

Regulatorische und supprimierte T-Zellen: Identifizierung präferentiell exprimierter Moleküle

Dissertation

zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Christoph Martin Richter
geboren in Frankfurt am Main

Mainz, Juli 2005

Aus dem
Institut für Immunologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Tag der mündlichen Prüfung:
15. November 2005

Inhaltsverzeichnis

I	Einleitung	5
1.1	CD4 ⁺ CD25 ⁺ regulatorische T-Zellen (Treg).....	6
1.2	„Genefishing“ („differential display“).....	12
1.3	„Differentielle Proteom-Analyse“.....	13
1.4	Zielsetzung und Strategie	13
II	Material & Methoden	16
2.1	Methoden der Zellkultur.....	16
2.1.1	Isolierung muriner CD25 ⁺ T-Zellen.....	16
2.1.2	Isolierung muriner CD4 ⁺ CD25 ⁻ T-Zellen.....	18
2.2	Kulturmedien.....	19
2.3	Isolierung humaner T-Zellen.....	20
2.4	Bestimmung der Zellzahl.....	20
2.5	Stimulation von T-Zellen.....	20
2.6	Proliferations-Test.....	21
2.7	CFSE-Markierung konventioneller T-Zellen.....	21
2.8	FACS-basierter Zell-Isolierung.....	22
2.9	„Genefishing“ („differential display“).....	22
2.10	„Differentielle Proteom-Analyse“.....	27
2.11	Proteinnachweis.....	28
2.11.1	Proteinpräparation.....	28
2.11.2	Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE) nach Laemmli 1974.....	28

2.11.3	Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE) mittels Tricine Gelen.....	30
2.11.4	Nachweis der Proteine nach Transfer auf eine feste Matrix (Western-Blot).....	32
2.11.5	Chemilumineszenz Nachweis.....	33
2.11.6	DAB Nachweis.....	33
2.12	Generierung eines eukaryotischen Galectin-10- Expressionskonstruktes.....	34
2.13	Transfektion von Zellen.....	35
2.14	Caspase-3/7-Assay.....	36
2.15	Cytospin-Färbung.....	36
2.16	Generierung eines polyklonalen anti-Galectin-10 Serums....	37
2.17	Titerbestimmung der Kaninchenseren mittels ELISA.....	38
2.18	IgG-Präparation mittels Dialyse.....	39
2.19	„Oregon Green“ - Markierung des anti-Galectin-10-IgGs.....	39
2.20	mRNA Nachweis.....	40
2.20.1	RNA-Präparation.....	40
2.20.2	Reverse Transkription (RT).....	41
2.21	PCR (Polymerase-chain-reaction).....	41
2.21.1	konventionelle PCR	41
2.21.2	qRT- PCR (quantitative reverse transcription – PCR).....	42
2.21.3	Eingesetzte Oligonukleotide.....	43
III	Ergebnisse	45
3.1	FACS-Analyse muriner Tregs.....	45
3.2	Funktionalität muriner Tregs.....	46
3.3	Isolierung supprimierter muriner T-Zellen.....	47
3.4	„Genefishing“ („differential display“).....	49
3.5	Identifizierung von Pur-alpha.....	51
3.6	„Differentielle Proteom-Analyse“.....	52

3.7	Ausschnitte präferentiell in murinen Tregs exprimierter Spots	54
3.8	Ausschnitte präferentiell in humanen Tregs exprimierter Spots.....	56
3.9	Identifizierung von Galectin-10	56
3.10	Quantifizierung der Galectin-10-mRNA-Expression in Tregs.....	58
3.11	Untersuchung muriner Galectine.....	59
3.12	Generierung eines polyklonalen Galectin-10-Antiserums.....	60
3.13	Galectin-10-Protein-Nachweis in Tregs.....	63
3.14	Lokalisation von Galectin-10 in Tregs.....	66
3.15	Immunhistologische Untersuchungen humaner Tregs.....	67
3.16	Generierung eines Expressionskonstruktes.....	69
3.17	Überexpression von Galectin-10 in Jurkat-Zellen.....	70
3.18	Überexpression von Galectin-10 in konventionellen CD4 ⁺ T-Zellen.....	72
IV	Diskussion	76
4.1	Vorteile und Nachteile der verschiedenen Methoden zur Identifizierung differentiell exprimierter Moleküle.....	76
4.2	Identifizierung präferentiell in murinen Tsups exprimierter mRNA-Moleküle	77
4.2.1	Identifizierung von Pur-alpha.....	77
4.3	Identifizierung präferentiell in Tregs exprimierter Proteine.....	78
4.3.1	Identifizierung von Galectin-1 in murinen Tregs.....	79
4.3.2	Identifizierung von Galectin-10 in humanen Tregs.....	79
4.4	Die Galectin-Familie	80
4.5	Galectine: Ihre Wirkung auf T-Zell-Funktionen und Toleranzmechanismen.....	82

4.6	<i>Wird Galectin-10 ebenfalls präferentiell in murinen Tregs exprimiert?.....</i>	84
4.7	Lokalisation von Galectin-10 in humanen Tregs.....	85
4.8	<i>Ist Galectin-10 am anergen Phänotyp und an den suppressiven Eigenschaften von humanen Tregs beteiligt?</i>	86
V	Zusammenfassung	88
VI	Literatur	89
VII	Abkürzungen	95

I Einleitung

Das Immunsystem dient dem Organismus als Schutz vor Krankheitserregern wie Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten. Dem Organismus stehen zur Bekämpfung dieser Erreger angeborene und erworbene Mechanismen zur Verfügung. Die angeborene Immunität ist gegen Oberflächenstrukturen wie z.B. LPS (Lipopolysacharid) oder andere bakterielle Strukturen gerichtet und wird vor allem von Makrophagen und Granulocyten, welche ein hohes phagocytisches Potential besitzen, getragen. Die angeborene Immunität ist in der Lage sehr schnell zu reagieren, besitzt aber kein immunologisches Gedächtnis. Die Zellen der adaptiven Immunität (T- und B-Zellen) hingegen sind in der Lage Gedächtniszellen auszubilden. Um zu verhindern, dass sich T-Zell - Antworten gegen Bestandteile des eigenen Organismus richten, durchlaufen T-Zellen im Zuge ihrer Entwicklung im Thymus einen Selektionsprozess. Die durch zufälliges Genarrangement gebildeten antigenspezifischen Bereiche des T-Zell - Rezeptors werden auf ihre Affinität an Peptiden in Kombination mit MHC (major-histocompatibility-complex)-Molekülen auf „Antigen-präsentierenden Zellen“ (APC) getestet. Neben der „Positiv-Selektion“ an MHC -Komplexen auf „Antigen-präsentierenden Zellen“ des Thymusepithels (d.h. nur T-Zellen, deren T-Zell-Rezeptor (TZR) Peptide in Kombination mit eigenem MHC erkennt, werden positiv selektioniert) werden im Zuge der „Negativ-Selektion“ potentiell autoreaktive T-Zellen eliminiert. Das bedeutet, dass T-Zellen, deren TZR Eigenpeptide nach Präsentation in Kombination mit eigenem MHC hoch affin erkennt, apoptotisch werden und sterben (klonale Deletion). Diese als „Positiv- und Negativ-Selektion“ bezeichneten Mechanismen werden als zentrale Toleranz bezeichnet. Ziel dieses gesamten Selektionsprozesses ist es, dass nur solche T-Zellen reifen, welche einerseits den eigenen MHC erkennen, so dass es in Kombination mit einem passenden Fremd-Peptid zu einem vollen Aktivierungssignal kommen kann, und sie andererseits nicht mit einem Selbst-Peptid aktiviert werden können.

Trotz zentraler Toleranz können autoreaktive T-Zellen aus dem Thymus auswandern und somit Autoimmunerkrankungen auslösen. Mögliche Ursachen dafür können unter anderem nicht funktionierende Selektionsmechanismen und die Tatsache sein, dass nicht alle Eigenpeptide im Zuge der Selektion präsentiert werden. Daher existieren neben der zentralen Toleranz weitere periphere

Toleranzmechanismen wie Anergie, Deletion durch „activation induced cell death“ (AICD), Ignoranz und Suppression. Beispielsweise benötigt eine T-Zelle zur Aktivierung ein Signal über ihren T-Zell-Rezeptor und Kosignale über weitere Rezeptoren wie z.B CD28. Bleiben die Kosignale aus, so wird die Zelle inaktiviert, d.h. „anerg“. Der Mechanismus der Suppression dient der aktiven Unterdrückung autoreaktiver Immunantworten und wird insbesondere von $CD4^+CD25^+$ T-regulatorischen Zellen (Tregs) getragen.

1.1 $CD4^+CD25^+$ T-regulatorische Zellen (Treg)

Die These einer T-Zell-Subpopulation mit suppressiver Funktion auf die Immunantwort wurde bereits 1970 von Gershon et al. dargelegt, allerdings wurde diese Theorie für viele Jahre, bedingt durch fragwürdige Ergebnisse, in Zweifel gezogen [1]. Erst als 1995 durch S. Sakaguchi et al. einer T-Zell-Subpopulation, welche neben CD4 die IL-2-Rezeptor alpha-Kette (CD25) konstitutiv exprimiert, eine eindeutige Rolle in der Kontrolle autoreaktiver T-Zellen *in vivo* zugeschrieben werden konnte, wurde diese These der peripheren Toleranzerhaltung durch Suppression wieder aufgegriffen. Es konnte gezeigt werden, dass die Depletion von $CD4^+CD25^+$ T-Zellen in erwachsenen Mäusen zur Bildung verschiedener Autoimmunerkrankungen führt [2]. In weiteren Versuchen konnte im humanen System eine vergleichbare Population $CD4^+CD25^+$ T-Zellen mit supprimierenden Eigenschaften charakterisiert werden.

$CD4^+$ T-Zellen dieser Subpopulation exprimieren konstitutiv die IL-2-Rezeptor alpha-Kette (CD25) und werden als T-regulatorische Zellen (Tregs) bezeichnet. Tregs repräsentieren 5-10% aller peripheren $CD4^+$ T-Zellen, sind durch einen hypoproliferativen Phänotyp charakterisiert und an der Aufrechterhaltung der immunologischen Selbst-Toleranz durch aktive Suppression autoreaktiver T-Zell-Populationen beteiligt. Tregs sind in der Lage sowohl die Cytokinproduktion als auch die Proliferation konventioneller T-Zellen zu supprimieren. Die resultierenden T-Zellen werden als suppressierte T-Zellen (Tsups) bezeichnet. Diese Suppression ist - sowohl murin als auch human - zellkontaktabhängig, unabhängig von löslichen supprimierenden Faktoren [3;4], und erfordert eine Stimulation der Tregs über ihren T-Zell-Rezeptor. Auf welchem Mechanismus diese zellkontaktabhängige

Suppression basiert, ist bisher weitestgehend unbekannt, es konnte aber gezeigt werden, dass die Suppression durch Tregs in einer Inhibition der IL-2 Produktion in konventionellen T-Zellen resultiert [4].

CD25 konnte als erster präferentiell exprimierter Oberflächenrezeptor von Tregs identifiziert werden. Arbeiten mit Tregs werden aber dadurch erschwert, dass konventionelle T-Zellen nach Aktivierung ebenfalls CD25 exprimieren und in Präparationen von (insbesondere humanen) Tregs über CD25 demnach nicht ausschließlich Tregs angereichert werden.

Neben CD25 exprimieren Tregs konstitutiv weitere Aktivierungsmarker wie z.B. CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte antigen-4) und GITR (Glucocorticoid-induced TNF-Rezeptor). Da die suppressiven Eigenschaften von Tregs zellkontaktabhängig sind, sind insbesondere solche Oberflächenmoleküle hinsichtlich einer direkten Beteiligung an der Suppressionsvermittlung auf konventionelle T-Zellen von großem Interesse. Allerdings werden sowohl GITR als auch CTLA-4 - wie auch CD25 – ebenfalls von aktivierten konventionellen T-Zellen exprimiert.

Die Ergebnisse von Experimenten mit anti-CTLA-4-Antikörpern werden zur Zeit kontrovers diskutiert. Im murinen System konnte von Takahashi et al. gezeigt werden, dass die Blockierung von CTLA-4 mittels monoklonaler Antikörper zur Aufhebung der suppressiven Eigenschaften von Tregs *in vitro* führt [5]. Im Gegensatz hierzu konnten Annunziato et al. zeigen, dass nur eine Kombination aus CTLA-4 und TGF-beta blockierenden Antikörpern die Suppression aufhebt [6] und Arbeiten von Thornton [4] und Chai [7] zeigten keinen suppressionsaufhebenden Effekt von anti-CTLA-4. Darüber hinaus konnte in Experimenten mit CTLA-4 knock-out Mäusen eine normale Entwicklung von Tregs mit unbeeinflussten supprimierenden Eigenschaften [8;9] nachgewiesen werden.

Weiterhin hatte die Blockade von CTLA-4 keinen Einfluss auf die suppressiven Eigenschaften von humanen Tregs [3].

Im murinen System war es zusätzlich möglich, die präferentielle Expression von GITR auf Tregs nachzuweisen [10] und somit Zellen anzureinigen, welche stärkere Suppressor-Aktivität aufweisen als ausschließlich über CD25 angereinigte T-Zellen [11].

Mehrere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass in Kokultur-Experimenten die Zugabe von anti-GITR-Antikörpern zum Durchbrechen der Suppression führt [10;12]. Im Gegensatz dazu hat die Bindung von GITR-spezifischen Antikörpern in präaktivierten Tregs keinen Einfluss auf deren suppressive Eigenschaften, so dass eine direkte Beteiligung von GITR an der zellkontaktabhängigen Suppression durch Tregs ausgeschlossen werden kann. Vielmehr zeigten Stephens et al. durch anti-GITR-Antikörper an GITR knock-out Mäusen, dass die Zielzellen der durchbrochenen Suppression nicht die Tregs, sondern die konventionellen T-Zellen sind [13].

Die Aufhebung der Suppression durch anti-GITR-Antikörper wie auch durch löslichen GITR-Ligand beruht vielmehr auf deren kostimulatorischer Wirkung für konventionelle T-Zellen, welche die Treg vermittelte Suppression durchbricht [14].

Welche Moleküle für den anergen Phänotyp und die suppressiven Eigenschaften von Tregs bzw. für die induzierte Suppression in Tsups verantwortlich sind, ist weitestgehend unbekannt. Der derzeit einzige anerkannte molekularbiologische Marker für Tregs ist FoxP3. FoxP3 ist ein zur Forkhead-Familie gehörender Transkriptionsrepressor und ist sowohl am anergen Phänotyp als auch an der suppressiven Kapazität von Tregs beteiligt und spezifisch in Tregs im Thymus und der Peripherie exprimiert [15-17]. Zusätzlich zur Expression in Tregs konnte die Induktion der FoxP3-Expression ebenfalls in Tsups nachgewiesen werden.

Die Überexpression von FoxP3 in murinen naiven T-Zellen resultiert in Zellen, welche sowohl phänotypisch als auch funktionell natürlich vorkommenden Tregs gleichen [15;16]. Weiterhin konnte das letale Autoimmun-Syndrom Scurfy, welches in Mäusen mit einem FoxP3-Defekt beobachtet wurde und zu hyperproliferativen Lymphocyten führt, auf das Fehlen von Tregs zurückgeführt werden. Die Rekonstitution dieser Tiere mit Tregs führte zur Aufhebung des Krankheitsbildes und zum Überleben der Mäuse [15;18]. Im humanen System resultiert die Defekt-Mutation von FoxP3 in IPEX (immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked Syndrome), einer seltenen Krankheit, welche durch autoaggressive T-Zellen verursacht wird und zu einem frühen Tod führt [19].

Zusammenfassend sind die Eigenschaften von Tregs in der folgenden Abbildung schematisch dargestellt.

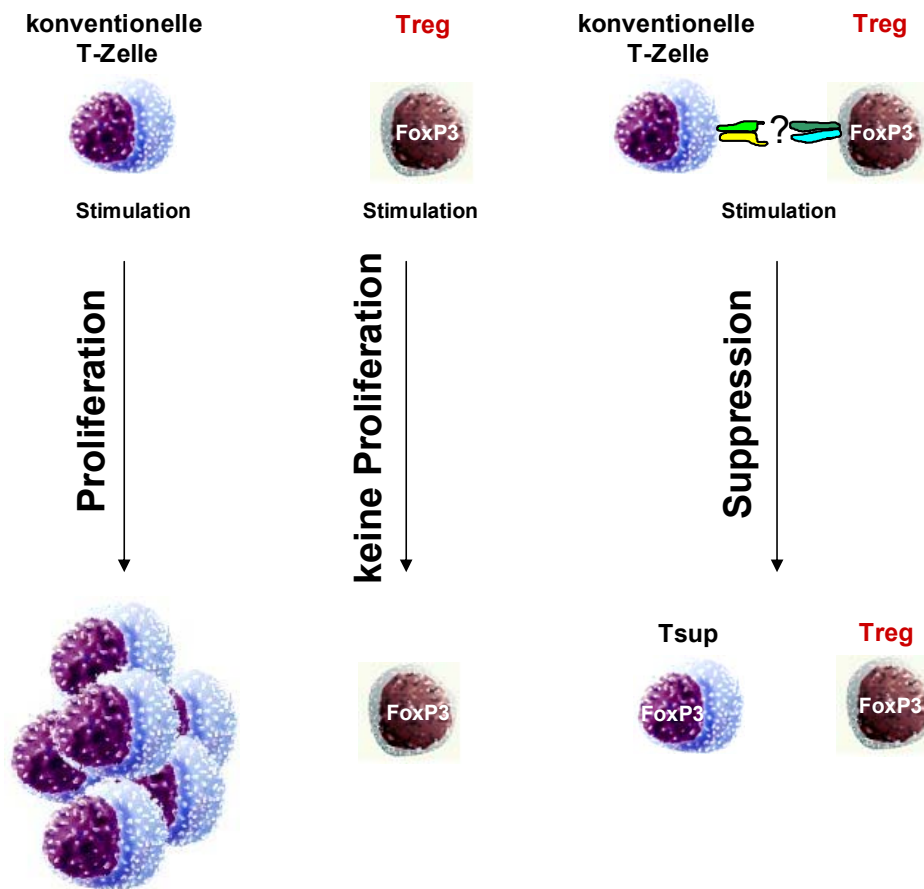


Abb.1: Darstellung der Eigenschaften von Tregs

Tregs proliferieren nach Stimulation kaum und sind außerdem in der Lage die Proliferation konventioneller T-Zellen zu supprimieren. Über welche Signalwege die Suppression funktioniert und welche Moleküle daran beteiligt sind, ist bisher weitestgehend unbekannt. Einziger molekularbiologischer Marker von Tregs und Tsups ist der Transkriptionsrepressor FoxP3.

Inzwischen wurden verschiedene Treg-Populationen charakterisiert. Die in Abb.1 dargestellten Tregs werden als „natürlich vorkommende CD4⁺CD25⁺ regulatorische T-Zellen“ bezeichnet, entwickeln sich direkt aus CD4⁺ T-Zell-Vorläufern während der „Positiv-Selektion“ im Thymus und supprimieren konventionelle T-Zellen strikt zellkontaktabhängig.

Tregs der zweiten Subpopulation werden als „induzierte regulatorische T-Zellen“ bezeichnet. Im humanen System gibt es Befunde, dass sich diese Population aus naiven konventionellen $CD4^+$ T-Zellen durch zellkontaktabhängige Interaktion mit den oben beschriebenen „natürlich vorkommenden regulatorischen T-Zellen“ entwickelt. Die durch „induzierte regulatorische T-Zellen“ ausgelöste Suppression konventioneller T-Zellen wird als infektiöse Toleranz bezeichnet, ist zellkontaktunabhängig und wird durch die löslichen Faktoren IL-10 und TGF-beta induziert [20;21]. Die Eigenschaften dieser humanen Tregs entsprechen den in der Maus beschriebenen Tr1- (IL-10 produzierenden) und Th3- (TGF-beta produzierenden) Zellen [22].

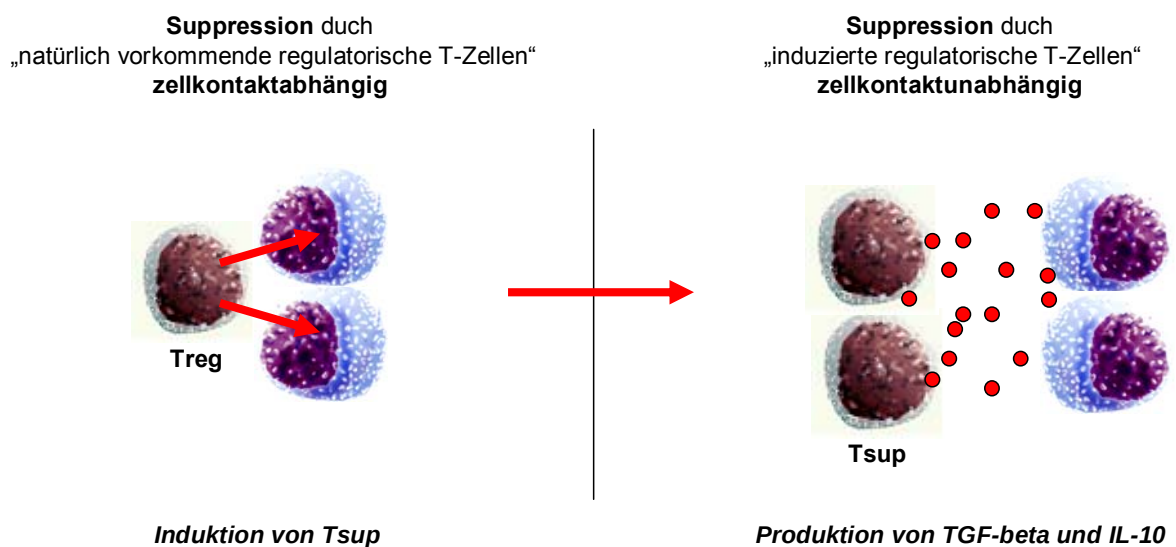


Abb.2: Darstellung „natürlich vorkommender“ - und „induzierter“ - Tregs

„Natürlich vorkommende regulatorische T-Zellen“ supprimieren konventionelle T-Zellen zellkontaktabhängig. Die so entstandenen „induzierten regulatorischen T-Zellen“ sind wiederum in der Lage konventionelle T-Zellen zu supprimieren, allerdings zellkontaktunabhängig und über die löslichen Faktoren TGF-beta und IL-10 („Infektiöse Toleranz“) (abgeändert nach: Stassen 2004 [22]).

Tregs konnten mittlerweile zahlreiche Funktionen im Rahmen von Autoimmunität, anti-Tumor-Immunantworten sowie an der Unterdrückung allergischer Reaktionen durch die Suppression von Th2-Antworten nachgewiesen werden. Neben positiven Funktionen wie beispielsweise der Verhinderung von Autoimmunkrankheiten und der Förderung von Transplantat-Akzeptanzen sind allerdings auch krankheitsfördernde Effekte wie die Blockade von anti-Tumor-Antworten beschrieben worden [23].

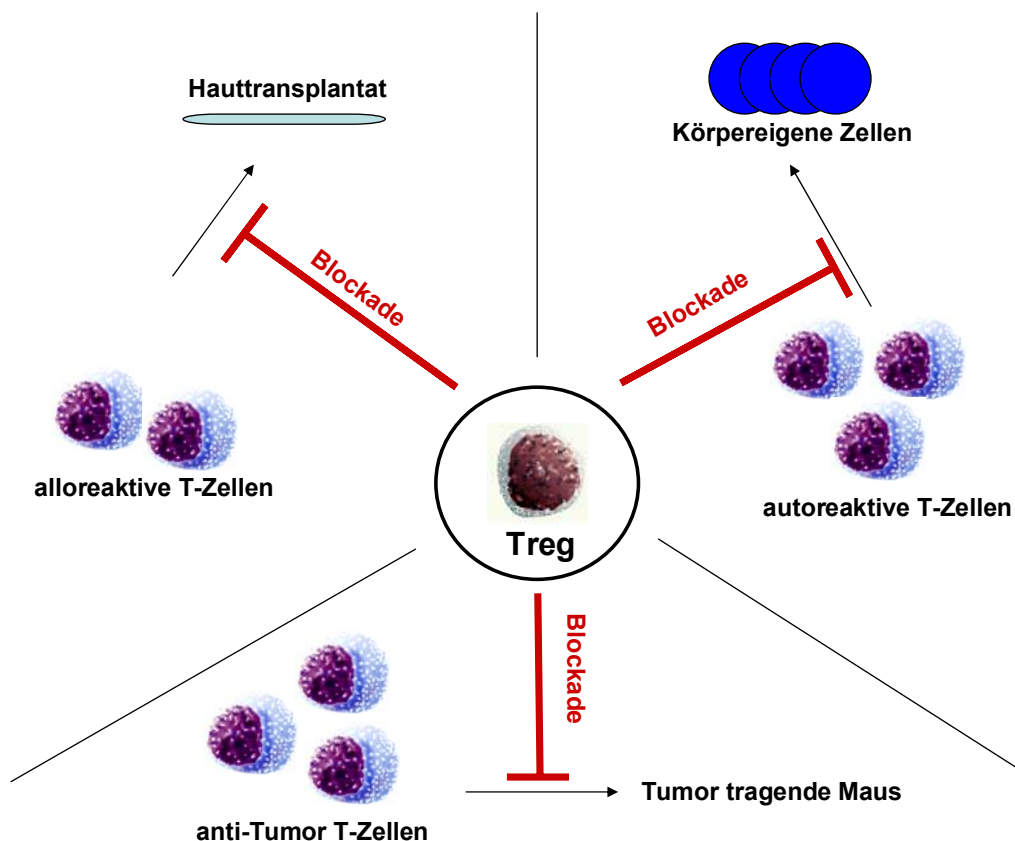


Abb.3: Funktionen von Tregs in der Regulation von Immunantworten

Dargestellt sind einige Funktionen von Tregs im Rahmen von anti-Tumor-Antworten, Autoimmun-Antworten und Transplantat-Akzeptanz (abgeändert nach McHugh 2002 [23]).

