

Aus dem  
Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene  
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. M. Lohoff  
  
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg  
  
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg  
GmbH, Standort Marburg

Interleukin-27 inhibiert die Entwicklung von  
regulatorischen T-Zellen über *signal transducer and  
activator of transcripton 3 (STAT3)*.

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin  
dem Fachbereich Medizin der  
Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

Vera Elisabeth Johanna Steinwald

aus Heidelberg

Marburg 2008

Angenommen vom Fachbereich Medizin

der Philipps-Universität Marburg am:

27.02.2009

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. Matthias Rothmund

Referent: Prof. Dr. Michael Lohoff

Koreferent: PD Dr. Holger Garn

Meiner Familie  
und allen anderen mir lieben Menschen, die mich auf meinem bisherigen  
Lebensweg unterstützt haben

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Allgemeines zum Immunsystem:	1
1.2 Das adaptive Immunsystem:	2
1.3 Th-Zellen:	4
1.4 Die Subpopulationen der Th-Zellen:	5
<b>1.4.1 Th1:</b>	5
<b>1.4.2 Th2:</b>	6
<b>1.4.3 Th17:</b>	7
<b>1.4.4 Th0:</b>	9
<b>1.4.5 Regulatorische Th-Zellen:</b>	9
<b>1.4.6 Gegenseitige Hemmung der Subpopulationen:</b>	9
1.5 T-Zell-abhängige Toleranz und Immunsuppression	10
<b>1.5.1 Allgemeines:</b>	10
<b>1.5.2 Regulatorische Zellen:</b>	12
1.5.2.1 Nicht CD4+ regulatorische Zellen:	12
1.5.2.2 Natürliche Treg:	12
1.5.2.3 Erworbene Tregs im Allgemeinen:	14
1.5.2.4 CD4+CD25+Foxp3+ induzierte Treg:	14
1.5.2.5 Th3:	15
1.5.2.6 Tr1:	15
1.6 Interleukin-27:	17
1.7 Thema der Arbeit:	20
<b>2 Methoden</b>	<b>21</b>
2.1 Isolierung von Mauszellen <i>ex vivo</i>	21
<b>2.1.1 Präparation der Maus und Herstellung einer Leukozytensuspension</b>	<b>21</b>
2.2 Positive Selektion von CD4+ und CD4+CD62L+Zellen mittels <i>magnetic cell sorting</i> (MACS)	21
2.2.1 Prinzip:	21
2.2.2 Durchführung:	22
2.2.2.1 Vorbereitung der Zellsuspension:	22
2.2.2.2 Markierung der CD4+ Zellen	22
2.2.2.3 Positive Selektion mit der LS-Säule:	22
2.2.2.4 Behandlung mit Release Reagenz:	23
2.2.2.5 Markierung und Selektion der CD62L+ Zellen:	23
2.3 Stimulierung und Polarisierung der Zellen	24

2.3.1 Prinzip:	_____	24
2.3.2 Durchführung:	_____	24
2.4 Transfer und Restimulation	_____	25
2.4.1 Prinzip:	_____	25
2.4.2.1 Durchführung Transfer:	_____	25
2.4.2.2 Durchführung Restimulation:	_____	25
2.5 Isolierung von CD4+CD25-, CD4+CD25+ Zellen für Proliferationsassays	_____	25
2.5.1 Prinzip:	_____	25
2.5.2 Durchführung:	_____	26
2.5.2.1 Anreicherung der CD4+ Zellen:	_____	26
2.5.2.2 Positive Selektion der CD25+ Zellen:	_____	26
2.6 Herstellung von APZ für Proliferationsassays	_____	27
2.6.1 Prinzip:	_____	27
2.6.2 Durchführung:	_____	27
2.7 Intrazelluläre Zytokin Färbung für FACS Messungen (ICS = <i>Intracellular cytokine staining</i> )	_____	28
2.7.1 Prinzip:	_____	28
2.7.2 Durchführung:	_____	28
2.7.2.1 Fixierung der Zellen:	_____	28
2.7.2.1 Färbung:	_____	28
2.8 Oberflächenfärbung von CD25:	_____	29
2.9 Durchflusszytometrie oder Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)	_____	29
2.10 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	_____	30
2.10.1 Prinzip:	_____	30
2.10.2 Durchführung:	_____	30
2.11 Phosphorylierungs-Studien von STAT Proteinen:	_____	31
<b>2.11.1 Stimulation der Th-Zellen</b>	_____	31
<b>2.11.2 Gewinnung von Schockpellets für Proteinlysate und RNA-Gewinnung:</b>	_____	31
2.11.2.1 Prinzip:	_____	31
2.11.2.2 Durchführung:	_____	31
<b>2.11.3 Herstellung von Gesamtzell-Proteinlysaten</b>	_____	32
2.11.3.1 Prinzip:	_____	32
2.11.3.2 Durchführung:	_____	32
<b>2.11.4 Proteinbestimmung nach Pierce</b>	_____	32
2.11.4.1 Prinzip:	_____	32
2.11.4.2 Durchführung:	_____	33
<b>2.11.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese:</b>	_____	33
2.11.5.1 Prinzip:	_____	33

2.11.5.2 Durchführung:	34
<b>2.11.6 Western-Blot</b>	<b>35</b>
2.11.6.1 Prinzip:	35
2.11.6.2 Durchführung:	35
<b>2.11.7 Strippen von mit ECL entwickelten Western-Blots:</b>	<b>36</b>
2.11.7.1 Prinzip:	36
2.11.7.2 Durchführung:	37
<b>2.12 RNA-Isolierung:</b>	<b>37</b>
2.12.1 Prinzip:	37
2.12.2 Durchführung:	37
<b>2.13 cDNA Synthese aus aufgereinigter mRNA:</b>	<b>38</b>
2.13.1 Prinzip:	38
2.13.2 Durchführung:	38
<b>2.14 Quantitative real time PCR (TaqMan):</b>	<b>39</b>
2.14.1 Prinzip:	39
2.14.2 Durchführung:	41
<b>2.15 Vorübergehende Herunterregulation der Expression eines interessierenden Proteins mittels „small interfering RNA“ (siRNA):</b>	<b>42</b>
2.15.1 Prinzip:	42
2.15.2 Durchführung:	43
<b>2.16 Proliferationsassay:</b>	<b>44</b>
2.16.1 Prinzip:	44
2.16.2 Durchführung:	45
<b>2.17 Statistische Analyse:</b>	<b>46</b>
<b>2.18 Materialien</b>	<b>47</b>
<b>2.18.1 Mäuse:</b>	<b>47</b>
<b>2.18.2 Chemikalien</b>	<b>47</b>
<b>2.18.3 Zytokine:</b>	<b>48</b>
<b>2.18.4 Antikörper</b>	<b>49</b>
2.18.4.1 Antikörper für Zellkultur	49
2.18.4.2 Färbeantikörper:	49
2.18.4.3 ELISA-Antikörper	49
2.18.4.4 Western-Blot-Antikörper	50
<b>2.18.5 Puffer :</b>	<b>50</b>
<b>2.18.6 Kits:</b>	<b>53</b>
<b>2.18.7 Sonstige Materialien:</b>	<b>55</b>

<b>3 Ergebnisse</b>	<b>58</b>
3.1 Untersuchung der Kinetik der Foxp3 Expression während der Polarisierung zu iTreg und Th0 mit und ohne Zugabe von IL-27	58
3.2 Untersuchung zu dosisabhängigen Effekten von IL-27 auf die Foxp3 Expression nach 72h Polarisierung zu iTreg	60
3.3 Vergleich der Kinetik der IL-2 Produktion bei der Differenzierung zu iTreg und Th0 mit und ohne IL-27	61
3.4 Dosisabhängige Effekte auf die IL-2 Produktion durch IL-27 von zu iTreg und Th0 polarisierten Zellen	63
3.5 Effekt von IL-27 auf die Expression von CD25 und CTLA-4 bei Polarisierung zu iTreg.	65
3.6 Vergleich der suppressiven Fähigkeiten von iTreg und nTreg	67
3.7 Effekt von IL-27 auf die suppressiven Fähigkeiten von iTreg	69
3.8 Untersuchung des Effektes von IL-27 auf die TNF- $\alpha$ Produktion von Th0-Zellen und iTreg.	71
3.9 Kontrolle des Effektes von IL-27 auf die IFN- $\gamma$ Produktion von Th0 und iTreg	73
3.10 Überprüfung des Effektes von IL-27 auf die Expression von T-bet und IFN- $\gamma$ mRNA	74
3.11 IL-27 phosphoryliert STAT1 und STAT3	76
3.12 Nachweis der Herunterregulation von STAT3 durch siRNA	78
3.13 Effekt der Herunterregulation von STAT3 durch siRNA1 und siRNA2 auf die Foxp3 Expression	80
3.14 Vergleich der IFN- $\gamma$ Produktion mit und ohne Herunterregulation von STAT3 durch siRNA	82

<b>4 Diskussion</b>	<b>83</b>
4.1 Ziel der Arbeit:	83
4.2 Foxp3 Expression unter dem Einfluss von TGF- $\beta$ und IL-27	84
4.3 Einfluss von IL-27 auf die IL-2 Produktion	84
4.4 Einfluss von IL-27 auf die Treg Marker CD25 und CTLA-4	85
4.5 Vergleich der suppressiven Eigenschaften der entstehenden Zellen	86
4.6 Einfluss von IL-27 auf die TNF- $\alpha$ Produktion	87
4.7 Th1 induzierende Eigenschaften von IL-27 im Zusammenspiel mit TGF- $\beta$	88
4.8 Aktivierung von STAT Proteinen durch IL-27	88
4.9 Nachweis der transienten Herunterregulation von STAT3 durch siRNA1 und siRNA2	89
4.10 Die Inhibition von Foxp3 durch IL-27 ist zumindest teilweise STAT3 abhängig und führt zu einer Verstärkung der STAT1 vermittelten Signalwege	89
4.11 Ergebnisse in Zusammenschau mit neueren Erkenntnissen in der Literatur	91
<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>95</b>
<b>6 Abstract</b>	<b>97</b>
<b>7 Referenzen</b>	<b>98</b>
<b>9 Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>113</b>
<b>10 Lebenslauf</b>	<b>116</b>
<b>11 Verzeichnis der akademischen Lehrer:</b>	<b>117</b>
<b>12 Danksagung</b>	<b>118</b>
<b>13 Ehrenwörtliche Erklärung</b>	<b>119</b>



# 1 Einleitung

## 1.1 Allgemeines zum Immunsystem:

Der Begriff Immunsystem leitet sich vom lateinischen *“immunis – frei, unberührt, verschont“* ab. Klassischerweise wird es als ein Abwehrsystem des Körpers gegenüber gefährlichen Einflüssen aus der Umwelt wie Bakterien, Viren, Pilzen, Giftstoffen sowie gefährlichen körpereigenen Einflüssen (wie etwa entarteten Zellen) definiert. Während lange Zeit die Abwehr selbst im Fokus des wissenschaftlichen Interesses stand, treten nun vermehrt die Mechanismen zu ihrer Verhinderung und Limitierung in den Vordergrund. Wichtig für die freie und unberührte Existenz eines Organismus` sind ebenfalls die Aufrechterhaltung der Toleranz gegenüber dem „Selbst“ zur Verhinderung von Autoimmunerkrankungen, die Tolerierung nützlicher kommensaler Mikroben, des Fötus` während der Schwangerschaft, sowie die Generierung einer angemessenen, limitierten Immunantwort zur Vermeidung von Gewebeschäden. Zusätzlich wird heutzutage auch die gezielte Manipulation des Immunsystems zur Tolerierung fremder Organtransplantate immer wichtiger.

Das Immunsystem wird klassischerweise in ein unspezifisches, angeborenes und ein spezifisches, adaptives System eingeteilt. Das unspezifische Immunsystem gilt als entwicklungsgeschichtlich älter. Zu ihm gehören z.B. der Säuremantel der Haut, physikalische Barrieren wie Epidermis und Schleimhäute, das Komplementsystem, antimikrobielle Enzymsysteme, Granulozyten, Natürliche Killerzellen (NKs), das Monozyten-Makrophagensystem etc. Die Bezeichnung bezieht sich auf seine Unspezifität, da es unabhängig vom jeweils eindringenden Erreger auf gleiche Weise aktiv wird und diese Mechanismen schon dem Neugeborenen zur Verfügung stehen. In jedem Fall ist es jedoch die erste Verteidigungslinie des Organismus`. Leider entgehen ihm aufgrund seiner in der Keimbahn kodierten invariablen Rezeptoren einige Pathogene. Außerdem ist es nicht lernfähig, so dass es nicht mit verbesserten Mechanismen auf wiederholt attackierende, bereits bekannte Erreger reagieren kann.

Dies ist allein die Aufgabe des adaptiven Immunsystems. Zu ihm werden B- und T-Lymphozyten gezählt. Die enge Verknüpfung der angeborenen und adaptiven Systeme wird beispielsweise von phagozytischen Zellen wie Makrophagen gewährleistet. Diese nehmen beispielsweise Bakterien auf und machen sie in ihrem Inneren unschädlich, zum anderen sezernieren sie Zytokine wie Interleukin-1 (IL-1), IL-6, IL-8, IL-12 und Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF- $\alpha$ ). Letztere sorgen für lokale Entzündungsreaktionen und systemische Effekte wie Fieber, sowie eine Rekrutierung

und Aktivierung von weiteren Zellen der angeborenen und adaptiven Immunität wie Granulozyten, B- und T-Lymphozyten.

## 1.2 Das adaptive Immunsystem:

Das adaptive Immunsystem ist in der Lage, fast jedes Pathogen zu erkennen und zu bekämpfen. Dies wird möglich aufgrund einer somatischen Rekombination von Antigen-Rezeptor-Genen der Lymphozyten, die in einer sehr großen Vielfalt möglicher Rezeptoren für die Erkennung von Antigenen resultiert. Zudem kann das adaptive Immunsystem durch Bildung von Gedächtniszellen bei einer zweiten Begegnung mit einem Pathogen, dieses schneller und effektiver bekämpfen. Die Immunantworten des adaptiven Systems werden klassischerweise in eine humorale, von Antikörpern (AK) vermittelte und eine zelluläre Antwort unterteilt. Zur humoralen Immunität gehören etwa die B-Lymphozyten, die nach Aktivierung durch ihr spezifisches Antigen über direkten Kontakt mit ihrem B-Zell-Rezeptor (BZR) zu AK-produzierenden Plasmazellen reifen können. Dabei ist der BZR selber ein membranständiger AK. Mit Hilfe der AK können z.B. die Erreger durch Quervernetzung mit den AK verklumpen oder wichtige pathogene Strukturen der Erreger blockiert werden. Die Bindung der AK an das Pathogen (Opsonisierung) erleichtert auch ihre Erkennung für phagozytierende Zellen des angeborenen Immunsystems. Aufgrund der Natur der Antikörper dienen diese primär zur Bekämpfung von extrazellulären Pathogenen wie vielen Bakterien, Parasiten und frei zirkulierenden Viren und Toxinen. Auch T-Lymphozyten können das humorale System modulieren. Allerdings werden sie klassischerweise primär dem zellulären System zugerechnet. T-Lymphozyten werden aufgrund spezifischer Oberflächenproteine in zwei Hauptpopulationen unterteilt:

die CD8 (CD = *Cluster of Differentiation*) auf ihrer Oberfläche exprimierende zytotoxische T-Zellen und CD4 exprimierende T-Helfer Zellen (Th-Zellen) (Cantor and Boyse 1975). Dabei ist CD8 ein doppelkettiges Molekül, während CD4 ein einkettiges Molekül mit vier Immunglobulin-ähnlichen Domänen ist. Beide Zellen exprimieren den T-Zell-Rezeptor (TZR), der zur Familie der Immunglobulin-Rezeptoren gehört und sie befähigt, Antigene zu erkennen (Bentley and Mariuzza 1996). Der TZR besteht aus einer membranständigen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette, die über eine Disulfid-Brücke miteinander verbunden sind. Eine Minderheit der T-Zellen exprimiert stattdessen einen TZR aus einer  $\gamma$ - und  $\delta$ -Kette. Diese Zellen sind für die Erkennung von Nicht-Peptid-Antigenen

zuständig. Jede Kette des TZR hat eine konstante und eine variable Region, wobei letztere für die Erkennung von Antigenen zuständig ist.

Einerseits kann nun der TZR nur Antigene erkennen, die ihm auf der Oberfläche einer der beiden MHCs (MHC = *Major histocompatibility complex*), MHC-I oder MHC-II, von anderen körpereigenen Zellen präsentiert werden (Dembic et al. 1986). Andererseits ist auch die Anwesenheit von Molekülen wie z.B. CD4 oder CD8 auf der TZR Seite für die erfolgreiche Erkennung entscheidend. Die von den MHCs präsentierten Antigene sind dabei kurze Peptidfragmente von in der Zelle prozessierten Proteinen (Rothbard and Geffer 1991).

Die MHCs-I existieren in für den Organismus spezifischer genetischer Sequenz und werden auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert. Sie bestehen aus einer membranständigen  $\alpha$ -Kette und dem nicht-kovalent gebundenen  $\beta_2$ -Mikroglobulin. Auf ihnen werden Peptidfragmente aus dem Inneren der Zelle präsentiert. MHCs-1 werden über den TZR und über CD8 erkannt. So werden etwa bei Virusbefall in der Zelle befindliche Virusproteine ebenso wie alle anderen Proteine prozessiert und auf den MHCs-1 präsentiert. Die Virus-Peptidfragmente können dann von den zytotoxischen Zellen erkannt werden, die daraufhin z.B. in den infizierten Zellen den programmierten Zelltod durch Apoptose auslösen können.

MHCs-II werden nur auf sogenannten Antigen-Präsentierenden-Zellen (APZ) wie B-Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen (DZ), sowie den Epithelzellen des Thymus exprimiert. Sie dienen ganz bevorzugt der Präsentation von Fremd-Antigenen und bestehen aus einer membranständigen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette. B-Zellen und phagozytierende Zellen internalisieren Pathogene aus dem Extrazellulärraum, prozessieren diese in ihren Endosomen und präsentieren anschließend die Peptidfragmente der Pathogene als Antigene. Dadurch geben MHCs-II, im Gegensatz zu MHCs-I, im Regelfall keine Informationen über das Zytosol weiter, sondern über den Extrazellulärraum. Die MHCs-II werden ausschließlich von Th-Zellen mit dem TZR und CD4 erkannt.

Der Komplex von MHC-1/TZR und CD8, bzw. MHC-II/TZR und CD4 allein reicht allerdings immer noch nicht aus für eine erfolgreiche Signaltransduktion und folgende Aktivierung der T-Zellen. Es werden ebenfalls die Moleküle des CD3-Komplexes benötigt, der sich um den TZR herum assoziiert. Er besteht aus zwei Heterodimeren und einem Homodimer. Diese haben auf ihrer zytosolischen Seite ITAM's (ITAM = *immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*). Bindet nun z.B. ein MHC-

II/Antigen-Komplex an den TZR einer Th-Zelle, werden Tyrosinreste der ITAMs am CD-3 Komplex phosphoryliert. Damit wird eine Signaltransduktions-Kaskade in Gang gesetzt, während die Bindung und Signalstärke durch die gleichzeitige Bindung von CD4 an die  $\beta$ -Kette des MHC-II um ein vielfaches gesteigert wird.

Auf diese Aktivierung reagieren die Th-Zellen meistens mit der Ausschüttung der für sie spezifischen Zytokine, die nun die Immunantwort entsprechend modulieren können.

### 1.3 Th-Zellen:

Die primäre Aufgabe der Th-Zellen besteht nicht darin, Pathogene direkt zu bekämpfen, vielmehr sind sie die Koordinatoren der Immunantwort. Sie sorgen im Idealfall für eine effektive Bündelung der am Besten geeigneten Mechanismen und Immunzellen zur Bekämpfung des jeweiligen Erregers, die für die Abwehr eines Helminthen durchaus anders aussieht als bei einem intrazellulären Erreger wie einem Virus.

CD4<sup>+</sup> (wie auch CD8<sup>+</sup>) Zellen reifen im Thymus aus gemeinsamen Vorläuferzellen heran. Zuerst durchlaufen diese ein Stadium, in dem sie negativ für CD4 und CD8 sind. Daraufhin folgt ein doppelt positives Stadium, bis sie ihren endgültigen für CD4 oder CD8 einfach positiven Typ erreichen. Gleichzeitig erfolgt eine positive Selektion von Zellen, die vom Thymusepithel exprimierte MHCs mittelstark binden können. Bei zu starker oder schwacher Bindung an MHCs werden solche Zellen durch Apoptose eliminiert. Im späteren Verlauf erfolgt eine negative Selektion von Zellen, die mit von DZ präsentierten Autoantigenen des Körpers reagieren. Nur <5% der eingewanderten Thymozyten überleben diesen strengen Ausleseprozess und können, im Falle der Th-Zellen als naive Th-Zellen, in die Peripherie auswandern. Da sie jedoch noch keinen Kontakt zu ihrem Antigen hatten, sind sie noch nicht zu Effektor-Zellen ausdifferenziert.

Die naiven Th-Zellen zirkulieren nun zwischen dem Blut und den peripheren Lymphgewebe. Das Adhäsionsmolekül CD62L, das stark von naiven und nur schwach von reifen Effektor Th-Zellen exprimiert wird, ist ein Faktor, der den Eintritt über Hohe Endotheliale Venulen in die Lymphknoten vermittelt. In letztere wandern auch APZ ein, meistens Dendritische Zellen, nachdem sie in der Peripherie durch Aufnahme von Pathogenen aktiviert wurden. Auf dem Weg in den nächsten Lymphknoten reifen sie, so dass sie bei der Ankunft im Lymphknoten die für ihr Antigen spezifischen Lymphozyten aktivieren können. Sie treten kurz mit allen Lymphozyten in Kontakt, gehen aber nur mit derjenigen naiven Zelle mit einem spezifischen Rezeptor für ihr

Antigen eine längerfristige Bindung ein. Für die erfolgreiche Aktivierung, die zu einer Ausdifferenzierung zur Effektor Zelle und klonalen Expansion der Th-Zelle führt, sind neben der Bindung von TZR und CD4 an den MHC-II /Antigen Komplex noch Co-Stimulatorische Signale nötig. Diese werden z.B. von den B7 Molekülen auf Seite der APZ an das CD28 Molekül der naiven Th-Zelle vermittelt. Bei der erfolgreich durch eine APZ aktivierten naiven Th-Zelle entscheidet nun hauptsächlich das herrschende Zytokinmilieu über ihre Ausdifferenzierung in Richtung der verschiedenen reifen Effektor Zell-Subpopulationen.

#### 1.4 Die Subpopulationen der Th-Zellen:

Lange Zeit galt das Th1/Th2 Paradigma zur Unterteilung der T-Helferzellen als Erklärung der Phänomene unterschiedlicher Immunantworten (Mosmann et al. 1986). In den letzten Jahren wurde diese Hypothese durch die Entdeckung neuer T-Helferzell-Populationen erweitert, wie z.B. der Wiederentdeckung der Treg (Sakaguchi et al. 1995) und der Entdeckung der Th17-Zellen (Infante-Duarte et al. 2000; Park et al. 2005; Harrington et al. 2005).

##### 1.4.1 Th1:

Ausgereifte Th1 Zellen werden klassischerweise über die Produktion von IL-2, Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) und TNF definiert (Mosmann et al. 1986). Sie werden hauptsächlich mit der Immunität gegen intrazelluläre Erreger wie Viren, intrazelluläre Parasiten und Bakterien wie *Toxoplasma gondii* und *Listeria monocytogenes* in Verbindung gebracht. IFN- $\gamma$  ist ein potenter Makrophagen-Aktivator, der sie zur Phagozytose von Pathogenen, deren Abtötung und der Sekretion von antimikrobiellen Substanzen anregt (Stenger et al. 1994; Agnello et al. 2003). Zusätzlich vermittelt es den Isotypenwechsel von B-Zellen auf IgG2a. Dies steigert durch verstärkte Opsonisierung der Pathogene ebenfalls deren Phagozytose (Snapper and Paul 1987). Die Differenzierung von Th1 Zellen kann durch IFN- $\gamma$  und IL-12 induziert werden. IFN- $\gamma$  kann z.B. von NK Zellen bereit gestellt werden (Scharton and Scott 1993).

Typ I Zytokine wie IFN- $\gamma$  leiten ihre Signale nach Bindung an heterodimere Rezeptoren über JAK/STAT Komplexe weiter (Boulay et al. 2003). JAKs (Janus-Kinasen) sind Tyrosinkinasen, die nach Bindung des Zytokins dimerisieren, sich gegenseitig aktivieren und dabei den Zytokin-Rezeptor phosphorylieren. Letzterer kann nun STAT-Proteine (*signal transducers and activators of transcription*) binden und

phosphorylieren. Die so aktivierten STATs bilden Dimere, die nach Translokation zum Zellkern die Transkription bestimmter Gene initialisieren können (Ihle 1995; Levy and Darnell, Jr. 2002). IFN- $\gamma$  bindet auf diese Weise an den IFN- $\gamma$ -R (R = Rezeptor) und aktiviert über JAK-1 und -2 STAT1, was die Expression des T-box Transkriptionsfaktors T-bet induziert. Letzterer gilt als zentraler Faktor für die Th1-Differenzierung (Szabo et al. 2002). Zum einen wird nun die Produktion von IFN- $\gamma$  induziert, was für eine autokrine Verstärkung sorgen kann (Szabo et al. 2000), zum anderen wird die Expression der  $\beta$ 2-Kette des IL-12R hochreguliert, so dass dieser nun vermehrt auf der Zelle exprimiert wird (Afkarian et al. 2002). Für den kompletten IL-12R wird auch die IL-12R $\beta$ 1-Kette benötigt, die jedoch ohnehin konstitutiv exprimiert wird. Die Zelle wird jetzt empfänglicher für IL-12 (Weaver et al. 2007). IL-12 wird beispielsweise von aktivierten Makrophagen und DZ ausgeschüttet. Es aktiviert nach Bindung an seinem Rezeptor JAK2 und TYK2 (Bacon et al. 1995). Dies aktiviert seinerseits wiederum STAT4, ein Vorgang, der schließlich zusammen mit STAT1 die IFN- $\gamma$  Produktion weiter verstärkt. Zusätzlich wird die Expression der IL-18R $\alpha$  -Kette gesteigert. IL-12 unterstützt die endgültige Differenzierung zur Th1-Zelle und kann sie nun mit IL-18, auch ohne weitere TZR Stimulation zum Abschluss zu bringen (Yang et al. 1999).

#### 1.4.2 Th2:

Die definierenden Zytokine für Th2-Zellen sind IL-4, IL-5, IL-13 sowie (mittlerweile etwas strittiger) IL-6 und IL-10 (Mosmann et al. 1986). Von Th2 Zellen gesteuerte Antworten werden vor allem mit der erfolgreichen Bekämpfung von Helminthen und der Entstehung von allergischen Reaktionen, wie beim Asthma bronchiale, in Verbindung gebracht. IL-4 und auch IL-5 können den Isotypenwechsel von B-Zellen zu IgG1 in der Maus, IgG4 im Menschen sowie IgE in beiden Spezies (Snapper and Paul 1987) induzieren und eosinophile Granulozyten rekrutieren. IL-13 kann die Mastzellreaktion vermitteln (Weaver et al. 2007). Das wichtigste bekannte Zytokin für die Induktion der Th2 Differenzierung ist IL-4 (Le Gros et al. 1990; Swain et al. 1990). Seine primäre Herkunft in diesem Zusammenhang ist noch nicht völlig geklärt. Hinweise deuten auf NK1.1 Zellen, basophile Granulozyten und Mastzellen hin (Seder et al. 1991; Yoshimoto and Paul 1994; Shinkai et al. 2002; Min et al. 2004). Nach der Bindung von IL-4 an den IL-4 Rezeptor erfolgt durch die Phosphorylierung von JAK 1 und JAK 3, die Aktivierung von STAT6 (Wurster et al. 2000). Sie kann nun die

Expression des Zinkfinger-Transkriptionsfaktors GATA3 hochregulieren, dem zentralen Faktor der Th2-Differenzierung (Zheng and Flavell 1997;Kurata et al. 1999). GATA3 autoaktiviert nun seine eigene Expression und erleichtert somit gleichzeitig die Expression der Gene für IL-4, IL-5 und IL-13 über eine Öffnung der Chromatinstruktur (Yamashita et al. 2004). Gleichzeitig hemmt es die Expression für Faktoren der Th1 Differenzierung, wie STAT4 und die IL-12R $\beta$ 2 Kette (Ouyang et al. 1998;Ferber et al. 1999;Ouyang et al. 2000). GATA3 kann bereits nach einmaliger Stimulation seine eigene Expression so aufrecht erhalten, dass es, nunmehr IL-4 und STAT6 unabhängig, die Differenzierung zur Th2 Zelle ohne weitere äußere Stimuli fortsetzen kann (Ouyang et al. 1998). Ähnlich wie IFN- $\gamma$  bei Th1-Zellen, kann IL-4 bei Th2 für eine positive autoregulatorische Aktivierung der Zelle sorgen. Zusätzlich sind IRF-4 (*IRF= Interferon regulatory factor*) und NFAT (*Nuclear Factor of activated T-cells*) an der Differenzierung zu Th2-Zelle über eine Hochregulation der Transkription von IL-4 beteiligt (Lohoff et al. 2002;Rengarajan et al. 2002).

