

**Transkriptionelle Kontrolle der Entwicklung
und Funktion natürlich vorkommender
CD4⁺CD25⁺ regulatorischer T-Zellen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

im Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Nina Ullrich

Mainz, März 2009

Aus dem
Institut für Immunologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Tag der mündlichen Prüfung:

13.Mai 2009

Für meine Familie

1.	 EINLEITUNG	1
1.1	DAS IMMUNSYSTEM	1
1.2	ZENTRALE UND PERIPHERE TOLERANZ	3
1.3	REGULATORISCHE T-ZELLEN	4
1.3.1	NATÜRLICH VORKOMMENDE REGULATORISCHE T-ZELLEN (nTREGS)	4
1.3.2	INDUZIERTER REGULATORISCHER T-ZELLEN (iTREGS)	7
1.3.3	MECHANISMEN DER nTREG- VERMITTELTE SUPPRESSION	8
1.4	TRANSKRIPTIONSFAKTOREN DER IKAROS- FAMILIE	10
1.4.1	DER TRANSKRIPTIONSFAKTOR HELIOS	11
1.4.2	DER TRANSKRIPTIONSFAKTOR EOS	13
1.5	MICRORNAs	14
1.5.1	MICRORNA155 (MIR155)	15
1.6	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	16
2.	 MATERIAL UND METHODEN	17
2.1	PUFFER/LÖSUNGEN/ANTIKÖRPER/OLIGONUKLEOTIDE	17
2.1.1	PUFFER/LÖSUNGEN	17
2.1.2	ANTIKÖRPER UND BEADS	19
2.1.3	OLIGONUKLEOTIDE	20
2.2	VERSUCHSTIERE	21
2.3	METHODEN	21
2.3.1	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	21
	Milzzellpräparation	21
	Bestimmung der Zellzahl	21
	CD4 ⁺ CD25 ⁺ T-Zellanreinigung aus Milzzellen (nTregs)	22
	CD4 ⁺ CD25 ⁻ T-Zellanreinigung (konventionelle CD4 ⁺ T-Zellen)	23
	Stimulation/Voraktivierung von T-Zellen	24
	FACS Analyse	25
	Proliferations- bzw. Suppressionsassay	26
2.3.2	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	27
	Präparation der mRNA aus T-Zellen	27
	Bestimmung der Konzentration und Reinheit der mRNA	27

Reverse Transkription (RT-Reaktion) der mRNA zu cDNA	28
Quantitative Real Time Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR)	29
Anreinigung, RT-Reaktion und qRT-PCR von microRNAs	30
Agarose Gelelektrophorese	31
Plasmidpräparation	31
Chromatin Immuno-Präzipitation (ChIP)	32
Transfektion	32
Dual-Luciferase Reporter Assay	33
2.3.3 METHODEN ZUR ANALYSE VON PROTEINEN	33
Herstellung von Zell-Lysaten	33
Bestimmung der Protein Konzentration	33
Polyacrylamid- Gelelektrophorese (PAGE)	34
Western-Blot Analyse	34
2.3.4 <i>IN VIVO</i> VERSUCHE	35
Bluten von Mäusen	35
Auslösen der DTH und Messung der Fußschwellung	35
3. ERGEBNISSE	36
3.1 GENEXPRESSIONSANALYSE VON T-ZELLEN	37
3.2 TRANSKRIPTIONSFAKTOREN DER IKAROS- GENFAMILIE	40
3.2.1 HELIOS UND EOS ZEIGEN PRÄFERENTIELL IN NTREGS EINE VERSTÄRKT EXPRESSSION	42
3.2.2 SPLEIßVARIANTEN VON HELIOS UND EOS	45
HELIOS Isoformen	45
EOS Isoformen	47
3.2.3 FUNKTIONELLE ANALYSEN VON EOS UND HELIOS <i>IN VITRO</i>	48
HELIOS bindet an den FoxP3 Promotor und kann diesen aktivieren	48
EOS aktiviert den FoxP3 Promotor nur marginal	50
3.2.4 DIE GEGENWART VON TGF- β FÜHRT ZUR INDUKTION DER HELIOS EXPRESSION <i>IN VITRO</i>	51
In Gegenwart von TGF- β führt die ektopische Expression von HELIOS in CD4 ⁺ T-Zellen zu einer Aktivierung des FoxP3 Promotors	53
Die ektopische Expression von HELIOS in CD4 ⁺ T-Zellen führt in Gegenwart von TGF- β zu einer verstärkten FoxP3 Proteinbildung	54
3.2.5 INDUKTION REGULATORISCHER T-ZELLEN DURCH HELIOS <i>IN VIVO</i>	55
<i>In vivo</i> führt die ektopische Expression von HELIOS zur Induktion von FoxP3 ⁺ -positiven T-Zellen in T-Zell-defizienten Mäusen	56
Die durch HELIOS induzierten CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ T-Zellen weisen <i>ex vivo</i> suppressive Eigenschaften auf	57
<i>In vivo</i> besitzen die durch HELIOS induzierten CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ T-Zellen Suppressor-Funktionen	59

3.3	DIE ROLLE DER MICRORNA155	62
3.3.1	TZR STIMULATION FÜHRT ZUR INDUKTION DER BIC UND DER MIR155 EXPRESSION	63
3.3.2	FOXP3 IST NICHT ESSENTIELL AN DER REGULATION VON BIC UND DER MIR155 EXPRESSION BETEILIGT	65
3.3.3	DIE EKTOPISCHE EXPRESSION DER MIR155 IN KONVENTIONELLEN CD4 ⁺ T-ZELLEN FÜHRT ZU EINER RESISTENZ GEGENÜBER DER NTREG- VERMITTELTEN SUPPRESSION	66
3.3.4	NACH EKTOPISCHER EXPRESSION DER MIR155 BESITZEN KONVENTIONELLE CD4 ⁺ T-ZELLEN EINEN AKTIVIERTEN PHÄNOTYP	67
3.3.5	DIE EKTOPISCHE EXPRESSION DER MIR155 IN CD4 ⁺ T-ZELLEN FÜHRT ZU EINER VERMINDERTEN BACH1 EXPRESSION	68
4.	DISKUSSION	71
4.1	DIE ROLLE DER TRANSKRIPTIONSFAKTOREN HELIOS UND EOS	73
4.2	DIE ROLLE DER MICRORNA155	79
5.	ZUSAMMENFASSUNG	83
6.	LITERATURVERZEICHNIS	84
7.	ABKÜRZUNGEN	94

1. Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Die Hauptfunktion des Immunsystems ist es, den Körper vor eindringenden Mikroorganismen und Fremdsubstanzen zu bewahren, aber auch geschädigte und körpereigene Zellen zu beseitigen. Dazu hat das Immunsystem die Fähigkeit erworben, „körpereigene“ und „körperfremde“ Moleküle voneinander zu unterscheiden. Die Zellen des Immunsystems kommen im ganzen Körper vor, hauptsächlich aber in den lymphatischen Organen, zu denen das Knochenmark, der Thymus, die Milz, die Lymphknoten und das Mukosa-assoziierte Lymphsystem (*MALT = mucosa-associated lymphoid tissue*) zählen. Die Immunzellen zirkulieren ständig im Blutstrom und im lymphatischen System, so dass sie durch Interaktion miteinander schnellstmöglich auf den Eintritt von Krankheitserregern reagieren und deren Ausbreitung verhindern können.

Die erste Schranke gegen eindringende Pathogene bietet das angeborene Immunsystem. Makrophagen, dendritische Zellen, natürliche Killerzellen und Granulozyten sind Zellen der angeborenen oder unspezifischen Immunität und sichern mit Hilfe spezieller Rezeptoren eine direkte Abwehr gegen zahlreiche pathogene Fremdantigene. Fremdantigene sind beispielsweise Motive aus bakterieller DNA (z.B. CpG = *Cytosin poly Guanin*) oder aus äußeren bakteriellen Membranbestandteilen (z.B. LPS = *Lipopolysaccharid*). Bestimmte Pathogene, wie Viren und enkapsulierte Bakterien, haben jedoch Strategien entwickelt, die sich der Kontrolle der angeborenen Immunität entziehen. Daher haben höhere Organismen im Laufe der Evolution zusätzliche Schutz- und Abwehrmechanismen entwickelt, um auf fast jedes Pathogen individuell und spezifisch reagieren zu können. Dieses erworbene oder adaptive Immunsystem basiert hauptsächlich auf B- und T-Lymphozyten, die sehr stark mit den Zellen des angeborenen Immunsystems zusammen arbeiten. B-Zellen sind dabei für die so genannte „humorale“ Immunantwort verantwortlich, da sie in der Lage sind, nach Aktivierung eine große Anzahl an Antikörpern in Blut und Lymphe zu sezernieren. Die „zelluläre“ Immunantwort wird von T-Zellen vermittelt, die entweder weitere Zellen anlocken oder Zellen direkt angreifen und zerstören. Die durch B- und T-Zellen eingeleitete spezifische Immunreaktion bewirkt zusätzlich die Ausbildung von Gedächtniszellen. Durch diese Gedächtniszellen oder das

sogenannte „immunologische Gedächtnis“ erfolgt nach einem wiederholten Kontakt mit dem Antigen eine schnellere und effektivere Immunantwort. Durch die unterschiedlichsten Gründe kann es zu Störungen im Immunsystem kommen, wodurch die Zellen des Immunsystems ihre Fähigkeit verlieren, eine angemessene Immunantwort auszulösen. Bei einer überschießenden Immunantwort bekämpft das Immunsystem ungewollt auch körpereigene Zellen, so dass Allergien oder Autoimmunerkrankungen, wie Diabetes Typ I, Rheumatoide Arthritis oder Multiple Sklerose, auftreten können. Ist die Immunantwort zu schwach, können Erkrankungen, die normalerweise harmlos sind, lebensbedrohliche Verläufe annehmen. Zu schwache Immunantworten können entweder angeboren sein (z.B. Wiskott-Aldrich-Syndrom^A) oder erworben werden (z.B. AIDS durch den HI-Virus). Nur durch das Gleichgewicht aller immunologischen Zellen kann der Organismus vor schädlichen Krankheitserregern geschützt werden. Um diese Balance zu gewährleisten haben sich innerhalb des Immunsystems verschiedene regulative Mechanismen entwickelt.

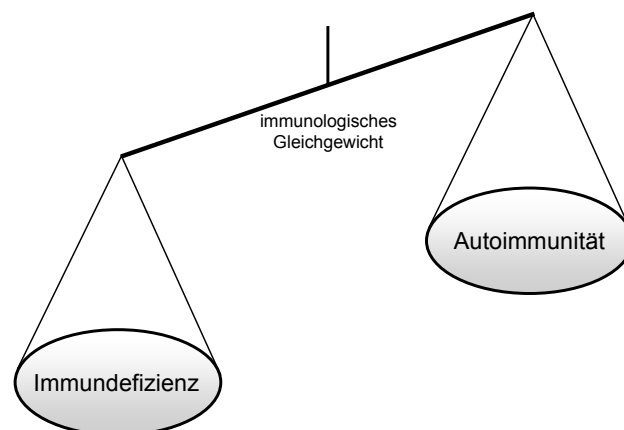


Abbildung 1: Die Balance aller Immunzellen ist wichtig für das immunologische Gleichgewicht. Bei einer zu schwachen Immunantwort kann der Körper selbst auf harmlose Angriffe nicht mehr adäquat reagieren und es kommt zu Immundefizienzen. Bei einer überschießenden Immunantwort reagiert der Körper dagegen zu heftig auf „körpereigene“ Moleküle, so dass Autoimmunerkrankungen entstehen.

^A Mutationen im Wiskott-Aldrich-Syndrom-Gen (WAS) führen zu einer Insuffizienz der Gerinnung (Thrombozytopenie) und des Immunsystems (Lymphopenie).

1.2 Zentrale und periphere Toleranz

Der Mechanismus der Toleranz gewährleistet die Kontrolle von Zellen mit autoreaktiven Rezeptorspezifitäten, so dass Reaktionen gegen körpereigene Strukturen verhindert werden.

Der Selektionsprozess der zentralen Toleranz findet bereits bei der Entwicklung von T-Zellen im Thymus statt. T-Zell-Vorläufer, die sich im Knochenmark entwickeln, wandern in den Thymus aus, wo ihre Reifung stattfindet. Über verschiedene Entwicklungs-Stadien entwickeln sich im Kortex aus den zunächst CD4⁻CD8⁻-doppelnegativen Thymozyten, durch die Expression diverser Oberflächenmoleküle, CD4⁺CD8⁺-doppelpositive Zellen. Anschließend wandern die Zellen in die medulläre Region des Thymus, wo sie mit den mTECs (*medullar thymus epithelial cells*) interagieren. Hier werden die Zellen CD4⁺- oder CD8⁺-einzeln positiv. Während der Reifung der T-Zellen wird durch Rekombination der drei großen Gensegmente D, J und V der T-Zell-Rezeptor (TZR) gebildet. Da T-Zellen in der Lage sein müssen, Antigene mit ihrem TZR zu erkennen, die an körpereigene MHC-Moleküle gebunden sind, muss im Kortex des Thymus eine so genannte „positive Selektion“ stattfinden. Die „positive Selektion“ findet an den cTECs (*cortical thymus epithelial cells*) statt, die MHC-I und MHC-II- Moleküle auf ihrer Oberfläche haben und somit als antigenpräsentierende Zellen wirken. T-Zellen, die mit ihrem TZR an die MHC-Moleküle binden können, erhalten ein Signal zum Überleben, die übrigen T-Zellen sterben durch Apoptose. Dieser positiven Selektion steht die „negative Selektion“ gegenüber, die wieder in der Medulla des Thymus stattfindet. Bei der negativen Selektion werden potentiell autoaggressive T-Zellen zerstört, deren TZRs körpereigene Peptide mit hoher Affinität erkennen (klonale Deletion)^{1,2}. Unter Affinität versteht man die Bindungsstärke zwischen dem TZR und dem Peptid-MHC-Komplex.

Die zentrale Toleranz ist dazu da, dass nur die T-Zellen den Thymus verlassen dürfen und in der Peripherie aktiviert werden sollen, die körpereigene MHC-Moleküle erkennen, die mit einem „Fremd-Peptid“ beladen sind und nicht mit einem „Selbst-Peptid“. Der Mechanismus der zentralen Toleranz gewährleistet allerdings nicht die absolute Selektion, so dass trotz allem autoreaktive T-Zellen aus dem Thymus in die Peripherie auswandern. Daher muss zusätzlich zur zentralen Toleranz die so genannte periphere Toleranz eingreifen. Die unterschiedlichen Mechanismen der peripheren Toleranz sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Mechanismen der peripheren Toleranz

Mechanismus	Wirkungsweise
Suppression	Hemmung autoreaktiver T-Zellen durch regulatorische T-Zellen.
Ignoranz	Autoantigene werden in zu geringer Zahl präsentiert, so dass die T-Zelle nicht ausreichend stimuliert wird.
Anergie	Funktionelle Ruhigstellung der T-Zelle nach insuffizienter TZR Stimulation ohne kostimulatorische Signale.
Depletion	Auslösen von Apoptose („Selbstmord“) nach Aktivierung (<i>activation induced cell death</i>).

1.3 Regulatorische T-Zellen

Regulatorische T-Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der peripheren Toleranz, da sie autoaggressive Zellen des Immunsystems durch verschiedene, zum Teil noch nicht genau geklärte Mechanismen supprimieren.

Man unterscheidet unter den CD4⁺ T-Zellen zwischen natürlich vorkommenden CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen (nTregs), die im Thymus gebildet werden und induzierten CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen (iTregs), die sich in der Peripherie aus konventionellen CD4⁺ T-Zellen entwickeln.

1.3.1 Natürlich vorkommende regulatorische T-Zellen (nTregs)

Der Grundstein für die Idee einer im Thymus natürlich vorkommenden Population an „Suppressor-T-Zellen“ (heute als CD4⁺CD25⁺ regulatorische T-Zellen bezeichnet) wurde bereits 1969 gelegt, als Nishizuka *et al.* zeigten, dass die Thymektomie von drei Tage alten Mäusen zu der Entwicklung verschiedenster Autoimmunerkrankungen führt. Die Autoimmunerkrankungen traten nicht auf, wenn den Mäusen vor Tag zwei oder nach Tag sieben *postnatal* der Thymus entfernt wurde³. Später konnte gezeigt werden, dass die Entwicklung von nTregs etwa 12 Stunden nach der Geburt im Thymus beginnt⁴. Durch den Transfer von Milzzellen oder Thymozyten aus adulten Mäusen spätestens zwei Wochen nach Thymektomie konnte der Ausbruch der Autoimmunerkrankungen verhindert werden³. Anfang der 1970er Jahre wurde eine T-Zell-Population beschrieben, die in der Lage ist sowohl B-Zellen als auch Antigenpräsentierende Zellen und T-

Zellen in ihrer Proliferation zu supprimieren^{5,6}. Die eindeutige Identifizierung der nTregs war jedoch nicht möglich, da zu diesem Zeitpunkt kein spezifischer Erkennungsmarker bekannt war. Aufgrund fragwürdiger Ergebnisse gerieten die „Suppressor-Zellen“ dann für viele Jahre in Misskredit und die bis dahin gewonnenen Daten wurden nachträglich als Sekundäreffekte der Th1/Th2-Kreuzregulation interpretiert. Die Helfer-T-Zellen Th1 und Th2 sind eine Subpopulation der T-Zellen, die sich aufgrund ihrer Cytokinproduktion voneinander unterscheiden und antagonistisch wirken. Während Th1-Zellen hauptsächlich Interferon- γ und das Interleukin IL-12 sezernieren, setzen Th2-Zellen viel IL-4 und IL-5 frei. Erst Mitte der 1990er Jahre konnten Sakaguchi *et al.* schließlich zeigen, dass die supprimierenden T-Zellen tatsächlich existieren und über die konstitutive Expression des Oberflächenmoleküls CD25, der Interleukin-2 (IL-2) Rezeptor alpha Kette, zu identifizieren sind⁷. Die ehemals als „Suppressor-T-Zellen“ bezeichneten Zellen erlangten nun als natürlich vorkommende CD4⁺CD25⁺ regulatorische T-Zellen (nTregs) wieder höchstes Interesse.

In gesunden Individuen umfassen nTregs etwa 5-10% der peripheren CD4⁺ T-Zellen. Im Unterschied zu konventionellen CD4⁺ T-Zellen sind nTregs nach TZR Stimulation weder in der Lage autokrin *in vitro* zu proliferieren noch *in vitro* oder *in vivo* IL-2 zu produzieren⁸. Allerdings sind sie in der Lage, *in vitro* und *in vivo* die Proliferation und Cytokinproduktion von aktivierten konventionellen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in einem antigenunabhängigen aber zellkontaktabhängigen Prozess zu inhibieren^{9,10}. Ein wesentliches Merkmal der nTreg-vermittelten Suppression scheint die Hemmung der endogenen IL-2 Produktion in den supprimierten T-Zellen zu sein und damit erst sekundär die Inhibition der Proliferation^{11,12}. Allerdings lässt sich die Suppression der konventionellen CD4⁺ T-Zellen durch regulatorische T-Zellen von verschiedenen Molekülen, welche beispielsweise kostimulatorisch über CD28 oder GITR (*Glucocorticoid-induced TNF receptor*) wirken, durchbrechen^{13,14}.

nTregs sind charakterisiert durch die konstitutive Expression von CD25, CTLA4 (*Cytotoxic T Lymphocyte-associated 4*) und GITR auf ihrer Oberfläche und intrazellulär durch den Transkriptionsfaktor Forkhead Box P3 (FoxP3). FoxP3, auch *scurfin* genannt, gehört zur Familie der Forkhead/winged-helix Transkriptionsfaktoren. Während die drei Oberflächenmoleküle CD25, CTLA4 und GITR auch von konventionellen CD4⁺ T-Zellen nach Aktivierung exprimiert

werden, wird, zumindest in Mäusen, FoxP3 tatsächlich nur in nTregs und verschiedenen induzierten iTregs exprimiert^{15;16}. Mäuse mit einer natürlich auftretenden Mutation im FoxP3 Gen, so genannte *scurfy* Mäuse, entwickeln schwere Autoimmunerkrankungen durch eine massive CD4⁺ T-Zellinfiltration¹⁷. *Scurfy* Mäuse weisen zwar eine hohe Anzahl an CD4⁺CD25⁺ T-Zellen auf, allerdings handelt es sich bei diesen Zellen mit großer Wahrscheinlichkeit um aktivierte konventionelle CD4⁺ T-Zellen. Ein Phänotyp der konventionellen CD4⁺ T-Zellen aus den *scurfy* Mäusen ist, dass sie hyperresponsiv auf die Aktivierung durch TZR-Stimuli in Abwesenheit kostimulatorischer Signale reagieren. Des Weiteren produzieren sie nach Aktivierung mit beschleunigter Kinetik große Mengen an IL-2 und anderen Cytokinen¹⁸. Als Pendant zur *scurfy* Maus wurde im Menschen das IPEX-Syndrom (*immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome*) entdeckt, bei dem die Betroffenen aufgrund von Mutationen im FoxP3 Gen autoimmune Erkrankungen entwickeln. Analog zur Maus führt das IPEX-Syndrom ohne Behandlung zu einem frühen Tod der betroffenen Kinder innerhalb des ersten Lebensjahres¹⁹⁻²¹. Nach Transduktion von FoxP3 weisen konventionelle CD4⁺ T-Zellen sowohl den anergen Phänotyp als auch die nTreg spezifischen Oberflächenmoleküle auf und besitzen *in vitro* und *in vivo* suppressive Eigenschaften^{16;22;23}. Somit scheint der Transkriptionsfaktor FoxP3 wesentlich an der Entwicklung und Funktion von nTregs beteiligt zu sein.

Tabelle 2: Anomalien von nTregs in humanen Autoimmunerkrankungen.

Erkrankung	nTregs Veränderungen	Literaturangabe
Kawasaki Krankheit; Systemische Lupus erythematosus.	niedrige Zellzahl an nTregs, aber unbekannte Funktion.	Furuno <i>et al.</i> 2004 ²⁴ ; Crispin <i>et al.</i> 2003 ²⁵ ; Liu <i>et al.</i> 2004 ²⁶ .
Autoimmune Hepatitis.	niedrige Zellzahl an nTregs mit eingeschränkter Funktion.	Longhi <i>et al.</i> 2004 ²⁷ ; Longhi <i>et al.</i> 2006 ²⁸ .
Chronisch entzündliche Darmerkrankungen; Rheumatoide Arthritis.	niedrige Zellzahl an nTregs mit normaler Funktion in der Peripherie, aber erhöhte Zellzahl an nTregs mit erhöhter Funktion im entzündeten Gewebe.	Makita <i>et al.</i> 2004 ²⁹ ; Maul <i>et al.</i> 2005 ³⁰ ; Agardh <i>et al.</i> 2006 ³¹ ; de Kleer <i>et al.</i> 2004 ³² ; Liu <i>et al.</i> 2005 ³³ .
Diabetes Typ I; Multiple Sklerose.	unveränderte Zellzahl an nTregs, aber eingeschränkte Funktion.	Brusko <i>et al.</i> 2005 ³⁴ ; Lindley <i>et al.</i> 2005 ³⁵ ; Viglietta <i>et al.</i> 2004 ³⁶ .

Wie sich der Tabelle 2 entnehmen lässt, liegen bei den meisten Autoimmunerkrankungen zu niedrige Zellzahlen an nTregs vor, so dass sie ihre Funktion, autoreaktive T-Zellen zu hemmen, nicht angemessen ausführen können. Die Induktion, Expansion oder der Transfer von nTregs in den Patienten stellt daher ein großes Potential für nTreg-basierte Therapieansätze dar.

1.3.2 Induzierte regulatorische T-Zellen (iTregs)

Induzierte CD4⁺CD25⁺ regulatorische T-Zellen (iTregs) können auf unterschiedliche Weise in der Peripherie aus konventionellen CD4⁺ T-Zellen entstehen. In Gegenwart des Cytokins *Transforming Growth Factor beta* (TGF-β) kann in konventionellen CD4⁺ T-Zellen die Expression von FoxP3 induziert werden. Diese iTregs besitzen nTreg typische suppressive Eigenschaften³⁷⁻³⁹. Es wurde allerdings beobachtet, dass bei Anwesenheit von IL-6 bei der TGF-β-abhängigen *in vitro* Induktion, die Differenzierung zu FoxP3⁺-positiven T-Zellen behindert ist und die Differenzierung zu Th17-Zellen bevorzugt wird^{40;41}. Die Gegenwart von IL-2 wiederum vereinfacht die Differenzierung zu FoxP3⁺-positiven T-Zellen, aber inhibiert die Differenzierung zu Th17-Zellen⁴². Zusätzlich zeigte sich der Vitamin A Metabolit Retinolsäure in der Lage, die IL-6-abhängige Differenzierung zu Th17-Zellen zu hemmen und stattdessen die Differenzierung zu FoxP3⁺-positiven T-Zellen anzuregen⁴³. Somit spielen sowohl IL-2 als auch die Retinolsäure eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Balance zwischen entzündungshemmender (FoxP3⁺-positiven T-Zellen) und entzündungsfördernder (Th17-Zellen) TGF-β-induzierter Immunität. Nachdem gezeigt wurde, dass die TGF-β-induzierten iTregs in Gegenwart von IL-2 alle nTreg typischen Eigenschaften *in vitro* aufweisen, konnte kürzlich gezeigt werden, dass der Transfer von TGF-β-induzierten iTregs auch in der Lage ist *in vivo* die Autoimmunerkrankungen von *scurfy* Mäusen zu heilen⁴⁴. iTregs lassen sich neben TGF-β auch durch lang anhaltende und wiederholte Stimulation mit spezifischem Antigen, beispielsweise durch orale Verabreichung, aus konventionellen CD4⁺ T-Zellen generieren^{45;46}. Eine weitere Studie zu iTregs beschreibt eine Cyclooxygenase COX-2 Abhängigkeit, die zur Produktion von Prostaglandin E2 (PGE2) führt⁴⁷. PGE2 kann durch Erhöhung des *second messengers* cAMP (*cyclic adenosine monophosphat*) einerseits die IL-2 Expression inhibieren, andererseits die FoxP3 Expression induzieren^{48;49}.

Neben den oben erwähnten iTregs gibt es unter den induzierten regulatorischen T-Zellen zusätzlich noch Tr1- (T regulatory type1-) und Th3- (T-Helfer-) Zellen. Beide Zelltypen vermitteln ihre suppressiven Eigenschaften vorwiegend über lösliche Faktoren. Tr1-Zellen, die kein FoxP3 exprimieren, produzieren nach TZR Stimulation primär IL-10. Th3-Zellen, die sowohl FoxP3⁺-positiv als auch FoxP3⁻-negativ sein können, sind primär charakterisiert durch die Bildung von TGF-β⁴⁵.

1.3.3 Mechanismen der nTreg-vermittelten Suppression

Obwohl der Mechanismus der nTreg-vermittelten Suppression von CD4⁺ T-Zellen noch nicht komplett verstanden ist, wurden in den letzten Jahren verschiedene Mechanismen postuliert. 1998 konnte durch *Transwell*TM Experimente gezeigt werden, dass die Suppression von konventionellen CD4⁺ T-Zellen *in vitro* ein zellkontaktabhängiger Prozess ist^{11;50}. Eine Suppression fand nicht statt, wenn beide Zelltypen durch eine semipermeable Membran getrennt waren, die lediglich einen Austausch löslicher Mediatoren zulässt.

Trotzdem wurde die Beteiligung der Cytokine TGF-β und IL-10 lange Zeit kontrovers diskutiert. Nakamura *et al.* konnten schließlich zeigen, dass hohe Dosen an anti-TGF-β die nTreg-vermittelte Suppression *in vitro* komplett aufheben konnte⁵¹. Allerdings wirkt TGF-β, das in großen Mengen von nTregs produziert wird, nicht löslich, sondern gebunden auf der Zelloberfläche von nTregs. Wurden CD4⁺ T-Zellen in Gegenwart von IL-10 aktiviert, zeigten diese Zellen inhibitorische Effekte, die sie über IL-10 und TGF-β vermittelten⁵². Es stellte sich dann jedoch heraus, dass es sich bei diesen Zellen um Tr1-Zellen handelte.

Verschiedene weitere Studien zeigen, dass nTregs zytolytische Aktivitäten aufweisen und Zielzellen direkt mit Hilfe von Granzym B und Perforin abtöten können⁵³⁻⁵⁵.

2007 wurden zwei weitere interessante Publikationen veröffentlicht, die sich mit der Freisetzung von Adenosin oder ihrer Metabolite beschäftigen. In der Publikation von Deaglio wird gezeigt, dass die Suppression durch Adenosin vermittelt wird, welches durch die nTreg-assoziierten Oberflächenmoleküle CD39 und CD73 generiert wird und über den Adenosin A2A Rezeptor auf konventionelle CD4⁺ T-Zellen wirkt⁵⁶. In der zweiten Publikation von Bopp *et al.* wurde gezeigt, dass der von nTregs in großen Mengen produzierte *second messenger* cAMP (*cyclic adenosine monophosphat*) nach Kontakt über *Gap*

Junctions auf konventionelle CD4⁺ T-Zellen übertragen wird und so die Proliferation dieser T-Zellen verhindert⁵⁷.

Es lässt sich erkennen, dass trotz jahrelanger Forschung, noch nicht vollständig geklärt ist, wie nTregs ihre suppressiven Effekte auf andere Zellen vermitteln. Die nTreg-vermittelte Suppression scheint ein komplexer Mechanismus zu sein, an dem viele Faktoren beteiligt sind. Die Weise wie nTregs wirken, scheint sowohl von der zu supprimierenden Zellart abzuhängen als auch von den Beschaffenheiten des umgebenden Milieus.

Da sich das Genprofil von nTregs von dem naiver oder aktivierter konventioneller CD4⁺ T-Zellen grundlegend unterscheidet, ist es von großer Bedeutung regulatorische Elemente zu identifizieren, die an der nTreg-vermittelten Suppression entscheidend beteiligt sind.

1.4 Transkriptionsfaktoren der IKAROS- Familie

Bereits publizierte als auch in unserem Labor durchgeführte vergleichende Genexpressionsanalysen von nTregs und konventionellen CD4⁺ T-Zellen hatten ergeben, dass die Transkriptionsfaktoren HELIOS und EOS präferentiell in nTregs exprimiert werden ⁵⁸⁻⁶⁰. HELIOS und EOS sind Mitglieder der IKAROS-Proteinfamilie. Bereits in den neunziger Jahren wurde der Namensgeber IKAROS als wichtiger Regulator bei der Reifung und Differenzierung von Lymphozyten beschrieben ⁶¹⁻⁶³. IKAROS ist auch als wichtiger Regulator bei der negativen Selektion beschrieben und spielt außerdem bei der Differenzierung der CD4⁻CD8⁻-doppelnegativen Thymozyten zu CD4⁺- oder CD8⁺-einzelpositiven T-Zellen eine entscheidende Rolle ⁶⁴. In einer erst kürzlich erschienenen Publikation konnte gezeigt werden, dass IKAROS an der Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen zu Th2-Zellen beteiligt ist ⁶⁵.