Aufgrund der genannten - und in Abb.3 dargestellten - Funktionen von Tregs sind die an der Suppression beteiligten Mechanismen und Moleküle sowie verlässliche

Treg-Marker momentan hinsichtlich immuntherapeutischer Ansätze von sehr großem Interesse. Gleiches gilt auch für Moleküle, welche in supprimierten T-Zellen die Suppression vermitteln.

Zur Identifizierung von Molekülen, die an der Entwicklung und Funktion von Tregs beteiligt sind, wurden bereits verschiedenste Methoden, wie z.B. „differential display“- und „microarray“- Technologien durchgeführt. Allerdings ist der Transkriptionsrepressor FoxP3 nach wie vor der einzige anerkannte endogene Marker humaner und muriner Tregs.

Um weitere präferentiell in Tregs bzw. in Tsups exprimierte Moleküle zu identifizieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit „Genefishing“ (zur Identifizierung präferentiell in Tsups exprimierter Moleküle) und „differentielle Proteom-Analysen“ (zur Identifizierung präferentiell in Tregs exprimierter Moleküle) durchgeführt.

1.2 „Genefishing“

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine „differential display“-Variante verwendet, welche mit sehr geringen mRNA-Ausgangskonzentrationen durchführbar ist und als „Genefishing“ bezeichnet wird. Diese Methode basiert auf dem mRNA-Expressions-Vergleich der zu untersuchenden Zell-Populationen. Hierbei werden 120 verschiedene „Deca-Oligonukleotide“ eingesetzt, deren Sequenz so gewählt ist, dass sie an möglichst viele verschiedene cDNAs binden und somit in einer folgenden PCR-Reaktion deren Amplifikation ermöglichen. Die so in einer Agarosegelelektrophorese entstehenden Bandenmuster verschiedener Zell-Populationen werden anschließend verglichen. Differentiell exprimierte Banden können aus den Gelen ausgeschnitten, kloniert, sequenziert und somit identifiziert werden. Nachteil dieser Methode ist, dass die mRNAs, welche keine komplementären Sequenzen zu den 120 „random-Oligonukleotiden“ haben, nicht erfasst werden können. Dennoch hat diese Methode den Vorteil, dass mit sehr geringen Zellzahlen gearbeitet werden kann. Da die Ausgangszellzahl von Tsups stark limitierend ist und bei weitem nicht für „differentielle Proteom-Analysen“ ausreicht, wurde die mRNA-Expression von murinen Tsups mit der mRNA-Expression „nicht supprimierter“ T-Zellen mittels „Genefishing“ verglichen.

1.3 „Differentielle Proteom-Analyse“

Bei der Methode der „differentiellen Proteom-Analyse“ werden Protein-Extrakte der zu vergleichenden Zell-Populationen auf 2D SDS-Gelen nach ihrem Molekulargewicht und ihrem isoelektrischen Punkt aufgetrennt. Jede Zell-Population weist dabei ein spezifisches Proteinexpressionsmuster auf.

Die Expressionsmuster verschiedener Zell-Populationen werden anschließend computerunterstützt verglichen. Interessante Proteine, welche ausschließlich oder stark differentiell in einer Zell-Population exprimiert werden, können anschließend aus den Gelen ausgestanzt und mittels MALDI-TOF- („matrix assisted laser desorption/ionization – time of Flight“) Massenspektrometrie identifiziert werden.

Cytosolische Proteinextrakte sowohl muriner als auch humaner Tregs und konventioneller T-Zellen wurden in der vorliegenden Arbeit mittels „differentieller Proteom-Analysen“ auf ihr Proteinexpressionsmuster untersucht.

1.4 Zielsetzung und Strategie

Das Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung von Molekülen, die entweder präferentiell in Tregs oder Tsups exprimiert werden.

Sowohl murine Tregs wie auch konventionelle T-Zellen wurden isoliert und mittels „differentieller Proteom-Analyse“ auf ihr Proteinexpressionsmuster untersucht. Zusätzlich wurde das Expressionsmuster muriner Tsups mit dem Expressionsmuster von „nicht supprimierten“ T-Zellen verglichen. Da die Menge an T-Zellen nach *in vitro* Suppression durch Tregs nicht ausreicht, um Proteom-Analysen durchzuführen, wurde das Expressionsmuster dieser Zell-Population mittels „differential display“ („Genefishing“) analysiert. Abb.4 stellt schematisch den Versuchsaufbau dar.

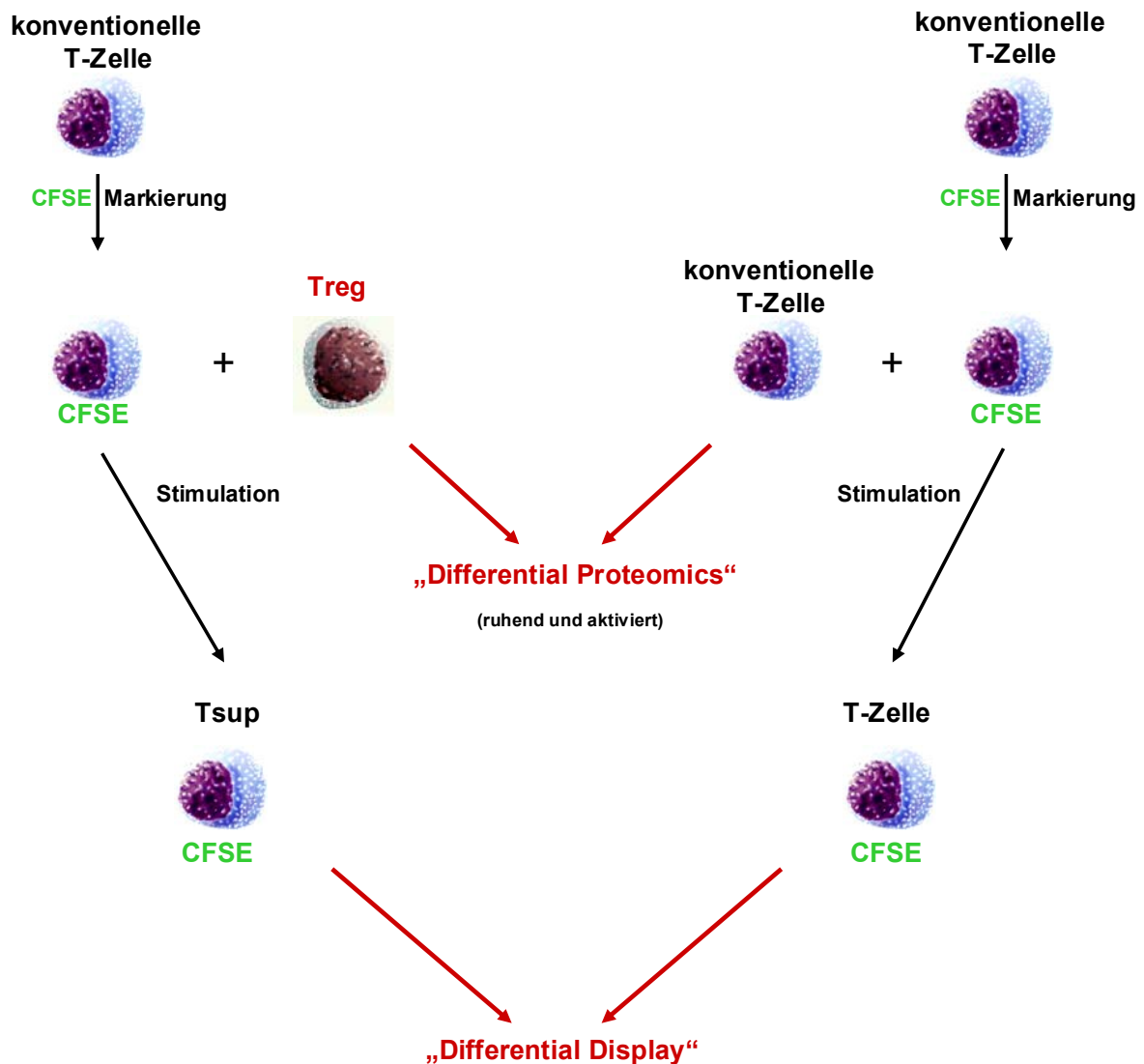


Abb.4: Versuchsaufbau zur Identifizierung präferentiell in Tregs bzw. in Tsups exprimierter Moleküle

Murine Tregs sowie konventionelle T-Zellen wurden zum einen für „differentielle Proteom-Analyse“ und zum anderen (nach Kokultur beider Populationen und anschließender Isolierung der CFSE-markierten Populationen) für „differential display“-Untersuchungen eingesetzt.

Parallel zu den beschriebenen murinen Versuchsansätzen wurden auch humane Tregs und konventionelle T-Zellen am Institut für Dermatologie der Johannes

Gutenberg-Universität isoliert. Humane T-Zell-Präparationen von Tregs und konventionellen T-Zellen wurden ebenfalls „differentiellen Proteom-Analysen“ unterzogen und zu weiteren Analysen in der vorliegenden Arbeit verwendet.

II Material & Methoden

2.1 Methoden der Zellkultur

2.1.1 Isolierung muriner CD25⁺ T-Zellen

Konventionelle sowie regulatorische T-Zellen wurden aus Milzpräparationen positiv isoliert. Hierzu wurden MACS Separationen (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland) durchgeführt. Mäuse der Stämme BALB/c und CD57Bl/6 wurden von „Charles River Laboratories“ (Sulzfeld, Germany) bezogen und im Instituts-Tierstall weiter gezüchtet.

- Milzen wurden in einem Sieb zerrieben und in MEM + 2% FCS aufgenommen.
- Die homogenisierte Milzzellsuspension wurde für 10min. bei 4°C in einem 50ml „Falcon“ stehen gelassen - Gewebereste setzen sich ab.
- Der Überstand wurde abgenommen und bei 400 x g 20min zentrifugiert.
- Das Zell-Sediment wurde pro Milz in 1ml Gey's Lysepuffer* aufgenommen. Nach 2min Erythrozyten-Lyse wurde die Lyse-Reaktion durch die Zugabe des doppelten Volumens MEM + 2% FCS gestoppt.
- Die Zell-Suspension wurde über ein Zellsieb in ein neues 50ml „Falcon“ überführt.
- Die Milzzellen wurden anschließend in MEM + 2% FCS gewaschen und auf 1×10^8 Zellen/ml eingestellt.

*Gey's Lysepuffer: 8,29gr. NH_4CL , 1,0gr. KHCO_3 , 0,037gr. EDTA pro 1l Wasser.

Zuerst wurden CD25⁺ Zellen mittels des Antikörpers 7D4-bio (= anti-CD25-Biotin-Antikörper) positiv isoliert.

- Zugabe des Antikörpers 7D4-Bio (Pharmingen, San Diego, USA) in einer Konzentration von 5µg/ml. Inkubation bei 4°C für 20min.

- Die Zellen wurden in MACS-Puffer gewaschen (2x).
- Die Zellen wurden erneut auf 1×10^8 Zellen/ml in MACS-Puffer eingestellt.
- Zugabe von Sa-PE (Streptavidine-Phycoerythrin) (Dianova, Hamburg, Deutschland) in einer 1:400 Verdünnung.
- Die Zellen wurden für 20min bei 4°C inkubiert.
- Die Zellen wurden in MACS-Puffer gewaschen (2x).
- Aufnahme der Zellen pro 10 Milzen in warmem MACS-Puffer.
- Zugabe von 50µl/5 x 10^8 Zellen „anti-PE-beads“.
- Die „Zell-anti-PE-beads-Suspension“ wurde für 30min bei Raumtemperatur geschüttelt.
- Auffüllen des Volumens auf 5ml pro 5 x 10^8 Zellen und erneute Gabe über Zellsieb.
- Die Zellsuspension wurde anschließend 1ml-weise über die vorbereiteten MACS-Säulen gegeben. Pro Säule 5 x 10^8 Zellen.
- Säulen wurden anschließend mit 2 x 3ml MACS-Puffer gespült.

Die Durchläufe wurden bei 4°C aufgehoben und für die anschließend folgende CD4-Separation verwendet.

- Die MACS-Säulen wurden aus dem magnetischen Feld herausgenommen und mit 5ml MACS-Puffer gefüllt. Die Zellen wurden zügig in ein frisches Falcon eluiert = Eluat 1.
- Bei mehreren Säulen wurden die Eluate vereint, für 20 Minuten abzentrifugiert und die Zellsedimente der Eluate aus drei Säulen in 5ml MACS-Puffer aufgenommen.
- Die Zellsuspension wurde erneut 1ml-weise über eine frische MACS-Säule gegeben.
- Die Säule wurde mit 2 x 3ml MACS-Puffer gespült und anschließend erneut eluiert (s.o.) = Eluat 2.
- Die Eluate wurden vereint, gewaschen und die Zellen in PBS/0,5%BSA aufgenommen.

Zur Eliminierung von Makrophagen-, $CD8^+$ T-Zell- und B-Zell-Verunreinigungen folgte eine DYNA-Beads-Behandlung (DynaL Biotech, Hamburg, Deutschland) mit anti-B220-, anti-CD8- und anti-MAC-1-beads.

Zu erwarten sind etwa 30% Verunreinigung, wovon die Hälfte wiederum B-Zell-Verunreinigungen darstellen. Um die T-Zell-Präparationen so sauber wie möglich zu halten, wurde die vierfache Menge an B220-beads zugegeben:

Beispiel:	6×10^7	(Ausgangszellzahl nach MACS)
<u>30%</u>	2×10^7	(Verunreinigung)
<u>50%</u>	1×10^7	(B-Zell-Verunreinigung)
<u>x 4</u>	4×10^7	B220-beads

- Zugabe von anti-B220-beads und jeweils der Hälfte an anti-CD8- und anti-MAC-1-beads.
- Inkubation für 20min unter Schütteln bei Raumtemperatur.
- Die Zell-Suspension wurde in 8ml PBS + 10% FCS aufgenommen und für 2 Minuten in einen Magneten gestellt.
- Der Überstand wurde anschließend vorsichtig abgenommen. In das „Falcon“ mit den „beads“ wurden erneut 8ml PBS + 10% FCS gegeben und das „Falcon“ anschließend für 2 Minuten in den Magneten gestellt.
- Die Überstände wurden vereinigt, zentrifugiert und die Zell-Sedimente der $CD25^+$ T-Zellen (nach Eliminierung von Makrophagen, B-Zellen und $CD8^+$ - Zellen) 2x in Testmedium gewaschen.
- Zellen wurden gezählt und für anschließende Tests auf die entsprechende Zellzahl eingestellt.

2.1.2 Isolierung muriner $CD4^+CD25^-$ T-Zellen

Die Durchläufe der oben beschriebenen MACS-Separation wurden für die anschließende Isolierung der $CD4^+$ Zellen verwendet.

- Die Durchläufe der CD25⁺-Zell-Isolierung (s.o.) wurden zentrifugiert und die Zellen in 1ml MACS-Puffer pro 1×10^8 Zellen aufgenommen.
- Zugabe von 0,5µg/ml des biotinylierten anti-CD4-Antikörpers H129.19-Biotin.
- Die Zellen wurden für 12 min bei 4°C inkubiert.
- Die Zellen wurden in MACS-Puffer gewaschen (2x).
- Zugabe von SA-PE-beads (1/40) und 10min Inkubation bei 4°C.
- Die Zellsuspension wurde über ein Zellsieb - und anschließend über MACS-Säulen (analog wie oben beschrieben (2x)) - gegeben.
- Die Zellen wurden in Testmedium gewaschen (2x).
- CD4⁺ T-Zellen wurden gezählt und für anschließende Tests auf die entsprechende Zellzahl in Testmedium eingestellt.

2.2 Kulturmedien

IMDM (Iscove's modified Dulbecco's medium)

17,67 g/l IMDM Trockenpulver

3,02 g/l NaHCO₃

1% Penicillin/Streptomycinlösung

5×10^{-5} M β -Mercaptoethanol

Phenolrot als Indikator

Testmedium

IMDM mit

5% fötales Kälberserum

1% Natriumpyruvatlösung

1% Glutaminlösung

MEM (minimal essential medium)

10,58 g/l MEM Trockenpulver

4,77 g/l HEPES

X-Vivo-15 (“serum-free Medium”) (Cambrex, Rockland, USA)

2.3 Isolierung humaner T-Zellen

Humane T-Zellen wurden ebenfalls über MACS-Separation isoliert. Die Isolierung humaner Zellen wurde in enger Kooperation vom Institut für Dermatologie der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz durchgeführt.

2.4 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde ein Aliquot der Zellsuspension mit Trypanblaulösung verdünnt. Tote Zellen färben sich blau, während lebende Zellen den Farbstoff nicht aufnehmen. Mit Hilfe einer Neubaur-Zählkammer wurde die Zahl der lebenden Zellen bestimmt. Die Anzahl der in der Kammer gezählten lebenden Zellen ergibt nach Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor und dem Kammerfaktor (10^4) die Zellzahl pro ml Zellsuspension.

2.5 Stimulation von T-Zellen

Die zu stimulierenden T-Zellen wurden auf 1×10^6 Zellen pro ml Endkonzentration in Testmedium eingestellt und in einer 24-well-Platte stimuliert. T-Zellen wurden, sofern nicht anders beschrieben, mit $3 \mu\text{g/ml}$ anti-CD3 (145-2C11) und „Antigen-präsentierenden Zellen“ (A20 = B-Zell-Tumor Zelllinie) im Verhältnis von 1:10 in Testmedium stimuliert. Für Stimulationen der Kokulturrexperimente wurde den Ansätzen 300 U/ml mIL4 zugegeben. Nach 3 Tagen wurden die Zellen mittels FACS isoliert. In Kokultur-Experimenten wurden konventionelle T-Zellen und Tregs im Verhältnis 1:1 in Testmedium kultiviert.

Zellen für Proteomanalysen wurden mit $3 \mu\text{g/ml}$ anti-CD3 und $10 \mu\text{g/ml}$ anti-CD28 (37.51 [24]) für 48h stimuliert.

2.6 Proliferations-Test

2×10^5 konventionelle T-Zellen sowie Tregs wurden entweder allein oder in Kokultur-Experimenten (Verhältnis 1:1) in 200µl Testmedium stimuliert.

96h nach Stimulation wurde dem Proliferations-Test radioaktiv markiertes Thymidin zugegeben und nach weiteren 18h der Thymidin-Einbau mittels eines „Beta-scintillation counters“ gemessen.

2.7 CFSE-Markierung konventioneller T-Zellen

Um konventionelle T-Zellen nach Kokultur-Experimenten mit Tregs wieder isolieren zu können, wurde eine CFSE-Markierung verwendet (CFDASE, Molecular Probes, Leiden, Niederlande). Der membrangängige Farbstoff CFDASE (Carboxyfluoreszein Diazetat Succinimidyl Ester) bindet an die freien Amine cytoplasmatischer Proteine. Durch die Abspaltung von zwei Acetat-Gruppen bildet sich der Farbstoff CFSE, dessen intrazelluläre Konzentration sich mit jeder Zellteilung halbiert. Über CFSE können anschließend mittels FACS sowohl die Zellteilungen nachvollzogen, sowie die markierten Zellen isoliert werden. Die so isolierten supprimierten T-Zellen wurden anschließend für „differential display“ Untersuchungen eingesetzt.

- Waschen der Zellen in PBS (pH 7,4) (2x).
- Einstellen der Zellen auf 1×10^7 /ml in PBS (pH 7,4).
- Zugabe von 2,5µM CFSE-Endkonzentration.
- Inkubation für 4min. bei 37°C in 15ml Falcon.
- Zugabe von doppeltem Volumen Testmedium + 10 FCS.
- Waschen der Zellen in Testmedium (2x).
- Zählen und Einstellen der Zellen.

2.8 FACS-basierter Zell-Isolierung

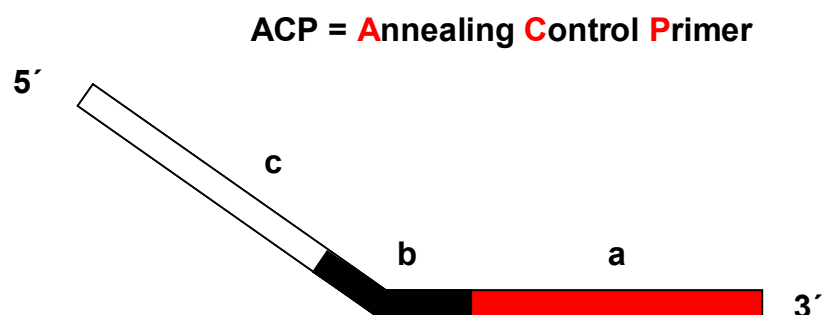
Nach Kokultorexperimenten wurden die CFSE markierten T-Zellen in PBS + 4% FCS gewaschen und anschließend mit Hilfe eines „cell-sorters“ (FACS-vantage SE and CellQuest Pro, BD Bioscience) isoliert. Tote Zellen wurden zuvor durch Propidiumjodid ausgeschlossen. Die FACS-basierte Zell-Isolierung erfolgte in der „FACS-Core-Facility“ der klinisch theoretischen Institute der Johannes Gutenberg-Universität Mainz.

2.9 „Genefishing“ („differential display“)

Zur Identifizierung von differentiell exprimierten Molekülen wurden konventionelle und supprimierte T-Zellen in Trizol (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) aufgenommen und einer RNA-Präparation mit anschließender DNase-Behandlung unterzogen. Für die Erst-Strang-cDNA-Synthese wurden (je nach Ansatz) 0,25 – 1µg RNA eingesetzt.

„Genefishing“ wurde mittels eines Kits der Firma Seegene (Fairborn, Rockville, USA) nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Dieses Verfahren basiert auf der Verwendung von speziellen, in drei Bereiche unterteilten Oligonukleotiden: „Annealing Control Primer“.

Der Aufbau dieser Primer ist in der folgenden Abbildung erklärt:



a: Kern-Sequenz: bindet an spezifische cDNA-Sequenzen bei einer „annealing-Temperatur“ von 50°C im Zuge der Zweit-Strang-cDNA-Synthese.

b: Regulator-Sequenz: bewegliche Sequenz, welche je nach Temperatur entweder die Bindung der Kern- und Universal-Sequenz, oder nur der Kernsequenz ermöglicht.

c: Universal-Sequenz: (für alle ACPs identisch) ermöglicht die Amplifikation von Zweit-Strang-cDNA bei einer „annealing-Temperatur“ von 65°C.

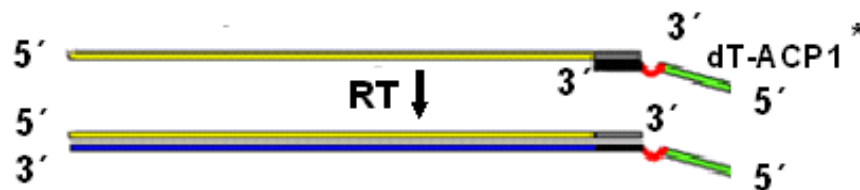
Das Genefishing-Verfahren arbeitet mit 120 verschiedenen ACPs, d.h. 120 verschiedenen Kern-Sequenz-Bereichen.

Die einzelnen Schritte dieser Methode sind, basierend auf der Gesamtdarstellung im Ergebnisteil dieser Arbeit (Abb.8 Seite 49), detailliert aufgeführt.

Erst-Strang-cDNA-Synthese:

Die Erst-Strang-cDNA-Synthese erfolgt mittels des Poly-AAA-Primers dT-ACP1.

Poly-AAA entspricht dabei dem Kernbereich (hier schwarz), rot ist die Regulator-Sequenz dargestellt und grün die Universal-Sequenz.



RNA (0,25-1µg):	X µl
10µM dT-ACP1 (* PolyAAA-Primer)	1 µl
RNase freies Wasser	<u>X</u> µl
	9,5µl

- Inkubation für 3min bei 80°C.
- Inkubation für 2min auf Eis.

- Zugabe von:

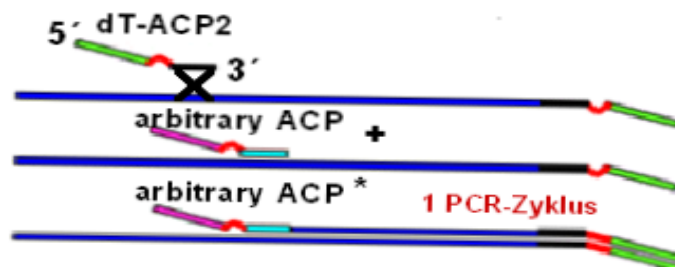
5x RT Puffer	4µl
2mM dNTP	5µl
RNase Inhibitor	0,5µl
M-MLV reverse Transkriptase (Fermentas)	<u>1µl</u>
	20µl

- Inkubation für 90min bei 42°C.
- Erhitzen des Ansatzes für 2min auf 94°C.
- Inkubation für 2min auf Eis.
- Verdünnen der Erst-Strang-cDNA durch Zugabe von 180µl RNase freiem Wasser.
- Aufbewahren der verdünnten Erst-Strang-cDNA bei -20°C.

Die folgende „Genefishing“-PCR-Reaktion beinhaltet sowohl die Zweit-Strang-cDNA-Synthese (ein PCR-Zyklus) als auch die anschließende Amplifikation.

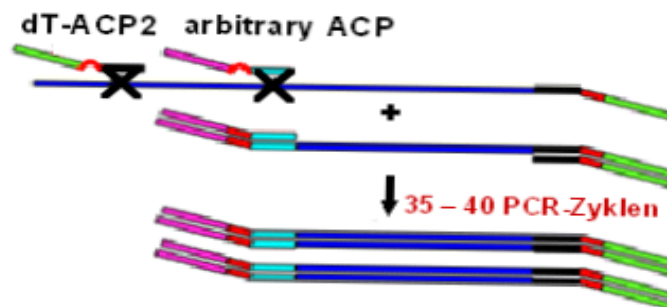
Zweit-Strang-cDNA-Synthese:

Die Zweit-Strang-cDNA-Synthese erfolgt mittels der Primer dT-ACP2 (= komplementärer Primer zu dT-ACP1) und jeweils einem der 120 verschiedenen arbitrary ACPs.



Amplifikation:

Die verwendeten ACPs können während der Amplifikation aufgrund der gewählten annealing-Temperatur von 65° nur an schon vorhandene cDNAs mit den oben als Universalsequenz (c:) bezeichneten Sequenzen binden.