### 1.4.3 Th17:

Das neueste Mitglied der Th-Subpopulationen sind die Th17 Zellen. Sie verdanken ihren Namen der Produktion von IL-17 (oder IL-17A) und IL-17F als ausdifferenzierte Zellen und werden bisher zusätzlich durch die Produktion von Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) und IL-22 charakterisiert (Infante-Duarte et al. 2000;Liang et al. 2006). Es ist umstritten, ob sie auch IL-6 produzieren (Stockinger and Veldhoen 2007). Jedoch werden sie mit der erfolgreichen Bekämpfung von extrazellulären Bakterien wie *Klebsiella pneumoniae* (Happel et al. 2003) und *Streptococcus pneumoniae* (Malley et al. 2006) sowie von einigen Pilzen wie *Candida albicans* (Huang et al. 2004b) in Verbindung gebracht. Zusätzlich bieten sie passende Erklärungsmodelle für die Entstehung vieler Autoimmunerkrankungen wie der experimentellen allergischen Enzephalitis (EAE) (Langrish et al. 2005) (das Mausmodell für die Erforschung der Multiplen Sklerose), sowie der Kollagen induzierten Arthritis (CIA) (Hirota et al. 2007) (das Modell der rheumatoiden Arthritis). Diese Erkrankungen waren früher primär den Th1 Zellen zugeschrieben worden.

IL-17 ist außerdem in der Lage, Neutrophile Granulozyten zu rekrutieren und zu aktivieren (Weaver et al. 2007).

Unabhängig von Th17 Zellen wurde IL-17 auch in  $\gamma\delta$ -Th-Zellen, CD8+ Gedächtniszellen, Eosinophilen und Neutrophilen Granulozyten sowie Monozyten

nachgewiesen (Shin et al. 1999; Molet et al. 2001; Ferretti et al. 2003; Zhou et al. 2005; Lockhart et al. 2006). Ob und wie Th17-Zellen die B-Zellfunktion beeinflussen können, ist bisher noch nicht genau bekannt. Gezeigt wurde nur, dass IL-23 und IL-17A defiziente Mäuse leicht reduzierte IgG-Serum-Konzentrationen aufweisen (Nakae et al. 2002; Ghilardi et al. 2004).

Derzeit wird vermutet, dass für die Induktion der Differenzierung zur Th17 Zelle ein Zusammenspiel von IL-6 und Transforming-Growth-Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) notwendig ist. (Bettelli et al. 2006; Mangan et al. 2006; Veldhoen et al. 2006). TGF- $\beta$  kann nach Bindung an seinen Rezeptor Mitglieder der SMAD-Proteinfamilie aktivieren, die das Signal in den Zellkern weiterleiten (Rubtsov and Rudensky 2007). TGF- $\beta$  kommt in fast allen Körpergeweben vor und wird unter anderem von Epithelzellen produziert. IL-6 kann von aktivierten DZ sezerniert werden und leitet nach Bindung an den IL-6R sein Signal über JAK1 und STAT3 weiter (Diehl and Rincon 2002). Durch das Zusammenspiel beider Signalwege wird der Transkriptionsfaktor ROR $\gamma$ t (*retinoic orphan receptor  $\gamma$ t*) induziert. Man nimmt an, dass ROR $\gamma$ t ein zentraler Faktor für die Th17 Differenzierung ist, wie GATA3 oder T-bet für die Th2 und Th1 Differenzierung (Ivanov et al. 2006). ROR $\gamma$ t ist über bisher ungeklärte Mechanismen in der Lage, die Expression von IL-17 und der IL-23R-Kette des IL-23-Rezeptors hoch zu regulieren. Letzterer ist ein Mitglied der IL-12R-Familie, der für seine volle Funktionalität, wie der IL-12R, die IL-12R $\beta$ 1 Kette benötigt. IL-23 galt bisher für die Stabilisierung des Phänotyps als wichtig, im Sinne einer Zuständigkeit für die Expansion der bereits ausdifferenzierten Zellen und Steigerung ihrer Zytokinproduktion. (Aggarwal et al. 2003). IL-23 allein kann keine Th17 Zellen induzieren, verstärkt allerdings die Produktion von IL-22, IL-17A und IL-17F. Aufgrund neuester Erkenntnisse ist nun klar, dass ohne IL-23 keine Th-17 Zellen generiert werden können, die in der Lage sind, pathogene Reaktionen zu generieren, wie z.B. eine EAE. Nur mit IL-6 und TGF- $\beta$  differenzierte Zellen produzieren auch IL-10, wobei letzteres anscheinend für einen eher regulatorischen Phänotyp sorgt (s.u.) (McGeachy et al. 2007). Zusätzlich war bei nur mit TGF- $\beta$  und IL-6 differenzierten Zellen die Produktion von Chemokinen wie CCL5, CXCL10 und CCL2 vermindert, was beispielsweise auf eine verminderte Fähigkeit Makrophagen zu rekrutieren, spekulieren lässt.

Vor kurzem wurde auch ein Weg zur Th17 Differenzierung beschrieben, bei dem IL-6 als Kooperationspartner von TGF- $\beta$  durch IL-21 ersetzt wurde (Korn et al. 2007). Auch



IRF-4 wird für die Th17 Entwicklung benötigt (Brustle et al. 2007), wobei seine Beziehung zu ROR $\gamma$ t noch unklar ist.

#### **1.4.4 Th0:**

Bei der Differenzierung *in vitro* definiert man auch Th0 Zellen. Bei ihnen herrscht während der Reifung kein polarisierendes Zytokinmilieu vor, d.h. die Zellen werden praktisch nur über den TZR stimuliert. Sie produzieren per Definition die Th1 und Th2 Zytokine IFN- $\gamma$  und IL-4 auf niedrigem Niveau. Sie spielen *in vivo* vermutlich keine große Rolle, da praktisch immer ein polarisierendes Milieu vorherrscht. Für *in vitro* Experimente werden sie jedoch gerne zum Vergleich genommen, da sie ein basales, nicht polarisiertes Zytokin-Produktionsniveau aufzeigen.

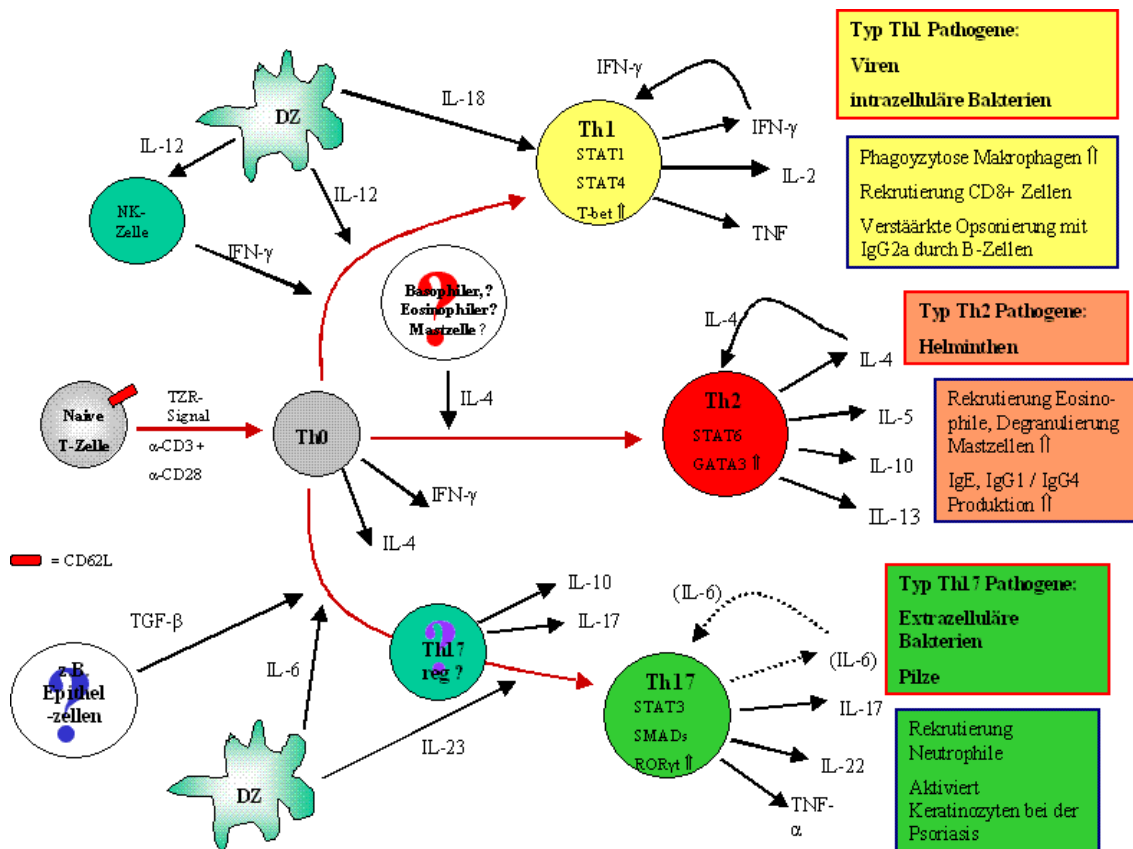
#### **1.4.5 Regulatorische Th-Zellen:**

Sie werden im nächsten Abschnitt eingehender beschrieben.

#### **1.4.6 Gegenseitige Hemmung der Subpopulationen:**

Die Hauptzytokine und Transkriptionsfaktoren einer Th-Subpopulation können die Polarisierung in Richtung anderer Populationen hemmen. So können z.B. Th2 Zytokine, wie IL-4, oder der zentrale Th2 Regulator GATA3 die Th17 (Bettelli et al. 2006) und Th1 Differenzierung hemmen. Das Th1 Zytokin IFN- $\gamma$  und sein zentraler Regulator T-bet hemmen die Th2 und Th17 Differenzierung usw.

**Differenzierung von Naiven Th-Zellen zu Th1-, Th2- und Th17 Effektorzellen:**



**Abbildung 1:**  
 Nach Erkennung ihres spezifisches Antigens über den TZR reifen naive Th-Zellen, dem vorhandenen Zytokinmilieu entsprechend, zu reifen Th-Effektor-Zellen heran. Die Zytokine werden von anderen Immunzellen als Antwort auf bestimmte Pathogene sezerniert. Die von den reifen Effektorzellen produzierten Zytokine können wiederum auto- und parakrin auf die Th-Zell-Differenzierung einwirken

1.5 T-Zell-abhängige Toleranz und Immunsuppression

1.5.1 Allgemeines:

Schon in den 1970er Jahren wurde die Existenz von aktiver Immunsuppression von Gershon und Kondo postuliert (Gershon and Kondo 1970;Gershon 1975). Allerdings wurde sie in den 1980er Jahren diskreditiert, da man weder die dafür zuständigen Zellen noch die molekularen Mechanismen finden konnte. Erst 1995 konnte die Hypothese der Immunsuppression aufgrund der Erstbeschreibung einer T-Zellpopulation mit hoher Expression der IL-2 Rezeptor  $\alpha$ -Kette (IL2R $\alpha$  = CD25) und der Fähigkeit zur aktiven Suppression dank Sakaguchi wieder etabliert werden (Sakaguchi et al. 1995).

Zur Aufrechterhaltung und Etablierung von Toleranz gegenüber Selbst- und Nichtselbst-Antigenen werden im Allgemeinen folgende Mechanismen gezählt: Induktion von zentraler Toleranz über positive und negative Selektion autoreaktiver

Zellen im Thymus, Induktion von peripherer Toleranz über Induktion von Apoptose oder Anergie, sowie Generierung von suppressiven regulatorischen Zellen im Thymus und der Peripherie.

Anergie kann dabei als Inaktivierung oder funktionelle Unempfindlichkeit verstanden werden. Sie kann über Stimulation des TZR mit mangelnden co-stimulatorischen Signal induziert werden. Sie induziert einen proximalen Signaltransduktions-Block, der die Zellen unfähig macht, Zytokine nach zukünftiger TZR Stimulation zu produzieren. Dieser Block kann allerdings mittels einer sehr starken Stimulation über Wachstumsfaktoren (z.B. IL-2) wieder gebrochen werden und somit die Zellen erneut Effektor-Funktionen ausführen lassen. Anergie Zellen sind, im Gegensatz zu regulatorischen Zellen, nicht in der Lage, andere Zellen in ihrer Proliferation zu supprimieren (Knoechel et al. 2006).

Regulatorische T-Zellen können sehr allgemein über eine suppressive Aktivität auf Immunantworten definiert werden, selbst über einen limitierten Zeitraum. Im spezielleren werden sie meistens *in vitro* darüber definiert, dass sie die Aktivierung, Expansion und Produktion von Zytokinen anderer CD4+ Zellen hemmen können und selber hyporeaktiv auf Stimulation durch Antigen reagieren.

Regulatorische T-Zellen werden mit verschiedenen Ebenen der Immunsuppression in Verbindung gebracht, wie etwa der Aufrechterhaltung der Selbst-Toleranz und der Verhinderung von Autoimmunerkrankungen (Sakaguchi et al. 1995) und Allergien (Akbari et al. 2003), der rechtzeitigen Beendigung von Immunantworten zur Verhinderung von Gewebeschädigungen, der Tolerierung von kommensalen Mikroorganismen (Mills 2004), der Tolerierung des Fötus` während der Schwangerschaft (Zenclussen 2006) und der Tolerierung von Organtransplantaten (Chai et al. 2005). Andererseits kann eine erhöhte Aktivität regulatorischer T-Zellen auch der Bekämpfung von Tumoren (Curiel et al. 2004) und der Eliminierung von Erregern während Infektionen im Weg stehen (Mendez et al. 2004).

Regulatorische T-Zellen sind Gegenstand aktueller Forschung, so dass auf diesem Gebiet noch viele Fragen offen sind, auch in Bezug auf die Anzahl und Art der verschiedenen existierenden Populationen. Aufgrund verschiedener Zytokin-Profile, Oberflächenmarker und vermutlicher Suppressionsmechanismen versucht man, die regulatorischen T-Zellen in folgende Subpopulationen einzuteilen:

### 1.5.2 Regulatorische Zellen:

#### 1.5.2.1 Nicht CD4+ regulatorische Zellen:

Nicht nur bei Th-Zellen wurden bisher immunregulatorische Funktionen gefunden, sondern auch bei NKT-Zellen, die IL-10 und TGF- $\beta$  produzieren (Sonoda et al. 2001),  $\gamma\delta$ -T-Zellen (Hayday and Tigelaar 2003), CD8+CD28- Zellen (Manavalan et al. 2004), vom Thymus stammende Treg ähnliche CD8+CD25+ Zellen (Cosmi et al. 2003) und CD3+CD4-CD8- Zellen (Zhang et al. 2001). Die Funktion dieser Zellen ist noch nicht abschließend geklärt, und sie sollen daher hier keine weitere Berücksichtigung finden.

#### 1.5.2.2 Natürliche Treg:

Natürliche Treg (nTreg) sind die am ausführlichsten charakterisierten regulatorischen Zellen. Sie reifen im Thymus heran, wenngleich die Einzelheiten ihrer Reifung noch nicht geklärt sind. Wird nur der zuerst gefundene Marker für diese Population herangezogen, der IL-2R $\alpha$  (CD25), machen sie 5-10% der peripheren CD4+ Zellen aus (Sakaguchi et al. 1995). Als konstitutiv CD25 exprimierende CD4+ Zellen sind sie ab Tag 3 nach der Geburt in Mäusen nachweisbar.

Auch CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte antigen-4*), die Oberflächenmoleküle GITR (*glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor*) und LAG-3 (*lymphocyte activation antigen-3*) sowie CD62L können zu ihrer Charakterisierung genutzt werden (Sakaguchi 2004;Huang et al. 2004a).

Allerdings haben alle diese Marker ein Problem: sie werden zumindest in geringeren Konzentrationen auch auf reifen Effektorzellen oder, wie CD62L, auf naiven Zellen exprimiert, was eine präzise Identifikation lange Zeit sehr erschwerte. Seit der Entdeckung des *forkhead box protein 3* (Foxp3), einem zur *Forkhead* Familie gehörenden Transkriptionsfaktor, gibt es, zumindest bei Mäusen, einen für Treg spezifischen Marker (Ziegler 2006). Im Menschen wird Foxp3 auch unspezifisch durch TZR Stimulation hochreguliert und ist somit ebenfalls ein Aktivierungsmarker, obwohl beim Menschen ebenfalls CD4+CD25+ Foxp3 exprimierende Zellen als Suppressorzellen fungieren können (Walker et al. 2003).

nTreg sind in der Lage, CD4+ und CD8+ T-Zellen in ihrer Aktivierung, Proliferation und Effektorfunktion zu supprimieren (Thornton and Shevach 1998;Piccirillo and Shevach 2001). B-Zellen werden in ihrer Proliferation, Immunglobulin-Produktion und im Isotypklassenwechsel gehemmt (Nakamura et al. 2004;Lim et al. 2005). Zusätzlich unterdrücken nTregs die zytotoxische Funktion von NK und NKT-Zellen und die

Reifung und Funktion von DZ (Azuma et al. 2003; Misra et al. 2004; Ghiringhelli et al. 2006).

Foxp3 ist der wichtigste Regulator für die Entwicklung und Funktion der nTreg (Fontenot et al. 2003; Hori et al. 2003). Männliche Mäuse mit defektem Foxp3 Gen, das auf dem X-Chromosom liegt, zeigen einen von Autoimmunität geprägten Phänotyp mit massiver Proliferation in lymphatischen Geweben und daraus resultierender Lymphadenopathie, Splenomegalie, Hepatomegalie und verfrühtem Tod im Alter von ca. 3 Wochen (Scurfy Syndrom) (Brunkow et al. 2001). Beim Menschen resultiert ein Defekt des Foxp3 Gen in IPEX (*immuno-dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome*) (Wildin et al. 2001).

Vom Phänotyp her zeigen sich nTreg *in vitro* anerg. Sie produzieren kein IL-2, reagieren nicht mit Proliferation durch TZR-Stimulation (Dieckmann et al. 2001) und sind zum Erhalt ihrer Population auf externes IL-2 angewiesen. TGF- $\beta$  ist das einzige Zytokin, das nTreg bevorzugt exprimieren, allerdings in größeren Konzentrationen auch nur zellständig auf der Zelloberfläche (Nakamura et al. 2001). Ihre Aktivierung erfolgt Antigen-spezifisch über ihren TZR (Karim et al. 2005), während sie ihre Suppression selber Antigen-unspezifisch vermitteln (Thornton and Shevach 2000).

Derzeit gibt es einige Hypothesen über den Mechanismus ihrer Suppression, die sich möglicherweise nicht gegenseitig ausschließen, sondern synergistisch zusammen wirken. Es ist ziemlich sicher, dass nTreg eine hohe räumliche Nähe zu ihren Responderzellen brauchen, um ihre Wirkung zu entfalten, da z.B. die Trennung der Populationen durch semipermeable Membranen in Transwell Experimenten die Suppression aufheben kann (Takahashi et al. 1998; Thornton and Shevach 1998). Modelle für Zell-Kontakt abhängige Suppression beinhalten eine Vermittlung über membranständiges TGF- $\beta$ , LAG-3 (CD223) sowie eine Interaktion von CTLA-4 mit CD80 und CD86 auf APZ (Sakaguchi 2004; Huang et al. 2004a). Auch direkte Zytotoxizität auf B- und T-Zellen über die Freilassung von Perforinen und Granzym A könnte eine Rolle spielen (Grossman et al. 2004). Eine andere Möglichkeit besteht in dem direkten Transfer von cAMP von nTreg über Gap junctions. Dieser Transfer könnte anschließend die Synthese von IL-2 in der Responderzelle verhindern (Bopp et al. 2007). Es werden auch Modelle für Zellkontakt-unabhängige Mechanismen diskutiert, wie die Konkurrenz für Zytokine und Wachstumsfaktoren im Mikromilieu, insbesondere für IL-2. Für letzteres haben nTreg eine höhere Affinität aufgrund der hohen Expression des IL-2R $\alpha$  /CD25. Es wurde gezeigt, dass durch erfolgreiche

Kompetition in Effektor-T-Zellen Apoptose aufgrund von Zytokinmangel initiiert werden kann (Pandiyani et al. 2007). Während lösliche Faktoren wie von der Zelle abgegebenes TGF- $\beta$  und besonders IL-10 *in vivo* sicher Suppression vermitteln können (Annacker et al. 2001), spielt diese Art der Suppression für nTreg *in vitro* offenbar keine große Rolle (Shevach et al. 2006).

### 1.5.2.3 Erworbene Tregs im Allgemeinen:

Während man bei nTreg davon ausgeht, dass sie bereits bei Verlassen des Thymus` voll ausdifferenziert sind und einen stabilen Phänotyp besitzen, gibt es einige in der Peripherie induzierbare Zellen, die teils nur einen transienten regulatorischen Phänotyp aufweisen könnten. Zu den permissiven Bedingungen für die Generierung dieser Zellen gehören z.B. suboptimale Stimulation durch das spezifische Antigen (Apostolou and von Boehmer 2004), die Anwesenheit immunsuppressiver Zytokine wie IL-10 und TGF- $\beta$  (Chen et al. 2003) oder eine Stimulation durch un- bzw. halb-reife DZ (Mahnke et al. 2002). Leider ist auch hier die Nomenklatur noch im Fluss.

### 1.5.2.4 CD4+CD25+Foxp3+ induzierte Treg:

CD4+CD25- T-Zellen können mittels TGF- $\beta$  und IL-2 sowie Stimulation des TZR und CD28 in der Peripherie in CD4+CD25+ regulatorische Zellen konvertiert werden (Liang et al. 2005). Diese sind im ausgereiften Stadium nicht von nTreg zu unterscheiden, denn sie exprimieren genauso wie diese CD25, CTLA-4, GITR und LAG-3 sowie intrazelluläres Foxp3. Im Gegensatz zu nTreg scheinen sie aber auf die Zuführung von TGF- $\beta$  zur Aufrechterhaltung ihres Phänotyps angewiesen zu sein (Floess et al. 2007), denn ohne TGF- $\beta$  behält *in vivo* und *in vitro* nur ein Bruchteil der Zellen den Foxp3+CD25+GITR+ Phänotyp, während ihn die meisten innerhalb von 2-4 Tagen verlieren (Selvaraj and Geiger 2007). Da wir in dieser Arbeit mit TGF- $\beta$  induzierten regulatorischen T-Zellen gearbeitet haben, werden sie im Folgenden der Einfachheit halber iTreg genannt.

TGF- $\beta$  induziert nicht in allen Fällen regulatorische T-Zellen. So ist es faszinierend, dass die gleichzeitige Anwesenheit von IL-6 wie z.B. im Rahmen einer Entzündungsreaktion, die Induktion von iTreg komplett inhibiert und die Zellen (s.o.) statt dessen in Richtung Th17 differenzieren (Weaver et al. 2006). IL-6 inhibiert dabei die Foxp3 Expression abhängig von STAT3 (Yao et al. 2007; Yang et al. 2007).

TGF- $\beta$  unterstützt die Immunregulation auch durch die Inhibierung der Th1 und Th2 Differenzierung (Gorelik et al. 2000;Laouar et al. 2005). Seine Bedeutung und die der iTreg wurden in verschiedenen Mausmodellen mit Defekten im TGF- $\beta$  Signalweg anhand der Entwicklung von Autoimmunität bestätigt (Rubtsov and Rudensky 2007). Auch nTreg können direkt die Konvertierung naiver Th-Zellen zu CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Zellen vermitteln, was infektiöse Toleranz genannt wird (Jonuleit et al. 2002).

#### **1.5.2.5 Th3:**

Th3 Zellen wurden erstmals Mitte der 90er Jahre im Rahmen von Studien zur oralen Toleranz beschrieben, als im Darm durch Kontakt mit Fremdanigen entstehende und selber Toleranz induzierende Zellen. Sie zeichnen sich nach TZR Stimulation primär durch TGF- $\beta$  Produktion mit variabler Produktion von IL-4 und IL-10 sowie fehlender IFN- $\gamma$  und IL-2 Produktion aus (Inobe et al. 1998). Induziert werden können diese Zellen *in vitro* über Kultivierung mit TGF- $\beta$  und IL-4. Es wird angenommen, dass sie den Isotypwechsel zu IgA unterstützen (Weiner 2001). Das Verständnis über sie wird auch dadurch erheblich erschwert, dass ihre Charakterisierung vor der Entdeckung von Foxp3 stattfand und sie aufgrund ihrer schlechten proliferativen Eigenschaften kaum auf Oberflächenmarker untersucht wurden. Allerdings sollen sie CTLA-4 exprimieren (Chen et al. 1998), was ihre Abgrenzung zu nTreg und iTreg weiter erschwert.

Derzeit werden sie wohl als selbstständige Population definiert, die auf TZR Stimulation hauptsächlich TGF- $\beta$  sezerniert und dadurch ihrerseits Foxp3<sup>+</sup> Zellen generiert, die CD25<sup>+</sup> oder CD25<sup>-</sup> sind und wie nTreg andere Zellen in ihrer Proliferation hemmen können (Stassen et al. 2004;Carrier et al. 2007b). Daher wird Th3 Zellen eine Aufgabe bei der peripheren Stabilisierung des Phänotyps von Treg zugeschrieben (Carrier et al. 2007a).

#### **1.5.2.6 Tr1:**

Tr1 Zellen werden über die Produktion von IL-10 auf hohem Niveau gekennzeichnet, mit oder ohne Produktion von TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$  und IL-5, sowie niedriger bis fehlender IL-2 und IL-4 Produktion. Tr1 Zellen sind Foxp3 negativ (Vieira et al. 2004) und haben potente immunsuppressive Eigenschaften. Es wurde gezeigt, dass sie von Th1-Zellen dominierte Immunkrankheiten (Groux et al. 1997;Cong et al. 2002;McGuirk and Mills 2002b) und Th2 Antworten unterdrücken können (Cottrez et al. 2000). Dies geschieht über einen Mechanismus, der teilweise abhängig von der Produktion von IL-10 und

TGF- $\beta$  ist (Groux et al. 1997; Cottrez et al. 2000). Es wird angenommen, dass Tr1 Zellen ihre immunsuppressiven Eigenschaften hauptsächlich über IL-10 vermitteln (Barrat et al. 2002). Allerdings sind die einzelnen molekularen Mechanismen noch nicht klar.

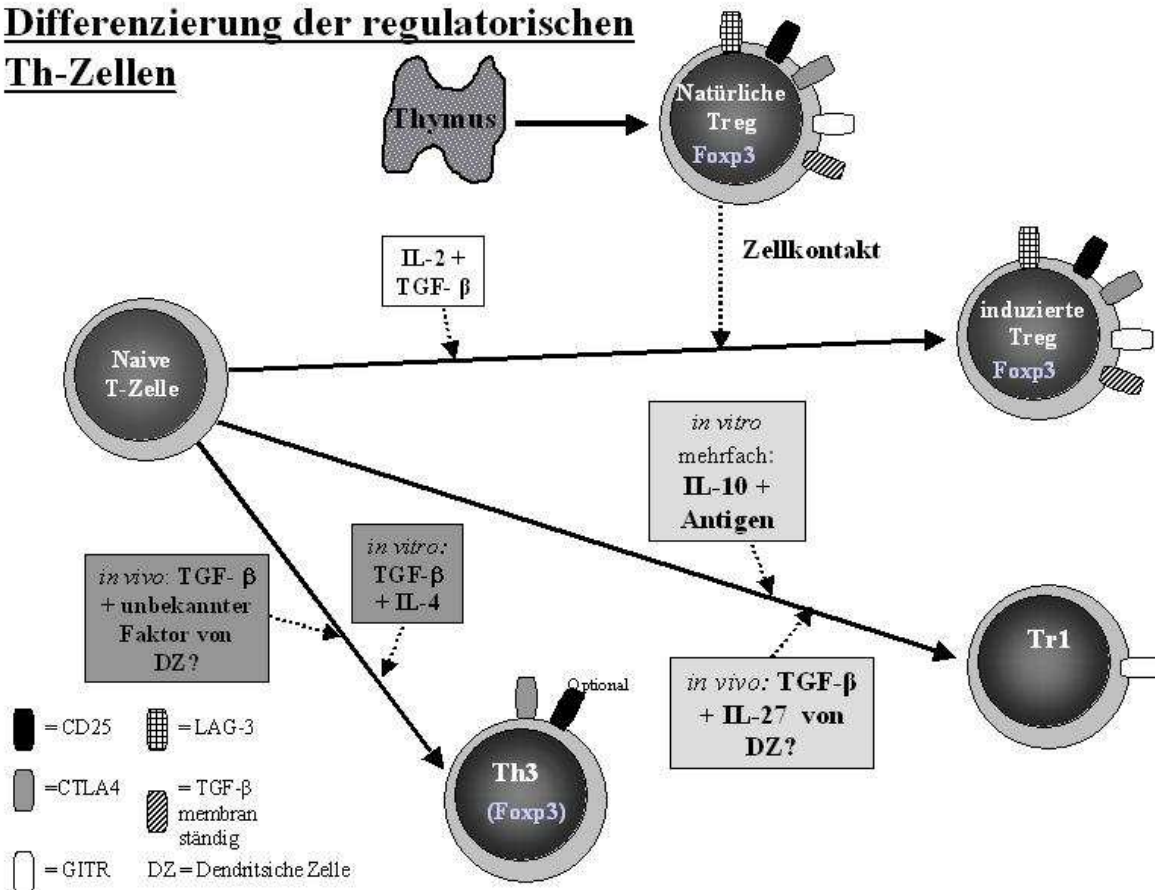
Tr1 Zellen wird eine Rolle bei der Tolerierung von Organtransplantaten (VanBuskirk et al. 2000), der Induktion von Toleranz gegenüber Allergenen wie Graspollen (Nouri-Aria et al. 2004) und der Aufrechterhaltung der Immunhomöostase gegenüber der enterischen Flora zugesprochen (Cong et al. 2002). Es konnte z.B. auch gezeigt werden, dass sie *in vivo* die Induktion einer EAE verhindern können (Barrat et al. 2002; Wildbaum et al. 2002). Allerdings wird auch eine überhöhte Sterblichkeit an *Mycobacterium tuberculosis* mit der Anwesenheit von anergen IL-10 produzierenden, möglicherweise Tr1 Zellen assoziiert (Boussiotis et al. 2000). Tr1 Zellen werden ebenfalls in erhöhter Konzentration in Lymphknotenmetastasen vom Mamma-, Pankreaskarzinom und dem malignen Melanom gefunden (Chakraborty et al. 1999; Liyanage et al. 2002; Viguier et al. 2004).