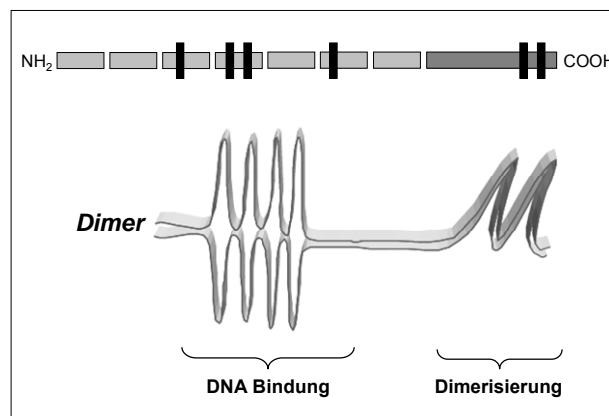


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Transkriptionsfaktoren der IKAROS- Genfamilie.

Obere Abbildung: In grau dargestellt sind die maximal acht Exons der Transkriptionsfaktoren, in schwarz dargestellt sind die maximal sechs Zinkfinger-Domänen. Untere Abbildung: Vereinfachte Darstellung eines Dimers (übernommen von ⁶⁶).

Die Mitglieder der IKAROS- Familie, die zu den Zinkfinger Proteinen zählen, besitzen am N-Terminus Zinkfinger-Domänen, die für die Aktivierung der Transkription und für die DNA-Bindung nötig sind. Am C-Terminus dieser Proteine befinden sich die Domänen für die Dimerisierung (Abbildung 2). Die Dimerisierung erfolgt entweder homotypisch mit dem gleichen Protein oder

heterotypisch mit einem anderen Protein der IKAROS- Familie. Zu weiteren Mitgliedern der IKAROS- Proteinfamilie gehören neben IKAROS, HELIOS und EOS, noch AIOLOS und PEGASUS. Der C-terminale Bereich ist bei allen Familienmitgliedern hoch konserviert, weist immer zwei Zinkfinger auf und ist somit charakteristisch für diese Familie ^{67;68}. Der N-Terminus dagegen ist variabler gestaltet und kann aufgrund alternativen Spleißens unterschiedlich viele Zinkfinger besitzen, was dazu führt, dass diese Transkriptionsfaktoren in verschiedenen Spleißvarianten (Isoformen) vorliegen können ⁶⁹.

1.4.1 Der Transkriptionsfaktor HELIOS

Der Transkriptionsfaktor HELIOS lässt sich in der Maus schon relativ früh in hämatopoetischen Zellen des Embryos detektieren. Später in der erwachsenen Maus zeigt sich eine Expression von HELIOS in hämatopoetischen Stammzellen, reifenden Erythrozyten, Makrophagen, sowie in B-Zellen, aber hauptsächlich findet man HELIOS in T-Zellen ^{58;59;66}. In der T-Zellpopulation wird der Transkriptionsfaktor HELIOS vor allem in nTregs exprimiert ⁵⁸⁻⁶⁰.

Da sich gezeigt hat, dass der Transkriptionsfaktor FoxP3 entscheidend an der Entwicklung und Funktion von nTregs beteiligt ist, ist es extrem wichtig zu verstehen, welche Faktoren bei der Induktion der FoxP3 Expression beteiligt sind. Während sich HELIOS bereits in CD4⁻CD8⁻-doppelnegativen Thymozyten detektieren lässt, findet man FoxP3 dagegen erst im CD4⁺-einzelpositiven Stadium der T-Zell-Entwicklung im Thymus ⁶⁰. Damit könnte HELIOS ein Faktor sein, der die Expression von FoxP3 entweder induzieren oder zumindest stabilisieren kann.

In humanen T-Zellen sind bisher acht verschiedene Spleißvarianten von HELIOS bekannt, wobei nur zwei davon in gesunden Individuen exprimiert werden ⁶⁶. Die Existenz von zwei HELIOS Isoformen in der Maus konnte durch Klonierungsstudien in unserem Labor bestätigt werden (unveröffentlichte Daten). Unter den zwei Isoformen befindet sich eine lange und eine kurze Isoform (Abbildung 3).

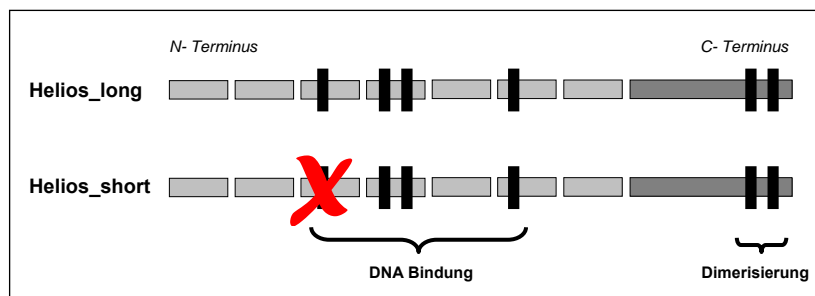


Abbildung 3: Schematische Darstellung der beiden HELIOS Isoformen. Beide HELIOS Isoformen besitzen zwei C-terminale Zinkfinger für die Dimerisierung. Die lange HELIOS Isoform bindet mit vier N-terminalen Zinkfingern an die DNA, die kurze HELIOS Isoform benötigt nur drei Zinkfinger.

Während die lange HELIOS Isoform, HELIOS_long, mit vier N-terminalen Zinkfingern an die DNA bindet, benötigt die kurze HELIOS Isoform, HELIOS_short, nur drei Zinkfinger. Dadurch erkennen die beiden Spleißvarianten unterschiedliche DNA-Sequenzen und sind für die Aktivierung oder Inhibierung unterschiedlicher Gene verantwortlich.

Zur Gewährleistung der exakten Funktion von HELIOS ist daher das richtige Gleichgewicht zwischen langer und kurzer Isoform zwingend erforderlich. Es hat sich gezeigt, dass eine überschüssige Expression von verkürzten HELIOS Isoformen zu Leukämien und T-Zell-Lymphomen in der Maus führen kann und diesem Transkriptionsfaktor somit eine Funktion als Tumorsuppressorgen^B zugeschrieben wird⁷⁰⁻⁷³.

^B Tumorsuppressorgene codieren für Proteine, die z.B. an der Kontrolle des Zellzyklus oder der Apoptose beteiligt sind. Dadurch senken sie die Wahrscheinlichkeit einer Tumorentwicklung. Mutationen dieser Gene erhöhen demnach die Wahrscheinlichkeit einer Tumorbildung.

1.4.2 Der Transkriptionsfaktor EOS

Der Transkriptionsfaktor EOS wird hauptsächlich im zentralen und peripheren Nervensystem exprimiert, lässt sich aber genauso wie HELIOS, wenn auch in geringerem Maße, in hämatopoetischen Zellen und in T-Zellen detektieren^{74;75}.

Durch Klonierungsstudien in unserem Labor konnten von EOS vier Isoformen charakterisiert werden (unveröffentlichte Daten). Diese Isoformen, zwei lange und zwei kürzere, entstehen wie bei allen Mitgliedern der IKAROS- Genfamilie aufgrund alternativen Spleißens (Abbildung 4).

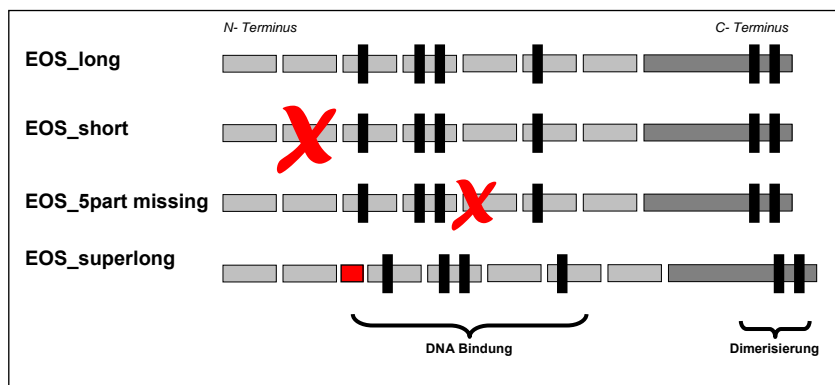


Abbildung 4: Schematische Darstellung der vier EOS Isoformen. Die vier EOS Isoformen besitzen am C-Terminus zwei Zinkfinger für die Dimerisierung mit Mitgliedern der IKAROSfamilie. Die N-terminalen Zinkfinger sind an der DNA Bindung beteiligt.

Da alle vier EOS Spleißvarianten die gleiche Anzahl N-terminaler Zinkfinger aufweisen, kann man annehmen, dass die unterschiedlich langen Isoformen gleiche DNA-Erkennungssequenzen besitzen.

Unter allen Mitgliedern der IKAROS- Proteinfamilie ist der Transkriptionsfaktor EOS derjenige, der HELIOS am ähnlichsten ist, da beide Transkriptionsfaktoren vergleichbare DNA- und Protein- Bindungseigenschaften aufweisen⁷⁵. Allerdings wird HELIOS eine Rolle als transkriptioneller Aktivator zugesprochen, EOS dagegen fungiert als Repressor⁷⁶.

1.5 microRNAs

Neben Transkriptionsfaktoren, welche die Expression von Genen kontrollieren, gibt es auch auf posttranskriptioneller Ebene regulierende Elemente. Dazu zählen so genannte microRNAs (miRNAs). Eine kürzlich veröffentlichte Studie über die miRNA142-3p hat gezeigt, dass microRNAs auch in der Regulation der nTreg-vermittelten Suppression eine Rolle spielen ⁷⁷.

miRNAs sind kleine nicht-kodierende RNA Moleküle, die eine wichtige Funktion im Organismus einnehmen, da sie den Proteinhaushalt einer Zelle durch Inhibition der Translation oder Degradation von *messenger RNAs* (mRNA) regulieren können ^{78;79}. MicroRNAs werden, wie sich der Abbildung 5 entnehmen lässt, als lange primäre miRNA-Transkripte (*pri-miRNA*) durch die RNA-Polymerase II im Zellkern transkribiert und durch das RNase-III-Enzym DROSHA zu miRNA-Vorläufermolekülen (*pre-miRNA*) prozessiert. Nach dem Transport ins Zytoplasma entsteht durch das RNase-III-Enzym DICER aus der *pre-miRNA* zunächst eine doppelsträngige miRNA. Zusammen mit RISC (*RNA-induced silencing complex*) bildet die einzelsträngige maturierte microRNA einen Komplex, der die Interaktion mit der Ziel-mRNA erlaubt. Die Verbindung beruht auf partieller Komplementarität zwischen der miRNA und der 3'UTR (*untranslated region*) der Ziel-mRNA ⁷⁸.

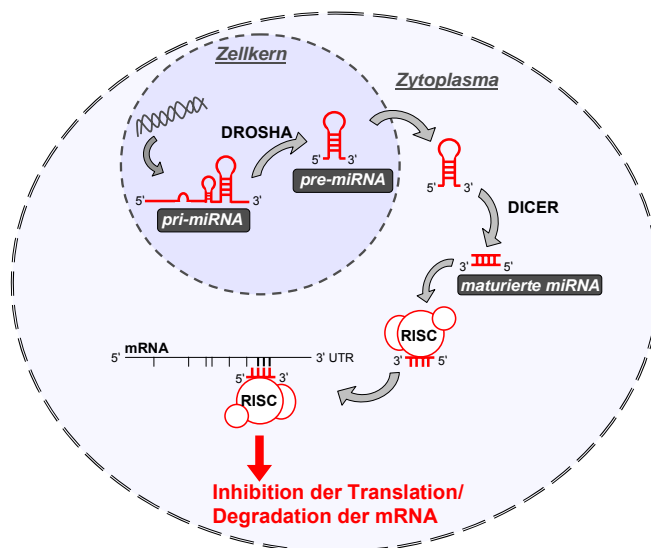


Abbildung 5: Schematische Darstellung der microRNA Biosynthese.

Es hat sich gezeigt, dass das Enzym DICER eine besonders wichtige Aufgabe bei der Prozessierung der miRNA einnimmt. Wird DICER in der frühen T-Zell-Entwicklung entfernt, kommt es zu einer 10-fachen Verminderung an CD4⁺-positiven und CD8⁺-positiven T-Zellen im Thymus⁸⁰. Wird DICER erst in der späteren T-Zell-Entwicklung ausgeschaltet, resultiert dies in einer verminderten T-Zell-Entwicklung und in einer divergierenden T-Helferzell-Differenzierung und Cytokinproduktion⁸¹. Der spezifische *knockout* von DICER in CD4⁺-T-Zellen führt in der Maus zu einer reduzierten Zellzahl an regulatorischen T-Zellen und zu der Ausbildung verschiedenster Immunerkrankungen⁸². In der gleichen Arbeit konnte außerdem gezeigt werden, dass nTregs und konventionelle CD4⁺ T-Zellen unterschiedliche miRNA Profile aufweisen, wobei das miRNA Profil von aktivierten konventionellen CD4⁺ T-Zellen dabei sehr stark dem Profil von nTregs entspricht.

1.5.1 microRNA155 (miR155)

Es hat sich gezeigt, dass eine spezielle microRNA, die microRNA155 (miR155), eine entscheidende Funktion bei den verschiedensten Immunantworten einnimmt. Bei der Bildung dieser microRNA wird aus dem transkribierten Vorläufer BIC (*B-cell integration cluster*) die maturierte miR155 prozessiert⁸³. Da die miR155 sowohl in Makrophagen und Dendritischen Zellen als auch in B- und T-Zellen exprimiert wird, spielt sie eine wichtige Rolle bei der Regulation von Zellen des angeborenen und des adaptiven Immunsystems⁸⁴⁻⁸⁶. Sowohl in humanen wie auch in murinen CD4⁺ T-Zellen ist BIC und somit die miR155 in ruhenden Zellen kaum detektierbar, nach TZR Stimulation jedoch ist eine relativ frühe BIC/miR155 Expression zu erkennen^{86;87}. Dass die miR155 entscheidend an der Entwicklung und Funktion von T-Zellen, insbesondere der T-Helfer-Zellen, beteiligt ist, konnte durch BIC/miR155 *knock-out* Mäuse gezeigt werden^{87;88}.

Ist die Regulation der miR155 gestört, kann es zur Entstehung von Karzinomen und Lymphomen kommen^{89;90}. So wurde beispielsweise gezeigt, dass die miR155 verstärkt in B-Zell-Lymphomen exprimiert vorliegt⁹¹⁻⁹³. Transgene Mäuse, welche die miR155 spezifisch in B-Zellen überexprimieren, wiesen eine erhöhte Expression von etwa 200 Proliferations-assoziierten Genen auf⁹⁴. Dieses Ergebnis zeigt deutlich, dass eine einzige microRNA in der Lage ist, viele verschiedene Ziel-mRNAs zu regulieren.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung von Molekülen, die entscheidend an der Entwicklung von nTregs oder der nTreg- vermittelten Suppression beteiligt sind und dabei entweder in den regulatorischen T-Zellen selbst oder in den konventionellen CD4⁺ T-Zellen (Effektorzellen) nach Aktivierung verstärkt exprimiert werden.

In diesem Zusammenhang sollte die Rolle der IKAROS- Familienmitglieder HELIOS und EOS analysiert werden. Durch vergleichende Genexpressionsanalysen zeigte sich, dass diese beiden Transkriptionsfaktoren in natürlich vorkommenden regulatorischen T-Zellen stark exprimiert vorliegen.

Des Weiteren befasst sich diese Arbeit mit der microRNA155 und ihrer Funktion als wichtiger Regulator der Translation und Degradation von mRNAs bei der nTreg- vermittelten Suppression.

Ob die oben genannten Faktoren an der transkriptionellen Kontrolle der Entwicklung und Funktion von nTregs beteiligt sind, sollte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in dieser Arbeit näher untersucht werden.

2. Material und Methoden

Die verwendeten Materialien wurden, wenn nicht anders angegeben, mit dem Reinheitsgrad p.a. von den Firmen Costar, Greiner, Roth, Sarstedt oder VWR bezogen. Die verwendeten Zentrifugen und Brutschränke sind von der Firma Heraeus.

2.1 Puffer/Lösungen/Antikörper/Oligonukleotide

2.1.1 Puffer/Lösungen

Verwendetes Wasser wurde voll entsalzt (Millipore-Entmineralisierungsanlage, Fa. Millipore), durch Aktivkohle gereinigt und steril-filtriert (0.2µm Sterilfilter). Soweit nicht anders angegeben, wurden folgende Puffer und Lösungen verwendet.

Tabelle 3: Puffer und Lösungen (alphabetisch geordnet)

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung
ACK-Puffer	150mM NH ₄ Cl; 1mM KHCO ₃ ; 0.1mM EDTA; pH 7.3.
„Blutpuffer“	30mM EDTA; 0.1% NaN ₃ ; in 1x PBS.
DEPC- Wasser (Diethylpyrocarbonat)	0.1% DEPC in H ₂ O über Nacht rühren; anschließend autoklavieren.
Gey's Lysepuffer	8.28g/l NH ₄ Cl; 1g/l KHCO ₃ ; 0.037g/l EDTA.
GM (Großer MACS- Puffer)	0.5%BSA; 0.01% NaN ₃ ; 5mM EDTA; in 1x PBS.
IMDM (Iscove's modified Dulbecco's medium)	17.67g/l IMDM Trockenpulver; 3.02g/l NaHCO ₃ ; 1% Penicillin/Streptomycinlösung; 0.05mM 2-Mercaptoethanol; Phenolrot als Indikator.
Ladepuffer 4x	4.3M Glycerin; 0.56M TRIS; 0.42M TRIS-HCl; 0.3M LDS; 1.6mM EDTA; 0.88mM Bromphenolblau; 0.5mM Bromphenolrot; 0.2M DTT.

MEM (minimal essential medium)	10.58g/l MEM Trockenpulver; 4.77g/l HEPES.
MOPS-Puffer 10x (Morpholinopropansulfonsäure)	200mM MOPS; 50mM NaAc; 10mM EDTA; pH 7 mit 10N NaOH.
PBS 10x (phosphate buffered saline)	1.4M NaCl; 0.1M NaH ₂ PO ₄ ; pH 6.6 mit 10N NaOH.
RIPA-Puffer 10x	1M TRIS; 5M NaCl; 0.5M EDTA; 0.13M Cholic Acid; 60mM NaF; 10% NP-40; 37mM LDS; pH 8.
'Stripping Puffer'	62.5mM TRIS-HCl; 2% SDS; 0.1M β-Mercaptoethanol.
TBE- Puffer (Tris-Borat-EDTA)	89mM TRIS; 89mM H ₃ BO ₃ ; 2mM EDTA; pH 8.
TBS-Puffer 20x (Tris buffered saline)	20mM TRIS-Base; 180mM TRIS-HCl; 3M NaCl.
TBST-Puffer 20x (Tris buffered saline Tween20)	20mM TRIS-Base; 180mM TRIS-HCl; 3M NaCl; 1%Tween20.
TE-Puffer (Tris-EDTA)	10mM TRIS; 1mM EDTA; pH 8.
TM (Testmedium)	5% FCS super; 1% Glutamin; 1% Na- Pyruvat; in IMDM.
Treg- Medium	100ng/ml mrlL-2 in Testmedium.
Trypanblau	4 Teile 0.2% Trypanblau; 1 Teil 4.25% NaCl.

Die Medien IMDM und MEM wurden als Trockensubstanz von der Firma Gibco bezogen, die übrigen verwendeten Chemikalien, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Gibco, Merck, Roche, Roth oder Sigma-Aldrich.

2.1.2 Antikörper und Beads

Nachfolgender Tabelle lässt sich entnehmen, woher die Antikörper und Beads für die T-Zellanreinigung und T-Zellstimulation bezogen wurden.

Tabelle 4: Antikörper/Beads (alphabetisch geordnet)

Antikörper/Beads	Hersteller
anti-CD3 (Klon 145-2C11)	zur Verfügung gestellt von Dr. Bluestone (<i>Ben May Institute, Departement of Pathology, Chicago, USA</i>)
anti-CD28 (Klon 31.51)	zur Verfügung gestellt von Dr. Allison durch Dr. Leclerq (<i>Universität Gent, Belgien</i>)
anti-MAC1 (CD11b)- Beads (4*10 ⁸ Beads/ml)	gekoppelt mit Epoxy Dynalbeads im eigenen Labor durch A. Hobel
anti-PE Beads	Miltenyi Biotech
Biotin anti-CD25 (Klon 7D4)	BD Pharmingen
Biotin anti-CD4 (Klon H129.19)	Dr. Huber (Hautklinik Mainz), im eigenen Labor biotinyliert
Dynalbeads CD8 (Lyt2) (4*10 ⁸ Beads/ml)	Dynal (Prod.Nr. 114.07)
Dynalbeads panB (B220) (4*10 ⁸ Beads/ml)	Dynal (Prod.Nr. 114.01)
Sa-Beads (Streptavidin)	Miltenyi Biotech
Sa-PE (Streptavidin gekoppelt mit Phycoerythrin)	Jackson Immuno Research

2.1.3 Oligonukleotide

Zur Vermeidung der Amplifikation genomischer DNA wurden die Oligonukleotide so gewählt, dass sie eine Intron/Exon Grenze umspannen.

Tabelle 5: Synthetische Oligonukleotide (Primer) (alphabetisch geordnet)

Name	Sequenz (5' → 3')
AIOLOS_for	5' – GAA GAC GAA GAT GCA GGA GAA G – 3'
AIOLOS_rev	5' – ACG TGT CTC TCC AGC TTA ATG C – 3'
BACH1_for	5' – GAG TCG GAA ATC GAG AAG CTG CA – 3'
BACH1_rev	5' – TCC TTG CAC ACC TGC TGA CAA AG – 3'
BIC_for	5' – TCA TCT GAG AAA ACA GCA AAG TTT A – 3'
BIC_rev	5' – CAG CAT ACA GCC TTC AGC AA – 3'
EOS_for	5' – CCC CAC AGA AGT TTG TAG GTG – 3'
EOS_rev	5' – GGT GTG AGT TCT GAG ATG CAG – 3'
FoxP3_for	5' – CTT ATC CGA TGG GCC ATC CTG GAA G – 3'
FoxP3_rev	5' – TTC CAG GTG GCG GGG TGG TTT CTG – 3'
FoxP3-Promotor.for	5' – CTCCAACGTCTCACAAACAC – 3'
FoxP3-Promotor.rev	5' – CAATGAGATAACAGGGCTCA – 3'
Gesamt-HELIOS_for	5' – ACC TCA GGA CCC ATT CTG TGG – 3'
Gesamt-HELIOS_rev	5' – TGA GCT TCT CTA TGA CAG CAG G – 3'
HELIOS_long_for	5' – GTC TGT GGC ATG GTT TGC ATT G – 3'
HELIOS_long_rev	5' – CAC TTG TGA GGT TTA CCC ACA G – 3'
HELIOS_short_for	5' – ATC CGG CTT CCG AAT GGT GAG – 3'
HELIOS_short_rev	5' – CAC TTG TGA GGT TTA CCC ACA G – 3'
HGPRT_for	5' – GTT GGA TAC AGG CCA GAC TTT GTT G – 3'
HGPRT_rev	5' – GAG GGT AGG CTG GCC TAT AGG CT – 3'
IKAROS_for	5' – GTC GAT GAG GGT CAA GAC ATG – 3'
IKAROS_rev	5' – CAC TCT TGG AGT TCT GCT GTG – 3'
IL-2_for	5' – CCT GAG CAG GAT GGA GAA TTA CA – 3'
IL-2_rev	5' – TCC AGA ACA TGC CGC AGA G – 3'
PEGASUS_for	5' – AGA GAC TCT TCA GGG AGC TGG – 3'
PEGASUS_rev	5' – GAT GTG CTC AAT GAG CCT GGC – 3'

Die verwendeten Oligonukleotide wurden, wenn nicht anders angegeben, in einer Konzentration von 100pmol/μl von der Firma Metabion bezogen, bei -20°C aufbewahrt und in einer Konzentration von 5pmol/μl in der PCR eingesetzt.

2.2 Versuchstiere

Alle verwendeten Mausstämme wurden unter konventionellen Bedingungen, Wasser und Futter *ad libitum* und künstlichem Tag-Nacht-Zyklus unter pathogen-freien (*special pathogen free*) Bedingungen gehalten.

Die Mäuse wurden im Alter von 5 bis 16 Wochen für die Versuche eingesetzt.

2.3 Methoden

2.3.1 Zellbiologische Methoden

Milzzellpräparation

Die Maus wurde durch Vergasung mit CO₂ getötet. Nach Entnahme der Milz wurde das Organ durch ein Metallsieb (60 gauge) gedrückt und mit MEM/2%FCS-Puffer resuspendiert. Durch 10-minütige Sedimentation der Milzsuspension wurden große Gewebebestandteile entfernt. Nach anschließender Zentrifugation (10min bei 600xg) wurden die Erythrozyten in der Zellsuspension 2min mit Gey's Lysepuffer (1ml pro Milz) lysiert. Die Lysereaktion wurde durch Zugabe von MEM/2%FCS gestoppt. Nach einer weiteren Zentrifugation und einem weiteren Zellsieb (40µm; Fa. BD) wurden die Zellen gezählt und die Zellzahl auf 1x10⁸/ml mit kaltem GM-Puffer eingestellt.

Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde ein Aliquot der Zellsuspension mit Trypanblau verdünnt. Tote Zellen wurden dabei blau angefärbt, da der Farbstoff durch defekte Zellmembranen dringen kann. Lebende Zellen erschienen im Mikroskop hell. Mithilfe einer Neubauer-Zählkammer (Fa. Brand) ließ sich die Zellzahl nach folgender Formel berechnen:

$$\text{Zellzahl} = \text{gezählte Zellen} * \text{Verdünnungsfaktor} * \text{Volumen} * \text{Kammerfaktor } 10^4$$

CD4⁺CD25⁺ T-Zellanreinigung aus Milzzellen (nTregs)

Nachdem die Zellen auf 1×10^8 /ml mit kaltem GM-Puffer eingestellt wurden, wurde wie folgt vorgegangen:

1. Zugabe von 1.25µg/ml 7D4bio pro 1×10^8 Zellen
2. Inkubation bei 4°C für 20min
3. 2maliges Waschen der Milzzellen mit kaltem GM (Zentrifugation: 10min, 600xg, 4°C)
4. Zugabe von Sa-PE Beads in einem Verhältnis von 1:400 pro 1×10^8 Zellen
5. Inkubation bei 4°C für 20min
6. 2maliges Waschen der Milzzellen mit kaltem GM (Zentrifugation: 10min, 600xg, 4°C)
7. Zugabe von 10µl anti-PE- Beads pro 1×10^8 Zellen in einem Endvolumen von max. 1ml
8. Inkubation bei 4°C für 15min, danach bei RT für 10min auf Schüttler
9. Zellsuspension über 40µm Zellsieb (Fa. BD)
10. 2maliges Waschen der Milzzellen/Zellsieb mit kaltem GM (Zentrifugation: 10min, 600xg, 4°C)
[In der Waschphase MACS[®]- Zellseparationssäulen vorbereiten (s.u.)]
11. Zellpellet in warmen GM- Puffer aufnehmen; Endvolumen 5ml pro Säule; max. 5×10^8 Zellen pro Säule; Säulen in Magnet (Fa. Miltenyi) fixieren
12. Zellsuspension ml-weise über die Separationssäulen geben
13. Spülen des Röhrchens mit 3ml warmen GM; ml-weise über die Säulen
14. 2maliges Spülen der Säulen mit 3ml warmen GM
15. Säulen aus Magnet nehmen und gebundene Zellen mit 5ml warmen GM und sterilem Stempel eluieren;
(→ Durchlauf für die Anreinigung der CD4⁺ Zellen verwenden)
16. Eluate vereinigen und erneut über eine Säule geben (Schritte 12-15)
17. Zellzahl bestimmen

Vorbereiten der MACS[®]- Zellseparationssäulen der Fa. Miltenyi

Die Säulen wurden mit Hilfe der Wasserstrahlpumpe wie folgt behandelt:

1. spülen mit 20ml 1x PBS + 1/1000 Tween20 (unsteril)
2. spülen mit 20ml 1x PBS (unsteril)
3. spülen mit 20ml Isopropanol (unsteril)
4. spülen mit 5ml Isopropanol (steril)
5. spülen mit 5ml 1x PBS/0.5% BSA (steril)

DYNA- Beads Behandlung (Entfernen von CD8⁺ T-Zellen, B- Zellen und Makrophagen)

Nach der CD25⁺ Anreinigung wird von einer 30%igen Verunreinigung ausgegangen, davon 50% B- Zellen.

1. Zellzahl bestimmen und Zellen in 1ml PBS/0.5% BSA aufnehmen
2. von der Gesamtzellzahl 30% berechnen als Gesamt-Verunreinigung
3. von den 30% Gesamt-Verunreinigung 50% berechnen als B-Zell-Verunreinigung
4. von diesen 50% die 8-fache Menge in μl an anti-B220 Beads zugeben
5. von der in 4. berechneten 8-fachen Menge in μl die Hälfte in μl an anti-MAC1 Beads zugeben
6. von der in 4. berechneten 8-fachen Menge in μl das 1½- fache in μl an anti-CD8 Beads zugeben
7. Inkubation bei RT für 20min auf Rüttler
8. Abstoppen der Reaktion mit 5ml PBS/10%FCS
9. Röhrchen in Magneten (DYNAL Biotech, Fa. Invitrogen) stellen und 2min warten
10. Vorsichtiges Abziehen der CD25⁺ Zellsuspension und in neues Röhrchen überführen
11. Altes Röhrchen erneut mit 5ml PBS/10%FCS auffüllen und resuspendieren
12. Röhrchen in Magneten stellen und 2min warten
13. Vorsichtiges Abziehen der CD25⁺ Zellsuspension
14. Zellpellet nach Zentrifugation (10min, 600xg, 4°C) in Treg-Medium aufnehmen und Zellzahl bestimmen

CD4⁺CD25⁻ T-Zellanreinigung (konventionelle CD4⁺ T-Zellen)

Die Anreinigung erfolgte entweder aus dem 1. Durchlauf der CD25⁺ T-Zellanreinigung oder direkt aus Milzzellen.

