sich nun mit der Untersuchung der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen dieser gestörten Suppression. Wie in Teil 1.4 der Einleitung erklärt wurde, verwenden Tregs verschiedene suppressive Mechanismen zur Aufrechterhaltung der aktiven peripheren Toleranz. Anders als z.B. Foxp3 defiziente Tiere^{71,72} entwickeln $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Mäuse jedoch keinen letalen, autoimmunen Phänotyp. Daher liegt die Vermutung nahe, dass durch die Deletion der $CK2\beta$ nur ein einzelner Mechanismus der Treg-vermittelten Suppression defekt sein könnte. Um diese Möglichkeit näher zu untersuchen, wurden $CK2\beta$ defiziente Tregs hinsichtlich der Expression verschiedener, an der Treg-vermittelten Suppression beteiligter Moleküle analysiert. Hierzu wurden erneut Milzzellsuspensionen einzelner wildtypischer $CK2\beta^{Treg+/+}$ -Kontrolltiere und von $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Mäusen hergestellt. In diesen Zellsuspensionen wurde die Expression der suppressiven Moleküle CTLA-4, Granzym B, CD39 und CD73, sowie der TZR-assoziierten Signalkomponente CD3 ϵ und der TZR β -Kette (TZR β) auf $CD4^+Foxp3^+$ Tregs überprüft. Abbildung 3.16 zeigt das Ergebnis dieser durchflusszytometrischen Untersuchung.

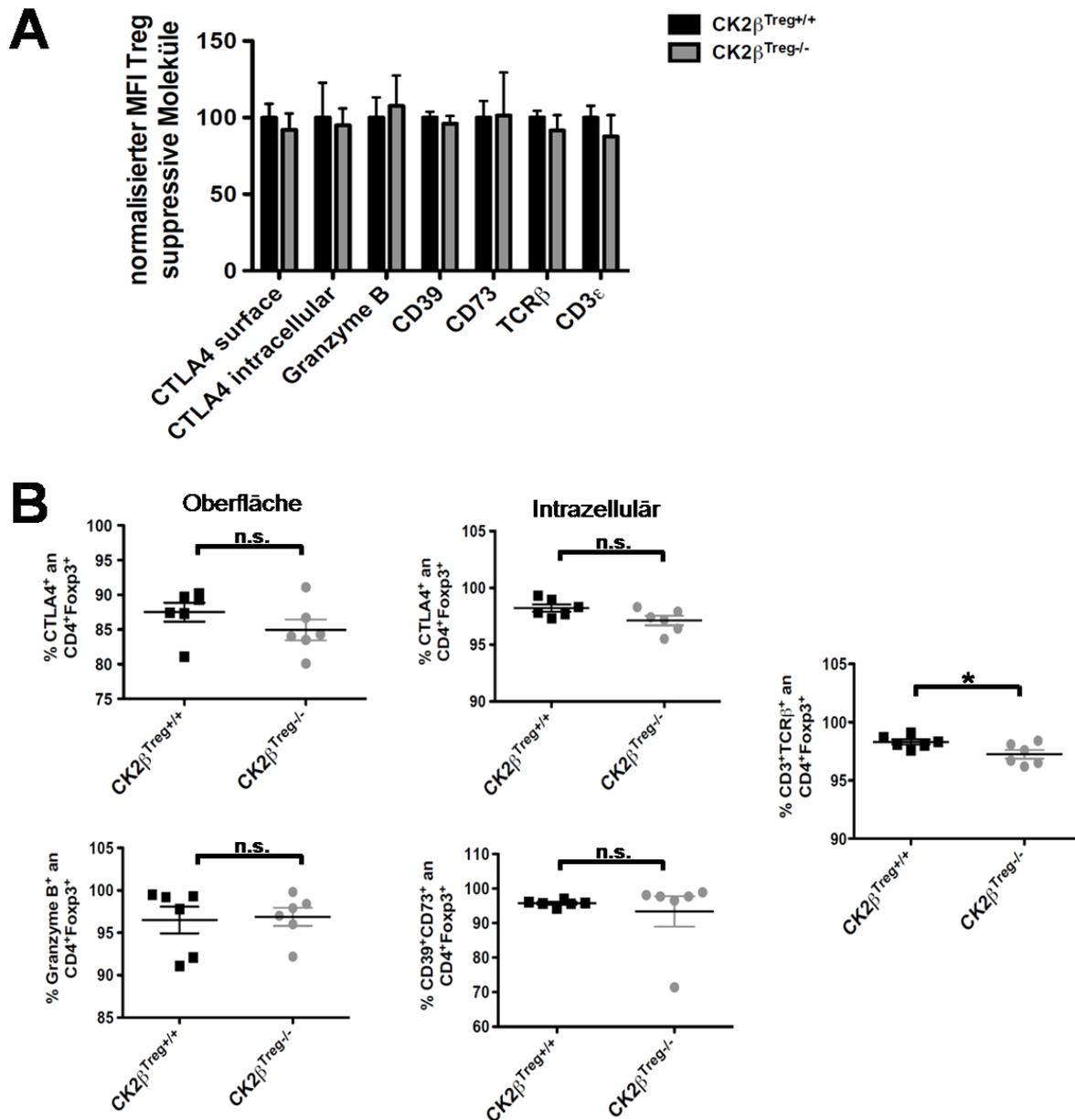


Abbildung 3.16: Die Expression verschiedener, an der Treg-vermittelten Suppression beteiligter Moleküle in CK2 β defizienten Tregs ist unverändert. Aus 7-12 Wochen alten CK2 β ^{Treg+/+}- und CK2 β ^{Treg-/-}-Mäusen wurden die Milzen entnommen und zu Einzelzellsuspensionen verarbeitet (siehe Abschnitt 2.11.3). Mittels hypotoner Lyse wurden die Erythrozyten in den Einzelzellsuspensionen entfernt und die Zellen darauffolgend in mehrere FACS-Färbungen aufgeteilt. Hierzu wurden die Zellen mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern gegen die Moleküle CD4, Foxp3 (intrazellulär) und in unterschiedlichen Ansätzen gegen CTLA-4 (einmal auf der Oberfläche und einmal intrazellulär), Granzym B (intrazellulär), CD39 und CD73 (jeweils auf der Zelloberfläche), sowie CD3 ϵ und pan TZR β Kette (jeweils auf der Zelloberfläche) gefärbt. Anschließend wurden die verschiedenen FACS-Proben gemäß Abschnitt 2.16 hinsichtlich der Expression der unterschiedlichen an der Treg-vermittelten Suppression beteiligten Moleküle auf CD4⁺Foxp3⁺ Tregs durchflusszytometrisch analysiert. In allen Proben wurden die Tregs durch ihre selektive Expression der Marker CD4 und Foxp3 von anderen Zellen unterschieden. **A** Normierte mittlere Fluoreszenz-Intensität (MFI) der gemessenen suppressiven Moleküle auf CK2 β suffizienten und CK2 β defizienten CD4⁺Foxp3⁺ Tregs. **B** Prozentualer Anteil der CD4⁺Foxp3⁺ Tregs, welche die verschiedenen suppressiven Moleküle exprimieren, in CK2 β ^{Treg-/-}- und CK2 β ^{Treg+/+}-Mäusen.

Ergebnisse

In Abbildung 3.16 lässt sich kein Unterschied in der Expression der untersuchten an der Treg-vermittelten Suppression beteiligten Proteine in CK2 β defizienten Tregs feststellen. Demnach kann ein Defekt der untersuchten Treg-spezifischen suppressiven Mechanismen durch den Verlust der CK2 β in Tregs ausgeschlossen werden. Allerdings umfasste die Analyse nicht alle Mechanismen der Suppression durch Tregs. Auffälligerweise geht aus Abbildung 3.16 hervor, dass ein signifikanter Anteil CK2 β defizienter Tregs eine verringerte Expression der TZR-assoziierten Signalkomponenten CD3 ϵ und der TZR β -Kette auf der Oberfläche zeigen. Durch die reduzierte Expression dieser Komponenten könnte die Aktivierung der Tregs stärkere Signale erfordern. CK2 β defiziente Tregs besitzen demnach eine geringfügig erhöhte Schwelle zur TZR-basierten Aktivierung. Inwieweit diese potenziell erhöhte Aktivierungsschwelle CK2 β defizienter Tregs für die beobachtete Th2-vermittelte Immunreaktion in CK2 $\beta^{\text{Treg-/-}}$ -Mäusen verantwortlich gemacht werden kann, ist allerdings unklar. Wie zuvor bereits in Abschnitt 1.4 der Einleitung beschrieben wurde koordiniert Foxp3 die Entwicklung und die suppressive Funktion von Tregs. Eine gestörte Protein Expression von Foxp3 könnte demnach eine mögliche Ursache für die in CK2 $\beta^{\text{Treg-/-}}$ -Mäusen beobachtete Th2-vermittelte Immunreaktion liefern. Der folgende Abschnitt 3.6.2 befasst sich mit der Foxp3-Expression CK2 β defizienter Tregs .

3.6.2 Regulatorische T-Zellen aus CK2 $\beta^{\text{Treg-/-}}$ -Tieren zeigen eine verringerte Expression des Transkriptionsfaktors Foxp3

Im vorherigen Teil 3.6.1 wurde die Expression verschiedener, an der Treg-vermittelten Suppression beteiligter Moleküle in CK2 β defizienten Tregs analysiert. Die durchflusszytometrische Untersuchung ergab jedoch keinerlei Unterschiede in der Expression dieser Moleküle. Im Zuge dieser Analyse wurden jedoch reduzierte Expressionslevel des Transkriptionsfaktors Foxp3 in den Tregs aus CK2 $\beta^{\text{Treg-/-}}$ -Mäusen beobachtet. Wie jedoch zuvor bereits in den Abschnitten 3.3.2 und 3.3.3 festgestellt werden konnte, ist die Zahl der CD4 $^+$ Foxp3 $^+$ Tregs in den CK2 $\beta^{\text{Treg-/-}}$ -Tieren unverändert. Die beobachtete Reduktion der Foxp3-Expression sollte im Folgenden bestätigt werden. Außerdem sollte festgestellt werden, ob sich dieser Defekt in der Expression von Foxp3 bereits während der Entwicklung der Tregs im Thymus oder erst in reifen Tregs in der Peripherie entwickelt. Dazu wurden Milzen und Thymi aus CK2 $\beta^{\text{Treg+/-}}$ - und CK2 $\beta^{\text{Treg-/-}}$ -Tieren einzeln präpariert. Aus den Milzen wurden erneut Einzelzellsuspensionen gefertigt und die enthaltenen Erythrozyten lysiert (siehe Abschnitt 2.11.3). Ebenso wurden die Thymi zu Einzelzellsuspensionen verarbeitet (siehe Abschnitt 2.11.1). In diesen Milz- und Thymuszellsuspensionen wurde per Durchflusszytometer die Expression des Treg-spezifischen Transkriptionsfaktors Foxp3 in CD4 $^+$ Foxp3 $^+$ Tregs überprüft. Die Ergebnisse der

Experimente zur verringerten Foxp3 Expression in CK2 β defizienten Tregs sind in Abbildung 3.17 dargestellt.

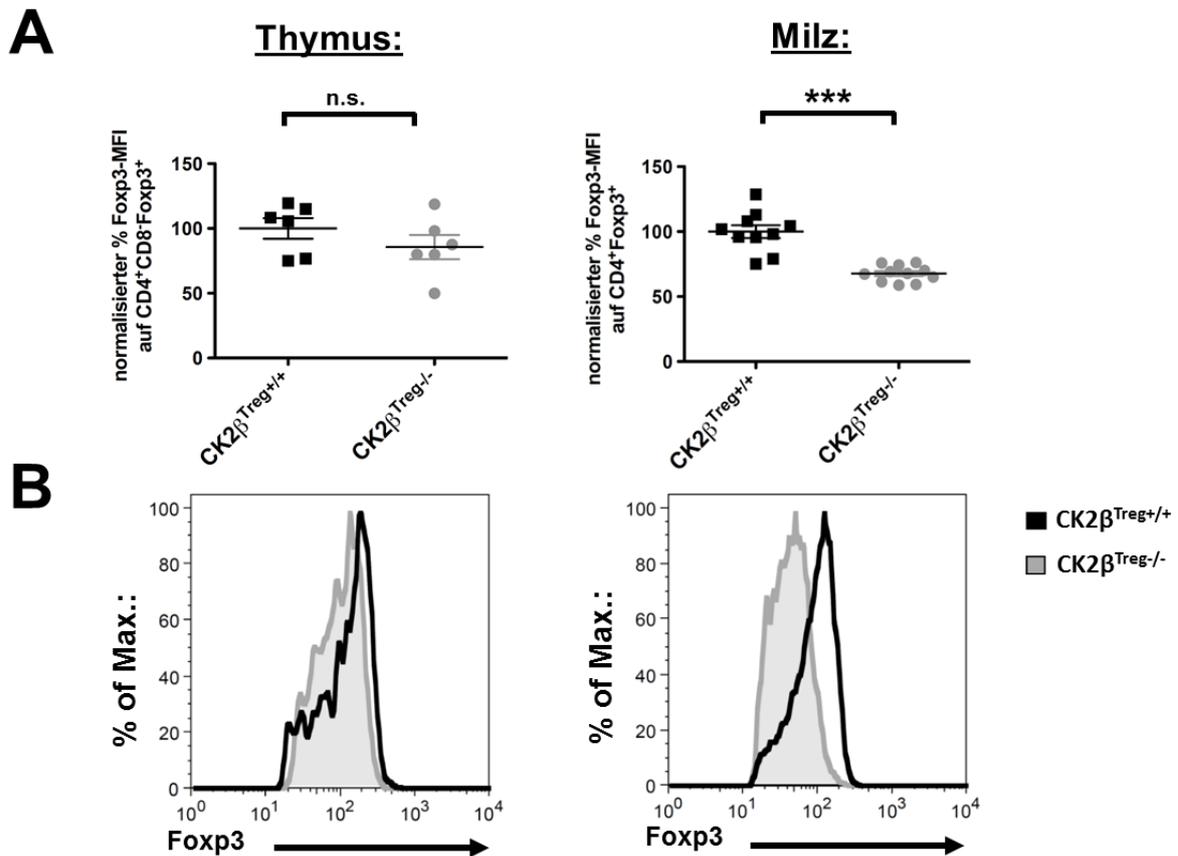


Abbildung 3.17: CK2 β defiziente Tregs zeigen eine verringerte Foxp3-Expression. Aus 7-12 Wochen alten CK2 β ^{Treg+/+}- und CK2 β ^{Treg-/-}-Mäusen wurden die Milzen und Thymi entnommen. Die Milzen wurden zu Einzelzellsuspensionen verarbeitet und die Erythrozyten lysiert (nach Abschnitt 2.11.3). Ebenso wurden aus den Thymi Einzelzellsuspensionen gefertigt (siehe Abschnitt 2.11.1). Diese Zellsuspensionen wurden mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern gegen die Marker CD4, CD8 und intrazellulär gegen Foxp3 gefärbt. Die in den Zellsuspensionen enthaltenen Tregs wurden durch ihre selektive Expression der Marker CD4 und Foxp3, sowie ihre fehlende CD8 Expression (speziell im Thymus) von anderen Zellen unterschieden. **A** Normierte, prozentuale, mittlere Fluoreszenz-Intensität von Foxp3 in CD4⁺CD8⁻Foxp3⁺ Tregs aus Thymi und in CD4⁺Foxp3⁺ Tregs aus Milzen von CK2 β ^{Treg+/+}- und CK2 β ^{Treg-/-}-Tieren. **B** Representative Overlays der Foxp3-Expression in CD4⁺CD8⁻Foxp3⁺ Tregs im Thymus und in CD4⁺Foxp3⁺ Tregs in der Milz je einer CK2 β ^{Treg+/+}- und einer CK2 β ^{Treg-/-}-Maus.