Bisher ist kein zentraler, spezifischer Transkriptionsfaktor für die Differenzierung zur Tr1 Zelle bekannt, wie GATA3 für Th2 oder T-bet für Th1 (Awasthi et al. 2007). Auch Tr1 Zellen exprimieren GITR, während die Expression von CTLA-4 unklar ist.

Induziert werden können sie *in vitro* über mehrfache Stimulation mit IL-10 und Antigen (Groux et al. 1997), und/oder durch unreife DZ (Jonuleit et al. 2000). Auch eine Differenzierung in Gegenwart von Vitamin D3 und Dexamethason führt zu IL-10 produzierenden Tr1 Zellen (Barrat et al. 2002), die Foxp3 negativ sind und ihre Suppression IL-10 abhängig vermitteln (Vieira et al. 2004). Alle diese Ansätze zur *in vitro* Induktion hatten in der Vergangenheit offenbar aber das Problem, dass die Zellen sehr schlecht proliferierten. Eine Lösung scheint nun in der Form von IL-27 gefunden worden zu sein, da gezeigt werden konnte, dass IL-27 im Zusammenspiel mit TGF- $\beta$  zu der Differenzierung von gut proliferierenden, IL-10 produzierenden Tr1 Zellen führt (Awasthi et al. 2007). Faszinierend dabei ist, dass bei diesem Modell die IL-27 Produktion durch DZ veranlasst wurde, die ihrerseits zuvor von Treg modifiziert worden waren.



**Differenzierung der regulatorischen Th-Zellen**



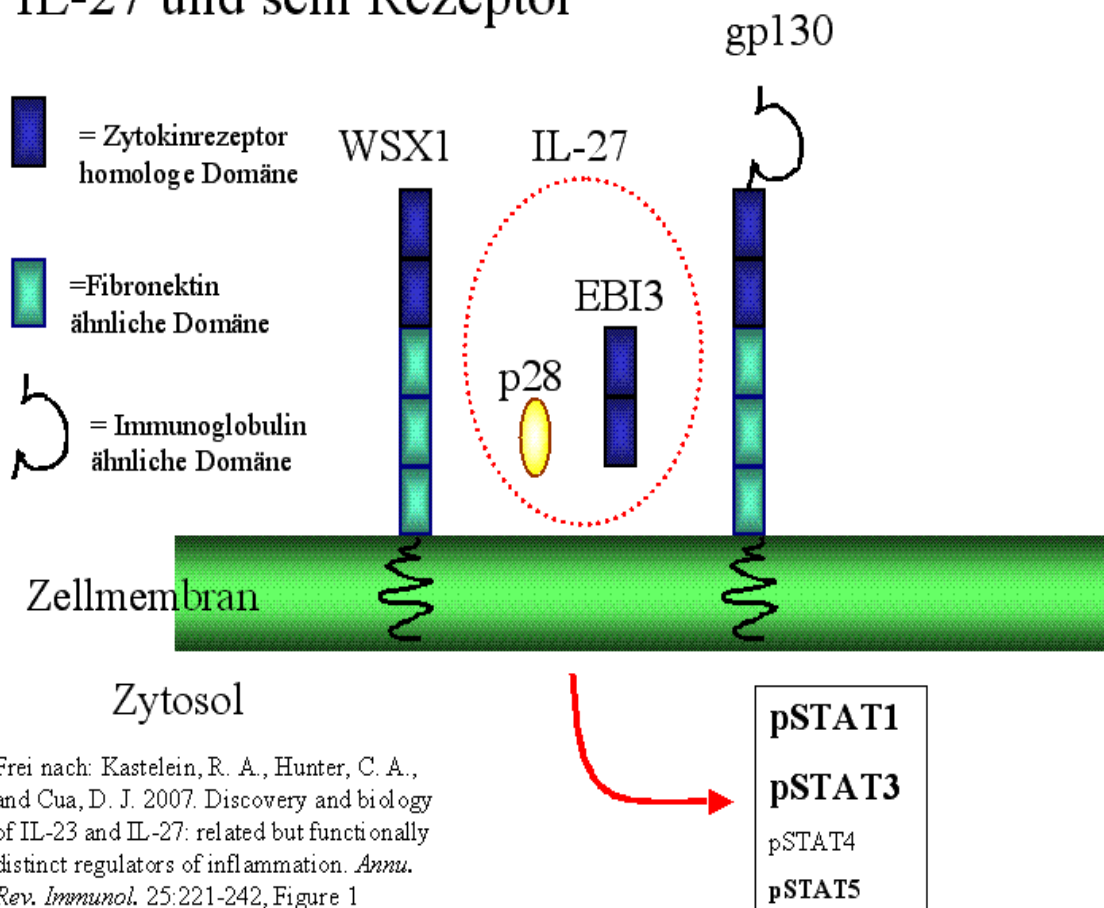
**Abbildung 2:**  
 Modell zur Entstehung der verschiedenen regulatorischen Th-Zellen. Während Natürliche Treg im Thymus heranreifen, können induzierte Treg, Th3 und Tr1 Zellen in der Peripherie aus Naiven T-Zellen induziert werden. DZ = dendritische Zelle. CD25, CTLA4, LAG-3, GITR und TGF-β sind Oberflächenmarker zur Charakterisierung unterschiedlicher Subtypen von regulatorischen T-Zellen.

1.6 Interleukin-27:

IL-27 ist ein heterodimeres Zytokin, das aus den zwei Untereinheiten p28 und Epstein-Barr induziertem Gen 3 (Ebi3) besteht. Die p28-Kette ähnelt der IL-12 Untereinheit p35 und besitzt eine klassische Zytokinstruktur. Währenddessen ähnelt Ebi3 der IL-12 p40 Untereinheit und ist von der Struktur her dem löslichen IL-6 Rezeptor alpha (IL-6Rα) nahe (Pflanz et al. 2002). IL-27 wird hauptsächlich von APZ exprimiert, und die Produktion beider Untereinheiten kann durch Liganden von Toll-like Rezeptoren, wie LPS, Poly I:C und intakten Escherichia coli, induziert werden (Pflanz et al. 2002;Wirtz et al. 2005;Schnurr et al. 2005). Die Untereinheit p28 kann durch IFN-γ hochreguliert werden, während dies bei Ebi3 durch Signalübertragung über CD40L und IL-1β möglich ist (Schnurr et al. 2005;Liu et al. 2007a).

Der IL-27 Rezeptor besteht aus einer spezifischen IL-27R $\alpha$  Kette, die auch WSX-1 oder TCCR (TCCR = *T-cell cytokine receptor*) genannt wird, sowie gp130, ein Signaltransduktionsmolekül. gp130 wird auch von den Zytokinen IL-6 und IL-11 genutzt. Während IL-27 in der Lage ist, sich auch in Abwesenheit von gp130 an die  $\alpha$ -Kette des IL-27R zu binden, kann eine erfolgreiche Signaltransduktion nur in Anwesenheit beider Untereinheiten erfolgen (Pflanz et al. 2004)[Pflanz 2004]. Die IL-27R $\alpha$  Kette wird ausschließlich auf Immunzellen wie T-Zellen, NK Zellen, Mastzellen, Monozyten, neutrophilen Granulozyten und B-Zellen exprimiert (Pflanz et al. 2004;Wirtz et al. 2005). Das höchste Expressionsniveau erreicht IL-27R $\alpha$  dabei bei den T-Lymphozyten (Effektor-, Regulatorischen- und Gedächtniszellen) (Villarino et al. 2005). IL-27 aktiviert nach Bindung an seinen Rezeptor STAT1, STAT3, STAT4 und STAT5 (Lucas et al. 2003).

### IL-27 und sein Rezeptor



**Abbildung 3:** IL-27, sein Rezeptor und die folgenden Aktivierungswege

IL-27 ist in der Lage, die Differenzierung zu Th2 über eine Blockade der Expression von GATA3 zu hemmen (Yoshimoto et al. 2007). Ebenso werden Th17 Zellen in ihrer Differenzierung inhibiert (Batten et al. 2006; Stumhofer et al. 2006). Beide suppressiven Effekte sind abhängig vom STAT1 Signaltransduktionsweg. Zusätzlich wird über diesen Weg auch die IL-2 Produktion während der Th1 Differenzierung sowie unter Th0 Bedingungen vermindert, was abhängig von der Induktion von *suppressor of cytokine signaling 3* (SOCS3) ist (Owaki et al. 2006b; Villarino et al. 2006d). Über STAT1 ist IL-27 auch in der Lage, T-bet zu induzieren, was die frühe Th1 Differenzierung unterstützen kann (Takeda et al. 2003). Allerdings zeigte sich, dass Mäuse ohne den IL-27R durchaus in der Lage sind, eine Th1 Antwort aufzubauen, die z.B. ausreicht, um die Parasiten-Vermehrung bei einer *Toxoplasma gondii* Infektion zu unterdrücken, wenn eventuell etwas verzögert. Allerdings entwickelten diese Mäuse eine tödliche Th-Zell-abhängige entzündliche Erkrankung im ZNS (Villarino et al. 2003). Auch die Infektion mit *Leishmania donovani* in IL-27R defizienten Mäusen resultiert in guter Th1 vermittelter Beseitigung des Parasiten, jedoch ebenfalls zur Entwicklung einer schweren Immunpathologie in der Leber (Rosas et al. 2006).

Eine Erklärung für den von hyperaktiven Immunantworten geprägten Phänotyp der IL-27R defizienten Maus bieten nun neuste Erkenntnisse: nämlich, dass IL-27 über einen STAT3 abhängigen Mechanismus ausgeprägt IL-10 induzieren kann (Stumhofer et al. 2007).

### 1.7 Thema der Arbeit:

Aufgrund der ambivalenten bereits beschriebenen Eigenschaften von IL-27, einerseits als Th1 permissiver Faktor, andererseits als immunsuppressives Agens *in vivo*, interessierte uns sein Effekt auf die Differenzierung der am Besten untersuchten regulatorischen Th-Zell Population der Tregs. Im Speziellen wollten wir den Effekt von IL-27 auf die Entstehung von iTreg aus *ex vivo* isolierten CD4<sup>+</sup> Zellen untersuchen. Da IL-27 wie IL-6 in der Lage ist, STAT3 zu aktivieren und für IL-6 bereits gezeigt werden konnte, dass es die Expression von Foxp3 STAT3 abhängig inhibiert, spekulierten wir auf einen ebenso inhibitorischen Effekt von IL-27 auf die Foxp3 Expression. Im Falle eines inhibitorischen Effektes von IL-27 auf die Foxp3 Expression wollten wir auch untersuchen, ob eine transiente Herunterregulation von STAT3 mit siRNA diesen Effekt umkehren könnte.

Zusätzlich sollten die mit IL-2, TGF- $\beta$  und IL-27 differenzierten Zellen auf ihren Phänotyp genauer untersucht werden. Dabei interessierte uns besonders der Vergleich der so entstandenen Zellen bezüglich ihrer suppressiver Fähigkeiten auf andere CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Responderzellen im Vergleich zu nTreg und iTreg, sowie das von den Zellen sezernierte Zytokinmuster.

## 2 Methoden

### 2.1 Isolierung von Mauszellen *ex vivo*

#### 2.1.1 Präparation der Maus und Herstellung einer Leukozytensuspension

Die Lymphknoten (LKs) und die Milz wurden den getöteten Mäusen separat unter sauberen Bedingungen entnommen, in eisgekühltem BSS zwischengelagert und fortan unter möglichst sterilen Bedingungen weiterbearbeitet.

Getrennt voneinander wurden die LKs und die Milz mit BSS auf ein Sieb in eine Petrischale gegossen und anschließend mit einem ausgekochten Stempel vorsichtig durch das Sieb gerieben, wobei die Kapseln der LKs zuerst mit einer Schere aufgebrochen wurden. Die so gewonnenen Zellsuspensionen wurden abzentrifugiert. Im Anschluss wurde die Milzsuspension nach Verwerfen des Überstandes in 5 ml Erylyse-Puffer bei RT resuspendiert und für 5 min inkubiert. Es folgte die Unterschichtung der Zellsuspension mit 2 ml FCS und sofortiger Zentrifugation, so dass sich die noch intakten Zellen im Pellet am Röhrchenboden sammelten, während die fragmentierten Erythrozyten oberhalb des dichteren FCS blieben. Anschließend wurden die Milz- und LK-Zellsuspensionen gemischt, nochmals in BSS gewaschen (= in BSS resuspendiert und bei 1500 rpm zentrifugiert) und anschließend in 7 ml PBS 1%FCS aufgenommen. Schließlich wurde die Zellzahl mithilfe eines kleinen Aliquots frisch aufsuspendierter Zellen in der Neubauerzählkammer bestimmt.

### 2.2 Positive Selektion von CD4<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>Zellen mittels *magnetic cell sorting* (MACS)

#### 2.2.1 Prinzip:

Da sich in der aus der Milz und den LKs gewonnener Zellsuspension noch reichlich andere Leukozyten befinden, müssen sie erst aussortiert werden, bevor man Experimente mit einer reinen Th-Zellsuspension ausführen kann. Das kann durch *Magnetic Cell Sorting* (MACS) geschehen. Dazu werden gegen Oberflächenmarker gerichteten AK verwendet, an welche Eisenkügelchen konjugiert sind. Wenn man die Suspension über eine mit Metallkügelchen befüllten Säule innerhalb eines starken Magnetfeldes gibt, werden die so markierten Zellen zurückgehalten. Wird der Durchfluss ohne markierte Zellen weiterverwendet, handelt es sich um eine positive Selektion für die nicht markierten Zellen. Alternativ kann die Säule anschließend aus dem Magnetfeld genommen und die nun nicht mehr im Magnetfeld zurückgehaltenen

Zellen aus der Säule eluiert werden. Diese Vorgehensweise entspricht einer negativen Selektion für die nicht markierten Zellen.

Für die Gewinnung von CD4+CD62L+ Zellen wird für beide Marker nacheinander jeweils eine positive Selektion durchgeführt und zwischendurch ein Release Reagenz zur Entfernung der Kügelchen verwendet.

### 2.2.2 Durchführung:

#### 2.2.2.1 Vorbereitung der Zellsuspension:

Der Pre-Separations-Filter (Filtergröße 30  $\mu\text{m}$ ) wurde mit 1 ml PBS/1%FCS äquilibriert und danach die gepoolte Zellsuspension über den Filter gegeben und aufgefangen, um eine Einzelzellsuspension zu erhalten.

Röhrchen und Filter wurden mit PBS/1%FCS nachspült und daraufhin abzentrifugiert. Die Puffer wurden zu diesem Zeitpunkt eisgekühlt gehalten, um die Zellen Stoffwechsel-inaktiv zu halten.

#### 2.2.2.2 Markierung der CD4+ Zellen

Die Zellen wurden anschließend in einer Konzentration von 100-150 Mio./ 1ml PBS/1%FCS bei 4°C aufgenommen, mit  $\alpha$ -CD4-FITC 1:500 gefärbt und 10 min bei 4°C inkubiert. Es folgten zwei Waschschrte mit MACS-Puffer bei 4°C. Das Pellet wurde nun in einer Konzentration von genau  $100 \times 10^6$  Zellen / 100  $\mu\text{l}$  MACS Puffer aufgenommen. Die Pipettenspitze wurde in einem FACS-Röhrchen mit etwas PBS/1%FCS ausgespült. Diese Suspension wurde am FACS gemessen, um den Anteil der CD4+ Zellen zu ermitteln.

Im Anschluss erfolgte eine Markierung der Zellsuspension von  $100 \times 10^6$  Zellen / 100  $\mu\text{l}$  MACS Puffer mit  $\alpha$ -FITC-beads aus dem Multisort Kit in einer Verdünnung von 1 : 5 für 15 min bei 4°C. Entsprechend der theoretischen Gesamtzahl der CD4+ Zellen (Anteil x Gesamtzahl) wurde die benötigte Anzahl an LS-Säulen determiniert. Schließlich wurden die Zellen nochmals zweimal mit 7 ml MACS-Puffer bei RT gewaschen, um überflüssige Beads zu entfernen.

#### 2.2.2.3 Positive Selektion mit der LS-Säule:

Die LS Säule wurde mit 3 ml MACS-Puffer bei RT äquilibriert. Das beim letzten Waschschrte übrig gebliebene Pellet wurde in 3 ml MACS-Puffer bei RT resuspendiert. Nun wurde 1 ml nach dem anderen auf die Säule gegeben, so dass möglichst viele markierte Zellen bei relativ geringen hydrostatischen Druck im Magnetfeld blieben. Das Röhrchen wurde mit 2 ml MACS-Puffer gespült und diese ebenfalls in 1 ml Schritten auf die Säule gegeben, um ein Einsinken des Pegels in die Säule zu gewährleisten und

damit den Zellverlust zu minimieren. Danach wurde die Säule zweimal mit 3 ml MACS-Puffer gespült, um weitgehend alle nicht magnetisch gebundenen Zellen zu entfernen.

Die Säule wurde aus dem Magnetfeld genommen und die markierten CD4<sup>+</sup> Zellen anschließend mit 5 ml MACS-Puffer und einem Stempel aus der Säule gelöst. Es folgte die Bestimmung der Reinheit der CD4<sup>+</sup> Zellen am FACS. Die Reinheit musste über 96% betragen, falls nicht, war es erforderlich die Zellsuspension nochmals über eine frische LS-Säule zu geben. Es folgte eine Zellzahlbestimmung.

#### 2.2.2.4 Behandlung mit Release Reagenz:

Die Zellsuspension wurde erneut zentrifugiert und daraufhin in einer Konzentration von  $50-100 \times 10^6$  Zellen / 1 ml MACS-Puffer RT aufgenommen. Dazu wurde „Release Agent“ in einer Verdünnung von 1: 50 zugegeben und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Inkubation mit Release Agent war nur erforderlich, wenn mit CD62L<sup>+</sup> Zellen gearbeitet werden sollte. Durch diese Behandlung wurde das über einen Linker an die AK gebundene Eisen (Beads) enzymatisch abgespalten. Zur Entfernung der Beads und des Release Agent wurden die Zellen zweimal mit 7 ml MACS-Puffer 4°C gewaschen.

#### 2.2.2.5 Markierung und Selektion der CD62L<sup>+</sup> Zellen:

Die CD4<sup>+</sup> Zellen wurden in einer Konzentration von  $50 \times 10^6$  Zellen / 300 µl MACS-Puffer aufgenommen und mit den α-CD62L-beads in einer Konzentration von 1:70 für 15 min bei 4°C inkubiert. Daraufhin erfolgten wieder zwei Waschschrte mit 7 ml MACS-Puffer. Währenddessen wurde die nächste LS-Säule mit 3 ml MACS-Puffer äquilibriert.

Die mit α-CD62L-beads markierten Zellen wurden erneut in 3 ml MACS-Puffer resuspendiert und anschließend wie in 2.2.2.3. beschrieben, über die Säule aufgereinigt. Es folgte eine Zellzahlbestimmung und die Messung der Reinheit in einer mit CD62L-PE gefärbten Probe. War die Reinheit > 98%, konnte die Zellsuspension von CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> Zellen abzentrifugiert werden, um sie dann in einer Konzentration von  $2 \times 10^6$  Zellen / 1 ml Zellkulturmedium aufzunehmen. Bei einer niedrigeren Reinheit musste die Zellsuspension nochmals in derselben Weise über eine frische LS-Säule gegeben werden.

## 2.3 Stimulierung und Polarisierung der Zellen

### 2.3.1 Prinzip:

Sie soll den Kontakt und die folgende Aktivierung von naiven Th-Zellen mit ihrem spezifischen Antigen simulieren, wie zum Beispiel im Lymphknoten durch dendritische Zellen und Makrophagen. Dazu wird bei den Th-Zellen mit einem Signal-übermittelnden Antikörper ( $\alpha$ -CD3) in Abwesenheit weiterer Zellen der T-Zell-Rezeptor stimuliert, während über  $\alpha$ -CD28 das zur T-Zell-Aktivierung nötige co-stimulatorische Signal dargeboten wird. Die Zugabe entsprechender Zytokinen sorgt für die Polarisierung in die gewünschte Richtung.

### 2.3.2 Durchführung:

Am Tag zuvor sollte man bereits eine entsprechende Anzahl Näpfe von 24er Napf Zellkulturplatten mit 5  $\mu$ g/ml  $\alpha$ -CD3 in 500  $\mu$ l beschichtet haben. Das Beschichtungs-Medium wurde nun entfernt, und die Näpfe mussten jeweils nacheinander mit 1 / 1,5 / 2 ml BSS gewaschen werden..

Die Zellen wurden jeweils in einer Konzentration von 0,8 bis  $1 \times 10^6$  pro Napf eingesetzt, in einem Endvolumen von 1 ml Zellkulturmedium, das schließlich mindestens folgendes enthielt:

Grundbedingungen (entspricht Th0)

$\alpha$ -CD3 5  $\mu$ g/ml immobilisiert am Napfboden

$\alpha$ -CD28 2,5  $\mu$ g/ml löslich im Kulturmedium

$\alpha$ -IL-4 10%,  $\alpha$ -IFN- $\gamma$  8  $\mu$ g/ml

rh-IL-2 50 U/ml:

Wo indiziert, wurden zusätzlich Zytokine in folgenden Konzentrationen hinzugegeben:

rh-TGF- $\beta$ 1 2 ng/ml

rm IL-6 50 ng/ml

rm IL-27 0,2 / 1 / 5 / **20** / 100 ng/ml

Wenn bei IL-27 keine Konzentration angegeben wurde (siehe Ergebnisteil), sind 20 ng/ml eingesetzt worden.

Die Zellen wurden unter den jeweils für das Experiment benötigten Konstellationen in dieser Weise für bis zu 72 h polarisiert, bzw. teilweise schon nach 24h oder 48h weiter



verwendet. Wo indiziert, wurden nach 24, 48 und 72h 150 µl Kulturüberstand für die Zytokinbestimmung im ELISA abgenommen.

## 2.4 Transfer und Restimulation

### 2.4.1 Prinzip:

Physiologischerweise trennt sich die naive T-Zelle nach spätestens 72h von den umgebenden APZ und verlässt den Lymphknoten. Daraufhin erfolgt die klonale Expansion durch autokrine IL-2 Produktion, die hier durch externe humane-IL-2 Gabe unterstützt wird. Die Restimulation mit  $\alpha$ -CD3 simuliert die erneute Begegnung der Th-Zelle mit ihrem Antigen in der Peripherie.

#### 2.4.2.1 Durchführung Transfer:

Nach 72h Polarisierung wurden die Zellen in jedem einzelnen Napf resuspendiert, auf zwei Nöpfe einer frischen Platte aufgeteilt, das Volumen mit Zellkulturmedium erneut auf 1 ml aufgefüllt und 50 U/ml rh IL-2 pro Napf hinzugefügt. Nach 48 h konnten die Zellen dann restimuliert werden, um ihren Phänotyp auf die gewünschte Weise zu testen.

#### 2.4.2.2 Durchführung Restimulation:

Zur Restimulation wurden nach den besagten 48h die Zellen aus allen Nöpfen eines Ansatzes in ein frisches Röhrchen überführt und dreimal mit BSS gewaschen, um alle Zytokine aus dem Medium zu entfernen.

Schließlich wurden die Zellen in 24er Napf Kulturplatten für 5 h  $5 \times 10^5$  bis  $1 \times 10^6$  Zellen in 1 ml Zellkulturmedium restimuliert, die am Vortag mit  $\alpha$ -CD3 5 µg/ml in 500 µl Zellkultur Beschichtungs-Puffer beschichtet worden waren. Die Konzentration der eingesetzten Zellen schwankte hier aufgrund der unterschiedlichen Proliferation der verschiedenen Ansätze. Allerdings wurde innerhalb eines Experimentes exakt dieselbe Anzahl von Zellen eines Ansatzes pro Napf eingesetzt, um eine Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Ansätzen zu gewährleisten.

## 2.5 Isolierung von CD4+CD25-, CD4+CD25+ Zellen für Proliferationsassays

### 2.5.1 Prinzip:

Für die Gewinnung von CD4+CD25-, CD4+CD25+ wurde ein MACS System verwendet, bei dem CD4+ Zellen zuerst mit Depletionssäulen angereichert wurden. Dies geschah durch eine negative Selektion für CD8a, CD11b, CD45R, CD49b und

Ter-119, was in einer Reinheit von CD4<sup>+</sup> Zellen von ca. 95% resultierte. Anschließend erfolgte eine positive Selektion für CD25<sup>+</sup> Zellen.

### 2.5.2 Durchführung:

#### 2.5.2.1 Anreicherung der CD4<sup>+</sup> Zellen:

Das Protokoll des Herstellers wurde vollständig befolgt (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Regulatory T-Cell Isolation Kit, mouse). Eine Leukozytensuspension wurde nach 2.1.1 und 2.2.2.1 hergestellt. Die angegebenen Volumina gelten für das Arbeiten mit bis zu 10<sup>7</sup> Leukozyten.

Nach der Aufarbeitung und dem Auszählen der Zellen wurden sie zentrifugiert und der Überstand vollständig verworfen. Das Pellet wurde nun in 40 µl MACS-Puffer / 10<sup>7</sup> Zellen resuspendiert und 10 µl Biotin AK Cocktail pro 10<sup>7</sup> Zellen hinzugefügt. Es folgte eine Inkubation von 10 min, 4°C. Im Anschluss wurden 30 µl MACS-Puffer, 20 µl anti-Biotin-Beads sowie 10 µl anti-CD25-PE AK pro 10<sup>7</sup> Zellen hinzugefügt und 15 min bei 4°C im Dunklen inkubiert. Es folgte ein Waschschrift, bei dem erst 2 ml MACS-Puffer hinzugefügt wurden, dann eine Zentrifugation mit anschließendem vollständigen Verwerfen des Überstandes. Die Zellen wurden in 500 µl MACS-Puffer pro 1,25x10<sup>8</sup> Zellen aufgenommen, während gleichzeitig die LD-Säule mit 2 ml MACS-Puffer äquilibriert wurde. Sobald das Reservoir der Säule leer war, konnte die Zellsuspension auf die Säule pipettiert und die unmarkierten Zellen konnten aufgefangen werden. Durch Waschschriffe mit zweimal 1 ml MACS-Puffer wurden die restlichen unmarkierten Zellen aus der Säule gelöst. Mit einer kleinen Probe aus dem Durchfluss war es nun möglich, eine FACS-Messung zur Reinheitskontrolle durchzuführen.

#### 2.5.2.2 Positive Selektion der CD25<sup>+</sup> Zellen:

Die isolierten CD4<sup>+</sup> Zellen wurden zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 90 µl MACS-Puffer resuspendiert und 10 µl anti-PE-Beads hinzugefügt. Es folgte eine 15 minütige Inkubation bei 4°C im Dunkeln. Die Zellen wurden nun durch Zugabe von 2 ml MACS-Puffer und anschließender Zentrifugation gewaschen, und der Überstand wurde abermals verworfen. Für den nächsten Separationsschritt wurde eine Suspension aus 500 µl MACS-Puffer pro 10<sup>8</sup> Zellen hergestellt. Die MS-Säule wurde mit 500 µl MACS-Puffer äquilibriert, bevor die Zellsuspension ohne Schaum in ihr oberes Reservoir gefüllt wurde. Nachdem das Reservoir wieder leer war, konnte darauf nacheinander 500 µl MACS-Puffer zum Auswaschen der nicht-markierten Zellen gegeben werden.

Zum Eluieren der markierten Zellen wurde die Säule aus dem Magnetfeld entfernt und auf ein geeignetes Sammelgefäß gegeben. Es wurden 1 ml MACS-Puffer auf das obere Reservoir gegeben und die Flüssigkeit sofort mit dem Stempel durchgepresst, um die Zellen aus der Säule zu lösen. Da das auf diese Weise erhaltene Eluat meistens nicht die gewünschte Reinheit aufwies, wurde die so gewonnene Suspension in gleicher Weise nochmals über eine MS-Säule gegeben und ihre Reinheit im Anschluss im FACS gemessen. Der Durchfluss der ersten Säule wurde ebenfalls im FACS gemessen und als CD4+CD25- Responderzellen für den Proliferationsassay verwendet.

## 2.6 Herstellung von APZ für Proliferationsassays

### 2.6.1 Prinzip:

Für die Gewinnung von APZ zur Stimulation der Zellen im Proliferationsassay wird eine Leukozytensuspension aus einer Milz gewonnen, und aus ihr werden CD4+ und CD8+ Zellen aussortiert. Das geschieht mittels negativer Selektion mit  $\alpha$ -CD8-FITC, anti-CD4-PE AK, sowie anti-FITC und anti-PE-Beads. Anschließend werden die Zellen bei 25 Gy bestrahlt, um sie an einer weiteren Proliferation zu hindern.

### 2.6.2 Durchführung:

Bei der Gewinnung einer Leukozytensuspension für die Aufreinigung von CD4+CD25+ und CD4+CD25- Zellen wurde ca. 1/3 der von Erythrozyten befreiten Milzsuspension für die Gewinnung von APZ abgetrennt. Nach Bestimmung der Zellzahl wurde eine Suspension von 500  $\mu$ l PBS/1%FCS pro  $10^6$  Zellen hergestellt, mit  $\alpha$ -CD8-FITC 1:500 und  $\alpha$ -CD4-PE 1:500 gefärbt und für 15 min bei RT im Dunklen inkubiert. Es folgte ein Waschschriff mit MACS-Puffer. Anschließend wurden die Zellen in 100  $\mu$ l MACS-Puffer aufgenommen und  $\alpha$ -FITC-Beads sowie  $\alpha$ -PE-Beads wurden in einer Verdünnung von 1:5 hinzugegeben. Es folgte eine weitere Inkubation von 15 min mit einem anschließenden Waschschriff mit MACS-Puffer. Eine LD-Säule wurde mit 2 ml MACS-Puffer äquilibriert und daraufhin die in 500  $\mu$ l MACS-Puffer aufgenommenen Zellen auf das obere Reservoir gefüllt. Die Säule wurde danach wie gewohnt zweimal mit je 1 ml MACS-Puffer nachgespült, um unmarkierte Zellen auszuwaschen. Eine kleine Probe des Durchflusses wurde im FACS gemessen und konnte bei einer Reinheit von > 96% weiter verwendet werden.