Verdünnte Erst-Strang-cDNA	5µl
5µM arbitrary ACP	
(je einer von 120 verschiedenen)	2µl
10µM dT-ACP2	1µl
10mM dNTPs	1µl
Wasser	35µl
10x Advantage Polymerase Puffer	
inklusive 50mM MgCL ₂ (Clontech)	5µl
Advantage cDNA Polymerase (Clontech)	<u>1µl</u>
	50µl

Die "Genefishing"-PCR wurde bei folgendem PCR-Temperaturprofil durchgeführt:

1. 94°C	2min
2. 50°C	3min
3. 68°C	1min

4. 94°C	30sec
5. 65°C	40sec
6. 68°C	1min
7. 68°C	5min

Schritte: 1-3: Zweit-Strang-cDNA-Synthese: 1 PCR-Zyklus

Schritte: 4-6: Amplifikation: 40 PCR- Zyklen

Schritt: 7: 1 x

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden anschließend auf einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt.

Präferentiell in den cDNA-Proben supprimierter T-Zellen auftretende Banden wurden anschließend aus den Gelen ausgeschnitten und mittels QiaExII nach den Angaben des Herstellers eluiert (Qiagen). Zur Elution wurden 15µl H₂O verwendet. Die eluierten Fragmente wurden mittels pGEM-TA-Cloning (Promega, Mannheim, Deutschland) in den Vektor pGem ligiert:

2 x Ligationspuffer	5µl
pGem-T	1µl
PCR-Produkt	3µl
T4 DNA – Ligase	<u>1µl</u>
	10µl

- Inkubation für 1h bei Raumtemperatur.
- 2µl des Ligationsansatzes wurden zu 50µl JM109 kompetenten E.coli-Bakterien gegeben und 20min auf Eis inkubiert.
- Transfektion mittels „heat-shock“ für 45sec bei 42°C.
- Inkubation 2min auf Eis.
- Zugabe von 450µl SOC- (oder Super-LB-) Medium und Inkubation für 1,5h bei 37°C unter Schütteln.
- Die Bakterien wurden anschließend auf LB-Platten „ausplattiert“.

Die verwendeten LB-Platten wurden zuvor mit Ampicillin (100µg/ml), x-Gal (2mM) und IPTG (1mM) bestrichen, um eine „Blau/Weiß“- Selektion zu ermöglichen. Weiße und somit „positive“ Klone wurden anschließend von den Platten „gepickt“ und in eine Minikultur überführt. Mittels PCR wurde zusätzlich das Vorhandensein eines Inserts geprüft. Hierzu wurden Oligonukleotide verwendet, welche die an das Insert grenzende Sequenzen des Vektors erkennen (M13-forward und -revers).

Polymerase-Puffer (Biotherm)	2,5µl
MgCl ₂ (50mM)	1,25µl
Primer (forward&revers 5pmol/µl)	1µl
dNTPs (10mM)	0,5µl
H ₂ O	<u>19,75µl</u>
	25µl
+ Taq-Polymerase (Biotherm)*	0,05µl

* (Biotherm-Polymerase, Genecraft, Lüdinghausen, Germany)

Plasmide, welche ein Insert der richtigen Größe enthielten, wurden anschließend sequenziert (Genterprise, Mainz). Die erhaltenen Sequenzen wurden über einen Datenbank-Vergleich (EMBL) identifiziert.

2.10 „Differenzielle Proteom-Analysen“

„Differenzielle Proteom-Analysen“ wurden von der auf Proteom Untersuchungen spezialisierten Kooperations-Firma Prot@gen (Dortmund, Deutschland) durchgeführt. Isolierte Zellen (aus etwa 20-30 Milzen) wurden in SDS-Lysepuffer lysiert und so zu Prot@gen gesendet. Die Proteinextrakte wurden anschließend in zweidimensionalen Gelelektrophoresen (2D) nach Klose aufgetrennt [25]. Auf präparative Gele wurden bis zu 300µg Protein aufgetragen. 2D-Gele wurden anschließend einer Silberfärbung unterzogen. Interessante differentiell exprimierte Protein-Spots wurden aus den Gelen ausgestantzt und mittels MALDI-

Massenspektrometrie (Ultraflex; Bruker Daltonics) und Datenbankvergleichen (NCBI-protein-database) identifiziert.

2.11 Proteinnachweis

2.11.1 Proteinpräparation

2×10^6 T-Zellen wurden in 100µl SDS-Lysepuffer unter vortexen lysiert und für 3 min auf 100°C erhitzt. Um eine homogene Suspension zu erhalten, wurde das Lysat mehrfach durch eine Kanüle gezogen.

SDS-Lysepuffer:	1	%	SDS
	15	%	Glycerin
	4	M	Harnstoff
	50	mM	Tris pH 6,8

Um die erhaltene Gesamtproteinkonzentration zu ermitteln, wurde der photometrisch auswertbare Proteinnachweis „DC protein assay“ (Biometra, Goettingen, Deutschland) verwendet und nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. In einer anschließenden SDS-PAGE wurden stets gleiche Gesamtproteinmengen der zu vergleichenden Ansätze eingesetzt (max. 30µg pro Geltasche).

2.11.2 Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE) nach Laemmli 1974

Das Wanderungsverhalten von Proteinen im Polyacrylamidgel ist abhängig von ihrer Nettoladung sowie ihrer Form und Größe. Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden die Proteine in Gegenwart des anionischen Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS, sodium dodecyl sulfate) elektrophoretisch aufgetrennt. Das negativ geladene SDS lagert sich dabei in konstantem

Elektrophoresepuffer (10 fach): 30,3 g Tris-base
144 g Glycin
10 g SDS
in 1l Wasser lösen

Acrylamidlösung: wässrige Acrylamid - (30%) / Bisacrylamid -(0,3%)
- Lösung (Rotiphorese Gel30)
(Roth, Karlsruhe, Deutschland)

APS (10%): Ammoniumpersulfat,
Merck (Darmstadt, Deutschland)

TEMED: (N,N,N',N'-Tetramethyldiamin, Sigma)

Für die durchgeführten Polyacrylamid-Gelelektrophoresen wurden 15 %ige Gele verwendet. Die Proteinproben wurden vor dem Auftragen mit Bromphenolblau und beta-Mercaptoethanol (1:200) versetzt und 3 min bei 95°C denaturiert. Die Auftrennung erfolgte bei einer Stromstärke von 10mA.

2.11.3 Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE) mittels Tricine-Gelen

Tricine-Gele ermöglichen eine bessere Auftrennung von kleinen Proteinen. Da im Rahmen dieser Arbeit Proteine eines Molekulargewichtes von etwa 14kD untersucht wurden, wurden für deren Auftrennung Tricine-Gele verwendet.

<u>SDS-PAGE:</u>	Trenngel	Sammelgel
Acrylamid-Lsg.	5ml	0,8ml
Gel-Puffer	5ml	2,5ml
Glycerol	1,5ml	-----
H ₂ O	3,5ml	6,7ml
TEMED	10µl	10µl
APS(10%)	75µl	50µl
Gesamtvolumen	ca.15ml	ca.10ml

Anodenpuffer: 0,2M Tris, pH 8,9

Kathodenpuffer: 0,1M Tris,
 0,1M Tricine,
 0,1% SDS ; pH8,25

Gel-Puffer: 3M Tris,
 0,3% SDS ph 8,45

Acrylamid-Lösung:

- 96g Acrylamid
 - 3g Methylen-Bisacrylamid
- in 200ml dest.H₂O gelöst

2.11.4 Nachweis der Proteine nach Transfer auf eine feste Matrix **(Western-Blot)**

Elektrophoretisch aufgetrennte Proteine können aus einem Trenngel auf eine geeignete Matrix (meist Membranen aus Nitrocellulose oder Nylon) transferiert werden. Die auf der Transfermembran immobilisierten Proteine lassen sich dann z.B mit spezifischen Antikörpern nachweisen.

Beim Elektroblothen im semi-dry-Verfahren werden das Gel und die Nitrocellulosemembran zwischen mehrere Lagen von Filterpapier gelegt, die mit Pufferlösung getränkt sind und dadurch als Ionenreservoir dienen. Die Transferdauer ist abhängig von der Dicke und der Polyacrylamidkonzentration des Gels.

Lösungen:

Blot-Puffer:

5,28	g	Tris
200	ml	Ethanol
2,03	g	Glycin
3,75	ml	10%ige SDS-Lösung
in 1l Wasser lösen		

Block-Puffer Roti-Block (10x)

TBST-Puffer:

20	mM	Tris
500	mM	NaCl
0,05	%	Tween 20
ph 7,5		

Der Proteintransfer wurde bei 120mA für 30 min durchgeführt. Nach dem „Blotten“ wurde die Membran für 45 min bei RT in Blockpuffer geschwenkt und anschließend kurz in TBST gewaschen. Es folgte der Proteinnachweis mittels spezifischer Antikörper:

Primärantikörper:

anti-Galectin-10-IgG (Kaninchen)

Sekundärantikörper:

anti-Kaninchen-IgG (Meerrettichperoxidase-Konjugat)

Der Primärantikörper wurde in einer Konzentration von 0,5µg/ml eingesetzt und für 2h mit der Nitrocellulosemembran inkubiert.

Anschließend wurde der Meerrettichperoxidase-konjugierte sekundäre Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur mit der zuvor in TBST gewaschenen Nitrocellulosemembran inkubiert. Die entsprechenden Proteinbanden wurden durch Chemilumineszenz oder durch DAB nachgewiesen.

2.11.5 Chemilumineszenz Nachweis

Das verwendete Chemilumineszenzsubstrat (Super-Signal-West-Pico chemiluminescent-substrate) wurde von der Firma Pierce (Rockford, USA) bezogen und nach den Anweisungen des Herstellers eingesetzt. Die Western-Blots wurden mit 1ml des Substrates für 30sec inkubiert und anschließend in Frischhaltefolie „eingepackt“. Die Detektion erfolgte mittels des Chemilumineszenz-Imagers ChemiDoc XRS (Bio-Rad, München, Deutschland).

2.11.6 DAB-Nachweis

Die Detektion erfolgte durch 10mg DAB/50mlPBS (Di-amino-benzidin, Sigma, Taufkirchen, Deutschland). Zur Verstärkung der Signale wurden dem in 50ml PBS gelösten DAB 200µl 1M CoCl₂-Lösung, 100µl 1M Imidazol-Lösung und direkt vor Detektion 20µl einer 30%igen H₂O₂-Lösung zugesetzt. Die Lösung wurde (je nach

Stärke der Detektion) 1-2 min mit dem Blot inkubiert. Durch Zugabe von Wasser wurde die Reaktion gestoppt.

2.12 Generierung eines eukaryotischen Galectin-10-Expressionskonstruktes

Zur Generierung eines Galectin-10-Expressionskonstruktes wurde der „offene Leserahmen“ von Galectin-10 mittels RT-PCR aus humanen Tregs amplifiziert (s.Kapitel: PCR). Hierzu wurden Oligonukleotide verwendet, welche Restriktionsschnittstellen für HindIII bzw. EcoRI enthielten (Sequenz s.S.43). Anschließend wurde sowohl das PCR-Produkt wie auch der Leervektor pcDNA3.1 (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) einem Restriktionsenzym-Verdau unterzogen.

Restriktionsenzym-Verdau:

pcDNA3.1 bzw. PCR-Fragment	15µl (=15µg)
10xReactin-buffer2 (Gibco)	5µl
H ₂ O	26µl
EcoRI (Gibco)	2µl (2 Units)
HindIII (Gibco)	2µl (2 Units)

Der Verdau wurde bei 37°C für 4h durchgeführt. Während der letzten Stunde wurde dem Restriktionsenzym-Verdau des Vektors 1µl alkalische Phosphatase zugegeben, um eine Rezirkulation des Vektors zu verhindern.

Nach dem Restriktionsenzym-Verdau des Galectin-10-Amplifikates und des Expressionsvektors wurde Galectin-10 in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA.3.1 kloniert, d.h., der verdaute Vektor und das PCR-Fragment wurden bei 16°C über Nacht ligiert. Als Kontrolle der Rezirkulation des Vektors wurde eine Ligation ohne Insert durchgeführt.

	Ligation	Kontrolle
Vektor	0,6µl (150ng)	0,6µl
Insert	1µl (1µg)	-----
H₂O	15,9µl	16,9µl
Puffer	2µl	2µl
T4-Ligase	0,5µl	0,5µl
Gesamt	20µl	20µl

Anschließend wurden die Plasmide in den *E.coli* Stamm DH5-alpha mittels „heat shock“ bei 42°C für 45sec transfiziert (Durchführung analog zu „Genefishing“). Die transfizierten Bakterien wuchsen für 1/2h in LB-Medium bei 37°C und wurden anschließend auf Agar-Platten mit Ampicillin ausplattiert. Mehrere Klone wurden anschließend einer Plasmid-Präparation unterzogen und durch die Firma Genterprise (Genterprise, Mainz, Deutschland) sequenziert. Nach einem Sequenzvergleich mit der bekannten Galectin-10-Sequenz (aus der Datenbank des NCBI) wurden positiv getestete Plasmide für anschließende Transfektionen von sowohl primären Zellen als auch von Zell-Linien eingesetzt.

2.13 Transfektion von Zellen

Für Transfektionen von primären humanen T-Zellen wurde eine Nukleofektion mittels „Amaya's Human T Cell Nucleofector Kit“ nach den Angaben des Herstellers durchgeführt (Amaya, Köln, Deutschland). 3×10^6 T-Zellen wurden in Nukleofektor-Lösung aufgenommen und mit 2,5µg Plasmid-DNA gemischt. Die Zellen wurden umgehend nukleofektiert und in frischem X-VIVO-15 Medium aufgenommen.

Transfektionen von Jurkat-Zellen wurden ebenfalls mittels „Amaya Nucleofection“ durchgeführt. Transfizierte Zellen wurden anschließend in frischem Testmedium aufgenommen.

Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden die transfizierten Zellen entweder für Cytospin-Präparationen oder Caspase-Assays eingesetzt.

Als Kontrolle der Transfektionen wurden Zellen mit 2,5µg/ml eGFP (enhanced green fluorescence protein) (amaxa) bzw. mit dem Leervektor pcDNA3.1 transfiziert.

2.14 Caspase-3/7-Assay

Zur Bestimmung der Apoptose-Induktion wurden Caspase-3/7-Assays (Apo-ONE homogeneous Caspase-3/7-Assay, Promega, Mannheim, Deutschland) durchgeführt.

Hierzu wurden konventionelle T-Zellen mit 2,5µg des generierten Galectin-10-Expressionskonstruktes bzw. mit dem Leervektor pcDNA.3.1. transfiziert und für 15h kultiviert. Pro Probe wurden 3×10^5 Zellen/well einer 96-well-plate eingesetzt. Die Bestimmung der Caspase-Aktivität wurde nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt - basierend auf der durch Caspasen katalysierten Umsetzung von Z-DEVD-R110* zu Rhodamin-110 und anschließender Fluoreszenz-Messung.

Die Auswertung erfolgte anhand der relativen Fluoreszenz-Intensität mittels eines SpectraFluor readers (TECAM, Crailsheim, Germany).

*Z-DEVD-R110: Rhodamin-110 bis-(N-CBZ-L-aspartyl-L-glutamyl-L-valyl-L-aspartic acid amide)

2.15 Cytospin-Färbung

Cytospin-Präparationen wurden in 4% Paraformaldehyd für 30min fixiert und anschließend mit Saponin für 15min permeabilisiert (alternativ wurden einige Cytospins mittels 0,2% Triton-X-100 permeabilisiert). Anschließend wurden die Präparate für 1h mit 2,5µg/ml des FITC markierten Galectin-10-IgGs in Saponin inkubiert. Nach 20min Waschen in PBS wurden die Cytospin-Präparationen mit „Aqua Poly/Mount Medium“ (Polysciences, Warrington, USA) „eingedeckelt“ und mikroskopisch ausgewertet.

Für parallele Färbungen des Zellkerns wurden 100ng/ml DAPI eingesetzt.

2.16 Generierung eines polyklonalen anti-Galectin-10-Serums

Das zur Immunisierung verwendete humane rekombinante Galectin-10 wurde durch Herstellung eines prokaryotischen Expressionskonstruktes und anschließender, durch IPTG induzierte Expression in *E. coli* (Stamm BL21) gewonnen. Die Generierung des Konstruktes erfolgte prinzipiell wie bereits unter „*Generierung eines eukaryotischen Galectin-10-Expressionskonstruktes*“ beschrieben, mit dem Unterschied, dass hier ein prokaryotischer Expressionsvektor (pET16b) verwendet wurde. Die Herstellung und Anreinigung des rekombinanten Proteins wurde von der Kooperationsfirma Prot@gen durchgeführt.

Durch einen im Expressionsvektor vorhandenen und ebenfalls translatierten „6xHIS-Tag“ wurde das rekombinante Galectin-10 anschließend über Ni-NTA Affinitäts-Chromatographie (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach den Angaben des Herstellers gereinigt.

Zur Generierung der Antikörper wurden zwei Kaninchen parallel immunisiert.

Zur Primärimmunisierung wurden 50µg humanes rekombinantes Galectin-10 (hrGalectin-10) in 500µl CFA (Complete Freund's Adjuvant) aufgenommen, mit 500µl PBS verdünnt und anschließend mit einem Ultrathorax gut vermischt. Die Suspension wurde anschließend in eine 1ml Spritze aufgezogen und den Kaninchen durch mehrere kleine Injektionen entlang des Rückens gespritzt. In zweiwöchigen Abständen wurden den Kaninchen weitere Folge-Immunisierungen mit 50µg hrGalectin-10 in IFA (Incomplete Freund's Adjuvant) injiziert. Vor jeder Immunisierung wie auch vor der Primärimmunisierung wurden den Kaninchen 1-2ml Blut aus der Ohrvene abgenommen und daraus Serum gewonnen. Hierzu wurde das abgenommene Blut ü.N. bei 4°C inkubiert und anschließend bei 400 x g zentrifugiert. Das so gewonnene Serum wurde zur folgenden Titerbestimmung mittels ELISA und zu Tests mittels Western-Blot eingesetzt.

2.17 Titerbestimmung der Kaninchenserum mittels ELISA

Zur Bestimmung der Titer der verschiedenen Seren wurden ELISA durchgeführt. HrGalectin-10 wurde hierzu an eine ELISA-Platte (96-well-plate) gebunden:

- hrGalectin-10 wurde in „Coating-buffer“ auf 5µg/ml eingestellt und 50µl dieser Verdünnung in jedes „well“ einer ELISA-Platte gegeben. – Inkubation für 1h bei 37°C.
- Die ELISA-Platten wurden 3 x mit PBS/Tween gewaschen.
- Zugabe von 50µl/well „Block-Puffer“ für 1/2h bei 37°C.
- Zugabe der zu testenden Seren in einer Verdünnung von 1:1000 in das jeweils erste „well“ einer Reihe.
- Die zu testenden Seren wurden seriell 1:2 bis zum letzten „well“ einer Reihe verdünnt.
- Inkubation für 1½h bei 37°C.
- Die ELISA-Platten wurden 3 x mit PBS/Tween gewaschen.
- Zugabe von 50µl/well des sekundären Antikörpers: anti-Kaninchen-HPO („horse-radish- peroxidase“-Konjugat) in einer Verdünnung von 1:4000. Inkubation für 1/2h bei 37°C.
- Die ELISA-Platten wurden 3 x mit PBS/Tween gewaschen.
- Zugabe von 50µl ABTS*/well (1mg/ml Citratpuffer**) und 30%iger H₂O₂-Lösung in einer Verdünnung von 1:4000 (Sigma, Taufkirchen).

* ABTS:2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (Sigma)

** Citratpuffer: 40mM Citrat + 60mM NaH₂PO₄

Die durchgeführten ELISA wurden anschließend photometrisch bei 480nm ausgewertet. Zur Bestimmung der Titer der jeweiligen Seren wurde die Verdünnungsstufe (X-Achse) gegen die gemessene OD (y-Achse) aufgetragen. In der so entstehenden sigmoidalen Regressionskurve entspricht der Wendepunkt dem Titer des jeweiligen Serums.

(detaillierte Auswertung s. Ergebnisse Abb.15 S.61)

2.18 IgG-Präparation mittels Dialyse

Die IgG-Präparation wurde nach Harboe & Ingild durchgeführt [26].

- Zugabe von 1ml 1M Tris (pH 7,5) zu 10ml Antiserum.
- Tropfenweise Zugabe von 9ml gesättigter $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung (= 100gr. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in 100ml Wasser gelöst).
- Inkubation bei 4°C über Nacht.
- Zentrifugation für 10min bei 12000 x g.
- Der Überstand wurde verworfen und das Sediment mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung gewaschen.
- Wiederholung des Waschschrilles 2x.
- Das Sediment wurde (pro 10ml Antiserum) in 2ml Tris (pH 7,5) bei 4°C gelöst.
- Gelöstes Sediment wurde in Dialyseschlauch (Ausschlussgröße 12kD) gefüllt und gegen Wasser dialysiert.
- Wiederholung der Dialyse gegen PBS.

Die Proteinkonzentration wurde anschließend photometrisch bestimmt:

2.19 „Oregon Green“-Markierung des anti-Galectin-10-IgGs

„Oregon Green“ ist ein FITC-Derivat, dessen Absorptions- und Emissions-Maximum bei 496nm und 524nm liegt. 2mg anti-Galectin-10-IgG wurde mittels des FluoReporter Oregon Green 488 Protein Labeling Kits (Molecular Probes) nach den Angaben des Herstellers markiert.

- 2mg anti-Galectin-10-IgG wurde auf 10mg/ml eingestellt.
- Zugabe von 20µl 1M Natrium-Bicarbonat-Lösung zu 200µl anti-Galectin-10-IgG.
- Zugabe von 7µl „Oregon Green stock-solution“ (10mg/ml in DMSO (Dimethylsulfoxid)). (Die Menge an benötigter „Oregon Green stock-solution“

ist abhängig von Molekulargewicht und Konzentration des zu markierenden Proteins).

- Inkubation für 1h lichtgeschützt bei Raumtemperatur.
- Zugabe von 7µl Hydroxylamine.
- Inkubation für 30min bei Raumtemperatur.

Das markierte IgG wurde anschließend über „spin columns“ einer Ausschlussgröße von 30kD gereinigt (Zentrifugation bei 1100 x g für 5min) und anschließend in PBS verdünnt. Die Konzentration des markierten IgGs wurde photometrisch - unter Beachtung der Korrekturfaktoren für Oregon Green (nach Angaben des Herstellers) - bestimmt.

2.20 mRNA-Nachweis

2.20.1 RNA-Präparation

1 x 10⁶ Zellen wurden in 1ml Trizol (GibcoBRL, Gaithersburg, USA) aufgenommen. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben bei -70°C eingefroren. Die RNA-Präparation mittels Trizol basiert auf einer Phenol/Chloroform Extraktion:

- Zugabe von 200µl Chloroform.
- 5min Inkubation bei Raumtemperatur.
- Zentrifugation bei 11000 x g für 10 min.
- Überführung der oberen wässrigen Phase in ein frisches 1,5ml Gefäß.
- Zugabe von 1µl Glycogen.
- 5min Inkubation bei Raumtemperatur.
- Zugabe von 500µl Isopropanol.
- 10min Inkubation bei Raumtemperatur.
- Zentrifugation bei 10000 x g für 10min.
- Abgießen des Alkohols.
- Waschen des Pellets mit 70%igem EtOH (2x).
- Zentrifugation bei 7000 x g für 10min.
- Reverse Transkription der sedimentierten RNA.

2.20.2 Reverse Transkription (RT)

Die präparierte RNA wurde einer reversen Transkription unterzogen und somit in cDNA umgeschrieben.

Die RT wurde mittels Oligo(dT)_n – Primern und Hexanucleotiden durchgeführt. Die Oligo(dT)_n – Primer binden bei diesem Verfahren an den Poly(A)-Schwanz des mRNA-Moleküls, wohingegen die Hexanucleotide statistisch und zufällig auf dem mRNA-Molekül binden und als Primer für die reverse Transkriptase M-MLV (MBI, Fermentas, St.Leon-Rot, Deutschland) dienen.

Zur sedimentierten RNA wurden folgende Reagenzien zugegeben:

2	µl	dNTP (10mM)
3	µl	5 x Puffer
1	µl	Oligo(dT) _n (100ng/µl)
1	µl	dN6 (20ng/µl)
7	µl	H ₂ O

Diese Mischung wurde 3min auf 65°C erhitzt.

Anschließend wurde 1µl der reversen Transkriptase M-MLV (1 Unit) zugegeben und der Ansatz für eine Stunde bei 42°C im Wasserbad inkubiert.

2.21 PCR (Polymerase-chain-reaction)

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sowohl konventionelle als auch Real-Time-PCR-Analysen durchgeführt. Real-Time PCRs werden im Folgenden mit qRT-PCR (quantitative reverse transcription-PCR) bezeichnet.

2.21.1 konventionelle PCR

Die jeweiligen cDNAs wurden 1:5 verdünnt und in einer PCR eingesetzt:

cDNA	5	µl
10 x Puffer	2,5	µl
dNTP [10 mM]	0,5	µl
Primerpaar [10pmol/µl]	0,5	µl
MgCl ₂ [25 mM]	2,5	µl
H ₂ O	14	µl
Polymerase [0,25U]*	0,1	µl

* Biotherm DNA Polymerase (GeneCraft, Lüdingshausen, Deutschland)

PCR-Temperaturprofil:

	Temperatur	Zeit
Denaturierung	94°C	30 sec
Annealing	Je nach Primer 50°-60°C	30 sec
Elongation	72°C	60 sec

2.21.2 qRT- PCR (quantitative reverse transcription – PCR)

Quantitative PCR-Experimente wurden mit einem i-Cycler der Firma Biorad (Biorad, München, Deutschland) und dem IQ SYBR Green Supermix Kit (Biorad) durchgeführt. Für fast alle eingesetzten Oligonukleotide wurde eine „annealing-Temperatur“ von 57°C verwendet (40 PCR-Zyklen).

Die Auswertung quantitativer PCR Experimente erfolgte durch den Abgleich auf das Haushaltsgen EF-1-alpha (human), HGPRT (murin) oder beta-actin (human).