1. Zellzahl auf 1×10^8 /ml mit kaltem GM-Puffer einstellen
2. Zugabe von 0.5 μg /ml H129.19-bio pro 1×10^8 Zellen
3. Inkubation bei 4°C für 10min
4. 2maliges Waschen der Milzzellen mit kaltem GM (Zentrifugation: 10min, 600xg, 4°C)
5. Zugabe von Sa- Beads in einem Verhältnis von 1:40 pro 1×10^8 Zellen
6. Inkubation bei 4°C für 10min

7. 2maliges Waschen der Milzzellen mit kaltem GM (Zentrifugation: 10min, 600xg, 4°C)
[In der Waschphase MACS[®]- Zellseparationssäulen vorbereiten]
8. Zellpellet in warmen GM- Puffer aufnehmen; Endvolumen 5ml pro Säule; max. $5 \cdot 10^8$ Zellen pro Säule; Säulen in Magnet fixieren
9. Zellsuspension ml-weise über die Separationssäule geben
10. Spülen des Röhrchens mit 3ml warmen GM; ml-weise über die Säule
11. 2maliges Spülen der Säule mit 3ml warmen GM
12. Säule aus Magnet nehmen und gebundene Zellen mit 5ml warmen GM und sterilem Stempel eluieren
13. Eluat erneut über eine Säule geben (Schritte 9-12 wiederholen)
14. Zellzahl bestimmen
15. Zellpellet nach Zentrifugation (10min, 600xg, 4°C) in Testmedium aufnehmen

Stimulation/Voraktivierung von T-Zellen

Die Zellen wurden durch Quervernetzung der T-Zell-Rezeptor-assoziierten CD3 Komplexe mittels Antikörper und mit anti-CD28 stimuliert. Für die polyklonale Stimulation wurden 24-well Platten wie folgt behandelt:

1. 500µl pro well anti-CD3- Antikörper in einer Konzentration von 3µg/ml; 30 Minuten bei 37°C inkubieren
2. wells 2x mit 1xPBS waschen
3. 500µl pro well anti-CD28- Antikörper in einer Konzentration von 5µg/ml für nTregs bzw. 10µg/ml für konventionelle CD4⁺ T-Zellen; 30 Minuten bei 37°C inkubieren
4. vor Ausplattieren der Zellen wells 2x mit 1xPBS waschen
5. pro well $1-1.5 \cdot 10^6$ Zellen ausplattieren

Konventionelle CD4⁺ T-Zellen wurden für einige Versuche in Gegenwart von 5ng/ml TGF-β (*porcine* TGF-β1, Fa. R&D Systems) und 10ng/ml mlIL-2 kultiviert.

FACS Analyse

Da sich Zellen sowohl in Größe und Granularität, als auch in der Expression verschiedener Oberflächenproteine unterscheiden, kann man Zellen nach diesen Kriterien mit Hilfe der FACS Analyse (*Fluorescence Activated Cell Sorting*) analysieren.

Zur Bestimmung der Reinheit der angereinigten Zellen wurden die T-Zellen auf der Oberfläche mit Antikörpern gegen anti-CD4 und anti-CD25 und intrazellulär mit Antikörpern gegen FoxP3 gefärbt. Die Antikörper waren entweder mit FITC- (*Fluorescein Isothiocyanat*) oder PE- (*Phycoerytrin*) Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt und wurden von den Firmen Becton Dickinson oder eBioscience bezogen. Für die intrazelluläre FoxP3 Färbung wurde das APC (*Allophycocyanin*) anti-mouse/rat FoxP3 Staining Set von der Firma eBioscience verwendet.

Vor der Färbung ist folgendes vorzubereiten:

CD4/CD25 Antikörper-Mix: α CD4-FITC (Klon GK1.5) wurde in einer Konzentration von 2.5 μ g/ml und α CD25-PE (Klon PC61.5) in einer Konzentration von 1 μ g/ml eingesetzt; die AK wurden in GM-Puffer verdünnt

Fixierungs-/Permeabilisierungspuffer (Fix/Perm): 1 Teil des Konzentrats mit 3 Teilen des zugehörigen Verdünnungsmittels mischen

1x Permeabilisierungspuffer (1xPerm-Puffer): 10x Puffer 1:10 mit H₂O verdünnen

FoxP3 Antikörper: α FoxP3-APC (Klon FJK-16s) wurde in einer Konzentration von 1 μ g/ml eingesetzt und in 1xPerm-Puffer verdünnt

Die Färbung erfolgte mit $5 \cdot 10^5$ bis $1 \cdot 10^6$ Zellen in einer 96-well Rundbodenplatte und 3minütiger Zentrifugation bei 600xg.

1. 2maliges Waschen der Zellen mit GM-Puffer
2. 100 μ l α CD4/CD25 Antikörper Mix auf Zellpellet
3. 20 min bei 4°C im Dunkeln inkubieren
4. 2maliges Waschen der Zellen mit GM-Puffer
5. 100 μ l Fix/Perm ½h- 18h bei 4°C im Dunkeln inkubieren
6. 2maliges Waschen der Zellen mit 1xPerm-Puffer
7. 100 μ l α FoxP3 Antikörper auf Zellpellet
8. 30 min bei 4°C im Dunkeln inkubieren
9. 2maliges Waschen der Zellen mit 1xPerm-Puffer
10. Zellpellet in 100 μ l GM-Puffer aufnehmen

Die Messung erfolgte am FACS-Canto der Firma BD, die Auswertung entweder mit der BD-eigenen Software FACS-DIVA oder dem Auswerteprogramm FlowJo.

Proliferations- bzw. Suppressionsassay

Um die Hemmung der Proliferation aktivierter konventioneller CD4⁺ T-Zellen durch CD4⁺CD25⁺ regulatorische T-Zellen (nTregs) zu messen, wurden die CD4⁺ T-Zellen ($2 \cdot 10^4$ Zellen) entweder alleine oder in Kokultur mit den nTregs ($2 \cdot 10^4$ Zellen) stimuliert. Die Stimulation erfolgte dabei mit löslichen anti-CD3-Antikörpern (3µg/ml) und Mitomycin C- behandelten A20-Zellen (siehe unten) im Verhältnis 1:10 zur T-Zellzahl in einer 96-well- Rundbodenplatte für 3 bis 4 Tage, je nach Proliferation, in einem Gesamtvolumen von 200µl Testmedium. Die Bestimmung der Proliferation erfolgte über den Einbau von radioaktivem [³H]-Thymidin in die DNA. Dazu wurden die Zellen an Tag 3 oder 4 mit 0.2 µCi [³H]-Thymidin/well für 18 bis 24h inkubiert. Anschließend wurde die 96-well-Platte bei -20°C eingefroren, um einen weiteren Einbau von [³H]-Thymidin zu verhindern. Zum Messen der Proliferationsrate wurden die Platten wieder aufgetaut und der Inhalt der einzelnen wells abgesaugt, so dass die DNA auf einem Glasfaserfilter zurückgehalten wurde. Der Glasfaserfilter wurde 2min in einer Mikrowelle getrocknet und zusammen mit 10ml Szintillationsflüssigkeit in einem Plastikbeutel eingeschweißt. Die Messung der Radioaktivität erfolgte in einem beta-Szintillationszähler. Die β-Strahlung wird dabei elektrisch als Lichtimpuls verarbeitet und als Impuls pro Minute (cpm = *count per minute*) angegeben.

Behandlung von A20 mit Mitomycin C

Die B-Tumorzelllinie A20 diente als Antigenpräsentierende Zelle und wurde als Ko-Stimulus im Proliferations-/Suppressionsassay eingesetzt. Um die starke Eigenproliferation der Zellen zu verhindern, wurden sie mit dem zytotoxischen Antibiotikum Mitomycin C wie folgt behandelt:

1. A20 auf $2 \cdot 10^7$ Zellen/ml einstellen mit MEM/2%FCS
2. Zugabe von 60µg Mitomycin C [1mg/ml] (50ml Röhrchen verwenden)
3. Inkubation für 30min bei 37°C im Wasserbad
4. 5maliges Waschen der Zellen mit 10ml MEM/2%FCS
5. Zellpellet nach Zentrifugation (10min, 600xg, 4°C) in TM aufnehmen
6. Zellzahl bestimmen

2.3.2 Molekularbiologische Methoden

Präparation der mRNA aus T-Zellen

Zur Anreicherung der Gesamt-RNA wurden $5 \cdot 10^5$ bis $5 \cdot 10^6$ Zellen in 1ml *Total RNA Isolation Reagent* (TRIR) der Firma Thermo Scientific gelöst. Das Lysat konnte entweder direkt nach einer 5minütigen Inkubation bei 4°C weiterverarbeitet werden oder bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C eingefroren werden. Die Präparation der RNA setzte sich nach Homogenisierung der Zellen aus drei Teilen zusammen: der RNA Extraktion, der RNA Präzipitation und dem Waschen der RNA. Aufgrund der Kontaminationsgefahr mit RNasen müssen bei der Verarbeitung von RNA Handschuhe getragen werden und RNase-freie Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße verwendet werden.

Mit dem Zell-Lysat wurde wie folgt vorgegangen:

1. Zugabe von 200 μl Roti[®]Chloroform/Isoamylalkohol 24:1
2. vortexen und 10 Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubieren
3. Zentrifugation: 15min, 9000xg, 4°C
4. ~ 500 μl der oberen wässrigen Phase in neues Reaktionsgefäß überführen
5. Zugabe von 1.5 μl Glycogen (20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ in 1% $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$)
6. vortexen und 5 Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubieren
7. Zentrifugation: 10min, 9000xg, 4°C
8. 2maliges Waschen des RNA-Pellets mit 1ml 75% Ethanol in $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ (Zentrifugation: 10min, 5000xg, 4°C)
9. Pellet an der Luft trocknen lassen, in 20 μl RNase-freiem Wasser aufnehmen und 5min bei 56°C lösen (die gelöste RNA kann bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C aufbewahrt werden)

Bestimmung der Konzentration und Reinheit der mRNA

Die Konzentration und die Reinheit der RNA wurden mit Hilfe eines Photometers (Fa. Eppendorf) bestimmt. Die Konzentration errechnete sich aus dem Absorptionsmaximum der aromatischen Pyridin- und Pyrimidinringe der Nucleinsäurebasen bei 260nm. Da bei dieser Wellenlänge eine $\text{OD}_{260\text{nm}}$ von 1 einer RNA Konzentration von 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ entspricht, wurde die Konzentration wie folgt berechnet:

$$\text{Isolierte RNA [ng}/\mu\text{l}] = \text{OD}_{260\text{nm}} * \text{Verdünnungsfaktor} * \text{RNA-Faktor } 40\mu\text{g}/\text{ml}$$

Zur Überprüfung der Reinheit wurde zusätzlich die Absorption bei 280nm gemessen, da Proteine aufgrund aromatischer Aminosäuren ihr Absorptionsmaximum bei 280nm haben. Das Verhältnis von 260nm zu 280nm sollte zwischen 1.8 und 2.0 liegen, um die RNA als rein zu betrachten.

Reverse Transkription (RT-Reaktion) der mRNA zu cDNA

Für nachfolgende PCR Analysen musste die RNA in cDNA (*copyDNA*) umgeschrieben werden. Je nach RNA Konzentration wurden 0.5 bis 2µg RNA für die RT-Reaktion eingesetzt. Die Reaktion erfolgte mit Hilfe von Oligo d(T)_n und poly d(N)₆ Primern. Durch die Kombination dieser Primer wird sichergestellt, dass eine große Menge vollständig kopierter RNA Moleküle gewonnen wird.

Tabelle 6: Ansatz für eine RT-Reaktion

Reagenzien	Menge in µl
100ng/µl Oligo d(T) _n (Fa. Roche)	1
20ng/µl poly d(N) ₆ (Fa. Roche)	1
10mM d(NTPs) (Fa. Gibco)	2
5x Puffer (Fa. Fermentas)	4
200U/µl RevertAid M-MuLV Reverse Transkriptase (Fa. Fermentas)	1
RNA/H ₂ O _{DEPC}	11
Σ	20

Die RT-Reaktion wurde bei 42°C, dem Temperaturoptimum der verwendeten Reversen Transkriptase, für eine Stunde durchgeführt.

Die gewonnenen cDNAs wurden immer 1:5 mit autoklaviertem Wasser verdünnt und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

Quantitative Real Time Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR)

Die qRT-PCR Analyse verbindet die herkömmliche PCR (*polymerase chain reaction*) zusätzlich mit der Quantifizierung der gewonnenen DNA (Amplifikat). Die Quantifizierung erfolgt mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffes, der sich in „Echt-Zeit“ (*Real Time*) in die DNA einlagert, wodurch die Fluoreszenz ansteigt. Die Zunahme der Fluoreszenz korreliert daher mit der Zunahme des Amplifikats. Die Messung erfolgt nach jedem Zyklus am Ende der Elongation. In dieser Arbeit wurde die qRT-PCR mit 50 Zyklen durchgeführt, wobei jeder Zyklus aus folgenden drei Schritten zusammengesetzt ist:

1. **Denaturierung:** Die doppelsträngige DNA wird auf 95°C erhitzt, so dass die Stränge getrennt werden.
2. **Primerhybridisierung:** In diesem Schritt erfolgt die spezifische Anlagerung der Oligonukleotide (*Primer*) an die einzelsträngige DNA.
3. **Elongation:** Die DNA-Polymerase füllt die fehlenden Stränge der DNA mit Nukleotiden auf, beginnend am 3'-Ende der angelagerten *Primer*, so dass wieder Doppelstränge entstehen.

Die Analyse erfolgte mit einem iCycler der Firma Bio-Rad und ABsolute™ QPCR SYBR® Green Fluorescein Mix der Firma Thermo Scientific. Die qRT-PCR wurde in Triplikaten à 25µl gemessen.

Tabelle 7: 3.2-facher Ansatz für die qRT-PCR

Reagenzien	Menge in µl
H ₂ O _{autoklaviert}	28.8
ABsolute SYBR Green Fluorescein (2x)	40
cDNA	8
Primer (5pmol/µl)	3.2
Σ	80

Da der ABsolute™ QPCR SYBR® Green Fluorescein Mix eine *Hot-start* Polymerase enthält, musste der Ansatz vor Beginn der eigentlichen PCR für 15 Minuten auf 95°C geheizt werden, um das Enzym zu aktivieren. Das anschließende Temperaturprogramm sah folgendermaßen aus:

Tabelle 8: Temperaturprogramm der qRT-PCR

	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
Denaturierung	95°C	30 sec	50
Primerhybridisierung	57°C	30 sec	
Elongation	72°C	1 min	

Um die Spezifität der verwendeten Oligonukleotide zu bestimmen, wurde nach Beendigung der 50 Zyklen eine Schmelzkurvenanalyse vorgenommen. Dabei wird die DNA mit Hilfe eines kontinuierlichen Temperaturanstiegs zu zwei einzelsträngigen DNA Molekülen aufgeschmolzen, wobei der Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt und gemessen wird. Spezifische PCR-Produkte haben einen höheren Schmelzpunkt als beispielsweise Primer-Dimere und können somit unterschieden werden.

Die Auswertung erfolgte mit der Bio-Rad eigenen Software.

Anreinigung, RT-Reaktion und qRT-PCR von microRNAs

Zur Anreinigung der microRNAs wurde das *mirVanaTM miRNA Isolation Kit* der Firma Ambion verwendet. Die Reverse Transkription der microRNAs zu cDNA wurde mit Hilfe des *TaqMan[®] MicroRNA Reverse Transcription Kit* der Firma Applied Biosystems durchgeführt. Die Detektion und Quantifizierung der miRNA155 erfolgte mit Hilfe des *mmu-miR-155 TaqMan[®] MicroRNA Assay* der Firma Applied Biosystems und anschließender TaqMan qRT-PCR. Bei den verwendeten Kits wurde genau nach den Herstellerangaben vorgegangen.

Der Vorteil von TaqMan Sonden, im Vergleich zu den oben verwendeten Oligonukleotiden, ist, dass sie eine wesentlich höhere Spezifität gewährleisten, da sie an ihrem einen Ende einen *Quencher* und an ihrem anderen Ende den Fluoreszenzfarbstoff FAM besitzen. Während eines PCR-Zyklus hybridisiert die Sonde mit der einzelsträngigen DNA, wobei die Fluoreszenz intakter TaqMan Sonden durch den *Quencher* unterdrückt wird. Die Taq Polymerase, die zusätzlich zur Polymerase Aktivität auch eine 5'-3' Exonuklease Aktivität besitzt, baut die Sonde während der Synthese am 5'- Ende ab, wodurch sich *Quencher* und Fluorophor voneinander entfernen und eine Zunahme der Fluoreszenz gemessen werden kann. Da Sonden, die nicht zu 100% binden, verdrängt werden, bevor die Taq Polymerase aktiv wird, ist das gemessene Fluoreszenz Signal eindeutig Sequenz-spezifisch.

Agarose Gelelektrophorese

Die zu analysierende DNA wurde je nach zu erwarteter Fragmentgröße in Gelen mit einer Agarose Konzentration von 1 bis 2% aufgetrennt. Je kleiner die DNA Fragmente sind, desto höher muss das Gel konzentriert sein. Die abgewogene Agarose wurde in 1x TBE-Puffer durch Erhitzen gelöst. Nach Abkühlen auf etwa 60°C wurde Ethidiumbromid, ein roter *Phenanthridin*-Farbstoff, zugegeben und die Agarose in eine horizontale Elektrophoresekammer gegossen. Ein Kamm sorgte für die Aussparungen (Taschen) im Gel, in die die DNA Proben gegeben wurden. Das polymerisierte Gel wurde mit Laufpuffer (1xTBE + 2µl/l Ethidiumbromid) getränkt und die mit Ladepuffer versehenen DNA Proben in die Taschen pipettiert. Die Auftrennung erfolgte bei 100 Volt. Da sich Ethidiumbromid zwischen die Basen der DNA einlagert, konnten die DNA Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

Plasmidpräparation

Die verwendeten Plasmide wurden mit Hilfe des *PureLink™ HiPure Plasmid DNA Maxiprep Kit* der Firma Invitrogen durchgeführt. Bis zur DNA Fällung wurde genau nach Herstellerangaben vorgegangen. Die DNA Fällung wurde wie folgt ausgeführt:

1. DNA Pellet in 900µl TE-Puffer lösen
2. in 2ml Reaktionsgefäß überführen
3. 900µl Isopropanol und 100µl 3M Natriumacetat-Lösung hinzugeben
4. Reaktionsgefäß invertieren und 30min bei -20°C inkubieren
→ DNA fällt aus
5. Zentrifugation: 10min, 6000xg, 4°C
6. Pellet mit 1ml Ethanol waschen (Zentrifugation: 10min, 6000xg, 4°C)
7. Pellet an der Luft trocknen lassen und in 100µl TE-Puffer aufnehmen
8. Konzentration der Plasmide am Photometer (Fa. Eppendorf) für dsDNA bei 260nm bestimmen. Da die Wellenlänge einer OD_{260nm} von 1 einer DNA Konzentration von 50µg/ml entspricht, wird die Konzentration wie folgt berechnet:

$$\text{Isolierte DNA [ng/µl]} = \text{OD}_{260\text{nm}} * \text{Verdünnungsfaktor} * \text{DNA-Faktor } 50\mu\text{g/ml}$$

Die aufgereinigten Plasmide wurden bis zu ihrer Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

Chromatin Immuno-Präzipitation (ChIP)

Zum Nachweis der Bindung von HELIOS- Protein an den FoxP3 Promotor wurde die Chromatin Immuno-Präzipitationsanalyse (ChIP) angewandt. Es wurde das *ChIP-IT™ Express Kit* von Active Motif verwendet und genau nach den Herstellerangaben vorgegangen.

Transfektion

Bei der Transfektion wird fremde DNA oder RNA in Zellen eingebracht. In dieser Arbeit erfolgte die Transfektion von Plasmid-DNA (pHELIOS bzw. pEOS) und miRNA (pre-miR155) mit Hilfe des *Mouse T cell Nucleofector® Kit* (Fa. Amaxa) durch Elektroporation mit dem *Nucleofector Device* der Firma Amaxa unter Verwendung des Programms X-01.

Die Plasmid-DNA oder miRNA musste vor der Transfektion mit der *Nucleofector Solution* auf die gewünschte Konzentration verdünnt werden (Einsatz von pHELIOS bzw. pEOS: 5µg; pre-miR155: 1µM). Für einen nachfolgenden Dual-Luciferase Reporter Assay wurden die Zellen zusätzlich mit den Expressionsvektoren für die Renilla-Luciferase (300ng) und die Firefly-Luciferase (FoxP3-Promotor; 5µg) co-transfiziert.

Es wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen:

1. Zellen ($2-3 \cdot 10^6$) 5min bei RT und 1000xg zentrifugieren
2. Pellet in 90µl *Nucleofector Solution* resuspendieren
3. 15µl verdünnte Plasmid-DNA oder miRNA zugeben
4. Transfer der Lösung in die Amaxa Küvette
5. Behandlung im Elektroporationsgerät
6. Zugabe von 1ml vorgewärmtem Amaxa Medium
7. Überführung mit der Amaxa Plastikpipette in eine 24-well Platte
8. Zellen 1-2 Stunden bei 37°C inkubieren („Erholungsphase“ der Zellen)
9. Amaxa Medium durch T-Zell-Medium ersetzen und mit anti-CD3/CD28 Antikörpern bis zur Weiterbehandlung stimulieren

Dual-Luciferase Reporter Assay

Zur Analyse der Promotor Aktivität von FoxP3 wurde ein *Dual-Luciferase™ Reporter Assays* der Firma Promega durchgeführt. Bei dieser Methode werden zwei Expressionsvektoren in einem Ansatz eingesetzt. Das eine Plasmid trägt ein Firefly-Luciferase-Gen, das durch den zu analysierenden Promotor (FoxP3) kontrolliert wird, das zweite Plasmid trägt ein Renilla-Luciferase-Gen, das durch einen viralen Promotor (HSV = *herpes simplex virus*) gesteuert wird und dank des integrierten Thymidinkinase-Promotors als interner Standard dient. Es wurde genau nach Herstellerangaben vorgegangen.

2.3.3 Methoden zur Analyse von Proteinen

Herstellung von Zell-Lysaten

Zur Gewinnung von Gesamtzell-Lysaten wurde der RIPA-Puffer (*Radio Immuno Precipitation Assay*) verwendet. Hierfür wurden $2-3 \cdot 10^6$ Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen und mit 100µl RIPA-Puffer lysiert. Zur besseren Lyse der Zellen wurde der Ansatz für 15min bei 4°C geschüttelt. Nach anschließender 15minütiger Zentrifugation bei 11000xg und 4°C wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -80°C aufbewahrt.

Bestimmung der Protein Konzentration

Die Proteinbestimmung erfolgte mit dem *BCA Protein Assay Kit* der Firma Novagen und wurde laut Herstellerangaben durchgeführt. Die Konzentration wurde am Spectra Fluor Plus der Firma Tecan bei 562nm gemessen.

Polyacrylamid- Gelelektrophorese (PAGE)

Die PAGE ist ein Verfahren zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht.

Die Zell-Lysate wurden nach Bestimmung der Protein Konzentration auf die gleiche Konzentration eingestellt und mit dem 4x Ladepuffer versetzt und für 10min bei 95°C erhitzt. Durch das DTT (Dithiothreitol) im Ladepuffer und die anschließende Hitzebehandlung werden die Disulfidbrücken gespalten, die Proteine werden denaturiert. Das anionische Detergenz LDS (Lithium-dodecylsulfat) im Ladepuffer bewirkt eine Entfaltung der Proteine und somit eine bessere Auftrennung. Die Anzahl der LDS-Moleküle, die an die Proteine binden, ist proportional zu deren Molekulargewichten. Die negative Ladung der LDS-Moleküle überlagert die Eigenladung der Proteine, wodurch die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht im elektrischen Feld erst möglich ist. In dieser Arbeit wurden Gradientengele von Invitrogen (*NuPAGE[®] Novex[®] 4-12% Bis-Tris Mini Gel*) verwendet. Die Gelelektrophorese mit diesen Gradientegelen fand in MOPS-Puffer bei einer Spannung von 200 Volt statt.

Western-Blot Analyse

Die mit PAGE aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe des Wet-Blot-Verfahrens auf eine Transfermembran (Immobilon-P der Fa. Millipore) mit Hilfe des *Genie[®] Blotter* der Firma Idea Scientific Company übertragen. Die verwendeten Puffer und das Laden der Apparatur erfolgte genau nach Herstellerangaben.

Nach dem Transfer wurde wie folgt vorgegangen:

1. Membran 30min in 1x Roti[®]-Block (Fa. Roth) bei RT inkubieren
2. 2maliges Waschen mit 1x TBST
3. 1. Antikörper in 1x TBST+1%BSA über Nacht bei 4°C inkubieren
4. 2maliges Waschen mit 1x TBST
5. 2. Antikörper in 1x TBST+1%BSA für 1-2h bei RT inkubieren
6. 2maliges Waschen mit 1x TBST
7. Membran vor der Detektion für mind. 1h in 1x TBS bei 4°C inkubieren
8. Detektion der Membran mit ECL-Substrat der Firma Pierce

2.3.4 *in vivo* Versuche

Bluten von Mäusen

Das Bluten der Mäuse erfolgte durch Anritzen des Schwanzes mit einem Skalpell. Die Blutropfen wurden in einem Reaktionsgefäß aufgefangen, in dem 300µl Blutpuffer vorgelegt waren. Die Blutpuffer-Lösung wurde in ein Reaktionsgefäß überführt, in dem 3ml ACK-Puffer für die Erythrozytenlyse vorgelegt waren, und für 3-5min lysiert. Nach Zentrifugation (3min bei 500xg) erfolgte ein Waschschrift mit GM-Puffer und anschließend die Färbung für die FACS Analyse.

Auslösen der DTH und Messung der Fußschwellung

Um eine DTH, also eine verzögerte Immunantwort des Typ 4, auszulösen, wurde in den rechten Fußballen der Mäuse 250ng OVA-Pep (Antigen aus dem Hühnereiweiß = Ovalbumin) in 20µl IFA (*incomplete Freund's adjuvant* = Wasser-in-Öl Emulsion) injiziert. Als Kontrolle wurde in den linken Fußballen 20µl IFA alleine gespritzt.

Die Fußschwellung sowohl des rechten als auch des linken Fußes wurde an jedem Tag mit Hilfe einer Testarm-Messuhr (Fa. Mitutoyo) bestimmt. Die Differenz der Füße spiegelte die Stärke der ausgelösten Immunreaktion wider.

3. Ergebnisse

Natürlich vorkommende regulatorische T-Zellen (nTregs) spielen eine wesentliche Rolle bei der Erhaltung der peripheren Toleranz, indem sie fehlgeleitete Effektorfunktionen von Zellen des angeborenen und des erworbenen Immunsystems inhibieren können. Somit sind nTregs in der Lage Autoimmunerkrankungen wie Typ I Diabetes zu verhindern und inflammatorische Erkrankungen wie chronisches Asthma oder chronische entzündliche Darmerkrankungen zu mildern. Im Gegensatz dazu scheinen nTregs in der Tumorummunologie eine eher fatale Rolle zu spielen. Bei der Entstehung von Tumoren tarnen sich die entarteten Zellen als körpereigene Zellen mit relativ schwachen Autoantigenen, so genannten tumorassoziierten Antigenen. Eine effiziente anti-Tumor-Immunreaktion stellt somit quasi eine autoaggressive T-Zell-Antwort dar. Da nTregs jedoch solche autoreaktiven T-Zellen supprimieren, verhindern sie damit eine wirkungsvolle anti-Tumorreaktion.

Die Aufklärung des Mechanismus der nTreg- vermittelten Suppression und der daran beteiligten Moleküle ist daher von großem therapeutischem Interesse.

3.1 Genexpressionsanalyse von T-Zellen

Um neue Aktivierungsmarker oder Moleküle zu identifizieren, die am Mechanismus der nTreg- vermittelten Suppression beteiligt sind, wurde eine Genexpressionsanalyse mittels der DNA-Microarray-Technologie durchgeführt. Diese Analyse gab einen Überblick über Gene, die spezifisch in nTregs ($CD4^+CD25^+FoxP3^+$), im Vergleich zu konventionellen $CD4^+$ T- Zellen ($CD25^-FoxP3^-$), stärker oder schwächer exprimiert werden. Für diese Analyse wurden nTregs und konventionelle $CD4^+$ T- Zellen aus den Milzen von BALB/cJ Mäusen mit spezifischen Antikörpern gegen CD25 und CD4 markiert und angereinigt (siehe Material und Methoden). Die Reinheit der Zellen liegt mit dieser Methode bei über 90% (Abbildung 6). Nach Isolation der RNA aus den ruhenden und aktivierten T-Zell-Populationen wurde die Genexpressionsanalyse durchgeführt (erfolgte extern durch unseren Kooperationspartner Dr. Detlev Mennerich, Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG).

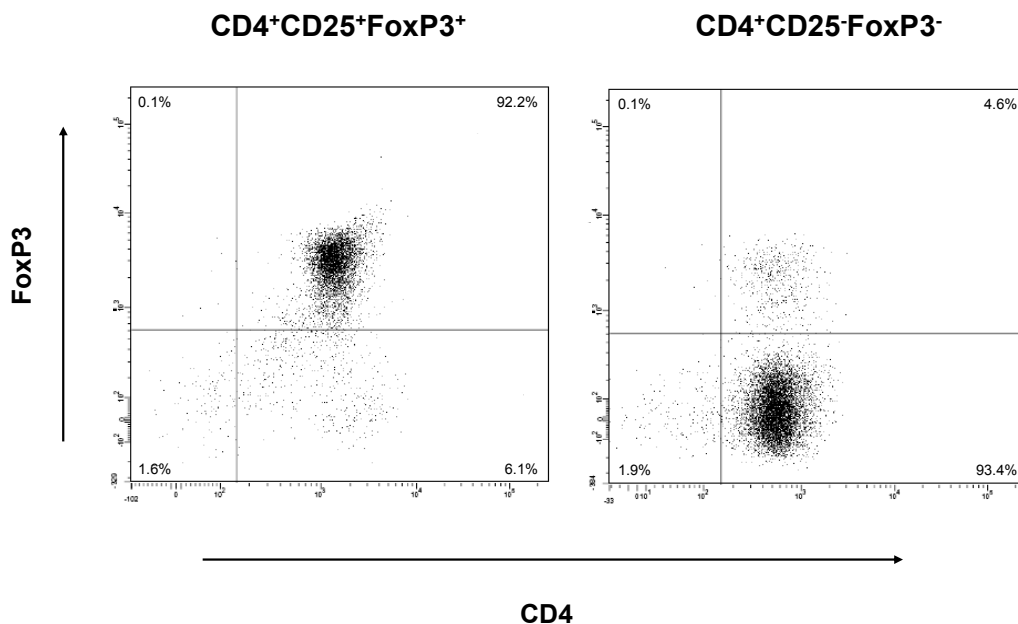


Abbildung 6: Reinheit der MACS isolierten T-Zellen. Die Zellen wurden mit anti-CD4 und anti-FoxP3 Antikörpern gefärbt und durch FACS Analyse auf ihre Reinheit getestet. Links dargestellt sind nTregs, rechts konventionelle $CD4^+$ T-Zellen. Die in den Quadranten angezeigten Prozentzahlen geben den Anteil positiver Zellen an der Gesamtzellzahl an.