Anschließend wurden die Zellen in  $1 \times 10^6$ /ml Zellkulturmedium aufgenommen und mit 25 Gy bestrahlt.

## 2.7 Intrazelluläre Zytokin Färbung für FACS Messungen (ICS = *Intracellular cytokine staining*)

### 2.7.1 Prinzip:

ICS ist eine Methode, um Zytokinproduktionen individueller Zellen innerhalb einer Population am FACS zu messen. Mit dem Produkt des Pilzes *Eupenicillium brefeldianum* (Brefeldin A) kann der anterograde Transport von Proteinen wie Interleukinen aus dem Endoplasmatischen Reticulum in den Golgi Apparat und somit ihre Freisetzung verhindert werden. Brefeldin A wird zum gewünschten Zeitpunkt für ca. 4 Stunden zur Zellkultur hinzugegeben. Anschließend werden die Zellen fixiert. Um das Anfärben von den nun intrazellulären Interleukinen zu ermöglichen, werden die Zellmembranen mit dem pflanzlichen Detergenz Saponin aufgeschlossen. Nun können mit Fluoreszenzfarbstoffen konjugierte Antikörper in Zytoplasma und Kern eindringen, an die Interleukine binden und somit eine Messung ermöglichen.

### 2.7.2 Durchführung:

#### 2.7.2.1 Fixierung der Zellen:

Zu den Zellen wurde 4h vor der Färbung Brefeldin A in einer Konzentration von 1: 1.000.000 hinzugegeben.

Nach dem Ende der Inkubation wurden Zellen aus den Näpfen eines Ansatzes in ein frisches Röhrchen überführt. Anschließend erfolgte ein Waschschriff mit eisgekühltem PBS, um die Stoffwechselaktivität herunterzufahren. Nun wurden die bis  $2 \times 10^6$  Zellen/ml in 2% Formaldehyd für 20h RT fixiert. Es folgte ein Waschschriff mit PBS 1%FCS. Jetzt wurden max.  $2 \times 10^6$  Zellen pro 1 ml in PBS 1% FCS aufgenommen.

#### 2.7.2.1 Färbung:

Dazu wurden 150–300  $\mu$ l Zellsuspension in ein FACS-Röhrchen überführt. Von nun an musste nicht mehr steril gearbeitet werden. Es folgten zwei Waschschriffe mit Saponinpuffer. Jetzt konnten die Zellen in den ca. 100  $\mu$ l Restmenge des Saponinpuffers mit den gewünschten Antikörpern gefärbt werden. In der Regel wurde 1  $\mu$ l AK-Lösung pro Röhrchen eingesetzt. Eine Probe sollte zur Kontrolle ungefärbt bleiben, und bei mindestens einer Probe musste eine Isotypen-Kontrolle (ein Antikörper gleichen Isotyps mit irrelevanter Spezifität) gefärbt werden, um zu kontrollieren, ob die Zellen nicht unspezifisch den Fc-Teil von Antikörpern auf ihren Oberflächen binden können. Dabei sollten die Anweisungen des Herstellers beachten werden, meistens erfolgte eine Inkubation für 20 min, RT, im Dunklen. Eine Ausnahme war die CTLA-4-PE Färbung, die 20 min auf Eis gefärbt wurde.

Es folgte ein Waschschrift mit Saponinpuffer, danach einer mit PBS/1%FCS. Zur Messung wurden die Zellen in 200–300 µl PBS/1%FCS aufgenommen und auf Eis gelagert, bevor sie im FACS gemessen wurden.

## 2.8 Oberflächenfärbung von CD25:

Für die Färbung des Oberflächenmarkers CD25 wurde auf die Zugabe von Brefeldin A verzichtet, zudem wurden die Zellen nicht fixiert, sondern lebend gefärbt. Es entfielen auch alle Waschschriffe mit Saponin, da keine Zellmembran für das Eindringen von Färbeantikörpern durchlässig gemacht werden musste. Stattdessen wurden die Zellen geerntet, einmal in PBS/1%FCS gewaschen und direkt im Anschluss mit CD25-CY und Isotype-PE in PBS/1%FCS 20 min auf Eis gefärbt. Vor der FACS-Messung erfolgten noch zwei Waschschriffe mit PBS/1%FCS

## 2.9 Durchflusszytometrie oder Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)

Mit der Durchflusszytometrie kann man mit der Hilfe eines Lasers die Emission von verschiedenen optischen Signalen messen. Sie werden erzeugt, wenn der Laser eine Zelle passiert. Die sich in Lösung befindlichen Zellen werden durch eine Kapillare gesaugt und passieren einzeln den Laserstrahl. Die Zelle emittiert nun immer ein Streulicht sowie Fluoreszenzimpulse, falls zuvor eine Behandlung mit einem entsprechend markierten AK stattgefunden hat. So können primär folgende Parameter bestimmt werden:

Das Vorwärtsstreulicht FSC (*Forward Scatter*), das durch Beugung des Lichts hervorgerufen wird und als Maß für die Zellgröße dienen kann.

Das Seitwärtsstreulicht SSC (*Side Scatter*), das durch die Brechung des Lichts hervorgerufen wird und ein Maß für die Granularität der Zelle ist, abhängig von z.B. Größe und Struktur des Zellkerns. Zusätzlich können in unserem Fall drei Fluoreszenzen erfasst werden: FITC, PE und CY.

Zur Auswertung werden nun die verschiedenen Parameter auf die X- oder Y- Achse eines Graphen gelegt. Die gemessenen Zellen erscheinen je nach Darstellung meistens als „Wolken“ von Zellpopulationen, wobei es möglich ist z.B., eine Vorauswahl der darzustellenden Zellen aufgrund von Granularität und Größe zu treffen.

## 2.10 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

### 2.10.1 Prinzip:

Durch den ELISA wird eine indirekte quantitative Bestimmung verschiedenster Produkte in Flüssigkeiten über eine Enzymreaktion möglich. Im ersten Schritt wird ein für das zu messende Zytokin spezifischer 1. AK im ELISA-Beschichtungs-Puffer an die Matrix der ELISA-Platten gebunden. Anschließend werden unspezifische Protein-Bindungsstellen mit einem proteinhaltigen Blockierungspuffer abgesättigt. Danach wird das quantitativ zu untersuchende Zytokin in Lösung zugegeben. Im nächsten Schritt wird nochmals ein für das Zytokin spezifischer, biotinylierter AK im Überschuss zugegeben. Mit Streptavidin, das mit Biotin eine der stärksten biologischen nicht-kovalenten Bindungen eingeht, wird das Nachweis-Enzym (hier: Alkalische Phosphatase) an den 2. AK gekoppelt. Im letzten Schritt wird das Substrat, PNPP, zugegeben, das sich nun durch die Alkalische Phosphatase in ein gelbes wasserlösliches, im Photometer bei 405 nm messbares Endprodukt umwandelt. Dies ist eine Form eines der Michaelis Menten Kinetik unterliegenden Sandwich-ELISAs.

### 2.10.2 Durchführung:

Für den TNF- $\alpha$  ELISA wurde das „BD OptEIA™ Set Mouse TNF (mono/poly)“ Kit vom Fermentas verwendet und die Anweisungen des Herstellers befolgt.

Für IL-2 und für IFN- $\gamma$  ELISAs wurde der 1. AK wurde in einer Konzentration von 0,5  $\mu\text{g/ml}$  für IL-2 bzw. 1,5  $\mu\text{g/ml}$  für IFN- $\gamma$  in 50  $\mu\text{l}$  pro Napf in 96er Napf ELISA-Platten über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach wurden die Platten zweimal mit ca. 200  $\mu\text{l}$  Waschpuffer pro Napf gewaschen und zwischendurch auf Zellstoff ausgeklopft, um flüssige Überreste möglichst vollständig zu entfernen. Es folgte eine Inkubation von 2 h mit 200  $\mu\text{l}$  ELISA-Blockierungspuffer pro Napf. Daraufhin folgten 2 Waschschrte.

Jetzt konnten die Proben in entsprechender Verdünnung in PBS/3%BSA, sowie die Verdünnungsreihe des bekannten Standards in Triplikaten oder Duplikaten mit 40  $\mu\text{l}$ /pro Napf pipettiert und über Nacht bei 4°C inkubiert werden. Es folgten 4 Waschschrte. Der biotinylierte 2.AK wurde mit 100 $\mu\text{l}$  in einer Konzentration von 0,05 $\mu\text{g/ml}$  in PBS/3%BSA für 45 min inkubiert. In der als „Blank“ bezeichneten Probe befand sich nur 100  $\mu\text{l}$  PBS/3%BSA. Es folgten sechs Waschschrte.

Jeder Napf wurde nun mit 100  $\mu\text{l}$  Streptavidin-AKP 1 : 10000 in PBS/3%BSA zügig befüllt (nur PBS/3%BSA im Blank). Die Inkubation betrug max. 15 min. Bei längeren Inkubationszeiten bindet der Streptavidin-Alkalische Phosphatase Komplex zunehmend

unspezifisch, was nur die Extinktion des Leerwertes erhöht und eine Bestimmung niedriger Konzentrationen unmöglich macht. Es folgten acht Waschschrte.

Zum Entwickeln wurden alle Näpfe zügig mit 100  $\mu$ l 1 mg/ml PNPP in sowie  $\alpha$ -CD3 und  $\alpha$ -CD28 zu beenden. Es folgte eine Ruhephase in Zellkulturmedium im Brutschrank für 2-3 h ohne Zytokine. Anschließend wurden die Zellen ohne oder mit 20 ng/ml IL-27 für 20, 60 oder 120 min stimuliert und Diethanolaminpuffer befüllt. Die Messung erfolgte bei einer Testwellenlänge von 405 nm, bei einer Referenzwellenlänge von 490 nm im ELISA-Reader. Optimale Messwerte wurden meistens nach 45-60 min erzielt. Aus den Extinktionswerten der Standardverdünnungsreihe konnte nun eine Eichgerade ermittelt werden, die als Grundlage zur Berechnung der unbekanntes Zytokinkonzentrationen diene.

## 2.11 Phosphorylierungs-Studien von STAT Proteinen:

### 2.11.1 Stimulation der Th-Zellen

Zu Überprüfung der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren STAT1 und STAT3 durch IL-27 wurden wie in 2.1 bis 2.2.2.3 isolierte CD4+ Zellen 24h nach Polarisierung unter Th0 Bedingung mit oder ohne TGF- $\beta$  geerntet und in BSS gewaschen, um die Stimulierung durch Zytokine anschließend sofort zu Schockpellets weiterverarbeitet, um eine Quantifizierung der STAT Proteine im Western Blot vorzunehmen.

### 2.11.2 Gewinnung von Schockpellets für Proteinlysate und RNA-Gewinnung:

#### 2.11.2.1 Prinzip:

Zellen können zur längerfristigen Lagerung in flüssigen Stickstoff schockgefroren werden. Diese Methode verhindert die Ausbildung von Eiskristallen, die sonst die zellinternen Strukturen zerstören würden.

#### 2.11.2.2 Durchführung:

Die Zellen wurden zum gewünschten Zeitpunkt geerntet und in ein 15ml Röhrchen überführt. Es folgten zwei Waschschrte mit eisgekühltem PBS, um enzymatische Reaktionen in den Zellen zu stoppen. Alternativ hätten die Zellen jetzt ohne Schockgefrierung direkt weiterverwendet werden können. Für die Weiterverarbeitung zu einem Schockpellet wurden die Zellen jedoch in der nach dem Dekantieren übrig gebliebenen Flüssigkeit resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorf Gefäß überführt. Es folgte eine Zentrifugation für 10 min bei 2000 Rpm und 4°C. Der flüssige Überstand wurde vorsichtig mit einer Pipette abgezogen und das Zellpellet daraufhin in flüssigen

Stickstoff schockgefroren, bevor es bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur Weiterverwendung gelagert wurde.

### **2.11.3 Herstellung von Gesamtzell-Proteinlysaten**

#### 2.11.3.1 Prinzip:

Die Zellen werden mit Hilfe eines Ultraschallbades aufgeschlossen. Proteinase-Inhibitoren im Lysepuffer sollen dabei den Selbstverdau durch zelleigene Proteasen hemmen. Hier werden PMSF, Chymostatin, Pepstatin A, Aprotinin und Leupeptin verwendet.

#### 2.11.3.2 Durchführung:

Zuerst wurde der Lysepuffer für Gesamtzell-Lysate frisch angesetzt und auf Eis gelagert.

Die Zellen wurden geerntet und mit eisgekühlten PBS gewaschen, da proteinhaltige Puffer den Inhalt der Lysate verfälschen könnten. Nach dem letzten Dekantieren wurde das Pellet im möglichst geringen Rücklauf suspendiert und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Es folgte eine Zentrifugation von 10 min, 2000 Rpm,  $4^{\circ}\text{C}$  und eine Entfernung des Überstandes.

Das Pellet wurde nun in 200-500  $\mu\text{l}$  Lysepuffer für  $1 \times 10^7$  Zellen suspendiert und für 15 min im Ultraschall-Wasserbad bei  $4^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Direkt im Anschluss wurde für 15 min, 15000 Rpm,  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert und der Überstand mit den gelösten Proteinbestandteilen in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Das Pellet mit den unlöslichen Resten wurde verworfen. Die Proben wurden sofort schockgefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert werden, um Proteasen am weiteren Verdau zu hindern.

### **2.11.4 Proteinbestimmung nach Pierce**

#### 2.11.4.1 Prinzip:

Um z. B. im Western Blot verschiedene Zellextrakte qualitativ und quantitativ vergleichen zu können, sollte die eingesetzte Gesamtproteinmenge der verschiedenen Proben gleich sein. Um die Menge zu bestimmen, wird die Proteinbestimmung nach Pierce eingesetzt.

Proteine reduzieren in alkalischer Umgebung  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^{1+}$ , was zu einer Farbänderung führt (Biuret Reaktion). Da sich das Ausmaß dieser Änderung über weite Bereiche (20-2000  $\mu\text{g/ml}$ ) proportional zur Konzentration der Proteine verhält, ist die Bestimmung des Proteingehalts anhand eines bekannten Standards möglich.



### 2.14.2 Durchführung:

Für den Standard wurden 1 mg/ml BSA in PBS verwendet. Es folgte eine Verdünnungsreihe von 1:2 mit Dupli- bis Triplikaten in einem Endvolumen von 20 µl in einer 96er Well ELISA Platte. Für den Blank-Wert wurde ein Triplikat nur mit 20 µl PBS befüllt. Aufgrund der gewöhnlich nur geringen Probenmenge wurde hier überwiegend eine Einfachbestimmung durchgeführt, beginnend mit einer 1:4 Verdünnung in PBS, daraufhin 1:8; 1:16; 1:32, ebenfalls im Endvolumen von 20 µl.

Schließlich wurden pro Well 180 µl 1:50 Reagenz A und Reagenz B hinzugefügt, die zuvor im Verhältnis 1:50 angemischt wurden. Nach einer Inkubation von 30 min bei 37°C konnte die Platte bei 550 nm im „ELISA-Reader“ abgelesen werden. Die Auswertung erfolgt wie beim ELISA über das Erstellen einer Standardkurve.

## **2.11.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese:**

### 2.11.5.1Prinzip:

Die Gelelektrophorese basiert auf dem unterschiedlichen Wanderungsverhalten von Molekülen wie Proteinen, RNA, DNA aufgrund ihrer unterschiedlichen Größen und Nettoladungen im elektrischen Feld. Man verwendet Gele anstatt freier Lösungen, weil sie Konvektionsströme aufgrund von kleineren Temperaturgradienten verhindern und die Auflösung verbessern, da sie gleichzeitig als Molekularsiebe wirken. In dieser Arbeit wurden Gele ausschließlich für Western Blots verwendet.

Polymerisiertes Acrylamid bildet gewebeartige Strukturen aus, die mit zunehmender Konzentration immer dichter werden. - Die Porengröße ist daher leicht zu variieren. Zusätzlich sind die Strukturen leicht herzustellen und chemisch inert. APS und TEMED werden als Katalysatoren für die Polymerisation benötigt. Der Zusatz des negativ geladenen Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) sorgt dafür, dass die Eigenladung der Proteine überdeckt wird. Somit werden die natürlichen Ladungen der Proteine vernachlässigbar und nur noch aufgrund ihrer Masse aufgetrennt. Beim Anlegen von Gleichstrom wandern alle Proteine zur Kathode, wobei kleinere Proteine schneller durch das Molekularsieb des Gels wandern. Zusätzlich werden Taschen in einem Sammelgel mit geringerem Polyacrylamidanteil verwendet, um die Proben anzukonzentrieren, ehe im Trenngel die eigentliche Separation erfolgt.

### 2.11.5.2 Durchführung:

#### 2.11.5.2.1 Vorbereitung der Proben:

Es wurden jeweils 5 µg Protein pro Probe eingesetzt, bestimmt nach Pierce im Proteinlysate, in einem Endvolumen von 20 µl. Für jede Probe wurde das benötigte Volumen Proteinlysate mit 5 µl 4x Puffer in ein Reaktionsgefäß pipettiert und das fehlende Volumen mit Aqua bidest. ergänzt. Disulfidbrücken der Proteine wurden durch β-Mercaptoethanol im 4xPuffer gespalten. Die Proben wurden für 5 min bei 95°C auf dem Heizblock gekocht, um Sekundär- und Tertiärstrukturen durch das Unterbrechen von Wasserstoffbrücken aufzubrechen. Zur Abkühlung wurden die Proben auf Eis gestellt und vor dem Einsetzen in die Probentaschen nochmals zentrifugiert.

#### 2.11.5.2.2 Herstellung des Gels und Auftrennung der Proben:

Es wurde ein 12%iges Trenngel aus 1,6 ml H<sub>2</sub>O, 2 ml 30% Acrylamide Mix, 1,3ml 1,5 M TRIS pH 8,8; 50 µl 10% SDS, 50 µl APS & 2 µl TEMED zusammengemischt, wobei als letztes TEMED zugesetzt wurde, weil mit ihm die Polymerisation beginnt. Das Trenngel wurde zwischen die dafür vorgesehenen Glasplatten gegossen und mit wenig Isopropanol überschichtet, um Luftblasen zu entfernen.

Nach der Auspolymerisation konnte das Isopropanol mit Löschpapier entfernt werden und ein Sammelgel aus 1,4 ml H<sub>2</sub>O, 0,33 ml 30% Acrylamide Mix, 0,25 ml 1 M TRIS pH 6,8, 20 µl 10% SDS, 20 µl 10% APS und 2 µl TEMED hergestellt werden. Nach dem Überschichten des Trenngels mit dem Sammelgel wurde ein taschenbildender Kamm in das Sammelgel gesteckt.

Das festgewordene, fertige Gel wurde nach Anleitung in die mit Laufpuffer gefüllte Strom-Kammer gestellt und der Kamm vorsichtig entfernt. Nach Reinigung der Taschen konnten die Proben und Marker nun vorsichtig mit der Hamilton-Pipette in die Geltaschen gegeben werden. Sie sanken aufgrund einer höheren Dichte auf den Boden der Taschen.

Zur Durchwanderung der Proteine durch das Sammelgel wurde eine Spannung von 80 V angelegt. Nachdem die Proben die Grenze zwischen Sammelgel und Trenngel erreicht hatten, wurde die Spannung auf 120 V erhöht. Die Wanderung der Proteine ist anhand des im Probenpuffer enthaltenen Farbstoffes Bromphenolblau zu erkennen. Nach ca. 2h waren meist die ersten Proteine bis zum Ende des Gels gelaufen und der Lauf wurde beendet.

## 2.11.6 Western-Blot

### 2.11.6.1 Prinzip:

Das Western Blotting dient zur semi-quantitativen Identifikation von einzelnen Proteinen aus komplexen Proteingemischen. Die über eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine werden vom Gel auf eine Membran übertragen (hier: Nitrocellulose), wodurch sie für einen gegen das gesuchte Protein gerichteten Erstantikörper besser zugänglich werden. Ein mit einem Enzym markierter Zweitantikörper bindet an den Erstantikörper und kennzeichnet das gesuchte Protein. Hier katalysiert eine an den Zweitantikörper gekoppelte Peroxidase die Spaltung von Diacylhydrazid in alkalischer Umgebung unter Lichtfreisetzung. Das ist ein Nachweis mittels Chemolumineszenz. Ein chemischer Beschleuniger wie Phenol kann dabei die Emission um ein mehrfaches steigern. Die Dokumentation erfolgte bei diesem Verfahren mit der Kodak Photo Station.

### 2.11.6.2 Durchführung:

#### 2.11.6.2.1 Blotten:

Zuerst wurden pro Blot 6 Bögen Whatman-Papier und 1 Bogen Nitrocellulose auf die Gelgröße zugeschnitten und anschließend in Transferpuffer eingelegt. Dabei musste mit Handschuhen gearbeitet werden, um keine Kontaminationen durch Proteine der Haut zu verursachen.

Drei Whatman-Papiere wurden nun nacheinander luftblasenfrei im Blotter aufeinandergeschichtet. Es folgte das kurz im Transferpuffer geschwenkte Gel und daraufhin die Nitrocellulose. Den Abschluss bildeten noch mal drei Lagen Whatman-Papier. Luftblasen mussten vermieden werden, weil sie ein gleichmäßiges Blotten verhindern.

Nun wurden 1,5 mA pro cm<sup>2</sup> für ca. 75 min angelegt. Der Erfolg des Blottens sollte anhand des Farb-Markers kontrolliert werden, der sichtbar aus dem Gel auf die Nitrocellulose gewandert sein musste. Anschließend wurde die Nitrocellulose für min. 1,5 h im Blockpuffer inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren.

#### 2.16.2.2 Behandlung mit Antikörpern:

Grundsätzlich sollten die empfindlichsten und in geringsten Mengen vorhandenen Proteine zuerst nachgewiesen werden, falls ein Nachweis mehrerer Proteine nacheinander unbedingt erforderlich war. Nach der Inkubation im Blockpuffer konnten

die gewünschten Erstantikörper in ca. 3 ml Blockpuffer pro Blot verdünnt werden. Der Blot wurde mit der Proteinseite nach unten luftblasenfrei auf die Erstantikörper-Verdünnung gegeben und über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurde der Blot dreimal für 10 min auf dem Schüttler mit Waschpuffer gewaschen. Die Inkubation mit Zweitantikörper erfolgte ebenfalls in 3 ml Blockpuffer pro Blot, wie beim Erstantikörper, allerdings für 2h bei Raumtemperatur. Es folgten drei Waschschrte.

Verwendete Verdünnungen von Erstantikörpern und passenden Zweitantikörpern:

1. AK	Verdünnung	2. AK	Verdünnung
rabbit-anti-mouse-Phospho-STAT3(Tyr 705), polyklonal	1:500	goat-anti-rabbit-IgG, HRP linked	1:1000
mouse-anti-mouse-STAT3(124H6), monoklonal	1:500	goat-anti-mouse-IgG, HRP linked	1 :1000
rabbit-anti-mouse-STAT3, polyklonal	1:500	goat-anti-rabbit-IgG, HRP linked	1:1000
rabbit-anti-mouse-STAT1(Ser727), polyklonal	1:500	goat-anti-rabbit-IgG, HRP linked	1:1000
rabbit-anti-mouse-Phospho-STAT1(Tyr701), polyklonal	1:500	goat-anti-rabbit-IgG, HRP linked	1:1000
anti-mouse- $\beta$ -Actin	1:1000	goat-anti-rabbit-IgG, HRP linked	1:1000

2.11.6.2.3 Entwicklung mit enhanced chemoluminescent (ECL):

Es wurden 1 ml Super Signal West Femto Luminol/Enhancer Solution mit 1 ml Stable Peroxide Buffer direkt vor der Entwicklung gemischt, auf eine saubere Unterlage gegeben, der Blot mit der Proteinseite nach unten darauf gegeben und für 5 min im Dunkeln inkubiert. Nach Abtropfen der überflüssigen Lösung von dem Blot, wurde erst der Marker dokumentiert. Anschließend folgte die Dokumentation der Chemolumineszenz des Blottes in der Kodak Photo Station.

**2.11.7 Strippen von mit ECL entwickelten Western-Blots:**

2.11.7.1 Prinzip:

Da teilweise Proteine wie Phospho-STAT3 und STAT3 nachgewiesen werden mussten, die Banden auf exakt der gleichen Höhe bilden, musste das oben beschriebene Prozedere manchmal mehrfach hintereinander durchgeführt werden. Daher wurde die Entfernung der zuerst verwendeten Erst- und Zweitantikörper notwendig. Sie wird durch eine Inkubation unter veränderten pH-Bedingungen und reduzierendem Milieu möglich.

### 2.11.7.2 Durchführung:

Western-Blot-Strip-Puffer sollten jeweils frisch angesetzt werden. Für 1-3 Blots wurden 30 ml 62,5 mM TRIS-HCl pH 6,7, 100 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 2% SDS in Aqua bidest. benötigt. Aufgrund des  $\beta$ -Mercaptoethanols sollte unter einem Abzug gearbeitet werden. Der Stripping-Puffer wurde in ein Hybridisierungs-Röhrchen gegeben und beides im Wasserbad auf 55°C vorgewärmt. Anschließend wurden die Blots mit der Proteinseite nach innen in die Röhrchen gelegt. Nun wurde das beladene Hybridisierungs-Röhrchen für 30-45 min im auf 55°C vorgewärmten Hybridisierungs-Ofen unter Rotation inkubiert, um eine gleichmäßige Benetzung und somit auch Entfernung der Antikörper zu gewährleisten.

Anschließend folgten drei Waschschrte zur Entfernung des Stripping-Puffers. Anschließend wurde eine Inkubation im Blockpuffer für 1h notwendig, um die unspezifischen Bindungsstellen erneut zu blockieren, bevor der nächste Erstantikörper aufgetragen werden konnte.

## 2.12 RNA-Isolierung:

### 2.12.1 Prinzip:

Gesamtzell-RNA wurde mittels des High Pure RNA Isolation Kits von Roche isoliert. Hierbei werden die Zellen zuerst chemisch aufgeschlossen und das Lysat im Anschluss auf ein Glasfaser Fleece gegeben. DNA und RNA binden an die Glasfaser, während andere kontaminierende Substanzen wie Proteine, Salze und andere Zellreste abgewaschen werden können. Anschließend wird DNase I eingesetzt, um die kontaminierende genomische DNA zu degradieren. Es folgen weitere Waschschrte zum Entfernen der DNase I. Im Anschluss kann die aufgereinigte RNA aus der Glasfaser eluiert werden.

### 2.12.2 Durchführung:

Um einen Verdau der zu isolierenden RNA mit kontaminierenden RNasen zu verhindern, sollten Einmalhandschuhe getragen werden und die Arbeitsflächen vorher mit RNase Away behandelt werden.

Um aus  $10^6$  Zellen RNA zu gewinnen, wurden sie zuerst in 200  $\mu$ l PBS resuspendiert. Anschließend wurden 400  $\mu$ l Lysis-Puffer hinzugefügt und das Ganze für 15 s gevortext. Nun wurde eines der Filtergefäße in ein Auffanggefäß gegeben und das Lysat auf das obere Reservoir des Filters pipettiert. Es folgte eine Zentrifugation von 8000 g für 15 s. Der Durchfluss konnte verworfen werden. In einem sterilen Reaktionsgefäß

konnten nun 90 µl DNase Inkubations Puffer und 10 µl DNase I vermischt werden, um anschließend auf das obere Reservoir des Filters pipettiert zu werden. Das Ganze wurde für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 500 µl Wasch Puffer I in das obere Reservoir gegeben und alles bei 8000 g für 15s zentrifugiert. Der Durchfluss wurde erneut verworfen. Es folgte ein zweiter Waschschrift, diesmal mit 500 µl Wasch Puffer II mit erneuter Zentrifugation bei 8000 g für 15 s und Verwerfen des Durchflusses. Danach schloss sich ein letzter Waschschrift an, mit 200 µl Wasch Puffer II und zweiminütiger Zentrifugation bei 13000 g, um den Waschpuffer vollständig aus dem Filter zu entfernen. Das Filtergefäß wurde nun auf ein frisches, steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt. Um die RNA zu eluieren, wurde als Nächstes 50-100 µl Eluationspuffer auf das obere Reservoir des Filters gegeben und bei 8000 g für 1 min zentrifugiert. Die eluierte RNA Lösung konnte nun aliquotiert und bis zur Weiterverwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert werden.

## 2.13 cDNA Synthese aus aufgereinigter mRNA:

### 2.13.1 Prinzip:

Zur Durchführung von quantitativen Analysen von mRNA muss diese erst in komplementäre DNA (cDNA) überführt werden, um eine Vervielfältigung mittels PCR möglich zu machen. Hierzu vermischt man die RNA mit Oligo(dT)18-Primern, die aus 18 Thyminen bestehen. Der Ansatz wird zuerst auf  $70^{\circ}\text{C}$  erhitzt, um Sekundärstrukturen der RNA aufzuschmelzen. Die Primer hybridisieren mit dem Poly-A-Schwanz der mRNAs bei der Abkühlung auf  $4^{\circ}\text{C}$ . Nun kann eine Reverse-Transkriptase (hier aus dem *Moloney murine leukemia virus*) den RNA Strang mit DNA komplettieren, wofür noch Nukleotide im Überschuss, ein RNase-Inhibitor und ein entsprechender Puffer benötigt werden. Die so entstandene cDNA kann dann später z.B. in einer TaqMan PCR amplifiziert und quantifiziert werden.