2.21.3 Eingesetzte Oligonukleotide

Um zu vermeiden, dass genomische DNA amplifiziert wird, wurden die folgenden Primersequenzen über eine Intron/Exon Grenze gelegt:

hGalectin-10 forward	: 5'-TAC CCG TGC CAT ACA CAG AGG CTG-3'
hGalectin-10 reverse	: 5'-CTT ATC TGG CAG CAC TGA GAT GCT C-3'
EF1-alpha forward	: 5'-GAT TAC AGG GAC ATC TCA GGC TG-3'
EF1-alpha reverse	: 5'-TAT CTC TTC TGG CTG TAG GGT GG-3'
β-Actin forward	: 5'-GAG CGG GAA ATC GTG CGT GAC ATT-3'
β-Actin reverse	: 5'-GAA GGT AGT TTC GTG GAT GCC-3'
Pur-alpha forward	: 5'- TCT CAT CGA GTT CCG TGA CGC TC -3'
Pur-alpha reverse	: 5'- CTC CTC GGA GTA CTT GCA GAA GG -3'
HGPRT forward	: 5'- GTT GGA TAC AGG CCA GAC TTT GTT -3'
HGPRT reverse	: 5'- GAG GGT AGG CTG GCC TAT AGG CT -3'
Galectin-10-Klonierungsprimer forward:	
5'- GAC TAA GCT TCC AGA AGG AGA CAA CAA TGT CC -3'	
Galectin-10-Klonierungsprimer reverse:	
5'- TCA GGA ATT CGC AAC ATG AAG TCT GGT TAT CTC -3'	

pcDNA3.1 Sequenzierungsprimer forward:
5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GAC C -3'
pcDNA3.1 Sequenzierungsprimer reverse:
5'- TAG AAG GCA CAG TCG AGG CTG -3'

III Ergebnisse

Da regulatorischen T-Zellen (Tregs) essentielle Funktionen im Rahmen von Autoimmunität, allergischen Erkrankungen und anti-Tumor-Immunantworten zukommen, sind die an der Suppression beteiligten Mechanismen und Moleküle von großem therapeutischem Interesse.

Zahlreiche Untersuchungen beschäftigten sich bereits mit der Identifizierung von präferentiell in Tregs, bzw. in supprimierten (Tsups) T-Zellen exprimierten Molekülen. Trotz aller Bemühungen ist der Transkriptionsfaktor FoxP3 aber bislang der einzige anerkannte Treg-Marker.

Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit sowohl Tregs als auch Tsups auf präferentiell exprimierte Moleküle untersucht. Unter therapeutischen Gesichtspunkten sind - neben Tregs – auch Tsups von besonderem Interesse, da anhand dieser Zellen die Suppressormechanismen genauer analysiert werden können.

Zur Identifizierung von präferentiell in Tregs exprimierten Proteinen wurden „differentielle Proteomanalysen“ und – zur Identifizierung von präferentiell in Tsups exprimierten mRNA-Molekülen - „differential display-Analysen“ durchgeführt.

3.1 FACS-Analyse muriner Tregs

Tregs - wie auch konventionelle - T-Zellen wurden mittels „magnetic activated cell separation“ (MACS) über CD25 bzw CD4 isoliert.

Sowohl für „Proteom“- als auch für „differential display-Analysen“ werden möglichst saubere Zell-Populationen benötigt. Deshalb wurden die isolierten Zell-Populationen sowohl auf ihre Reinheit mittels FACS als auch auf ihre Funktionalität untersucht. Abb.5 zeigt FACS-Analysen isolierter und gereinigter muriner Tregs.

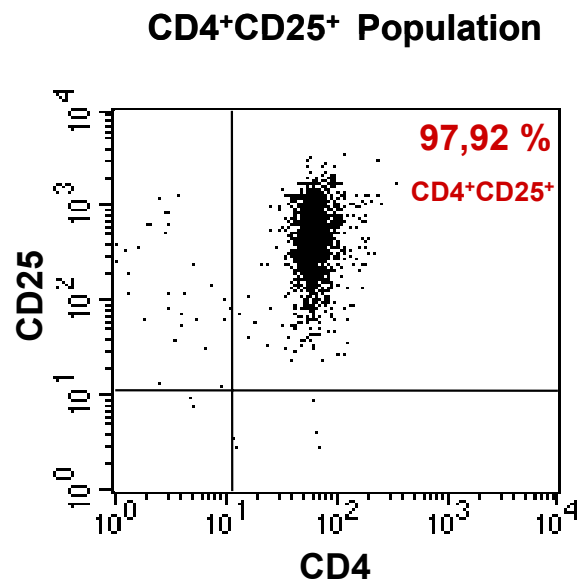


Abb.5: FACS-Analyse isolierter und gereinigter Tregs

Murine Tregs wurden in FACS-Analysen auf ihre Reinheit getestet. Die Zell-Populationen wurden mit anti-CD4-FITC und anti-CD25-PE-Antikörpern gefärbt. Die Reinheit betrug routinemäßig über 97%.

Treg-Populationen, deren Reinheit > 97 % betrug, wurden anschließend auf ihre Funktionalität untersucht.

3.2 Funktionalität muriner Tregs

Charakteristische Merkmale von Tregs sind zum einen der hypoproliferative Phänotyp nach Aktivierung und zum anderen ihre suppressive Aktivität auf konventionelle T-Zellen. In dem in Abb.6 dargestellten Proliferations-Test ist sowohl die Proliferation von Tregs und konventionellen T-Zellen allein als auch in Kokultur-Experimenten dargestellt. Die Proliferation wurde anhand der in die DNA eingebauten Menge an radioaktivem Thymidin bestimmt (s.M&M S.21).

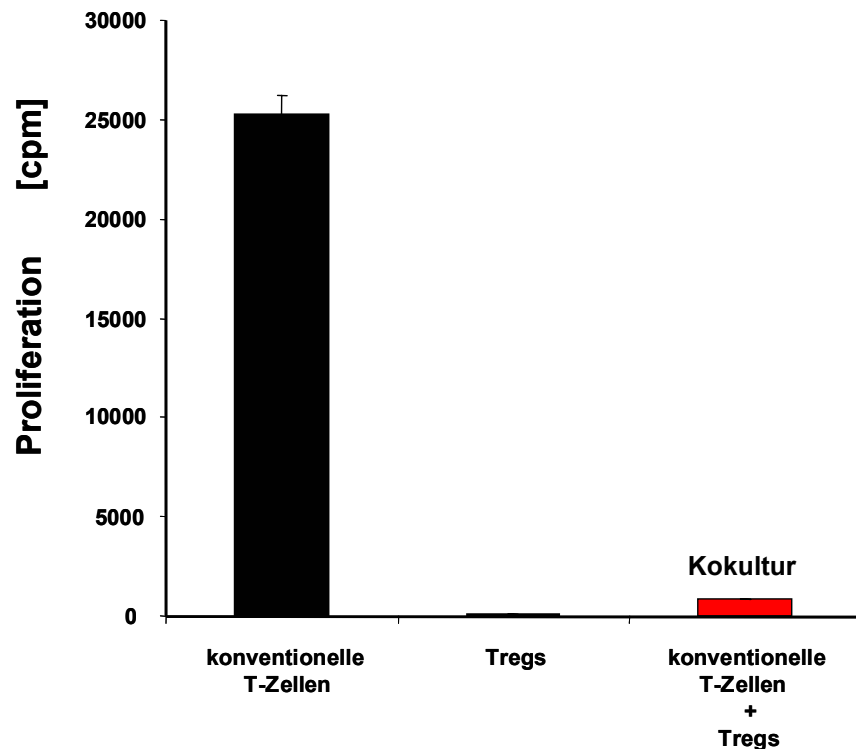


Abb.6: Suppression konventioneller T-Zellen durch Tregs

Durch den Einbau radioaktiven Thymidins während der Zellteilung wurde die relative Proliferation konventioneller T-Zellen (2×10^5 /well) und Tregs (2×10^5 /well) bestimmt. Rechts (roter Balken) ist die Proliferation konventioneller T-Zellen dargestellt, welche mit Tregs im Verhältnis 1:1 (je 2×10^5 /well) kokultiviert wurden.

Die Proliferation von Tregs ist im Vergleich zu konventionellen T-Zellen kaum darstellbar. Wurden konventionelle T-Zellen mit Tregs kokultiviert, so wurde ebenfalls eine stark reduzierte Proliferation gemessen (3,5% der Proliferation konventioneller T-Zellen).

Tregs, welche auf ihre Reinheit und suppressiven Eigenschaften wie oben beschrieben getestet worden waren, wurden anschließend für weiterführende „differential display-Analysen“ bzw. für „differentielle Proteom-Analysen“ eingesetzt.

3.3 Isolierung supprimierter muriner T-Zellen

Zur weiterführenden „differential display-Analyse“ von Tsups wurden konventionelle T-Zellen mit CFSE markiert und mit Tregs bzw. als Referenz mit konventionellen T-

Zellen für 3 Tage kokultiviert. Anschließend wurden die CFSE-markierten Zellen mittels FACS-Sort isoliert und für RNA-Präparationen verwendet. Abb.7 zeigt die durch FACS – Analyse dargestellte Proliferation der CFSE-markierten Zellen, basierend auf der Halbierung der CFSE-Konzentration in den sich teilenden T-Zellen nach jeder Zellteilung.

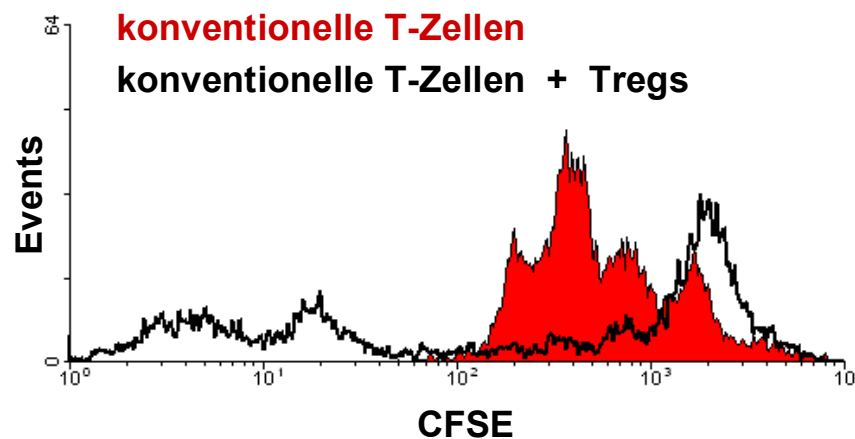


Abb.7: Suppression konventioneller CFSE-markierter T-Zellen

Murine, CFSE-markierte konventionelle T-Zellen wurden mit Tregs bzw. konventionellen T-Zellen im Verhältnis 1:1 kokultiviert. Dargestellt ist in rot die Proliferation „nicht supprimierter“ T-Zellen und in schwarz die Proliferation von supprimierten T-Zellen. CFSE-markierte T-Zellen wurden anschließend mittels FACS-Sort isoliert.

Abb.7 stellt die Proliferation von konventionellen T-Zellen nach Suppression durch Tregs verglichen mit „nicht supprimierten“ T-Zellen dar. Tsups aus Kokultorexperimenten mit Tregs (schwarz) zeigen eine kaum darstellbare Proliferation, wohingegen konventionelle T-Zellen ohne Tregs (rot) eine starke, durch CFSE deutlich darstellbare Zellteilung aufweisen. Die im linken Bereich des Diagramms (10^0 - 10^2) dargestellten Zellen (Events) sind die ungefärbten kokultivierten Tregs. Zusätzlich zu dem in Abb.6 dargestellten ^3H -Proliferationstest bestätigen diese Daten die Qualität und Funktionalität der angereinigten murinen Tregs.

3.4 „Genefishing“ („differential display“)

Die CFSE-markierten konventionellen T-Zellen (supprimiert und nicht supprimiert) wurden mittels FACS-Sort isoliert und für „differential display“- Untersuchungen einer DNase-Behandlung und anschließender RNA-Präparation unterzogen. 0,25µg der gereinigten RNA-Präparationen von Tsups bzw. „nicht supprimierten“ T-Zellen wurden mittels „Genefishing“ („differential display“) auf präferentiell in Tsups exprimierte mRNAs untersucht. Dieses Verfahren ist schematisch in Abb.8 dargestellt.

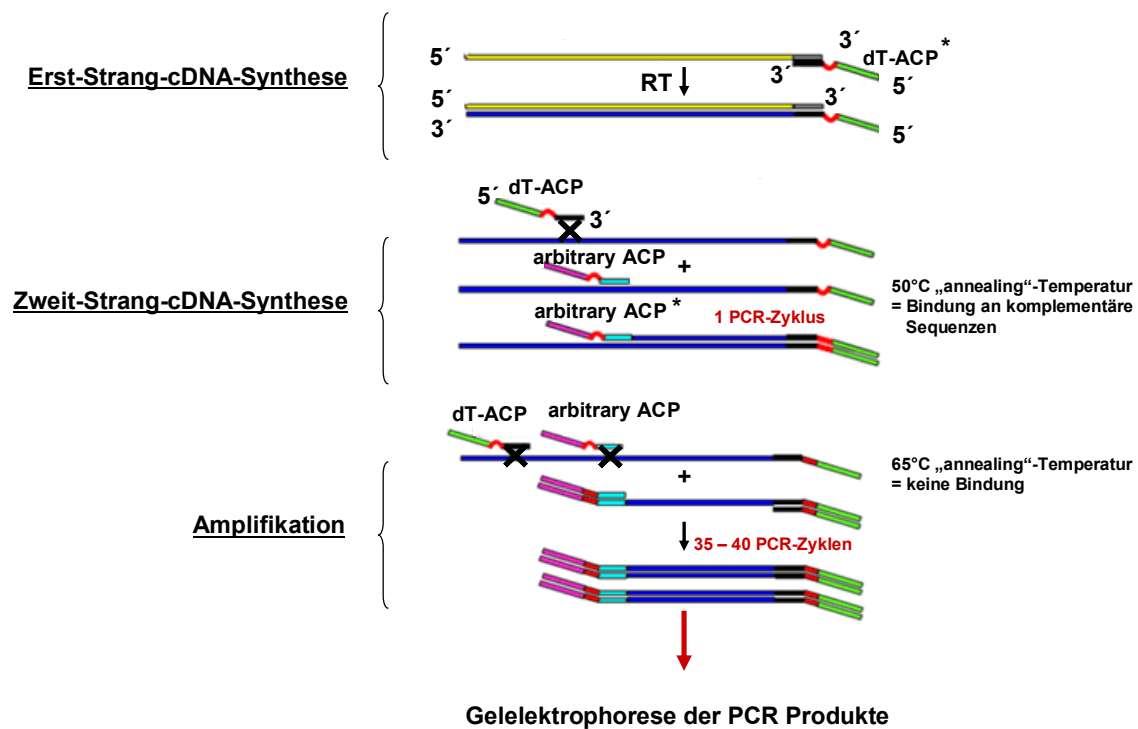


Abb.8: „Genefishing“-Schema

Mit Hilfe eines dT-Primers (dT-ACP1 = komplementär zu poly-AAA der mRNA) wird die Erst-Strang-cDNA Synthese von mRNA-Präparationen der zu untersuchenden Zell-Populationen durchgeführt. Anschließend wird durch eine PCR-Reaktion der Zweit-Strang mittels verschiedener 10-Basen-Primer (arbitrary ACP) und des dT-ACP2-Primers (komplementär zu dT-ACP1) synthetisiert. Durch Adaptoren, welche an die eingesetzten Oligonukleotiden gekoppelt sind, werden die entstandenen doppelsträngigen cDNAs amplifiziert und mittels Agarosegelelektrophorese die Bandenexpressionsmuster verschiedener Zell-Populationen verglichen (Details s.M&M S.22).

*ACP = „Annealing Control Primer“

„Genefishing“ basiert auf der Verwendung von Oligonukleotiden („arbitrary ACP“), welche an zuvor generierter Einzelstrang-cDNA mit einer zufälligen 10-Basen-Sequenz binden und somit eine folgende PCR-Amplifikation ermöglichen (detail. S.M+M). Diesem „Genefishing“-Verfahren stehen dabei 120 verschiedene Oligonukleotide zur Verfügung. Durch den Aufbau dieses Verfahrens wird deutlich, dass nicht die gesamte Bandbreite an RNA-Expression abgedeckt werden kann. Dennoch wurde aufgrund der relativ geringen RNA-Menge, welche für dieses Verfahren nötig ist, dieser Ansatz gewählt, da die Konzentration an RNA von Tsups einen stark limitierenden Faktor darstellt. Abb.9 stellt eine Übersicht eines Agarosegels mit PCR-Bandenmustern von Tsups und „nicht supprimierten“ T-Zellen dar.

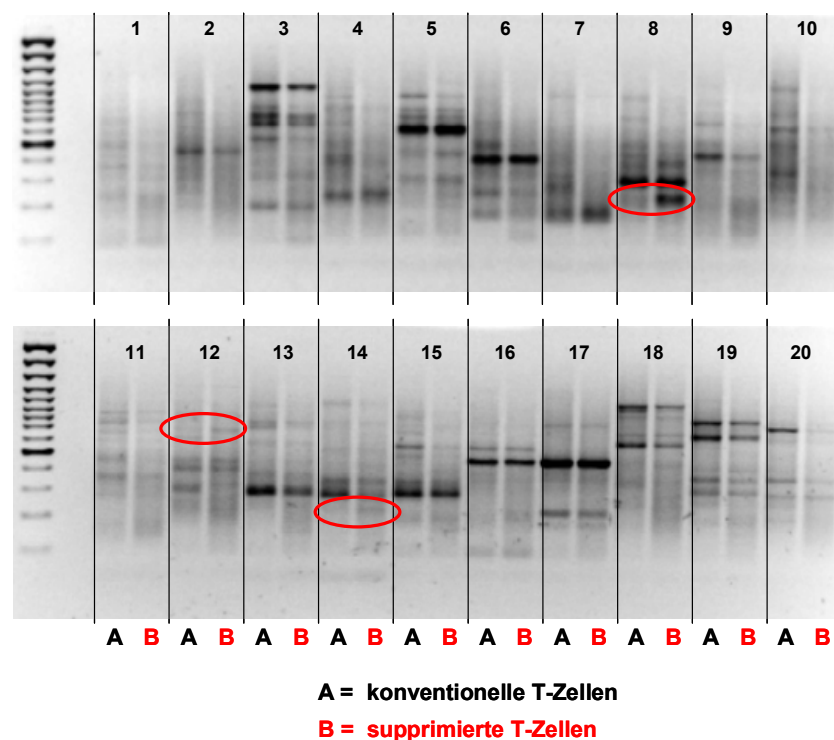


Abb.9: Agarosegel nach „Genefishing“

Sowohl Tsups als auch „nicht supprimierte“ T-Zellen wurden isoliert, DNase behandelt und nach RNA-Präparation einer „differential display“-PCR unterzogen. Dargestellt sind exemplarisch die Bandenexpressionen nach Amplifikation mit 20 verschiedenen Oligonukleotiden des „Genefishing“-Verfahrens. Rot umrandet sind in Tsups präferentiell auftretende Banden.

Abb.9 zeigt ein Agarosegel mit den Bandenexpressionsmustern von Tsups sowie „nicht supprimierter“ T-Zellen nach PCR. Durch das verwendete „Genefishing“-Verfahren entsteht für jedes eingesetzte Deca-Oligonukleotid ein spezifisches Bandenmuster. Dargestellt sind exemplarisch die Bandenmuster der ersten 20 von 120 Oligonukleotiden. Rot umrandet dargestellt sind Moleküle, deren Bandenintensität auf eine mehr oder weniger stark präferentielle Expression in Tsups hindeutet (Die Agarosegele der PCR-Produkte der weiteren 100 Deca-Oligonukleotide sind nicht abgebildet. Auch dort traten - vergleichbar zu Abb.9 - in Tsups präferentielle Banden auf.).

Präferentiell in Tsups auftretende Banden wurden anschließend aus den Gelen eluiert und nach Klonierung in den Vektor pGEM-Teasy sequenziert. Die den Sequenzen entsprechenden mRNA-Moleküle wurden anschließend über einen Daten-Bank-Vergleich identifiziert.

3.5 Identifizierung von Pur-alpha

Zur Bestätigung einer präferentiellen Expression in Tsups wurden die identifizierten mRNA-Moleküle mittels spezifischer Oligonukleotide in quantitativen-PCR-Analysen (qRT-PCR = quantitative „Reverse Transcription“ -PCR) auf ihre Expression in mehreren unabhängigen Experimenten getestet.

Lediglich einem der potentiellen Kandidaten konnte in allen eingesetzten RNA-Präparationen eine reproduzierbare präferentielle mRNA-Expression in Tsups nachgewiesen werden: Pur-alpha. Abb.10 stellt die präferentielle Pur-alpha-mRNA-Expression in Tsups anhand qRT-PCR Analysen dar.

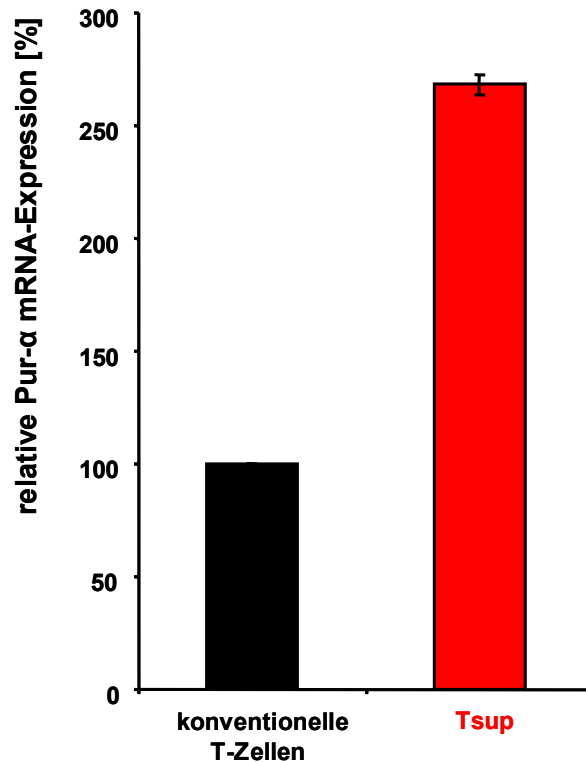


Abb.10: Präferentielle Pur-alpha-mRNA-Expression in Tsups

Sowohl von Tsups als auch von „nicht supprimierten“ T-Zellen wurde RNA isoliert. Nach reverser Transkription wurde eine qRT-PCR mit Pur-alpha spezifischen Primern durchgeführt. Die relative mRNA-Expression wurde anhand des Haushaltsgens HGPRT normalisiert und die mRNA-Expression „nicht supprimierter“ T-Zellen gleich 100% gesetzt.

Der ermittelte Faktor der präferentiellen mRNA-Expression in Tsups betrug gemittelt aus 3 unabhängigen Experimenten 2,7. Da es sich bei Pur-alpha um einen Transkriptionsfaktor handelt, ist eine mögliche Beteiligung dieses Moleküls an der Suppression konventioneller T-Zellen trotz der geringen präferentiellen Expression in Tsups nicht unwahrscheinlich und wird in weiteren, über diese Arbeit hinausgehenden Experimenten untersucht werden.

3.6 „differentielle Proteom-Analyse“

Parallel zu den mRNA-Expressions-Analysen wurde das Proteom von murinen und humanen Tregs untersucht.

Da zur Identifizierung präferentiell in Tregs exprimierter Moleküle die Zellzahl bei weitem nicht so stark limitierend ist, wie es für Tsups der Fall ist, wurde hierzu ein umfangreicherer Versuchsansatz in Kooperation mit der Firma Prot@gen gewählt. Hierzu wurden die isolierten T-Zellen (s.Abb.5, 6 und 7) lysiert und anschließend von der Firma Prot@gen (Dortmund) einer „differentiellen Proteom-Analyse“ in Kombination mit MALDI-Massenspektrometrie unterzogen.

Protein-Extrakte der verschiedenen T-Zell-Populationen wurden zum einen nach ihrem Molekulargewicht (MW) und zum anderen nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI) aufgetrennt. Durch dieses Verfahren entsteht für jede Zell-Population ein charakteristisches Proteinexpressionsmuster. Interessante, differentiell exprimierte Spots können anschließend aus den Gelen ausgestanzt und mittels MALDI-Massenspektrometrie identifiziert werden. In der folgenden Abb.11 ist exemplarisch eine 2D-Gelelektrophorese von Extrakten muriner Tregs in einer Übersicht dargestellt.

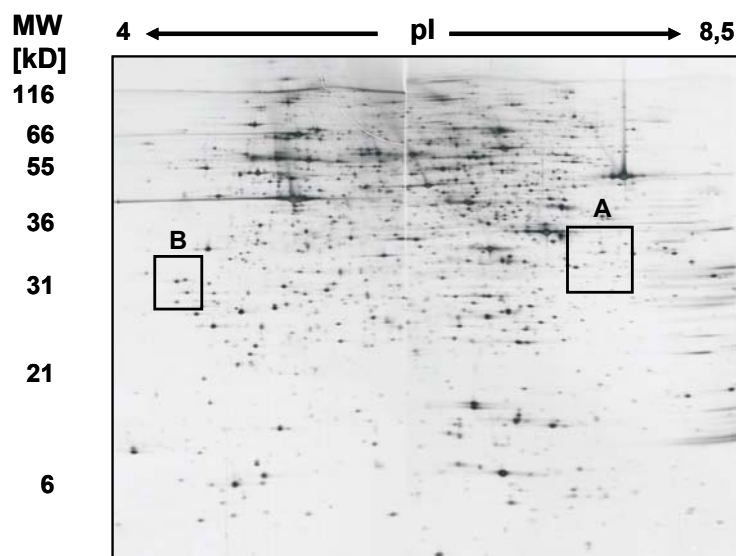


Abb.11: Proteinexpressionsmuster muriner Treg-Extrakte nach 2D-PAGE

Mittels einer 2D-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese wurden Proteinextrakte von aktivierten murinen Tregs (s.M&M S.20) nach ihrem Molekulargewicht und ihrem isoelektrischen Punkt aufgetrennt. Das so entstandene, für murine Tregs charakteristische Expressionsmuster wurde anschließend durch eine „Silber-Färbung“ dargestellt. Die mit A und B markierten Bereiche sind in Abb.12 detaillierter - und mit den Gelausschnitten konventioneller T-Zellen vergleichend - dargestellt.