Das Resultat der Genexpressionsanalyse ist in Abbildung 7 graphisch als „Volcano Plot“ dargestellt. Der „Volcano Plot“ zeigt horizontal die Regulation der Genexpression zwischen zwei Zellpopulationen, dargestellt als logarithmische Skala, so dass die Regulation symmetrisch erscheint. Die vertikale Achse repräsentiert die Signifikanz der Regulation, welche mithilfe des T-Tests statistisch ermittelt wurde. Punkte, die links der X-Achse angeordnet sind, repräsentieren Gene, die in nTregs schwach, aber in konventionellen CD4⁺ T-Zellen stark exprimiert werden.

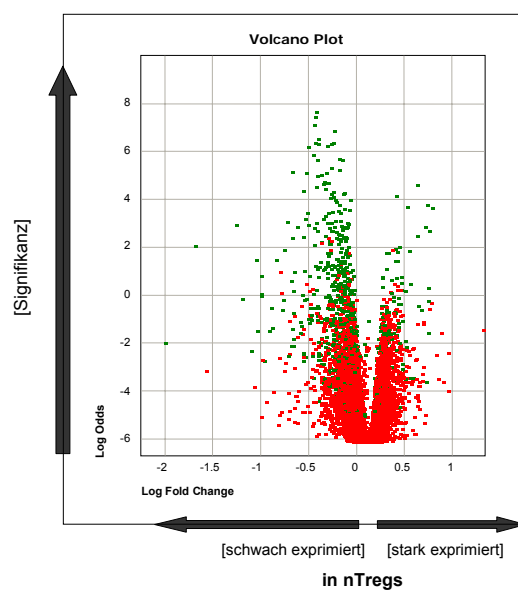


Abbildung 7: „Volcano Plot“ der Genexpressionsanalyse von nTregs. Dargestellt ist die Signifikanz (Y-Achse) gegen die Regulation (X-Achse) von nTregs gegen konventionelle CD4⁺ T-Zellen.

Da die Genexpressionsanalyse eine große Datenmenge geliefert hatte, musste eine Auswahl getroffen werden, welche Gene näher untersucht werden. Unter den in nTregs hochregulierten Genen (Tabelle 9) befinden sich bereits bekannte nTreg-assoziierte Moleküle, aber auch bisher unbekannte Kinasen, Phosphatasen, Oberflächenmoleküle und Transkriptionsfaktoren.

Tabelle 9: Ausschnitt des DNA-Microarrays.

Auswahl an Genen, die in nTregs im Gegensatz zu CD4⁺ T-Zellen stark exprimiert vorliegen.

Gen Name	Funktion	Faktor
Zac1/ PLAGL1	Transkriptionsfaktor	97
HELIOS	Transkriptionsfaktor	70
Pacsin1	Kinase	45
IRF-6	Transkriptionsfaktor	33
Vcam1	Zell-Zell Interaktion	31
Tm7sf1	Transmembranprotein	30
FoxP3	Transkriptionsfaktor	29
RORα	Transkriptionsfaktor	26
Sox4	Transkriptionsfaktor	24
Phospholipase A2	Phospholipase	18
CCR6	Chemokin-Rezeptor	12
Gjb2 (CX26)	Gap junction	11
EOS	Transkriptionsfaktor	6
BIC	microRNA155	2

In der Genexpressionsanalyse zeigte sich, dass der Transkriptionsfaktor HELIOS, der zur IKAROS- Genfamilie gehört, in nTregs sehr stark exprimiert wird. Des Weiteren wurde EOS, ein weiterer Transkriptionsfaktor dieser Familie, mit einer erhöhten Genexpression in nTregs gefunden. Da bereits bekannt ist, dass der Transkriptionsfaktor IKAROS eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von T-Zellen spielt, sollte die Rolle der beiden im Microarray gefundenen Familienmitglieder HELIOS und EOS näher untersucht werden.

Interessanterweise zeigte sich in der DNA-Microarray-Analyse neben der Expression verschiedenster Protein-kodierender mRNAs sowohl in nTregs als auch in konventionellen CD4⁺ T-Zellen nach Aktivierung eine erhöhte Expression des BIC Gens (*B-cell integration cluster*), welches für die nicht-Protein-kodierende microRNA155 (miR155) kodiert. Da es durch die miR155-*knockout* Maus bereits Hinweise gab, dass die miR155 an der Funktion von T-Zellen beteiligt ist, sollte nachfolgend die Rolle der miR155 bei der nTreg- vermittelten Suppression in beiden T-Zellpopulationen untersucht werden.

3.2 Transkriptionsfaktoren der IKAROS- Genfamilie

In der Genexpressionsanalyse mittels DNA-Microarray (siehe 3.1) hat sich gezeigt, dass in nTregs im Vergleich zu konventionellen CD4⁺ T-Zellen neben den bereits bekannten nTreg Markern Foxp3, CD25, CTLA-4 und GITR auch die Transkriptionsfaktoren EOS und vor allem HELIOS stark exprimiert werden (Abbildung 8). Die übrigen Mitglieder der IKAROS- Familie, PEGASUS, AIOLOS und IKAROS, zeigten keine verstärkte Expression in nTregs.

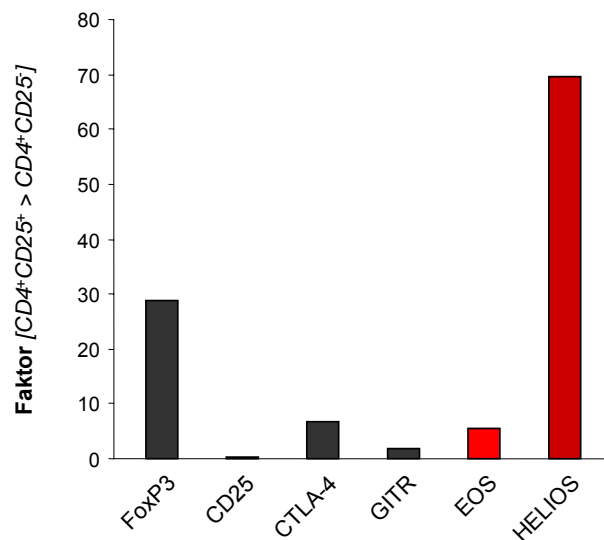


Abbildung 8: Ausschnitt hochregulierter Gene in nTregs. In der Zusammenstellung der Genexpressionsanalyse durch DNA-Microarray sind einige Gene dargestellt, die in nTregs stark exprimiert vorliegen. Der Faktor gibt das Verhältnis zwischen nTregs gegen konventionelle CD4⁺ T-Zellen an.

Sowohl EOS als auch HELIOS spielen eine entscheidende Rolle an der Aufrechterhaltung eines funktionierenden Immunsystems. Es ist bekannt, dass die Proteine der IKAROS- Genfamilie sowohl an der Entwicklung als auch an der Differenzierung von Lymphozyten beteiligt sind (siehe Einleitung).

Ein zentraler Punkt bei der Erforschung von nTregs ist die Frage, welche Moleküle an ihrer Entwicklung im Thymus beteiligt sind und somit eine entscheidende Rolle an der Expression des nTreg spezifischen Transkriptionsfaktors FoxP3 spielen. Da bereits gezeigt werden konnte, dass FoxP3 nicht für die verstärkte Expression von HELIOS in nTregs verantwortlich ist, sollte untersucht werden, ob im Gegenzug dazu die verstärkte HELIOS Expression einen Einfluss auf die Expression von FoxP3 und damit auf die Entwicklung und Funktion von nTregs hat⁶⁰.

Im Folgenden sollten zunächst die Ergebnisse der DNA-Microarray Genexpressionsanalyse mittels qRT-PCR und Western-Blot Analysen validiert werden. Anschließend sollte die Wirkung der Transkriptionsfaktoren HELIOS und EOS auf den FoxP3 Promoter durch Überexpressionsstudien untersucht werden.

3.2.1 HELIOS und EOS zeigen präferentiell in nTregs eine verstärkte Expression

Um die in der Genexpressionsanalyse gewonnenen Daten bezüglich der HELIOS Expression zu validieren, wurden qRT-PCR Versuche durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen nach Anreinigung mit einer Kombination von anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern stimuliert. Zu den unten angegebenen Zeitwerten wurde die Expression der HELIOS mRNA analysiert. Als Kontrolle dienten unstimulierte, frisch angereinigte Zellen.

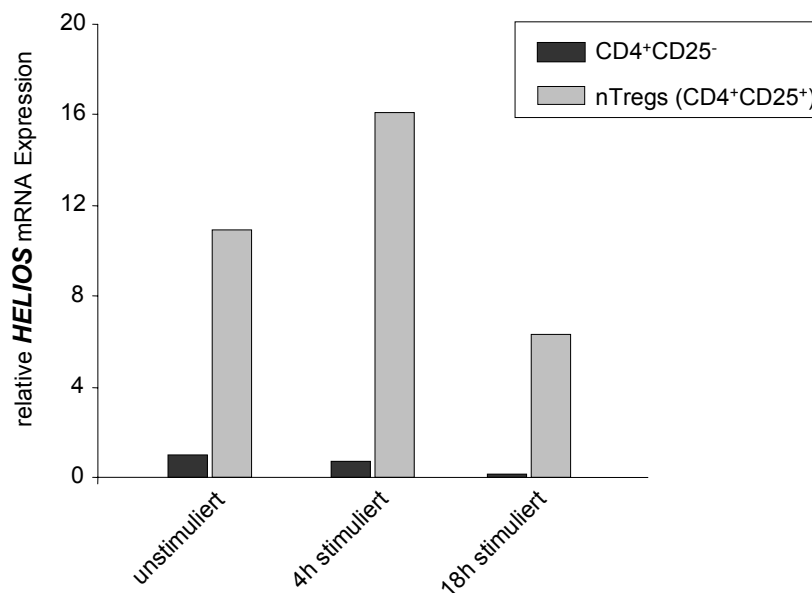


Abbildung 9: HELIOS Expression von nTregs und konventionellen CD4⁺ T-Zellen. Zum Nachweis von HELIOS wurde eine qRT-PCR durchgeführt und die Expression von nTregs mit konventionellen CD4⁺ T-Zellen verglichen. Die HELIOS Expression wurde auf das Haushaltsgen HGPRT (Hypoxanthin-Guanin-phosphoribosyltransferase) normalisiert.

In Abbildung 9 ist die Expression von HELIOS mRNA dargestellt. Es zeigt sich, dass nTregs eine deutlich höhere HELIOS Expression aufweisen, als konventionelle CD4⁺ T-Zellen. Die polyklonale TZR Stimulation bewirkt in den konventionellen CD4⁺ T-Zellen keinen Anstieg der Expression. In nTregs ist nach vierstündiger Stimulation eine Induktion der HELIOS mRNA Expression zu erkennen, die nach längerer Stimulation (18h) wieder um etwa 50% zurückgeht.

Anschließend sollten die oben gewonnenen HELIOS mRNA Daten auf Proteinebene mittels Western-Blot Analyse bestätigt werden.

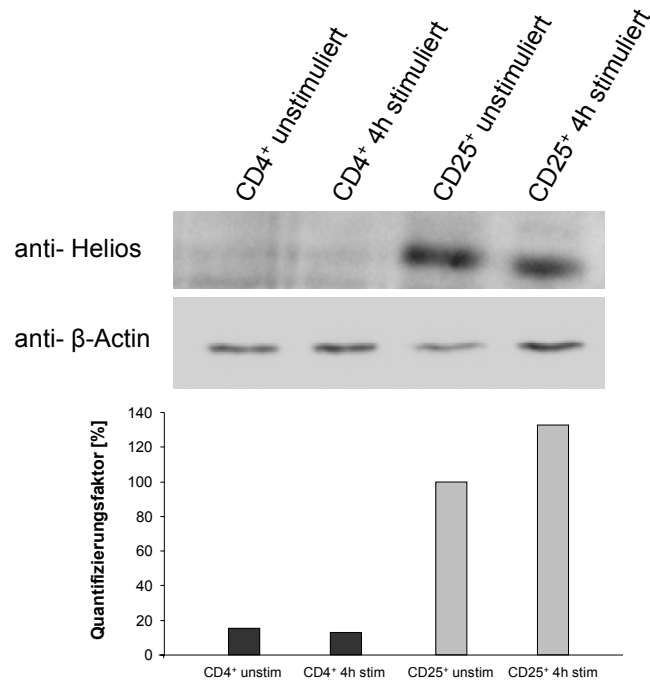


Abbildung 10: HELIOS Protein-Expression von konventionellen CD4⁺ T-Zellen und nTregs. Gesamtzell-Lysate von konventionellen CD4⁺ T-Zellen und nTregs wurden mittels Western-Blot Verfahren auf ihre HELIOS Expression analysiert. Zur Normalisierung wurden Antikörper gegen β-Actin verwendet. Die untere Abbildung gibt die Quantifizierung der Banden an, wobei unstimulierte CD25⁺ T-Zellen als 100% gesetzt und alle anderen Werte darauf bezogen wurden.

Der Western-Blot Analyse lässt sich entnehmen, dass sowohl unstimulierte als auch stimulierte nTregs eine sehr starke HELIOS Expression aufweisen, während sich das HELIOS Protein in konventionellen CD4⁺ T-Zellen kaum detektieren lässt (Abbildung 10).

HELIOS wird, analog zu FoxP3, präferentiell in nTregs exprimiert, während es sich in konventionellen CD4⁺ T-Zellen kaum nachweisen lässt.

Analog zu HELIOS zeigte sich bei der Microarray-Analyse auch eine erhöhte Expression des Transkriptionsfaktors EOS in nTregs. Um nun diese Ergebnisse der Genexpressionsanalyse zu validieren, wurde die EOS mRNA Expression mittels qRT-PCR bestimmt.

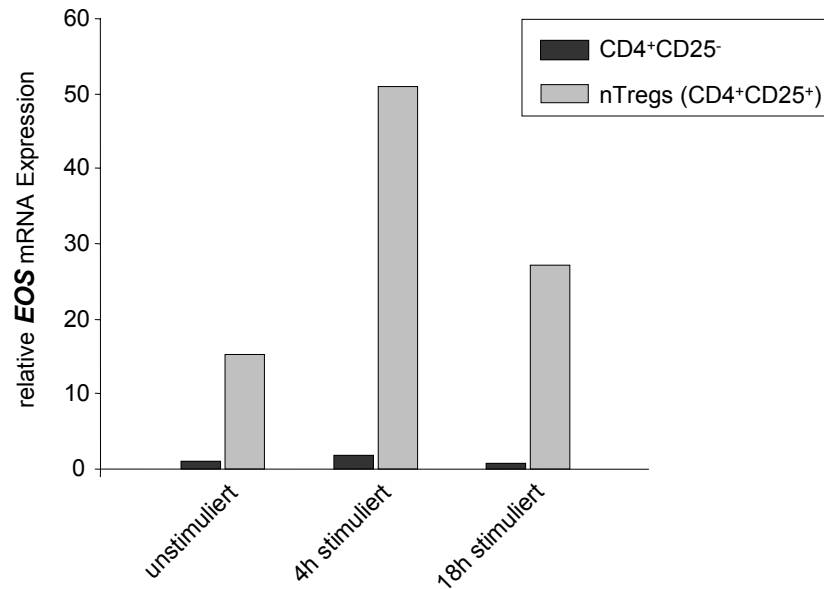


Abbildung 11: EOS Expression von nTregs und konventionellen CD4⁺ T-Zellen. Mit qRT-PCR wurde die EOS Expression von nTregs mit konventionellen CD4⁺ T-Zellen verglichen. Als Haushaltsgen diente HGPRT.

Wie in Abbildung 11 zu erkennen ist, exprimieren nTregs wesentlich mehr EOS mRNA als konventionelle CD4⁺ T-Zellen. Während die polyklonale TZR Stimulation die EOS mRNA Expression in konventionellen CD4⁺ T-Zellen nicht erhöht, bewirkt eine kurzzeitige Stimulation (4h) in den nTregs hingegen eine Induktion der EOS mRNA Expression, die nach 18stündiger Stimulation wieder abnimmt.

Die Darstellung von EOS auf Proteinebene war zum Zeitpunkt der Versuche nicht möglich, da keine spezifischen Antikörper zur Verfügung standen.

Die Expressionsanalyse der übrigen Mitglieder der IKAROS- Genfamilie mit Hilfe der qRT-PCR ergab, analog zur DNA-Microarray-Analyse, keine Unterschiede zwischen nTregs und konventionellen CD4⁺ T-Zellen (Daten nicht gezeigt), so dass diese nicht präferentiell an der Entwicklung und Funktion von nTregs beteiligt zu sein scheinen und somit nicht weiter untersucht wurden.

3.2.2 Spleißvarianten von HELIOS und EOS

Wie bereits in der Einleitung geschildert, ist ein Charakteristikum der Transkriptionsfaktoren der IKAROS- Genfamilie, dass jedes Mitglied in verschiedenen Isoformen vorliegt.

HELIOS Isoformen

Bei gesunden Menschen sind zwei Isoformen des Transkriptionsfaktors HELIOS bekannt. Durch Klonierungsstudien in unserem Labor konnte die Existenz von zwei Spleißvarianten auch in Mäusen bestätigt werden. Während die lange Isoform, HELIOS_long, vier Zinkfinger für die DNA Bindung besitzt, verfügt die kurze Isoform, HELIOS_short, nur über drei Zinkfinger, da eine Region von 78 Basenpaaren in Exon 3 fehlt (Abbildung 12).

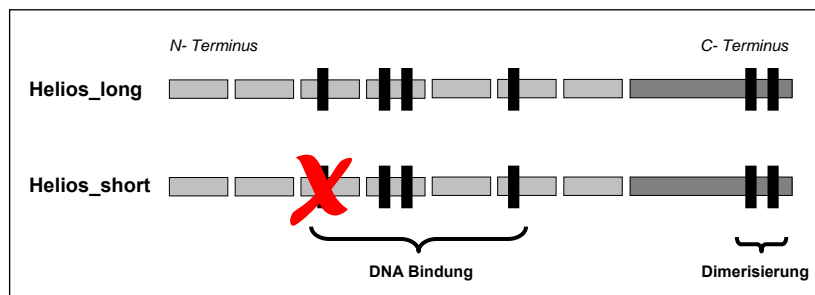
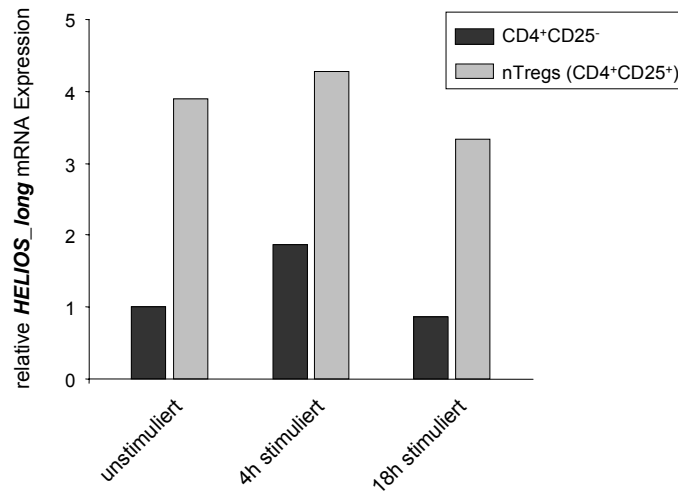


Abbildung 12: Schematische Darstellung der beiden HELIOS Isoformen. Beide HELIOS Isoformen besitzen am C-Terminus zwei Zinkfinger für die Dimerisierung mit Mitgliedern der IKAROS-Familie. Während die lange HELIOS Isoform, HELIOS_long, mit vier N-terminalen Zinkfingern an die DNA bindet, benötigt die kurze HELIOS Isoform, HELIOS_short, nur drei Zinkfinger. (Exons sind in grau, Zinkfinger in schwarz dargestellt).

Durch den hoch-konservierten C-Terminus weisen beide HELIOS Spleißvarianten zwei C-terminale Zinkfinger für die Dimerisierung auf. Durch die Unterschiede im N-Terminus (DNA Bindungsdomäne) erkennen die beiden Isoformen unterschiedliche Sequenzen in der DNA und sind somit für die Regulation der Expression unterschiedlicher Gene verantwortlich.

Um zu untersuchen, ob die beiden HELIOS Isoformen unterschiedlich stark in nTregs oder konventionellen CD4⁺ T-Zellen exprimiert werden, wurden für die qRT-PCR Oligonukleotide verwendet, die spezifisch nur eine der beiden Isoformen erkennen.

A - HELIOS_long



B - HELIOS_short

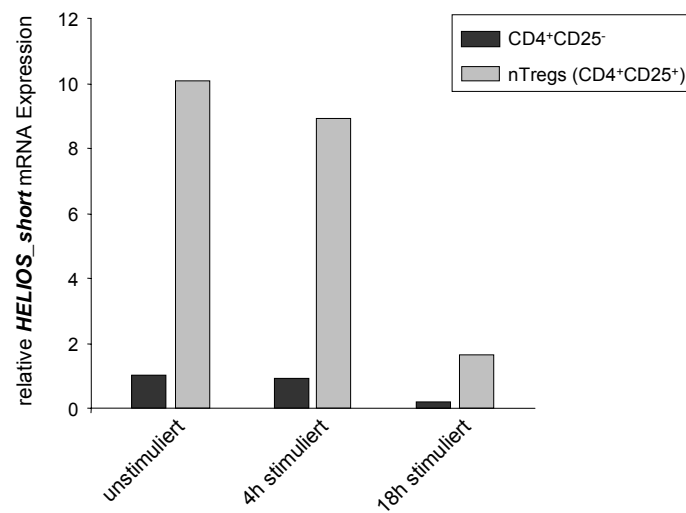


Abbildung 13: HELIOS_long und _short Expression von nTregs und konventionellen CD4⁺ T-Zellen. Mit qRT-PCR wurde die HELIOS_long (A) bzw. _short (B) Expression von nTregs mit konventionellen CD4⁺ T-Zellen verglichen. Die gewonnenen Werte für beide HELIOS Isoformen wurden auf die Expression des Haushaltgens HGPRT normalisiert.

Genau wie die Gesamt- HELIOS mRNA Expression (Abbildung 9), zeigt sich in Abbildung 13, dass die mRNA beider HELIOS Isoformen sehr stark in nTregs exprimiert wird, während in konventionellen CD4⁺ T-Zellen nur eine geringe Expression zu erkennen ist. Während nach 18stündiger TZR Stimulation die mRNA Expression der kurzen Isoform, HELIOS_short, sehr stark abnimmt, bleibt die mRNA Expression der langen Isoform, HELIOS_long, relativ konstant. Da die qRT-PCR Analyse der Gesamt-HELIOS mRNA gezeigt hat (Abbildung 9), dass durch TZR Stimulation die Expression nach 18 Stunden zurück geht, zeigen die Ergebnisse in Abbildung 13, dass der Rückgang der Gesamt-HELIOS Expression offensichtlich auf die verminderte Expression der kurzen Isoform (Helios_short) zurück zu führen ist.

EOS Isoformen

Durch Klonierung der EOS mRNA konnte in unserem Labor gezeigt werden, dass es analog zu HELIOS auch von EOS verschiedene Spleißvarianten gibt. Während HELIOS zwei Isoformen aufweist, konnten von EOS vier Isoformen charakterisiert werden (unveröffentlichte Daten).

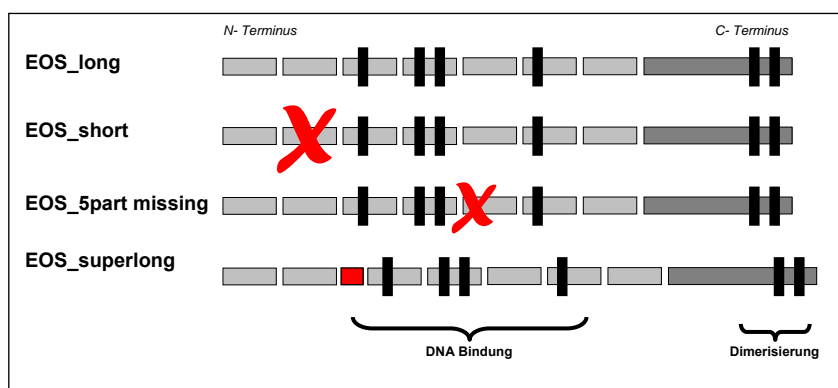


Abbildung 14: Schematische Darstellung der vier EOS Isoformen. Die vier EOS Isoformen besitzen am C-Terminus zwei Zinkfinger für die Dimerisierung mit Mitgliedern der IKAROS-Familie. Die N-terminalen Zinkfinger sind an der DNA Bindung beteiligt.

Wie sich der Abbildung 14 entnehmen lässt, gibt es zwei lange und zwei kürzere Isoformen von EOS. Allen vier Isoformen gemein, sind die vier Zinkfinger für die DNA-Bindung. Der einen kurzen Isoform, EOS_short, fehlt das zweite Exon, der zweiten kurzen Isoform, EOS_5 part missing, fehlen 47 Basenpaare in Exon fünf. Die extralange Isoform, EOS_superlong, weist zwischen Exon zwei und drei noch zusätzliche 72 Basenpaare auf.

3.2.3 Funktionelle Analysen von EOS und HELIOS *in vitro*

Da nTregs eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung eines funktionierenden Immunsystems spielen und mittlerweile bekannt ist, dass der Transkriptionsfaktor FoxP3 ausschlaggebend daran beteiligt ist, stellt sich die Frage, wie FoxP3 wiederum reguliert wird. Im Folgenden sollte geklärt werden, ob die Transkriptionsfaktoren HELIOS und EOS einen Einfluss auf die Expression von FoxP3 haben.

HELIOS bindet an den FoxP3 Promotor und kann diesen aktivieren

Wie bereits erwähnt, wurde schon 2006 von Sugimoto *et al.* gezeigt, dass FoxP3 nicht für die verstärkte Expression von HELIOS in nTregs verantwortlich ist. Und auch von unserem Kooperationspartner Dr. Detlev Menerich (Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG), konnte mit humanen T-Zellen gezeigt werden, dass FoxP3 nicht an den HELIOS Promotor bindet und daher nicht die Expression von HELIOS reguliert (Daten nicht gezeigt).

Um zu prüfen, ob im Gegenzug das HELIOS Protein den FoxP3 Promotor in nTregs reguliert, wurde als nächstes eine Chromatin Immunopräzipitation durchgeführt. Da durch die Fixierung mit Formaldehyd die bestehenden Protein/DNA Interaktionen erhalten bleiben, konnte mit spezifischen Antikörpern gegen HELIOS und anschließender konventioneller PCR die Bindung von HELIOS an den Promotor des FoxP3 Gens analysiert werden.

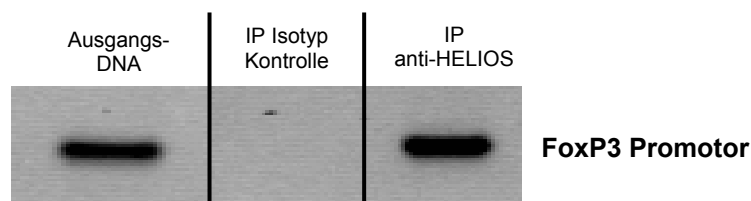


Abbildung 15: Chromatin Immunopräzipitation von nTregs. Mit Hilfe der ChIP-Methode wurde die DNA von nTregs mit Antikörpern gegen HELIOS immunopräzipitiert und anschließend auf FoxP3 mittels konventioneller PCR untersucht. Die Ausgangs-DNA dient als Positiv-Kontrolle, die zeigt, dass die verwendeten Oligonukleotide und somit die PCR funktioniert hat. Die IP Isotyp Kontrolle zeigt, dass die Bindung des HELIOS Antikörpers spezifisch ist.

Wie sich in Abbildung 15 an der dicken Bande in der dritten Spalte erkennen lässt, führt die Immunopräzipitation von HELIOS zu einer Anreicherung des FoxP3 Promotors im Vergleich zur Positivkontrolle. Als Positiv-Kontrolle wurde ein Teil der genomischen Ausgangs-DNA verwendet, d.h. bevor die DNA mit den HELIOS Antikörpern immunopräzipitiert wurde. Die IP Isotyp Kontrolle dient als Kontrolle für die Spezifität der HELIOS Antikörper.

Mithilfe der ChIP-Methode zeigte sich deutlich, dass HELIOS in nTregs an den FoxP3 Promotor bindet (Abbildung 15). Um als nächstes zu klären, ob HELIOS den FoxP3 Promotor in nTregs auch aktivieren kann, wurde ein Dual-LuciferaseTM Reporter Assay durchgeführt (siehe Material und Methoden). Nach der Transfektion, jeweils mit einem Plasmid für die kurze oder lange HELIOS Isoformen in Kombination mit dem FoxP3-Reporterkonstrukt, konnte die FoxP3 Promotor Aktivität als Lichteinheiten am Luminometer gemessen werden.

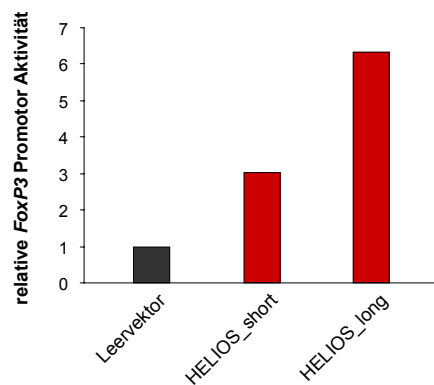


Abbildung 16: Dual-LuciferaseTM Reporter Assay zur Messung der FoxP3 Promotor Aktivität in nTregs nach HELIOS Überexpression. Voraktivierte nTregs wurden mit Plasmiden für die HELIOS Isoformen oder einer Kontrolle (Leervektor) und dem FoxP3- Reportervektor transfiziert. Die FoxP3 Promotor Aktivität wurde als relative Lichteinheiten (*RLU: relative light units*) gemessen. Die Werte für die HELIOS Isoformen sind auf den Leervektor bezogen, der 1 gesetzt wurde.