Wie Abbildung 3.17 zeigt, weisen CK2 β defiziente Tregs im Thymus von CK2 β ^{Treg-/-}-Mäusen eine annähernd vergleichbare Foxp3-Expression auf, wie die thymalen Tregs wildtypischer Kontrollmäuse. Im Zuge der Treg Entwicklung wirkt sich die Deletion der CK2 β also nur geringfügig auf die Expression von Foxp3 aus. Im Gegensatz dazu ist die Foxp3 Expression CK2 β defizienter Tregs in den Milzen von CK2 β ^{Treg-/-}-Mäusen, als Beispiel eines peripheren lymphatischen Organs, stark reduziert. So weisen die

Ergebnisse

Tregs der $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Mäuse im Mittel eine um 33% geringere Expression von Foxp3 auf. 2007 konnte die Forschergruppe um R. A. Flavell in einer Studie offenlegen, dass eine reduzierte Foxp3 Expression zur Konversion der Tregs zu Th2 Zellen und damit zur Entwicklung eines autoimmunen Th2-vermittelten Phänotyps führt¹²¹. Die in dieser Studie erzielten Ergebnisse könnten demnach eine Erklärung für die in $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Mäusen beobachtete speziell Th2-vermittelte Autoimmunreaktion bilden. R. A. Flavell beobachtete jedoch, parallel zu Foxp3, eine Reduktion verschiedener suppressiver Moleküle auf Tregs, wie z.B. CTLA-4. Eine derartige verringerte Expression suppressiver Moleküle wurde jedoch für $CK2\beta$ defiziente Tregs bereits in Abschnitt 3.6.1 ausgeschlossen. Im Folgenden sollten daher weitere Erklärungsansätze für die in $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Mäusen beobachtete Th2-vermittelte Autoimmunreaktion gefunden werden. Wie zuvor in Abschnitt 1.4 des Einleitungsteils beschrieben wurde, befähigt die Expression des Transkriptionsfaktors IRF4 Tregs zur spezifischen Suppression Th2-vermittelter Immunantworten⁹². Der folgende Abschnitt 3.7 befasst sich daher mit der Rolle von IRF4 in $CK2\beta$ defizienten Tregs.

3.7 Regulatorische T-Zellen aus $CK2\beta^{Treg-/-}$ Mäusen weisen eine reduzierte Expression des Transkriptionsfaktors IRF4 auf

Im vorherigen Abschnitt 3.6.2 konnte eine geringere Foxp3 Expression in $CK2\beta$ defizienten Tregs als mögliche Ursache für die sich in $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Mäusen entwickelnde Th2-vermittelte Autoimmunreaktion festgestellt werden. Da der Verlust von Foxp3 in $CK2\beta$ defizienten Tregs jedoch, anders als erwartet, nicht mit einer reduzierten Proteinexpression verschiedener suppressiver Moleküle auf Tregs, wie z.B. CTLA-4, einhergeht, sollten weitere mögliche Erklärungsansätze überprüft werden. Als solchen Erklärungsansatz könnte ein neues Konzept zur spezifischen Suppression verschiedener T-Helferzellantworten durch Tregs dienen. Dieses Konzept wurde in den Jahren 2009-2012 in wesentlichen Teilen durch die Arbeitsgruppe um A. Rudensky erarbeitet^{92,93,94}. Um unterschiedliche T-Helferzellantworten besser kontrollieren zu können, beginnen Tregs demnach Transkriptionsfaktoren zu exprimieren, die für die verschiedenen T-Helferzelltypen von entscheidender Bedeutung sind. Die Adaption dieser Transkriptionsfaktoren ermöglicht den Tregs eine spezialisierte Suppression der entsprechenden T-Helferzellen. Auf Einzelheiten dieses Konzepts wurde bereits in den Abschnitten 1.2.3 und 1.4 des Einleitungsteils eingegangen. Unter anderem konnte die Gruppe um Rudensky feststellen, dass Tregs durch Expression des Transkriptionsfaktors IRF4 zur spezifischen Suppression Th2-vermittelter Immunantworten befähigt werden⁹², daher sollte im Folgenden die Expression von IRF4 in $CK2\beta$ defizienten Tregs untersucht werden. Hierfür wurden $CD25^+$ Tregs aus den Milzen von $CK2\beta^{Treg+/+}$ - und $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Mäusen mittels MACS isoliert (siehe

Abschnitt 2.12.1). Mittels Durchflusszytometrie wurde in dieser CD25-angereicherten Zellpopulation der Anteil der CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs ermittelt, wobei die Zellen nur bei einem Anteil der CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs von über 90% für die weiteren Versuche verwendet wurden. Aus den reinen Tregs wurden die Proteine und Gesamt-RNA isoliert. Mittels Western Blot sollte die Expression von IRF4 in den Tregs auf Proteinebene und durch qRT-PCR die IRF4 mRNA Expression analysiert werden. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abbildung 3.18 zusammengefasst.

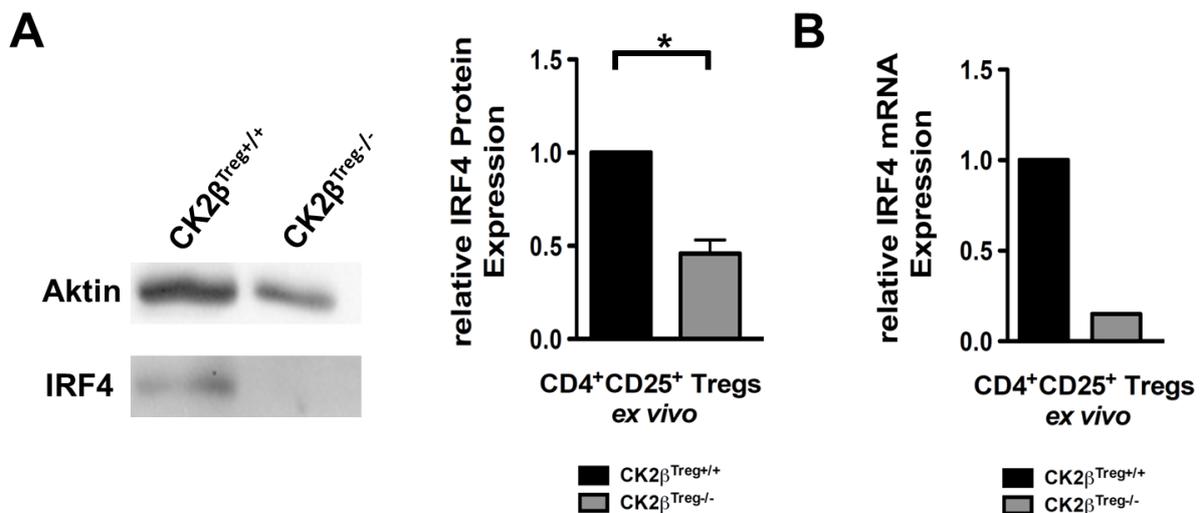


Abbildung 3.18: Tregs aus CK2 β ^{Treg-/-}-Tieren weisen eine reduzierte Expression des Transkriptionsfaktors IRF4 auf. Aus 7-16 Wochen alten CK2 β ^{Treg+/+}- und CK2 β ^{Treg-/-}-Tieren wurden die Milzen entnommen. Diese wurden zu Einzelzellsuspensionen verarbeitet und die Erythrozyten lysiert (nach Abschnitt 2.11.3). Aus den Zellsuspensionen wurden gemäß Abschnitt 2.12.2 CD4⁺ T-Zellen mittels MACS vorangereichert. Per durchflusszytometrischer Zellsortierung wurden aus der vorgereinigten CD4⁺ T-Zellpopulation die CD4⁺CD25⁺ T-Zellen weiter isoliert (siehe Abschnitt 2.12.3). Der Anteil der CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs in diesen CD4⁺CD25⁺ Zellen wurde per Durchflusszytometrie bestimmt. Für weitere Experimente wurden die Tregs nur bei einem Anteil von über 90% CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs verwendet. Aus den *ex vivo* isolierten Tregs wurden Proteine und Gesamt-RNA isoliert. **A** IRF4 Western Blots und relative IRF4 Proteinexpression aus zwei unabhängigen Experimenten. **B** qRT-PCR zum Nachweis der relativen Expression der IRF4 mRNA in Tregs aus einem einzelnen Experiment.

Aus Abbildung 3.18 A und B geht hervor, dass Tregs aus CK2 β ^{Treg-/-}-Mäusen eine deutlich geringere IRF4 Expression aufweisen als die Tregs aus CK2 β ^{Treg+/+}-Mäusen. Diese Reduktion zeigt sich auf Proteinebene und lässt sich zudem auch auf Ebene der IRF4 mRNA Expression bestätigen. In Korrelation mit den Ergebnissen von A. Rudensky⁹² liefert diese verringerte IRF4 Expression in CK2 β defizienten Tregs einen weiteren Erklärungsansatz für die spontane in CK2 β ^{Treg-/-}-Mäusen beobachtete Th2-vermittelte Autoimmunreaktion. Demnach resultiert der Verlust der CK2 β UE in Tregs in einer verminderten Expression des Transkriptionsfaktors IRF4. Aufgrund der reduzierten IRF4

Ergebnisse

Expression wiederum sind CK2 β defiziente Tregs möglicherweise nur schwer in der Lage, Th2-vermittelte Immunantworten zu supprimieren. Da die CK2 jedoch eine große Substratvielfalt besitzt und an zahlreichen Signalwegen partizipiert, lassen sich weitere CK2-abhängige Mechanismen, die zu einer verminderten Treg-vermittelten Suppression führen, nicht ausschließen.

3.8 Zusammenfassung der Ergebnisse

In Vorarbeit zu diesem Projekt wurde durch einen komparativen *Kinomarray* die Casein Kinase 2 (CK2) als eine der, selektiv in Tregs, aktivsten Kinasen identifiziert. Ziel dieser Arbeit war es daher, die Funktion der CK2 in Tregs zu untersuchen. Unter Verwendung pharmakologischer CK2 Inhibitoren konnte die Suppression von Tregs in klassischen Suppressionsassays aufgehoben werden. Da pharmakologische Inhibitoren jedoch auch die Wirkungsweise anderer Kinasen beeinflussen, können die erhaltenen Ergebnisse nicht eindeutig auf die Inhibition der CK2 zurückgeführt werden. Daher wurden konditionale „*knockout*“ Mäuse generiert, in denen die regulatorische CK2 β UE gezielt in Foxp3 exprimierenden Tregs defekt ist (CK2 $\beta^{\text{Treg}/-}$ -Mäuse). Die Analyse dieser Mäuse ergab, dass sich in diesen Tieren eine spontane, sublethale Autoimmunreaktion entwickelt. Die genauere Analyse der T-Zellen der CK2 $\beta^{\text{Treg}/-}$ -Mäuse offenbarte, dass die beobachtete Immunreaktion starke Charakteristika einer Th2-vermittelten Immunantwort zeigt. Da vom CK2 β -Defekt in CK2 $\beta^{\text{Treg}/-}$ -Mäusen ausschließlich die Foxp3⁺ Tregs betroffen sind, muss die beobachtete Immunreaktion jedoch auf einer reduzierten suppressiven Funktion der Tregs beruhen. Von dieser CK2-abhängigen Störung ist in besonderem Maße das Vermögen der Tregs zur Suppression Th2-vermittelter Immunantworten betroffen. Die dysfunktionale Suppression von Th2 Antworten wurde zusätzlich im Krankheitsmodell des murinen Asthma bronchiale als Beispiel eines Th2-basierten Krankheitsmodells *in vivo* bestätigt. Insgesamt wiesen CK2 $\beta^{\text{Treg}/-}$ -Mäuse nach Sensibilisierung^h deutlich stärkere Merkmale einer Th2-vermittelten Immunreaktion und größere pathologische Veränderungen der Lunge auf als wildtypische Kontrolltiere. Außerdem konnten in den Asthma-Versuchen bereits in den Lungen unsensibilisierter CK2 $\beta^{\text{Treg}/-}$ -Mäuse pathologische Veränderungen beobachtet werden. Als mögliche Ursache für die beobachtete Th2-vermittelte Autoimmunreaktion in CK2 $\beta^{\text{Treg}/-}$ -Mäusen wurde neben einer reduzierten Foxp3-Expression, eine stark verringerte Expression des Transkriptionsfaktors IRF4 in CK2 β defizienten Tregs identifiziert. So konnte in früheren Studien gezeigt werden, dass der Verlust der Foxp3 Expression in Tregs zur Konversion der Tregs zu Th2 Zellen und zur Entwicklung einer Th2-vermittelten Autoimmunreaktion

^h Sensibilisierung: Immunisierung von Versuchstieren durch intraperitoneale Injektion von Ovalbumin (als Antigen) zusammen mit Aluminiumhydroxid (als Adjuvanz) gemäß Abschnitt 2.19.1

führt¹²¹. Im Gegensatz dazu wurde in einer anderen Studie eine kritische Funktion von IRF4 in Tregs für die Suppression Th2-basierter Immunantworten aufgedeckt⁹². Zusammenfassend konnte die CK2 durch diese Arbeit als neues Zielmolekül identifiziert werden, um gezielt die Treg-vermittelte Suppression speziell Th2-vermittelter Immunreaktionen zu inhibieren. Die folgende Diskussion beschäftigt sich nun mit der Nutzbarkeit und Anwendung einer Manipulation der CK2 in Tregs.

4 Diskussion

4.1 Das therapeutische Potenzial regulatorischer T-Zellen

Wie zuvor bereits in den Abschnitten 1.3 und 1.4 der Einleitung beschrieben wurde, haben regulatorische T-Zellen (Tregs) eine essentielle Funktion bei der Aufrechterhaltung der immunologischen Toleranz. Durch die Identifikation des Transkriptionsfaktors Foxp3 als Schlüsselfaktor, der die Funktion und Entwicklung von Tregs steuert, konnten Tregs im Jahr 2003 als eigenständige T-Zell-Subpopulation definiert werden^{71,72}. Inzwischen konnte eine wesentliche Beteiligung von Tregs bei der Suppression schädlicher Autoimmunreaktionen gegen körpereigene Gewebe, oder auch kommensale Bakterien im Darm zweifelsfrei nachgewiesen werden^{52,53}. Eine fehlerhafte Funktionsweise von Tregs begünstigt daher die Entstehung zahlreicher autoimmuner Erkrankungen. Beispielsweise führen Mutationen im Gen für Foxp3 beim Menschen zur Entwicklung des lethalen IPEX Syndroms (Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked Syndrom)¹²². Betroffene Patienten entwickeln bereits in frühem Alter schwere systemische Autoimmunreaktionen¹²². Neben dieser fatalen Autoimmunerkrankung kann eine fehlerhafte Treg-vermittelte Suppression zur Entstehung verschiedener autoimmuner Erkrankungen führen, wie z.B. Diabetes Typ 1, Rheumatoider Arthritis, Multipler Sklerose (MS), Systemischem Lupus Erythematodes (SLE) sowie Psoriasis und *Intestinal Bowel Disease* (IBD)¹²³. Außerdem regulieren Tregs überschießende Immunreaktionen gegen harmlose Antigene, wodurch eine fehlerhafte Suppression durch Tregs zur Entstehung allergischer Reaktionen, wie z.B. Asthma oder Lebensmittelallergien, beitragen kann^{114,124}. Weitere klinische Relevanz erhalten Tregs bei Transplantationen, wo der Transfer von Tregs einen vielversprechenden Therapieansatz darstellt, um Transplantatabstoßungsreaktionen zu verhindern¹²⁵. Auf der anderen Seite kann die Suppression durch Tregs Immunreaktionen gegen Tumorgewebe inhibieren, da Tregs den Tumor als körpereigenes Gewebe interpretieren und somit potentielle Immunreaktionen gegen ihn unterbinden⁶⁷. So stellt der Schutz durch Tregs einen der Hauptmechanismen dar, wie Tumore der Erkennung durch das Immunsystem entgehen¹²⁶. Zusammenfassend besitzen Tregs also ein vielseitiges therapeutisches Anwendungspotential, das in Abbildung 4.1 dargestellt ist.