In der in Abb.11 dargestellten Übersichts-2D-Gelelektrophorese wurden Proteine aus murinen Tregs nach ihrem Molekulargewicht (MW) und isoelektrischen Punkt (pI) aufgetrennt.

Um vergleichende Aussagen über die Protein-Expression verschiedener Zell-Populationen treffen zu können, werden in den folgenden Abbildungen detailliertere Ausschnitte aus solchen Gesamt-Gelen dargestellt (Detailausschnitte A und B).

3.7 Ausschnitte präferentiell in murinen Tregs exprimierter Spots

In der folgenden Abbildung sind exemplarisch zwei präferentiell in murinen Tregs exprimierte Spots dargestellt.

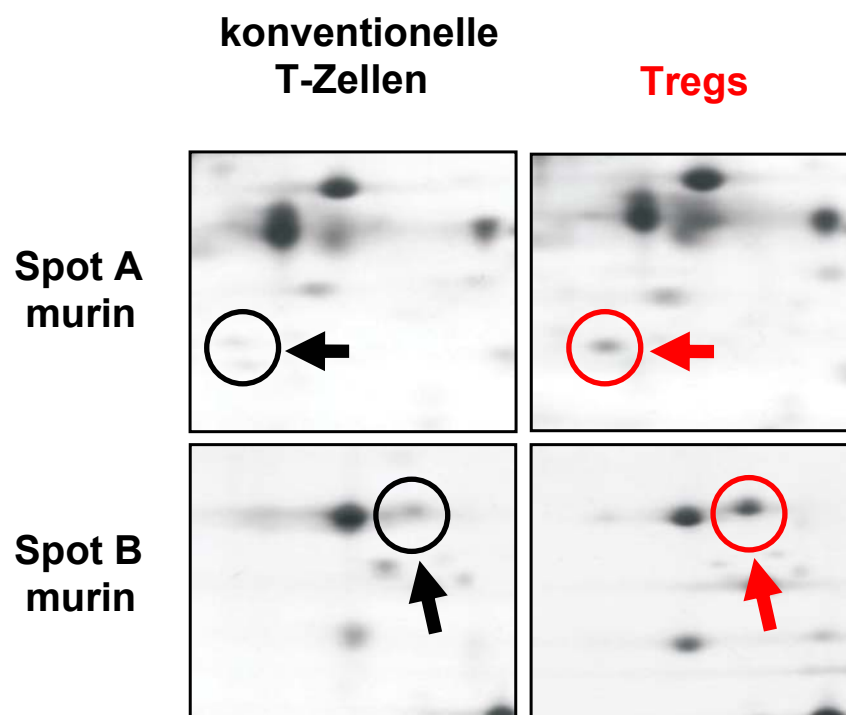


Abb.12: Protein-Spot-Intensitätsvergleich muriner T-Zellen

Die Proteinexpressionsmuster aktivierter konventioneller T-Zellen sowie muriner Tregs wurden verglichen. Dargestellt sind ausgewählte 2D-PAGE-Ausschnitte, in welchen deutlich präferentiell in Tregs exprimierte Proteine identifiziert werden konnten.

Zur Bestätigung der Ergebnisse wurden mehrere Zell-Präparationen ($n > 3$) unabhängig voneinander in Proteom-Analysen untersucht. Die in Tab.1 dargestellten Proteine erwiesen sich in allen Präparationen als präferentiell in Tregs exprimiert. Exemplarisch sind in der folgenden Tabelle einige der am stärksten präferentiell in aktivierten oder ruhenden Tregs exprimierten Proteine dargestellt.

Verstärkt in aktivierten murinen Tregs exprimierte Proteine		
Name	NCBI	Faktor
<u>L-chain Ferritin</u>	<u>Acc.No.13787175</u>	<u>3,7</u>
<u>Annexin A11</u>	<u>Acc.No.15277556</u>	<u>2,8</u>
<u>Galectin 1</u>	<u>Acc.No.6678682</u>	<u>2,8</u>
<u>Annexin A6</u>	<u>Acc.No.25071858</u>	<u>2,4</u>

Tab.1 : Verstärkt in murinen Tregs exprimierte Proteine

Die Proteinexpressionsmuster muriner konventioneller T-Zellen sowie muriner Tregs wurden verglichen. Dargestellt sind ausgewählte präferentiell in murinen Tregs exprimierte Proteine.

Die präferentielle Expression von Galectin-1 in murinen Tregs bestätigt bereits veröffentlichte „microarray“-Daten [10] und somit die Methodik der „differentiellen Proteom-Analyse“. Das am stärksten präferentiell in murinen Tregs exprimierte Molekül konnte mit einem Faktor von 3,7 als L-chain Ferritin identifiziert werden. Dass keine weiteren Marker muriner Tregs wie z.B. CD25 oder FoxP3 identifiziert wurden, ist dadurch zu erklären, dass zur Proteom-Analyse cytosolische Extrakte verwendet wurden und somit weder CD25 als Oberflächenmolekül noch FoxP3 als Transkriptionsfaktor zu erwarten waren.

In den parallel durchgeführten 2D-Gelelektrophoresen humaner Treg-Extrakte konnte allerdings ein Spot identifiziert werden, welcher sich in seiner präferentiellen Expression in Tregs von allen anderen humanen und murinen Spots stark abhob. Die Identifizierung und Analyse dieses Proteins hatte deshalb absolute Priorität, so dass sich alle nachfolgenden Untersuchungen auf dieses Protein konzentrierten.

3.8 Ausschnitte präferentiell in humanen Tregs exprimierter Spots

Abb.13 stellt dieses Protein als präferentiellen Spot in einer 2D-Gelelektrophorese humaner Treg-Extrakte dar.

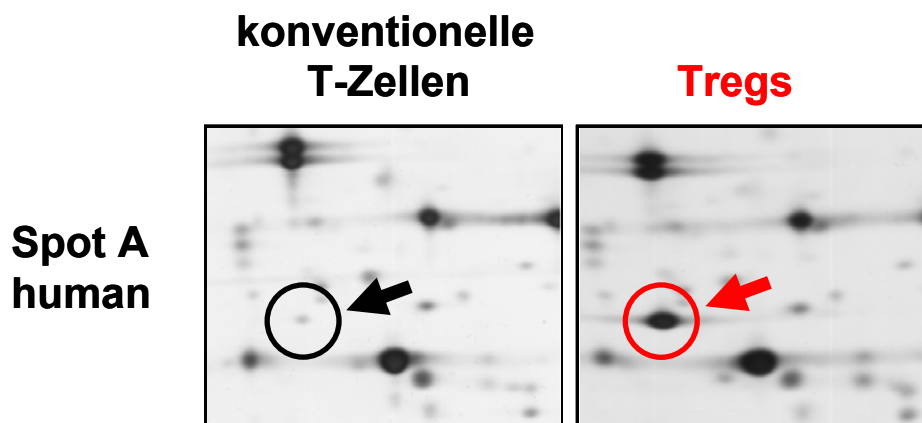


Abb.13: Protein-Spot-Intensitätsvergleich humaner T-Zellen

Die Proteinexpressionsmuster humaner konventioneller T-Zellen sowie humaner Tregs wurden verglichen. Dargestellt ist der am stärksten präferentiell in humanen Tregs exprimierte Spot.

Die gemittelte Spot-Intensität für das in Abb.13 dargestellte Protein aus 2D-Gelen von drei unabhängigen Spendern ergab eine 42-fach stärkere Expression in humanen Tregs verglichen mit konventionellen T-Zellen.

3.9 Identifizierung von Galectin-10

Der in Abb.13 dargestellte Spot A konnte massenspektrometrisch als Galectin-10 identifiziert werden (Dr.Petra Lutter, Firma Prot@gen). Als Mitglied der Galectin-Familie stellt Galectin-10 auch hinsichtlich einer potentiellen Beteiligung an suppressiven Mechanismen ein sehr interessantes Protein dar: Zum einen konnte anderen Galectinen bereits eine immunsuppressorische Wirkung nachgewiesen werden (s.Diskussion) und zum anderen konnte sowohl im Rahmen dieser Arbeit

(s.Tab.1) als auch durch McHugh et al. murines Galectin-1 als präferentiell in Tregs exprimiertes Molekül identifiziert werden [10].

Um in ersten Experimenten die Daten aus den „differentiellen Proteom-Analysen“ zu bestätigen, wurden RNA-Präparationen von Tregs und konventionellen T-Zellen einer Galectin-10 spezifischen RT-PCR unterzogen.

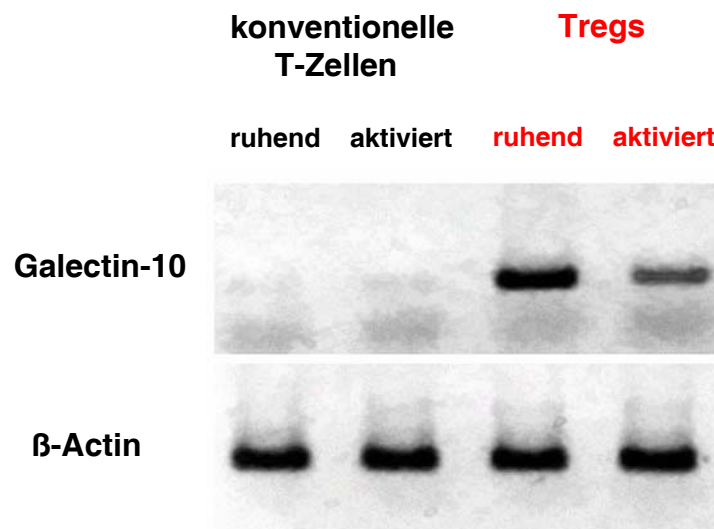


Abb.14: Präferentielle Galectin-10-mRNA-Expression in humanen Tregs

Sowohl ruhende als auch aktivierte humane konventionelle T-Zellen (s.M&M S.20) sowie humane Tregs wurden nach RNA-Präparation und reverser Transkription einer PCR mit Galectin-10 spezifischen Primern unterzogen. Aktivierte Zellen wurden für 48h mit 1µg/ml anti-CD3 und 2µg/ml anti-CD28 stimuliert. Als Kontrolle diente das „Haushaltsgen“ beta-Actin.

Abb.14 bestätigt auf mRNA-Ebene die Ergebnisse der präferentiellen Galectin-10-Protein-Expression in humanen Tregs. Konventionelle T-Zellen zeigen hier keine bzw. eine minimale, an der Nachweisgrenze liegende Galectin-10-mRNA-Expression. Im Gegensatz dazu ist die Expression der Galectin-10-mRNA in ruhenden Tregs sehr stark und nimmt mit Aktivierung der Zellen ab.

3.10 Quantifizierung der Galectin-10-mRNA-Expression in Tregs

Um eine Quantifizierung der mRNA-Daten zu ermöglichen, wurde anschließend eine qRT-PCR durchgeführt.

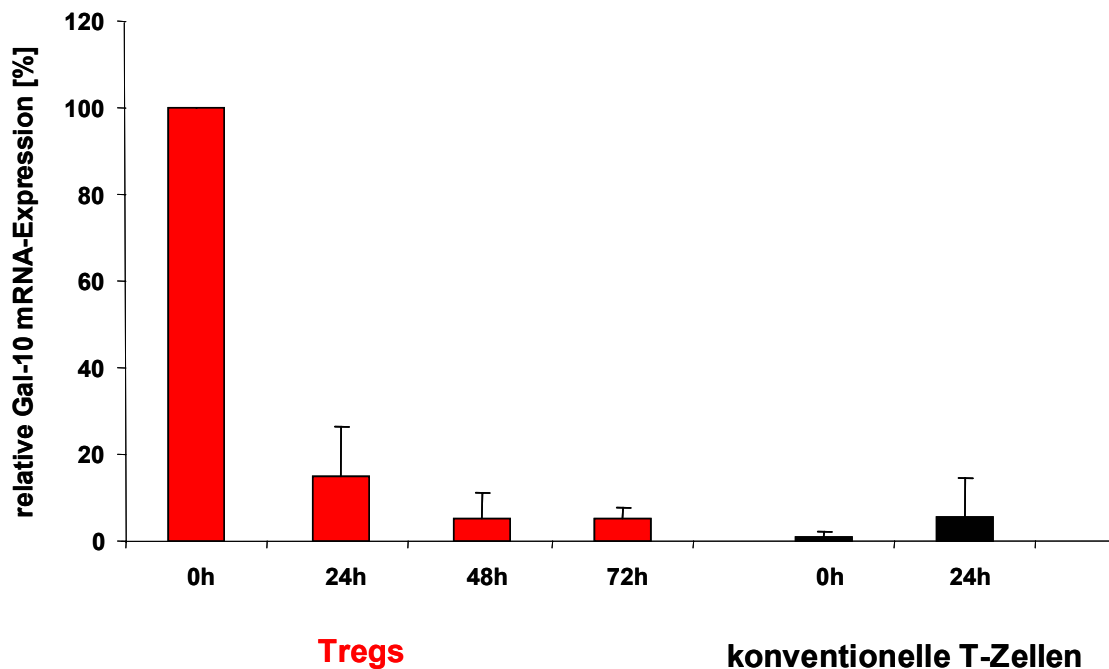


Abb.15: Präferentielle, mit Aktivierung abnehmende Galectin-10-mRNA-Expression in Tregs

Sowohl ruhende als auch aktivierte humane konventionelle T-Zellen sowie humane Tregs wurden nach RNA-Präparation und reverser Transkription einer qRT-PCR mit Galectin-10 spezifischen Primern unterzogen. Aktivierte Zellen wurden für 24h, 48h bzw 72h mit 1µg/ml anti-CD3 und 2µg/ml anti-CD28 stimuliert. Die relative mRNA-Expression wurde anhand des Haushaltsgens EF1-alpha (Elongations-Faktor1-alpha) normalisiert und die mRNA-Expression ruhender Tregs (0h) gleich 100% gesetzt.

Abb.15 zeigt die Daten einer quantitativen Galectin-10 spezifischen PCR. Die Auswertung erfolgte durch Normalisierung der Galectin-10-mRNA-Expression auf das Haushaltsgen EF1-alpha. Dargestellt ist die Galectin-10-mRNA-Expression der jeweiligen T-Zell-Populationen in Prozent, wobei die mRNA-Expression von ruhenden Tregs „100%“ gesetzt wurde.

Es ist die gemittelte relative mRNA-Expression aus 3 unabhängigen Experimenten dargestellt.

Diese war in ruhenden (0h) Tregs 300fach stärker als in ruhenden (0h) konventionellen T-Zellen. Einige weitere Experimente konnten quantitativ nicht ausgewertet werden, da in konventionellen T-Zellen keine Galectin-10-mRNA nachgewiesen werden konnte.

Mit den quantitativen PCR-Experimenten wird sowohl die präferentielle wie auch die, mit Aktivierung abnehmende mRNA-Expression von Galectin-10 in humanen Tregs bestätigt. Nach 48h – 72h erreicht die Galectin-10-mRNA-Expression von Tregs annähernd das Niveau von ruhenden konventionellen T-Zellen.

Da die präferentielle Expression von Galectin-10 in humanen Tregs auf mRNA-Ebene bestätigt werden konnte, wurde die Frage aufgeworfen:

Existiert Galectin-10 oder ein anderes präferentiell in Tregs exprimiertes Galectin auch im murinen System?

3.11 Untersuchung muriner Galectine

Die in der Literatur beschriebene [10] schwach präferentielle Expression von Galectin-1 in murinen Tregs konnte bereits in den dargestellten Proteom-Analysen bestätigt werden (Faktor 2,8).

Es wurde beschrieben, dass Galectin-10 in der Maus nicht exprimiert wird [27;28]. Allerdings wird in einer anderen Arbeit eine 200bp Sequenz genomischer Maus-DNA für Galectin-10 erwähnt. Daher wurden für den Nachweis von möglichem murinen Galectin-10 sowohl die funktionellen humanen Primer als auch neu synthetisierte murine Primer eingesetzt: Galectin-10 konnte in murinen Treg-mRNA-Präparationen nicht nachgewiesen werden.

Murines Galectin-4 und -6 werden in der Literatur als mögliche Analoga von humanem Galectin-10 beschrieben. Allerdings konnte weder für Galectin-4 oder -6 noch für ein anderes Galectin eine vergleichbare differentielle mRNA-Expression im murinen System gezeigt werden (Daten nicht gezeigt), so dass sich weitere Untersuchungen zur Galectin-Expression auf humane Zellen beschränkten.

Zur näheren Charakterisierung der Galectin-10-Expression in humanen Tregs - auch über die mRNA-Ebene hinaus - war es nötig, Antikörper gegen Galectin-10 zu generieren.

3.12 Generierung eines polyklonalen Galectin-10-Antiserums

Zur Herstellung eines Galectin-10-Antiserums wurde Galectin-10 aus humanen Treg-Extrakten mittels PCR amplifiziert, in einen prokaryontischen Expressionsvektor eingefügt und in Bakterien überexprimiert (s.M&M S.37). Dieses humane rekombinante Galectin-10 (hrGal-10) wurde zur Immunisierung von Kaninchen verwendet. Abb.16 stellt das Immunisierungsschema dar.

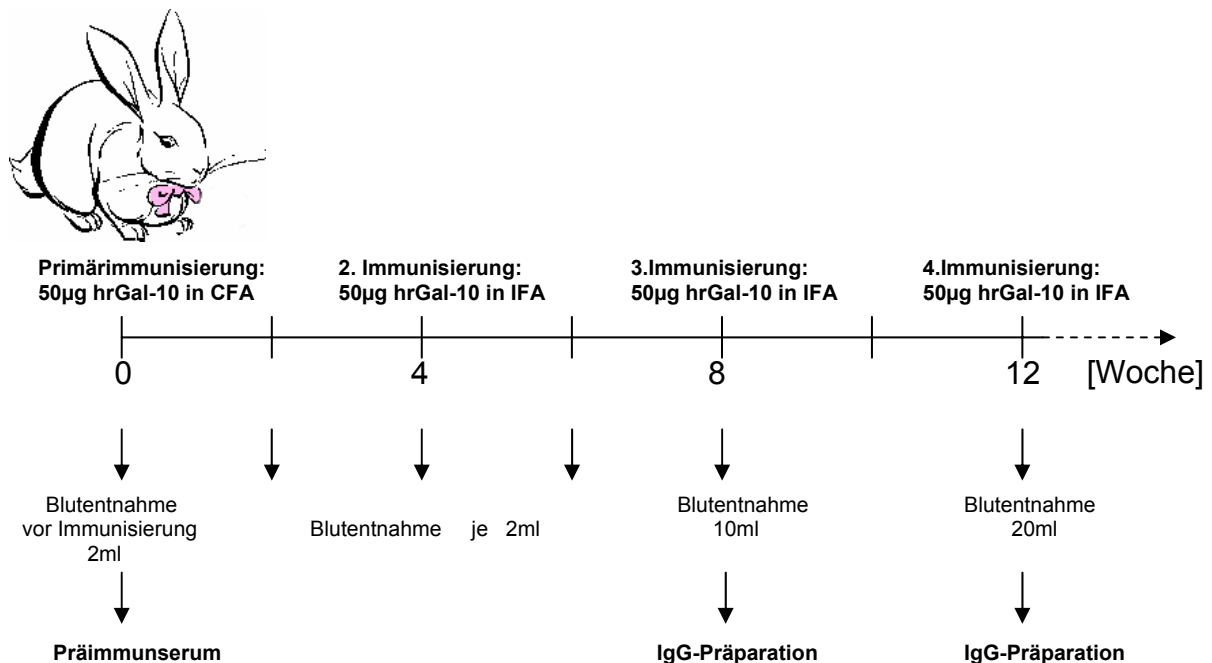


Abb.16: Immunisierungsschema

Kaninchen wurden mit 50µg humanem rekombinanten Galectin-10 (hrGal-10) in „Complete Freund’s Adjuvants“ (CFA) primär immunisiert. Alle folgenden Immunisierungen wurden ebenfalls mit 50µg Galectin-10 in „Incomplete Freund’s Adjuvants“ (IFA) durchgeführt. Sowohl vor Primärimmunisierung als auch alle weiteren 2 Wochen wurde den Kaninchen die angegebene Menge Blut abgenommen.

Um die Entwicklung der Antikörperproduktion verfolgen zu können, wurden den Kaninchen entsprechend dem dargestellten Immunisierungsschema alle zwei Wochen 2ml Blut entnommen und Serum gewonnen. Durch anschließende Enzyme-linked-immuno-sorbend-Assays (ELISA) wurden die Antikörper-Titer der jeweiligen Seren bestimmt. Die folgende Abbildung zeigt die Zusammenstellung der ELISA-Ergebnisse markanter Immunisierungszeitpunkte.

OD (480 nm)

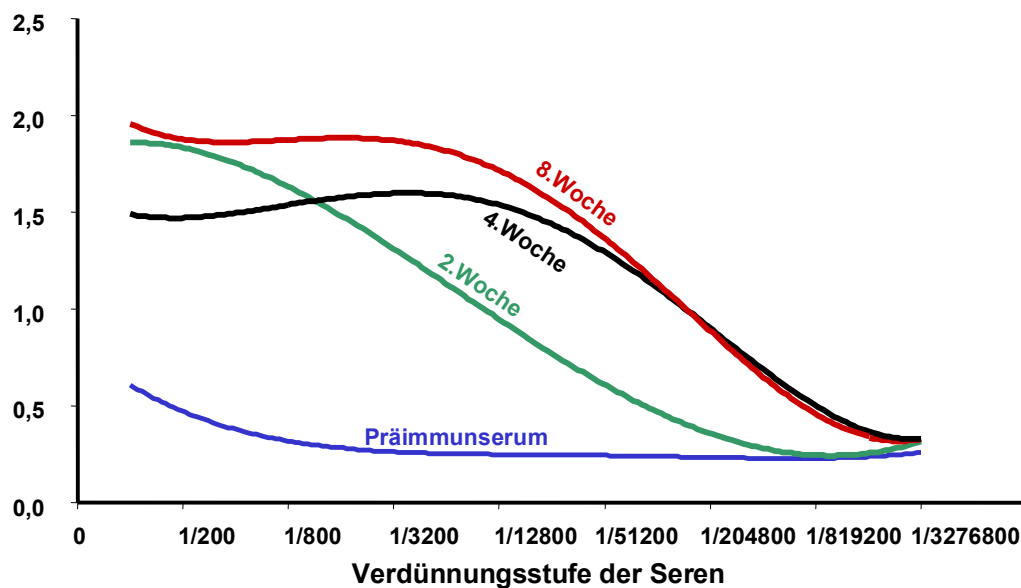


Abb.17: Titerbestimmung der Kaninchenserum mittels ELISA

Rekombinantes Galectin-10 wurde in einer Konzentration von 5µg/ml an eine ELISA-Platte gebunden und das jeweilige Antiserum auf das gebundene Protein titriert. Nach Zugabe eines sekundären Enzym-gekoppelten-anti-Kaninchen-Antikörpers wurde der ELISA photometrisch ausgewertet. Dargestellt sind die Serum-Titrationskurven der 2., 4. und 8. Woche nach Primärimmunisierung wie auch des Präimmunserums.

Zur Titerbestimmung wurde das zur Immunisierung verwendete humane rekombinante Galectin-10 (hrGal-10) an eine ELISA-Platte gebunden. Die jeweiligen Kaninchenserum wurden anschließend (beginnend mit einer 1:100 Verdünnung) auf das an die Platte gebundene Galectin-10 titriert. Über einen Peroxidase konjugierten sekundären anti-Kaninchen-Antikörper und Zugabe von ABTS und

H₂O₂ wurden die Experimente photometrisch bei 480nm ausgewertet (s.M&M S.38). Als „background“-Kontrolle diente das Präimmunserum.

Der Antikörper-Titer der jeweiligen Seren lässt sich sowohl graphisch als auch mathematisch bestimmen. Graphisch ergibt sich der Titer aus der korrelierenden Verdünnungsstufe der „halbmaximalen“ OD (480nm), mathematisch errechnet er sich durch Bestimmung des Wendepunktes der resultierenden sigmoidalen Regressionsgleichung. Exemplarisch ist in Abb.17 der Titer für das Antiserum der achten Woche eingezeichnet (berechneter Titer: 1:400000). Bereits zwei Wochen nach der primären Immunisierung konnte ein deutlicher Anstieg der gegen Galectin-10 gerichteten Antikörper in den Seren detektiert werden. Weitere zwei Wochen später erreichte der Titer bereits Werte, welche sich nach weiteren Immunisierungen nicht mehr wesentlich steigern ließen (s.Abb.17 Vergleich: 4. und 8. Woche).

Zum weiteren Nachweis der spezifischen Bindung wurde das generierte Antiserum in Western-Blot-Analysen auf rekombinantes Galectin-10 getestet. Als Negativ-Kontrolle diente hierbei wiederum Präimmunserum.

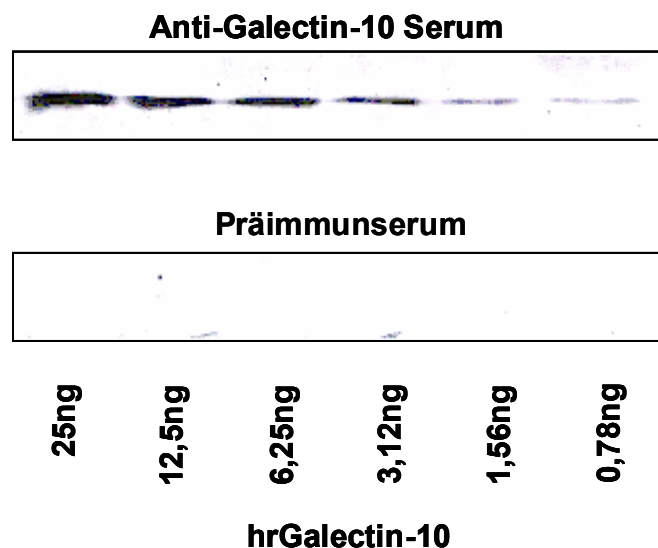


Abb.18: Nachweis der Bindung des generierten Antiserums in Western-Blot-Analysen

Das gewonnene Kaninchenserum wurde auf seine Bindung an hrGalectin-10 in Western-Blot-Analysen getestet. Als Kontrolle diente Präimmunserum. Die Seren wurden in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt. Als sekundärer Antikörper wurde ein anti-Kaninchen-Peroxidase-Konjugat eingesetzt. Die Detektion erfolgte mittels DAB (s.M&M S.33).