Der Abbildung 16 lässt sich entnehmen, dass der Transkriptionsfaktor HELIOS in der Lage ist den FoxP3 Promotor zu aktivieren. Im Vergleich zu der langen HELIOS Isoform, HELIOS_long, kann die kurze HELIOS Isoform, HELIOS_short, den FoxP3 Promotor viel schwächer aktivieren.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde entschieden, in den nächsten Versuchen nur noch mit der langen Isoform von HELIOS weiterzuarbeiten.

EOS aktiviert den FoxP3 Promotor nur marginal

Da für EOS keine geeigneten Antikörper zur Verfügung standen, konnte die Methode der Chromatin-Immunopräzipitation nicht angewandt werden. Um den Einfluss des Transkriptionsfaktors EOS auf den FoxP3 Promotor dennoch zu überprüfen, wurde nur ein Dual-LuciferaseTM Reporter Assay durchgeführt. Dazu wurden nTregs mit den Plasmiden für die vier verschiedenen EOS Isoformen oder einer Kontrolle und dem FoxP3-Reporterkonstrukt transfiziert. Nach der Transfektion erfolgte die Messung der FoxP3 Promotor Aktivität am Luminometer.

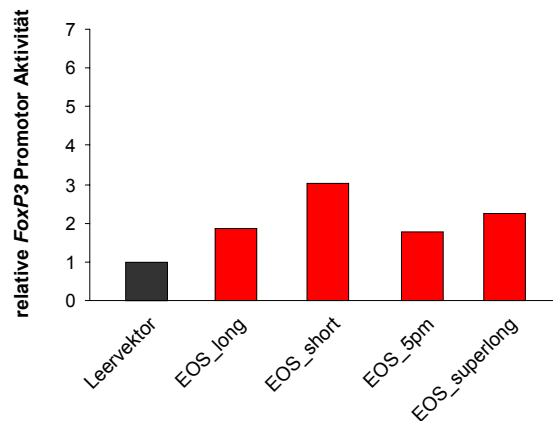


Abbildung 17: Dual-LuciferaseTM Reporter Assay zur Messung der FoxP3 Promotor Aktivität in nTregs nach EOS- Überexpression. Die FoxP3 Promotor Aktivität wurde in nTregs, die mit Plasmiden für die EOS Isoformen oder einer Kontrolle (Leervektor) und dem FoxP3- Reportervektor transfiziert waren, als relative Lichteinheiten gemessen. Die Werte für die EOS Isoformen sind auf den Leervektor bezogen, der 1 gesetzt wurde.

Nach Überexpression der vier EOS Spleißvarianten in voraktivierten nTregs zeigt sich lediglich mit dem Konstrukt für die kurze Isoform eine geringe Erhöhung der FoxP3 Promotor Aktivität (Abbildung 17).

Da die lange HELIOS Isoform von allen getesteten HELIOS und EOS Isoformen den stärksten Effekt auf den FoxP3 Promotor gezeigt hat, wurde in den folgenden Experimenten nur noch mit HELIOS_long gearbeitet.

3.2.4 Die Gegenwart von TGF- β führt zur Induktion der HELIOS Expression *in vitro*

Da in 3.2.3 gezeigt werden konnte, dass die lange Isoform des Transkriptionsfaktors HELIOS in der Lage ist, die FoxP3 Expression in nTregs zu verstärken, sollte als nächstes getestet werden, ob HELIOS in der Lage ist, die FoxP3 Expression in konventionellen CD4⁺ T-Zellen zu erhöhen.

Allerdings konnte nach ektopischer Expression der langen HELIOS Isoform in konventionellen CD4⁺ T-Zellen *in vitro* kein Effekt auf die FoxP3 Promotor Aktivität festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Dies lässt den Schluss zu, dass es weitere Moleküle und Faktoren geben könnte, die an der Induktion und Regulation der FoxP3 Expression beteiligt sind.

Für die Moleküle CD28, CTLA-4, CD80, CD86 und Interleukin 2 (IL-2) konnte zwar eine Beteiligung an der Induktion der FoxP3 Expression in Thymozyten nachgewiesen werden, es zeigte sich aber, dass sie nicht unbedingt notwendig für die Entwicklung von nTregs im Thymus sind⁹⁵. Dagegen ist schon länger bekannt, dass der *Transforming Growth Factor-beta* (TGF- β) in der Gegenwart von IL-2 *in vitro* die Expression von FoxP3 in konventionellen CD4⁺ T-Zellen induzieren kann. Diese induzierten regulatorischen T-Zellen (iTregs) weisen genau wie nTregs einen anergen und suppressiven Phänotyp auf. Kürzlich konnte von Liu *et al.* gezeigt werden, dass TGF- β auch an der Expression von FoxP3 in Thymozyten und somit an der Entwicklung von nTregs entscheidend beteiligt ist⁹⁵.

Um zunächst zu testen, ob TGF- β neben der FoxP3 Expression auch die Expression von HELIOS induzieren kann, wurden konventionelle CD4⁺ T-Zellen aus Mäusen, die keine natürlich vorkommenden FoxP3⁺-positiven T-Zellen besitzen, isoliert und in Gegenwart von TZR Stimuli, TGF- β und IL-2 kultiviert.

Die verwendeten Mäuse (OVAtgRAG2^{-/-} KO) besitzen durch das Fehlen von RAG2 (*recombination activating gene2*), welches für ein essentielles Enzym der frühen Lymphozytenentwicklung kodiert, keine reifen T- und B-Zellen. Aufgrund der fehlenden Rekombinase können die Zellen keine funktionstüchtigen T- oder B-Zell-Rezeptoren rearrangieren. Durch die Kreuzung mit T-Zell-Rezeptor-transgenen Mäusen (OVAtg) können sich allerdings wieder CD4⁺ T-Zellen entwickeln. Da die Mäuse dadurch zwar konventionelle CD4⁺ T-Zellen besitzen,

aber keine natürlich vorkommenden FoxP3⁺-positiven T-Zellen, kann man durch TGF- β und IL-2 die *de novo* Bildung von FoxP3 induzieren.

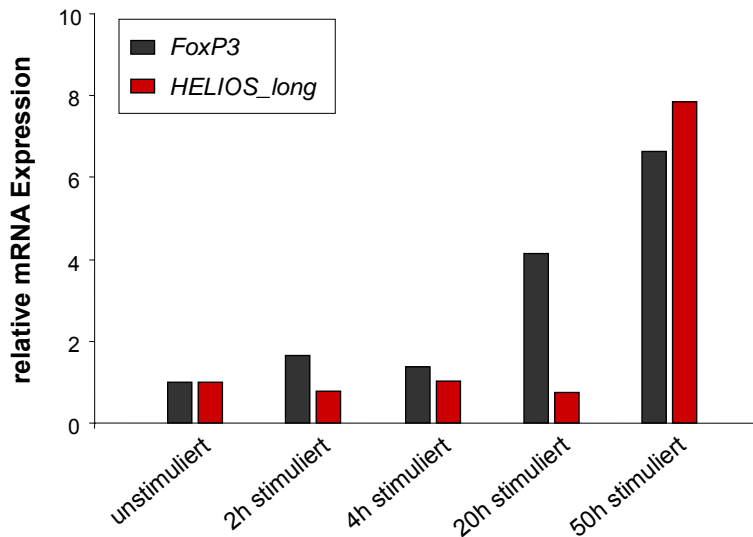


Abbildung 18: FoxP3 und HELIOS Expression von TGF- β und IL-2 behandelten konventionellen CD4⁺ T-Zellen aus OVA tgRAG2^{-/-} KO Mäusen. Sowohl die FoxP3 mRNA Expression als auch die HELIOS_long mRNA Expression von TGF- β und IL-2 behandelten konventionellen CD4⁺ T-Zellen aus OVA tgRAG2^{-/-} KO Mäusen wurde mittels qRT-PCR untersucht. Die gewonnenen Expressionsdaten wurden auf das Haushaltsgen HGPRT normalisiert.

Wie sich der Abbildung 18 entnehmen lässt, wird durch TGF- β und IL-2 nicht nur die FoxP3 mRNA Expression induziert, sondern auch die mRNA Expression der langen HELIOS Isoform. Während die Induktion der FoxP3 Expression schon nach 20stündiger TZR Stimulation zu messen ist, erhöht sich die HELIOS Expression erst nach 50 Stunden.

In Gegenwart von TGF- β führt die ektopische Expression von HELIOS in CD4⁺ T-Zellen zu einer Aktivierung des FoxP3 Promotors

Um nun die Frage zu klären, ob in Gegenwart von TGF- β der Transkriptionsfaktor HELIOS die Expression von FoxP3 in konventionellen CD4⁺ T-Zellen erhöhen kann, wurden die Zellen aus den auf Seite 51 beschriebenen OVA_{tg}RAG2^{-/-} KO Mäusen, die FoxP3⁻-negativ sind, in Gegenwart von TGF- β , IL-2 und TZR Stimuli für 20 Stunden kultiviert. Die 20stündige Stimulation wurde gewählt, da sich im letzten Versuch gezeigt hat, dass sich zu diesem Zeitpunkt noch keine HELIOS mRNA Expression detektieren ließ (Abbildung 18).

Um den Einfluss der ektopischen HELIOS Expression auf den FoxP3 Promotor zu überprüfen, wurde ein Dual-LuciferaseTM Reporter Assay durchgeführt.

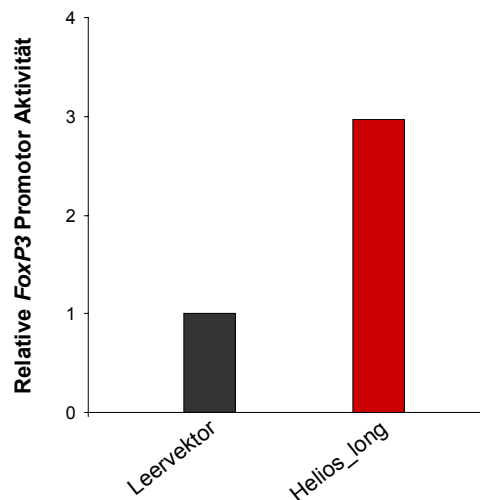


Abbildung 19: Dual-LuciferaseTM Reporter Assay zur Messung der FoxP3 Promotor Aktivität in konventionellen CD4⁺ T-Zellen nach ektopischer HELIOS Expression. Konventionelle CD4⁺ T-Zellen aus OVA_{tg}RAG2^{-/-} KO Mäusen wurden in Gegenwart von TGF- β , IL-2 und TZR Stimuli voraktiviert. Nach 20 Stunden wurden die Zellen mit dem Plasmid für die lange HELIOS Isoform (HELIOS_long) oder einer Kontrolle (Leervektor) und dem FoxP3- Reportervektor transfiziert. Der gemessene Wert für HELIOS ist auf den Leervektor bezogen, der 1 gesetzt wurde.

Wie sich der Abbildung 19 entnehmen lässt, bewirkt die Gegenwart des Cytokins TGF- β , dass die Induktion der HELIOS Expression zu einer verstärkten FoxP3 Promotor Aktivität in konventionellen CD4⁺ T-Zellen führt.

Die ektopische Expression von HELIOS in CD4⁺ T-Zellen führt in Gegenwart von TGF- β zu einer verstärkten FoxP3 Proteinbildung

Wie sich der Abbildung 19 entnehmen lässt, zeigt HELIOS einen fördernden Effekt auf die FoxP3 Promotor Aktivität. Daher sollte als nächstes geprüft werden, ob HELIOS auch auf Proteinebene einen Einfluss auf die FoxP3 Expression hat. Dazu wurden die Zellen wie im vorherigen Versuch beschrieben behandelt und mit spezifischen Antikörpern gegen FoxP3 nukleär gefärbt. Der FoxP3 Proteingehalt wurde mittels FACS Analyse nachgewiesen (siehe Material und Methoden).

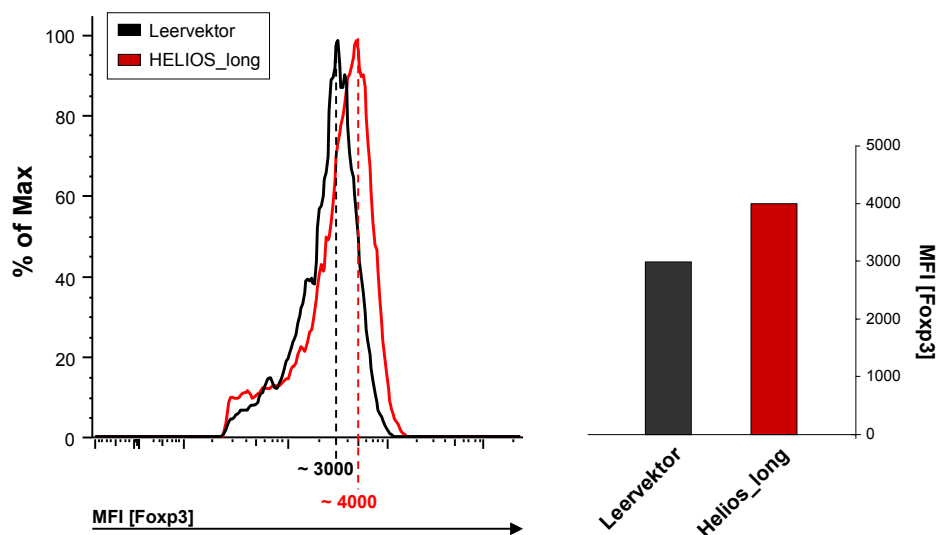


Abbildung 20: Intrazelluläre FoxP3 Färbung von konventionellen CD4⁺ T-Zellen nach HELIOS Überexpression. Konventionelle CD4⁺ T-Zellen aus OVA_{tg}RAG2^{-/-} KO Mäusen wurden für einen Tag in Gegenwart von TGF- β , IL-2 und TZR Stimuli aktiviert. An Tag 1 wurden die Zellen mit dem Plasmid für die lange HELIOS Isoform (HELIOS_long) oder einer Kontrolle (Leervektor) transfiziert. Nach drei Tagen Restimulation wurden die Zellen lysiert und der nukleäre FoxP3 Proteingehalt mittels FACS Analyse gemessen. (MFI = mittlere Fluoreszenzintensität)

Die intrazelluläre FoxP3 Färbung zeigt, dass die Überexpression von HELIOS in TGF- β und IL-2 behandelten konventionellen CD4⁺ T-Zellen aus OVA_{tg}RAG2^{-/-} KO Mäusen auch auf Proteinebene einen Einfluss auf die FoxP3 Expression hat (Abbildung 20). Die Zellen, die HELIOS ektopisch exprimieren, zeigen im Vergleich zur Kontrolle eine Verstärkung der FoxP3 Bildung um etwa 30%.

3.2.5 Induktion regulatorischer T-Zellen durch HELIOS *in vivo*

In 3.2.4 konnte gezeigt werden, dass HELIOS *in vitro* die TGF- β -vermittelte Expression von FoxP3 in konventionellen CD4⁺ T-Zellen verstärken kann. Da TGF- β in der lebenden Maus ubiquitär vorhanden ist, kann angenommen werden, dass die ektopische Expression von HELIOS in konventionellen CD4⁺ T-Zellen auch *in vivo* zu einer erhöhten FoxP3 Expression führt. Hierzu wurde als *in vivo* Modell ein adoptiver Transfer (AT) der HELIOS- bzw. Leervektor-transfizierten Zellen etabliert.

Um eine maximale Transfektionseffizienz zu erreichen, wurden FoxP3⁻negative konventionelle CD4⁺ T-Zellen aus den OVA_{tg}RAG2^{-/-} KO Mäusen (siehe Seite 51) mit TZR Stimuli für drei Tage stimuliert. An Tag 4 wurden die T-Zellen mit dem Plasmid für die lange HELIOS Isoform oder der Kontrolle transfiziert und in T-Zell-defiziente Mäuse (RAG2^{-/-} KO) intravenös in die Schwanzvene injiziert. Durch das Fehlen der Rekombinase RAG2 (*recombination activating gene*) besitzen die Mäuse keinerlei natürliche T- und B-Zellen, so dass nur die adoptiv transferierten T-Zellen detektiert werden. Vierzehn Tage nach adoptivem Transfer der transfizierten Zellen, wurde der FoxP3 Proteingehalt der Milzzellen im FACS analysiert. Weiterhin wurde ein Proliferations- bzw. Suppressionsassay durchgeführt, da verschiedene FoxP3-Transfektionsstudien gezeigt haben, dass die ektopische Expression von FoxP3 in konventionellen CD4⁺ T-Zellen diesen Zellen suppressive Eigenschaften verleiht.

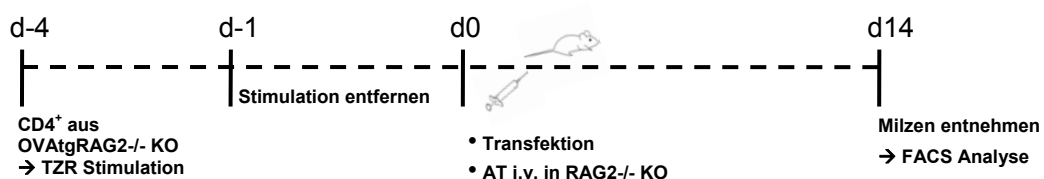


Abbildung 21: Schematischer Aufbau des *in vivo* Versuchs. Konventionelle CD4⁺ T-Zellen aus OVA_{tg}RAG2^{-/-} KO Mäusen wurden 3 Tage mit TZR Stimuli stimuliert. An Tag 4 wurden die Zellen mit der Kontrolle oder dem Plasmid für die lange HELIOS Isoform transfiziert und intravenös in RAG2^{-/-} KO Mäuse gespritzt. 14 Tage nach adoptivem Transfer wurden die Milzen der Mäuse entnommen und für FACS Analysen oder einen *ex vivo* Proliferations-/Suppressionsassay verwendet.

In vivo führt die ektopische Expression von HELIOS zur Induktion von FoxP3⁺-positiven T-Zellen in T-Zell-defizienten Mäusen

Vierzehn Tage nach adoptivem Transfer der transfizierten Zellen wurden die Milzen der Mäuse präpariert. Die Milzzellen wurden auf die Expression der Oberflächenmarker CD4 und CD25 sowie auf den Proteingehalt von FoxP3 im FACS analysiert.

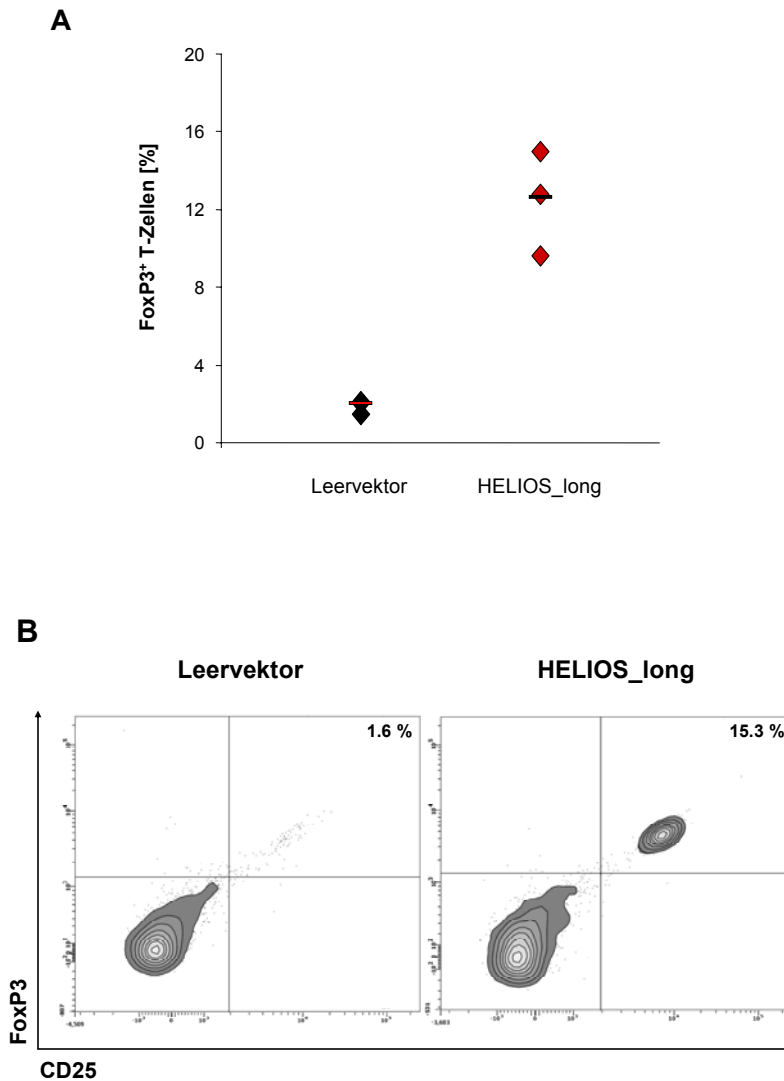


Abbildung 22: FoxP3⁺-positive T-Zellen aus den Milzen der behandelten RAG2^{-/-} KO Mäuse nach adoptivem Transfer. Den Mäusen wurden an Tag 14 die Milzen entnommen und die Zellen wurden auf CD4, CD25 und FoxP3 gefärbt und im FACS analysiert. In Abbildung A sind die FoxP3⁺-positiven T-Zellen aller sechs Mäuse (drei pro Gruppe) des Versuchs abgebildet. Abbildung B zeigt eine beispielhafte *Dot Plot* Darstellung je einer Milz pro Gruppe.

Der Abbildung 22 lässt sich entnehmen, dass die RAG2^{-/-} KO Mäuse, die mit den HELIOS transfizierten konventionellen CD4⁺ T-Zellen injiziert wurden, eine deutlich höhere FoxP3⁺-positive T-Zellpopulation aufweisen als die Mäuse der Kontrollgruppe. Weiter zeigt sich, dass die T-Zell-Population, die sich überwiegend in den „HELIOS-Mäusen“ bildet, neben FoxP3 auch das nTreg-assoziierte Molekül CD25 konstitutiv exprimieren. Dass die Mäuse der Kontrollgruppe auch eine kleine CD25⁺FoxP3⁺ Zellpopulation aufweisen, könnte durch das ubiquitäre TGF-β in der Maus verursacht werden.

Die durch HELIOS induzierten CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T-Zellen weisen ex vivo suppressive Eigenschaften auf

Um die Funktionalität der durch HELIOS induzierten CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T-Zellen zu untersuchen, wurde *ex vivo* ein Proliferations- bzw. Suppressionsassay durchgeführt. Dazu wurden aus den Milzen der RAG2^{-/-} KO Mäuse, die mit HELIOS_long bzw. dem Leervektor konstituiert waren, CD25⁺-positive T-Zellen und aus unbehandelten Wildtyp BALB/cJ Mäusen sowohl CD25⁺-positive (nTregs) als auch CD25⁻-negative (konventionelle CD4⁺) T-Zellen angereinigt.

Um das suppressive Potenzial quantifizieren zu können, wurden die CD25⁺-positiven T-Zellen aus den RAG2^{-/-} KO bzw. aus den Wildtyp BALB/cJ Mäusen in abnehmender Zellzahl zu einer konstant bleibenden Anzahl an konventionellen CD4⁺ T-Zellen aus Wildtyp BALB/cJ Mäusen gegeben. Die Stimulation erfolgte mit löslichen anti-CD3 Antikörpern und Mitomycin C- behandelten A20 Zellen als akzessorische Zellen. Am dritten Tag wurde radioaktives ³H-Thymidin zu der Kokultur gegeben, womit die Proliferation durch den Einbau in die DNA der sich teilenden Zellen bestimmt werden konnte (siehe Material und Methoden).

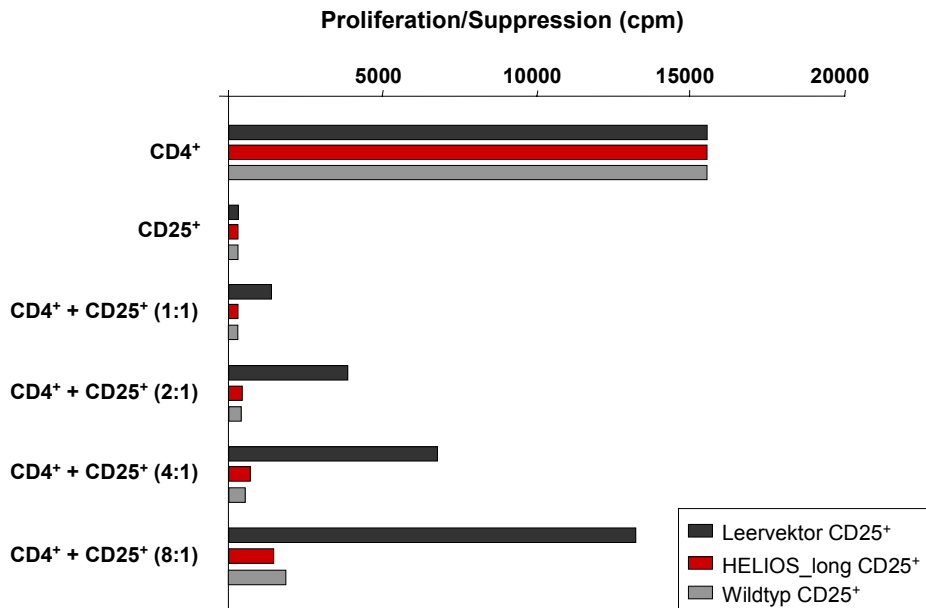


Abbildung 23: Proliferations- bzw. Suppressionsassay der Zellen *ex vivo* nach Adoptiven Transfer. CD4⁺ T-Zellen aus Wildtyp BALB/cJ Mäusen wurden entweder alleine oder in Kokultur mit CD25⁺ T-Zellen aus den behandelten RAG2^{-/-} KO bzw. aus Wildtyp BALB/cJ Mäusen in den angegebenen Verhältnissen stimuliert. Als Stimuli dienten lösliche anti-CD3 Antikörper und Mitomycin C- behandelte A20-Zellen. Nach 3 Tagen wurde ³H-Thymidin zugegeben und nach weiteren 20 Stunden konnte die Proliferation durch den Einbau des radioaktiven Thymidins mithilfe eines β -Szintillationszählers bestimmt werden.

Der Abbildung 23 lässt sich deutlich entnehmen, dass die CD25⁺-positiven T-Zellen aus den RAG2^{-/-} KO Mäusen, die mit HELIOS transfizierte CD4⁺ T-Zellen erhalten haben, die Proliferation der konventionellen CD4⁺ T-Zellen genauso gut supprimieren können, wie die CD25⁺-positiven T-Zellen (nTregs) aus den Wildtyp BALB/cJ Mäusen. Im Vergleich dazu sind die isolierten CD25⁺-positiven T-Zellen der RAG2^{-/-} KO Mäuse, die mit der Kontrolle transfizierte CD4⁺ T-Zellen erhalten haben, schlechter in der Lage, die Proliferation der CD4⁺ T-Zellen zu hemmen. Die Zellen der Kontrollgruppe zeigen ein leichtes Suppressionspotential, da die angereinigten CD25⁺-positiven T-Zellen auch einige FoxP3⁺-positive T-Zellen enthalten, wie sich bereits in der vorherigen FACS Analyse zeigte (Abbildung 22).

Dieses Ergebnis und das aus dem vorherigen Versuch zeigen, dass HELIOS fähig ist, $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ nTregs zu induzieren, die *ex vivo* suppressive Eigenschaften aufweisen.

In vivo besitzen die durch HELIOS induzierten $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T-Zellen Suppressor-Funktionen

Um zu überprüfen, ob die durch HELIOS induzierten $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T-Zellen auch *in vivo* funktionell wirksam sind, d.h. suppressive Eigenschaften besitzen, wurde nachfolgendes Experiment durchgeführt.

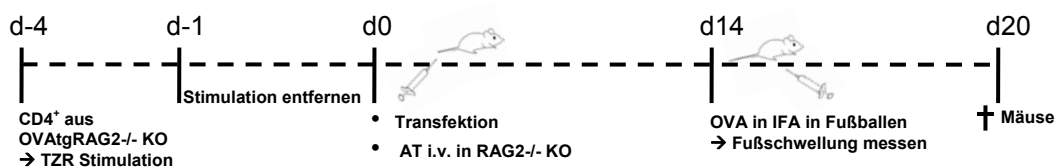


Abbildung 24: Schematischer Aufbau des *in vivo* Versuchs. Konventionelle $CD4^+$ T-Zellen aus OVAtgRAG2^{-/-} KO Mäusen wurden 3 Tage polykonal stimuliert. Am Tag 4 wurden die Zellen mit dem Plasmid für die lange HELIOS Isoform oder der Kontrolle transfiziert und intravenös in RAG2^{-/-} KO Mäuse injiziert. 14 Tage nach adoptiven Transfer (AT) wurde das Antigen OVA in den rechten Fußballen der Mäuse injiziert. Bis Tag 20 nach AT wurde jeden Tag die Fußschwellung gemessen.

Genau wie im vorherigen Versuch, wurden $FoxP3^-$ negative konventionelle $CD4^+$ T-Zellen aus den OVAtgRAG2^{-/-} KO Mäusen (siehe Seite 51) isoliert und für drei Tage mit einer Kombination aus anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern stimuliert. Am vierten Tag wurden die Zellen mit dem Leervektor oder dem Plasmid für die lange HELIOS Isoform transfiziert und intravenös in die Schwanzvene von T-Zelldefizienten Mäusen (RAG2^{-/-} KO) injiziert. Vierzehn Tage nach Adoptivem Transfer wurde in den Mäusen eine DTH (*delayed type hypersensitivity*), also eine verzögerte Immunantwort des Typ 4, ausgelöst. Dazu wurde den Mäusen in den rechten Fußballen als Antigen das OVA-Peptid aus dem Hühnereiweiß Ovalbumin (OVA) in IFA (*incomplete Freund's adjuvant* = Wasser-in-Öl Emulsion) injiziert, in den linken Fußballen wurde IFA alleine gespritzt. Die Fußschwellung sowohl des rechten als auch des linken Fußes wurde an jedem Tag mit Hilfe einer Testarm-Messuhr bestimmt. Die Differenz der Füße, die

einerseits nur mit dem Adjuvanz und andererseits mit dem Antigen gespritzt wurden, ist in der Abbildung 25 graphisch dargestellt.