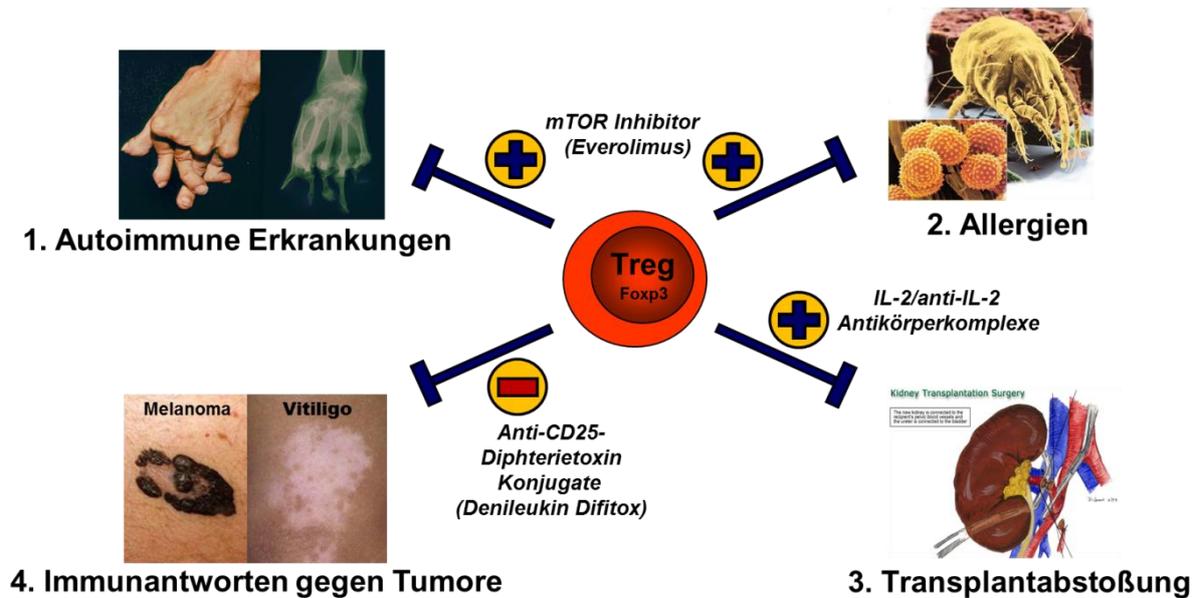


Abbildung 4.1: Potenzielles therapeutisches Anwendungspotenzial von Tregs. Eine fehlerhafte Treg-vermittelte Suppression kann zur Entstehung verschiedener Autoimmunerkrankungen (1.) und Allergien (2.) beitragen. Die Expansion von Tregs stellt zudem eine Therapiemöglichkeit dar, um die Entwicklung schädlicher *Graft-versus-Host-disease* (GvHD) Reaktionen bei Transplantationen sowie Transplantatabstoßungsreaktionen (3.) zu verhindern. Außerdem kann die Blockade der Treg-vermittelten Suppression dazu beitragen, Immunreaktionen gegen Tumore (4.) zu verstärken. Verschiedene Phamaka werden bereits dazu eingesetzt, um die Treg-vermittelten Ursachen an diesen Erkrankungen zu behandeln. So werden IL-2/Anti-IL-2 Antikörperkomplexe eingesetzt, um über die Expansion von Tregs GvHD Reaktionen bei Knochenmarkstransplantationen zu verhindern. Das Immunsuppressivum Everolimus stabilisiert die Foxp3 Expression von Tregs und steigert deren Überlebensfähigkeit. Außerdem wurden Anti-CD25 gekoppelte Diphtherietoxin Konjugate mit zweifelhaftem Erfolg dazu eingesetzt, um Tregs auszuschalten und so Immunreaktionen gegen verschiedene Tumore zu provozieren.

Teilweise werden bereits verschiedene Strategien genutzt, um den Treg-vermittelten Beitrag an diesen Erkrankungen, wie z.B. reduzierte Anzahlen an Tregs, fehlerhafte suppressive Mechanismen oder die Resistenz von Effektorzellen gegenüber der Treg-vermittelten Suppression¹²³, zu therapieren. Ein Teil der hierzu verwendeten Pharmaka wurde bereits in Abbildung 4.1 aufgeführt und wird im Folgenden genauer behandelt. Beispielsweise wurden basierend auf murinen Studien Konjugate aus IL-2 und IL-2-spezifischen Antikörpern erfolgreich in der Behandlung *chronischer Graft-versus-Host-disease* (GvHD) Reaktionen nach Knochenmarkstransplantationen eingesetzt¹²⁷. Die Applikation dieser IL-2/Anti-IL-2 Antikörperkomplexe induzierte die Expansion von Tregs, welche im Stande waren, die Entwicklung der GvHD zu blockieren⁶⁷. Analog konnten IL-2/Anti-IL-2 Antikörperkomplexe bei Hepatitis C induzierter, autoimmuner Vasculitis erfolgreich angewandt werden um Tregs zu expandieren¹²⁸. Ein weiteres Beispiel für die erfolgreiche therapeutische Anwendung eines Pharmakons zur Aktivierung der Funktion von Tregs ist der Kinase-Inhibitor

Diskussion

Everolimus (Afinitor, Novartis), der als generelles Immunsuppressivum Anwendung findet. Everolimus hemmt die Aktivität der Serin/Threonin-Kinase mTOR, welche der PI3K-Akt Kinase Kaskade nachgeschaltet ist. Die Blockade von mTOR fördert im Mausmodell die Induktion und die Überlebensfähigkeit von Tregs und stabilisiert Foxp3, indem Everolimus den suppressiven Einfluss von mTOR auf Transkriptionsfaktoren der SMAD- und Foxo-Familie unterbindet, welche ihrerseits die Expression von Foxp3 und diverser überlebensfördernder Gene induzieren¹²⁹. Außerdem zeigt Everolimus weitere nützliche Effekte auf andere Zellen. So hemmt es massiv die Proliferation von Tcons, wodurch es parallel zu einer gesteigerten Frequenz von Tregs kommt⁶⁷. Durch diesen Effekt wird der Nutzen von Everolimus als Immunsuppressivum noch verstärkt. Dennoch sind nicht alle Versuche, die Funktion von Tregs therapeutisch zu nutzen, von Erfolg gekrönt. Ein Negativbeispiel liefert das Medikament Denileukin Difitox (Ontak; Esai), ein an Diphtherietoxin gekoppelter Antikörper, der spezifisch an die IL-2-Rezeptor α -Kette (CD25) bindet. Da CD25 auf der Oberfläche zahlreicher Tregs in großen Mengen exprimiert wird, soll der Antikörper spezifisch an Treg Zellen binden und so Diphtherietoxin in die Treg Zelle einschleusen, welches darauf zur Zerstörung der Zelle führt. Durch die Reduktion der Anzahl der Tregs soll es so zu einer geringeren Treg-vermittelten Suppression und damit zu einer gesteigerten Anti-Tumor-Antwort kommen. Studien an Melanom- und Prostata-Krebspatienten lieferten jedoch widersprüchliche Resultate⁶⁷, die durch die Tatsache erklärbar sind, dass auch Tcons nach ihrer Aktivierung CD25 auf ihrer Oberfläche exprimieren⁶⁷. Dieses Negativbeispiel verdeutlicht also den Bedarf an Medikamenten, die möglichst selektiv die Funktionen von Tregs modulieren, ohne schwerwiegende Nebenwirkungen hervorzurufen. Aktuell gängige Immunsuppressiva, wie z.B. Glukokortikoide oder das im oberen Textverlauf beschriebene Everolimus, haben ein breites Wirkungsspektrum, sodass viele verschiedene Zelltypen betroffen sind. Dies führt beispielsweise zu einer gesteigerten Infekt Anfälligkeit und zu zahlreichen weiteren Nebenwirkungen. Durch Medikamente, die gezielt die Funktionsweise von Tregs beeinflussen, sollten derartige Nebenwirkungen geringer ausfallen. Die Ergebnisse des in Abschnitt 1.4 des Einleitungsteils beschriebenen *Kinomarray* identifizieren die Casein Kinase 2 (CK2) als Kinase, mit einer selektiv hohen Aktivität in Tregs im Vergleich zu CD4⁺ Tcons. Demnach stellt die CK2 ein interessantes Zielmolekül dar, um Tregs möglichst selektiv zu beeinflussen, ohne dabei die Funktionen von Tcons zu stören. So zeigen die Ergebnisse des Proliferationsassays in 3.1, dass durch die Blockade der CK2-Aktivität selektiv die Funktion von Tregs aufgehoben werden kann, ohne die Proliferation der Tcons zu beeinflussen. Die CK2 bietet sich zusätzlich als Zielmolekül für die Manipulation von Tregs an, da in den letzten Jahren bereits zahlreiche unterschiedliche pharmakologische Inhibitoren entwickelt wurden, um die Aktivität des Enzyms zu blockieren. Der nächste Abschnitt 4.2 beschäftigt sich daher mit dem Angebot und den speziellen Eigenschaften pharmakologischer CK2 Inhibitoren.

4.2 Pharmakologische CK2 Inhibitoren

Im Jahre 1954 entdeckten Burnett und Kennedy die Protein Kinase CK2 und benannten sie nach ihrer Fähigkeit das Protein Casein zu phosphorylieren¹³⁰. Seither konnten jedoch nur limitierte Informationen über die Funktion und Regulation der CK2 gewonnen werden, wovon ein Teil dieser Eigenschaften bereits in Abschnitt 1.5 der Einleitung behandelt wurde¹³¹. In den letzten Jahren konnten diverse Studien jedoch eine bedeutende, protoonkogene Rolle der CK2 in Tumorzellen aufdecken. Diese protoonkogene Funktion führte in den letzten Jahren zu einem massiven Interesse an kleinen Molekülen, welche die Funktion der CK2 selektiv inhibieren, messbar anhand einer rapide angestiegenen Zahl an Patenten auf diese Moleküle¹³². Der folgende Abschnitt 4.3 befasst sich daher eingehender mit der Anwendung pharmakologischer CK2 Inhibitoren zur Krebstherapie, während sich hiesiger Abschnitt direkt mit den pharmakologischen Inhibitoren selbst beschäftigt. Die Mehrheit dieser Moleküle umfasst ATP-kompetitive Inhibitoren, welche die relativ stark konservierte ATP Bindungstasche der Kinasen blockieren¹³³. Die Familie der ATP-kompetitiven CK2 Inhibitoren umfasst dabei drei verschiedene Klassen chemischer Moleküle: Polyphenole, Indolquinazolin basierte Moleküle und halogenierte Benzimidazol Derivate¹³³, von denen letztere die ersten Substanzen waren, die zur CK2 Inhibition verwendet wurden. So stellt beispielsweise das halogenierte Benzimidazol Derivat TBB (4,5,6,7-Tetrabromo-benzotriazol) einen der ersten und am häufigsten in Studien verwendeten CK2 Inhibitor dar¹³⁴. TBB bildet die strukturelle Basis für eine ganze Reihe an CK2 Inhibitoren, wie den Inhibitor DMAT, der während dieser Arbeit erstmals dazu eingesetzt wurde, um die Aktivität der CK2 in Tregs in einem klassischen Suppressionsassay zu blockieren. Dabei wurde in den in Abschnitt 3.1 dargelegten *in vitro* Experimenten festgestellt, dass DMAT in der Lage ist, die Treg-vermittelte Suppression der Proliferation konventioneller T-Zellen aufzuheben. Wie der zuvor bereits in Abschnitt 4.1 der Diskussion beispielhaft beschriebene Kinase-Inhibitor Everolimus zeigt, finden Kinase-Inhibitoren bereits Anwendung, um die Funktion von Tregs zu manipulieren. Die Anwendung von CK2 Inhibitoren um die Suppression durch Tregs aufzuheben, wurde zuvor jedoch noch nicht beschrieben. Ein generelles Problem bei der Anwendung dieser ATP-kompetitiven Inhibitoren besteht in ihrer Unspezifität. Diese resultiert in erster Linie daher, dass die ATP Bindungstasche von Kinasen, aber auch von anderen ATP-bindenden Proteinen, stark konserviert ist^{133,135}. Beispielsweise blockiert der hier (Abschnitt 3.1) verwendete CK2 Inhibitor DMAT in der eingesetzten Konzentration neben der CK2 auch die Aktivität der Kinasen PIM-1, PIM-3 sowie HIPK-2 in gleichem Ausmaß¹¹⁷. Eine direkte Beziehung einer dieser Kinasen zur Funktion von Tregs ist jedoch nicht bekannt. Zudem zeigt in dem im Vorfeld dieser Arbeit durchgeführten Kinomarray keine dieser Kinasen eine selektiv in Tregs erhöhte Aktivität. Die mangelnde Selektivität der Kinase Inhibitoren

Diskussion

kann als einer der Hauptgründe angeführt werden, warum bis heute lediglich ein CK2 Inhibitor, namens CX4945, eine klinische Phase II Studie als Chemotherapeutikum erreicht hat¹³². Ausgehend von ATP-kompetitiven CK2 Inhibitoren wandelte sich daher der Fokus der Forschung in den letzten Jahren zu alternativen Inhibitionsmöglichkeiten der CK2. Die Strategien dieser alternativen Inhibition beinhalten z.B. synthetische Peptide, welche die Interaktion von Substraten mit der CK2 und insbesondere der CK2 β UE unterbinden. So konnte ein Substrat-ähnliches Peptid (P15) synthetisiert werden, welches, wenn gekoppelt an das membrangängige Peptid Tat, antitumoröse Wirkung in Tiermodellen und klinischen Patientenstudien aufwies^{136,137}. Peptide, welche speziell die Funktion der CK2 β UE unterbinden, sind besonders effektiv, da die β -UE die zentrale Komponente der CK2 darstellt. So rekrutiert die CK2 β UE Substrate und Interaktionspartner und moduliert die Substratselektivität und katalytische Aktivität der CK2¹⁰¹. Die Gruppe um Cochet publizierte 2006 ein Peptid (P1), das in der Lage ist p53-vermittelt Apoptose zu induzieren und spezifisch die Funktion der CK2 β UE zu blockieren¹³⁸. Neben diesen inhibitorischen Peptiden konnten kürzlich Polyoxometallate als allosterische CK2 Inhibitoren identifiziert werden¹³⁹. Deren Wirksamkeit *in vivo* konnte bislang jedoch nicht nachgewiesen werden. Insgesamt besteht somit ein breites Spektrum an Inhibitoren, das genutzt werden könnte, um potentiell die Suppression durch Tregs durch die Inhibition der CK2 zu unterbinden. Jedoch sind noch weitere Studien nötig, um die Wirkung der einzelnen CK2 Inhibitoren auf die Treg-vermittelte Suppression *in vitro* und in Tumormodellen *in vivo* zu überprüfen. Pharmakologische CK2 Inhibitoren könnten demnach zukünftig genutzt werden, um die Suppression von Anti-Tumorantworten durch Tregs zu inhibieren. Neben diesem therapeutischen Ansatz sind zusätzlich Stoffe von Interesse, welche die suppressiven Eigenschaften von Tregs verstärken. Beispielsweise wären Aktivatoren der CK2 hypothetisch dazu geeignet um die Treg-vermittelte Suppression bei Autoimmunerkrankungen und Allergien zu steigern. Zwar existieren nur limitierte Informationen zur Regulation der CK2, jedoch konnte in den 80er Jahren eine CK2-aktivierende Funktion von Polyaminen, wie Spermin und Spermidin, identifiziert werden¹³¹. Polyamine werden in der Zelle im Wesentlichen durch das Synthese-limitierende Enzym Ornithin Decarboxylase (ODC) produziert¹³¹. Beispielsweise führt die Überexpression von ODC im transgenen Mausmodell zu einer erhöhten CK2 Aktivität¹⁴⁰. Einen Zusammenhang zwischen der ODC und Tregs liefert ein im Verlaufe dieser Arbeit durchgeführtes Experiment (Daten nicht gezeigt). So wurde ein qRT-PCR basierter *Signaltransduction Pathway Finder* (SA-Bioscience) unter Verwendung CK2 β suffizienter und CK2 β defizienter (aus CK2 $\beta^{CD4^{-/-}}$ Mäusen) Tregs durchgeführt. In diesem Experiment wurde die ODC-1 als Gen identifiziert, dessen Expression in CK2 β defizienten Tregs am stärksten reduziert war (-118x). Diese präliminären Daten suggerieren also eine regulative Schleife, in der die ODC-1 die Aktivität der CK2 fördert, was wiederum zu einer gesteigerten Expression der ODC-1 auch in Tregs führt. Die Induktion von Polyaminen könnte demnach einen möglichen Angriffspunkt