Abb.18 zeigt, dass das generierte Antiserum in einer Verdünnung von 1:1000 in der Lage ist, in Western-Blot-Analysen eine Menge von unter 1ng Galectin-10 zu detektieren.

Aufgrund der dargestellten ELISA- und Western-Blot-Daten wurden den Kaninchen ab der achten Woche nach der primären Immunisierung 10-20 ml Blut entnommen und aus dem resultierenden Serum IgG gewonnen (s.M&M S.39). Diese IgG-Fractionen wurden für die folgenden Versuche zum Protein-Nachweis von Galectin-10 in humanen Tregs eingesetzt.

3.13 Galectin-10-Protein-Nachweis in Tregs

In dem in Abb.19 dargestellten Western-Blot wurden in einem ersten Ansatz Proteinextrakte aus ruhenden Tregs und konventionellen T-Zellen von zwei Spendern auf ihre Galectin-10-Expression untersucht. Zum Nachweis wurde das oben beschriebene gereinigte anti-Galectin-10-IgG eingesetzt. Als sekundärer Antikörper diente ein Peroxidase-konjugierter-anti-Kaninchen-Antikörper. Die Detektion erfolgte durch Chemilumineszenz (s.M&M S.33).

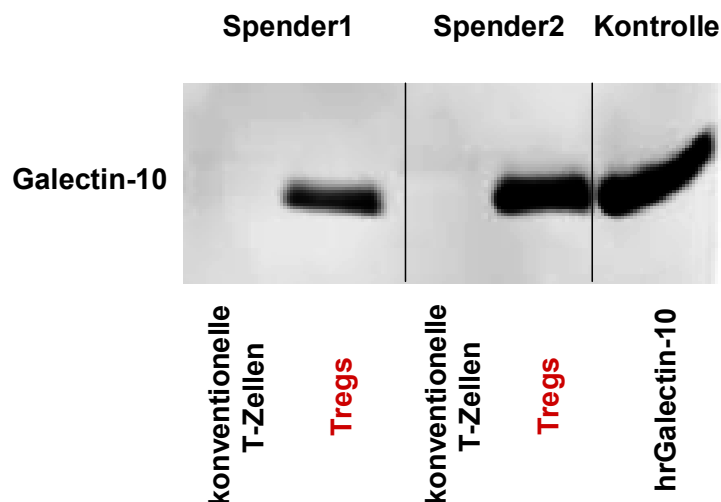


Abb.19: Präferentielle Galectin-10-Protein-Expression in Tregs

Sowohl ruhende konventionelle T-Zellen als auch Tregs wurden in SDS-Lysepuffer lysiert. 5µg Gesamtproteinextrakt wurden anschließend in einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Das gereinigte anti-Galectin-10-IgG diente als Primär- und ein HRP-konjugierter-anti-Kaninchen-AK als Sekundärantikörper. Die Detektion erfolgte mittels Chemilumineszenz. Als Kontrolle diente rekombinantes Galectin-10.

Der dargestellte Western-Blot weist klare Galectin-10-Banden (etwa 14kD) in den Proteinextrakten von Tregs auf, jedoch kein Galectin-10 in den Extrakten konventioneller T-Zellen. Als Kontrolle dienten 50ng hrGalectin-10. Als zusätzliche Kontrolle wurde ein identischer, mit dem Präimmunserum behandelter Blot parallel entwickelt. Es konnte weder in den Treg- Extrakten eine Bande nachgewiesen werden, noch war die Detektion des rekombinanten Galectin-10 möglich (nicht abgebildet).

Da sowohl die 2D-Gele der Proteom-Analysen als auch die mRNA-Daten daraufhindeuteten, dass auch konventionelle T-Zellen geringe Mengen Galectin-10 exprimieren können, wurden in einer weiteren SDS-PAGE Proteinextrakte von konventionellen T-Zellen und Tregs in höheren Konzentrationen als den zuvor verwendeten 5µg Gesamtprotein eingesetzt und titriert.



Abb.20: Schwache Galectin-10-Protein-Expression in konventionellen T-Zellen

Sowohl ruhende konventionelle T-Zellen als auch Tregs wurden in SDS-Lysepuffer lysiert. 15µg Gesamtproteinextrakt wurden anschließend 1:2 seriell verdünnt, in einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Das gereinigte anti-Galectin-10-IgG diente als Primär- und ein HRP-konjugierter-anti-Kaninchen-AK als Sekundärantikörper. Die Detektion erfolgte mittels Chemilumineszenz. Als Kontrolle dienten 50ng rekombinantes Galectin-10.

In dem in Abb.20 dargestellten Blot wurden 15µg Gesamtproteinextrakt seriell 1:2 verdünnt. Nur in der höchsten Konzentration konnte auch in konventionellen T-Zell-Extrakten Galectin-10 schwach nachgewiesen werden, wohingegen in allen Verdünnungsstufen der Treg-Extrakte ein klarer Nachweis möglich war.

Da die dargestellten RNA-Daten (Abb.15) auf eine Abnahme der Galectin-10-Expression mit Aktivierung der Zellen hindeuteten, wurden im folgenden Versuch T-Zellen in einer Kinetik über 48h stimuliert, lysiert und in einem Western-Blot auf ihre Galectin-10-Expression untersucht.



Abb.21: Mit Aktivierung abnehmende Galectin-10-Protein-Expression in Tregs

Sowohl ruhende konventionelle T-Zellen als auch Tregs wurden in SDS-Lysepuffer lysiert. 5µg Gesamtproteinextrakt wurden anschließend in einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Das gereinigte anti-Galectin-10-IgG diente als Primär- und ein HRP-konjugierter-anti-Kaninchen als Sekundärantikörper. Die Detektion erfolgte mittels Chemilumineszenz. Als Kontrolle dienten 50ng rekombinantes Galectin-10.

Es ist deutlich zu erkennen, dass mit Aktivierung der Tregs die Galectin-10-Protein-Expression abnimmt und somit die mRNA-Daten (s.Abb.14 und 15) auch auf Protein-Ebene bestätigt werden konnten.

3.14 Lokalisation von Galectin-10 in Tregs

Aufgrund der gezeigten Daten wurde die Frage aufgeworfen: *In welcher Form exprimieren humane Tregs Galectin-10: cytoplasmatisch, membranständig oder wird Galectin-10 sezerniert?* – Da es sich bei den zur Proteomanalyse eingesetzten Lysaten um cytosolische Extrakte handelte, ist es sehr wahrscheinlich, dass es sich bei Galectin-10 um ein cytoplasmatisches Protein handelt. Eine membranständige und auch eine sezernierte Form von Galectin-10 sind aber ebenfalls möglich und könnten zur Klärung einer potentiellen funktionellen Bedeutung von Galectin-10 bezüglich der Eigenschaften von Tregs von großem Interesse sein.

Zur Beantwortung der Frage, ob Galectin-10 von Tregs sezerniert werden kann, wurden konventionelle T-Zellen und Tregs für 48h stimuliert und anschließend sowohl die Lysate als auch die eingeeengten Überstände auf ein SDS-Gel aufgetragen und im folgenden Western-Blot mit dem anti-Galectin-10-IgG entwickelt.

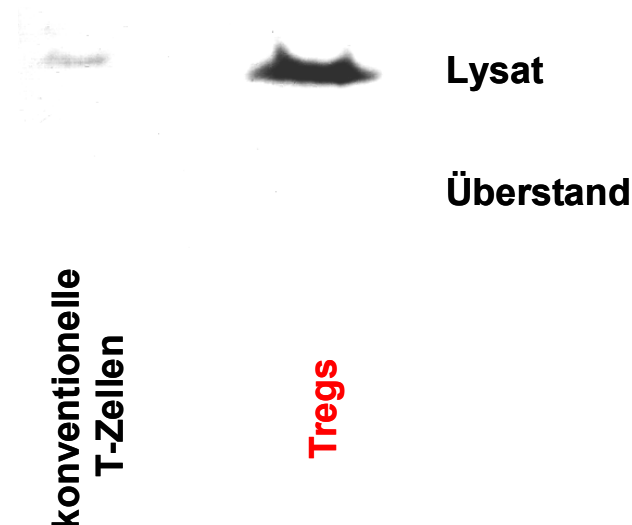


Abb.22: Tregs sezernieren kein Galectin-10

Sowohl ruhende konventionelle T-Zellen als auch Tregs wurden in SDS-Lysepuffer lysiert. Die zuvor abgenommenen Zell-Überstände wurden in einer Vakuum-Zentrifuge eingeeengt. Sowohl 30µg Gesamtproteinextrakt als auch die korrelierenden Überstände der entsprechenden Zellzahl wurden anschließend in einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Das gereinigte anti-Galectin-10-IgG diente als Primär- und ein HRP-konjugierter anti-Kaninchen-Ak als Sekundärantikörper. Die Detektion erfolgte mittels Chemilumineszenz.

Wie in Abb.22 zu sehen ist, konnte in den Lysaten dieses Experimentes in Tregs eine starke Galectin-10-Expression nachgewiesen werden. In diesem Ansatz wurden 30µg Gesamtprotein eingesetzt, wodurch die schwache Bande in konventionellen T-Zellen zu erklären ist. Zur Analyse der Überstände wurde errechnet, wie viele Zellen einer Proteingesamtmenge von 30µg entsprachen. Der Stimulations-Überstand dieser Zellzahl wurde für anschließende Western-Blot-Analysen eingeengt, in Lysepuffer aufgenommen und einer PAGE unterzogen.

Trotz dieser großen Menge an eingeengtem Überstand konnte kein Galectin-10 in den Überständen von Tregs nachgewiesen werden, so dass eine sezernierte Form von Galectin-10 in Tregs weitgehend ausgeschlossen werden kann.

Um eine Aussage darüber machen zu können, ob Galectin-10 möglicherweise membranständig von Tregs exprimiert werden kann, wurde versucht, den anti-Galectin-10 Antikörper in FACS-Analysen einzusetzen. Nach mehrfachen Versuchen und verschiedensten extrazellulären Färbemethoden konnte keine Galectin-10-Färbung erzielt werden. Da auch intrazelluläre Färbemethoden (Saponin) zur Anfärbung cytoplasmatischer Proteine keine Färbung ergaben, besteht die Möglichkeit, dass der generierte Antikörper zwar denaturiertes, aber kein natives Galectin-10 erkennt. Eine membranständige Expression von Galectin-10 wurde mittels der beschriebenen Experimente nicht nachgewiesen – kann aber, unter der Annahme, dass natives Galectin-10 nicht erkannt werden kann, auch nicht ausgeschlossen werden.

3.15 Immunhistologische Untersuchungen humaner Tregs

Da der generierte Antikörper in Western-Blot-Analysen sehr gut funktioniert, wurden anschließend Cytospin-Präparationen sowohl von konventionellen T-Zellen als auch von Tregs gefärbt.

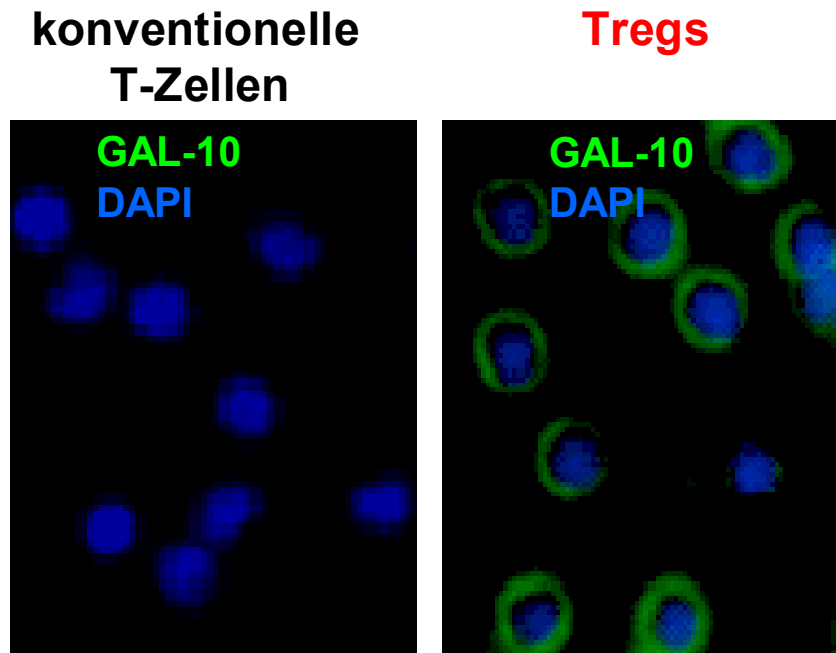


Abb.23: Cytopspinfärbung konventioneller T-Zellen und Tregs

Ruhende konventionelle T-Zellen und Tregs wurden auf Objektträger zentifugiert. Die Cytopspin-Präparationen wurden anschließend mit Paraformaldehyd fixiert und mit Saponin behandelt, um die Zellmembran zu permeabilisieren (s.M&M 36). Die Färbung erfolgte mittels des polyklonalen anti-Galectin-10-IgG und eines sekundären FITC-markierten-anti-Kaninchen-Antikörpers.

Abb.23 zeigt eine Galectin-10 Färbung in Kombination mit einer Kernfärbung sowohl von Tregs als auch von konventionellen T-Zellen. In der Population konventioneller T-Zellen konnten keine, in der Treg-Population hingegen deutlich positive T-Zellen mit variierender Färb-Intensität nachgewiesen werden. Innerhalb der Treg-Populationen betrug die Frequenz Galectin-10-positiver T-Zellen etwa 80%. Unabhängig von der Intensität der Färbung ist deutlich zu erkennen, dass die Färbung sich nicht auf den Kern erstreckt. Eine zusätzliche Gegenfärbung mit anti-CD3-Antikörpern belegt eindeutig, dass es sich bei den Galectin-10-positiven Zellen um CD3-positive T-Zellen handelt (Daten nicht gezeigt).

3.16 Generierung eines Expressionskonstruktes

Zur näheren Charakterisierung von Galectin-10 wurde ein eukaryotisches Expressionskonstrukt hergestellt. Hierzu wurde Galectin-10 aus humanen Tregs mittels Galectin-10-spezifischen Oligonukleotiden, welche Restriktionsschnittstellen für eine folgende Klonierung enthielten, amplifiziert und anschließend in den Expressionsvektor pcDNA3.1 eingefügt (s.M&M S.34). Nach Transfektion in den E.coli-Stamm DH5- α wurden die erhaltenen Klone auf das Vorhandensein des Galectin-10-Konstruktes mittels PCR überprüft.

Die Plasmid-Präparationen positiv getesteter Klone wurden anschließend sequenziert und mit der aus Datenbanken erhaltenen Sequenz von Galectin-10 verglichen.

1	MSLLPVPYTEAASLSTGSTVTIKGRPLACF	CLC (Q05315 ncbi)
	MSLLPVPYTEAASLSTGSTVTIKGRPLACF	Klon 4
31	LNEPYLQVDFHTEMKEESDIVFHFQVCFGR	CLC (Q05315 ncbi)
	LNEPYLQVDFHTEMKEESDIVFHFQVCFGR	Klon 4
61	RVVMNSREYGAWKQQVESKNMPFQDGQEFE	CLC (Q05315 ncbi)
	RVVMNSREYGAWKQQVESKNMPFQDGQEFE	Klon 4
91	LSISVLPDKYQVMVNGQSSYTFDHRIKPEA	CLC (Q05315 ncbi)
	LSISVLPDKYQVMVNGQSSYTFDHRIKPEA	Klon 4
121	VKMVQVWRDISLTKFNVSYLKR	CLC (Q05315 ncbi)
142	VKMVQVWRDISLTKFNVSYLKR	Klon 4

Abb.24: Vergleich der klonierten Galectin-10-Sequenz mit Datenbanken

Sequenzvergleich des Plasmid-Inserts des generierten Expressionskonstruktes (Klon 4) mit der Galectin-10-Sequenz aus der Proteindatenbank des NCBI.

Abb.24 stellt die Sequenz des Inserts von pcDNA-Gal-10 (Klon 4) im Vergleich mit der Galectin-10-Sequenz aus der Proteindatenbank des NCBI dar (Accession number: Q05315, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db>). Das Galectin-10-Expressionskonstrukt (Klon4) zeigte keine Sequenzabweichungen und wurde daher für die folgenden Untersuchungen eingesetzt.

3.17 Überexpression von Galectin-10 in Jurkat-Zellen

In ersten Experimenten wurde versucht, Jurkat-Zellen mit dem hergestellten Galectin-10-Konstrukt zu transfizieren und die Expression von Galectin-10 mittels des generierten polyklonalen Antikörpers nachzuweisen. Als Kontrolle dienten Jurkat-Zellen, welche nicht mit dem Galectin-10-Konstrukt, sondern mit dem Leervektor pcDNA3.1 transfiziert wurden. Für die Färbungen wurde der anti-Galectin-10-Antikörper mit „Oregon Green“ markiert (s.M&M S.39).

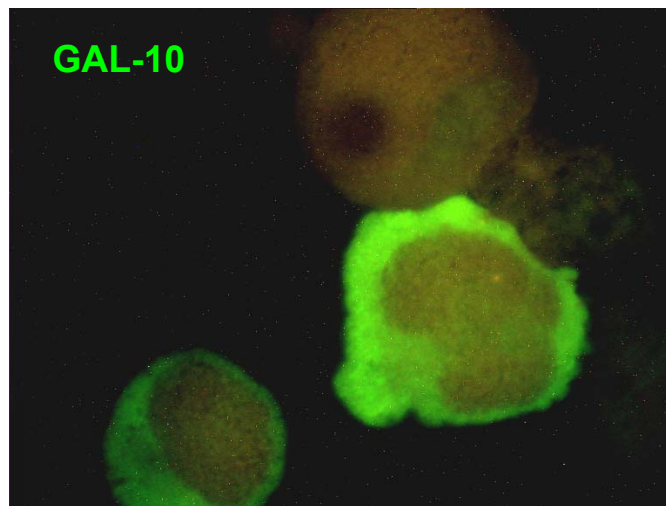


Abb.25: Cytospinfärbung Galectin-10-exprimierender Jurkat-Zellen

Jurkat-Zellen wurden mit einem eukaryotischen Galectin-10-Expressionskonstrukt transfiziert. 24h nach Transfektion wurden die Zellen auf Objektträger zentrifugiert. Die Cytospins wurden anschließend mit Paraformaldehyd fixiert und mit Saponin behandelt. Die Färbung erfolgte mittels des zuvor mit „Oregon Green“ markierten (s.M&M S.39) polyklonalen anti-Galectin-10-IgGs.

Die in Abb.25 dargestellte mikroskopische Aufnahme zeigt eine deutliche cytoplasmatische Galectin-10-Färbung von Galectin-10-transfizierten Jurkat-Zellen. Dass nicht alle Zellen gefärbt sind, ist durch eine Transfektionseffizienz von etwa 60% zu erklären und bestätigt zusätzlich die Spezifität der Galectin-10-Färbung. Färbungen mit einem Kontroll-Antikörper und mit Leervektor-transfizierten Jurkat-Zellen waren negativ (nicht abgebildet).

Um eine mögliche direkte Beteiligung von Galectin-10 an supprimierenden Mechanismen zu untersuchen, wurden diese in Abb.25 dargestellten Galectin-10 exprimierenden Jurkat-Zellen anschließend mit CFSE-markierten konventionellen T-Zellen kokultiviert. Die Proliferation der CFSE-markierten T-Zellen wurde anschließend mittels FACS Analysen untersucht (Abb.26).

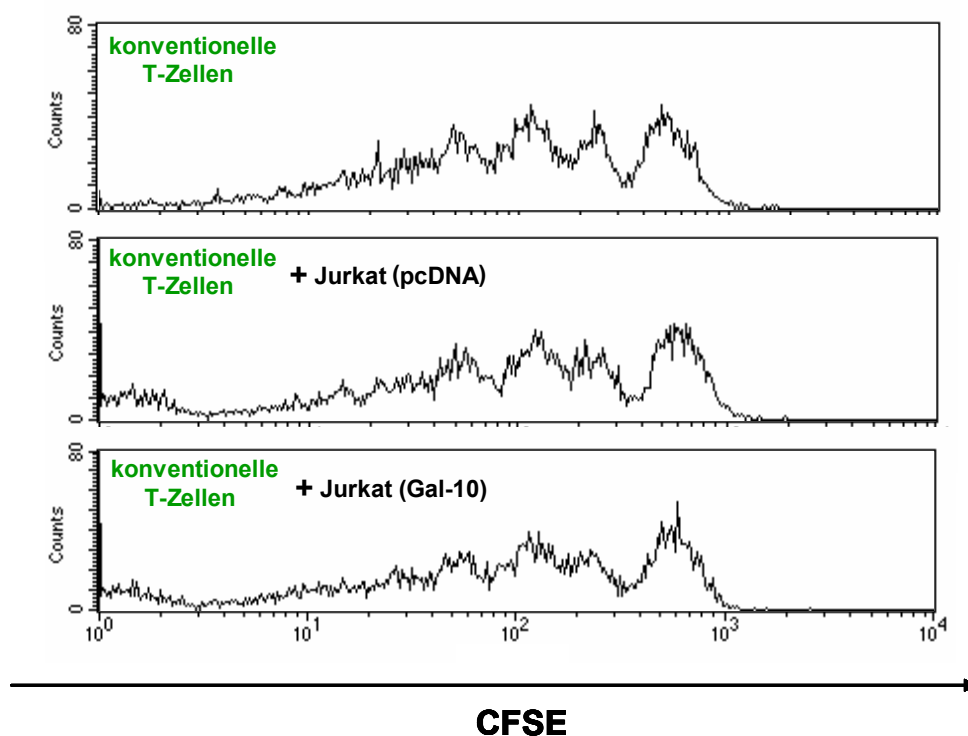


Abb.26 Galectin-10 exprimierende Jurkat-Zellen haben keinen supprimierenden Einfluss auf die Proliferation konventioneller T-Zellen

Konventionelle T-Zellen wurden mit CFSE markiert und anschließend mit Galectin-10-exprimierenden Jurkat-Zellen für 5 Tage kokultiviert. Dargestellt ist die Proliferation CFSE-markierter konventioneller T-Zellen alleine (oben), in Kokultur mit Jurkat-Zellen (Mitte) und in Kokultur mit Galectin-10-exprimierenden Jurkat-Zellen (unten).

Abb.26 zeigt, dass die Proliferation von konventionellen T-Zellen nicht durch die Kokultur mit Galectin-10-exprimierenden Jurkats beeinflusst wird. Eine direkte Beteiligung von Galectin-10 an der Suppression konventioneller T-Zellen konnte mit dieser Versuchsanordnung nicht nachgewiesen werden. Da Jurkat-Zellen T-Lymphocyten sind, welche sich höchstwahrscheinlich völlig anders verhalten als primäre T-Zellen, kann eine Beteiligung von Galectin-10 an den supprimierenden Eigenschaften von Tregs anhand dieser Ergebnisse aber nicht ausgeschlossen werden.

3.18 Überexpression von Galectin-10 in konventionellen T-Zellen

Zur weiteren Untersuchung einer potentiellen Beteiligung von Galectin-10 an Treg-Funktionen wurden deshalb konventionelle T-Zellen mit dem Galectin-10-Expressionskonstrukt transfiziert. Als Transfektionskontrolle wurden Parallelansätze mit einem eGFP-Konstrukt (enhanced Green Fluorescence Protein) transfiziert (s.M&M S.35). Die Transfektionseffizienz betrug in etwa 70% (nicht abgebildet). Interessanterweise war eine Überexpression von Galectin-10 in konventionellen T-Zellen nicht möglich, während die Transfektion mit eGFP problemlos funktionierte. Entweder starben die Zellen nach Transfektion mit Galectin-10 oder es konnte keinerlei Galectin-10-Expression in den überlebenden Zellen nachgewiesen werden.

Um einen möglichen Apoptose-induzierenden Effekt von Galectin-10 auf konventionelle T-Zellen zu untersuchen, wurden im Folgenden Caspase-Assays zum Nachweis einer verstärkten Apoptose von Galectin-10-transfizierten T-Zellen durchgeführt. Abb.27 stellt einen solchen Caspase-Assay dar.

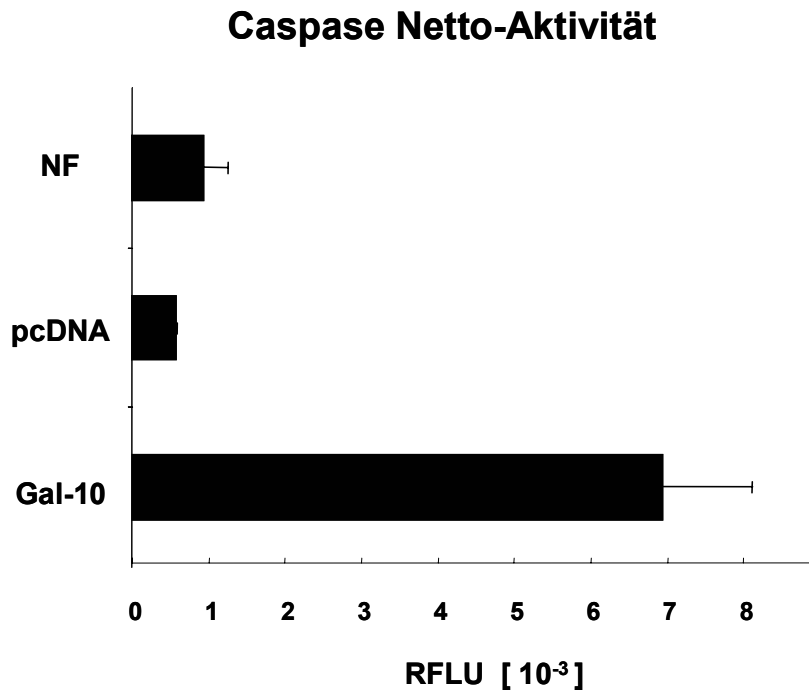


Abb.27: Die Überexpression von Galectin-10 führt zur Apoptose in konventionellen T-Zellen

Konventionelle humane T-Zellen wurden mit 2,5µg des Expressions-Konstruktes für Galectin-10 (GAL-10) bzw. mit dem Leervektor pcDNA (pcDNA) transfiziert. Als Kontrolle dienten Zellen, welche nur mit der „nucleofector solution“ behandelt wurden. Die Caspase-3/7 Aktivität wurde photometrisch 15h nach Transfection ausgewertet. Zur Bestimmung der Netto- Caspase- Aktivität wurde die Caspase- Aktivität unbehandelter konventioneller T-Zellen von allen Messdaten subtrahiert.