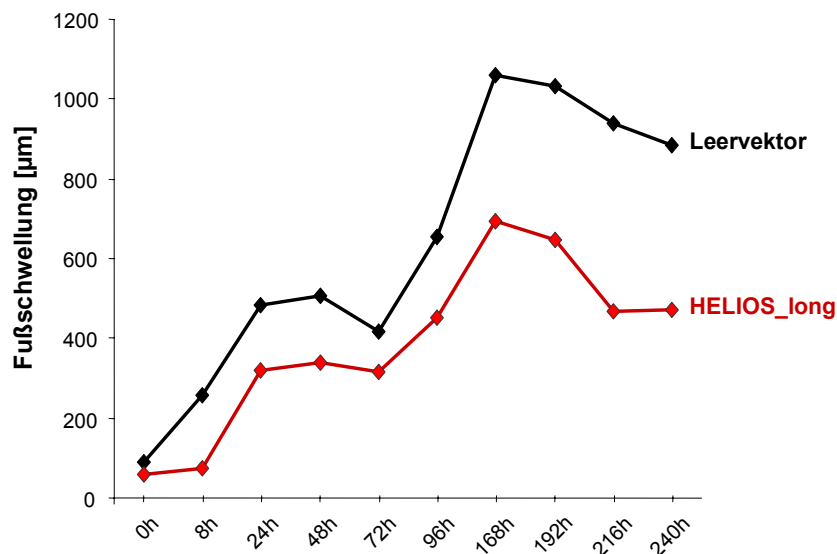


Abbildung 25: Graphische Darstellung der DTH. Nach der Injektion des Antigens an Tag 14 wurde jeden Tag bis Tag 20 die Fußschwellung der behandelten Mäuse gemessen.

Die tägliche Messung der Fußschwellung zeigt, dass in den „HELIOS Mäusen“, im Vergleich zur Kontrollgruppe, eine wesentlich schwächere DTH auftritt (Abbildung 25). Somit zeigt dieser Versuch, dass die Expression von HELIOS nicht nur zu einer Erhöhung der FoxP3 Expression führt, sondern auch den Zellen eine suppressive Funktion *in vivo* verleiht.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass nTregs, im Gegensatz zu konventionellen $CD4^+$ T-Zellen, eine sehr starke Expression der Transkriptionsfaktoren HELIOS und EOS aufweisen, von denen aufgrund alternativen Spleißens mehrere Isoformen vorliegen. Weiterhin wurde gezeigt, dass HELIOS an den FoxP3 Promotor binden kann. Während die ektopische Expression der langen HELIOS Isoform in nTregs den FoxP3 Promotor sehr stark aktivieren kann, zeigten sowohl die kurze HELIOS Isoform, als auch alle EOS Isoformen, lediglich marginale Effekte auf den FoxP3 Promotor.

In vitro bewirkte die ektopische Expression der langen HELIOS Isoform in konventionellen CD4⁺ T-Zellen nur in Gegenwart des Cytokins TGF- β sowohl eine gesteigerte FoxP3 Promotor Aktivität als auch eine verstärkte FoxP3 Proteinbildung. Die *in vitro* gewonnenen Daten konnten in *in vivo* Studien bestätigt werden. Der adoptive Transfer von HELIOS transfizierten konventionellen CD4⁺ T-Zellen in T-Zell-defiziente Mäuse (RAG2^{-/-} KO) führte zu einer verstärkten Bildung an FoxP3⁺-positiven T-Zellen. Außerdem zeigte sich, dass diese Zellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* suppressive Funktionen besitzen.

Die Daten deuten darauf hin, dass der Transkriptionsfaktor HELIOS entscheidend an der Entwicklung und Funktion von FoxP3⁺-positiven T-Zellen beteiligt zu sein scheint.

3.3 Die Rolle der microRNA155

BIC (*B-cell integration cluster*) ist ein nicht-Protein-kodierendes Transkript, das zur microRNA155 (miR155) prozessiert werden kann. Über verschiedene weitere Vorläufer entsteht die reife miR155 (siehe Einleitung Seite 14), die eine wichtige Rolle im Immunsystem einnimmt, wie sich durch miR155-defiziente (miR155-/-KO) Mäuse gezeigt hat^{87;88}. Die miR155-defizienten Mäuse weisen einen autoimmunen Phänotyp in der Lunge auf, mit strukturellen Veränderungen der Atemwege („*airway remodeling*“) und verstärkter Leukozyteninfiltration. Weiterhin zeigen sie schwere Defekte in verschiedenen Funktionen des adaptiven Immunsystems. So sind B-Zellen nicht mehr in der Lage Antigene effizient zu präsentieren und T-Zellen zu aktivieren. *In vitro* aktivierte T-Zellen der miR155-defizienten Mäuse differenzieren vorzugsweise zu Th2-Zellen, so dass durch die Bildung des Cytokins IL-4 allergische Reaktionen verstärkt auftreten können.

Um zu überprüfen, ob die miR155 an der nTreg-vermittelten Suppression beteiligt ist, sollte zunächst mittels qRT-PCR die Expression von nTregs und konventionellen CD4⁺ T-Zellen verglichen werden. Anschließend wurde mit Hilfe eines miR155 spezifischen Vorläufers, der zu einer ektoptischen Überexpression führt, die Funktion dieser microRNA näher untersucht.

3.3.1 TZR Stimulation führt zur Induktion der BIC und der miR155 Expression

Um die Expressionsrate von BIC in nTregs im Vergleich zu konventionellen CD4⁺ T-Zellen zu überprüfen, wurden die Zellen nach Anreinigung entweder sofort (unstimuliert) oder 20 Stunden nach polyklonaler TZR Stimulation mittels qRT-PCR analysiert.

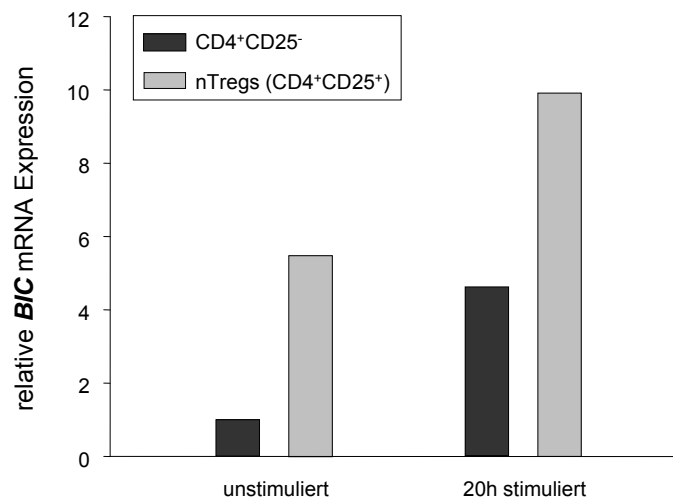


Abbildung 26: BIC Expression von nTregs und konventionellen CD4⁺ T-Zellen. Mit qRT-PCR wurde die BIC Expression von nTregs mit konventionellen CD4⁺ T-Zellen verglichen. Als Haushaltsgen diente HGPRT.

Es zeigt sich, dass frische unstimulierte nTregs eine deutlich höhere BIC Expression aufweisen als konventionelle CD4⁺ T-Zellen (Abbildung 26). Nach TZR Stimulation jedoch steigt in beiden T-Zellpopulationen die Expression an, wobei die Induktion in konventionellen CD4⁺ T-Zellen stärker ist als in nTregs.

Die Entstehung der miR155 aus dem BIC Transkript erfolgt, wie bereits erwähnt, über viele Zwischenschritte. Nur wenn die beteiligten Enzyme intakt vorliegen, kann die Prozessierung zur reifen miR155 ablaufen.

Zum Nachweis der maturierten miR155 in nTregs im Vergleich zu konventionellen CD4⁺ T-Zellen, wurde mit einer miR155 spezifischen TaqMan-Sonde eine qRT-PCR durchgeführt.

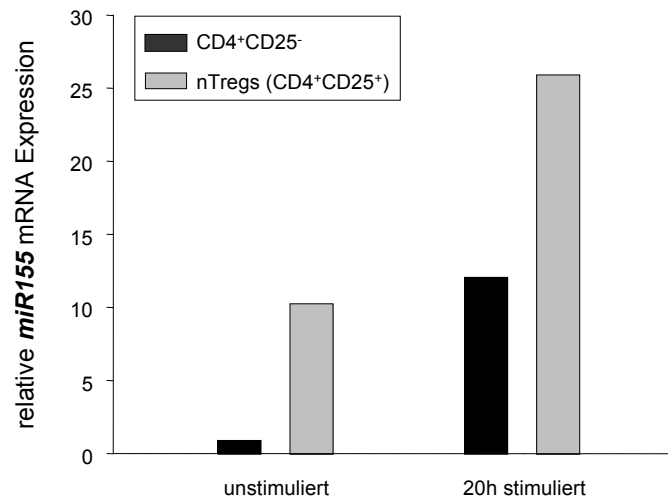


Abbildung 27: miR155 Expression von nTregs und konventionellen CD4⁺ T-Zellen. Mittels TaqMan-PCR wurde die miR155 Expression von nTregs mit konventionellen CD4⁺ T-Zellen verglichen. Die relative Expression wurde auf das Haushaltsgen 5S (ribosomale 5S RNA) normalisiert.

In Abbildung 27 zeigt sich, analog zur BIC Expression, dass frische nTregs eine deutlich höhere Expression vorweisen als konventionelle CD4⁺ T-Zellen. Die Expressionsrate steigt nach 20stündiger TZR Stimulation wieder in beiden T-Zellpopulationen an.

Zwar ist in nTregs sowohl die absolute BIC Expression als auch die Maturierung zur miR155 wesentlich höher als in konventionellen CD4⁺ T-Zellen. Allerdings bewirkt die TZR Stimulation eine deutlich stärkere Induktion sowohl von BIC als auch der miR155 in den konventionellen CD4⁺ T-Zellen verglichen mit den nTregs.

3.3.2 FoxP3 ist nicht essentiell an der Regulation von BIC und der miR155 Expression beteiligt

Kürzlich wurde postuliert, dass die Regulation der miR155 ein FoxP3-abhängiger Prozess sei und dass die kontinuierliche FoxP3 Expression für den hohen miR155-Gehalt in nTregs verantwortlich sei^{96,97}. In 3.3.1 hat sich jedoch gezeigt, dass auch konventionelle CD4⁺ T-Zellen, die kein FoxP3 exprimieren, eine erhöhte BIC und miR155 Expression nach TZR Stimulation aufweisen.

Um die Möglichkeit auszuschließen, dass der Anstieg der Expression von einer nTreg (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) Verunreinigung in der CD4⁺ T-Zellpopulation verursacht wird, wurde die BIC (Daten nicht gezeigt) und die miR155 Expression von konventionellen CD4⁺ T-Zellen aus Wildtyp Mäusen mit der Expression von konventionellen CD4⁺ T-Zellen aus *scurfy* Mäusen verglichen. *Scurfy* Mäuse sind FoxP3 Defektmutanten, die aufgrund einer Punktmutation im FoxP3 Gen kein funktionelles FoxP3 besitzen.

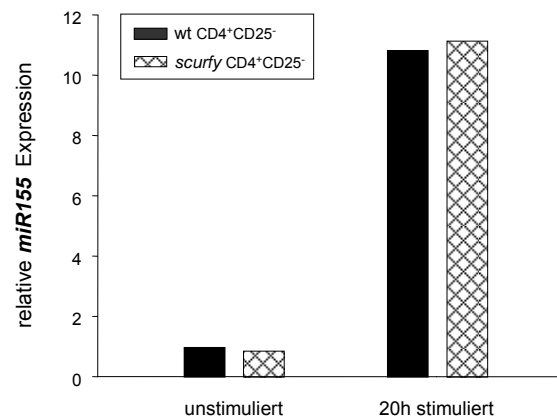


Abbildung 28: miR155 Expression von konventionellen CD4⁺ T-Zellen. Durch TaqMan-PCR wurde die miR155 Expression von konventionellen CD4⁺ T-Zellen aus Wildtyp und *scurfy* Mäusen analysiert. Zur Normalisierung diente das Haushaltsgen 5S.

Die konventionellen CD4⁺ T-Zellen aus *scurfy* Mäusen zeigen weder eine beeinträchtigte BIC (Daten nicht gezeigt) noch miR155 Expression (Abbildung 28). Da eine FoxP3 Abhängigkeit bei der Induktion der miR155 somit ausgeschlossen werden kann, sollte im Folgenden die Rolle der miR155 in konventionellen CD4⁺ T-Zellen und deren potentieller Einfluss auf die nTreg-vermittelte Suppression näher analysiert werden.

3.3.3 Die ektopische Expression der miR155 in konventionellen CD4⁺ T-Zellen führt zu einer Resistenz gegenüber der nTreg-vermittelten Suppression

Um die Funktion der miR155 bei der nTreg-vermittelten Suppression besser zu verstehen, wurde mit konventionellen CD4⁺ T-Zellen, die entweder mit einer Kontrolle oder mit einem spezifischen miR155 Vorläufer (*pre-miR155*) transfiziert waren, ein Proliferations- bzw. Suppressionsassay durchgeführt (siehe Material und Methoden Seite 26).

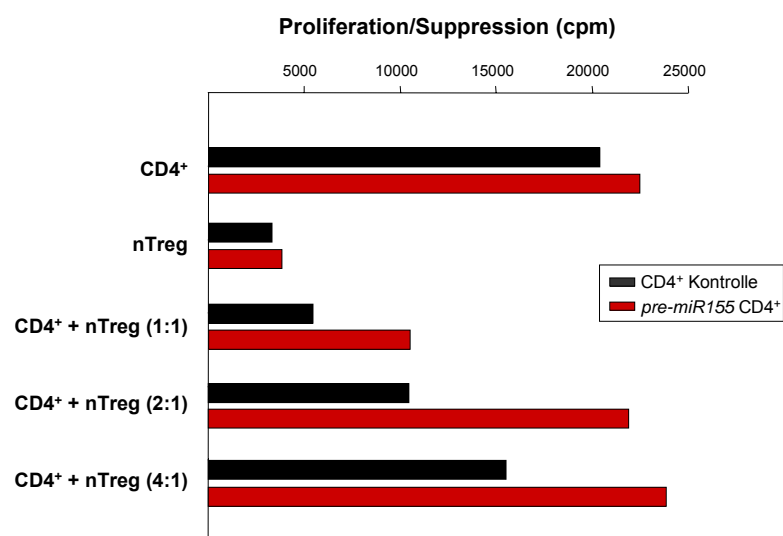


Abbildung 29: Proliferation- bzw. Suppressionsassay nach Überexpression der miR155 in CD4⁺ T-Zellen. Konventionelle CD4⁺ T-Zellen wurden entweder mit einer Kontrolle oder dem Vorläufer für die miR155 (*pre-miR155*) transfiziert und alleine oder in Kokultur mit nTregs in den angegebenen Verhältnissen stimuliert. Als Stimuli dienten lösliche anti-CD3 Antikörper und Mitomycin C-behandelte A20-Zellen. Nach 3 Tagen wurde ³H-Thymidin zugegeben und nach weiteren 20 Stunden konnte die Proliferation durch den Einbau des radioaktiven Thymidins mithilfe eines β -Szintillationszählers bestimmt werden.

Wie in Abbildung 29 zu sehen ist, weisen nTregs alleine *in vitro* nur eine geringe Proliferation auf, während der erhöhte ³H-Thymidin Einbau in den konventionellen CD4⁺ T-Zellen wesentlich höher ist. In Kokultur mit nTregs lässt sich die Proliferation der CD4⁺ T-Zellen effizient inhibieren. Dagegen zeigt sich, dass die ektopische Expression der miR155 in konventionellen CD4⁺ T-Zellen zu einer deutlich schlechteren Hemmbarkeit durch nTregs führt.

3.3.4 Nach ektopischer Expression der miR155 besitzen konventionelle CD4⁺ T-Zellen einen aktivierten Phänotyp

Ein zentraler Prozess bei der Suppression konventioneller CD4⁺ T-Zellen durch nTregs ist die Hemmung der IL-2 Produktion. In 3.3.3 konnte gezeigt werden, dass die ektopische Expression der miR155 in konventionellen CD4⁺ T-Zellen zu einer schlechteren Inhibition der Proliferation dieser Zellen führte. Dies könnte darauf beruhen, dass die Überexpression der miR155 die Produktion von IL-2 erhöht. Die IL-2 Expression nach ektopischer Expression der miR155 in konventionellen CD4⁺ T-Zellen wurde mittels qRT-PCR überprüft.

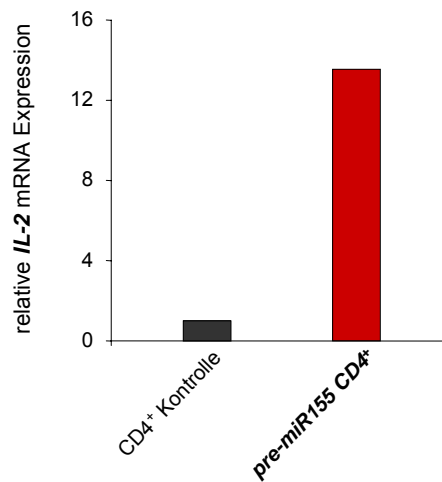


Abbildung 30: IL-2 Expression nach Überexpression der miR155 in CD4⁺ T-Zellen. Mit qRT-PCR wurde die IL-2 Expression von konventionellen CD4⁺ T-Zellen verglichen, die entweder mit einer Kontrolle oder dem Vorläufer für die miR155 (*pre-miR155*) transfiziert wurden. Normalisiert wurde auf die Expression des Haushaltsgens HGPRT.

Wie in Abbildung 30 zu erkennen ist, führt die ektopische Expression der miR155 in den konventionellen CD4⁺ T-Zellen tatsächlich zu einer erhöhten IL-2 mRNA Expression. Dies deutet darauf hin, dass die erhöhte Expression der miR155 nach TZR Stimulation entscheidend an der Induktion der IL-2 Expression beteiligt ist. Weiterhin suggerieren diese Ergebnisse, dass die miR155 an der Degradation eines transkriptionellen Repressors beteiligt ist, welcher wiederum die IL-2 Expression reguliert.

3.3.5 Die ektopische Expression der miR155 in CD4⁺ T-Zellen führt zu einer verminderten BACH1 Expression

Um mögliche Ziel-mRNAs (*Targets*) der miR155 zu finden, welche an der Repression der IL-2 Expression beteiligt sein könnten, wurden von Dr. Detlev Menerich (Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG) Computer-basierte *in silico* Analysen durchgeführt. Wie bereits in der Literatur beschrieben, konnte der Transkriptionsfaktor BACH1 (Btb and CNC homolog1) als *Target* der miR155 charakterisiert werden^{98;99}. Interessanterweise fungiert BACH1, der mit „MARE“ (*Maf recognition element*) interagieren kann, durch die Bindung mit dem Transkriptionsfaktor MafK (Mitglied der kleinen Maf Proteine) als transkriptioneller Repressor, unter anderem für das IL-2 Gen. Wird nun die BACH1 Expression gehemmt, indem die miR155 ektopisch überexprimiert wird, könnten stattdessen transkriptionelle Aktivatoren an „MARE“ binden und zu einer Verstärkung der Genexpression (z.B. von IL-2) führen.

Um das Zusammenspiel zwischen miR155 und BACH1 zu überprüfen, wurden konventionelle CD4⁺ T-Zellen erneut mit einer Kontrolle oder dem miR155 Vorläufer transfiziert und die nachfolgende BACH1 Expression mittels qRT-PCR und Western-Blot Analysen überprüft.

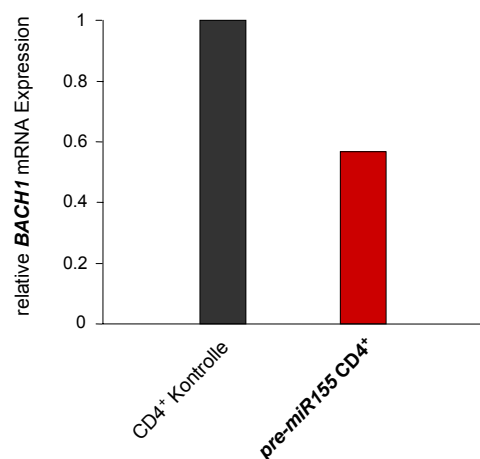


Abbildung 31: BACH1 Expression nach Überexpression der miR155 in CD4⁺ T-Zellen. Die BACH1 Expression von konventionellen CD4⁺ T-Zellen, die entweder mit einer Kontrolle oder dem Vorläufer für die miR155 (*pre-miR155*) transfiziert wurden, wurden über qRT-PCR miteinander verglichen und auf die Expression des Haushaltsgens HGPRT normalisiert.

Die Überexpression der miR155 in konventionellen CD4⁺ T-Zellen führt, wie sich in Abbildung 31 erkennen lässt, zu einer Verminderung der BACH1 mRNA Expression.

Da sich gezeigt hat, dass die Erhöhung der miR155 die Expression der BACH1 mRNA um etwa die Hälfte reduzieren kann, sollte im nächsten Versuch die entsprechende Protein Expression mittels Western-Blot Analyse überprüft werden.

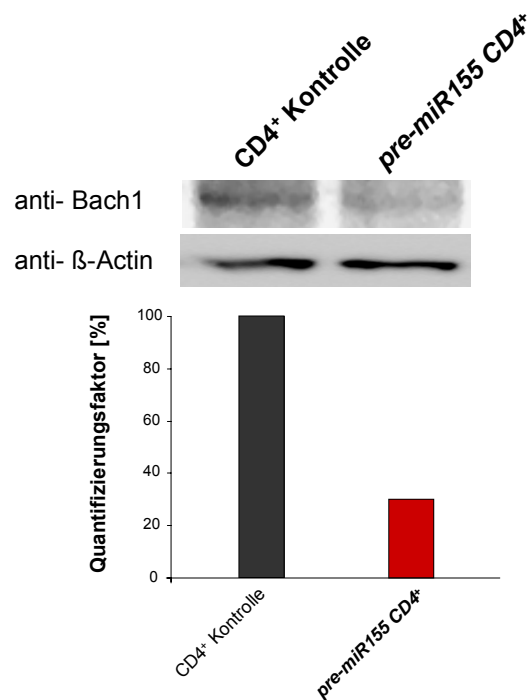


Abbildung 32: BACH1 Protein-Expression nach Überexpression der miR155 in CD4⁺ T-Zellen. Konventionelle CD4⁺ T-Zellen wurden nach Transfektion mit einer Kontrolle oder dem Vorläufer für die miR155 (*pre-miR155*) mit RIPA Puffer lysiert und die Gesamzell- Lysate mittels Western-Blot Verfahren analysiert. Es wurden BACH1 spezifische Antikörper und zur Normalisierung Antikörper gegen β-Actin verwendet. Der angegebene Faktor gibt die Quantifizierung der Banden an, wobei die Kontrolle als 100% gesetzt und der *pre-miR155* Wert darauf bezogen wurde.

Wie in Abbildung 32 dargestellt, führt die ektopische Erhöhung des intrazellulären miR155 Gehaltes in konventionellen CD4⁺ T-Zellen, genau wie bereits auf PCR-Ebene festgestellt, auch auf Proteinebene zu einer verminderten BACH1 Expression.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die microRNA155 sowohl in nTregs als auch in konventionellen CD4⁺ T-Zellen detektierbar ist. Nach TZR Stimulation steigt die Expression zwar in beiden Zellpopulationen an, allerdings ist die Induktion in konventionellen CD4⁺ T-Zellen wesentlich stärker als in nTregs. Anhand der durch *scurfy* Mäuse gewonnenen Daten zeigte sich, dass die Funktion der miR155 nicht unbedingt ein FoxP3 regulierter Prozess zu sein scheint. Die ektoxische Expression der miR155 in konventionellen CD4⁺ T-Zellen führt dazu, dass die Zellen ihre IL-2 Produktion erhöhen und durch diesen aktivierten Phänotyp resistenter gegenüber der nTreg- vermittelten Suppression werden. Der Transkriptionsfaktor BACH1, der an der Regulation des IL-2 Gens als transkriptioneller Repressor beteiligt ist, wird durch die ektoxische Expression der miR155 gehemmt.

Die Daten zeigen, dass die miR155 ein interessantes Ziel bei der Entwicklung neuer Therapieansätze in der Tumorbekämpfung sein könnte.

4. Diskussion

Natürlich vorkommende regulatorische T-Zellen (nTregs) besitzen durch ihre suppressive Aktivität ein großes Potenzial für neue Therapieansätze bei Autoimmunerkrankungen. Für den therapeutischen Einsatz der nTregs, ist es aber von großer Notwendigkeit, die Faktoren zu kennen, welche die Entwicklung und die suppressiven Funktionen dieser T-Zellen steuern. Als gezeigt werden konnte, dass konventionelle CD4⁺ T-Zellen nach Transduktion mit dem Transkriptionsfaktor FoxP3 (*Forkhead Box P3*) sowohl den anergen Phänotyp als auch die regulatorischen Eigenschaften *in vitro* und *in vivo* von nTregs besitzen, wurde die zentrale Bedeutung von FoxP3 für die Entstehung und Funktion von nTregs erst deutlich ^{15;16;23}. FoxP3 wirkt als transkriptioneller Repressor, der vor allem an der Hemmung der Cytokin-Expression beteiligt ist ¹⁸.

Da Transkriptionsfaktoren nie alleine fungieren, rekrutiert auch FoxP3 weitere transkriptionelle Co-Faktoren. FoxP3 kann sowohl mit dem Calcium-reguliertem Transkriptionsfaktor NFAT (*Nuclear factor of activated T cells*) um die DNA-Bindung konkurrieren, als auch mit ihm interagieren ^{18;100;101}. Während NFAT in Kooperation mit AP-1 (*Activator protein-1*) die Expression der Interleukine IL-2 und IL-4 aktiviert, wird die Expression dieser Cytokine von dem FoxP3/NFAT Komplex inhibiert ^{22;102}. Allerdings fungiert der FoxP3/NFAT Komplex nicht ausschließlich inhibierend. Er wirkt aktivierend auf die Expression von CTLA4, CD25 und GITR, Moleküle, die für den nTreg-spezifischen Phänotyp verantwortlich sind ¹⁰⁰. Dies zeigt, dass an der Genregulation durch den FoxP3/NFAT Komplex weitere Co-Repressoren oder Co-Aktivatoren involviert sein müssen.

Der Transkriptionsfaktor NFAT ist nicht nur für die Ausbildung des nTreg-spezifischen Phänotyps von Bedeutung, sondern durch mehrere NFAT bindende Domänen im FoxP3 Promotor auch für die Induktion der FoxP3 Expression selbst ^{103;104}. Allerdings konnten Bopp *et al.* durch NFAT-c2/c3 doppel-*knock-out* Mäuse zeigen, dass das Fehlen dieser Transkriptionsfaktoren keinerlei Einfluss auf die Entstehung von CD4⁺CD25⁺ nTregs im Thymus und deren Funktion in der Peripherie hat ¹⁰⁵. Möglicherweise ist ein weiteres Mitglied der NFAT Familie, NFATc1, in der Lage, die Rolle der fehlenden NFAT- Transkriptionsfaktoren zu kompensieren ¹⁰⁰. Weiterhin wurde eine Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor NF-κB (*Nuclear factor-kappa B*) beschrieben. Dabei wirkt FoxP3 durch

Interaktion mit NF- κ B als transkriptioneller Repressor der NF- κ B-vermittelten Expression von Zielgenen ¹⁰⁶. Ein weiterer wichtiger Kooperationspartner von FoxP3 ist der Transkriptionsfaktor RUNX1 (*RUNT-related transcription factor 1*), der die CD4 Expression in CD4⁻CD8⁻-doppelnegativen Thymozyten hemmen kann ¹⁰⁷. Es zeigte sich, dass FoxP3 die RUNX1-induzierte IL-2 und IFN- γ (*Interferon-gamma*) Expression durch Interaktion inhibieren kann. Analog zum FoxP3/NFAT Komplex ist der FoxP3/RUNX1 Komplex an der Aktivierung nTreg-spezifischer Moleküle beteiligt. Somit kontrolliert FoxP3 durch die Interaktion mit verschiedenen transkriptionellen Co-Repressoren oder Co-Aktivatoren die Anergie von nTregs, sowie deren suppressive Eigenschaften ¹⁰⁸. Zu weiteren möglichen Co-Repressoren bei diesen FoxP3 Komplexen zählen Histon-Deacetylasen (HDACs), die an der posttranslationalen Modifikation von Histonen und somit einer stärkeren Verpackung des Chromatins beteiligt sind. Durch die Deacetylierungen werden Bereiche der DNA für Transkriptionsfaktoren blockiert und somit die Genexpression negativ reguliert. Für die Komplexbildung mit HDACs, benötigen einige Interaktionspartner bestimmte Erkennungssequenzen. Der Transkriptionsfaktor NFATc1 beispielsweise muss durch Sumoylierung modifiziert werden ¹⁰⁹.

Obwohl die Ausbildung der nTreg-spezifischen Funktionen nicht alleine von FoxP3 abhängig ist, gilt FoxP3 dennoch als der „Hauptregulator“ (*master regulator*) bei der Entwicklung von nTregs im Thymus. Daher ist es unabdingbar zu verstehen, welche Moleküle und Faktoren bei der Induktion der FoxP3 Expression beteiligt sind. Allerdings ist auch die Regulation der FoxP3 Expression sehr komplex, da viele Signale die FoxP3 Expression steigern können.

4.1 Die Rolle der Transkriptionsfaktoren HELIOS und EOS

Wie wichtig der Transkriptionsfaktor IKAROS bei der Entwicklung und Differenzierung von T-Zellen ist, wurde schon Anfang der 1990er Jahre von Georgopoulos *et al.* anhand von zwei Mausstämmen mit verschiedenen Mutationen im IKAROS- Gen beschrieben ^{110;111}. Homozygote Mäuse, die keine IKAROS- Dimerisierungsdomäne aufweisen, besitzen weder natürliche Killerzellen (NK-Zellen) noch B-Zellen. Weiterhin weisen die Mäuse etwa 50% weniger Thymozyten auf als Wildtyp Mäuse. Die dabei entstehenden T-Zellen differenzieren bevorzugt zu CD4⁺ T-Zellen aus und weisen eine starke TZR Antwort mit verstärkter Proliferation auf ¹¹¹. Der zweite Mausstamm, der eine Mutation in der DNA- bindenden Domäne besitzt, entwickelt einen wesentlich stärkeren Phänotyp. Die Mäuse weisen weder vor noch nach der Geburt NK-Zellen, B- oder T-Lymphozyten auf ¹¹⁰. Diese Versuche deuteten darauf hin, dass IKAROS in der Lage ist mit anderen Faktoren zu interagieren. Tatsächlich wurden weitere Transkriptionsfaktoren identifiziert, die aufgrund großer Homologie der IKAROS-Genfamilie zugeordnet sind.