darstellen um die CK2 Aktivität in Tregs zu erhöhen und so die suppressiven Funktionen der Tregs zu steigern. Auf diese Weise könnte die Aktivierung der CK2 zur Steigerung der Suppressiven Eigenschaften von Tregs für die Behandlung verschiedener Autoimmunerkrankungen und Allergien nutzbar gemacht werden. Um diesen hypothetischen Ansatz zu verifizieren bedarf es jedoch noch weiterer, intensiver Forschung. Im Gegensatz dazu wäre die Anwendung pharmakologischer CK2 Inhibitoren zur Aktivierung der Immunreaktion gegen Tumore leichter zu erreichen. Zahlreiche Studien in diesem Feld konnten bereits ein fundiertes Wissen um Nebenwirkungen und die direkte toxische Wirkung der CK2 Inhibitoren auf den Tumor selbst ansammeln. Der folgende Abschnitt befasst sich daher mit der Manipulation der CK2 zur Behandlung von onkologischen Erkrankungen. Ein besonderer Schwerpunkt wird dabei auf das Potenzial gelegt, die Inhibition der Treg-vermittelten Suppression zu nutzen, um Anti-Tumorreaktion zu steigern.

4.3 CK2 als Zielmolekül bei der Krebstherapie

Wie zuvor im letzten Abschnitt 4.2 festgestellt wurde, übt eine erhöhte CK2 Aktivität eine stark proonkogene Wirkung in Zellen aus. So korreliert ein verstärkt aggressives Tumorverhalten mit einer gesteigerten CK2 Aktivität¹³³. Die CK2 steuert verschiedene Onkogene und Tumor-Suppressor-Proteine und schützt anti-apoptotische Proteine vor dem Abbau durch Caspasen^{133,141}. Damit nimmt die CK2 eine Schlüsselfunktion bei der Progression der Onkogenese ein, indem sie Proliferation, Überleben und Stressresistenz der Krebszellen fördert¹⁴¹. Entsprechend gilt eine erhöhte Expression der CK2 als ein negativer prognostischer Marker bei Prostata-¹⁴² und Lungenkrebs¹⁴³, sowie akuter myeloider Leukämie¹⁴⁴. Zusammenfassend übernimmt die CK2 also eine Schlüsselfunktion an der malignen Transformation von Tumoren, und so wuchs in den letzten Jahren das Interesse an selektiven, pharmakologischen CK2 Inhibitoren. Wie zuvor in Abschnitt 4.2 beschrieben wurden bis heute zahlreiche Substanzen zur Behandlung von Tumoren entwickelt, von denen kürzlich der neue CK2 Inhibitor CX4945 in eine klinische Phase II Studie zur Behandlung maligner Melanome aufgenommen wurde¹³². Diese Inhibitoren besitzen eine direkte toxische Wirkung auf Tumorzellen, indem sie die anti-apoptotische Wirkung der CK2 auf diese Zellen aufheben. In dieser Arbeit hingegen sollte die Funktion der CK2 in Tregs untersucht werden. In Abschnitt 3.1 wurde daher der CK2 Inhibitor DMAT eingesetzt um in einem *in vitro* Experiment dessen Einfluss auf die Treg-vermittelte Suppression zu testen. Die Ergebnisse (siehe Abschnitt 3.1) zeigen, dass DMAT im Stande ist, die Suppression der Proliferation CD4⁺ T-Zellen durch Tregs aufzuheben. Dieses Resultat liefert einen starken Hinweis darauf, dass sich pharmakologische CK2 Inhibitoren neben ihrer direkten toxischen Wirkung für Tumorzellen dazu eignen, die Suppression einer Anti-Tumorantwort durch

Tregs zu inhibieren. Da die Suppression durch Tregs einen wesentlichen Schutzmechanismus darstellt, wie ein Tumor der Lyse durch Effektor T-Zellen entgehen kann¹²⁶, wird das therapeutische Potenzial der CK2 Inhibitoren durch ihre potentiell anti-suppressive Wirkung auf Tregs somit weiter verstärkt. Beispielsweise leisten Tregs einen entscheidenden Beitrag dazu im Bereich des Tumors ein immunsuppressives Milieu zu etablieren und zu erhalten¹⁴⁵. Ferner akkumulieren Tregs, basierend auf Tumor-produzierten Chemokinenⁱ selektiv in dessen Mikroumgebung, wo sie mitunter die größte einwandernde Lymphozyten-Population ausmachen¹⁴⁵. Zusätzlich konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass die Depletion von Tregs im Tumorgewebe erfolgreich eine Anti-Tumorantwort unterstützen kann, welche schließlich zur Abstoßung des Tumors führt¹⁴⁶. Ergänzend zu ihrer toxischen Wirkung auf Tumorzellen könnten pharmakologische CK2 Inhibitoren also die Abstoßung eines Tumors durch das Immunsystem über die Inhibition der Treg-vermittelten Suppression unterstützen. Zur vollständigen Aktivierung des Immunsystems gegen antigene Tumore wäre demnach eine Kombination von CK2 Inhibitoren mit Tumorstoffen denkbar. Durch die Inhibition der CK2 würden Tregs in ihrer Funktion blockiert und zugleich das Immunsystem durch antigenspezifische Vakzinierung zur Reaktion gegen den Tumor aktiviert. Tumorstoffung wird bereits als elegante und vielseitige Methode zur Bekämpfung von Krebs in zahlreichen klinischen Studien getestet¹⁴⁷. Wie anhand der Analyse der CK2 $\beta^{\text{Treg}^{-/-}}$ -Mäuse in dieser Arbeit weiter festgestellt wurde, kontrolliert die CK2 in Tregs bevorzugt die Fähigkeit zur Suppression Th2-vermittelter Immunantworten. Der folgende Abschnitt 4.4 befasst sich daher mit den Optionen, die CK2 als Zielmolekül zur Behandlung Th2-vermittelter Immunreaktionen zu nutzen.

4.4 CK2-Inhibition als Mittel zur Blockade der Treg-vermittelten Suppression von Th2-basierten Immunantworten

Wie durch die Analyse der CK2 $\beta^{\text{Treg}^{-/-}}$ Mäuse in dieser Arbeit festgestellt wurde, spielt die CK2 in Tregs eine entscheidende Funktion an der Suppression Th2-vermittelter Immunantworten. So entwickeln Tiere mit konditionalem Knockout der CK2 β UE in Foxp3 exprimierenden Tregs eine spontane, sublethale Autoimmunreaktion, die zu wesentlichen Teilen Charakteristika einer Th2-vermittelten Immunreaktion trägt. Beispielsweise zeigen CK2 $\beta^{\text{Treg}^{-/-}}$ Mäuse eine Hypertrophie der peripheren lymphatischen Organe (siehe Abschnitt 3.3.1). Diese geht einher mit einer stark erhöhten Anzahl an aktivierten Effektor-Gedächtnis T-Zellen, deren Analyse starke Charakteristika eines Th2-basierten Phänotyps offenbarte (siehe Abschnitt 3.4). Außerdem konnten im Blut der CK2 $\beta^{\text{Treg}^{-/-}}$ Mäuse erhöhte

ⁱ Chemokine: Untergruppe von Zytokinen, die in der Lage sind eine Migrationsbewegung in Immunzellen auszulösen

Titer des Th2-abhängigen Antikörper-Isotyps IgE festgestellt werden (siehe Abschnitt 3.4). Zusätzlich wiesen $CK2\beta^{Treg-/-}$ Mäuse in einem Asthmodell eine fehlgesteuerte Treg-vermittelte Suppression der Th2-basierten Immunreaktion in der Lunge auf (siehe Abschnitt 3.5). Folgendes Szenario könnte nun die Entstehung der Th2-vermittelten Autoimmunreaktion in $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Mäusen erklären. Mit zunehmendem Alter der Tiere könnten potentiell autoaggressive T-Zellen den Mechanismen der Toleranz entgehen und in der Körperperipherie, wie beispielhaft in Abschnitt 1.3 erläutert, aktiviert werden. In gesunden Tieren supprimieren Tregs die Aktivierung dieser autoaggressiven Zellen, während die $CK2\beta$ defizienten Tregs in $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Mäusen aufgrund einer fehlerhaften Suppression hierzu nicht vollständig in der Lage sind. So könnte es speziell in einem Th2-Antworten fördernden Zytokinmilieu wie z.B. in der Lunge zur Aktivierung autoreaktiver T-Zellen und damit zur Entwicklung einer Th2-vermittelten Autoimmunreaktion kommen. Bei der Suche nach den molekularen Ursachen der fehlgesteuerten Suppression $CK2\beta$ -defizienter Tregs wurde zunächst die Expression verschiedener Moleküle untersucht, die an der Treg-vermittelten Suppression beteiligt sind. Bei der durchflusszytometrischen Analyse konnten jedoch keine Unterschiede in der Expression der untersuchten Moleküle festgestellt werden. Wie aus dieser Untersuchung jedoch hervorging, weisen $CK2\beta$ defiziente Tregs eine leicht reduzierte Expression der TZR-assoziierten Signalkomponente $CD3\epsilon$ und des TZR auf. Diese Ergebnisse könnten dabei auf das inflammatorische Milieu in $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Tieren zurückzuführen sein. Die ständige Exposition mit diesen proinflammatorischen Signalen könnte zu einem *Feedback* Mechanismus führen, durch welchen es zur reduzierten Expression des Signalmoleküls $CD3\epsilon$ und des TZR Kette kommt. Parallel würde dieser *Feedback* Mechanismus zu einer gesteigerten Expression inhibitorischer Moleküle, die an der Treg-vermittelten Suppression beteiligt sind, führen. Die potenziellen Veränderungen für $CK2\beta$ defiziente Tregs, die sich durch das proinflammatorische Milieu in $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Tieren ergeben, sind in Abbildung 4.2 graphisch zusammengefasst.

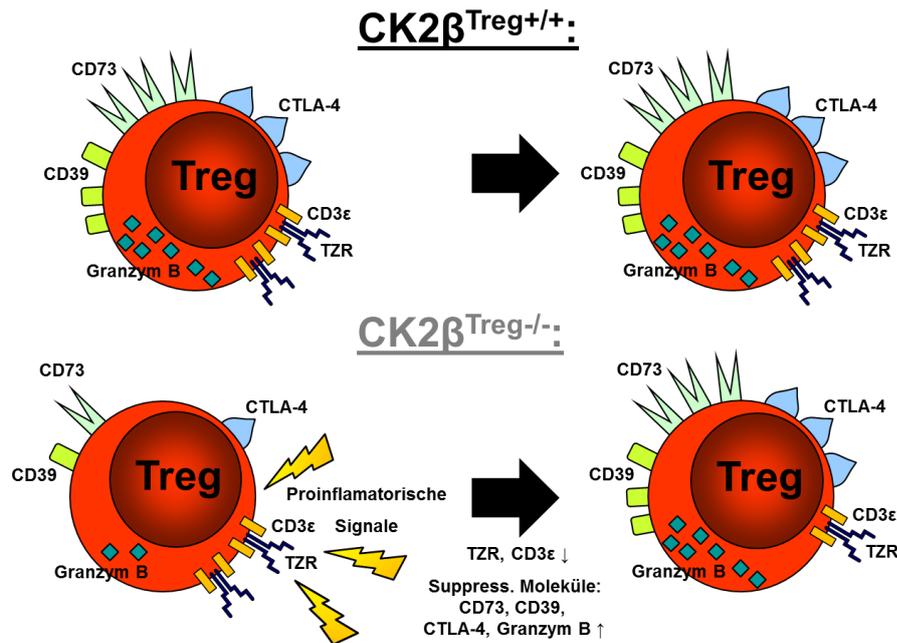


Abbildung 4.2: Potenzielle Effekte des proinflammatorischen Milieus in CK2β^{Treg-/-}-Mäusen auf die Expression verschiedener suppressiver Moleküle und des TZR-Komplex. CK2β suffiziente Tregs sind in der Lage autoaggressive T-Zellen zu supprimieren und die Entstehung einer autoimmunen Inflammation zu verhindern. CK2β defiziente Tregs hingegen können diese autoimmune Inflammation jedoch nicht vollständig supprimieren, wodurch sich in CK2β^{Treg-/-}-Mäusen ein proinflammatorisches Milieu entwickelt. Die Exposition mit diesen proinflammatorischen Signalen führt in CK2β defizienten Tregs potenziell zu einer gesteigerten Expression suppressiver Moleküle (z.B. CD73, CD39, CTLA-4 und Granzym B). Parallel kommt es zu einer kompensatorischen Reduktion der Expression des TZR und der TZR-assoziierten Signalkomponente CD3ε.

Um herauszufinden, inwieweit dieser potenzielle *Feedback* Mechanismus Unterschiede in der Expression verschiedener, suppressiver Moleküle nivelliert, könnten gemischte Knochenmarkschimäre, mit Knochenmark aus CK2β^{Treg+/+}- und CK2β^{Treg-/-}-Mäusen generiert werden. In diesen Chimären sollte die Entstehung eines proinflammatorischen Milieus durch die Gegenwart CK2β suffizienter Tregs verhindert werden. Hierdurch könnte man die Expression der suppressiven Moleküle auf CK2β defizienten Tregs direkt und ohne den störenden Einfluss proinflammatorischer Signale analysieren. Ob die beobachtete, reduzierte Expression der TZR-Komponenten in CK2β defizienten Tregs die Inflammation in CK2β^{Treg-/-}-Mäusen erklären kann, ist ohne die Ergebnisse eines solchen Experiments jedoch fraglich.

Als Erklärung für die fehlerhafte Suppression speziell Th2-vermittelter Immunantworten konnten in weiteren Versuchen stattdessen zwei andere mögliche Ansätze geliefert werden. Zum einen wurde in den durchgeführten Experimenten festgestellt, dass CK2β defiziente Tregs eine geringere Expression des Treg-spezifischen Transkriptionsfaktors Foxp3 aufweisen. Wie durch die Forschergruppe um R.A.