RFLU: Relative Fluorescence Light Units

Die in Abb.27 dargestellte Caspase-Aktivität lässt auf eine stark erhöhte Apoptose in Galectin-10-transfizierten konventionellen T-Zellen verglichen mit Leervektor-(pcDNA) bzw. „nucleofector solution“ (NF)-transfizierten Zellen schließen.

Ob Galectin-10 tatsächlich eine direkte Beteiligung am anergen Phänotyp und den suppressiven Eigenschaften von Tregs zugeschrieben werden kann, wird in weiterführenden, über diese Arbeit hinausgehenden Untersuchungen zu klären sein.

Im Folgenden sind die erzielten Ergebnisse dieser Arbeit in Stichpunkten zusammengefasst.

- Der Transkriptionsfaktor Pur-alpha konnte als präferentiell in murinen Tsups exprimiertes Molekül identifiziert werden (Faktor 2,7).
- Galectin-10 konnte als präferentiell in humanen Tregs exprimiertes Molekül identifiziert werden (300fach verstärkte mRNA-Expression).
- Die Expression von Galectin-10 ist in ruhenden Tregs am stärksten und nimmt nach Aktivierung ab.
- Galectin-10 wird von Tregs nicht sezerniert.
- Galectin-10 konnte in murinen T-Zellen nicht identifiziert werden.
- Es konnte ein Antikörper gegen humanes Galectin-10 generiert werden, welcher Galectin-10 in Western-Blot- und immunhistologischen Untersuchungen spezifisch färbt.
- Es konnte ein Expressionskonstrukt für Galectin-10 generiert werden, welches die Expression von Galectin-10 in eukaryontischen Zellen induziert.
- Die Überexpression von Galectin-10 induziert Apoptose in konventionellen humanen T-Zellen.

Speziell hinsichtlich einer potentiellen Beteiligung von Galectin-10 am anergen Phänotyp und den suppressiven Eigenschaften von Tregs werden momentan in weiterführenden Arbeiten siRNA-Experimente etabliert, um die Galectin-10-Expression in Tregs zu inhibieren und somit eine Korrelation zwischen der Galectin-10-Expression und den suppressiven Eigenschaften von Tregs nachzuweisen. (Ergebnisse zu Untersuchungen der funktionellen Beteiligung von Galectin-10 an den Eigenschaften von Tregs werden in der Dissertation von Jan Kubach am Institut für Dermatologie der Johannes Gutenberg-Universität beschrieben.)

Weiterführende Arbeiten beschäftigen sich momentan damit, Proteom-Analysen von Membran-Protein-Extrakten durchzuführen, um somit präferentiell von Tregs exprimierte Oberflächenmoleküle zu identifizieren.

IV Diskussion

In den letzten Jahren beschäftigten sich zahlreiche Untersuchungen damit, neben FoxP3 weitere präferentiell in regulatorischen T-Zellen (Tregs) exprimierte Moleküle zu identifizieren. Singuläre Befunde wurden veröffentlicht, in denen weitere Moleküle wie Neuropilin-1 [29] oder LAG-3 [30] als präferentiell in Tregs exprimiert beschrieben wurden. Diese Daten konnten aber bislang nicht reproduziert werden. Der Transkriptionsfaktor FoxP3 ist deshalb nach wie vor der einzige anerkannte molekularbiologische Marker humaner und muriner Tregs.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht weitere differentiell exprimierte Moleküle zu identifizieren. Zum einen wurden die Proteinexpressionsmuster von Tregs mit konventionellen T-Zellen verglichen, und zum anderen wurden die mRNA-Expressionsmuster supprimierter T-Zellen (Tsups) vergleichend mit „nicht supprimierten“ T-Zellen untersucht.

4.1 Vorteile und Nachteile der verschiedenen Methoden zur Identifizierung differentiell exprimierter Moleküle

Zur Identifizierung von präferentiell in Tsups exprimierten mRNA-Molekülen wurde eine Variante des „differential display“-Verfahrens („Genefishing“) angewendet. Hierbei musste in Kauf genommen werden, dass nicht alle mRNA-Moleküle erfasst werden können; dieses Verfahren ist aber auch mit einer limitierten Ausgangszellzahl im Gegensatz zu Proteom-Analysen durchführbar. Da die Ausgangszellzahlen von Tregs und konventionellen T-Zellen bei weitem nicht so stark limitierend sind, wie dies für Tsups der Fall ist, wurden zur Identifizierung von präferentiell in Tregs exprimierten Proteinen „differentielle Proteom-Analysen“ durchgeführt. Der Vorteil der durchgeführten „differentiellen Proteom-Analysen“ ist zum Beispiel, dass durch mRNA-Analysen einige Moleküle nicht nachgewiesen werden können, obwohl ihre Proteinexpression sehr stark ist. So konnten beispielsweise Shevach et al. mittels „microarray“-Analysen muriner T-Zellen eine starke Expression von GITR in Tregs nachweisen, nicht aber von CD25 [10],

welches sich als Protein problemlos nachweisen ließ. Zusätzlich konnten mit den hier durchgeführten „Proteom-Analysen“ bis zu 1600 Protein-Spots detektiert werden, wohingegen die Zahl an detektierbaren mRNAs mittels „Genefishing“ weit darunter lag.

4.2 Identifizierung präferentiell in murinen Tsups exprimierter mRNA-Moleküle

Die Methode des „Genefishings“ stellt einen Kompromiss zwischen Durchführbarkeit und Effizienz dar, d.h., diese Methode kann mit relativ geringen Ausgangsmaterialien durchgeführt werden - wahrscheinlich werden aber viele mRNAs nicht erfasst, da dieses Verfahren mit „nur“ 120 verschiedenen Primern arbeitet (s.M&M S.22). Dadurch ist zu erklären, wieso zum Beispiel die mRNA für FoxP3 mittels „Genefishing“ nicht als präferentiell in Tsups identifiziert werden konnte, obwohl sich diese in Tsups, welche für das „Genefishing“ Verfahren verwendet wurden, stets mit Hilfe der qRT-PCR als präferentiell exprimiert nachweisen ließ. Tsups exprimierten in diesen Experimenten immer die 5-10fache Menge an FoxP3-mRNA verglichen mit „nicht supprimierten“ Zellen (Daten nicht gezeigt und [31]).

Mittels „Genefishing“ konnten etwa 15 mRNAs als präferentielle Banden in Tsups identifiziert werden (Abb. 9 stellt exemplarisch 3 dieser Banden dar). Nach anschließender Sequenzierung wurden 5 der identifizierten mRNAs einer spezifischen qRT-PCR unterzogen, wovon eine mRNA reproduzierbar als präferentiell in Tsups exprimiert bestätigt werden konnte: Pur-alpha (s.Abb.10).

4.2.1 Identifizierung von Pur-alpha

Pur-alpha ist ein hoch konserviertes sequenzspezifisches DNA- und RNA-bindendes Molekül. Als Transkriptionsfaktor ist Pur-alpha an zellulären Funktionen wie Transkription, Replikation und Zellwachstum beteiligt [32]. Darbinian N. et al. beispielsweise konnten zeigen, dass die ektoische Expression von Pur-alpha die Proliferation verschiedener transfizierter Zell-Populationen (z.B. human Glioblastoma) suppressierte [33].

Im Zusammenhang mit einer möglichen suppressiven Funktion auf konventionelle T-Zellen stellt Pur-alpha daher ein interessantes Molekül dar. Die präferentielle Expression von Pur-alpha in Tsups verglichen mit „nicht supprimierten“ T-Zellen konnte mittels quantitativer PCR-Analysen (qRT-PCR) auf etwa das Dreifache bestimmt werden (s.Abb.10). Funktionell könnte diese relativ geringe präferentielle Expression durchaus von Bedeutung sein. Geplante weiterführende Arbeiten wie beispielsweise die ektopische Expression von Pur-alpha in „nicht supprimierten“ T-Zellen können möglicherweise nähere Einblicke in die Funktion dieses Moleküls gewähren. Solche Untersuchungen wurden allerdings vorerst zurückgestellt, da die parallel durchgeführten Proteom-Analysen vielversprechendere Kandidaten für nähere Untersuchungen ergaben, und diesen im Folgenden die Hauptaufmerksamkeit entgegengebracht wurde.

4.3 Identifizierung präferentiell in Tregs exprimierter Proteine

Zur Identifizierung von präferentiell in murinen und humanen Tregs exprimierten Proteinen wurden „differentielle Proteom-Analysen“ durchgeführt.

Der Vorteil von Proteom-Analysen im Vergleich mit dem bereits oben beschriebenen „Genefishing“-Verfahren ist die wesentlich größere Zahl an identifizierbaren Molekülen. Das bedeutet, dass prinzipiell alle Proteine eines Molekulargewichtes von 5-120 KDa und eines isoelektrischen Punktes von 4-8,5 erfasst werden können, sofern sie in ausreichender Konzentration exprimiert werden.

In den durchgeführten „differentiellen Proteom-Analysen“ konnten mehr als 1600 humane und 1400 murine „Protein-Spots“ detektiert werden. Diese Proteine sind zum größten Teil, bedingt durch die Aufarbeitung der Proteinextrakte, lösliche und daher hauptsächlich cytosolische Proteine. Wie nicht anders zu erwarten, waren die meisten der (murinen und humanen) „Protein-Spots“ in Tregs und konventionellen T-Zellen identisch, da es sich trotz essentieller funktioneller Unterschiede um sehr ähnliche Zellen handelt. Neben einigen in konventionellen T-Zell-Populationen präferentiell exprimierten Proteinen konnten auch einige wenige Proteine als präferentiell in Tregs exprimiert identifiziert werden.

4.3.1 Identifizierung von Galectin-1 in murinen Tregs

Im Zuge der Proteom-Analysen muriner T-Zell-Extrakte konnte insbesondere Galectin-1 als präferentiell in Tregs exprimiertes Protein identifiziert werden. Dieses Protein ist daher interessant, da es bereits von Shevach et al. als präferentiell in murinen Tregs exprimiertes Molekül auf mRNA-Ebene beschrieben wurde [10] und somit die hier dargestellten Ergebnisse der „Proteom-Analyse“ bestätigt. Der im Rahmen der durchgeführten „differentiellen Proteom-Analysen“ bestimmte Faktor der präferentiellen Expression von Galectin-1 betrug etwa 3.

Allerdings konnte kein Molekül identifiziert werden, dessen differentielle Expression einen Faktor von 4 oder mehr erreichte. Das mittels muriner Proteom-Analysen als am stärksten präferentiell in Tregs exprimierte Protein konnte als L-chain-Ferritin identifiziert werden. Die Hauptfunktion von Ferritin ist das Speichern von Eisen, wie zahlreiche Untersuchungen anhand von Interaktionen von Ferritin mit Eisen nachweisen konnten [34]. Da es sich bei Ferritin weder um einen Transkriptionsfaktor handelt noch seine bisher bekannte Funktion mit Wachstumsregulation oder Suppression in Zusammenhang gebracht werden kann, wurden nähere Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit zu Ferritin vorerst zurückgestellt. Gleiches gilt für das ebenfalls als schwach differentiell exprimiert identifizierte Annexin 11 [35]. Dem ebenfalls schwach präferentiell in Tregs exprimierten Annexin 6 (s.Tab1) hingegen konnte bereits eine Proliferations-supprimierende Wirkung auf „squamosa carcinoma epithel Zellen“ nachgewiesen werden [36]. Die bislang durch „differentielle Proteom-Analysen“ nachgewiesene relativ schwache präferentielle Expression in murinen Tregs (Faktor 2,4) rechtfertigte aber vorerst keine nähere Charakterisierung. Weitere momentan durchgeführte Proteom-Analysen muriner T-Zell-Extrakte werden zeigen, ob nähere Untersuchungen dieser Proteine gerechtfertigt sind.

4.3.2 Identifizierung von Galectin-10 in humanen Tregs

Im Zuge der „differentiellen Proteom-Analysen“ humaner Tregs konnte aber ein Protein identifiziert werden, welches sich in mehreren unabhängigen Experimenten von allen anderen humanen und murinen Spots stark abhob: Galectin-10.

Zur näheren Untersuchung wurde zunächst die präferentielle Galectin-10-Expression in humanen Tregs mittels konventioneller PCR-Analysen bestätigt (Abb.14). In qRT-PCR-Analysen (Abb.15) konnte ebenfalls eine stark präferentielle (in ruhenden Zellen etwa Faktor 300), mit Aktivierung abnehmende Galectin-10-mRNA-Expression in Tregs nachgewiesen werden.

Um auch über mRNA hinausgehende Aussagen über die präferentielle Galectin-10-Expression in Tregs machen zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein polyklonales Antiserum gegen Galectin-10 generiert. Mit Hilfe dieses Antikörpers konnte in Western-Blot-Analysen die mit Aktivierung abnehmende präferentielle Galectin-10- Expression in Tregs auf Protein-Ebene bestätigt werden.

4.4 Die Galectin-Familie

Da sowohl in murinen als auch in humanen Proteom-Analysen Galectine als präferentiell exprimierte Proteine in Tregs identifiziert werden konnten, wurde speziell diese Protein-Familie im Rahmen dieser Arbeit ausführlicher untersucht. Insbesondere fokussierten sich dabei nähere Untersuchungen auf Galectin-10, da Galectin-1 wie erwähnt (s.4.3.1) bereits von McHugh et al. [10] als präferentiell in murinen Tregs beschrieben wurde.

Galectine gehören zur Familie der Lectine und sind (mit Ausnahme von Galectin-10 (s.u.)) durch ihre Fähigkeit beta-Galactose zu binden charakterisiert. Die Galectin-Familie ist hochkonserviert und umfasst mittlerweile 15 Mitglieder. Galectine sind an vielen wichtigen Prozessen wie Zelldifferenzierung, Proliferation, Aktivierung und Apoptose verschiedenster Zell-Populationen beteiligt [37].

Sie besitzen keine „Signal-Sequenzen“, welche für eine Protein-Sekretion mittels des „klassischen Sekretionsweges“ erforderlich sind. Dennoch können einige Galectine sezerniert werden, wahrscheinlich durch einen nicht klassischen Sekretionsweg. Beispielsweise kann Galectin-3 als Bestandteil von Vesikeln über die Plasmamembran ausgeschleust werden, wobei die zugrunde liegenden Signale bisher unbekannt sind [38].

Galectin-10, auch als Charcot-Leyden –crystal- Protein bezeichnet, wurde ursprünglich als Kristalle bildendes Protein in humanen Geweben entdeckt und

später aufgrund der starken strukturellen Ähnlichkeiten in die Familie der Galectine als Galectin-10 eingestuft [39;40]. Nähere Untersuchungen zeigten, dass Galectin-10 nicht Galactose, sondern Mannose bindet [41]. Neben seiner Fähigkeit Mannose zu binden und einer Interaktion mit der eosinophilen Lysophospholipase [28] ist bisher nichts über die Funktion von Galectin-10 bekannt. Galectin-10 wurde bislang ausschließlich in humanen eosinophilen und basophilen Granulocyten beschrieben, allerdings konnte für andere Galectine bereits der Einfluss auf T-Zell-Funktionen bzw. auf die Physiologie anderer Zellen des Immunsystems nachgewiesen werden. Einige Eigenschaften von Galectinen sind schematisch in Abb.28 dargestellt.

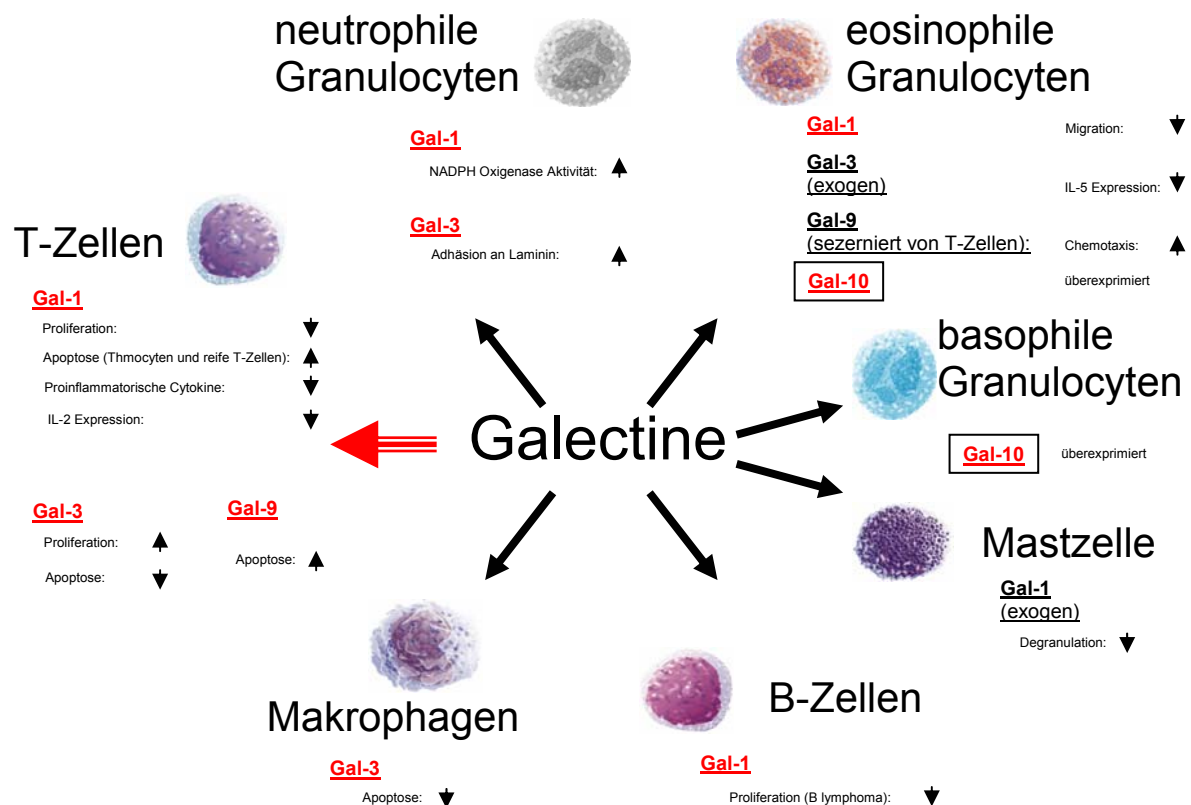


Abb.28: Effekte von Galectinen auf die Physiologie humaner Zellen des Immunsystems

Dargestellt ist die Galectin-Expression verschiedener Zellen (rot) – und die Wirkung der dargestellten Galectine auf Zellen des Immunsystems:

▲ : fördernder Einfluss auf die dargestellte Funktion

▼ : reduzierender Einfluss auf die dargestellte Funktion

(abgeändert nach : Rabinovich 2004 [37]).

Im Folgenden werden einige Funktionen von Galectinen - insbesondere bezüglich ihrer Wirkung auf T-Zellen und einer möglichen Beteiligung an Toleranzmechanismen - ausführlicher behandelt.

4.5 Galectine: Ihre Wirkung auf T-Zell-Funktionen und Toleranzmechanismen

Blaser et al. konnten zeigen, dass Galectin-1 von humanen cytotoxischen T-Zellen produziert wird und gleichzeitig in der Lage ist, die Antigen-induzierte Proliferation cytotoxischer T-Zellen zu inhibieren und somit als ein autokriner Proliferationsinhibitor wirkt [42]. Nähere Untersuchungen zeigten, dass Galectin-1 einen Zell-Zyklus-Arrest im Stadium von S und G2/M Phase in T-Zellen auslöst [43]. CD45 konnte als erster Rezeptor für Galectin-1 in peripheren humanen Lymphocyten identifiziert werden [44;45]. Hinsichtlich einer potentiellen Beteiligung von Galectinen im Rahmen von zentralen und peripheren Toleranzmechanismen ist die Beschreibung einer apoptotischen Wirkung von Galectin-1 für CD45RO⁺ T-Zellen interessant [45], da sowohl unreife als auch aktivierte periphere T-Zellen CD45RO stark exprimieren.

Eine Vielzahl von Untersuchungen deutet mittlerweile darauf hin, dass Galectine sowohl in der zentralen als auch in der peripheren Toleranz eine Rolle spielen. Baum et al. beispielsweise konnten zeigen, dass Thymusepithelzellen Galectin-1 exprimieren, welches an 2-O-Glycan auf unreifen cortikalen Thymocyten bindet und dort Apoptose induziert [44;46]. Des Weiteren konnte auch für Galectin-9 eine Apoptose-induzierende Wirkung auf murine unreife Thymocyten nachgewiesen werden [47].

Untersuchungen zum molekularen Mechanismus des Zellwachstum-hemmenden Einflusses von Galectin-1 zeigten, dass Galectin-1 nicht nur in unreifen, sondern auch in aktivierten peripheren T-Zellen Apoptose induzieren kann [48;49]. Galectin-1 beispielsweise hat inhibitorische Wirkung auf die Proliferation PHA- (Phytohemmagglutinin) aktivierter humaner T-Zellen [42] und induziert Apoptose in peripheren T-Lymphocyten [45;46;50].

Für Galectin-3 wurde ebenfalls eine Wirkung auf die Proliferation von T-Zellen beschrieben - allerdings antagonistisch zu Galectin-1 [38].

Humane Leukemia-Zellen beispielsweise zeigten nach Transfektion mit Galectin-3 eine gesteigerte Proliferation und waren resistent gegen Apoptose (induziert durch verschiedene pro-apoptotische Stimuli wie anti-Fas-Antikörper und Staurosporin) [51]. Des Weiteren konnte von Joo et al. gezeigt werden, dass die Proliferation muriner anti-CD3-stimulierter T-Zellen fast komplett durch die Inhibition von endogenem Galectin-3 durch „antisense Oligonukleotide“ geblockt werden konnte [52]. Abb.29 stellt schematisch Angriffspunkte von Galectinen im Rahmen zentraler und peripherer Toleranz zusammen.

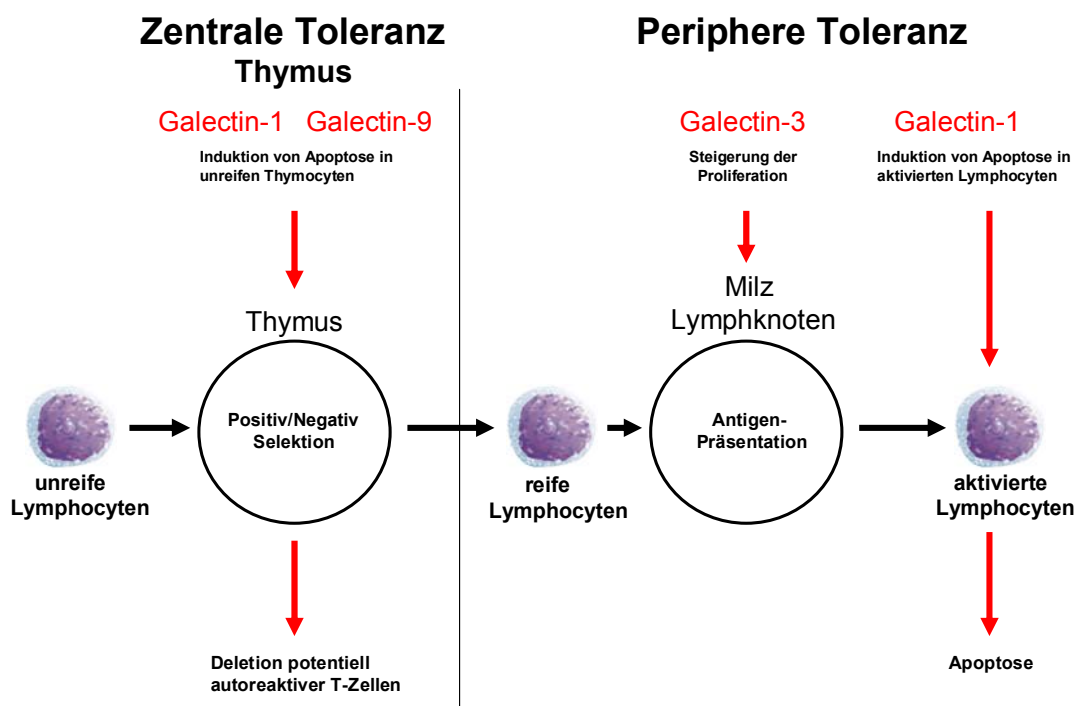


Abb.29: Die Rolle von Galectinen in zentraler und peripherer Toleranz (abgeändert nach: Rabinovich 2002 [53])

Neben den bereits beschriebenen *in vitro*-Experimenten konnten Galectinen auch in Tiermodellen immunsuppressorische Funktionen nachgewiesen werden: Versuche mit Ratten zeigten, dass die Injektion von rekombinantem Galectin-1 die Induktion der „experimentellen autoimmun encephalomyelitis (EAE)“ in Tieren mit einer entsprechenden genetischen Prädisposition unterdrückte [54].

Die beschriebenen Daten machten Galectine im Allgemeinen und Galectin-10 im Speziellen als präferentiell in Tregs exprimiertes Protein zu einem interessanten Kandidaten weiterer Experimente.

4.6 Wird Galectin-10 ebenfalls präferentiell in murinen Tregs exprimiert?

Aufgrund der starken präferentiellen Expression von Galectin-10 in humanen Tregs stellte sich die Frage: *Wird Galectin-10 oder ein anderes Galectin von murinen Tregs ebenfalls präferentiell exprimiert?*

Weder mit den human-spezifischen Oligonukleotiden noch mit neu synthetisierten - die bekannte 200bp lange Teilsequenz genomischer Maus-DNA erkennenden - Primern war ein Galectin-10-mRNA-Nachweis in murinen Präparationen möglich. Auch das gegen humanes Galectin-10 gerichtete Antiserum erbrachte keine Signale in Western-Blot-Analysen muriner Zellextrakte (Daten nicht gezeigt).