### 2.13.2 Durchführung:

Die cDNA Synthese wurde mit dem Revert Aid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (MBI Fermentas) ausgeführt. Dazu wurden pro Ansatz 11 µl mRNA mit 1 µl 0,5 µg/ml oligo(dT)18-Primer vermischt, in einer Handzentrifuge einige Sekunden zentrifugiert und anschließend für 5 min bei  $70^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Danach wurden die Reaktionsgefäße zum Ermöglichen der Bindung der Primer auf Eis ausgekühlt und nochmals zentrifugiert. Pro Ansatz wurde ein Mastermix aus 4 µl 5x Puffer, 0,5 µl 40 U/ml Ribonuklease Inhibitor, 2 µl 10 mM dNTP Mix, sowie 0,5 µl HPLC Wasser hergestellt.

Von diesem wurden 7 µl in jeden Ansatz pipettiert und alles für 5 min bei 37°C inkubiert. Dann wurden die Ansätze mit jeweils 1 µl 200 U/ml Reverser Transkriptase versetzt und 60 min bei 42°C inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch für 10 min auf RT abgekühlt, danach kurz bei 70°C inaktiviert und schließlich auf Eis ausgekühlt. Die gewonnene Lösung konnte direkt in eine PCR eingesetzt oder anschließend bei -20°C bis zur Weiterverwendung gelagert werden.

## 2.14 Quantitative real time PCR (TaqMan):

### 2.14.1 Prinzip:

Selbst kleinste Mengen einer bekannten DNA-Sequenz können mittels PCR nachgewiesen werden. Dafür wird eine Polymerase mit einem Temperaturoptimum um 70°C benötigt, wie die Taq-Polymerase, die aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* isoliert werden kann. Zusätzlich werden zwei Oligonukleotide (Primer) benötigt, die komplementär zu DNA-Abschnitten sind, welche das zu amplifizierende Stück flankieren, sowie Nukleotide im Überschuss.

Die DNA wird auf 94-98°C erhitzt, um die beiden Stränge voneinander zu trennen (Denaturierung). Daraufhin wird die Temperatur auf 50-65°C gesenkt, um die Bindung der Primer an die Einzelstränge zu ermöglichen (Primerhybridisierung oder Annealing). An diesen Primer kann nun die Polymerase binden und den Einzelstrang mit den entsprechenden Nukleotiden komplettieren. Hierzu wird die Temperatur auf 68-72°C erhöht, was dem Temperaturoptimum der Polymerase entspricht. Diesen Vorgang bezeichnet man als Elongation. Anschließend wird der gesamte Zyklus, beginnend mit der Denaturierung, wiederholt. Somit entsteht mit fortschreitender Zykluszahl eine annähernd exponentiell ansteigende Menge einer doppelsträngigen DNA mit definierter Länge.

Bei einer quantitativen PCR ist nicht nur die Vervielfältigung, sondern auch eine Bestimmung der Anzahl der ursprünglich vorhandenen Kopien der DNA in der Probe möglich. Da die Quantifizierung während der laufenden PCR stattfindet, wird von „real time“ gesprochen.

Zusätzlich zur normalen PCR verwendet man noch ein einzelsträngiges Oligonukleotid, das komplementär zu einem Segment von 20-60 Nukleotiden innerhalb der zu amplifizierenden DNA bindet. An dieses ist kovalent am 5' Ende ein fluoreszierender Reporter oder Fluorophor gebunden (hier: 6-Carboxyfluorescein (FAM)). Am 3' Ende wird ein sogenannter „Quencher“ ebenso kovalent gebunden (hier:

Tetramethylrhodamine (TAMRA). Oligonukleotid, Fluorophor und Quencher bilden zusammen die sogenannte Sonde. Der Quencher ist in der Lage, die Fluoreszenz des Fluorophores aufgrund der hohen räumlichen Nähe zu unterbinden, wie z.B. bei der intakten Sonde. Während der Elongation des PCR-Zyklus degradiert die Polymerase aufgrund ihrer Exonuklease-Aktivität Nukleotid für Nukleotid der gebundenen Sonde. Dadurch verlieren Quencher und Fluorophor ihren festen räumlichen Bezug zueinander; das Fluorophor fluoresziert.

Wenn die Sonde im Überschuss zugegeben wird, ist die entstehende Fluoreszenz direkt proportional zu der Menge der bereits amplifizierten DNA. Dieses Phänomen macht ihre Quantifizierung unter Zuhilfenahme von bekannten Standard-Proben möglich.

Da wir uns für Expressionsunterschiede von in cDNA umgewandelte mRNA interessieren und bei der Gewinnung der Proben z.B. auch unterschiedliche Zellzahlen verwendet wurden, wird aus den Proben auch die Anzahl der mRNA Kopien eines „Housekeeping-Gene's“, hier Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase (HPRT), bestimmt. Bei Housekeeping-Genen geht man davon aus, dass sie in jedem Zelltyp zu jeder Zeit gleichmäßig exprimiert werden. Somit kann man durch die Bildung eines Quotienten aus Expression der zu untersuchenden mRNA auf die Expression des Housekeeping Gens die Proben normalisieren.

Anschließend wurde die relative Expression der Gene noch auf das Niveau der Th0 Zellen kalibriert.



2.14.2 Durchführung:

Für jedes Primerpaar mit Sonde wurde ein Mastermix entsprechend folgender Tabelle angesetzt:

	Mastermix HPRT pro 1 Ansatz (µl)	Mastermix T-bet pro 1 Ansatz (µl)	Mastermix IFN-γ pro 1 Ansatz (µl)
Reaction Buffer	2,5	2,5	2,5
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	2	1	2
dNTP-Mix 2,5 mM	1	1	1
Primer forward HPRT	0,125	-	-
Primer reverse HPRT	0,125	-	-
Sonde HPRT	0,375	-	-
Primer F2 T-bet	-	0,125	-
Primer R2 T-bet	-	0,125	-
Sonde T-bet	-	0,375	-
Primer forward IFN-γ	-	-	0,25
Primer reverse IFN-γ	-	-	0,25
Sonde IFN-γ	-	-	0,375
HotGoldStar-Enzym 5 U/µl	0,125	0,125	0,125
H <sub>2</sub> O bidest	16,25	17,25	16
Gesamt	22,5	22,5	22,5

Pro Ansatz erfolgte eine 2-fach Bestimmung in einem Endvolumen von 25 µl, wobei 2,5 µl aus der Probe und 22,5 µl aus dem Mastermix stammten. In die „no template control“ (NTC) wurde statt einer Probe nur H<sub>2</sub>O bidest pipettiert. Zur Vermischung der Proben wurde hier wegen der kleinen Volumina nur mit einer Handzentrifuge zentrifugiert anstatt zu vortexen. Zudem sollte zur Vermeidung von Kontaminationen ausschließlich mit Handschuhen auf zuvor mit 70% Ethanol gereinigten Flächen gearbeitet werden. Im Anschluss wurden die Öffnungen der Platte luftdicht verschlossen und die Platte vor Einsetzen in den Zyklus nochmals kurz bei ca. 1000 Rpm anzentrifugiert.

Die Bedingungen für den Zyklus waren wie folgt: Ein Initialschritt von 95°C für 10 min, gefolgt von 40 Zyklen eines 2-Schritt Programms bestehend aus 95°C für 15 s und 60°C für 60 s.

Folgende Sequenzen (5' - 3') wurden verwendet:

HPRT forward, CTGGTGAAAAGGACCTCTCG;

HPRT reverse, TGAAGTACTCATTATAGTCAAGGGCA;

HPRT Sonde, Fam-TGTTGGATACAGGCCAGACTTTGTTGGAT-Tamra;

T-bet forward, GTGGATGTGGTCTTGGTGGAC;

T-bet reverse, ACATATAAGCGGTTCCCTGGC;

T-bet Sonde, Fam-CTGGCGGTACCAGAGCGGCAAGT-Tamra;

IFN $\gamma$  forward, GCAACAGCAAGGCGAAAAAG;

IFN $\gamma$  reverse, CGGAATCCAGCCTCAGGAA;

IFN $\gamma$  Sonde, Fam-ATGCATTCATGAGTATTGCCAAGTTTGAGGTC-Tamra.

Die Analyse erfolgte anschließend mit der ABI Prismn sequence detection Software Version 1.6.

Als Streuungsmaß wurde die Standardabweichung nach der  $\Delta\Delta C_T$  Methode (Livak and Schmittgen 2001) berechnet.

## 2.15 Vorübergehende Herunterregulation der Expression eines interessierenden Proteins mittels „small interfering RNA“ (siRNA):

### 2.15.1 Prinzip:

In eukaryontischen Zellen gibt es den natürlichen Mechanismus der RNA-Interferenz (RNAi), der sich ca. 19-25 (meist 21) Nukleotide langer einzelsträngiger RNA bedient, um die Expression einzelner Gene herunterzuregulieren. Diese einzelsträngige RNA kann wie bei der microRNA/miRNA aus zelleigenen pre-miRNA-Genen stammen, oder aus Transposons und fremden Quellen wie RNA-Viren im Falle von natürlicher siRNA (Chu and Rana 2007). Eine RNase Typ III namens „Dicer“ schneidet aus längeren doppelsträngigen RNA (dsRNA) Sequenzen 20-25 Basenpaar lange dsRNA Fragmente (Liu et al. 2007b). Im Falle von miRNA werden diese aus Haarnadelstrukturen der sogenannten pre-miRNA herausgeschnitten, bei siRNA wird aus längeren dsRNA Sequenzen (wie beispielsweise von RNA Viren) herausgeschnitten.

Jeweils eines dieser Fragmente assoziiert nun mit anderen Proteinen zum „RNA induced silencing complex“ (RISC), wobei Argonaute2, eine Endonuklease, der Hauptträger der katalytischen Funktion zu sein scheint (Liu et al. 2004; Peters and Meister 2007). Der RISC-Komplex ist nun über die miRNA oder siRNA in der Lage, komplementäre mRNA zu binden und (im Falle von siRNA) diese zu spalten. Die nicht komplementären Restfragmente der mRNA werden dann anscheinend von Exonukleasen degradiert. Somit kommt die mRNA nicht zur Translation und die Expression des Genes faktisch zum Erliegen. Im Falle von miRNA sind die Sequenzen nicht vollständig komplementär. Hier besteht Grund zur Annahme, dass der RISC-

Komplex die mRNA nur dauerhaft bindet, aber nicht spaltet und sie deswegen nicht zur Translation kommt.

Ein Hauptproblem der Nutzung von RNAi mittels künstlicher Einbringung von siRNA sind infolgedessen nicht spezifische Effekte, wie die Aktivierung einer IFN Antwort bei Fragmenten von größer als 30 Nukleotiden, sowie sogenannte „Off-Target“ Effekte, bei denen eine unbeabsichtigte Herunterregulation von Genen entsteht, beispielsweise durch nur teilweise Komplementarität mit der verwendeten Sequenz, wie dies bei miRNA der Fall ist (Svoboda 2007).

Es gibt verschiedene Ansätze, künstlich hergestellte siRNA in Zellen einzubringen, so mit Hilfe von Liposomen oder Plasmiden als Vektor (Li et al. 2006). In der vorliegenden Arbeit wurden die Zellen mit dem Amaxa Kit mittels Elektroporation nukleofektiert.

Als Kontrollen wurden eine scrambled siRNA mit zufälliger Sequenz eingesetzt, um Effekte durch die Einbringung von siRNA zu kontrollieren, sowie Nukleofektionen ohne siRNA, um den Effekt der Elektroporation alleine auf die Zellen zu kontrollieren.

Die folgenden verwendeten siRNAs sind bereits in der Literatur beschrieben für RNAi von STAT3:

STAT3 siRNA-1(Liu 2007): 5`-CCAACAUCUGCCUGGACCGTCTGT T-3`

STAT3 siRNA-2 (Sumita et al. 2006):

5`-UCAACUUCAGACCCGUCAACAAATT-3`

Scrambled siRNA:

5`-CUGAGAGUAUUUCGAGACGAAAA-3`

### 2.15.2 Durchführung:

CD4+ Zellen wurden wie in 2.2 isoliert und direkt nach der Isolation nukleofektiert.

In einer zuvor mit 5 µg/ml α-CD3 beschichteten und gewaschenen 24er-Napf Platte wurden in Reihe 1 je 1500 µl Zellkulturmedium mit Grundbedingungen nach 2.3.3 vorgelegt, in allen anderen Näpfen 300 µl. Hier wurde mit Handschuhen und RNAase freien gestopften Spitzen gearbeitet, um die RNA nicht durch RNAasen auf den Händen, Arbeitsflächen etc. zu gefährden.

Die frisch isolierten Zellen wurden noch mal zweimal mit BSS gewaschen, um für die Nukleofektion störende Proteine aus der Lösung zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen gleichmäßig auf 1,5 ml Reaktionsgefäße verteilt, entsprechend der Anzahl der Ansätze. Pro Ansatz wurden meist  $5 \times 10^6$  Zellen verwendet. Diese wurden bei 1000 g, 10 min, mit Bremse zentrifugiert und anschließend trocken gesaugt. Zur selben Zeit

wurden 100 µl Nukleofektions-Lösung RT pro Ansatz in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt und mit 500 pMol scrambled oder entsprechender siRNA versehen. Zur Kontrolle wurde ein Ansatz mit keinerlei RNA versetzt. Die Nukleofektions-Lösung mit siRNA wurde nun gut gemischt, bevor mit ihr das entsprechende Zellpellet suspendiert wurde. Die Zellsuspension wurde dann möglichst blasenfrei in die Küvette überführt. Letztere wurde dann in der Nucleofector™ II machine mit dem Programm W-001 behandelt.

Danach wurde die Zellsuspension von der Küvette in einen der mit 1500 µl Zellkulturmedium befüllten Näpfe überführt und gut durchgemischt. Anschließend wurde diese Suspension gleichmäßig auf die 5 Näpfe verteilt, in denen 300 µl Zellkulturmedium zugegeben worden waren. Die Näpfe wurden mit Zellkulturmedium mit Grundbedingungen auf 1 ml aufgefüllt. Nun wurden jedem Napf, falls indiziert, 2 ng/ml rhTGF-β1 hinzugefügt und oder 20 ng/ml rmIL-27 oder 50 ng/ml rmIL-6.

Für spätere Western Blot Analysen wurden die Zellen der entsprechenden Ansätze 48h nach Nukleofektion geerntet und nach 2.11.x (s.o.) zu Schockpellets, Gesamtzell-Proteinlysaten etc. weiterverarbeitet, um schließlich gesamt STAT3, STAT1 und β-Aktin im Western Blot nachzuweisen.

Dagegen wurden für ICS die Zellen 72h nach Nukleofektion geerntet, fixiert und entsprechend 2.7 mit anti-Foxp3-PE oder anti-IFN-γ-PE gefärbt und im FACS analysiert. Die letzten vier Stunden vor der Ernte der Zellen wurde Brefeldin A hinzugefügt.

## 2.16 Proliferationsassay:

### 2.16.1 Prinzip:

Die Aufgabe von Treg besteht unter anderem darin, die Expansion und Proliferation von anderen CD4+ Zellen zu hemmen. Proliferationsassays ermöglichen, das Ausmaß der Zellvermehrung zu quantifizieren und somit die Funktionsfähigkeit der verschiedenen „in vitro“ gewonnenen Th-Zellen und der natürlichen „ex vivo“ gewonnenen Treg zu vergleichen. Als Marker für die Proliferation wurde radioaktiv mit H<sup>3</sup> markiertes Thymidin (β-Strahler, HWZ = 12,3 Jahre) im Überschuss in die Zellkultur gegeben, da es DNA spezifisch ist und es somit nur in die zu duplizierenden Stränge während der Synthesephase vor der Mitose eingebaut wird. Aufgrund der Natur der Duplizierung der DNA und ihrer Aufteilung während der Mitose, ist die Menge des eingebauten Thymidins proportional zu der Anzahl der neu entstandenen Zellen. Zur Messung macht

man sich zunutze, dass DNA und RNA an Glasfaser binden, im Gegensatz zu nichteingebautem Thymidin und den anderen Bestandteilen von aufgeschlossenen Zellen. Eine Quantifizierung kann nun mithilfe eines Flüssigszintillationszählers erfolgen, weil  $\beta$ -Strahlung ihre Energie auf aromatische Lösungsmittel transferieren kann, in denen Szintillatoren gelöst sind. Denn bei der Übertragung der Energie auf die Szintillatoren werden diese angeregt und wandeln Energie in messbare Lichtquanten um.

Es wurden CD4+CD25- Zellen als in ihrer Proliferation zu hemmende Responder Zellen verwendet. Zur Stimulation wurden bestrahlte und somit nicht mehr teilungsfähige APCs verwendet, die zuvor mit anti-CD3 inkubiert wurden, so dass der Fc-Teil der AK an ihre Oberfläche gebunden war und sie zusätzlich direkt den TZR stimulieren konnten.

#### 2.16.2 Durchführung:

Für den Assay wurden 96er Rundbodenplatten mit einem Endvolumen von 200  $\mu$ l pro Napf verwendet. Je Ansatz wurde eine Dreifach-Bestimmung durchgeführt. In jedem Napf befanden sich  $5 \times 10^4$  CD4+CD25- (entsprechend 2.5.2.1 frisch gewonnene) Responder Zellen, sowie  $5 \times 10^4$  mit 25 Gy bestrahlte und gemäß 2.6 frisch isolierte APZ, welche zuvor für einige Minuten mit 0,5  $\mu$ g/ml  $\alpha$ -CD3 inkubiert worden waren. Ein Ansatz mit nur diesen beiden Zellarten diente als Leerwert-Kontrolle.

Als Regulator-Zellen wurden  $5 \times 10^4$  pro Napf (für die 1:1 Effektor : Responder Zell Verdünnung) verwendet. Diese entsprachen entweder frisch gemäß 2.5 isolierten CD4+CD25+ Zellen mit einer Reinheit von  $\geq 98\%$ , oder 72h zuvor gemäß 2.2 isolierten CD4+CD62L+ Zellen, die mit 2 ng/ml rhTGF- $\beta$ 1 mit oder ohne 20 ng/ml rmIL-27 oder 50 ng/ml rhIL-6 polarisiert worden waren. Bei höheren Verdünnungen wurden entsprechend  $1,25 \times 10^4$  oder weniger Regulator-Zellen und eine konstante Menge an Responderzellen eingesetzt.

Alle Zellen wurden für 72h im Brutschrank inkubiert. Für die letzten 7h wurde jeder Napf mit 25  $\mu$ l 4 mC/ml  $H^3$ -Thymidin „gepulst“.

Anschließend wurden die Platten bei  $-15^\circ\text{C}$  eingefroren, um durch Eiskristalle die Zellintegrität zu zerstören. Nach dem Wiederauftauen konnte die Platte am Filtermate Harvester für die Messung vorbereitet werden.

Hierzu wurde ein entsprechend großer Glasfaserfilter mit der glänzenden Seite nach oben in das Erntegerät eingelegt. Nun wurde eine saubere Waschplatte erst zweimal „kalt“ gewaschen und abgesaugt, um ein anschließendes gleichmäßiges Aufsaugen und

Benetzen mit der Zellsuspension zu gewährleisten. Die zu messende Platte wurde nun in das Erntegerät eingelegt und „heiß“ abgesaugt. Das bedeutet, dass der flüssige Müll in einen speziellen Behälter für radioaktiven Abfall gelangte. Anschließend wurde die Platte viermal mit Wasser gespült und „heiß“ abgesaugt, um möglichst alle nicht an die Glasfaser bindenden Reste zu entfernen, besonders freies, nicht in die DNA eingebautes  $H^3$ -Thymidin. Die Platte wurde nochmals viermal kalt gewaschen und abgesaugt, weil nun nicht mehr mit höherer Radioaktivität im Flüssigabfall gerechnet werden musste.

Die Glasfaser wurde nun mit einer Pinzette entnommen und für 30 min bei 50°C getrocknet. Anschließend konnte sie in eine Omni Filter Platte eingespannt werden. Jede Öffnung, die einem inkubierten Napf der Originalplatte entsprach, wurde mit 15  $\mu$ l Szintillations-Flüssigkeit benetzt. Anschließend wurden alle Öffnungen der Messplatte mit einer Klebefolie verschlossen, um eine Austrocknung zu verhindern. Die Messplatte konnte nun im Flüssigszintillationszähler gemessen werden.

### 2.17 Statistische Analyse:

Ein zweiseitiger T-Test wurde für die statistische Analyse genutzt. P-Werte unter 0,05 wurden als signifikant angesehen.

Als Streuungsmaß wurde in den Abbildungen +/- die einfache Standardabweichung verwendet, berechnet aus den Dupli- oder Triplikaten.

Als Streuungsmaß für die TaqMan Analyse wurde die Standardabweichung nach der  $\Delta\Delta C_T$  Methode (Livak and Schmittgen 2001) berechnet.

## 2.18 Materialien

**2.18.1 Mäuse:**

6-8 Wochen alte C57Bl/6 Mäuse aus The Jackson Laboratory, Maine, USA.

**2.18.2 Chemikalien**

2-Mercaptoethanol	Amersham Biosciences, Freiburg
Aqua ad iniectabilia	Delta Select, München
Bovines Serum Albumin (BSA) , Minimum 98% Reinheit, für ELISA:	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
BSA für MACS-Puffer, Cohn Fraction, pH 7	United States Biological, Swampscott, USA
Clicks RPMI 1640	Biochrom, Berlin
Dekontaminationslösung	Packard/ Perkin Elmer, Massachusetts, USA
Diethanolamin	Merck, Darmstadt
EDTA 0,5 M pH 8	Promega, Madison, USA
FACS Clean	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS Flow™	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS Rinse	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS Sheath Fluid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
FACS™ Lysing solution	Becton Dickinson, Heidelberg
FCS (Fetal calf serum)	Biowest, Nuaille, Frankreich
Formaldehyd 37%	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
H <sup>3</sup> -Thymidin 4 mC/ml	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
HCl 1 M	Fisher Scientific, Schwerte-Geisecke
HPLC Gradient Grade H <sub>2</sub> O	Fisher Scientific, Schwerte-Geisecke
Instamed HANKS´ Salz Trocken- Substanz (BSS)	Biochrom, Berlin
Instamed PBS Dulbecco	Biochrom AG, Berlin
Isopropanol	Acros Organics, New Jersey, USA
L-Glutamin Lösung	Biochrom, Berlin
Magermilchpulver	Glücksklee, erhältlich in jeden Supermarkt

Magnesium Chloride Hexahydrate (MgCl <sub>2</sub> (6H <sub>2</sub> O))	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Methanol	Merck, Darmstadt
Microscint <sup>TM</sup> O, LSC Cocktail	Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Massachusetts, USA
N,N,N',N'-Teramethyl- Ethylenediamine (TEMED)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
NaCl	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
NaHCO <sub>3</sub>	Biochrom AG, Berlin
NaOH 1 M	Merck, Darmstadt
NH <sub>4</sub> Cl	Biomol, Hamburg
PNPP (4-Nitrophenyl phosphate Dinatriumsalz Hexahydrate)	Fluka, Sigma Aldrich, Taufkirchen
RNase AWAY	Molecular BioProducts, San Diego, USA
Saponin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Sodium Dodecyl Sulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate:	Pierce/Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Super Signal West Femto Stable Peroxide Buffer	Pierce/Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Super Signal WestFemto Luminol/Enhancer Solution	Pierce/Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
TRIS-HCl	Carl Roth GmbH &Co KG, Karlsruhe
Trypanblau	Gibco, Karlsruhe
Tween 20	Merck, Darmstadt

### **2.18.3 Zytokine:**

rh-IL-2 10 000 U/ml:	Eurocetus/ Chiron Benelux, Amsterdam
rh-TGF-β1:	eBiosciences, San Diego, USA
recombinant murine IL-6	Peptotech Inc, Rocky Hill, USA
recombinant murine IL-27 :	R&D Systems, Minneapolis, USA



**2.18.4 Antikörper****2.18.4.1 Antikörper für Zellkultur**

anti-mouse-CD3	Über Protein A gereinigter, monoklonaler AK 145-2c-11
anti-mouse-CD3 1 mg/ml	BD Biosciences Pharmigen
anti-mouse-CD28	Über Protein A gereinigter, monoklonaler AK 37.51
anti-mouse-IL-4 für Zellkultur	Kulturüberstand des Hybridoms 11B11
anti-mouse-IFN- $\gamma$	Über Protein G gereinigter, monoklonaler AK XMG1-2

**2.18.4.2 Färbeantikörper:**

Anti-CD25-CY mAb	BD Biosciences Pharmigen, San Diego, USA
anti-CTLA-4-PE	BD Biosciences Pharmigen, San Diego, USA
FITC conjugated anti-mouse IFN- $\gamma$	eBiosciences, San Diego, USA
FITC conjugated anti-mouse IL-2	eBiosciences, San Diego, USA
FITC-anti-mouse-CD4	BD Biosciences Pharmigen, San Diego, USA
FITC-anti-mouse-IL-4	BD Biosciences Pharmigen, San Diego, USA
FITC-mouse-IgG1, isotype control immunoglobulin	BD Biosciences Pharmigen, San Diego, USA
PE conjugated anti-mouse/rat-foxp3	eBiosciences, San Diego, USA
PE conjugated-anti-mouse-TNF-alpha	eBiosciences, San Diego, USA
PE rat anti-mouse-IL-2	BD Biosciences Pharmigen, San Diego, USA
PE-anti-mouse-CD62L	BD Biosciences Pharmigen, San Diego, USA
PE-anti-mouse-IL-10	BD Biosciences Pharmigen, San Diego, USA

**2.18.4.3 ELISA-Antikörper**

Purified rat anti-mouse IL-2 0,5 mg/ml für ELISA	BD Biosciences Pharmigen, San Diego, USA
Biotin rat anti-mouse IL-2 0,5 mg/ml für ELISA	BD Biosciences Pharmigen, San Diego, USA
Streptavidin-AKP	BD Biosciences Pharmigen, San Diego, USA

2.18.4.4 Western-Blot-Antikörper

Anti-biotin-IgG, HRP-linked	Cell signalling technologies, Danvers, USA
anti-mouse- $\beta$ -Actin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Anti-rabbit-IgG, HRP-linked	Caltag (Invitrogen), Karlsruhe
goat-anti-rabbit-IgG, HRP linked	Cell signalling technologies, Danvers, USA
mouse-anti-mouse-STAT3(124H6), monoklonal	Cell signalling technologies, Danvers, USA
rabbit-anti-mouse-Phospho- STAT1(Tyr701), polyklonal	Cell signalling technologies, Danvers, USA
rabbit-anti-mouse-Phospho- STAT3(Tyr 705), polyklonal	Cell signalling technologies, Danvers, USA
rabbit-anti-mouse-STAT1(Ser727), polyklonal	Cell signalling technologies, Danvers, USA
rabbit-anti-mouse-STAT3, polyklonal	Cell signalling technologies, Danvers, USA

2.18.5 Puffer : **$\beta$ -Mercaptoethanol (ME) Stammlösung für Zellkultur:**

0,7ml 2-Mercaptoethanol in 1l PBS lösen (10 mM), steril filtriert

**BSS:**

BSS Pulver für 10l, 0,6g Penicillin G, 1g Streptomycin Sulfat, 14,25g NaHCO<sub>3</sub> und 23,83g HEPES in 9,7l H<sub>2</sub>O lösen und pH auf 7,2 einstellen. Dann auf 10l auffüllen, steril filtrieren und portionieren.

**Erylyse-Puffer:** 170 mM NH<sub>4</sub>Cl, 20 mM HEPES in Aqua dest.

(9,1g NH<sub>4</sub>Cl in Aqua dest lösen, 20 ml 1 M HEPES Lösung zugeben, auf 1 l mit Aqua dest auffüllen und steril filtrieren. (Mw NH<sub>4</sub>Cl = 53,49)

**FCS (inaktiviert):**

Serum auftauen lassen, 40min bei 56°C inaktivieren, auf Raumtemperatur (RT) abkühlen lassen, steril filtrieren und portionieren

**Lysepuffer für Gesamtzell-Lysate:**

40mM TRIS pH 8,0, 100  $\mu$ M PMSF, 1  $\mu$ g/ml Chymostatin, 5 $\mu$ g/ml Pepstatin A, 5  $\mu$ g/ml Aprotinin, 5 $\mu$ g/ml Leupeptin

**MACS-Puffer:**

PBS; 0,5% BSA (m/v); 0,4 % (v/v) von 0,5 M EDTA, pH = 8, steril filtriert

**PBS 1%FCS (v/v)****Phosphate-buffered-Saline (PBS) pH 7,2:**

PBS Trockensubstanz für 10l in Aq. dest lösen, pH = 7,2 einstellen, auf 10l auffüllen, portionieren und autoklavieren.