Flavell zuvor aufgedeckt wurde, führt eine geminderte Foxp3 Expression zur Entwicklung eines Th2-vermittelten autoimmunen Phänotyps, ähnlich wie in $CK2\beta^{Treg-/-}$ Tieren¹²¹. Die Autoren dieser Studie fügten eine Luziferase und *enhanced Green Fluorescent Protein* (eGFP) enthaltende Genkassette in die 3'-untranslatierte Region des *Foxp3*-Lokus ein¹²¹. Hierdurch konnten sie Mäuse mit einem *Foxp3*-IRES-luciferase-IRES-eGFP (FILIG) Allel generieren, in welchen die Tregs eine reduzierte Foxp3 Expression aufweisen¹²¹. Die Stabilität der Foxp3 Expression wird in Tregs zu wesentlichen Teilen von einem speziellen Promotor Element, der sogenannten *conserved non-coding sequence 2* (CNS2), oder auch *Treg-specific demethylated region* (TSDR) genannt, reguliert⁵². Die genetische Deletion dieser TSDR in Tregs führt zu einem progressiven Verlust der Foxp3 Expression, ausgelöst durch die Proliferation der Zellen¹⁴⁸. Im Gegensatz dazu ist die Induktion von Foxp3 in den entsprechenden Mäusen in Thymus und Peripherie unbeeinflusst¹⁴⁸. Mittels Luziferase-Reporter-Gen-Studien konnte die Bindung verschiedener Faktoren, wie z.B. CREB/ATF Faktoren¹⁴⁹, STAT5⁵², Ets-1¹⁵⁰, Runx1 und sein Ko-Faktor CBF β ¹⁴⁸, sowie Foxp3¹⁴⁸ selbst, an die TSDR nachgewiesen werden. Im Hinblick auf eine mögliche Regulation dieser Faktoren durch die CK2 weisen CREB/ATF¹⁰⁰, sowie STAT5¹⁵¹ direkte Phosphorylierungssequenzen für die CK2 auf und könnten demnach potentiell durch die CK2 reguliert werden. Für Ets-1, Runx1, CBF β und Foxp3 hingegen sind keine direkten Verbindungen zur CK2 bekannt. Die folgende Abbildung 4.3 fasst die Transkriptionsfaktoren, welche die Stabilität von Foxp3 steuern, und ihre mögliche Regulation durch die CK2 zusammen.

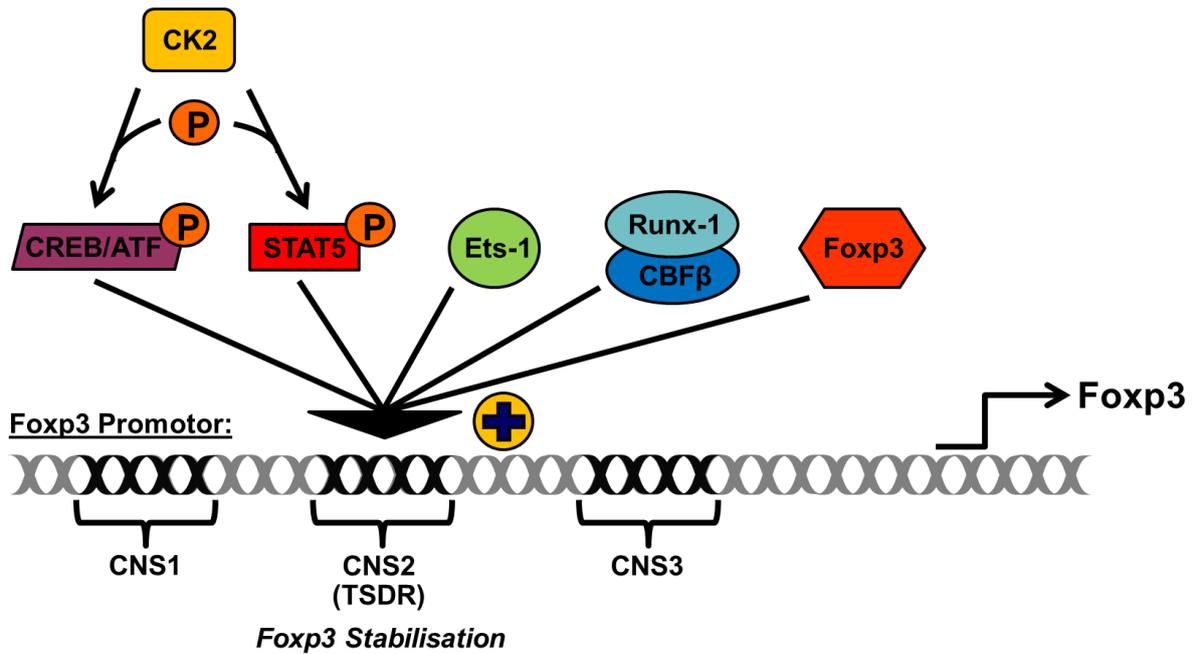
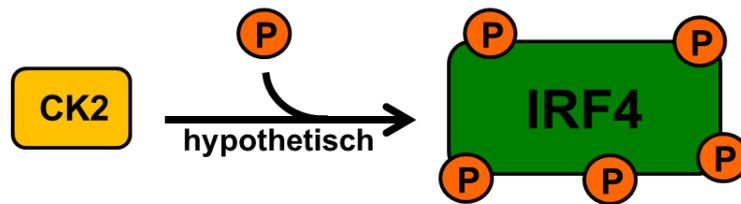


Abbildung 4.3: Transkriptionsfaktoren, die die Stabilität von FoXP3 steuern, und ihre mögliche Regulation durch die CK2. Die Transkriptionsfaktoren CREB/ATF, STAT5, Ets-1, FoXP3, sowie Runx-1 und sein Co-faktor CBFβ binden an die *Treg-specific demethylated region* (TSDR) und beeinflussen maßgeblich die Stabilität der FoXP3 Expression in Tregs. Von diesen Faktoren ist die CK2 im Stande CREB/ATF und STAT5 zu phosphorylieren und in ihrer Aktivität zu regulieren.

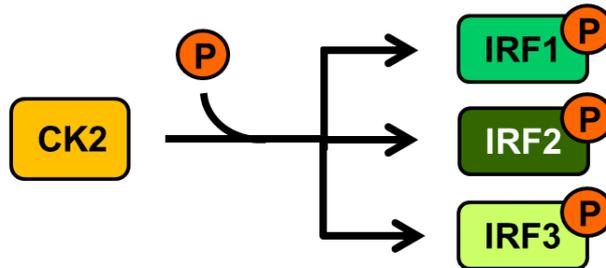
Wie der Name TSDR zudem impliziert, erfolgt die Kontrolle der FoXP3 Stabilität zusätzlich über die epigenetische Regulation der Zugänglichkeit der TSDR, mittels Methylierung. Zwar ist derzeit nicht bekannt, ob die CK2 im Stande ist die Aktivität relevanter Methylasen zu regulieren, jedoch lassen sich etwa 16% der bekannten CK2 Substrate in die Gruppe von Proteinen einordnen, welche die Funktion von DNA und RNA, sowie die Proteinsynthese regulieren¹⁰⁰. Um eine direkte Beziehung der CK2 zur Regulation der FoXP3 Stabilität nachzuweisen, sind demnach noch weitere Untersuchungen notwendig. Ein erster denkbarer Ansatz hierzu wäre die Methylierung der TSDR in CK2β defizienten Tregs zu messen. Die Ergebnisse der Publikation der FILIG Maus durch Flavell suggerieren zudem einen zweiten Ansatz, um eine direkte Verbindung zwischen der CK2 und der Stabilität der FoXP3 Expression offenzulegen. Wie von Flavell beschrieben kommt es durch den Verlust von FoXP3 in Treg Zellen zur Transformation dieser Zellen zu Th2 Zellen. So könnte durch das Einkreuzen eines sogenannten *Fate-reporters* in den Stamm der CK2β^{Treg-/-} Mäuse der notwendige Nachweis erbracht werden. Durch diesen *Fate-reporter* beginnen die Zellen der entsprechenden Mäuse, die zu einem beliebigen Zeitpunkt ihrer Existenz FoXP3 exprimieren, dauerhaft das rote Fluoreszenz-Protein (RFP) zu produzieren. Wenn die CK2 also essenziell für die Stabilität von FoXP3 ist, müssten in diesen Reporter-Tieren RFP⁺FoXP3⁻ „exTreg“ Zellen existieren, welche zudem verstärkt den Th2-spezifischen Transkriptionsfaktor GATA3 exprimieren sollten. Abgesehen von der reduzierten FoXP3-Expression

konnte im Rahmen dieser Arbeit eine weitere mögliche Ursache für die in $CK2\beta^{Treg-/-}$ Mäusen beobachtete, spontane Th2-vermittelte Autoimmunreaktion ausgemacht werden. So weisen $CK2\beta$ defiziente Tregs, wie in Abschnitt 3.7 beschrieben, eine stark verringerte Expression des Transkriptionsfaktors IRF4 auf. Den Ergebnissen zu Folge ist die CK2 wichtig für die Expression des Transkriptionsfaktors IRF4 in Tregs. Wie zuvor bereits erwähnt, sind Tregs in der Lage, sich durch die Expression von IRF4 auf die Suppression Th2-vermittelter Immunantworten zu spezialisieren⁹². So entwickeln Mäuse mit Treg-spezifischer Deletion von IRF4 einen Th2-vermittelten autoimmunen Phänotyp, einhergehend mit der Produktion der IL-4-abhängigen Antikörper-Isotypen IgG1 und IgE, sowie Gewebeläsionen⁹², vergleichbar mit dem in $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Mäusen beschriebenen Phänotyp. Die reduzierte IRF4 Expression in $CK2\beta$ defizienten Tregs könnte demnach den Th2-vermittelten autoimmunen Phänotyp in $CK2\beta^{Treg-/-}$ Mäusen erklären, da $CK2\beta$ defiziente Tregs durch die verringerte IRF4-Expression nur eingeschränkt zur Suppression Th2-vermittelter Immunreaktionen befähigt sind. Für die CK2 ist bisher keine direkte, regulatorische Beziehung zu IRF4 bekannt, allerdings existieren in humanem und murinem IRF4 jeweils fünf potenzielle Phosphorylierungssequenzen für die CK2¹⁵². Zudem konnte eine CK2-abhängige Phosphorylierung für die weiteren IRF-Familienmitglieder IRF1, IRF2 und IRF3 nachgewiesen werden¹⁵². Eine Regulierung der IRF4-Aktivität durch die CK2 ist daher als wahrscheinlich anzunehmen. Zudem greift die CK2 in Signalwege ein, welche zur Induktion von IRF4 führen. In T-Zellen z.B. resultieren Signale des TZR in der induzierten Expression von IRF4¹⁵³. Wie durch die Ergebnisse des *Kinomarray* in Abschnitt 1.4 belegt wird, führt das Signal des TZR zu einer gesteigerten Aktivität der CK2, insbesondere in Tregs, welche potentiell zur Induktion von IRF4 beitragen könnte. Neben dem Signal des TZR wird auch nach Kontakt mit dem Th2-spezifischen Zytokin IL-4 die Expression von IRF4 induziert¹⁵⁴. Auch hier greift die CK2 aktivierend in den, von IL-4 ausgehenden, JAK-STAT Signalweg ein, indem sie mit den Januskinasen (JAK) 1 und 2 assoziiert und im Stande ist, JAK2 zu phosphorylieren¹⁵¹. Die Argumente, die eine mögliche Regulation von IRF4 durch die CK2 belegen, sind in der folgenden Abbildung 4.4 zusammengefasst.

1. Hypothetische CK2 Phosphorylierungssequenzen:



2. CK2 Phosphorylierung anderer IRF-Mitglieder:



3. IRF4 induzierende, CK2-abhängige Signalwege:

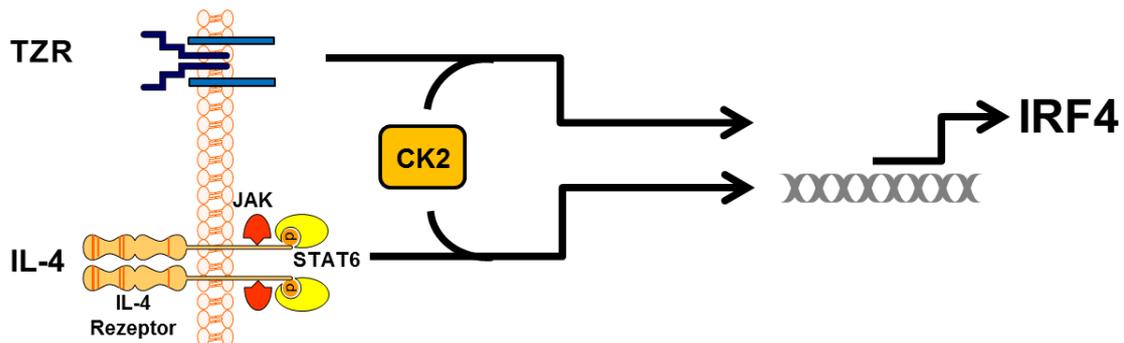


Abbildung 4.4: Belege einer Regulation von IRF4 durch die CK2. **1.** In der Primärsequenz von humanem und murinem IRF4 existieren jeweils 5 potenzielle Phosphorylierungssequenzen der CK2. **2.** Für die IRF-Familienmitglieder IRF1-3 existieren Beweise einer direkten Phosphorylierung durch die CK2. **3.** Die CK2 greift aktivierend in Signalwege ein, welche die Expression von IRF4 induzieren.

Um den molekularen Mechanismus der Regulation von IRF4 durch die CK2, speziell in Tregs, weiter zu charakterisieren, sind jedoch noch weitere Untersuchungen notwendig.

Zusammenfassend konnte die CK2, anhand der Analyse der CK2 β ^{Treg^{-/-}}-Mäuse, als mögliches Zielmolekül identifiziert werden, um die Treg-vermittelte Suppression Th2-spezifischer Immunreaktionen zu manipulieren. Daher könnten CK2 Inhibitoren potentiell dazu genutzt werden, um Krankheiten zu therapieren, die auf einer mangelhaften Th2 Antwort basieren. Wie der in Abschnitt 1.4 beschriebene *Kinomarray* offenbart, zeigt die CK2 in Tregs eine stärkere CK2 Aktivität als in Tcons. Hierdurch ergibt sich ein denkbare therapeutisches Fenster, um gezielt die Funktion von Tregs zu manipulieren, ohne die Aktivität von Tcons zu beeinflussen. Wie die Analyse der

CK2 $\beta^{\text{Treg-/-}}$ Mäuse zeigte, ergibt sich für die aus der Dysfunktion der CK2 in Tregs entstehenden Effekte zusätzlich eine Prävalenz für mukosale Organe, wie die Lunge. Aus dieser Prävalenz resultiert außerdem der Vorteil, dass eventuelle Nebenwirkungen, die durch die Manipulation der CK2 in Tregs in anderen Geweben ausgelöst werden, reduziert werden. Pharmakologische CK2 Inhibitoren könnten also Anwendung finden, um etwa die Suppression von Th2-Antworten durch Tregs bei hartnäckigen Parasiteninfektionen zu blockieren. Nach WHO (*World Health Organisation*) Informationen leiden derzeit Milliarden Menschen an parasitären Erkrankungen, die jährlich Millionen von Toten fordern. So geht die WHO beispielsweise davon aus, dass jeder vierte Mensch parasitäre Würmer trägt. Durch die Wirkung von CK2 Inhibitoren auf die Suppression von Tregs könnten also stärkere Th2 Antworten induziert werden, die zur Bekämpfung dieser Infektionen beitragen. Neben der Inhibition der CK2 würden sich durch Möglichkeiten der Aktivierung der CK2 in Tregs weitere Anwendungsfelder eröffnen. Bereits in Abschnitt 4.2 wurden Polyamine, wie Spermin und Spermidin, als Aktivatoren der CK2 diskutiert. Wie die durch Analyse der CK2 $\beta^{\text{Treg-/-}}$ Mäuse erzielten Ergebnisse zeigen, könnten derartige CK2 Aktivatoren hypothetisch zur Steigerung der Treg-vermittelten Suppression bei allergischen Erkrankungen wie Asthma eingesetzt werden. Eine Wirkung dieser Substanzen auf die suppressiven Eigenschaften von Tregs muss jedoch zuvor nachgewiesen werden.