Dass Galectin-10 in murinen Zellen nicht detektiert werden konnte, wird durch Arbeiten von Ackerman et al. unterstützt, in welchen Galectin-10 als „ausschließlich von humanen Granulocyten exprimiert“ beschrieben wurde [27;28]. Dennoch kann eine Expression anhand der hier durchgeführten Experimente nicht hundertprozentig ausgeschlossen werden. Zum einen besteht die Möglichkeit, dass weder der generierte Antikörper noch die human-spezifischen Primer potentiell murines Galectin-10 erkennen – zum anderen existiert keine Positiv-Kontrolle für die (- auf der 200bp langen Teilsequenz genomischer Maus-DNA basierenden -) „murinen Galectin-10-Primer“.

Weitere Untersuchungen muriner Tregs hinsichtlich einer Galectin-10-Expression waren aus den beschriebenen Gründen nicht möglich.

Andere Angehörige der Galectin-Familie (u.a. die als murine Analoga zu humanem Galectin-10 beschriebenen Galectin-4 und -6) wurden ebenfalls auf eine mögliche präferentielle Expression in murinen Tregs untersucht - da möglicherweise ein anderes Galectin die Funktion von humanem Galectin-10 in der Maus übernommen haben könnte. Neben der bereits von Shevach et al. gezeigten und in den Proteom-Analysen dargestellten schwachen präferentiellen Expression von Galectin-1 (s.Tab.1) konnte aber keinem weiteren Galectin eine vergleichbare präferentielle Expression in murinen Tregs nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Daher konzentrierten sich nähere Untersuchungen zu Galectinen auf humane Tregs.

4.7 Lokalisation von Galectin-10 in humanen Tregs

Zur Klärung, ob (*und wenn ja: wie?*) Galectin-10 an den Funktionen humaner Tregs beteiligt ist, wurde zunächst untersucht, in welcher Form Galectin-10 von Tregs exprimiert wird: *Wird es sezerniert, befindet es sich im Cytoplasma oder wird es membranständig exprimiert?* Bedenkt man, dass die für die „differentielle Proteom-Analyse“ eingesetzten Zell-Lysate primär cytosolische Proteine waren, so wäre eine cytoplasmatische Lokalisation die logische Konsequenz, trotzdem kann eine membranständige Lokalisation nicht ausgeschlossen werden. Jonuleit et al. konnten zeigen, dass die suppressiven Eigenschaften humaner Tregs zellkontaktabhängig sind [21]. Sollte Galectin-10 also eine direkte Beteiligung an den suppressiven Eigenschaften von Tregs zukommen, wäre eine membranständige Expression zu erwarten.

Obwohl für Granulocyten beschrieben wurde, dass sie Galectin-10 sezernieren [55;56], konnte in den Überständen von Tregs weder Galectin-10 nachgewiesen (s.Abb.22), noch konnte die Bildung kristalliner Strukturen, wie sie für eosinophile Granulocyten typisch sind [39;40], beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Zur Klärung einer möglichen membranständigen Expression von Galectin-10 wurden FACS- Analysen mit dem im Rahmen dieser Arbeit generierten polyklonalen Antikörper durchgeführt. Allerdings konnte weder mit intrazellulären noch mit extrazellulären Färbemethoden Galectin-10 nachgewiesen werden. Möglicherweise beruht dieser Befund darauf, dass der generierte Antikörper kein natives, sondern nur denaturiertes Galectin-10 erkennt, so dass auf diesem Wege keine Aussage über die Lokalisation von Galectin-10 in Tregs getroffen werden kann.

In immunhistologischen Untersuchungen unter denaturierenden Bedingungen zeigten Tregs allerdings eine an der Membran lokalisierte Färbung, welche sich nicht über das gesamte Cytoplasma und den Kern erstreckt (s.Abb.23) - eine Beobachtung, welche zu der beschriebenen zellkontaktabhängigen Suppression durch Tregs [3] passen würde und eine mögliche direkte Beteiligung von Galectin-

10 an den suppressiven Eigenschaften von Tregs erklären könnte. Eine definitive Aussage, ob Galectin-10 an der Zelloberfläche oder intrazellulär an der Membran lokalisiert ist, kann aber nicht getroffen werden, zudem es sich – wie oben erwähnt – bei den zur Proteom-Analyse eingesetzten Lysaten um cytosolische Extrakte handelte. Momentan werden monoklonale Antikörper gegen Galectin-10 generiert, um eine mögliche Oberflächenexpression in FACS-Analysen zu bestätigen bzw. auszuschließen.

4.8 Ist Galectin-10 am anergen Phänotyp und an den suppressiven Eigenschaften von humanen Tregs beteiligt?

Um diese Frage zu beantworten, wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht, Galectin-10 in konventionellen T-Zellen mit Hilfe eines Expressions-Konstruktes zu exprimieren. Interessanterweise war eine Überexpression von Galectin-10 in konventionellen T-Zellen nicht möglich, da die meisten Zellen starben, nachdem sie transfiziert wurden. In den wenigen überlebenden Zellen konnte keinerlei Galectin-10-Expression nachgewiesen werden. Transfektionen mit dem Leervektor oder eGFP hingegen funktionierten problemlos. Daher wurde angenommen, dass Galectin-10 in konventionellen T-Zellen zur Induktion von Apoptose führt. Zur Bestätigung eines möglichen Apoptose-induzierenden Effektes von Galectin-10 in konventionellen T-Zellen wurde die Caspase-Aktivität als Apoptose-Indikator in Galectin-10-transfizierten Zellen untersucht. In Galectin-10-transfizierten T-Zellen konnte eine wesentlich höhere Caspase-Aktivität und somit Apoptose nachgewiesen werden als in T-Zellen, welche mit dem Leervektor bzw. nicht transfiziert wurden (s.Abb.29). Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass Galectin-10 in hohen Konzentrationen, z.B. wenn es unter einem starken konstitutiven CMV-Promotor überexprimiert wird, auf konventionelle T-Zellen toxisch wirkt. Eine Möglichkeit, die durchaus nicht unwahrscheinlich ist, wenn man bedenkt, dass Galectin-10 potentiell am anergen Status von Tregs beteiligt ist. Eine Apoptose-induzierende Wirkung von Galectinen wurde bereits für humanes Galectin-12 beschrieben, welches nach Überexpression in COS-1 Zellen zur Apoptose führte [57].

Da eine ektopische Expression von Galectin-10 zwar nicht in konventionellen T-Zellen, aber in Jurkat-Zellen möglich war, wurden diese Galectin-10 exprimierenden Jurkat-Zellen in Kokultur-Experimenten mit konventionellen T-Zellen eingesetzt. Die Proliferation von konventionellen T-Zellen wird aber nicht durch die Kokultur mit Galectin-10-exprimierenden Jurkat-Zellen beeinflusst. Die Überexpression von Galectin-10 in Tumor-Zelllinien wie Jurkat-Zellen ist höchstwahrscheinlich aber auch nicht mit der Expression von primären Zellen vergleichbar. Mögliche andere posttranskriptionale oder posttranslationale Mechanismen - oder auch andere nachgeschaltete Signalwege - könnten in Jurkat-Zellen aktiviert bzw. deaktiviert sein. Daher kann eine direkte Beteiligung von Galectin-10 an den supprimierenden Eigenschaften von Tregs nicht ausgeschlossen werden.

Ob Galectin-10 direkt am anergen Phänotyp und an den suppressiven Eigenschaften humaner Tregs beteiligt ist, wird in weiteren Untersuchungen zu klären sein. Da eine Überexpression von Galectin-10 in konventionellen T-Zellen nicht möglich ist, wird momentan versucht - neben der bereits erwähnten Generierung von monoklonalen Antikörpern – siRNA-Experimente zu etablieren, um somit die Galectin-10-Biosynthese spezifisch in Tregs zu blockieren. Durch diese Inhibition von Galectin-10 sollte es möglich sein, eine direkte Beteiligung dieses Moleküls am anergen Phänotyp und den suppressiven Eigenschaften von Tregs nachzuweisen.

Unabhängig von einer möglichen Beteiligung von Galectin-10 an den suppressiven Eigenschaften von Tregs ist der Befund einer präferentiellen Galectin-10-Expression in Tregs von potentieller klinischer Relevanz.

Neuere Untersuchungen beschäftigen sich eingehend mit der tumorimmunologischen Bedeutung von Tregs. Curiel et al. beispielsweise konnten eine Korrelation zwischen der Anzahl von Tregs in Ovarien-Tumoren und der Sterblichkeit der Patienten nachweisen, d.h. je größer die Anzahl von Tregs im Tumor-Gewebe war, desto geringer war die Überlebensrate der Patienten [58]. Unter diesen Gesichtspunkten können neue Marker regulatorischer T-Zellen wie Galectin-10 wichtige Werkzeuge für die klinische Anwendung und Risikoabschätzung darstellen.

V Zusammenfassung

Verschiedene Methoden wurden angewendet, um präferentiell exprimierte Moleküle in Tregs bzw. in Tsups zu identifizieren.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein Molekül als präferentiell in murinen Tsups mittels „differential display“ identifiziert werden: der Transkriptionsfaktor Pur-alpha.

Weiterhin konnte neben Galectin-1 im murinen System mittels „differentieller Proteom-Analysen“ einem weiteren Galectin eine präferentielle Expression in humanen Tregs zugeschrieben werden: Galectin-10. Sowohl auf mRNA-Ebene wie auch mit Hilfe eines generierten Antiserums konnte diese starke präferentielle Expression in humanen Tregs bestätigt werden.

Galectin-10 wird von humanen Tregs nicht sezerniert und führt in konventionellen T-Zellen nach Überexpression zur Apoptose der transfizierten Zellen.

Möglicherweise könnte Galectin-10 neben CD25 als weiteres Oberflächenmolekül für nähere Untersuchungen und die Isolierung humaner Tregs in Frage kommen. Um diese Frage zweifelsfrei beantworten zu können, werden momentan in weiterführenden Arbeiten monoklonale Antikörper gegen Galectin-10 generiert, in der Absicht, Galectin-10 in FACS-Analysen unter nativen Bedingungen in humanen Tregs nachzuweisen.

Zur näheren Charakterisierung der präferentiellen Galectin-10-Expression in Tregs wird momentan versucht siRNA-Experimente zu etablieren, um somit die Galectin-10-Biosynthese in humanen Tregs zu blockieren. Auf diesem Weg soll eine mögliche direkte Beteiligung von Galectin-10 am anergen Phänotyp bzw. an der Suppression konventioneller T-Zellen nachgewiesen werden.

VI Literatur

1. **Gershon,R.K. and Kondo,K.**, Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* 1970. **18**: 723-737.
2. **Sakaguchi,S., Sakaguchi,N., Asano,M., Itoh,M., and Toda,M.**, Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J.Immunol.* 1995. **155**: 1151-1164.
3. **Jonuleit,H., Schmitt,E., Stassen,M., Tuettenberg,A., Knop,J., and Enk,A.H.**, Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J.Exp.Med.* 2001. **193**: 1285-1294.
4. **Thornton,A.M. and Shevach,E.M.**, CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J.Exp.Med.* 1998. **188**: 287-296.
5. **Takahashi,T., Kuniyasu,Y., Toda,M., Sakaguchi,N., Itoh,M., Iwata,M., Shimizu,J., and Sakaguchi,S.**, Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int.Immunol.* 1998. **10**: 1969-1980.
6. **Annunziato,F., Cosmi,L., Liotta,F., Lazzeri,E., Manetti,R., Vanini,V., Romagnani,P., Maggi,E., and Romagnani,S.**, Phenotype, localization, and mechanism of suppression of CD4(+)CD25(+) human thymocytes. *J.Exp.Med.* 2002. **196**: 379-387.
7. **Chai,J.G., Tsang,J.Y., Lechler,R., Simpson,E., Dyson,J., and Scott,D.**, CD4+CD25+ T cells as immunoregulatory T cells in vitro. *Eur.J.Immunol.* 2002. **32**: 2365-2375.
8. **Kataoka,H., Takahashi,S., Takase,K., Yamasaki,S., Yokosuka,T., Koike,T., and Saito,T.**, CD25(+)CD4(+) regulatory T cells exert in vitro suppressive activity independent of CTLA-4. *Int.Immunol.* 2005. **17**: 421-427.
9. **Tang,Q., Boden,E.K., Henriksen,K.J., Bour-Jordan,H., Bi,M., and Bluestone,J.A.**, Distinct roles of CTLA-4 and TGF-beta in CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur.J.Immunol.* 2004. **34**: 2996-3005.

10. **McHugh,R.S., Whitters,M.J., Piccirillo,C.A., Young,D.A., Shevach,E.M., Collins,M., and Byrne,M.C.,** CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity*. 2002. **16**: 311-323.
11. **Bopp,T., Palmetshofer,A., Serfling,E., Heib,V., Schmitt,S., Richter,C., Klein,M., Schild,H., Schmitt,E., and Stassen,M.,** NFATc2 and NFATc3 transcription factors play a crucial role in suppression of CD4+ T lymphocytes by CD4+ CD25+ regulatory T cells. *J.Exp.Med.* 2005. **201**: 181-187.
12. **Shimizu,J., Yamazaki,S., Takahashi,T., Ishida,Y., and Sakaguchi,S.,** Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat.Immunol.* 2002. **3**: 135-142.
13. **Stephens,G.L., McHugh,R.S., Whitters,M.J., Young,D.A., Luxenberg,D., Carreno,B.M., Collins,M., and Shevach,E.M.,** Engagement of glucocorticoid-induced TNFR family-related receptor on effector T cells by its ligand mediates resistance to suppression by CD4+CD25+ T cells. *J.Immunol.* 2004. **173**: 5008-5020.
14. **Tone,M., Tone,Y., Adams,E., Yates,S.F., Frewin,M.R., Cobbold,S.P., and Waldmann,H.,** Mouse glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor ligand is costimulatory for T cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2003. **100**: 15059-15064.
15. **Fontenot,J.D., Gavin,M.A., and Rudensky,A.Y.,** Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat.Immunol.* 2003. **4**: 330-336.
16. **Hori,S., Nomura,T., and Sakaguchi,S.,** Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003. **299**: 1057-1061.
17. **Khatttri,R., Cox,T., Yasayko,S.A., and Ramsdell,F.,** An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat.Immunol.* 2003. **4**: 337-342.
18. **Fontenot,J.D. and Rudensky,A.Y.,** Molecular aspects of regulatory T cell development. *Semin.Immunol.* 2004. **16**: 73-80.
19. **Wildin,R.S., Smyk-Pearson,S., and Filipovich,A.H.,** Clinical and molecular features of the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome. *J.Med.Genet.* 2002. **39**: 537-545.
20. **Dieckmann,D., Bruett,C.H., Ploettner,H., Lutz,M.B., and Schuler,G.,** Human CD4(+)CD25(+) regulatory, contact-dependent T cells induce interleukin 10-producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells [corrected]. *J.Exp.Med.* 2002. **196**: 247-253.

21. **Jonuleit,H., Schmitt,E., Kakirman,H., Stassen,M., Knop,J., and Enk,A.H.,** Infectious tolerance: human CD25(+) regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4(+) T helper cells. *J.Exp.Med.* 2002. **196**: 255-260.
22. **Stassen,M., Schmitt,E., and Jonuleit,H.,** Human CD(4+)CD(25+) regulatory T cells and infectious tolerance. *Transplantation* 2004. **77**: S23-S25.
23. **McHugh,R.S. and Shevach,E.M.,** The role of suppressor T cells in regulation of immune responses. *J.Allergy Clin.Immunol.* 2002. **110**: 693-702.
24. **Gross,J.A., Callas,E., and Allison,J.P.,** Identification and distribution of the costimulatory receptor CD28 in the mouse. *J.Immunol.* 1992. **149**: 380-388.
25. **Klose,J. and Kobalz,U.,** Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. *Electrophoresis* 1995. **16**: 1034-1059.
26. **Harboe,N. and Ingild,A.,** Immunization, isolation of immunoglobulins, estimation of antibody titre. *Scand.J.Immunol.Suppl* 1973. **1**: 161-164.
27. **Ackerman,S.J., Weil,G.J., and Gleich,G.J.,** Formation of Charcot-Leyden crystals by human basophils. *J.Exp.Med.* 1982. **155**: 1597-1609.
28. **Ackerman,S.J., Liu,L., Kwatia,M.A., Savage,M.P., Leonidas,D.D., Swaminathan,G.J., and Acharya,K.R.,** Charcot-Leyden crystal protein (galectin-10) is not a dual function galectin with lysophospholipase activity but binds a lysophospholipase inhibitor in a novel structural fashion. *J.Biol.Chem.* 2002. **277**: 14859-14868.
29. **Bruder,D., Probst-Kepper,M., Westendorf,A.M., Geffers,R., Beissert,S., Loser,K., von Boehmer,H., Buer,J., and Hansen,W.,** Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells. *Eur.J.Immunol.* 2004. **34**: 623-630.
30. **Huang,C.T., Workman,C.J., Flies,D., Pan,X., Marson,A.L., Zhou,G., Hipkiss,E.L., Ravi,S., Kowalski,J., Levitsky,H.I., Powell,J.D., Pardoll,D.M., Drake,C.G., and Vignali,D.A.,** Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity.* 2004. **21**: 503-513.
31. **Stassen,M., Jonuleit,H., Muller,C., Klein,M., Richter,C., Bopp,T., Schmitt,S., and Schmitt,E.,** Differential regulatory capacity of CD25+ T regulatory cells and preactivated CD25+ T regulatory cells on development, functional activation, and proliferation of Th2 cells. *J.Immunol.* 2004. **173**: 267-274.
32. **Gallia,G.L., Johnson,E.M., and Khalili,K.,** Puralpha: a multifunctional single-stranded DNA- and RNA-binding protein. *Nucleic Acids Res.* 2000. **28**: 3197-3205.

33. **Darbinian,N., Gallia,G.L., King,J., Del Valle,L., Johnson,E.M., and Khalili,K.,** Growth inhibition of glioblastoma cells by human Pur(alpha). *J.Cell Physiol* 2001. **189**: 334-340.
34. **Harrison,P.M. and Arosio,P.,** The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim.Biophys.Acta* 1996. **1275**: 161-203.
35. **Gerke,V. and Moss,S.E.,** Annexins: from structure to function. *Physiol Rev.* 2002. **82**: 331-371.
36. **Theobald,J., Hanby,A., Patel,K., and Moss,S.E.,** Annexin VI has tumour-suppressor activity in human A431 squamous epithelial carcinoma cells. *Br.J.Cancer* 1995. **71**: 786-788.
37. **Rabinovich,G.A., Toscano,M.A., Ilarregui,J.M., and Rubinstein,N.,** Shedding light on the immunomodulatory properties of galectins: novel regulators of innate and adaptive immune responses. *Glycoconj.J.* 2004. **19**: 565-573.
38. **Liu,F.T., Patterson,R.J., and Wang,J.L.,** Intracellular functions of galectins. *Biochim.Biophys.Acta* 2002. **19;1572**: 263-273.
39. **Charcot,J.M. and Robin,C.,** Observation de Leucocythemie. *C.R.Mem.Soc.Biol.* 1853. **5**.
40. **Leyden,E.,** Zur Kenntnis des Bronchial-asthma. *Arch.Pathol.Anat.* 1872. **54**.
41. **Swaminathan,G.J., Leonidas,D.D., Savage,M.P., Ackerman,S.J., and Acharya,K.R.,** Selective recognition of mannose by the human eosinophil Charcot-Leyden crystal protein (galectin-10): a crystallographic study at 1.8 Å resolution. *Biochemistry* 1999. **19;38**: 13837-13843.
42. **Blaser,C., Kaufmann,M., Muller,C., Zimmermann,C., Wells,V., Mallucci,L., and Pircher,H.,** Beta-galactoside-binding protein secreted by activated T cells inhibits antigen-induced proliferation of T cells. *Eur.J.Immunol.* 1998. **28**: 2311-2319.
43. **Allione,A., Wells,V., Forni,G., Mallucci,L., and Novelli,F.,** Beta-galactoside-binding protein (beta GBP) alters the cell cycle, up-regulates expression of the alpha- and beta-chains of the IFN-gamma receptor, and triggers IFN-gamma-mediated apoptosis of activated human T lymphocytes. *J.Immunol.* 1998. **161**: 2114-2119.
44. **Baum,L.G., Pang,M., Perillo,N.L., Wu,T., Delegeane,A., Uittenbogaart,C.H., Fukuda,M., and Seilhamer,J.J.,** Human thymic epithelial cells express an endogenous lectin, galectin-1, which binds to core 2 O-glycans on thymocytes and T lymphoblastoid cells. *J.Exp.Med.* 1995. **181**: 877-887.

45. **Perillo,N.L., Pace,K.E., Seilhamer,J.J., and Baum,L.G.**, Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. *Nature* 1995. **378**: 736-739.
46. **Perillo,N.L., Uittenbogaart,C.H., Nguyen,J.T., and Baum,L.G.**, Galectin-1, an endogenous lectin produced by thymic epithelial cells, induces apoptosis of human thymocytes. *J.Exp.Med.* 1997. **%19;185**: 1851-1858.
47. **Wada,J., Ota,K., Kumar,A., Wallner,E.I., and Kanwar,Y.S.**, Developmental regulation, expression, and apoptotic potential of galectin-9, a beta-galactoside binding lectin. *J.Clin.Invest* 1997. **99**: 2452-2461.
48. **Perillo,N.L., Pace,K.E., Seilhamer,J.J., and Baum,L.G.**, Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. *Nature* 1995. **378**: 736-739.
49. **Rabinovich,G.A., Alonso,C.R., Sotomayor,C.E., Durand,S., Bocco,J.L., and Riera,C.M.**, Molecular mechanisms implicated in galectin-1-induced apoptosis: activation of the AP-1 transcription factor and downregulation of Bcl-2. *Cell Death.Differ.* 2000. **7**: 747-753.
50. **Rabinovich,G.A., Iglesias,M.M., Modesti,N.M., Castagna,L.F., Wolfenstein-Todel,C., Riera,C.M., and Sotomayor,C.E.**, Activated rat macrophages produce a galectin-1-like protein that induces apoptosis of T cells: biochemical and functional characterization. *J.Immunol.* 1998. **160**: 4831-4840.
51. **Yang,R.Y., Hsu,D.K., and Liu,F.T.**, Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1996. **93**: 6737-6742.
52. **Joo,H.G., Goedegebuure,P.S., Sadanaga,N., Nagoshi,M., von Bernstorff,W., and Eberlein,T.J.**, Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding protein in activated T lymphocytes. *J.Leukoc.Biol.* 2001. **69**: 555-564.
53. **Rabinovich,G.A., Rubinstein,N., and Toscano,M.A.**, Role of galectins in inflammatory and immunomodulatory processes. *Biochim.Biophys.Acta* 2002. **1572**: 274-284.
54. **Offner,H., Celnik,B., Bringman,T.S., Casentini-Borocz,D., Nedwin,G.E., and Vandenbark,A.A.**, Recombinant human beta-galactoside binding lectin suppresses clinical and histological signs of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J.Neuroimmunol.* 1990. **28**: 177-184.
55. **Butterfield,J.H., Ackerman,S.J., Scott,R.E., Pierre,R.V., and Gleich,G.J.**, Evidence for secretion of human eosinophil granule major basic protein and Charcot-Leyden crystal protein during eosinophil maturation. *Exp.Hematol.* 1984. **12**: 163-170.

-
56. **Dvorak,A.M., Ackerman,S.J., Letourneau,L., Morgan,E.S., Lichtenstein,L.M., and MacGlashan,D.W., Jr.,** Vesicular transport of Charcot-Leyden crystal protein in tumor-promoting phorbol diester-stimulated human basophils. *Lab Invest* 1996. **74**: 967-974.
57. **Hotta,K., Funahashi,T., Matsukawa,Y., Takahashi,M., Nishizawa,H., Kishida,K., Matsuda,M., Kuriyama,H., Kihara,S., Nakamura,T., Tochino,Y., Bodkin,N.L., Hansen,B.C., and Matsuzawa,Y.,** Galectin-12, an Adipose-expressed Galectin-like Molecule Possessing Apoptosis-inducing Activity. *J.Biol.Chem.* 2001. **276**: 34089-34097.
58. **Curiel,T.J., Coukos,G., Zou,L., Alvarez,X., Cheng,P., Mottram,P., Evdemon-Hogan,M., Conejo-Garcia,J.R., Zhang,L., Burow,M., Zhu,Y., Wei,S., Kryczek,I., Daniel,B., Gordon,A., Myers,L., Lackner,A., Disis,M.L., Knutson,K.L., Chen,L., and Zou,W.,** Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat.Med.* 2004. **10**: 942-949.

VII Abkürzungen

ABTS	2,2-Azino-bis(3-Ethylbenzthiazolin-6-Sulfonsäure)
ACP	annealing control primer
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
bio	biotinyliert
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumin
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary DNA
CMV	Cytomegalovirus
CFDASE	Carboxyfluoreszein Diazetat Succinimidyl Ester
DAB	Diaminobenzidin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-Triphosphat
E.coli	Echerischia coli
EAE	experimentelle allergische Enzephalomyelitis
EDTA	disodium ethylenediamine tetraacetic acid
EF-1	Elongations-Faktor-1
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbend Assay
FACS	Fluorescence Activated Cell Sort/Scan
FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
g	Erdbeschleunigung
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
His	Histidin
hr	human rekombinant

IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IMDM	Iscoe's modified Dulbecco's medium
kD	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
MACS	magnetic activated cell sorter
MEM	minimal essential medium
MHC	major histocompatibility complex
min	Minute
mRNA	messenger RNA
N6	Hexanukleotide
NTA	nitrilotriacetic acid
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin
qRT-PCR	quantitativ reverse transcription PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RT	reverse transcription
SA	Streptavidin
SDS	sodium dodecyl sulfate
Th	T-Helferzeller
Tregs	regulatorische T-Zellen
Tsups	supprimierte T-Zellen
Tris	Tris(Hydroxymethyl)-Aminomethan
U	Unit