Wie in der Einleitung bereits geschildert, exprimieren nTregs im Gegensatz zu konventionellen CD4⁺ T-Zellen hohe Mengen der IKAROS- Familienmitglieder HELIOS und EOS (siehe auch Abbildungen 8-11). Ein Charakteristikum dieser Transkriptionsfaktoren ist, dass sie aufgrund von Spleißvarianten in verschiedenen Isoformen vorliegen können. Durch Klonierungsstudien in unserem Labor konnten wir in murinen T-Zellen die Existenz von zwei HELIOS Isoformen analog zu humanen T-Zellen bestätigen und für EOS vier Isoformen identifizieren (unveröffentlichte Daten).

Während HELIOS bereits in CD4⁻CD8⁻-doppelnegativen Thymozyten detektiert werden kann, wird FoxP3 erst im CD4⁺-einzelpositiven Stadium der T-Zell-Entwicklung exprimiert ⁶⁰. Da HELIOS somit früher als FoxP3 gebildet wird und ebenso wie FoxP3 verstärkt in frischen nTregs exprimiert wird, könnte HELIOS an der Regulation von FoxP3 beteiligt sein.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das HELIOS Protein an den FoxP3 Promotor binden kann (Abbildung 15). Zur weiteren Überprüfung der Funktionalität von HELIOS und EOS bei der Entwicklung und Funktion von

nTregs wurden die verschiedenen Isoformen der beiden Transkriptionsfaktoren in voraktivierten nTregs überexprimiert. Während die ektopische Expression der langen HELIOS Isoform die FoxP3 Promotor Aktivität relativ stark steigern konnte, zeigte die kurze Isoform nur einen schwachen Effekt auf die FoxP3 Promotor Aktivität (Abbildung 16). Zu erklären ist dieser Effekt dadurch, dass die kurze HELIOS Isoform durch das Fehlen eines Zinkfingers andere DNA-Bindungsdomänen erkennt als die lange HELIOS Isoform. Analog zur kurzen HELIOS Isoform, zeigten alle vier Isoformen von EOS nur einen marginalen Einfluss auf die FoxP3 Promotor Aktivität (Abbildung 17). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde in weiterführenden Experimenten sowohl auf EOS als auch auf die kurze HELIOS Isoform verzichtet und stattdessen die Rolle des Transkriptionsfaktor HELIOS_long intensiver analysiert.

Da konventionelle CD4⁺ T-Zellen kaum detektierbares FoxP3 aufweisen, sollte als nächstes untersucht werden, ob die ektopische Expression der langen HELIOS Isoform in diesen Zellen zu einer Aktivierung des FoxP3 Promotors und dadurch zu einer Induktion der FoxP3 Expression führt. Allerdings konnte in ersten Versuchen kein Einfluss auf den FoxP3 Promotor in konventionellen CD4⁺ T-Zellen detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Dies lässt darauf schließen, dass noch weitere Faktoren benötigt werden, die an der Induktion der FoxP3 Expression beteiligt sind. Als möglicher Faktor kommt der *Transforming Growth Factor beta* (TGF- β) in Frage, der an der Entwicklung von FoxP3⁺-positiven T-Zellen im Thymus und somit an der Entwicklung von nTregs beteiligt ist⁹⁵. Und tatsächlich bewirkt die Anwesenheit von TGF- β , welches in der lebenden Maus ubiquitär vorhanden ist, dass die ektopische Expression der langen HELIOS Isoform in konventionellen CD4⁺ T-Zellen *in vitro* sowohl zu einer Steigerung der FoxP3 Promotor Aktivität als auch des FoxP3 Proteins führt (Abbildungen 19 und 20). Diese Ergebnisse bestätigen bereits veröffentlichte Publikationen, dass TGF- β ein wichtiges Signalmolekül für die FoxP3 Expression ist. Außerdem zeigen sie, dass HELIOS nicht ohne Co-Faktoren auf den FoxP3 Promotor wirken kann. Mögliche Co-Faktoren an diesem komplexen Regulationsmechanismus könnten Histon-Acetyltransferasen (HATs) sein, die durch Acetylierung DNA-Bereiche für HELIOS zugänglich machen könnten. Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass die Familienmitglieder IKAROS und AIOLOS verschiedene HDACs (Histon-Deacetylasen) rekrutieren, wodurch sie auf spezifische Promotoren negativ regulierend wirken¹¹². In anergischen T-

Zellen bewirkt die Interaktion von IKAROS mit HDAC2 eine Inhibierung der IL-2 Expression¹¹³. Da HELIOS gleiche DNA-bindende Domänen wie IKAROS aufweist, ist es denkbar, dass HELIOS zusammen mit HAT den inhibierenden IKAROS/HDAC Komplex verdrängt und somit die Expression von Genen, beispielsweise von FoxP3, aktiviert. Zusätzlich zeigte sich, dass die Hemmung mit dem HDAC Inhibitor Trichostatin A (TsA) in nTregs eine Erhöhung der Anzahl FoxP3⁺-positiver regulatorischer T-Zellen bewirkt¹¹³. Durch die Hemmung der HDACs kommt es sowohl zu einer verstärkten Acetylierung von Histonen als auch des FoxP3 Proteins selbst. Die Acetylierung von FoxP3 führt zu einer effektiveren Bindung an den IL-2 Promotor, wodurch es zu einer Hemmung der IL-2 Produktion und zu einer gesteigerten suppressiven Fähigkeit dieser Zellen kommt.

Die Flexibilität in der Chromatin-Struktur wird allerdings nicht nur durch posttranslationale Modifikationen der Histone gewährleistet, sondern auch durch Methylierung von CpG-Motiven in der DNA. In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit der Gruppe um Hühn wurde gezeigt, dass die FoxP3 Genloci von nTregs und konventionellen CD4⁺ T-Zellen sehr divergent sind. Während nTregs neben einer spezifischen Demethylierungsregion (TSDR = Ireg- Spezifische Demethylierte Region) auch Histonmodifikationen und offene Chromatin Konformationen im FoxP3 Locus aufweisen, konnte dies nicht in konventionellen CD4⁺ T-Zellen festgestellt werden^{114;115}. Obwohl TGF- β in konventionellen CD4⁺ T-Zellen die FoxP3 Expression induzieren kann und diese Zellen dadurch suppressive Eigenschaften erlangen, ist die so erworbene FoxP3 Expression nicht stabil. Der Großteil dieser induzierten T-Zellen (iTregs) verliert in Abwesenheit von TGF- β die Fähigkeit der FoxP3 Expression und damit auch ihre suppressive Funktion¹¹⁴. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass iTregs trotz vergleichbarer FoxP3 Expression zu nTregs lediglich eine partielle Demethylierung der TSDR besitzen, die aber durch einen DNA-Methylierungsinhibitor stabilisiert werden kann und somit zu einer stabilen FoxP3 Expression führt^{114;115}. Diese durch TGF- β ausgelöste partielle Demethylierung im FoxP3 Genlocus würde erklären, warum bei den Versuchen in dieser Arbeit die ektopische Expression der langen HELIOS Isoform in konventionellen CD4⁺ T-Zellen erst in Gegenwart von TGF- β den FoxP3 Promotor aktivieren konnte. Die von Floess *et al.* beschriebenen epigenetischen Genregulationen sind höchstwahrscheinlich dafür verantwortlich, dass FoxP3 in nTregs, aber nicht in

konventionellen CD4⁺ T-Zellen oder induzierten iTregs, permanent exprimiert werden kann ¹¹⁴.

Bisher zeigten die *in vitro* generierten Daten, dass der Transkriptionsfaktor HELIOS_long die TGF- β -vermittelte Expression von FoxP3 verstärken kann. Diese Ergebnisse sollten in einem *in vivo* Modell eines adoptiven Transfers (AT) der transfizierten Zellen verifiziert werden. Dazu wurden konventionelle CD4⁺ T-Zellen, welche HELIOS_long ektopisch überexprimierten, adoptiv in Mäuse transferiert, denen aufgrund einer Gendefizienz jegliche T-Zellen fehlten. Da in Mäusen das Cytokin TGF- β ubiquitär vorliegt, wurde in diesem Modell auf artifizielles TGF- β verzichtet. Es zeigte sich, dass die Präsenz von HELIOS_long eine signifikant gesteigerte Induktion an FoxP3⁺-positiven T-Zellen bewirkt (Abbildung 22). Allerdings wies auch die Kontrollgruppe eine kleine Population an FoxP3⁺-positiven T-Zellen auf. Dieses Phänomen der *de novo* Expression von FoxP3 in naiven konventionellen CD4⁺ T-Zellen in T-Zell-defizienten Mäusen lässt sich durch verschiedene Mechanismen erklären. Einerseits haben bereits die vorherigen *in vitro* Daten gezeigt, dass TGF- β , welches natürlicherweise in der Maus vorkommt, ein wichtiger Regulator ist, der die FoxP3 Expression induzieren kann ^{37;116}. Weiterhin ist bekannt, dass der adoptive Transfer von Antigen-spezifisch-aktivierten konventionellen CD4⁺ T-Zellen in T-Zell-defiziente Mäuse nach oraler Verabreichung des Antigens zur *de novo* Synthese von FoxP3 führt ¹¹⁷. Das Ergebnis aus Abbildung 22 zeigt jedoch, dass die lange HELIOS Isoform die Expression von FoxP3, die *in vivo* höchstwahrscheinlich von TGF- β induziert wird, wesentlich verstärken kann.

Vergleicht man nun die Suppressionsfähigkeit der CD25⁺-positiven T-Zellen aus der HELIOS_long Gruppe und der Kontrollgruppe in einem Proliferations- bzw. Suppressionsassay *ex vivo* miteinander, dann zeigt sich, dass die Zellen der HELIOS_long Gruppe im Gegensatz zur Kontrollgruppe die Proliferation von konventionellen CD4⁺ T-Zellen genauso gut supprimieren können, wie CD25⁺-positive T-Zellen (nTregs) aus Wildtyp Mäusen (Abbildung 23). Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass HELIOS_long auch *in vivo* einen stark fördernden Einfluss auf die Konversion konventioneller CD4⁺ T-Zellen zu FoxP3⁺ exprimierenden T-Zellen mit suppressiven Eigenschaften hat. In weiteren Experimenten wurde die funktionelle Relevanz der durch HELIOS_long geförderten Entwicklung von CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T-Zellen in einem *in vivo* Krankheitsmodell analysiert. Zu diesem Zweck wurde eine DTH (*delayed type hypersensitivity*), also eine verzögerte Immunantwort des Typ 4, in den behandelten Mäusen ausgelöst. Es

stellte sich heraus, dass die Mäuse der HELIOS_long Gruppe eine weniger starke Immunreaktion zeigten, verglichen mit der Kontrollgruppe (Abbildung 25). Sowohl die *in vitro*, als auch die *in vivo* gewonnenen Daten zeigen, dass eine Überexpression der langen HELIOS Isoform die Entwicklung von FoxP3⁺-positiven T-Zellen mit suppressiven Eigenschaften begünstigt. Der Transkriptionsfaktor HELIOS, oder vielmehr seine lange Isoform, scheint somit eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von nTregs zu spielen. Da die Regulation der FoxP3 Expression jedoch ein komplexer Vorgang ist, ist es von großer Bedeutung Interaktionspartner von HELIOS zu identifizieren, wodurch der Mechanismus der FoxP3 Expression besser geklärt werden kann.

Es gibt natürlich bereits bekannte Moleküle, die an der Regulation von FoxP3 involviert sind. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass der Transmembran-Rezeptor NOTCH1 in Zusammenarbeit mit TGF- β die FoxP3 Expression regulieren kann ¹¹⁸. Nach Aktivierung spaltet sich NIC (*NOTCH1 intracellular domain*), der intrazelluläre Teil von NOTCH1, ab und wandert in den Kern. Ein Zielgen von NOTCH1 ist der Transkriptionsfaktor Hes1, der eine inhibierende Wirkung auf den FoxP3 Promotor besitzt ¹¹⁹. Weiterhin wurde gezeigt, dass IKAROS die Expression von Hes1 inhibieren kann, wodurch es zu einer verstärkten Expression an CD4 kommt ¹²⁰. Da Hes1 als transkriptioneller Repressor für die FoxP3 Expression beschrieben wurde, könnte HELIOS in nTregs in Kooperation mit weiteren Faktoren, die Hes1 Expression inhibieren, wodurch die FoxP3 Expression gesteigert wird.

Ein weiterer Faktor, der an der Induktion der FoxP3 Expression beteiligt ist, ist STAT1 (*signal transducer and activator of transcription1*). Durch das Cytokin IL-27 wird STAT1 durch Phosphorylierung aktiviert, bindet an den FoxP3 Promotor und aktiviert diesen ¹²¹. Interessanterweise zeigte sich in IKAROS-defizienten T-Zellen eine erhöhte STAT1 Expression ⁶⁵. Dies lässt den Schluss zu, dass IKAROS direkt an der negativen Regulation von STAT1 involviert ist. Geht man nun davon aus, dass IKAROS und HELIOS um gleiche Interaktionspartner konkurrieren, könnte STAT1 in nTregs an der HELIOS-vermittelten FoxP3 Expression beteiligt sein.

Wie oben bereits erwähnt, spielt neben den verschiedenen Interaktionspartnern auch die Struktur des Chromatins, und somit die Interaktion mit HATs, eine sehr wichtige Rolle. Inwiefern die Verdrängung von HDACs oder die Rekrutierung von HATs an der HELIOS-vermittelten FoxP3 Expression beteiligt sind, müsste in weiteren Studien geklärt werden.

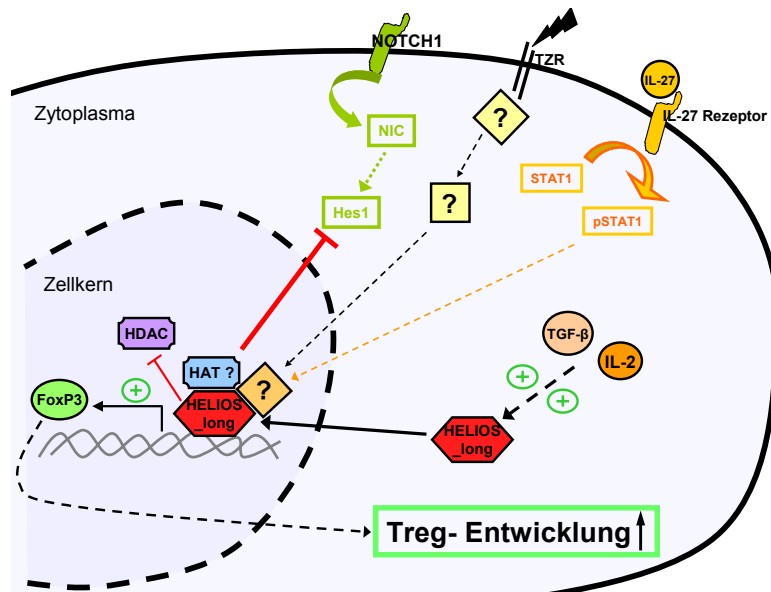


Abbildung 33: Schematische Darstellung der Wirkungsweise von HELIOS_{long} auf die FoxP3 Expression.

In diesem Zusammenhang wäre die Generierung von Mäusen, die entweder einen T-Zell-spezifischen Gendefekt im HELIOS Gen tragen oder die HELIOS ausschließlich in T-Zellen überexprimieren, sicherlich sehr hilfreich. Mit Hilfe dieser Mäuse könnte die Rolle von HELIOS bei der Entwicklung von Lymphozyten, genauer gesagt von FoxP3⁺-positiven nTregs, und die Identifizierung seiner Interaktionspartner besser analysiert werden.

4.2 Die Rolle der microRNA155

Wie bereits in der Einleitung geschildert, besitzt die microRNA155 (miR155), die aus dem Vorläufer BIC (*B-cell integration cluster*) prozessiert wird, eine wichtige Bedeutung bei der Regulation immunologischer Zellen.

In einer bereits veröffentlichten Studie konnte gezeigt werden, dass BIC kaum in ruhenden humanen CD4⁺ T-Zellen detektierbar ist, jedoch durch TZR-Stimulation relativ früh exprimiert wird⁸⁶. Diese Daten konnten in dieser Arbeit mit murinen T-Zellen bestätigt werden. Sowohl in ruhenden nTregs, die im Gegensatz zu konventionellen CD4⁺ T-Zellen eine stärkere BIC- als auch miR155 Expression aufweisen, als auch in ruhenden konventionellen CD4⁺ T-Zellen zeigte sich nach TZR-Stimulation eine gesteigerte BIC/miR155 Expression (Abbildungen 26 und 27). Dass BIC/miR155 ein direktes Zielgen von dem nTreg-spezifischem Transkriptionsfaktor FoxP3 zu sein scheint, wurde durch die Bindung von FoxP3 an den BIC Promotor nachgewiesen^{96;122}. Auch in einer erst kürzlich veröffentlichten Publikation wurde eine Beteiligung von FoxP3 an der miR155 Expression belegt⁹⁷. Während der Verlust der miR155 zwar zu einer Verminderung der nTreg Zellzahl führte, wurde deren Suppressorfunktion allerdings nicht beeinflusst. Außerdem zeigte sich, dass in nTregs die kontinuierliche FoxP3 Expression zu einer Induktion hoher miR155 Mengen führt⁹⁷. Da allerdings auch murine konventionelle CD4⁺ T-Zellen, die kein FoxP3 exprimieren, nach TZR Stimulation eine verstärkte miR155 Expression aufweisen (Abbildung 27), kann nicht ausschließlich FoxP3 für die miR155 Expression verantwortlich sein. Außerdem zeigte sich auch in konventionellen CD4⁺ T-Zellen aus der *scurfy* Maus, einer FoxP3 Defektmutante, eine Erhöhung der miR155 Expression nach TZR-Stimulation (Abbildung 28). Diese Daten deuten demnach darauf hin, dass FoxP3 für die Induktion der BIC/miR155 Expression nicht unbedingt notwendig zu sein scheint. Kooperationspartner von uns (Detlev Menerich und Kollegen von Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG) konnten dies mit humanen T-Zellen bestätigen (Daten nicht gezeigt). Sie fanden heraus, dass FoxP3 zwar an den BIC Promotor von nTregs bindet, aber nicht an den BIC Promotor von konventionellen CD4⁺ T-Zellen. Da auch diese Befunde darauf hindeuten, dass die BIC/miR155 Expression unabhängig von der FoxP3 Expression ist, sollte im Folgenden die Rolle der miR155 in FoxP3⁻negativen konventionellen CD4⁺ T-Zellen näher untersucht werden. Erstaunlicherweise zeigte sich, dass die ektopische Expression der miR155 in konventionellen CD4⁺

T-Zellen zu einer schlechteren Hemmbarkeit ihrer Proliferation durch nTregs führte (Abbildung 29). Zusätzlich zeigte sich, dass T-Zellen aus miR155-defizienten Mäusen eine verminderte IL-2 Produktion aufweisen⁸⁸. Dieses Resultat passt zu dem Ergebnis dieser Arbeit, das zeigt, dass die ektopische Expression der miR155 in konventionellen CD4⁺ T-Zellen zu einer Erhöhung der IL-2 Produktion führt (Abbildung 30). Da ein wesentliches Merkmal der nTreg-vermittelten Suppression die Hemmung der endogenen IL-2 Produktion in den supprimierten T-Zellen ist, ist es umgekehrt nur konsequent, dass die Erhöhung der IL-2 Produktion nach ektopischer Expression der miR155 zu einer verminderten Suppression führt. Vermutlich bewirkt die erhöhte Konzentration intrazellulärer miR155 in konventionellen CD4⁺ T-Zellen eine verminderte Translation von Proteinen, die wiederum an der Inhibition der IL-2 Expression beteiligt sind. Zur Identifizierung solcher miR155 Ziel-mRNAs, fand unser Kooperationspartner Dr. Mennerich (Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG) durch Computer-basierte *in silico* Analysen den Transkriptionsfaktor BACH1 (Btb and CNC homolog1). BACH1 ist in der Literatur bereits als Ziel-mRNA der miR155 beschrieben^{98,99}. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch die ektopische Expression der miR155 in konventionellen CD4⁺ T-Zellen, die Expression der BACH1 mRNA gehemmt wird, wodurch es auch zu einer Verminderung des BACH1 Proteins kommt (Abbildungen 31 und 32). Ein Interaktionspartner von BACH1 ist der Transkriptionsfaktor MafK, ein Mitglied der Maf Familie, der an der Regulation der IL-2 Expression beteiligt ist¹²³. Da BACH1 zusammen mit seinem Heterodimerpartner MafK als transkriptioneller Repressor fungiert, kann spekuliert werden, dass die miR155-vermittelte Hemmung von BACH1 dazu führt, dass anstelle von BACH1 andere Faktoren mit MafK Heterokomplexe bilden und somit als transkriptionelle Aktivatoren der IL-2 Expression agieren¹²⁴. Diese Hypothese ist in Einklang mit bereits bestehenden Publikationen, die zeigen, dass die Aktivierung von Genen ein- und ausgeschaltet werden kann, abhängig von der Balance der kleinen Maf Proteine und ihrer entweder aktivierenden oder supprimierenden Interaktionspartner (zusammengefasst in¹²⁵).

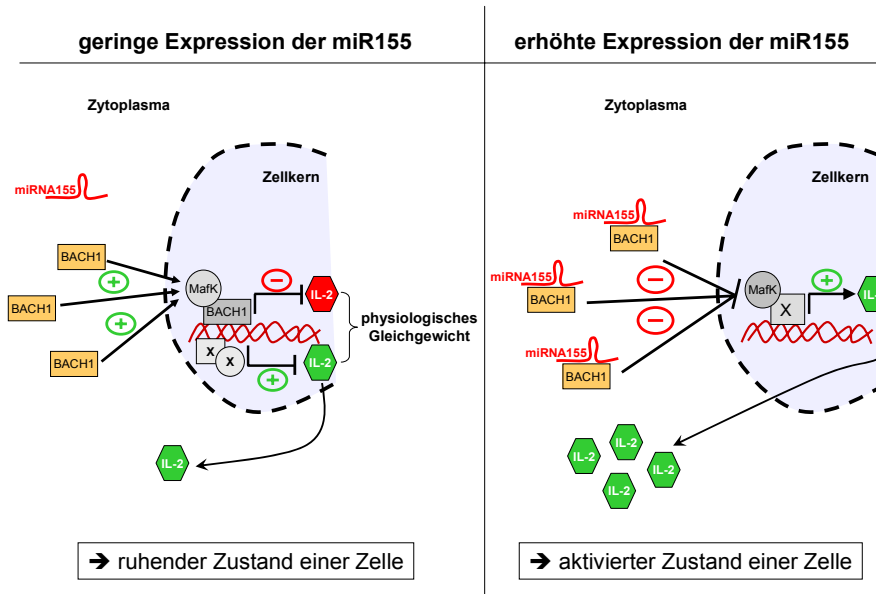


Abbildung 34: Schematische Darstellung der Wirkungsweise der miR155 auf BACH1.

Zur weiteren Identifizierung von möglichen miR155-Ziel-mRNAs wurden durch die Computer-basierten *in silico* Analysen von Dr. Menerich (Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG) mehrere Faktoren dokumentiert, die essentiell an der Regulation der Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen zu Helfer-T-Zellen (Th1 oder Th2) beteiligt sind. Dazu zählen beispielsweise die Transkriptionsfaktoren Ets-1 und Schnurri-2. Während Ets-1 an der Differenzierung und Regulation von Th1 Zellen beteiligt ist, ist Schnurri-2 an der Regulation der Th2 Differenzierung involviert^{126;127}. Dass auch die miR155 eine wichtige Rolle bei der Differenzierung von Helfer-T-Zellen spielt, belegen die Daten aus den BIC/miR155- defizienten Mäusen, die zeigen, dass deren T-Zellen bevorzugt Th2-typische Cytokine bilden und somit die Differenzierung in Richtung Th2 Zelltyp bevorzugen^{87;88}.

Die miR155 scheint somit viele verschiedene Faktoren zu regulieren, die sowohl für die Differenzierung, die Proliferation, als auch für die Aktivierung der T-Zellen wichtig sind. Allerdings kann man nicht davon ausgehen, dass es sich bei der Regulation durch microRNAs um einen strikten „An-/Aus-Mechanismus“ handelt. Vielmehr kann davon ausgegangen werden, dass microRNAs für die Einhaltung des Proteinhaushaltes und somit für das homöostatische Gleichgewicht verantwortlich sind.

Dadurch ergeben sich für microRNAs mögliche therapeutische Ansatzpunkte bei der Behandlung der unterschiedlichsten Krankheiten.

Da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass die ektopische Expression der miR155 zu einer Resistenz gegenüber der nTreg- vermittelten Suppression führt, ergibt sich für die miR155 als mögliches Therapieziel der Einsatz bei der Tumorbekämpfung. So könnte eine transiente Aufhebung der nTreg- vermittelten Suppression eine effektivere anti-Tumor-Immunreaktion begünstigen.

5. Zusammenfassung

Natürlich vorkommende regulatorische T-Zellen (nTregs) beeinflussen eine Vielzahl von Immunreaktionen, indem sie Effektorzellen in ihrer Proliferation und Cytokinproduktion hemmen können. Der Einsatz von nTregs für therapeutische Zwecke beinhaltet daher ein enormes Potential sowohl bei der Behandlung von Autoimmunerkrankungen als auch von Tumorerkrankungen. Demzufolge ist es von großer Bedeutung Moleküle zu identifizieren, die einerseits an der Entwicklung von nTregs, andererseits an der nTreg-vermittelten Suppression beteiligt sind. Da der Transkriptionsfaktor FoxP3 ein entscheidender Faktor bei der Entwicklung von nTregs ist, ist die Aufklärung der Regulation der FoxP3 Expression von großem immunologischem Interesse.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die lange Isoform des Transkriptionsfaktors HELIOS, HELIOS_{long}, die Expression von FoxP3 verstärken kann. In *in vitro* Studien konnte die Bindung von HELIOS an den FoxP3 Promotor demonstriert werden. Neben dessen Aktivierung führte die ektopische Expression von HELIOS_{long} in FoxP3⁻-negativen konventionellen CD4⁺ T-Zellen zu einer Erhöhung des FoxP3 Proteins. In einem *in vivo* Mausmodell konnten diese *in vitro* gewonnenen Daten verifiziert werden. Auch *in vivo* zeigte HELIOS_{long} einen fördernden Einfluss auf die Induktion der FoxP3 Expression. Es konnte eine signifikante Steigerung an FoxP3⁺-positiven T-Zellen in T-Zell-defizienten Mäusen nachgewiesen werden, die zudem in der Lage sind sowohl *ex vivo* als auch *in vivo* suppressive Eigenschaften zu übermitteln. Die lange Isoform des Transkriptionsfaktors HELIOS scheint einen stark fördernden Einfluss auf die FoxP3 Expression zu haben und richtungweisend an der Entwicklung und Funktion FoxP3⁺-positiver regulatorischer T-Zellen beteiligt zu sein.

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Rolle der microRNA155 (miR155) bei der nTreg-vermittelten Suppression. Es konnte gezeigt werden, dass die ektopische Expression der miR155 in konventionellen CD4⁺ T-Zellen eine erhöhte IL-2 Produktion bewirkt, so dass diese Zellen resistenter gegenüber der nTreg-vermittelten Suppression werden. Als mögliches Zielgen der miR155, das an der Regulation der IL-2 Expression beteiligt ist, konnte der Transkriptionsfaktor BACH1 identifiziert werden, da die ektopische Expression der miR155 sowohl zu einer Verringerung der BACH1 mRNA, als auch des BACH1 Proteins führte.

6. Literaturverzeichnis

1. Jameson, S.C. and M.J. Bevan. 1998. T-cell selection. *Curr. Opin. Immunol.* 10:214-219.
2. Mariathasan, S., R.G. Jones, and P.S. Ohashi. 1999. Signals involved in thymocyte positive and negative selection. *Semin. Immunol.* 11:263-272.
3. Nishizuka, Y. and T. Sakakura. 1969. Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. *Science* 166:753-755.
4. Fontenot, J.D., J.L. Dooley, A.G. Farr, and A.Y. Rudensky. 2005. Developmental regulation of Foxp3 expression during ontogeny. *J. Exp. Med.* 202:901-906.
5. Gershon, R.K. and K. Kondo. 1970. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* 18:723-737.
6. Gershon, R.K. and K. Kondo. 1971. Infectious immunological tolerance. *Immunology* 21:903-914.
7. Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, and M. Toda. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* 155:1151-1164.
8. Shevach, E.M. 2002. CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat. Rev. Immunol.* 2:389-400.
9. Thornton, A.M. and E.M. Shevach. 2000. Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J. Immunol.* 164:183-190.
10. Piccirillo, C.A. and E.M. Shevach. 2001. Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells. *J. Immunol.* 167:1137-1140.
11. Thornton, A.M. and E.M. Shevach. 1998. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J. Exp. Med.* 188:287-296.
12. Thornton, A.M., E.E. Donovan, C.A. Piccirillo, and E.M. Shevach. 2004. Cutting edge: IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4+CD25+ T cell suppressor function. *J. Immunol.* 172:6519-6523.
13. Ji, H.B., G. Liao, W.A. Faubion, A.C. Abadia-Molina, C. Cozzo, F.S. Laroux, A. Caton, and C. Terhorst. 2004. Cutting edge: the natural ligand for glucocorticoid-induced TNF receptor-related protein abrogates regulatory T cell suppression. *J. Immunol.* 172:5823-5827.
14. Zheng, Y., C.N. Manzotti, M. Liu, F. Burke, K.I. Mead, and D.M. Sansom. 2004. CD86 and CD80 differentially modulate the suppressive function of human regulatory T cells. *J. Immunol.* 172:2778-2784.
15. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299:1057-1061.