Insgesamt konnte in dieser Arbeit eine bedeutende Rolle der CK2 an der Treg-vermittelten Suppression insbesondere Th2-gesteuerter Immunantworten identifiziert werden. Diese Funktion erfüllt die CK2 möglicher Weise durch die Stabilisation der Expression des Treg-spezifischen Transkriptionsfaktors Foxp3 oder über die Induktion des Transkriptionsfaktors IRF4, der wiederum eine herausragende Funktion bei der Treg-vermittelten Suppression von Th2 Zellen ausfüllt. Die möglichen Mechanismen, über welche die CK2 die Suppression Th2-vermittelter Immunreaktionen steuert, ist in Abbildung 4.5 zusammengefasst.

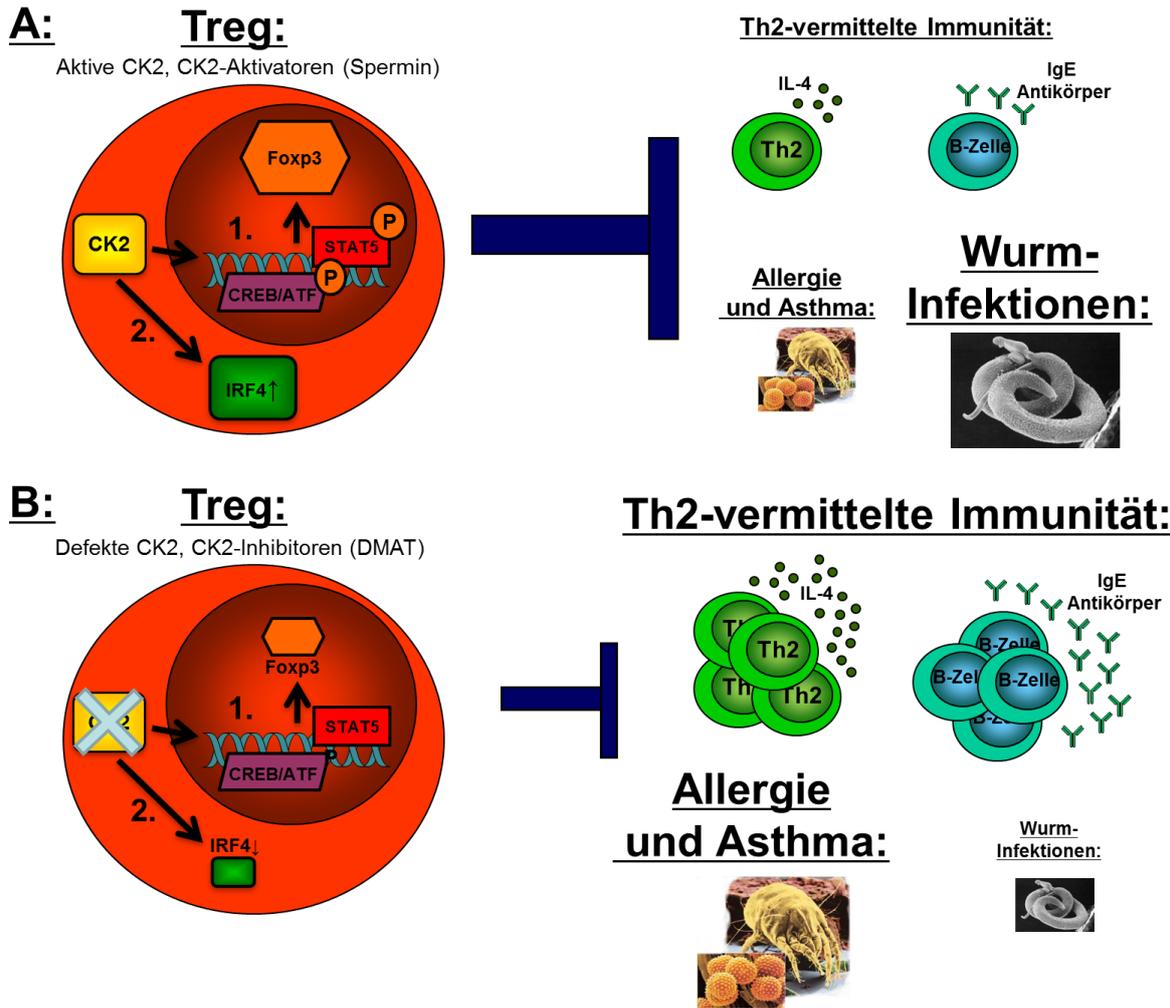


Abbildung 4.5: CK2-abhängiger Mechanismus der Suppression Th2-vermittelter Immunreaktionen. **A:** Eine intakte CK2 steuert die Suppression Th2-vermittelter Immunreaktionen, entweder durch die Stabilisierung der Fc γ R3-Expression (1.), oder über die Regulation der Expression des Transkriptionsfaktors IRF4 (2.). IRF4 wiederum reguliert gemeinsam mit Fc γ R3 die Expression verschiedener Gene, welche Tregs zur Suppression von Th2-Antworten spezialisieren. Durch die Aktivierung der CK2 mittels Polyaminen (z.B. Spermin) könnte die Treg-vermittelte Suppression von Th2-Antworten potenziell verstärkt und auf diese Weise allergische Reaktionen wie z.B. Asthma behandelt werden. Auf der anderen Seite könnte eine defekte CK2 Aktivität oder die Inhibition der CK2 mittels pharmakologischer Inhibitoren (z.B. DMAT) dazu genutzt werden, um die Suppression von Th2-Antworten aufzuheben. Hierdurch könnten stärkere Th2-vermittelte Immunreaktionen generiert werden, welche bei der Behandlung parasitärer Wurminfektionen nutzbar wären.

Wie aus Abbildung 4.5 hervorgeht, stellt die CK2 ein interessantes Zielmolekül dar, um die Suppression Th2-basierter Immunantworten mittels pharmakologischer CK2 Inhibitoren zu unterbinden. Auf diese Weise könnten stärkere Th2-vermittelte Immunreaktionen gegen hartnäckige Parasiteninfektionen generiert werden. Im Gegensatz dazu könnten natürliche Aktivatoren der CK2 wie Polyamine potentiell dazu genutzt werden, um die Treg-gesteuerte Suppression von Th2 Zellen zu steigern. Anwendungsfeld einer solchen, hypothetischen Therapie wären allergische Reaktionen,

wie z.B. allergisches Asthma, wo eine gesteigerte Suppression von Th2-vermittelten Immunantworten erwünscht ist.

5 Zusammenfassung

Regulatorische T-Zellen (Tregs) leisten durch ihre suppressiven Eigenschaften einen essenziellen Beitrag zur Aufrechterhaltung der immunologischen Toleranz. Sie verhindern schädliche Immunreaktionen gegen Autoantigene, kommensale Bakterien, sowie harmlose Nahrungsmittelbestandteile. Gleichzeitig gewährleisten sie die Entwicklung effektiver Immunantworten gegen eindringende Pathogene, wie z.B. Parasiten, Bakterien und Viren. Damit haben Tregs direkten Einfluss auf das Gleichgewicht zwischen Immunität und Toleranz. Fehler in der suppressiven Funktionsweise von Tregs begünstigen daher auf der einen Seite die Entstehung zahlreicher autoimmuner Erkrankungen und Allergien. Auf der anderen Seite können Tregs Immunreaktionen bei chronischen Infektionen reduzieren, sowie die Entstehung effektiver Immunantworten gegen Tumore hemmen. Ihre Beteiligung an der Ätiologie all dieser Krankheiten macht Tregs zu einem bedeutenden potenziellen Zielobjekt, um diese Krankheiten effektiv zu therapieren. Die Erweiterung des Grundwissens um die molekularen Mechanismen der Treg-vermittelten Suppression ist daher ein notwendiger Schritt bei der Entwicklung Treg-basierter Therapieansätze. 2003 konnte mit Foxp3 ein Transkriptionsfaktor identifiziert werden, der maßgeblich die suppressiven Funktionen von Tregs steuert. Um weiteren Einblick in die der Suppression zugrundeliegenden Signalwege zu erhalten, wurde im Institut für Immunologie ein komparativer Kinomarray durchgeführt, anhand dessen die Casein Kinase 2 (CK2) als eine der aktivsten Kinasen in Tregs identifiziert wurde (Daten freundlicherweise von Prof. Dr. Tobias Bopp bereitgestellt).

Basierend auf den Ergebnissen des Kinomarrays wurde in dieser Arbeit die Funktion der CK2 in Tregs untersucht. Dabei konnte in *in vitro* Experimenten die Treg-vermittelte Suppression durch den pharmakologische CK2 Inhibitor DMAT aufgehoben werden. Weil derartige Inhibitoren jedoch nicht absolut spezifisch die Aktivität nur einer Kinase supprimieren, wurden außerdem Mäuse mit konditionalem „knockout“ der CK2 β Untereinheit spezifisch in Tregs gekreuzt (CK2 $\beta^{\text{Treg-/-}}$ Mäuse). Die Analyse dieser Tiere offenbarte eine essenzielle Beteiligung der CK2 an den suppressiven Funktionen von Tregs. So entwickeln CK2 $\beta^{\text{Treg-/-}}$ Mäuse mit zunehmendem Alter Splenomegalien und Lymphadenopathien, von denen in besonderem Maße die Mukosa-assoziierten Lymphknoten betroffen sind. Eine Analyse des Aktivierungsstatus der T-Zellen in den Tieren konnte zudem einen erhöhten Anteil sogenannter Effektor-Gedächtnis T-Zellen aufdecken, die charakteristische Merkmale eines Th2 Phänotyps zeigten. Erhöhte Titer des Antikörperisotyps IgE in den Seren von CK2 $\beta^{\text{Treg-/-}}$ Mäusen suggerieren zusätzlich eine fehlerhafte Suppression speziell Th2-vermittelter Immunantworten durch CK2 β -defiziente Tregs. In Th2-vermittelten Asthma Experimenten *in vivo*

konnte der Verdacht der fehlerhaften Kontrolle von Th2-Antwort bestätigt werden, wobei zusätzlich aufgedeckt wurde, dass bereits unbehandelte $CK2\beta^{Treg-/-}$ Mäuse Zeichen einer Entzündungsreaktion in der Lunge aufweisen. Bei der Suche nach den molekularen Ursachen der fehlerhaften Suppression Th2-vermittelter Immunantworten durch $CK2\beta$ -defiziente Tregs konnten zwei mögliche Erklärungsansätze gefunden werden. Zum einen zeigen $CK2\beta$ -defiziente Tregs eine verringerte Expression von Foxp3, was, in Analogie zu Ergebnissen der Gruppe von R. Flavell¹²¹, zu einer Konversion von Tregs zu Th2 Zellen und damit zur Entstehung eines Th2-basierten, autoimmunen Phänotyps führt. Des Weiteren weisen $CK2\beta$ -defiziente Tregs eine reduzierte Expression des Transkriptionsfaktors IRF4 auf, der in Tregs entscheidend für die Kontrolle Th2-basierter Immunreaktionen ist⁹². Die dargelegten Ergebnisse identifizieren die CK2 damit als Kinase, die entscheidend an der Treg-vermittelten Suppression speziell Th2-basierter Immunantworten beteiligt ist. Demnach könnten pharmakologische CK2 Inhibitoren beispielsweise dazu eingesetzt werden, um die Treg-vermittelte Suppression im Rahmen chronischer Parasiten-Infektionen aufzuheben. Die in $CK2\beta^{Treg-/-}$ Mäusen beobachtete Prävalenz der Funktion der CK2 für Mukosa-assoziierte Organe stellt dabei einen zusätzlichen Vorteil dar, weil systemische Nebenwirkungen, die durch die Blockade der Treg-vermittelte Suppression entstehen, zumindest in nicht-Mukosa-assoziierten Geweben nicht zu erwarten sind.

6 Literaturverzeichnis

1. Medzhitov, R. & Janeway, C. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunological reviews* **173**, 89–97 (2000).
2. Cañas, C. a & Cañas, F. The biological significance of evolution in autoimmune phenomena. *Autoimmune diseases* **2012**, 784315 (2012).
3. Von Boehmer, H. Self recognition by the immune system. *European journal of biochemistry / FEBS* **194**, 693–8 (1990).
4. Janeway, C. a & Medzhitov, R. Innate immune recognition. *Annual review of immunology* **20**, 197–216 (2002).
5. Brown, K. L. & Hancock, R. E. W. Cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Current opinion in immunology* **18**, 24–30 (2006).
6. Tomlinson, S. Complement defense mechanisms. *Current opinion in immunology* **5**, 83–9 (1993).
7. Takeuchi, O. & Akira, S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* **140**, 805–20 (2010).
8. Tauber, A. I. Metchnikoff and the phagocytosis theory. *Nature reviews. Molecular cell biology* **4**, 897–901 (2003).
9. Gudmundsson, G. H. & Agerberth, B. Neutrophil antibacterial peptides, multifunctional effector molecules in the mammalian immune system. *Journal of immunological methods* **232**, 45–54 (1999).
10. Biron, C. a, Nguyen, K. B., Pien, G. C., Cousens, L. P. & Salazar-Mather, T. P. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annual review of immunology* **17**, 189–220 (1999).
11. Dinarello, C. a. Historical insights into cytokines. *European journal of immunology* **37 Suppl 1**, S34–45 (2007).
12. Flannagan, R. S., Cosío, G. & Grinstein, S. Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nature reviews. Microbiology* **7**, 355–66 (2009).
13. Bowie, A. G. & Unterholzner, L. Viral evasion and subversion of pattern-recognition receptor signalling. *Nature reviews. Immunology* **8**, 911–22 (2008).
14. Davis, M. M. & Bjorkman, P. J. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* **334**, 395–402 (1988).
15. Savina, A. & Amigorena, S. Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. *Immunological reviews* **219**, 143–56 (2007).

16. Palm, N. W. & Medzhitov, R. Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. *Immunological reviews* **227**, 221–33 (2009).
17. Banchereau, J. & Steinman, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**, 245–52 (1998).
18. Koch, U. & Radtke, F. Mechanisms of T cell development and transformation. *Annual review of cell and developmental biology* **27**, 539–62 (2011).
19. Sprent, J. & Surh, C. D. T cell memory. *Annual review of immunology* **20**, 551–79 (2002).
20. Morris, G. P. & Allen, P. M. How the TCR balances sensitivity and specificity for the recognition of self and pathogens. *Nature immunology* **13**, 121–8 (2012).
21. Venturi, V., Price, D. A., Douek, D. C. & Davenport, M. P. The molecular basis for public T-cell responses? *Nature reviews. Immunology* **8**, 231–8 (2008).
22. Kerjaschki, D. The crucial role of macrophages in lymphangiogenesis. *The Journal of clinical investigation* **115**, 2316–9 (2005).
23. Bradley, L. M., Watson, S. R. & Swain, S. L. Entry of naive CD4 T cells into peripheral lymph nodes requires L-selectin. *The Journal of experimental medicine* **180**, 2401–6 (1994).
24. Arbonés, M. L. *et al.* Lymphocyte homing and leukocyte rolling and migration are impaired in L-selectin-deficient mice. *Immunity* **1**, 247–60 (1994).
25. Kushwah, R. & Hu, J. Complexity of dendritic cell subsets and their function in the host immune system. *Immunology* **133**, 409–19 (2011).
26. Banchereau, J. *et al.* Immunobiology of dendritic cells. *Annual review of immunology* **18**, 767–811 (2000).
27. Liu, Y. J., Kanzler, H., Soumelis, V. & Gilliet, M. Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation. *Nature immunology* **2**, 585–9 (2001).
28. Kapsenberg, M. L. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nature reviews. Immunology* **3**, 984–93 (2003).
29. Ivanov, I. I. *et al.* Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine. *Cell host & microbe* **4**, 337–49 (2008).
30. Zhu, J., Yamane, H. & Paul, W. E. Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annual review of immunology* **28**, 445–89 (2010).
31. Yamane, H. & Paul, W. E. Early signaling events that underlie fate decisions of naive CD4(+) T cells toward distinct T-helper cell subsets. *Immunological reviews* **252**, 12–23 (2013).
32. Amsen, D. *et al.* Instruction of distinct CD4 T helper cell fates by different notch ligands on antigen-presenting cells. *Cell* **117**, 515–26 (2004).
33. Maekawa, Y. *et al.* Delta1-Notch3 interactions bias the functional differentiation of activated CD4+ T cells. *Immunity* **19**, 549–59 (2003).