**Saponinpuffer:** PBS, 0,3% Saponin (m/v), 2% FCS (v/v)

**Zell-Fixierungspuffer:** PBS, 2% Formaldehyd (v/v)

**Zellkultur Beschichtungspuffer:** TRIS 50 mM in H<sub>2</sub>O bidest.; pH 9,5, steril filtriert

**Zellkulturmedium:**

Clicks RPMI 1640, 10% (v/v) FCS, 60  $\mu$ g/ml Penicillin G, 100  $\mu$ g/ml Streptomycinsulfat, 1% (v/v) HEPES-Puffer, 2 mM L-Glutamin, 0,14% (m/v) NaHCO<sub>3</sub>, 0,05 mM  $\beta$ -ME, steril filtriert

**Ammonium Persulfate 10%** (m/v) in H<sub>2</sub>O bidest

**Western Blot Sammelgelpuffer:** 1 M TRIS pH 6,8

**Western-Blot Sammelgel:**

für 2ml: 1,4 ml H<sub>2</sub>O, 0,33 ml 30% Acrylamide Mix, 0,25 ml 1 M TRIS pH 6,8, 20 $\mu$ l 10% SDS, 20 $\mu$ l 10% Ammonium persulfate, 2 $\mu$ l TEMED

<b>Western Blot Trenngel:</b> (für je 1 Gel)	<b>8% Gel</b>	<b>12% Gel</b>
H <sub>2</sub> O	2,3 ml	1,6 ml
30% Acrylamide Mix	1,3 ml	2,0 ml
1,5 M TRIS pH 8,8	1,3 ml	1,3 ml
10% SDS	50 µl	50 µl
10% Ammonium Persulfate	50 µl	50 µl
TEMED	3 µl	2 µl

**Western Blot 10x Laufpuffer:**

2 M Glycin, 250 mM TRIS-HCl in Aqua bidest.

**Western Blot 10x Transferpuffer:**

2 M Glycin, 250 mM TRIS-HCl pH 8,8 in Aqua bidest.

**Western Blot Transferpuffer:**

10ml 10x Transferpuffer, 20ml Methanol, 70 ml H<sub>2</sub>O

**Western Blot Laufpuffer:**

100ml 10x Laufpuffer, 10 ml 10% SDS auf 1 l Aqua bidest.

**Western Blot 4x SDS Probenpuffer:**

1,25 ml Sammelgelpuffer, 2 ml 10% SDS (m/v), 0,5 ml Glycerin, 5,25 ml H<sub>2</sub>O, 0,5 ml Mercaptoethanol, kleine Spatelspitze Bromphenolblau, aliquotiert bei -20°C oder 4°C lagern

**Western-Blot Blockpuffer:**

Western Blot Waschpuffer (s.u.), 5% (m/v) Magermilchpulver

**Western-Blot Waschpuffer:**

100 mM NaCl; 10 mM TRIS-HCl pH = 7,5; 0,05 % Tween 20 (v/v)

**Western Blot Stripping Puffer:**

62,5 mM TRIS-HCl pH 6,7, 100 mM 2-Mercaptoethanol, 2% SDS in Aqua bidest.

**SDS 10%** (m/v) in H<sub>2</sub>O bidest

**ELISA-Coating Puffer:** 0,1 M NaHCO<sub>3</sub> pH 8,2

**ELISA-Blockierungs und Verdünnungspuffer:** PBS, 3% BSA (m/v)

**ELISA-Entwicklungslösung (Diethanolaminpuffer):**

400mg MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O in ca. 450ml Aq. dest. lösen, 48,5ml Diethanolamin zugeben und ca. 1h rühren lassen. pH auf 9,8 einstellen und auf 500ml auffüllen. Bei 4°C im Dunkeln lagern.

**ELISA-Waschpuffer:** PBS, 0,05% Tween (v/v)

### **2.18.6 Kits:**

#### 2.18.6.1

**BD OptEIA™ Set Mouse TNF-α (mono/poly)**

Becton Dickinson, Heidelberg

Capture Antibody: Anti-mouse TNF-α

Detection Antibody: Biotinylated Anti-mouse TNF-α

Enzyme Reagent: Streptavidin-horseradish peroxidase conjugate

Standards: Recombinant mouse TNF-α 115 ng/ml

#### 2.18.6.2

**High Pure RNA Isolation Kit:**

Roche Deutschland,  
Grenzach-Wyhlen

Lysis/-Binding Buffer

DNase I, recombinant, lysophilizate

DNase Incubation Buffer

Wash Buffer I

Wash Buffer II

Elution Buffer

High Pure Filter Tubes

Collection Tubes

2.18.6.3

**MACS Anti-FITC MultiSortKit**

Miltenyi Biotech, Bergisch

MACS MultiSort Release Reagent

Gladbach

Anti FITC MultiSort MicroBeads

2.18.6.4

**CD4+CD25+ Regulatory T-Cell**

Miltenyi Biotech, Bergisch

**Isolation Kit, mouse**

Gladbach

Anti-PE MicroBeads

CD25-PE mouse

CD4+CD25+ T-Cell Biotin Antibody Cocktail, mouse

CD62L MicroBeads, mouse

2.18.6.5

**qPCR Core Kit**

Eurogentec, Seraing, Belgien

10x Reaction buffer

50 mM MgCl<sub>2</sub>

5 mM dNTP Mix

PCR enzyme (HotGoldStar 5 U/μl)

2.18.6.6

**RevertAid<sup>TM</sup> First Strand cDNA Synthesis Kit**

MBI Fermentas, St. Leon-Rot

RevertAid<sup>TM</sup> M-MuLV reverse Transcriptase

RiboLock<sup>TM</sup> Ribonuclease Inhibitor

5x Reaction Buffer

10 mM dNTP Mix

Oligo(dT)<sub>18</sub> Primer

Random Hexamer Primer

Control Primer

Control RNA

DEPC-treated Water

2.18.6.7**Mouse T Cell Nucleofector Kit**

Amaxa Biosystems; Köln

- 25 Plastic pipettes
- 25 Certified cuvettes
- 10 µg maxGFP (for 5 reactions)
- 0.5 ml Supplement
- 2.25 ml Mouse T Cell Nucleofector Solution
- 100 ml Mouse T Cell Nucleofector Medium
- 1 ml Medium Component A
- 1 ml Medium Component B

**2.18.7 Sonstige Materialien:**

15ml Röhrchen	Greiner bio-one, Frickenhausen
50ml Röhrchen	Greiner bio-one, Frickenhausen
96er Napf Rundbodenplatten	Fisher Scientific, Schwerte-Geisecke
Abi Prismn 7700 Sequence Detector	Applied Biosystems, Foster City, USA
BD FACS Calibur	BD Biosciences, Heidelberg
Biofuge stratos (Zentrifuge)	Heraeus, Osterode
Brutschrank BB 6220	Heraeus, Osterode
Brutschrank BBD 6220	Heraeus, Osterode
Bunsen Brenner: gasprofi 1	WLD Tec GmbH, Göttingen
Einmal-Handschuhe: NOBAGLOVE-Latex	NOBA Verbandsmittel Danz GmbH, Wetter
ELISA 96er Well Platten: MaxiSorb	Nunc, Dänemark
ELISA Reader: Dynex MRX II	Dynex Technologies, Middlesex UK
Eppendorf Research 10 Pipette	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Research 100 Pipette	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Research 1000 Pipette	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Research 2,5 Pipette	Eppendorf, Hamburg
Filter tip FT 100	greiner bio-one, Frickenhausen
Filter tip FT 100(E)	greiner bio-one, Frickenhausen
Filter tip FT 10E	greiner bio-one, Frickenhausen
für PCR: T Gradient	Biometra, Göttingen

Glass Fiber Filters	Packard/ Perkin Elmer, Massachusetts, USA
Hamilton Pipette	Hamilton, Martinsried
HERA safe Typ HS 18 Sterilbank	Heraeus, Osterode
HERA safe Typ KS 12 Sterilbank	Heraeus, Osterode
Klebefolie	Packard/ Perkin Elmer, Massachusetts, USA
Leica DMIL Mikroskop	Leica Microsystems, Wetzlar
MACS LD-Columns (bis $1 \times 10^8$ markierte, insgesamt bis $5 \times 10^8$ Zellen)	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
MACS LS-Columns, (bis $1 \times 10^8$ markierte, insgesamt bis $2 \times 10^9$ Zellen)	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
MACS MS-Columns ( $10^4$ - $10^7$ markierte, insgesamt $10^6$ - $2 \times 10^8$ Zellen)	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
MACS Pre-Separations-Filter, Mesh Size 30 $\mu\text{m}$	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Megafuge 1.OR (Zentrifuge)	Heraeus, Osterode
Mini-Protean 3 Electrophoresis Module	Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA
Multifuge 1 L-R (Zentrifuge)	Heraeus, Osterode
Netwell TM Insert 74 $\mu\text{m}$ Polyester Mesh	Corning Incorporated, USA
Neubauer Zählkammer	Brand, Wertheim
Nitrocellulose	Schleicher & Schüll, Dassel
Nucleofector® II	Amaxa Biosystems, Köln
OmniFilter™ Platten	Packard/ Perkin Elmer, Massachusetts, USA
Optical Caps	Applied Biosystems, Foster City, USA
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim
Pipetten-Spitzen gestopft	Greiner bio-one, Frickenhausen
Pipetten-Spitzen gestopft	Greiner bio-one, Frickenhausen
Power PAC 100	Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Schüttler: H S250 basic	IKA, Staufen
Sterilfilter: Filtropur BT50 0,2 500ml	Sarsted, Newton, USA

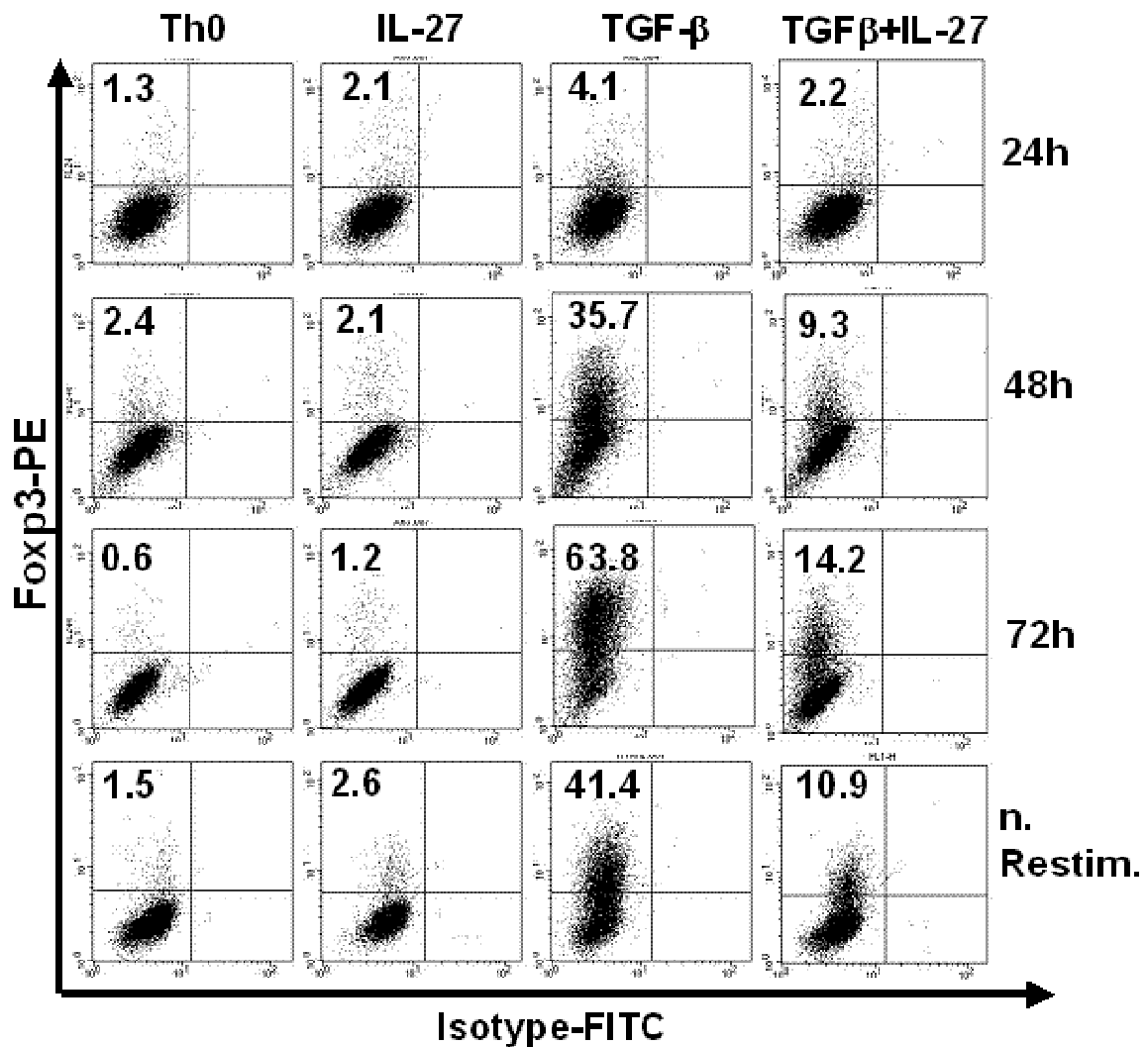


Bottle Top Filter	
Thermoblock	Roth, Karlsruhe
Tischzentrifuge: BIOFUGE pico	Heraeus, Osterode
Top Count NXT, Microplate Scintillation & Luminescence Counter	Packard/ Perkin Elmer, Massachusetts, USA
Vortexer: MS1 Minishaker	IKA, Staufen
Whatman Papier	Schleicher & Schüll, Dassel
Zellkulturplatten: 12er; 24er; 96er Napf Flachboden	Nunc, Dänemark

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Untersuchung der Kinetik der Foxp3 Expression während der Polarisierung zu iTreg und Th0 mit und ohne Zugabe von IL-27

Ein Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von IL-27 auf die Entstehung von iTreg zu untersuchen und die so entstandenen Zellen genauer zu charakterisieren. Derzeit gibt es die besten Belege für die Generierung von iTreg aus naiven CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> Zellen mittels Stimulation in Gegenwart von TGF- $\beta$  und IL-2 (Liang et al. 2005). Dabei konnte regelmäßig eine Induzierung von Foxp3 gezeigt werden. Bisher gilt Foxp3 in der Maus als der spezifischste Marker für Treg (Ziegler 2006). Seine Anwesenheit wird auch als maßgeblich für die Funktionalität der Treg gesehen, als andere CD4<sup>+</sup> Zellen in ihrer Proliferation und Funktion hemmender Faktor (Fontenot et al. 2003). Unter diesen Annahmen wollten wir die zeitliche Abhängigkeit der Foxp3 Expression während der Differenzierung zu iTreg und zu Th0 und nach Restimulation mit und ohne Zugabe von IL-27 untersuchen. Hierzu wurden nach 2.2 isolierte CD4<sup>+</sup>CD62<sup>+</sup> Zellen unter in 2.3 beschriebenen Th0 Grundbedingungen mit und ohne TGF-  $\beta$  sowie IL-27 für 24, 48, 72h oder bis 5h nach der Restimulation kultiviert und anschließend geerntet, fixiert und per ICS mit Foxp3-PE gefärbt und analysiert.



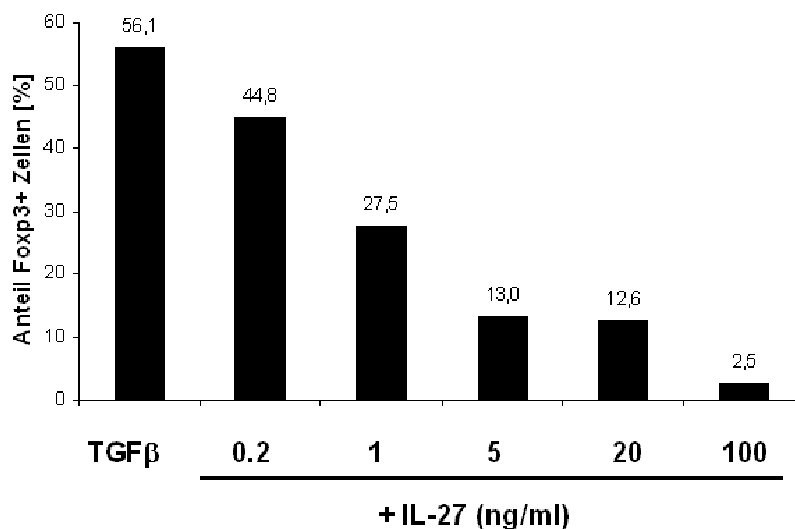
**Abbildung 4a:** Kinetik der Foxp3 Expression

CD4+CD62L+ Zellen wurden für 24 h, 48 h, 72 h oder bis 5 h nach Restimulation mit den angegebenen Zytokinen kultiviert und anschließend für Foxp3-PE und Isotype-FITC (Kontroll-AK) mit ICS gefärbt und im FACS analysiert. Die Daten sind repräsentativ für mindestens 3 unabhängige Experimente mit gleichem Ergebnis.

Es zeigte sich wie erwartet, dass TGF-β und IL-2 die Generierung von iTreg fördert, sichtbar an der hohen Foxp3 Expression. Dieser Effekt war bereits nach 48h deutlich sichtbar mit einem Anteil von 35,7% Foxp3+ Zellen; der höchste Anteil wurde mit 63,8% nach 72h erreicht. Der Effekt war auch nach der Restimulation stabil (41,4% Foxp3+ Zellen). Gleichzeitig blockierte IL-27 effektiv die durch TGF-β induzierte Foxp3 Expression auf 22 bis 26% des Niveaus ohne IL-27. Auch dieser inhibitorische Effekt war bis zur Restimulation stabil. Th0 Bedingungen und IL-27 alleine induzierten praktisch kein Foxp3.

### 3.2 Untersuchung zu dosisabhängigen Effekten von IL-27 auf die Foxp3 Expression nach 72h Polarisierung zu iTreg

Zur genaueren Charakterisierung des eben beschriebenen Effektes wurden gesamt CD4<sup>+</sup> Zellen 72 h in der Gegenwart von TGF- $\beta$  und IL-2 oder unter Th0 Bedingungen kultiviert, mit oder ohne verschiedene Konzentrationen von IL-27, die von 0,2 ng/ml bis 100 ng/ml reichten. Anschließend wurden Kulturüberstände für ELISAs abgenommen und die Zellen mit ICS für Foxp3-PE gefärbt und analysiert.

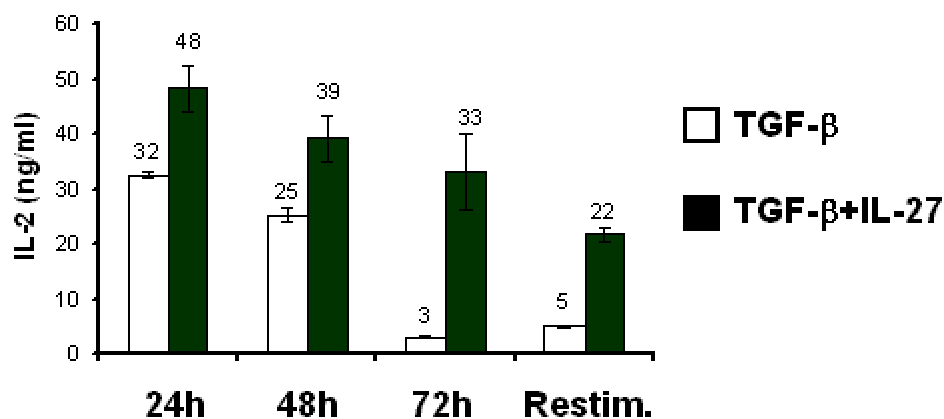


**Abbildung 4b:** Dosisabhängige Beziehung von IL-27 zum Anteil der Foxp3 exprimierenden Zellen bei naiven CD4<sup>+</sup> Zellen, die 72h unter iTreg induzierenden Bedingungen (TGF $\beta$  oder unter zusätzlicher Gabe von IL-27) polarisiert wurden. Die Daten sind repräsentativ für 3 separate Experimente.

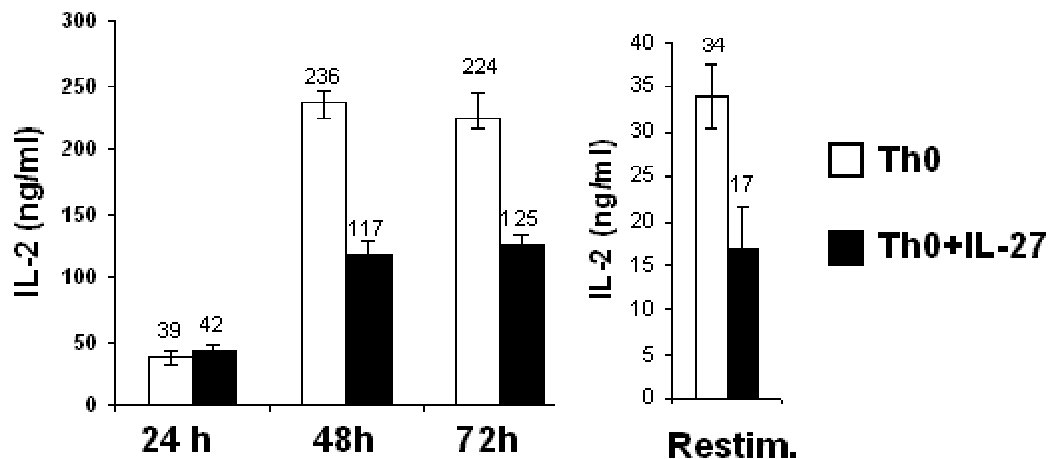
Für die mit TGF- $\beta$  und IL-2 kultivierten Zellen zeigte sich im untersuchten Bereich eine dosisabhängige Steigerung der Inhibition der Foxp3 Expression durch IL-27 mit einem Maximum bei der höchsten applizierten Dosis von 100 ng/ml. Differenzierung ohne IL-27 resultierte in 56,1% Foxp3<sup>+</sup> Zellen, während bei 100 ng/ml IL-27 nur noch 2,5 % der Zellen Foxp3<sup>+</sup> waren. Allerdings zeigte auch schon 1 ng/ml eine Verminderung der Foxp3 Expression von fast um die Hälfte (27,5%). Bei den zu Th0 polarisierten Zellen zeigte sich mit und ohne IL-27 keine Foxp3 Expression (Daten nicht gezeigt.)

### 3.3 Vergleich der Kinetik der IL-2 Produktion bei der Differenzierung zu iTreg und Th0 mit und ohne IL-27

Wie bereits erwähnt, gilt auch die Unfähigkeit zur eigenen IL-2 Produktion als typische Eigenschaft von Treg (Dieckmann et al. 2001), was im Zusammenhang mit der Herunterregulierung der IL-2 Transkription als Effekt der vermehrten Expression von Foxp3 gesehen wird (Fontenot et al. 2003; Hori et al. 2003; Gavin et al. 2007). Es ist auch bekannt, dass IL-27 unter Th0 Bedingungen die IL-2 Produktion vermindert (Owaki et al. 2006b; Villarino et al. 2006c). Es schien uns trotzdem möglich, dass IL-27 durch Herunterregulation von Foxp3 unter iTreg induzierenden Bedingungen die Produktion von IL-2 steigern könnte. Wir vermuteten, dass die Foxp3 Expression und IL-2 Produktion reziprok korrelieren könnten. Im Hinblick auf die zu erwartenden Ergebnisse wurden die Kulturüberstände der in 3.2 beschriebenen CD4<sup>+</sup> Zellen im ELISA auf IL-2 untersucht.



**Abbildung 5a:** Kinetik der IL-2 Konzentration im Kulturüberstand von zu iTreg differenzierten CD4<sup>+</sup> Zellen mit und ohne Zugabe von 20 ng/ml IL-27. Die Balken kennzeichnen die Standardabweichung bei Dreifachbestimmungen. Die Daten sind repräsentativ für 3 separate Experimente.

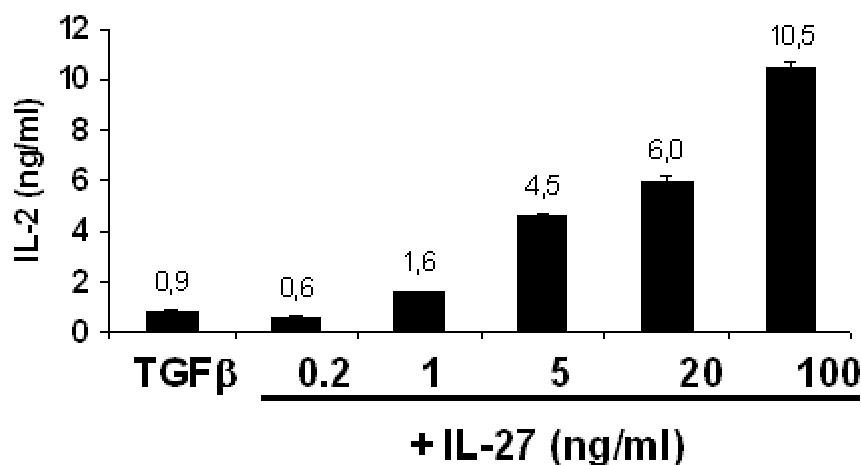


**Abbildung 5b:** Kinetik der IL-2 Produktion im Kulturüberstand von zu Th0 differenzierten naiven CD4+ Zellen mit und ohne Zugabe von 20 ng/ml IL-27. Die Balken über den Säulen kennzeichnen die Standardabweichung bei Dreifachbestimmungen. Die Daten sind repräsentativ für 3 separate Experimente.

Wie erwartet, zeigten Zellen unter Th0 Bedingungen eine um Faktor 10 höhere Produktion von IL-2 (236 ng/ml nach 48h) als mit TGF- $\beta$  kultivierte Zellen (25 ng/ml nach 48h). Erwartungsgemäß zeigte sich auch eine verminderte IL-2 Produktion unter Th0 Bedingungen bei Zugabe von IL-27 (236 ng/ml vs. 117 ng/ml). Im Gegensatz dazu zeigte sich unter TGF- $\beta$  und IL-27 Gabe ab 48h eine deutliche Steigerung der IL-2 Produktion (25 ng/ml vs. 39 ng/ml). Dieser Effekt war auch nach 72 h stabil. Trotzdem blieb das Niveau der IL-2 Produktion zu diesem Zeitpunkt in mit TGF- $\beta$  und IL-27 behandelten Kulturen noch signifikant unter dem von Th0-Zellen. Nach Restimulation jedoch erreichte es fast ähnliche Werte wie bei Th0 Zellen (22 ng/ml vs. 34 ng/ml). Eine Herunterregulierung von Foxp3 durch IL-27 korreliert daher mit einer erhöhten IL-2 Produktion der entstandenen Zellen - ein Effekt, der in dieser Form für IL-27 noch nicht beschrieben worden war.

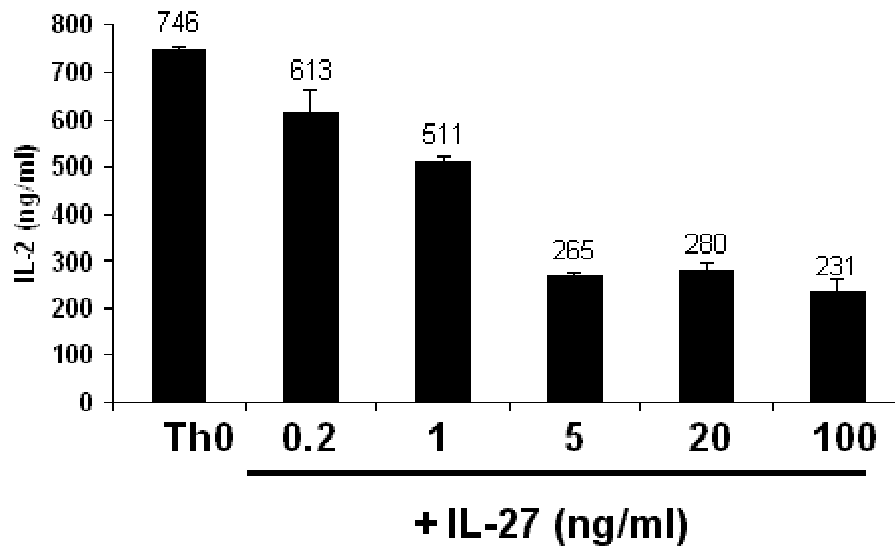
### 3.4 Dosisabhängige Effekte auf die IL-2 Produktion durch IL-27 von zu iTreg und Th0 polarisierten Zellen

Bei wie in 3.2 gewonnen Überständen von CD4<sup>+</sup> Zellen wurde nunmehr ebenfalls der IL-2 Gehalt im Kulturüberstand per ELISA analysiert, unter der Hypothese, dass die oben beschriebene reziproke Korrelation zwischen der Foxp3 Expression und IL-2 Produktion auch als abhängig von der verwendeten IL-27 Dosis bestätigt werden kann.



**Abbildung 5c:** IL-2 Konzentration im Kulturüberstand von 72h zu iTreg differenzierten CD4<sup>+</sup> Zellen mit und ohne Zugabe von verschiedenen Konzentrationen IL-27. Die Balken über den Säulen kennzeichnen die Standardabweichung bei Dreifachbestimmungen. Die Daten sind repräsentativ für 3 separate Experimente.

Wie oben bereits für die Foxp3 Expression gezeigt, wurde auch für die IL-2 Produktion eine dosisabhängige Beziehung zur applizierten Konzentration von IL-27 sichtbar. Bei den nur mit TGF- $\beta$  kultivierten Zellen bestätigte sich die reziproke Beziehung zwischen hoher Foxp3 Expression (3.2) und niedriger IL-2 Produktion. IL-27 steigerte mit zunehmender Konzentration die IL-2 Produktion. Die höchste Produktion wurde bei einer applizierten Konzentration von 100 ng/ml IL-27 mit 10,5 ng/ml IL-2 im Überstand erreicht, während bei ohne IL-27 kultivierten Zellen nur 0,9 ng/ml IL-2 im Kulturüberstand nachzuweisen waren. Hier korrelierte die höchste IL-2 Produktion mit dem geringsten Anteil von Foxp3<sup>+</sup> Zellen in der Durchflusszytometrie.