16. Fontenot, J.D., M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky. 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 4:330-336.
17. Brunkow, M.E., E.W. Jeffery, K.A. Hjerrild, B. Paeper, L.B. Clark, S.A. Yasayko, J.E. Wilkinson, D. Galas, S.F. Ziegler, and F. Ramsdell. 2001. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat. Genet.* 27:68-73.
18. Schubert, L.A., E. Jeffery, Y. Zhang, F. Ramsdell, and S.F. Ziegler. 2001. Scurfin (FOXP3) acts as a repressor of transcription and regulates T cell activation. *J. Biol. Chem.* 276:37672-37679.
19. Wildin, R.S., F. Ramsdell, J. Peake, F. Faravelli, J.L. Casanova, N. Buist, E. Levy-Lahad, M. Mazzella, O. Goulet, L. Perroni, F.D. Bricarelli, G. Byrne, M. McEuen, S. Proll, M. Appleby, and M.E. Brunkow. 2001. X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat. Genet.* 27:18-20.
20. Bennett, C.L., J. Christie, F. Ramsdell, M.E. Brunkow, P.J. Ferguson, L. Whitesell, T.E. Kelly, F.T. Saulsbury, P.F. Chance, and H.D. Ochs. 2001. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat. Genet.* 27:20-21.
21. Wildin, R.S., S. Smyk-Pearson, and A.H. Filipovich. 2002. Clinical and molecular features of the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome. *J. Med. Genet.* 39:537-545.
22. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299:1057-1061.
23. Khattri, R., T. Cox, S.A. Yasayko, and F. Ramsdell. 2003. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat. Immunol.* 4:337-342.
24. Furuno, K., T. Yuge, K. Kusuhara, H. Takada, H. Nishio, V. Khajoe, T. Ohno, and T. Hara. 2004. CD25+CD4+ regulatory T cells in patients with Kawasaki disease. *J. Pediatr.* 145:385-390.
25. Crispin, J.C., A. Martinez, and J. Cacer-Varela. 2003. Quantification of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J. Autoimmun.* 21:273-276.
26. Liu, M.F., C.R. Wang, L.L. Fung, and C.R. Wu. 2004. Decreased CD4+CD25+ T cells in peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus. *Scand. J. Immunol.* 59:198-202.
27. Longhi, M.S., Y. Ma, D.P. Bogdanos, P. Cheeseman, G. Mieli-Vergani, and D. Vergani. 2004. Impairment of CD4(+)CD25(+) regulatory T-cells in autoimmune liver disease. *J. Hepatol.* 41:31-37.
28. Longhi, M.S., M.J. Hussain, R.R. Mitry, S.K. Arora, G. Mieli-Vergani, D. Vergani, and Y. Ma. 2006. Functional study of CD4+CD25+ regulatory T cells in health and autoimmune hepatitis. *J. Immunol.* 176:4484-4491.
29. Makita, S., T. Kanai, S. Oshima, K. Uraushihara, T. Totsuka, T. Sawada, T. Nakamura, K. Koganei, T. Fukushima, and M. Watanabe. 2004. CD4+CD25bright T cells in human intestinal lamina propria as regulatory cells. *J. Immunol.* 173:3119-3130.

30. Maul, J., C. Loddenkemper, P. Mundt, E. Berg, T. Giese, A. Stallmach, M. Zeitz, and R. Duchmann. 2005. Peripheral and intestinal regulatory CD4⁺ CD25^(high) T cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 128:1868-1878.
31. Agardh, D., K. Lynch, C. Brundin, S. A. Ivarsson, A. Lernmark, and C. M. Cilio. 2006. Reduction of tissue transglutaminase autoantibody levels by gluten-free diet is associated with changes in subsets of peripheral blood lymphocytes in children with newly diagnosed coeliac disease. *Clin. Exp. Immunol.* 144:67-75.
32. de, K., I. L. R. Wedderburn, L. S. Taams, A. Patel, H. Varsani, M. Klein, J. W. de, G. Pugayung, F. Giannoni, G. Rijkers, S. Albani, W. Kuis, and B. Prakken. 2004. CD4⁺CD25^{bright} regulatory T cells actively regulate inflammation in the joints of patients with the remitting form of juvenile idiopathic arthritis. *J. Immunol.* 172:6435-6443.
33. Liu, M. F., C. R. Wang, L. L. Fung, L. H. Lin, and C. N. Tsai. 2005. The presence of cytokine-suppressive CD4⁺CD25⁺ T cells in the peripheral blood and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Scand. J. Immunol.* 62:312-317.
34. Brusko, T. M., C. H. Wasserfall, M. J. Clare-Salzler, D. A. Schatz, and M. A. Atkinson. 2005. Functional defects and the influence of age on the frequency of CD4⁺CD25⁺ T-cells in type 1 diabetes. *Diabetes* 54:1407-1414.
35. Lindley, S., C. M. Dayan, A. Bishop, B. O. Roep, M. Peakman, and T. I. Tree. 2005. Defective suppressor function in CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾ T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 54:92-99.
36. Vigiotta, V., C. Baecher-Allan, H. L. Weiner, and D. A. Hafler. 2004. Loss of functional suppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J. Exp. Med.* 199:971-979.
37. Chen, W., W. Jin, N. Hardegen, K. J. Lei, L. Li, N. Marinos, G. McGrady, and S. M. Wahl. 2003. Conversion of peripheral CD4⁺CD25⁻ naive T cells to CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J. Exp. Med.* 198:1875-1886.
38. Apostolou, I. and H. von Boehmer. 2004. In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells. *J. Exp. Med.* 199:1401-1408.
39. Kretschmer, K., I. Apostolou, D. Hawiger, K. Khazaie, M. C. Nussenzweig, and H. von Boehmer. 2005. Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat. Immunol.* 6:1219-1227.
40. Bettelli, E., Y. Carrier, W. Gao, T. Korn, T. B. Strom, M. Oukka, H. L. Weiner, and V. K. Kuchroo. 2006. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441:235-238.
41. Veldhoen, M., R. J. Hocking, C. J. Atkins, R. M. Locksley, and B. Stockinger. 2006. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity.* 24:179-189.
42. Laurence, A., C. M. Tato, T. S. Davidson, Y. Kanno, Z. Chen, Z. Yao, R. B. Blank, F. Meylan, R. Siegel, L. Hennighausen, E. M. Shevach, and J. J. O'shea. 2007. Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity.* 26:371-381.
43. Mucida, D., Y. Park, G. Kim, O. Turovskaya, I. Scott, M. Kronenberg, and H. Cheroutre. 2007. Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science* 317:256-260.

44. Huter, E.N., G.A.Punkosdy, D.D.Glass, L.I.Cheng, J.M.Ward, and E.M.Shevach. 2008. TGF-beta-induced Foxp3+ regulatory T cells rescue scurfy mice. *Eur. J. Immunol.* 38:1814-1821.
45. Chen, Y., V.K.Kuchroo, J.Inobe, D.A.Hafler, and H.L.Weiner. 1994. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* 265:1237-1240.
46. Knoechel, B., J.Lohr, E.Kahn, J.A.Bluestone, and A.K.Abbas. 2005. Sequential development of interleukin 2-dependent effector and regulatory T cells in response to endogenous systemic antigen. *J. Exp. Med.* 202:1375-1386.
47. Mahic, M., S.Yaqub, C.C.Johansson, K.Tasken, and E.M.Aandahl. 2006. FOXP3+CD4+CD25+ adaptive regulatory T cells express cyclooxygenase-2 and suppress effector T cells by a prostaglandin E2-dependent mechanism. *J. Immunol.* 177:246-254.
48. Minakuchi, R., M.C.Wacholtz, L.S.Davis, and P.E.Lipsky. 1990. Delineation of the mechanism of inhibition of human T cell activation by PGE2. *J. Immunol.* 145:2616-2625.
49. Baratelli, F., Y.Lin, L.Zhu, S.C.Yang, N.Heuze-Vourc'h, G.Zeng, K.Reckamp, M.Dohadwala, S.Sharma, and S.M.Dubinett. 2005. Prostaglandin E2 induces FOXP3 gene expression and T regulatory cell function in human CD4+ T cells. *J. Immunol.* 175:1483-1490.
50. Takahashi, T., Y.Kuniyasu, M.Toda, N.Sakaguchi, M.Itoh, M.Iwata, J.Shimizu, and S.Sakaguchi. 1998. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int. Immunol.* 10:1969-1980.
51. Nakamura, K., A.Kitani, and W.Strober. 2001. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J. Exp. Med.* 194:629-644.
52. Groux, H., A.O'Garra, M.Bigler, M.Rouleau, S.Antonenko, J.E.de Vries, and M.G.Roncarolo. 1997. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature.* 389:737-742.
53. Gondek, D.C., L.F.Lu, S.A.Quezada, S.Sakaguchi, and R.J.Noelle. 2005. Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J. Immunol.* 174:1783-1786.
54. Zhao, D.M., A.M.Thornton, R.J.Dipaolo, and E.M.Shevach. 2006. Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes. *Blood.*
55. Cao, X., S.F.Cai, T.A.Fehniger, J.Song, L.I.Collins, D.R.Piwnic-Worms, and T.J.Ley. 2007. Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity.* 27:635-646.
56. Deaglio, S., K.M.Dwyer, W.Gao, D.Friedman, A.Usheva, A.Erat, J.F.Chen, K.Enjoji, J.Linden, M.Oukka, V.K.Kuchroo, T.B.Strom, and S.C.Robson. 2007. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J. Exp. Med.* 204:1257-1265.
57. Bopp, T., C.Becker, M.Klein, S.Klein-Hessling, A.Palmetshofer, E.Serfling, V.Heib, M.Becker, J.Kubach, S.Schmitt, S.Stoll, H.Schild, M.S.Staeger, M.Stassen, H.Jonuleit, and E.Schmitt. 2007. Cyclic adenosine monophosphate is a key

- component of regulatory T cell-mediated suppression. *J. Exp. Med.* 204:1303-1310.
58. Hahm,K., B.S.Cobb, A.S.McCarty, K.E.Brown, C.A.Klug, R.Lee, K.Akashi, I.L.Weissman, A.G.Fisher, and S.T.Smale. 1998. Helios, a T cell-restricted Ikaros family member that quantitatively associates with Ikaros at centromeric heterochromatin. *Genes Dev.* 12:782-796.
 59. Kelley,C.M., T.Ikeda, J.Koipally, N.Avitahl, L.Wu, K.Georgopoulos, and B.A.Morgan. 1998. Helios, a novel dimerization partner of Ikaros expressed in the earliest hematopoietic progenitors. *Curr. Biol.* 8:508-515.
 60. Sugimoto,N., T.Oida, K.Hirota, K.Nakamura, T.Nomura, T.Uchiyama, and S.Sakaguchi. 2006. Foxp3-dependent and -independent molecules specific for CD25+CD4+ natural regulatory T cells revealed by DNA microarray analysis. *Int. Immunol.* 18:1197-1209.
 61. Georgopoulos,K., D.D.Moore, and B.Derfler. 1992. Ikaros, an early lymphoid-specific transcription factor and a putative mediator for T cell commitment. *Science* 258:808-812.
 62. Georgopoulos,K., S.Winandy, and N.Avitahl. 1997. The role of the Ikaros gene in lymphocyte development and homeostasis. *Annu. Rev. Immunol.* 15:155-176.
 63. Glimcher,L.H. and H.Singh. 1999. Transcription factors in lymphocyte development--T and B cells get together. *Cell* 96:13-23.
 64. Urban,J.A. and S.Winandy. 2004. Ikaros null mice display defects in T cell selection and CD4 versus CD8 lineage decisions. *J. Immunol.* 173:4470-4478.
 65. Quirion,M.R., G.D.Gregory, S.E.Umetsu, S.Winandy, and M.A.Brown. 2009. Cutting edge: Ikaros is a regulator of Th2 cell differentiation. *J. Immunol.* 182:741-745.
 66. Rebollo,A. and C.Schmitt. 2003. Ikaros, Aiolos and Helios: transcription regulators and lymphoid malignancies. *Immunol. Cell Biol.* 81:171-175.
 67. Molnar,A., P.Wu, D.A.Largespada, A.Vortkamp, S.Scherer, N.G.Copeland, N.A.Jenkins, G.Bruns, and K.Georgopoulos. 1996. The Ikaros gene encodes a family of lymphocyte-restricted zinc finger DNA binding proteins, highly conserved in human and mouse. *J. Immunol.* 156:585-592.
 68. Haire,R.N., A.L.Miracle, J.P.Rast, and G.W.Litman. 2000. Members of the Ikaros gene family are present in early representative vertebrates. *J. Immunol.* 165:306-312.
 69. Molnar,A. and K.Georgopoulos. 1994. The Ikaros gene encodes a family of functionally diverse zinc finger DNA-binding proteins. *Mol. Cell Biol.* 14:8292-8303.
 70. Nakase,K., F.Ishimaru, K.Fujii, T.Tabayashi, T.Kozuka, N.Sezaki, Y.Matsuo, and M.Harada. 2002. Overexpression of novel short isoforms of Helios in a patient with T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Exp. Hematol.* 30:313-317.
 71. Fujii,K., F.Ishimaru, K.Nakase, T.Tabayashi, T.Kozuka, K.Naoki, M.Miyahara, H.Toki, K.Kitajima, M.Harada, and M.Tanimoto. 2003. Over-expression of short isoforms of Helios in patients with adult T-cell leukaemia/lymphoma. *Br. J. Haematol.* 120:986-989.

72. Tabayashi, T., F. Ishimaru, M. Takata, I. Kataoka, K. Nakase, T. Kozuka, and M. Tanimoto. 2007. Characterization of the short isoform of Helios overexpressed in patients with T-cell malignancies. *Cancer Sci.* 98:182-188.
73. Zhang, Z., C.S. Swindle, J.T. Bates, R. Ko, C.V. Cotta, and C.A. Klug. 2007. Expression of a non-DNA-binding isoform of Helios induces T-cell lymphoma in mice. *Blood* 109:2190-2197.
74. Honma, Y., H. Kiyosawa, T. Mori, A. Oguri, T. Nikaido, K. Kanazawa, M. Tojo, J. Takeda, Y. Tanno, S. Yokoya, I. Kawabata, H. Ikeda, and A. Wanaka. 1999. Eos: a novel member of the Ikaros gene family expressed predominantly in the developing nervous system. *FEBS Lett.* 447:76-80.
75. Perdomo, J., M. Holmes, B. Chong, and M. Crossley. 2000. Eos and pegasus, two members of the Ikaros family of proteins with distinct DNA binding activities. *J. Biol. Chem.* 275:38347-38354.
76. Perdomo, J. and M. Crossley. 2002. The Ikaros family protein Eos associates with C-terminal-binding protein corepressors. *Eur. J. Biochem.* 269:5885-5892.
77. Huang, B., J. Zhao, Z. Lei, S. Shen, D. Li, G.X. Shen, G.M. Zhang, and Z.H. Feng. 2009. miR-142-3p restricts cAMP production in CD4+. *EMBO Rep.* 10:180-185.
78. Bartel, D.P. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116:281-297.
79. Valencia-Sanchez, M.A., J. Liu, G.J. Hannon, and R. Parker. 2006. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes Dev.* 20:515-524.
80. Cobb, B.S., T.B. Nesterova, E. Thompson, A. Hertweck, E. O'Connor, J. Godwin, C.B. Wilson, N. Brockdorff, A.G. Fisher, S.T. Smale, and M. Merkenschlager. 2005. T cell lineage choice and differentiation in the absence of the RNase III enzyme Dicer. *J. Exp. Med.* 201:1367-1373.
81. Muljo, S.A., K.M. Ansel, C. Kanellopoulou, D.M. Livingston, A. Rao, and K. Rajewsky. 2005. Aberrant T cell differentiation in the absence of Dicer. *J. Exp. Med.* 202:261-269.
82. Cobb, B.S., A. Hertweck, J. Smith, E. O'Connor, D. Graf, T. Cook, S.T. Smale, S. Sakaguchi, F.J. Livesey, A.G. Fisher, and M. Merkenschlager. 2006. A role for Dicer in immune regulation. *J. Exp. Med.* 203:2519-2527.
83. Metzler, M., M. Wilda, K. Busch, S. Viehmann, and A. Borkhardt. 2004. High expression of precursor microRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma. *Genes Chromosomes. Cancer* 39:167-169.
84. Tili, E., J.J. Michaille, A. Cimino, S. Costinean, C.D. Dumitru, B. Adair, M. Fabbri, H. Alder, C.G. Liu, G.A. Calin, and C.M. Croce. 2007. Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF-alpha stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock. *J. Immunol.* 179:5082-5089.
85. O'Connell, R.M., K.D. Taganov, M.P. Boldin, G. Cheng, and D. Baltimore. 2007. MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 104:1604-1609.
86. Haasch, D., Y.W. Chen, R.M. Reilly, X.G. Chiou, S. Koterski, M.L. Smith, P. Kroeger, K. McWeeny, D.N. Halbert, K.W. Mollison, S.W. Djuric, and J.M. Trevisan. 2002. T

- cell activation induces a noncoding RNA transcript sensitive to inhibition by immunosuppressant drugs and encoded by the proto-oncogene, BIC. *Cell Immunol.* 217:78-86.
87. Thai, T.H., D.P. Calado, S. Casola, K.M. Ansel, C. Xiao, Y. Xue, A. Murphy, D. Friendewey, D. Valenzuela, J.L. Kutok, M. Schmidt-Suppran, N. Rajewsky, G. Yancopoulos, A. Rao, and K. Rajewsky. 2007. Regulation of the germinal center response by microRNA-155. *Science* 316:604-608.
 88. Rodriguez, A., E. Vigorito, S. Clare, M.V. Warren, P. Couttet, D.R. Soond, D.S. van, R.J. Grocock, P.P. Das, E.A. Miska, D. Vetrie, K. Okkenhaug, A.J. Enright, G. Dougan, M. Turner, and A. Bradley. 2007. Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. *Science* 316:608-611.
 89. Volinia, S., G.A. Calin, C.G. Liu, S. Ambs, A. Cimmino, F. Petrocca, R. Visone, M. Iorio, C. Roldo, M. Ferracin, R.L. Prueitt, N. Yanaihara, G. Lanza, A. Scarpa, A. Vecchione, M. Negrini, C.C. Harris, and C.M. Croce. 2006. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103:2257-2261.
 90. O'Connell, R.M., D.S. Rao, A.A. Chaudhuri, M.P. Boldin, K.D. Taganov, J. Nicoll, R.L. Paquette, and D. Baltimore. 2008. Sustained expression of microRNA-155 in hematopoietic stem cells causes a myeloproliferative disorder. *J. Exp. Med.* 205:585-594.
 91. van den, B.A., B.J. Kroesen, K. Kooistra, J.D. de, J. Briggs, T. Blokzijl, S. Jacobs, J. Kluiver, A. Diepstra, E. Maggio, and S. Poppema. 2003. High expression of B-cell receptor inducible gene BIC in all subtypes of Hodgkin lymphoma. *Genes Chromosomes. Cancer* 37:20-28.
 92. Kluiver, J., S. Poppema, J.D. de, T. Blokzijl, G. Harms, S. Jacobs, B.J. Kroesen, and B.A. van den. 2005. BIC and miR-155 are highly expressed in Hodgkin, primary mediastinal and diffuse large B cell lymphomas. *J. Pathol.* 207:243-249.
 93. Eis, P.S., W. Tam, L. Sun, A. Chadburn, Z. Li, M.F. Gomez, E. Lund, and J.E. Dahlberg. 2005. Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102:3627-3632.
 94. Costinean, S., N. Zanesi, Y. Pekarsky, E. Tili, S. Volinia, N. Heerema, and C.M. Croce. 2006. Pre-B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high-grade lymphoma in E(mu)-miR155 transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103:7024-7029.
 95. Liu, Y., P. Zhang, J. Li, A.B. Kulkarni, S. Perruche, and W. Chen. 2008. A critical function for TGF-beta signaling in the development of natural CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 9:632-640.
 96. Zheng, Y., S.Z. Josefowicz, A. Kas, T.T. Chu, M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky. 2007. Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells. *Nature* 445:936-940.
 97. Lu, L.F., T.H. Thai, D.P. Calado, A. Chaudhry, M. Kubo, K. Tanaka, G.B. Loeb, H. Lee, A. Yoshimura, K. Rajewsky, and A.Y. Rudensky. 2009. Foxp3-dependent microRNA155 confers competitive fitness to regulatory T cells by targeting SOCS1 protein. *Immunity.* 30:80-91.
 98. Gottwein, E., N. Mukherjee, C. Sachse, C. Frenzel, W.H. Majoros, J.T. Chi, R. Braich, M. Manoharan, J. Soutschek, U. Ohler, and B.R. Cullen. 2007. A viral microRNA functions as an orthologue of cellular miR-155. *Nature* 450:1096-1099.

99. Skalsky,R.L., M.A.Samols, K.B.Plaisance, I.W.Boss, A.Riva, M.C.Lopez, H.V.Baker, and R.Renne. 2007. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes an ortholog of miR-155. *J. Virol.* 81:12836-12845.
100. Wu,Y., M.Borde, V.Heissmeyer, M.Feurerer, A.D.Lapan, J.C.Stroud, D.L.Bates, L.Guo, A.Han, S.F.Ziegler, D.Mathis, C.Benoist, L.Chen, and A.Rao. 2006. FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell* 126:375-387.
101. Ho,L. and G.Crabtree. 2006. A Foxy tango with NFAT. *Nat. Immunol.* 7:906-908.
102. Hogan,P.G., L.Chen, J.Nardone, and A.Rao. 2003. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev.* 17:2205-2232.
103. Mantel,P.Y., N.Ouaked, B.Ruckert, C.Karagiannidis, R.Welz, K.Blaser, and C.B.Schmidt-Weber. 2006. Molecular mechanisms underlying FOXP3 induction in human T cells. *J. Immunol.* 176:3593-3602.
104. Tone,Y., K.Furuuchi, Y.Kojima, M.L.Tykocinski, M.I.Greene, and M.Tone. 2008. Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer. *Nat. Immunol.* 9:194-202.
105. Bopp,T., A.Palmetshofer, E.Serfling, V.Heib, S.Schmitt, C.Richter, M.Klein, H.Schild, E.Schmitt, and M.Stassen. 2005. NFATc2 and NFATc3 transcription factors play a crucial role in suppression of CD4+ T lymphocytes by CD4+ CD25+ regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 201:181-187.
106. Bettelli,E., M.Dastrange, and M.Oukka. 2005. Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102:5138-5143.
107. Taniuchi,I., M.Osato, T.Egawa, M.J.Sunshine, S.C.Bae, T.Komori, Y.Ito, and D.R.Littman. 2002. Differential requirements for Runx proteins in CD4 repression and epigenetic silencing during T lymphocyte development. *Cell* 111:621-633.
108. Ono,M., H.Yaguchi, N.Ohkura, I.Kitabayashi, Y.Nagamura, T.Nomura, Y.Miyachi, T.Tsukada, and S.Sakaguchi. 2007. Foxp3 controls regulatory T-cell function by interacting with AML1/Runx1. *Nature* 446:685-689.
109. Nayak,A., J.Glockner-Pagel, M.Vaeth, J.E.Schumann, M.Buttmann, T.Bopp, E.Schmitt, E.Serfling, and F.Berberich-Siebelt. 2009. SUMOylation of the transcription factor NFATc1 leads to its subnuclear relocalization and IL2 repression by HDAC. *J. Biol. Chem.*
110. Georgopoulos,K., M.Bigby, J.H.Wang, A.Molnar, P.Wu, S.Winandy, and A.Sharpe. 1994. The Ikaros gene is required for the development of all lymphoid lineages. *Cell* 79:143-156.
111. Wang,J.H., A.Nichogiannopoulou, L.Wu, L.Sun, A.H.Sharpe, M.Bigby, and K.Georgopoulos. 1996. Selective defects in the development of the fetal and adult lymphoid system in mice with an Ikaros null mutation. *Immunity.* 5:537-549.
112. Koipally,J., A.Renold, J.Kim, and K.Georgopoulos. 1999. Repression by Ikaros and Aiolos is mediated through histone deacetylase complexes. *EMBO J.* 18:3090-3100.
113. Wang,L., R.Tao, and W.W.Hancock. 2009. Using histone deacetylase inhibitors to enhance Foxp3(+) regulatory T-cell function and induce allograft tolerance. *Immunol. Cell Biol.*

114. Floess, S., J. Freyer, C. Siewert, U. Baron, S. Olek, J. Polansky, K. Schlawe, H. D. Chang, T. Bopp, E. Schmitt, S. Klein-Hessling, E. Serfling, A. Hamann, and J. Huehn. 2007. Epigenetic control of the *foxp3* locus in regulatory T cells. *PLoS Biol.* 5:e38.
115. Polansky, J. K., K. Kretschmer, J. Freyer, S. Floess, A. Garbe, U. Baron, S. Olek, A. Hamann, B. H. von, and J. Huehn. 2008. DNA methylation controls *Foxp3* gene expression. *Eur. J. Immunol.* 38:1654-1663.
116. Fantini, M. C., C. Becker, G. Monteleone, F. Pallone, P. R. Galle, and M. F. Neurath. 2004. Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through *Foxp3* induction and down-regulation of *Smad7*. *J. Immunol.* 172:5149-5153.
117. Siewert, C., U. Lauer, S. Cording, T. Bopp, E. Schmitt, A. Hamann, and J. Huehn. 2008. Experience-driven development: effector/memory-like alphaE+*Foxp3*+ regulatory T cells originate from both naive T cells and naturally occurring naive-like regulatory T cells. *J. Immunol.* 180:146-155.
118. Samon, J. B., A. Champhekar, L. M. Minter, J. C. Telfer, L. Miele, A. Fauq, P. Das, T. E. Golde, and B. A. Osborne. 2008. Notch1 and TGFbeta1 cooperatively regulate *Foxp3* expression and the maintenance of peripheral regulatory T cells. *Blood* 112:1813-1821.
119. Ou-Yang, H. F., H. W. Zhang, C. G. Wu, P. Zhang, J. Zhang, J. C. Li, L. H. Hou, F. He, X. Y. Ti, L. Q. Song, S. Z. Zhang, L. Feng, H. W. Qi, and H. Han. 2009. Notch signaling regulates the *FOXP3* promoter through RBP-J- and *Hes1*-dependent mechanisms. *Mol. Cell Biochem.* 320:109-114.
120. Kathrein, K. L., S. Chari, and S. Winandy. 2008. Ikaros directly represses the notch target gene *Hes1* in a leukemia T cell line: implications for CD4 regulation. *J. Biol. Chem.* 283:10476-10484.
121. Ouaked, N., P. Y. Mantel, C. Bassin, S. Burgler, K. Siegmund, C. A. Akdis, and C. B. Schmidt-Weber. 2009. Regulation of the *foxp3* gene by the Th1 cytokines: the role of IL-27-induced STAT1. *J. Immunol.* 182:1041-1049.
122. Marson, A., K. Kretschmer, G. M. Frampton, E. S. Jacobsen, J. K. Polansky, K. D. MacIsaac, S. S. Levine, E. Fraenkel, B. H. von, and R. A. Young. 2007. *Foxp3* occupancy and regulation of key target genes during T-cell stimulation. *Nature* 445:931-935.
123. Yoh, K., T. Sugawara, H. Motohashi, Y. Takahama, A. Koyama, M. Yamamoto, and S. Takahashi. 2001. Transgenic over-expression of MafK suppresses T cell proliferation and function in vivo. *Genes Cells* 6:1055-1066.
124. Oyake, T., K. Itoh, H. Motohashi, N. Hayashi, H. Hoshino, M. Nishizawa, M. Yamamoto, and K. Igarashi. 1996. Bach proteins belong to a novel family of BTB-basic leucine zipper transcription factors that interact with MafK and regulate transcription through the NF-E2 site. *Mol. Cell Biol.* 16:6083-6095.
125. Blank, V. 2008. Small Maf proteins in mammalian gene control: mere dimerization partners or dynamic transcriptional regulators? *J. Mol. Biol.* 376:913-925.
126. Kimura, M. Y., H. Hosokawa, M. Yamashita, A. Hasegawa, C. Iwamura, H. Watarai, M. Taniguchi, T. Takagi, S. Ishii, and T. Nakayama. 2005. Regulation of T helper type 2 cell differentiation by murine Schnurri-2. *J. Exp. Med.* 201:397-408.

127. Grenningloh,R., S.C.Miaw, J.Moisan, B.J.Graves, and I.C.Ho. 2008. Role of Ets-1 phosphorylation in the effector function of Th cells. *Eur. J. Immunol.* 38:1700-1705.

7. Abkürzungen

α	anti
AICD	activation induced cell death
AIDS	acquired immunodeficiency syndrome
AP-1	activator protein-1
APC	Antigen-präsentierende Zelle
APC	Allophycocyanin
AT	adoptiver Transfer
BACH1	Btb and CNC homolog1
BIC	B-cell integration cluster
bio	biotinyliert
BSA	Bovine serum albumin
cAMP	cyclic adenosine monophosphat
CD	cluster of differentiation
cDNA	copyDNA
ChIP	Chromatin Immuno-Präzipitation
CO ₂	chemisches Zeichen für Kohlenstoffdioxid
COX-2	Cyclooxygenase-2
CpG	Cytosin poly Guanin
cpm	count per minute
cTEC	cortical thymus epithelial cell
CTLA4	Cytotoxic T Lymphocyte associated antigen 4
db-cAMP	dibutyryl-cAMP
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-Triphosphat
DTH	delayed type hypersensitivity
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	Fluorescence activated cell sort/scan
FCS	fetal calf serum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
for	forward
FoxP3	Forkhead box Protein 3

GITR	Glucocorticoid- induced TNF receptor
GM	großer MACS- Puffer
h	Stunde
³ H	Tritium (radioaktiver Wasserstoff)
HAT	Histon-Acetyltransferase
HDAC	Histon-Deacetylase
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
HI-Virus	human immunodeficiency virus
H ₂ O	chemisches Zeichen für Wasser
HSV	herpes simplex virus
IFA	incomplete Freund's adjuvant
IFN-γ	Interferon-gamma
IKZF	Ikaros Zinkfinger family
IL	Interleukin
IMDM	Iscove's modified Dulbecco's medium
IPEX	immune dysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked
iTreg	induzierte CD4 ⁺ CD25 ⁺ regulatorische T-Zelle
i.v.	intravenous
KO	knock-out
LDS	Lithiumdodecylsulfat
LPS	Lipopolysaccharid
MALT	mucosa-associated lymphoid tissue
MARE	Maf recognition element
MEM	minimal essential medium
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	major histocompatibility complex
min	Minute
miRNA/miRNA	microRNA
MOPS	3'-N-(Morpholino-)propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
mTEC	medullar thymus epithelial cell
NFAT	nuclear factor of activated T cells
NF-κB	nuclear factor-kappa B
NIC	NOTCH1 intracellular domain
NK	natürliche Killerzelle

nTreg	natürlich vorkommende CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ regulatorische T-Zelle
OD	optische Dichte
OVA	Ovalbumin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PGE2	Prostaglandin E2
qRT-PCR	quantitative Real Time- Polymerase Kettenreaktion
RAG	recombination activating gene
rev	reverse
RIPA	Radio Immuno Precipitation Assay
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	Ribonukleinsäure
RLU	relative light units
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription
RUNX1	RUNT-related transcription factor1
Sa	Streptavidin
sec	Sekunde
STAT1	signal transducer and activator of transcription1
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris buffered saline
TBST	Tris buffered saline mit Tween20
TE	Tris-EDTA
tg	transgen
TGF-β	transforming growth factor beta
Th	T-Helfer Zelle
TM	Testmedium
Tr	T-regulatorische Zelle
TSDR	Treg-spezifische Demethylierungsregion
TZR	T-Zell-Rezeptor
UTR	untranslated region
μCi	microCurie