Literaturverzeichnis

34. Weninger, W., Manjunath, N. & von Andrian, U. H. Migration and differentiation of CD8+ T cells. *Immunological reviews* **186**, 221–33 (2002).
35. Murphy, K. M. & Stockinger, B. Effector T cell plasticity: flexibility in the face of changing circumstances. *Nature immunology* **11**, 674–80 (2010).
36. Hsieh, C. S. *et al.* Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science (New York, N.Y.)* **260**, 547–9 (1993).
37. Thierfelder, W. E. *et al.* Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells. *Nature* **382**, 171–4 (1996).
38. Bettelli, E., Korn, T., Oukka, M. & Kuchroo, V. K. Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature* **453**, 1051–7 (2008).
39. Dardalhon, V., Korn, T., Kuchroo, V. K. & Anderson, A. C. Role of Th1 and Th17 cells in organ-specific autoimmunity. *Journal of autoimmunity* **31**, 252–6 (2008).
40. Neurath, M. F. The Transcription Factor T-bet Regulates Mucosal T Cell Activation in Experimental Colitis and Crohn's Disease. *Journal of Experimental Medicine* **195**, 1129–1143 (2002).
41. Zhu, J., Guo, L., Watson, C. J., Hu-Li, J. & Paul, W. E. Stat6 is necessary and sufficient for IL-4's role in Th2 differentiation and cell expansion. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **166**, 7276–81 (2001).
42. Paul, W. E. & Zhu, J. How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified? *Nature reviews. Immunology* **10**, 225–35 (2010).
43. Von Bubnoff, D. *et al.* Natural killer cells in atopic and autoimmune diseases of the skin. *The Journal of allergy and clinical immunology* **125**, 60–8 (2010).
44. Amsen, D. *et al.* Direct regulation of Gata3 expression determines the T helper differentiation potential of Notch. *Immunity* **27**, 89–99 (2007).
45. Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M. & Kuchroo, V. K. IL-17 and Th17 Cells. *Annual review of immunology* **27**, 485–517 (2009).
46. Leberman, D. A. & Coffman, R. L. Interleukin 4 causes isotype switching to IgE in T cell-stimulated clonal B cell cultures. *The Journal of experimental medicine* **168**, 853–62 (1988).
47. Lohoff, M. *et al.* Dysregulated T helper cell differentiation in the absence of interferon regulatory factor 4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 11808–12 (2002).
48. Huber, M. *et al.* IRF4 is essential for IL-21-mediated induction, amplification, and stabilization of the Th17 phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 20846–51 (2008).
49. Zhou, L. & Littman, D. R. Transcriptional regulatory networks in Th17 cell differentiation. *Current opinion in immunology* **21**, 146–52 (2009).

50. Codarri, L. *et al.* ROR γ t drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. *Nature immunology* **12**, 560–7 (2011).
51. Kullberg, M. C. *et al.* IL-23 plays a key role in *Helicobacter hepaticus*-induced T cell-dependent colitis. *The Journal of experimental medicine* **203**, 2485–94 (2006).
52. Rudensky, A. Y. Regulatory T cells and Foxp3. *Immunological reviews* **241**, 260–8 (2011).
53. Josefowicz, S. Z., Lu, L.-F. & Rudensky, A. Y. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annual review of immunology* **30**, 531–64 (2012).
54. Fontenot, J. D. & Rudensky, A. Y. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nature immunology* **6**, 331–7 (2005).
55. Mills, K. H. G. TLR-dependent T cell activation in autoimmunity. *Nature reviews. Immunology* **11**, 807–22 (2011).
56. Berer, K. *et al.* Commensal microbiota and myelin autoantigen cooperate to trigger autoimmune demyelination. *Nature* **479**, 538–41 (2011).
57. Wu, H.-J. *et al.* Gut-residing segmented filamentous bacteria drive autoimmune arthritis via T helper 17 cells. *Immunity* **32**, 815–27 (2010).
58. Lee, Y. K., Menezes, J. S., Umesaki, Y. & Mazmanian, S. K. Proinflammatory T-cell responses to gut microbiota promote experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108 Suppl**, 4615–22 (2011).
59. Takahama, Y. Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nature reviews. Immunology* **6**, 127–35 (2006).
60. Starr, T. K., Jameson, S. C. & Hogquist, K. a. Positive and negative selection of T cells. *Annual review of immunology* **21**, 139–76 (2003).
61. Franzke, a, Hunger, J. K., Dittmar, K. E. J., Ganser, a & Buer, J. Regulatory T-cells in the control of immunological diseases. *Annals of hematology* **85**, 747–58 (2006).
62. Siggs, O. M., Makaroff, L. E. & Liston, A. The why and how of thymocyte negative selection. *Current opinion in immunology* **18**, 175–83 (2006).
63. Sakaguchi, S. Naturally arising CD4⁺ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annual review of immunology* **22**, 531–62 (2004).
64. Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T. & Ono, M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* **133**, 775–87 (2008).
65. Campbell, D. J. & Koch, M. a. Phenotypical and functional specialization of FOXP3⁺ regulatory T cells. *Nature reviews. Immunology* **11**, 119–30 (2011).
66. Belkaid, Y. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nature reviews. Immunology* **7**, 875–88 (2007).

Literaturverzeichnis

67. Von Boehmer, H. & Daniel, C. Therapeutic opportunities for manipulating T(Reg) cells in autoimmunity and cancer. *Nature reviews. Drug discovery* **12**, 51–63 (2012).
68. 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. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **155**, 1151–64 (1995).
69. Powrie, F., Leach, M. W., Mauze, S., Caddle, L. B. & Coffman, R. L. Phenotypically distinct subsets of CD4+ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice. *International immunology* **5**, 1461–71 (1993).
70. Asano, M., Toda, M., Sakaguchi, N. & Sakaguchi, S. Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *The Journal of experimental medicine* **184**, 387–96 (1996).
71. Hori, S., Nomura, T. & Sakaguchi, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science (New York, N.Y.)* **299**, 1057–61 (2003).
72. Fontenot, J. D., Gavin, M. a & Rudensky, A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nature immunology* **4**, 330–6 (2003).
73. Hsieh, C.-S., Zheng, Y., Liang, Y., Fontenot, J. D. & Rudensky, A. Y. An intersection between the self-reactive regulatory and nonregulatory T cell receptor repertoires. *Nature immunology* **7**, 401–10 (2006).
74. Schmidt, A., Oberle, N. & Krammer, P. H. Molecular mechanisms of treg-mediated T cell suppression. *Frontiers in immunology* **3**, 51 (2012).
75. Pandiyan, P., Zheng, L., Ishihara, S., Reed, J. & Lenardo, M. J. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nature immunology* **8**, 1353–62 (2007).
76. Wing, K. *et al.* CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science (New York, N.Y.)* **322**, 271–5 (2008).
77. Huang, C.-T. *et al.* Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity* **21**, 503–13 (2004).
78. Liang, B. *et al.* Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **180**, 5916–26 (2008).
79. Onishi, Y., Fehervari, Z., Yamaguchi, T. & Sakaguchi, S. Foxp3 natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively. (2008).
80. Yu, X. *et al.* The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells. *Nature immunology* **10**, 48–57 (2009).
81. Von Boehmer, H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nature immunology* **6**, 338–44 (2005).

82. Rubtsov, Y. P. *et al.* Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. *Immunity* **28**, 546–58 (2008).
83. Li, M. O., Wan, Y. Y. & Flavell, R. a. T cell-produced transforming growth factor-beta1 controls T cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell differentiation. *Immunity* **26**, 579–91 (2007).
84. Gondek, D. C., Lu, L.-F., Quezada, S. a, Sakaguchi, S. & Noelle, R. J. Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **174**, 1783–6 (2005).
85. Fassbender, M. *et al.* Cyclic adenosine monophosphate and IL-10 coordinately contribute to nTreg cell-mediated suppression of dendritic cell activation. *Cellular immunology* **265**, 91–6 (2010).
86. Bopp, T. *et al.* Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *The Journal of experimental medicine* **204**, 1303–10 (2007).
87. Bodor, J., Fehervari, Z., Diamond, B. & Sakaguchi, S. ICER/CREM-mediated transcriptional attenuation of IL-2 and its role in suppression by regulatory T cells. *European journal of immunology* **37**, 884–95 (2007).
88. Borsellino, G. *et al.* Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood* **110**, 1225–32 (2007).
89. Deaglio, S. *et al.* Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *The Journal of experimental medicine* **204**, 1257–65 (2007).
90. Ernst, P. B., Garrison, J. C. & Thompson, L. F. Much ado about adenosine: adenosine synthesis and function in regulatory T cell biology. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **185**, 1993–8 (2010).
91. Sakaguchi, S., Wing, K., Onishi, Y., Prieto-Martin, P. & Yamaguchi, T. Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? *International immunology* **21**, 1105–11 (2009).
92. Zheng, Y. *et al.* Regulatory T-cell suppressor program co-opts transcription factor IRF4 to control T(H)2 responses. *Nature* **458**, 351–6 (2009).
93. Koch, M. a *et al.* The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. *Nature immunology* **10**, 595–602 (2009).
94. Chaudhry, A. *et al.* CD4+ regulatory T cells control TH17 responses in a Stat3-dependent manner. *Science (New York, N.Y.)* **326**, 986–91 (2009).
95. Hill, J. a *et al.* Foxp3 transcription-factor-dependent and -independent regulation of the regulatory T cell transcriptional signature. *Immunity* **27**, 786–800 (2007).
96. Kubach, J. *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* **110**, 1550–8 (2007).

Literaturverzeichnis

97. Solstad, T. *et al.* CD147 (Basigin/Emmprin) identifies FoxP3+CD45RO+CTLA4+-activated human regulatory T cells. *Blood* **118**, 5141–51 (2011).
98. Birzele, F. *et al.* Next-generation insights into regulatory T cells: expression profiling and FoxP3 occupancy in Human. *Nucleic acids research* **39**, 7946–60 (2011).
99. Litchfield, D. W. Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death. *The Biochemical journal* **369**, 1–15 (2003).
100. Meggio, F. & Pinna, L. a. One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **17**, 349–68 (2003).
101. Bibby, A. C. & Litchfield, D. W. The multiple personalities of the regulatory subunit of protein kinase CK2: CK2 dependent and CK2 independent roles reveal a secret identity for CK2beta. *International journal of biological sciences* **1**, 67–79 (2005).
102. Buchou, T. *et al.* Disruption of the Regulatory γ Subunit of Protein Kinase CK2 in Mice Leads to a Cell-Autonomous Defect and Early Embryonic Lethality. **23**, 908–915 (2003).
103. Singh, N. N. & Ramji, D. P. Protein kinase CK2, an important regulator of the inflammatory response? *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* **86**, 887–97 (2008).
104. Sestero, C. M. *et al.* CD5-dependent CK2 activation pathway regulates threshold for T cell anergy. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **189**, 2918–30 (2012).
105. Axtell, R. C., Xu, L., Barnum, S. R. & Raman, C. CD5-CK2 binding/activation-deficient mice are resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis: protection is associated with diminished populations of IL-17-expressing T cells in the central nervous system. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **177**, 8542–9 (2006).
106. Pierres, A. *et al.* A rat anti-mouse T4 monoclonal antibody (H129.19) inhibits the proliferation of Ia-reactive T cell clones and delineates two phenotypically distinct (T4+, Lyt-2,3-, and T4-, Lyt-2,3+) subsets among anti-Ia cytolytic T cell clones. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **132**, 2775–82 (1984).
107. Malek, T. R., Robb, R. J. & Shevach, E. M. Identification and initial characterization of a rat monoclonal antibody reactive with the murine interleukin 2 receptor-ligand complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **80**, 5694–8 (1983).
108. Samelson, L. E. *et al.* T cell antigen receptor phosphorylation induced by an anti-receptor antibody. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **139**, 2708–14 (1987).
109. Gross, J. A., Callas, E. & Allison, J. P. Identification and distribution of the costimulatory receptor CD28 in the mouse. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **149**, 380–8 (1992).
110. Abrams, J. S. *et al.* Strategies of anti-cytokine monoclonal antibody development: immunoassay of IL-10 and IL-5 in clinical samples. *Immunological reviews* **127**, 5–24 (1992).

111. Prat, M., Gribaudo, G., Comoglio, P. M., Cavallo, G. & Landolfo, S. Monoclonal antibodies against murine gamma interferon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **81**, 4515–9 (1984).
112. Baniyash, M. & Eshhar, Z. Inhibition of IgE binding to mast cells and basophils by monoclonal antibodies to murine IgE. *European journal of immunology* **14**, 799–807 (1984).
113. Busse, W. W. & Lemanske, R. F. Asthma. *The New England journal of medicine* **344**, 350–62 (2001).
114. Hawrylowicz, C. M. & O'Garra, A. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nature reviews. Immunology* **5**, 271–83 (2005).
115. Robinson, D. S. Th-2 cytokines in allergic disease. *British medical bulletin* **56**, 956–68 (2000).
116. Kay, A. B. The role of eosinophils in the pathogenesis of asthma. *Trends in molecular medicine* **11**, 148–52 (2005).
117. Pagano, M. a *et al.* The selectivity of inhibitors of protein kinase CK2: an update. *The Biochemical journal* **415**, 353–65 (2008).
118. Lou, D. Y. *et al.* The alpha catalytic subunit of protein kinase CK2 is required for mouse embryonic development. *Molecular and cellular biology* **28**, 131–9 (2008).
119. Sacks, D. & Noben-Trauth, N. The immunology of susceptibility and resistance to Leishmania major in mice. *Nature reviews. Immunology* **2**, 845–58 (2002).
120. Stavnezer, J., Guikema, J. E. J. & Schrader, C. E. Mechanism and regulation of class switch recombination. *Annual review of immunology* **26**, 261–92 (2008).
121. Wan, Y. Y. & Flavell, R. a. Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression. *Nature* **445**, 766–70 (2007).
122. Fontenot, J. D. & Rudensky, A. Y. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nature immunology* **6**, 331–7 (2005).
123. Buckner, J. H. Mechanisms of impaired regulation by CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Nature reviews. Immunology* **10**, 849–59 (2010).
124. Shreffler, W. G., Wanich, N., Moloney, M., Nowak-Wegrzyn, A. & Sampson, H. a. Association of allergen-specific regulatory T cells with the onset of clinical tolerance to milk protein. *The Journal of allergy and clinical immunology* **123**, 43–52.e7 (2009).
125. Wood, K. J., Bushell, A. & Hester, J. Regulatory immune cells in transplantation. *Nature reviews. Immunology* **12**, 417–30 (2012).
126. Zou, W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nature reviews. Immunology* **6**, 295–307 (2006).
127. Koreth, J. *et al.* Interleukin-2 and regulatory T cells in graft-versus-host disease. *The New England journal of medicine* **365**, 2055–66 (2011).

128. Saadoun, D. *et al.* Regulatory T-cell responses to low-dose interleukin-2 in HCV-induced vasculitis. *The New England journal of medicine* **365**, 2067–77 (2011).
129. Daniel, C., Wennhold, K., Kim, H.-J. & von Boehmer, H. Enhancement of antigen-specific Treg vaccination in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 16246–51 (2010).
130. BURNETT, G. & KENNEDY, E. P. The enzymatic phosphorylation of proteins. *The Journal of biological chemistry* **211**, 969–80 (1954).
131. Montenarh, M. Cellular regulators of protein kinase CK2. *Cell and tissue research* **342**, 139–46 (2010).
132. Cozza, G., Pinna, L. a & Moro, S. Protein kinase CK2 inhibitors: a patent review. *Expert opinion on therapeutic patents* **22**, 1081–97 (2012).
133. Prudent, R. & Cochet, C. New protein kinase CK2 inhibitors: jumping out of the catalytic box. *Chemistry & biology* **16**, 112–20 (2009).
134. Pagano, M. a *et al.* Optimization of protein kinase CK2 inhibitors derived from 4,5,6,7-tetrabromobenzimidazole. *Journal of medicinal chemistry* **47**, 6239–47 (2004).
135. Fabian, M. a *et al.* A small molecule-kinase interaction map for clinical kinase inhibitors. *Nature biotechnology* **23**, 329–36 (2005).
136. Perea, S. E. *et al.* CIGB-300, a novel proapoptotic peptide that impairs the CK2 phosphorylation and exhibits anticancer properties both in vitro and in vivo. *Molecular and cellular biochemistry* **316**, 163–7 (2008).
137. Perera, Y. *et al.* Systemic administration of a peptide that impairs the protein kinase (CK2) phosphorylation reduces solid tumor growth in mice. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **122**, 57–62 (2008).
138. Martel, V., Filhol, O., Colas, P. & Cochet, C. p53-dependent inhibition of mammalian cell survival by a genetically selected peptide aptamer that targets the regulatory subunit of protein kinase CK2. *Oncogene* **25**, 7343–53 (2006).
139. Prudent, R. *et al.* Identification of polyoxometalates as nanomolar noncompetitive inhibitors of protein kinase CK2. *Chemistry & biology* **15**, 683–92 (2008).
140. Shore, L. J., Soler, A. P. & Gilmour, S. K. Ornithine decarboxylase expression leads to translocation and activation of protein kinase CK2 in vivo. *The Journal of biological chemistry* **272**, 12536–43 (1997).
141. Duncan, J. S. & Litchfield, D. W. Too much of a good thing: the role of protein kinase CK2 in tumorigenesis and prospects for therapeutic inhibition of CK2. *Biochimica et biophysica acta* **1784**, 33–47 (2008).
142. Laramas, M. *et al.* Nuclear localization of protein kinase CK2 catalytic subunit (CK2alpha) is associated with poor prognostic factors in human prostate cancer. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* **43**, 928–34 (2007).

143. O-charoenrat, P. *et al.* Casein Kinase II Alpha Subunit and C1-Inhibitor Are Independent Predictors of Outcome in Patients with Squamous Cell Carcinoma of the Lung Casein Kinase II Alpha Subunit and C1-Inhibitor Are Independent Predictors of Outcome in Patients with Squamous Cell. 5792–5803 (2004).
144. Kim, J. S. *et al.* Protein kinase CK2alpha as an unfavorable prognostic marker and novel therapeutic target in acute myeloid leukemia. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **13**, 1019–28 (2007).
145. Yu, H., Kortylewski, M. & Pardoll, D. Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nature reviews. Immunology* **7**, 41–51 (2007).
146. Yu, P. *et al.* Intratumor depletion of CD4+ cells unmasks tumor immunogenicity leading to the rejection of late-stage tumors. *The Journal of experimental medicine* **201**, 779–91 (2005).
147. Weide, B., Garbe, C., Rammensee, H.-G. & Pascolo, S. Plasmid DNA- and messenger RNA-based anti-cancer vaccination. *Immunology letters* **115**, 33–42 (2008).
148. Zheng, Y. *et al.* Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate. *Nature* **463**, 808–12 (2010).
149. Kim, H.-P. & Leonard, W. J. CREB/ATF-dependent T cell receptor-induced FoxP3 gene expression: a role for DNA methylation. *The Journal of experimental medicine* **204**, 1543–51 (2007).
150. Polansky, J. K. *et al.* Methylation matters: binding of Ets-1 to the demethylated Foxp3 gene contributes to the stabilization of Foxp3 expression in regulatory T cells. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* **88**, 1029–40 (2010).
151. Zheng, Y. *et al.* A CK2-dependent mechanism for activation of the JAK-STAT signaling pathway. *Blood* **118**, 156–66 (2011).
152. Marecki, S. & Fenton, M. J. The role of IRF-4 in transcriptional regulation. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* **22**, 121–33 (2002).
153. Matsuyama, T. *et al.* Molecular cloning of LSIRF, a lymphoid-specific member of the interferon regulatory factor family that binds the interferon-stimulated response element (ISRE). *Nucleic acids research* **23**, 2127–36 (1995).
154. Gupta, S., Jiang, M., Anthony, A. & Pernis, A. B. Lineage-specific modulation of interleukin 4 signaling by interferon regulatory factor 4. *The Journal of experimental medicine* **190**, 1837–48 (1999).

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Verteilung lymphatischer Gewebe im Körper von Mensch (A) und Maus (B).....	4
Abbildung 1.2: Aktivierung naiver CD4 ⁺ T-Zellen durch DCs und durch Aktivierung hervorgerufene Veränderungen der T-Zellen	6
Abbildung 1.3: Zusammenfassung der wichtigsten Th-Zellpopulationen.....	8
Abbildung 1.4: Suppressive Mechanismen von Tregs.....	14
Abbildung 1.5: Th-Zellspezifische Suppression mittels Adaption von Transkriptionsfaktoren durch Tregs.....	15
Abbildung 1.6: Tregs zeigen eine stark erhöhte Aktivität der Casein Kinase 2 im Vergleich zu konventionellen CD4 ⁺ T-Zellen.....	17
Abbildung 1.7: Struktur und allgemeine Funktionen der CK2.....	18
Abbildung 2.1: Schema zur Durchführung verschiedener ELISA.....	51
Abbildung 2.2: Schema zur Durchführung von Asthma Experimenten.....	55
3.1: Die pharmakologische Inhibition der Aktivität der CK2 blockiert die Treg-vermittelte Suppression der Proliferation CD4 ⁺ T-Zellen.....	66
Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der Generierung Treg-spezifischer konditionaler CK2 β "knockout" Mäuse.....	68
Abbildung 3.3: Verifizierung der Deletion der CK2 β UE in Tregs von CK2 β ^{Treg^{-/-}} Mäusen.....	71
Abbildung 3.4: CK2 β ^{Treg^{-/-}} -Tiere weisen vergrößerte periphere lymphatische Organe auf.....	73
Abbildung 3.5: Die Zellzahlen in den peripheren lymphatischen Organen von CK2 β ^{Treg^{-/-}} -Tieren sind erhöht.....	74
Abbildung 3.6: Die T-Zellentwicklung im Thymus von CK2 β ^{Treg^{-/-}} Mäusen verläuft normal.....	76
Abbildung 3.7: Milzen von CK2 β ^{Treg^{-/-}} -Mäusen zeigen eine normale Zusammensetzung an verschiedenen Immunzellen.	77
Abbildung 3.8: T-Zellen in CK2 β ^{Treg^{-/-}} -Tieren besitzen einen stark aktivierten T-Zell Phänotyp.....	79
Abbildung 3.9: Die stark aktivierten T-Zellen in CK2 β ^{Treg^{-/-}} -Tieren produzieren mehr IFN- γ	80
Abbildung 3.10: Der aktivierte T-Zell Phänotyp in CK2 β ^{Treg^{-/-}} -Mäusen ist verschoben in Richtung einer Th2-vermittelten Immunantwort.....	82
Abbildung 3.11: CK2 β ^{Treg^{-/-}} -Mäuse zeigen im Blut stark erhöhte IgE Titer.	83
Abbildung 3.12: CK2 β ^{Treg^{-/-}} Mäuse zeigen eine massive Infiltration von Entzündungszellen und weisen eine erhöhte Schleimproduktion in der Lunge auf.	86
Abbildung 3.13: Die bronchoalveoläre Lavage von CK2 β ^{Treg^{-/-}} Mäusen enthält zahlreiche infiltrierte Entzündungszellen.....	88
Abbildung 3.14: Zellen aus trachealen Lymphknoten asthmatischer CK2 β ^{Treg^{-/-}} -Mäuse produzieren vermehrt Th2 Zytokine.....	90
Abbildung 3.15: Asthmatische CK2 β ^{Treg^{-/-}} -Mäuse zeigen stark erhöhte Titer an antigen-spezifischen IgE Antikörpern.	92
Abbildung 3.16: Die Expression verschiedener, an der Treg-vermittelten Suppression beteiligter Moleküle in CK2 β defizienten Tregs ist unverändert.....	95
Abbildung 3.17: CK2 β defiziente Tregs zeigen eine verringerte Foxp3-Expression.....	97
Abbildung 3.18: Tregs aus CK2 β ^{Treg^{-/-}} -Tieren weisen eine reduzierte Expression des Transkriptionsfaktors IRF4 auf.	99
Abbildung 4.1: Potenzielles therapeutisches Anwendungspotenzial von Tregs.....	103

Abbildung 4.2: Potenzielle Effekte des proinflammatorischen Milieus in $CK2\beta^{Treg-/-}$ -Mäusen auf die Expression verschiedener suppressiver Moleküle und des TZR-Komplex.	110
Abbildung 4.3: Transkriptionsfaktoren, die die Stabilität von Foxp3 steuern und ihre mögliche Regulation durch die CK2.	112
Abbildung 4.4: Belege einer Regulation von IRF4 durch die CK2. 1.	114
Abbildung 4.5: CK2-abhängiger Mechanismus der Suppression Th2-vermittelter Immunreaktionen	116

8 Abkürzungsverzeichnis

Die im Laufe der Arbeit verwendeten Abkürzungen sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Abkürzung:	Ausgeschrieben:	Abkürzung:	Ausgeschrieben:
³ H-TdR	³ H-Thymidin	IRF4	Interferon-regulierender-Faktor-4
ABTS	2,2-Azino-bis(3-Ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)	iTreg	indzierbare regulatorische T-Zelle
ADP	Adenosindiphosphat	JAK	Janus Kinase
AHR	Airway hyperresponsiveness	LAG-3	Lymphozyten Aktivierungs Gen 3
AICD	activation induced cell death	LFA-1	Leukozyten funktionelles Antigen 1
Alum	Aluminiumhydroxid	mA	milliAmper
AMP	Adenosinmonophosphat	MACS	magnet activated cell sorting
APC	Antigen-Presenting-Cell	MHC-I	major histocompatibility complex I
APS	Ammoniumpersulfat	MHC-II	major histocompatibility complex II
ATP	Adenosintriphosphat	MS	Multiple Sklerose
BAL	Bronchoalveoläre Lavage	mTOR	Mammalian target of rapamycin
BSA	Bovines Serum Albumin	NK-Zelle	natürliche Killerzelle
BZR	B-Zell Rezeptor	nTreg	natürlich vorkommende regulatorische T-Zelle
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat	ODC	Ornithin Decarboxylase
CAP	kationische antimikrobielle Peptide	OVA	Ovalbumin
CBF β	C-Repeat Binding Factor β	PAMP	pathogen-associated-molecular-pattern
CCR6	CC Chemokin Rezeptor 6	PAS	periodic acid-schiff
CD	Cluster of differentiation	PBS	phosphate buffered saline
cDNA	complementary DNA	PCR	Polymerase-Chain-Reaction
CK2	Casein Kinase 2	PE	Phycoerythrin
CNS	conserved noncoding sequence	PIM-1	Proto-oncogene serine/threonine-protein kinase 1
Cnsk2b	Gen der CK2 β UE	PIM-3	Proto-oncogene serine/threonine-protein kinase 3
CPM	counts per million	PRR	pattern-recognition-receptor
CREB/ATF	cAMP response element binding protein/activating transcription factor	PVDF	Polyvinylidenfluorid
CTL	cytotoxic T-lymphocyte	RFP	Red Fluorescent Protein
CTLA-4	cytotoxisches T-Lymphozyten Antigen 4	RNA	ribonucleic acid
CXCR3	CXC Chemokin Rezeptor 3	ROR γ T	RAR-verwandter-Rezeptor- γ -T
DNA	desoxyribonucleic acid	RT	Reverse Transkription

dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-Triphosphat	Runx-1	Runt-related transcription factor 1
DC	dendritic cell	SA	Streptavidin
dCTP	2'-Desoxycytosin-5'-Triphosphat	SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfate
DEPC	Diethylpyrocarbonat	SLE	Systemischer Lupus Erythematodes
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-Triphosphat	SP	single positive
DMAT	2-Dimethylamino-4,5,6,7-tetrabromo-1H-Benzimidazol	SPF	spezifisch pathogenfrei
DN	doppelt negativ	SSC	Side Scatter
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-Triphosphat	STAT	signaltransducer and activator of transcription
DP	doppelt positiv	TAE	Tris-Acetat-EDTA
DTT	1,4-Dithiothreitol	TBB	4,5,6,7-tetrabromo-Benzotriazol
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-Triphosphat	Tbet	Tbox expressed in T-cells
EAE	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis	TBS	Tris-buffered-saline
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	TBS-T	Tris-buffered-saline with TWEEN
eGFP	enhanced Green Fluorescent Protein	Tcon	konventionelle T-Zelle
ELISA	Enzyme-linked-immunosorbend-assay	TE	Tris-EDTA
Ets-1	Protein C-ets-1	TEMED	Tetramethylethylendiamin
FACS	Fluorescence-Activated-Cell-Sorter	TGF- β	transforming growth factor β
FCS	fetal calf serum	Th1	T-Helferzelle Typ 1
FIC	Foxp3-IRES-Cre	Th17	T-Helferzelle Typ 17
FILIG	Foxp3-IRES-luciferase-IRES-eGFP	Th2	T-Helferzelle Typ 2
Foxp3	forkehead-box-protein 3	Th22	T-Helferzelle Typ 22
FSC	Forward Scatter	Th9	T-Helferzelle Typ 9
Gata3	Transkriptionsfaktor aus der Gata-Familie 3	Th-X	T-Helferzelle beliebiger Klasse (z.B. Th1)
GvHD	Graft versus Host disease	TIGIT	T-Zell Immunorezeptor mit Ig- und ITIM-Domänen
HE	Hämatoxylin-Eosin	TM10	Testmedium + 10% FCS
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase	TM5	Testmedium + 5% FCS
HIPK-2	Homeodomain-interacting protein kinase 2	TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
HPO	Horseraddish Peroxidasis	Treg	regulatorische T-Zelle
HRP	Horseraddish Peroxidasis	TSDR	Thymus-Specific-Demethylated-Region
IBD	Instestinal Bowel Disease	TZR	T-Zell Rezeptor
ICER	inducible cAMP early repressor	V	Volt
IFN- γ	Interferon-gamma	VE-Wasser	vollentsalztes Wasser

Abkürzungsverzeichnis

Ig	Immunglobulin	WHO	Welt Gesundheits Organisation
IHRES	internal ribosomal entry site	α UE	alpha-Untereinheit
IL	Interleukin	β UE	beta-Untereinheit
IPEX	Immundysregulation- Polyendocrinopathy- Enteropathy X-linked Syndrom		

Table 8.1: Abkürzungsverzeichnis: Auflistung der im Laufe dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen