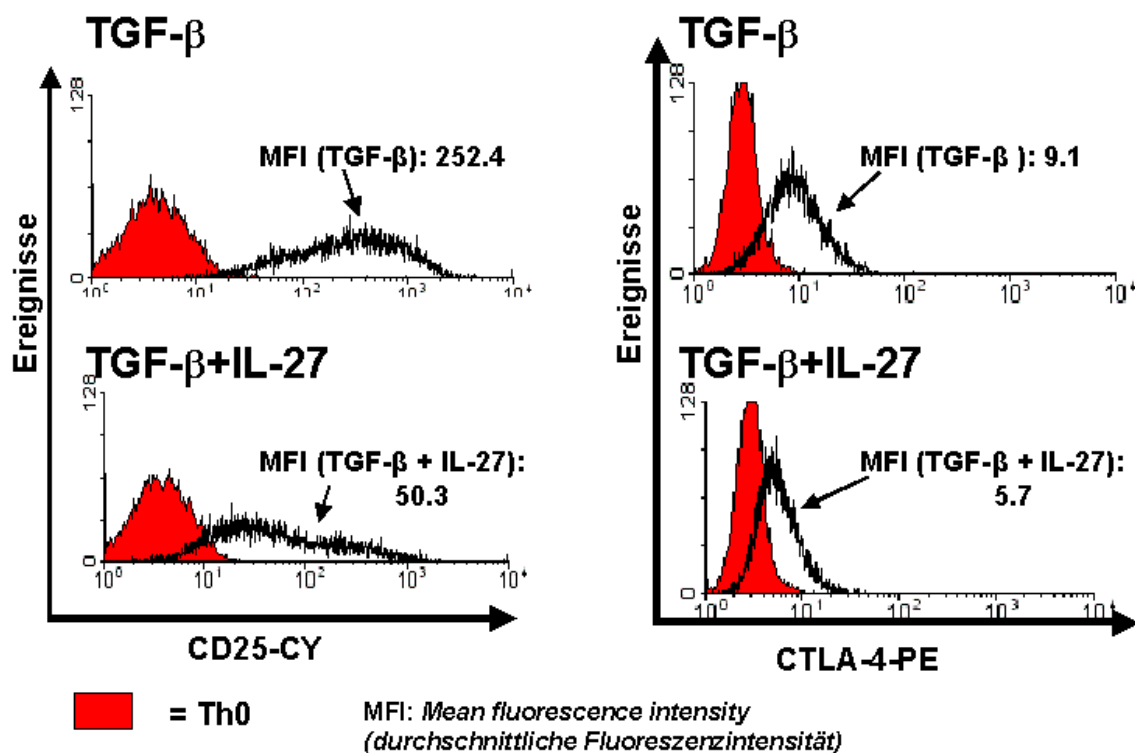
**Abbildung 5d:** IL-2 Konzentration im Kulturüberstand von 72h zu Th0 differenzierten CD4+ Zellen mit ohne verschiedenen applizierten Konzentrationen von IL-27. Die Balken über den Säulen kennzeichnen die Standardabweichung bei Dreifachbestimmungen. Die Daten sind repräsentativ für 3 separate Experimente.

Bei den unter Th0 Bedingungen kultivierten Zellen zeigte sich in Übereinstimmung mit der Literatur auch eine Verminderung der IL-2 Produktion durch IL-27. Allerdings erreichte diese schon bei einer Dosis von 5 ng/ml ein Plateau. Eine höhere Dosis von IL-27 führte zu keiner signifikanten weiteren Verminderung von IL-2. Dieser Effekt von IL-27 wird nach bisherigem Wissen über STAT1 vermittelt (Owaki et al. 2006b)



### 3.5 Effekt von IL-27 auf die Expression von CD25 und CTLA-4 bei Polarisierung zu iTreg.

Ein Charakteristikum von nTreg und iTreg ist die hohe Expression von CD25 auf der Zelloberfläche sowie zytosolisches CTLA-4 (Hori et al. 2003; Khattri et al. 2003; Gavin et al. 2007). Um eine Veränderung dieser Marker durch IL-27 zu untersuchen, kultivierte ich CD4+CD62L+ Zellen unter Th0 Bedingungen oder in Gegenwart von TGF- $\beta$  allein oder in Kombination mit 20 ng/ml IL-27 für 72h. Anschließend wurden sie gemäß 2.4 transferiert und für 48 h in Gegenwart von 50 U/ml rh-IL-2 weiter kultiviert, um sie anschließend wie in 2.7 und 2.8 beschrieben für CTLA-4 und CD25 zu färben und in der Durchflusszytometrie zu analysieren.



**Abbildung 6:** Effekt von IL-27 auf die CTLA-4 und CD25 Expression in der Durchflusszytometrie von zu iTreg differenzierten CD4+CD62L+Zellen mit und ohne Zugabe von IL-27 (weiße Histogramme) im Vergleich zu Th0 (rote Histogramme), 48h nach Transfer. Die Daten sind repräsentativ für 3 separate Ergebnisse.

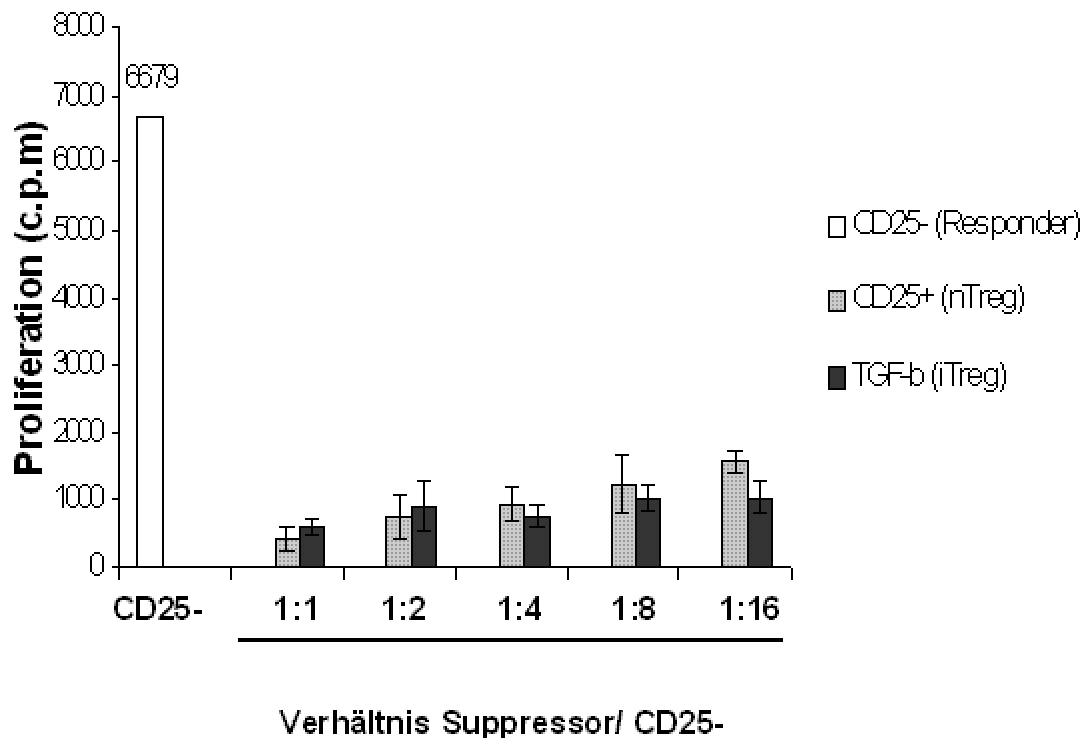
Mit TGF- $\beta$  kultivierte Zellen zeigten wie erwartet eine deutlich höhere Expression von CD25 und CTLA-4 als unter Th0 Bedingungen. Die Expression von CD25 und CTLA-4 unter mit TGF- $\beta$  und IL-27 kultivierten Zellen war auch deutlich höher als die der Th0 Zellen. Allerdings war sie signifikant niedriger als bei nur mit TGF- $\beta$  kultivierten

Zellen. Mit TGF- $\beta$  allein differenzierte Zellen zeigten für CD25-CY eine MFI von 252,4 im Vergleich zu 50,3 bei mit TGF-  $\beta$  und IL-27 differenzierten Zellen. Für CTLA-4 waren die MFIs entsprechend 9,1 vs. 5,7. Somit inhibiert IL-27 die Expression der für Treg typischen Marker, was konsistent mit der durch IL-27 verursachten Herunterregulation von Foxp3 konsistent ist.

### 3.6 Vergleich der suppressiven Fähigkeiten von iTreg und nTreg

Da eines der charakteristischsten Merkmale von nTreg ihre Fähigkeit ist, *in vitro* andere CD4<sup>+</sup> Zellen in ihrer Proliferation zu hemmen, wollte ich die mit TGF- $\beta$  und IL-2 polarisierten Zellen in dieser Hinsicht mit nTreg vergleichen, die frisch aus der Maus isoliert wurden. Während die genauen Mechanismen, welche die jeweilige Suppression vermitteln noch umstritten sind, ist es dennoch relativ klar, dass Treg über spezifische TZR Stimulation zur unspezifischen Suppression angeregt werden müssen.

Es wurden Proliferationsassays durchgeführt (siehe 2.16) mit wie in 2.5 isolierten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Responderzellen, die mit wie in 2.6 isolierten und bestrahlten APZ und löslichem  $\alpha$ -CD3 gemischt wurden. Diese Zellen wurden mit Suppressorzellen vermischt, die entweder als frisch gereinigte CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> Zellen für 72 h mit TGF- $\beta$  und IL-2 polarisiert worden waren oder mit frisch *ex vivo* gemäß 2.5 isolierten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Zellen (=nTreg). Die Mischung fand im angegebenen Mischungsverhältnis statt, und es wurde gemäß 2.16 weiter verfahren, bis die Zellen schließlich für die letzten 7 h mit 3H-Thymidin gepulst wurden.

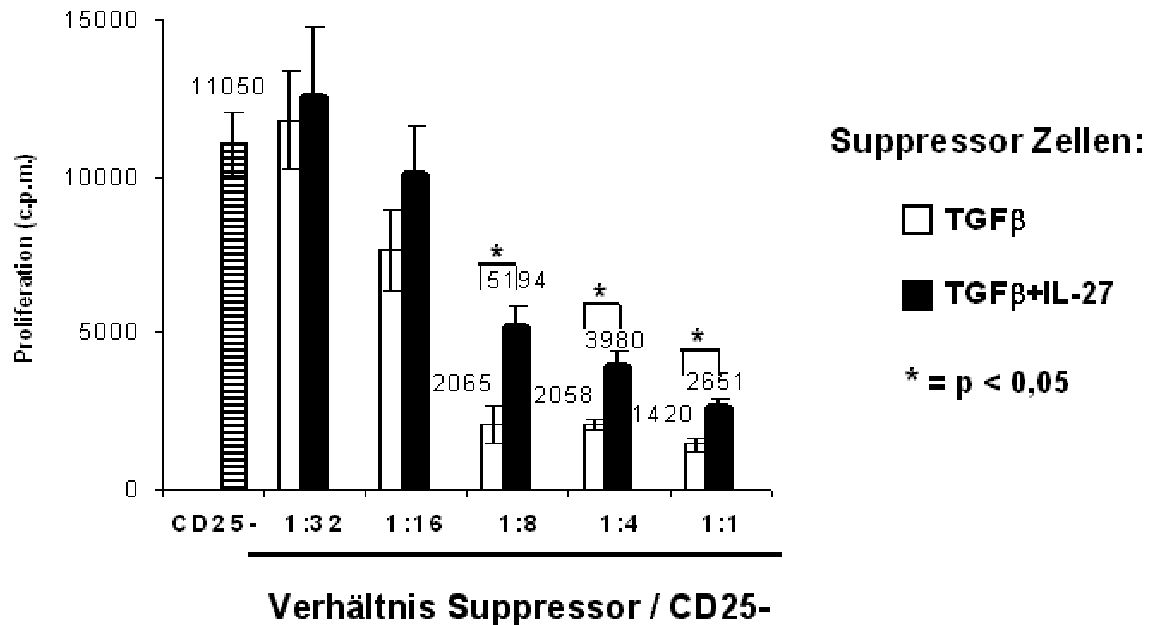


**Abbildung 7a:** Suppressive Fähigkeiten von nTreg (CD25+) zu iTreg (TGF-β) bei verschiedenen Mischungsverhältnissen zu CD25- Responderzellen im Vergleich zu CD25- Responderzellen alleine. Die Balken kennzeichnen die Standardabweichung bei Dreifachbestimmungen. Die Daten sind repräsentativ für mindestens 3 separate Experimente.

Abbildung 7a zeigt exemplarisch, dass die mit TGF-β und IL-2 polarisierten iTreg den frisch isolierten nTreg in ihrer Fähigkeit gleichwertig waren, CD4+CD25- Responderzellen in ihrer Proliferation zu hemmen. CD4+CD25- Responderzellen alleine proliferierten deutlich stärker und erzeugten c.p.m. (*counts per minute*) von ca. 6700, während ein Mischungsverhältnis von 1:1 von CD4+CD25- Responderzellen mit CD4+CD25+ nTreg oder mit TGF-β differenzierten iTreg in 412 bzw. 600 c.p.m. resultierte. Bei der höchsten Verdünnung von 1 : 16 von Responder zu Suppressorzellen fand immer noch eine signifikante Suppression statt, die in 1563 c.p.m. für nTreg bzw. 1033 c.p.m. für iTreg resultierte.

### 3.7 Effekt von IL-27 auf die suppressiven Fähigkeiten von iTreg

Mittlerweile ist bekannt, dass Tr1 Zellen höchstwahrscheinlich durch Differenzierung in Gegenwart von TGF- $\beta$  und IL-27 entstehen können (Awasthi et al. 2007). Es ist weiterhin bekannt, dass Tr1 Zellen *in vivo* suppressiv tätig sind, jedoch ist über die von ihnen verwendeten Mechanismen praktisch noch nichts bekannt. In der Annahme, dass Tr1 Zellen ihre Suppression weniger direkt vermitteln können als Foxp3 positive Treg, vermuten wir eine weniger starke Inhibierung der Responderzellen durch Tr1 Zellen. Zum testen dieser Hypothese führten wir einen wie gerade eben in 3.6 beschriebenen Versuch durch, diesmal allerdings mit CD4<sup>+</sup> Zellen, die für 72 h mit TGF- $\beta$  und IL-2 allein oder in Kombination mit 20 ng/ml IL-27 polarisiert worden waren.



**Abbildung 7b:** Suppressionsfähigkeit von für 72h zu iTreg (mit und ohne Zugabe von IL-27) differenzierten CD4<sup>+</sup> Zellen auf die Proliferation von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Responderzellen bei verschiedenen Mischverhältnissen von Suppressor zu Responderzellen. Die Balken kennzeichnen die Standardabweichung bei Dreifachbestimmungen. Die Daten sind repräsentativ für mindestens 4 Experimente.

Wie in Abbildung 7b ersichtlich, sind auch mit TGF-β und IL-27 polarisierte Zellen noch effizient in der Lage CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Zellen in ihrer Proliferation zu hemmen.

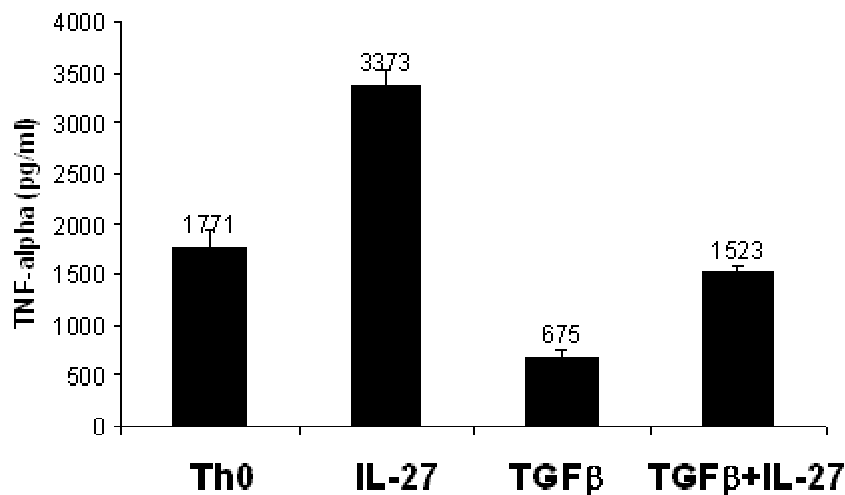
Allerdings sind sie darin bei den Verhältnissen 1:1; 1:4 und 1:8 signifikant schlechter als nur mit TGF-β polarisierte Zellen, wie die Analyse mit einem zweiseitigen, ungepaarten T-Test auf 5% Signifikanzniveau zeigte.

CD25<sup>-</sup> Responderzellen alleine proliferierten so stark, dass sie ca. 11000 c.p.m. produzierten. Ein gleiches Mischungsverhältnis von CD25<sup>-</sup> Responderzellen mit iTreg resultierte in nur noch 1420 c.p.m., während eine Mischung mit in TGF-β und IL-27 differenzierten Zellen in 2651 c.p.m. resultierten. Die Suppression wurde ca. ab einem Mischungsverhältnis von 1:16 bei mit TGF-β und IL-27 differenzierten Zellen und ab 1:32 bei iTreg aufgehoben.

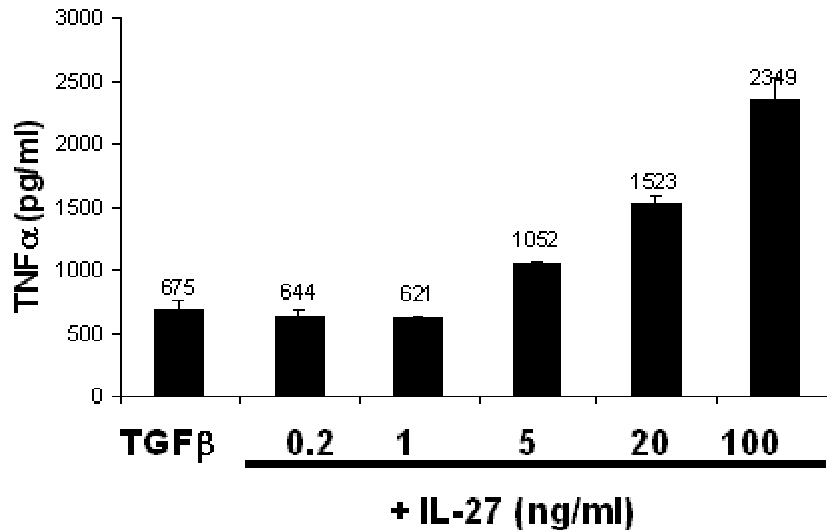
Somit korrelierte die verminderte Foxp3 Expression nach Kultivierung in IL-27 auch mit einer verminderten Fähigkeit, andere CD4<sup>+</sup> Zellen in der Proliferation zu hemmen.

### 3.8 Untersuchung des Effektes von IL-27 auf die TNF- $\alpha$ Produktion von Th0-Zellen und iTreg.

Es wurde bereits beschrieben, dass die Expression von Foxp3 die Produktion von TNF- $\alpha$  vermindern kann (Gavin et al. 2007). IL-27 dagegen wurde die Fähigkeit zugeschrieben, die TNF- $\alpha$  Produktion in der frühen Phase der Differenzierung von CD4<sup>+</sup> Zellen zu steigern (Yoshimura et al. 2006). Hier stellte sich die Frage, ob sich bei der TNF- $\alpha$  Produktion eine ebenso eindeutige reziproke Korrelation mit Foxp3 herstellen ließe wie mit IL-2. Dazu analysierten wir 6h nach Restimulation abgenommene Kulturüberstände von unter Th0 Bedingungen sowie mit TGF- $\beta$  und IL-2 polarisierten CD4<sup>+</sup> Zellen mit und ohne verschiedene Konzentrationen von IL-27.



**Abbildung 8a:** Vergleich der TNF- $\alpha$  Konzentration im Kulturüberstand von mit den angegebenen Zytokinen differenzierten CD4<sup>+</sup> Zellen 6h nach Restimulation. Die Balken kennzeichnen die Standardabweichung bei Dreifachbestimmungen. Die Daten sind repräsentativ für 3 separate Experimente.



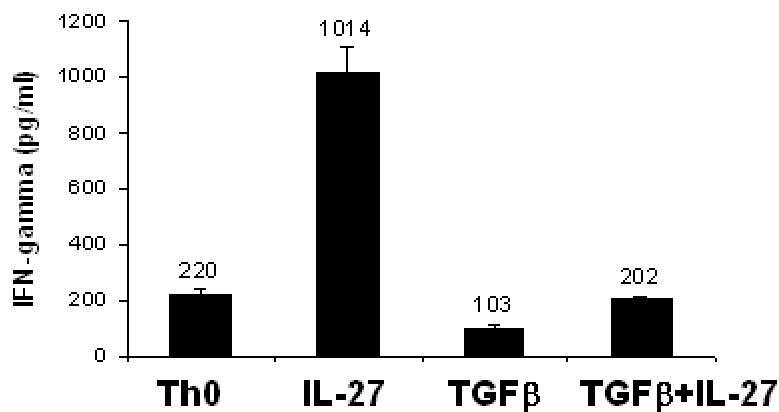
**Abbildung 8b:** TNF- $\alpha$  Konzentration im Kulturüberstand 6h nach Restimulation bei zu iTreg differenzierten CD4+ Zellen mit oder ohne verschiedenen Konzentrationen von IL-27. Die Balken über den Säulen kennzeichnen die Standardabweichung bei Dreifachbestimmungen. Die Daten sind repräsentativ für 3 Experimente.

In Einklang mit der Literatur verursachte eine Differenzierung allein in der Gegenwart von IL-27 eine hohe TNF- $\alpha$  Produktion (3373 pg/ml) im Vergleich zu Th0 Zellen (1771 pg/ml), während diese nur mit TGF- $\beta$  alleine niedrig war (675 pg/ml). Zugabe von IL-27 zu den mit TGF- $\beta$  kultivierten Zellen ergab eine dosisabhängige Steigerung der TNF- $\alpha$  Produktion, auf bis zu 2349 pg/ml bei 100 ng/ml IL-27 im Vergleich zu nur mit TGF- $\beta$  kultivierten Zellen. Dabei war eine signifikante Steigerung erst ab 5 ng/ml IL-27 zu erkennen, und die TNF- $\alpha$  Produktion konnte letztendlich ein mit Th0 Zellen vergleichbares Niveau erreichen.



### 3.9 Kontrolle des Effektes von IL-27 auf die IFN- $\gamma$ Produktion von Th0 und iTreg

IL-27 wurde ursprünglich als ein Th1 induzierender Faktor beschrieben, der die frühe IFN- $\gamma$  Produktion verstärken kann (Takeda et al. 2003). Im Gegensatz dazu ist bekannt, dass TGF- $\beta$  eine Suppression von IFN- $\gamma$  vermitteln kann (Lin et al. 2005). Uns interessierte, inwiefern IL-27 die von TGF- $\beta$  induzierte Suppression aufheben konnte. Zuerst wurden dafür wie in 3.8 gewonnene Überstände 6 h nach Restimulation für IFN- $\gamma$  im ELISA analysiert.

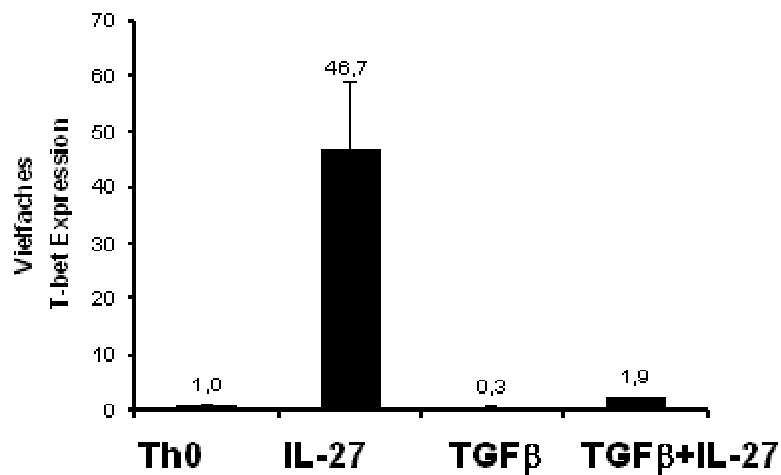


**Abbildung 9a:** Konzentration von IFN- $\gamma$  im Kulturüberstand 6h nach Restimulation von mit den angegebenen Zytokinen differenzierten CD4+ Zellen. Die Balken über den Säulen kennzeichnen die Standardabweichung bei Dreifachbestimmungen. Die Daten sind repräsentativ für 3 separate Experimente.

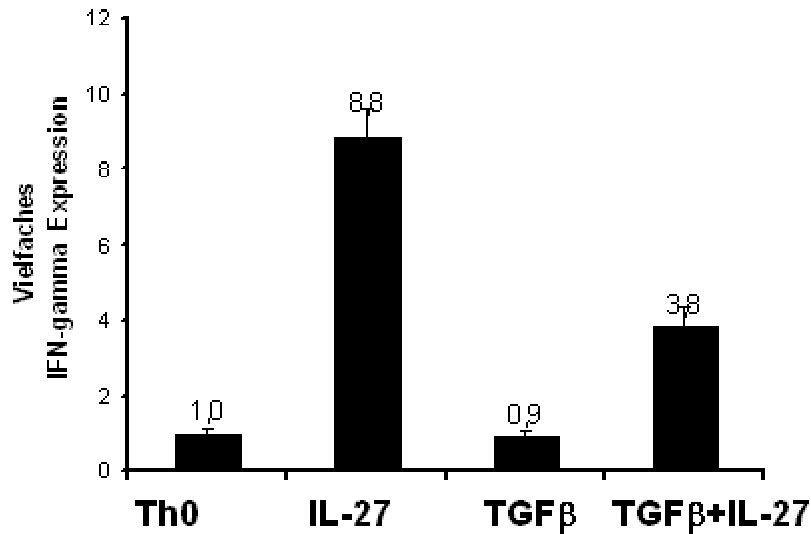
Kultivierung in Gegenwart von IL-27 allein resultierte in einer hohen IFN- $\gamma$  Produktion von 1014 pg/ml. Ebenso wie erwartet zeigte sich nur eine sehr niedrige, hier ca. um den Faktor 10 kleinere Produktion bei Kultivierung mit TGF- $\beta$  alleine (103 pg/ml). Unter Th0 Bedingungen war die Produktion signifikant höher (220 pg/ml) als mit TGF- $\beta$ , aber weiterhin niedrig. Kultivierung mit TGF- $\beta$  und 20 ng/ml IL-27 erhöhte die Produktion deutlich (202 pg/ml) im Vergleich zu TGF- $\beta$  alleine, ließ sie jedoch auf dem Niveau der Th0 Zellen sistieren.

### 3.10 Überprüfung des Effektes von IL-27 auf die Expression von T-bet und IFN- $\gamma$ mRNA

Um den eben beschriebenen Effekt noch genauer zu charakterisieren, wurden unter Th0 und iTreg Bedingungen für 24h polarisierte CD4+CD62L+ Zellen mit und ohne Zugabe von 20 ng/ml IL-27 zuerst nach 2.11.2 zu Schockpellets verarbeitet, anschließend wurde entsprechend 2.12 RNA isoliert, nach 2.13 cDNA gewonnen und letztendlich wie in 2.14 per quantitativer Real-time PCR für die Expressionsniveaus von IFN- $\gamma$  und dem Transkriptionsfaktor T-bet im Vergleich zum Housekeeping Gen HPRT analysiert.



**Abbildung 9b:** Expressionsniveaus (mRNA) von T-bet im Verhältnis zu Th0, normalisiert auf das HPRT Expressionsniveau, bei für 24h mit den angegebenen Zytokinen differenzierten CD4+CD62L+ Zellen. Die Balken über den Säulen entsprechen der Standardabweichung von Zweifachbestimmungen berechnet nach der  $\Delta\Delta C_T$  Methode. Die Daten sind repräsentativ für 3 separate Experimente.

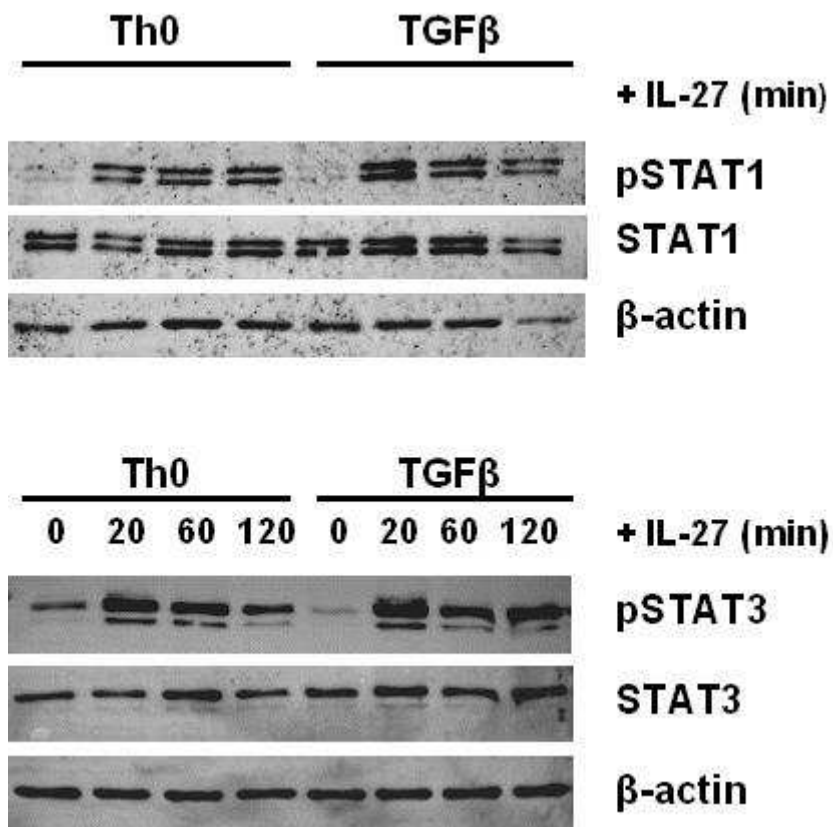


**Abbildung 9c:** Expressionsniveaus von IFN- $\gamma$  mRNA im Verhältnis zu Th0, normalisiert zum HPRT Expressionsniveau bei für 24h mit den angegebenen Zytokinen differenzierten CD4+CD62L+ Zellen. Die Balken über den Säulen entsprechen der Standardabweichung von Zweifachbestimmungen berechnet nach der  $\Delta\Delta C_T$  Methode. Die Daten sind repräsentativ für 3 Experimente.

Bereits zu diesem frühen Zeitpunkt zeigte sich ein sehr ähnliches Muster wie bei der IFN- $\gamma$  Produktion nach Restimulation. IL-27 alleine erzeugte hohe Expressionslevel von T-bet (Faktor 46,7) und IFN- $\gamma$  (Faktor 8,8) relativ zum Th0 Niveau. Insbesondere bei der Expression von T-bet erzeugten alle anderen Ansätze eine sehr viel niedrigere Expression. Bei der IFN- $\gamma$  Expression war der Unterschied zwischen IL-27 alleine und den anderen Ansätzen nicht so ausgeprägt. Auch war dort die Expression von mit TGF- $\beta$  und IL-27 polarisierten Zellen signifikant höher (T-bet: Faktor 1,9; IFN- $\gamma$  3,8) als unter Th0 Bedingungen oder mit TGF- $\beta$  alleine. Trotzdem blieb sie sehr deutlich unter dem Niveau von IL-27 alleine. Somit bestätigte sich die deutliche Inhibierung des Th1 induzierenden Effektes von IL-27 in der Gegenwart von TGF- $\beta$ .

### 3.11 IL-27 phosphoryliert STAT1 und STAT3

Als nächste Frage interessierte uns der zelluläre Mechanismus, mit dem IL-27 die Differenzierung zu Treg unterdrücken kann. IL-27 induziert die Phosphorylierung von STAT1, STAT3, STAT4 und STAT5 (Lucas et al. 2003), wobei die Funktionen von STAT1 und STAT3 für Th-Zellen am wichtigsten zu sein scheinen und am besten charakterisiert sind. Wir konzentrierten uns auf STAT3, da wir in Experimenten mit STAT1 defizienten Mäusen zeigen konnten, dass die Herunterregulation von Foxp3 durch IL-27 unabhängig von STAT1 ist (Daten nicht gezeigt). Zuerst wollten wir kontrollieren, ob etwa schon die Differenzierung mit TGF- $\beta$  einen Einfluss auf die Aktivierung von STAT1 und STAT3 hat. Wie in 2.2 beschrieben, wurden CD4<sup>+</sup> Zellen isoliert und für 24 h in der Gegenwart oder Abwesenheit von TGF- $\beta$  für 24h polarisiert und anschließend gewaschen, um sie anschließend für 2 h in Zellkulturmedium „zu beruhigen“. 20 ng/ml IL-27 wurden daraufhin für 0, 20, 60 und 120 min zugefügt und schließlich phosphoryliertes STAT1 und STAT3 (pSTAT1 oder pSTAT3) sowie  $\beta$ -Actin im Western Blot analysiert. Anschließend wurden die Blots gestrippt (2.11.7) und für gesamtes (phosphoryliertes und unphosphoryliertes) STAT1 bzw. STAT3 analysiert.

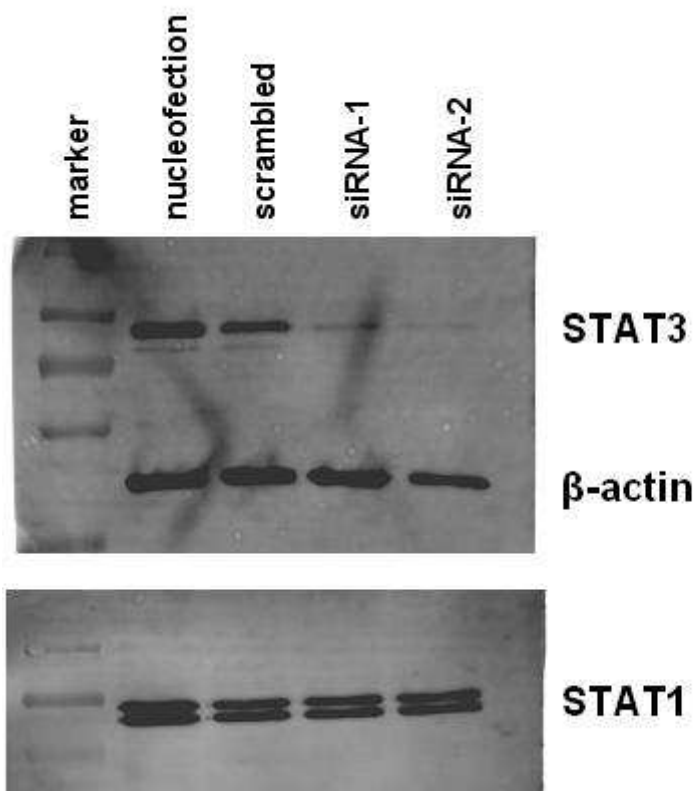


**Abbildung 10:** Phosphorylierung von STAT1 bzw. STAT3 bei für 24h zu iTreg oder Th0 differenzierten Zellen nach Zugabe von IL-27 für die angegebenen Zeitspannen im Vergleich zu gesamtem STAT1 bzw. STAT3 und  $\beta$ -Actin. Das Ergebnis ist repräsentativ für 3 separate Experimente.

In Abbildung 10 ist sichtbar, dass die Phosphorylierung von STAT1 und STAT3 für Th0 Bedingungen und für iTreg Bedingungen gleichartig ist. Auch die Expressionsniveaus von STAT1 und STAT3 sind vergleichbar. Somit bewirkt IL-27 in allen Fällen eine gleichmäßige und effiziente Phosphorylierung von STAT1 und STAT3 auch unter iTreg Bedingungen.

### 3.12 Nachweis der Herunterregulation von STAT3 durch siRNA

Eine Gemeinsamkeit von IL-6 und IL-27 besteht in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3. Ebenso sind beide Zytokine in der Lage, die Expression von Foxp3 herunterzuregulieren. Bei IL-6 konnte gezeigt werden, dass diese Herunterregulation von STAT3 vermittelt wird (Yao et al. 2007; Yang et al. 2007). Somit lag die Vermutung nahe, dass auch IL-27 die Suppression der Foxp3 Expression über STAT3 vermittelt. Daher wurde nun siRNA benutzt, um die Expression des STAT3 Proteins vorübergehend zu reduzieren. Dafür wurden CD4<sup>+</sup> Zellen gemäß 2.2 isoliert und gemäß 2.15 ohne RNA, mit scrambled RNA sowie den beschriebenen siRNAs 1, 2 und 3 direkt nach Isolation nukleofiziert, für 48 h unter iTreg Bedingungen polarisiert und geerntet. Schließlich wurden die Lysate der Zellen im Western Blot für die Expressionslevel von STAT3, STAT1 und  $\beta$ -Actin analysiert.

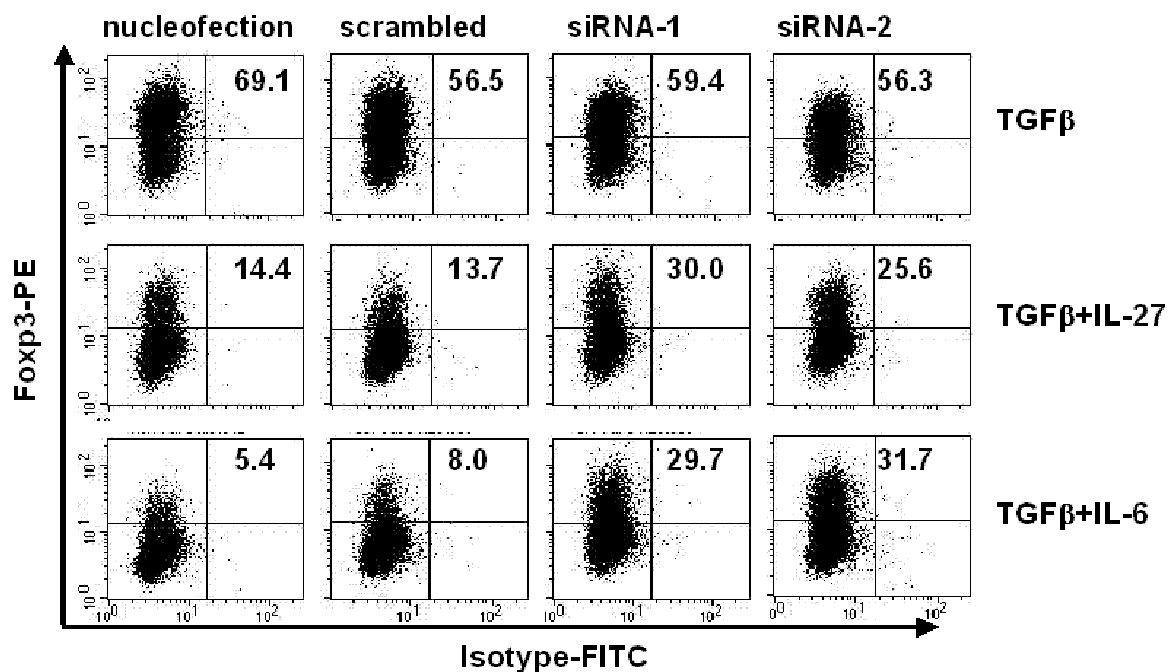


**Abbildung 11:** Expressionsniveaus im Western Blot von STAT1 (als Kontrolle für die Spezifität der siRNA), STAT3 und  $\beta$ -Actin nach 48h Polarisierung von CD4+ Zellen, die direkt nach Isolation ohne RNA, mit scrambled RNA oder mit siRNA1/ siRNA2 gegen STAT3 nukleofiziert und zu iTreg differenziert wurden. Die Daten sind repräsentativ für 3 Experimente.

Es zeigte sich, dass siRNA1 und siRNA2 in der Lage waren, spezifisch und effizient die Expression von STAT3 nach 48h zu inhibieren. SiRNA3 war dazu nicht in der Lage (Daten nicht gezeigt). siRNA1 und siRNA2 hatten hingegen keinen Effekt auf die Proteinlevel von STAT1, was die Spezifität dieser siRNAs für STAT3 belegt.

### 3.13 Effekt der Herunterregulation von STAT3 durch siRNA1 und siRNA2 auf die Foxp3 Expression

Um den Effekt der vorübergehenden Herunterregulation von STAT3 auf die Foxp3 Expression zu untersuchen, wurden CD4<sup>+</sup> Zellen gemäß 2.2 isoliert, entsprechend 2.15 direkt nukleofiziert und mit Grundbedingungen (siehe 2.3.3) plus TGF- $\beta$  oder TGF- $\beta$  und IL-27 oder TGF- $\beta$  und IL-6 für 72 h polarisiert. 5h nach der Restimulation wurden sie geerntet, fixiert und anschließend per ICS für Foxp3 in der Durchflusszytometrie analysiert.



**Abbildung 12a:** Anteil von Foxp3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Zellen (%) 5h nach Restimulation, mit direkter Nukleofektion nach Isolierung a) ohne RNA, b) mit scrambled RNA, c,d) siRNA1 oder siRNA2 und anschließender Polarisierung mit den angegebenen Zytokinen. Die Daten sind repräsentativ für mindestens 3 Experimente.

Die Polarisierung der CD4<sup>+</sup> Zellen nur mit TGF- $\beta$  resultierte in einem Anteil von Foxp3<sup>+</sup> Zellen von 56-70%. Die Zugabe von 20 ng/ml IL-27 konnte die Expression von Foxp3 um den Faktor 4,8 bei ohne RNA nukleofizierten und um den Faktor 4,1 bei mit scrambled RNA nukleofizierten Zellen mindern. Dagegen führten die siRNA-1 oder -2 jeweils zu einer Halbierung des Effektes von IL-27 auf die Foxp3 Expression (siRNA-1 30%; siRNA-2 25,6% Foxp3<sup>+</sup> Zellen).



IL-6 war in der Lage, die Foxp3 Expression stärker als IL-27 zu inhibieren. Bei ohne RNA und mit scrambled RNA nukleofizierten Zellen senkte IL-6 den Anteil von Foxp3+ Zellen auf 5,4 - 8%. Auch dieser stärkere Effekt wurde durch Behandlung mit siRNA-1 und -2 neutralisiert, so dass sehr ähnliche Expressionsniveaus von Foxp3 wie bei den mit IL-27 und siRNA behandelten Zellen entstanden (29,7% für siRNA-1 und 31,7% für siRNA2).

Somit zeigte sich, dass die Herunterregulation von STAT3 durch siRNA1 und siRNA2 in der Lage war, signifikant die inhibitorischen Effekte von IL-27 und IL-6 auf die durch TGF- $\beta$  vermittelte Induktion von Foxp3 zu vermindern. Die relative Effektivität der STAT3 Herunterregulation mit resultierender verstärkter Foxp3 Expression war stärker in mit IL-6 als mit IL-27 behandelten Zellen (Faktor 4 versus Faktor 2). Jedoch war IL-6 auch effektiver in der Lage, Foxp3 in Abwesenheit von siRNA zu inhibieren als IL-27. Beide (mit IL-27 und IL-6 sowie siRNA behandelten) Ansätze erreichten jedoch ein sehr ähnliches Endniveau der Foxp3 Expression, was etwa der Hälfte (ca. 30% Foxp3+ Zellen) desjenigen von iTreg (nur mit TGF- $\beta$  polarisiert) entsprach.

### 3.14 Vergleich der IFN- $\gamma$ Produktion mit und ohne Herunterregulation von STAT3 durch siRNA

Eine vorübergehende Herunterregulation von STAT3 ließ ein Überwiegen der durch STAT1 vermittelten Aktivierungswege und somit eine Hochregulation von T-bet und letztendlich auch IFN- $\gamma$  vermuten. Zusätzlich wurde bereits für die Zytokine IL-6 und IL-21 beschrieben, dass sie in der Abwesenheit von STAT3 den Anteil der IFN- $\gamma$  positiven Zellen erhöhen (Zhou et al. 2007; Yang et al. 2007). Somit färbte ich die wie in 3.13 gewonnenen Zellen für IFN- $\gamma$  und analysierte sie in der Durchflusszytometrie.

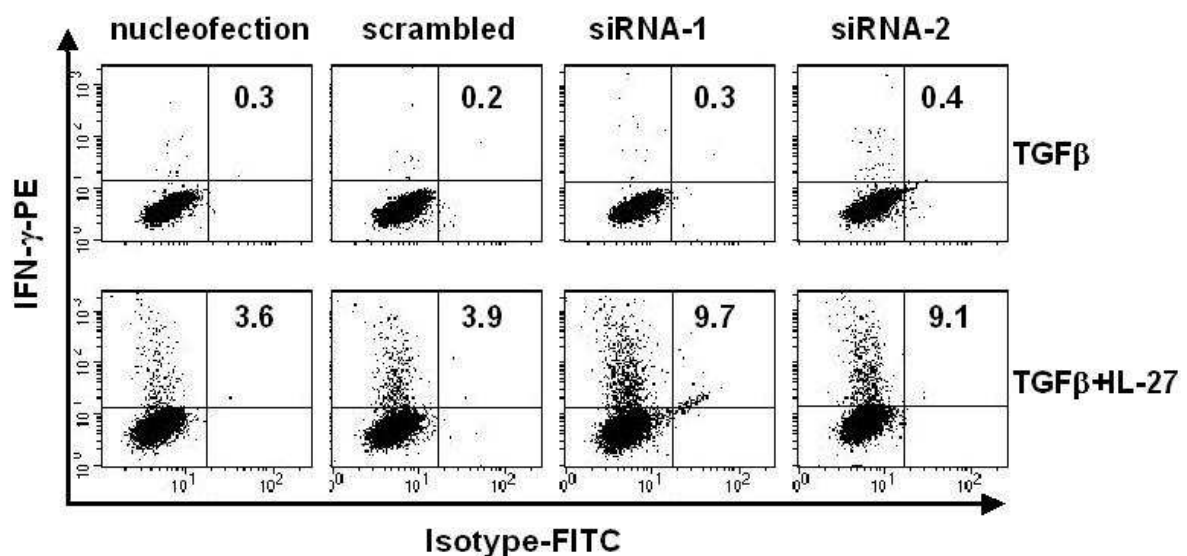


Abbildung 12b: Anteil von IFN- $\gamma$  positiven Zellen 5 h nach Restimulation bei ohne RNA, mit scrambled RNA, siRNA1 oder siRNA2 nukleofizierten und mit den angegebenen Zytokinen polarisierten CD4+ Zellen. Die Daten sind repräsentativ für 3 separate Experimente.

Mit TGF- $\beta$  und IL-27 behandelte Zellen zeigten auch ohne Behandlung mit siRNA 1 oder siRNA2 einen höheren Anteil von IFN- $\gamma$ + Zellen (3,6-3,9%) als nur mit TGF- $\beta$  behandelte Zellen (ca. 0,3%). Jedoch verdreifachte sich dieser Anteil unter siRNA1 und siRNA2 auf 9,7 bzw. 9,1%. Dieses Resultat deutet an, dass der STAT1 Signaltransduktionsweg nach Beeinflussung von STAT3 nicht nur intakt, sondern sogar verstärkt aktiv war.

## 4 Diskussion

### 4.1 Ziel der Arbeit:

IL-27 wurde zuerst als ein Zytokin beschrieben, das über den Transkriptionsfaktor STAT1 und die Induktion des Transkriptionsfaktors T-bet die frühe Th1 Differenzierung unterstützen kann (Takeda et al. 2003). Jedoch sind IL-27R defiziente Mäuse durchaus in der Lage, eine effiziente, wenn vielleicht auch etwas verzögerte Th1 Antwort aufzubauen und Infektionen mit intrazellulären Erregern, wie etwa durch *Toxoplasma gondii* und *Leishmania donovani*, zu beseitigen. Diese IL-27R defizienten Mäuse entwickeln allerdings eine überschießende Th-Zell abhängige Immunreaktion, die meistens letal endet (Villarino et al. 2003; Rosas et al. 2006). Diese Ergebnisse weisen daher sowohl auf Th1 permissive, als auch auf immunsuppressive Eigenschaften von IL-27 hin. Um diese scheinbar gegensätzlichen Effekte genauer zu verstehen, sollte in dieser Arbeit die Wirkung von IL-27 auf die Differenzierung von einer der am besten untersuchten suppressiven Th-Zell Population, den iTregs, untersucht werden.

Für nTregs und iTregs gilt in Mäusen Foxp3 als spezifischster Marker (Ziegler 2006). Zusätzlich gilt die Hypothese, dass Foxp3 der wichtigste Regulator für die Entwicklung und Funktion der Tregs ist (Fontenot et al. 2003; Hori et al. 2003). Die Funktion von Tregs wird hauptsächlich darüber definiert, dass sie in der Lage sind, andere CD4+ (und CD8+) T-Zellen in ihrer Aktivierung, Proliferation und Effektorfunktion zu supprimieren (Thornton and Shevach 1998; Piccirillo and Shevach 2001). Somit lag es nahe, den Effekt von IL-27 auf die Foxp3 Expression während der Differenzierung zu iTregs (mit IL-2 und TGF- $\beta$ ) zu analysieren und die so entstandenen Zellen genauer auf ihren Phänotyp zu untersuchen. Da IL-27 nach Bindung an seinen Rezeptor STAT1 und STAT3 (sowie STAT4, STAT5) aktiviert (Lucas et al. 2003), und für IL-6 schon gezeigt werden konnte, dass es die Foxp3 Expression STAT3 abhängig unterdrücken kann (Yao et al. 2007; Yang et al. 2007), vermuteten wir einen ähnlichen supprimierenden Effekt von IL-27 auf die Foxp3 Expression.

Für diese Analyse wurde hauptsächlich mit *ex vivo* isolierten CD4+ und CD4+CD62L+ Zellen in einem System gearbeitet, in dem die Zellen unter „Grund-“, (synonym für „Th0-“) Bedingungen mit  $\alpha$ -CD3,  $\alpha$ -CD28 und IL-2 *in vitro* unter Präsenz von  $\alpha$ -IFN- $\gamma$  und  $\alpha$ -IL-4 stimuliert wurden, um eine Polarisierung zu Th1 oder Th2 durch Eigenproduktion dieser entsprechenden Zytokine zu unterdrücken. Für die

Differenzierung zu iTreg wurde zusätzlich TGF- $\beta$  hinzugefügt und gegebenenfalls IL-27.

#### 4.2 Foxp3 Expression unter dem Einfluss von TGF- $\beta$ und IL-27

Unter Nutzung dieses Systems konnte bestätigt werden, dass Foxp3<sup>+</sup> iTreg mit TGF- $\beta$  effizient induziert werden können. Bereits nach 48h exprimierte ein signifikanter Anteil der Zellen Foxp3, und dieser Anteil blieb bis nach Restimulation stabil. Th0 Bedingungen und IL-27 alleine waren nicht in der Lage, Foxp3<sup>+</sup> Zellen zu induzieren. Bei Differenzierung mit TGF- $\beta$  und IL-27 wurden noch einige wenige Foxp3<sup>+</sup> Zellen induziert. Die Inhibition von Foxp3 durch IL-27 war signifikant. Es wurden um den Faktor 4 weniger Foxp3 positive Zellen induziert als bei nur mit TGF- $\beta$  differenzierten Zellen (Abbildung 4a). Der Unterschied wurde bereits nach 48h deutlich, und er blieb es bis nach der Restimulation. Somit wurde die Differenzierung zum Foxp3<sup>+</sup> iTreg Phänotyp durch IL-27 effektiv unterdrückt. Dieser Effekt wurde bereits unabhängig von dieser Arbeit durch Neufert et al. bestätigt. (Neufert et al. 2007).

Außerdem konnte demonstriert werden, dass die Herunterregulation von Foxp3 abhängig von der verwendeten Konzentration von IL-27 war. Eine höhere applizierte Konzentration von IL-27 korrelierte mit einer geringeren Foxp3 Expression. Der von uns untersuchte Bereich wies noch keinen Sättigungseffekt auf. Allerdings zeigte schon die zweitniedrigste Konzentration von 1 ng/ml IL-27 eine Halbierung der Foxp3<sup>+</sup> Zellen, während bei Konzentrationen über 100 ng/ml IL-27 keine wesentliche Steigerung der Inhibition mehr zu erreichen war, weil der Anteil der Foxp3<sup>+</sup> Zellen schon sehr niedrig war (Abbildung 4b).

#### 4.3 Einfluss von IL-27 auf die IL-2 Produktion

IL-27 wurde bisher primär nur als negativer Regulator der IL-2 Produktion angesehen (Villarino et al. 2006b; Owaki et al. 2006b). Diesen Effekt konnten wir unter Th0 Bedingungen bestätigen (Abbildung 5b und 5d). Er war bereits nach 48h sichtbar und blieb bis nach der Restimulation stabil. Auch hier konnten wir dosisabhängige Beziehungen für IL-27 zeigen. Die IL-2 Produktion nahm bis zu einer Konzentration von 5 ng/ml IL-27 um ca. den Faktor 2,8 ab. Bei weiteren Verdünnungsstufen von IL-27 zeigte sich jedoch keine wesentliche Verminderung der IL-2 Produktion mehr.

Ebenso konnten wir bestätigen, dass mit TGF- $\beta$  differenzierte Zellen deutlich weniger IL-2 produzieren als Zellen unter Th0 Bedingungen oder nur mit IL-27 polarisierte Zellen.

Neu ist mein Befund, dass IL-27 unter iTreg induzierenden Bedingungen die IL-2 Produktion steigern kann. Dabei korreliert der Anteil der Foxp3<sup>+</sup> Zellen sehr gut reziprok mit der Steigerung der IL-2 Produktion (Vergleiche Abbildung 4b mit 5c). Während der Reifung blieben die mit TGF- $\beta$  und IL-27 kultivierten Zellen deutlich unter dem Niveau der IL-2 Produktion von Th0 Zellen. Nach der Restimulation jedoch erreichten sie ein Th0 ähnliches Niveau. Somit konnte gezeigt werden, dass IL-27 je nach herrschenden dem Zytokinmilieu gegensätzliche Effekte auf die Expression von IL-2 hat.

#### 4.4 Einfluss von IL-27 auf die Treg Marker CD25 und CTLA-4

nTreg und iTreg sind im ausgereiften Stadium phänotypisch nicht zu unterscheiden. Sie werden beide durch die Expression der Marker CD25, CTLA-4, GITR und LAG-3 sowie intrazelluläres Foxp3 charakterisiert. Da Hypothesen über den Mechanismus der Suppression durch Treg auch die Konkurrenz für IL-2 (aufgrund höherer Affinität durch die hohe Expression des IL-2R $\alpha$  /CD25) sowie eine Interaktion von CTLA-4 mit CD80 und CD86 auf APZ (Sakaguchi 2004;Huang et al. 2004a) beinhalten, erschien es sinnvoll, den Einfluss von IL-27 auf die Expression von CD25 und CTLA-4 zu untersuchen. IL-27 konnte das Erreichen des iTreg assoziierten Phänotyps ebenfalls in Bezug auf die Marker CD25 und CTLA-4 unterdrücken (Abbildung 6), obwohl die mit TGF- $\beta$  und IL-27 differenzierten Zellen CD25 und CTLA-4 auf deutlich höheren Niveau als Th0 Zellen exprimierten.

Mittlerweile gibt es schlüssige Belege dafür, dass die Kombination von TGF- $\beta$  und IL-27 Tr1 Zellen induzieren können, welche das immunsuppressive Zytokin IL-10 produzieren (Awasthi et al. 2007). Diese Zellen wurden bisher im Maussystem nicht sehr eingehend auf ihre Oberflächenmarker untersucht, sind im Humansystem aber offensichtlich negativ für CTLA-4 und haben ein niedriges Expressionsniveau für CD25 (Veldman et al. 2004). Dieses Ergebnis würde zu unseren Daten passen und könnte bedeuten, dass auch in unseren Kulturen durch die Kombination von TGF- $\beta$  und IL-27 Tr1 Zellen entstanden. Leider war während der experimentellen Phase der Arbeit die Induktion von IL-10<sup>+</sup> Tr1 Zellen durch TGF- $\beta$  und IL-27 noch nicht bekannt, so dass

wir keine Veranlassung sahen, die Zellen bezüglich IL-10 genauer zu charakterisieren. Das müsste in künftigen Arbeiten geschehen.

Die niedrigere Expression von CTLA-4 und CD25 von den mit TGF- $\beta$  und IL-27 differenzierten Zellen, die möglicherweise IL-10<sup>+</sup> Tr1 Zellen sind, könnte ein Indiz dafür sein, dass Tr1 Zellen ihre Suppression z.B. im Gegensatz zu CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg nicht über eine Kompetition für IL-2 vermitteln (Pandiyani et al. 2007). Andererseits könnte auch die Steigerung der IL-2 Produktion durch IL-27 zu den niedrigeren Expressionsniveaus von CD25 passen. Es wäre möglich, dass ein hohes Expressionsniveau von CD25 auf der Zelloberfläche über unbekannte Mechanismen generell mit einer verminderten Fähigkeit zur autokrinen IL-2 Produktion korreliert (wie bei Treg), während eine niedrige CD25 Expression mit einer stärkeren Eigenproduktion von IL-2 (wie bei Th1 und Th2 Effektorzellen) in Zusammenhang steht.

#### 4.5 Vergleich der suppressiven Eigenschaften der entstehenden Zellen

Eine wichtiges Charakteristikum von Treg ist ihre Fähigkeit andere CD4<sup>+</sup> Zellen in ihrer Proliferation zu hemmen. Somit wurde es unerlässlich, die mit TGF- $\beta$  differenzierten Zellen mit *ex vivo* isolierten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> nTreg zu vergleichen, um sich ihrer Gleichwertigkeit in dieser Hinsicht sicher zu sein. Dafür wurden Proliferationsassays mit Zugabe von <sup>3</sup>H-Thymidin verwendet. (Abbildung 7a). Die von mir induzierten Treg waren den nTreg in ihrer suppressiven Funktion mindestens ebenbürtig.

Zum anderen stellte sich die Frage des Vergleichs von iTreg mit TGF- $\beta$  und IL-27 differenzierten Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass mit TGF- $\beta$  und IL-27 polarisierte Zellen immer noch in der Lage waren, eine deutliche Suppression zu vermitteln (Abbildung 7b). Allerdings waren sie darin in den Verhältnissen 1:1; 1:4; 1:8 von Suppressor- zu Responder-Zellen signifikant schlechter als nur mit TGF- $\beta$  polarisierte iTreg. Somit korrelierte eine verminderte Foxp3 Expression auch mit einer verminderten suppressiven Funktion im Proliferationsassay.

In diesem Fall ergibt sich ein scheinbarer Widerspruch, wenn man davon ausgeht, dass IL-27 in Kombination mit TGF- $\beta$  IL-10<sup>+</sup> Tr1 Zellen induzieren kann (Awasthi et al. 2007). Für IL-10<sup>+</sup> Tr1 Zellen wurden nämlich *in vivo* immunsuppressive Eigenschaften gezeigt (Groux et al. 1997; Cottrez et al. 2000; Cong et al. 2002; McGuirk and Mills 2002a). Wie bereits erwähnt, ist jedoch über die genauen Suppressionsmechanismen

von Tr1 Zellen noch wenig bekannt, außer der Vermutung, dass sie hauptsächlich über IL-10 vermittelt werden (Barrat et al. 2002). Es wäre daher möglich, dass sie einerseits wirklich weniger effektiv die Proliferation von CD4+CD25- Responderzellen hemmen. Andererseits könnte es sein, dass sie ihre Suppression *in vivo* indirekter, wie z.B. über andere Zellen vermitteln. Jedoch war ein solcher Interaktionspartner höchstwahrscheinlich unter den hier genutzten Bedingungen nicht anwesend gewesen. Dieser Punkt wird weiter unten noch ausführlicher diskutiert.

#### 4.6 Einfluss von IL-27 auf die TNF- $\alpha$ Produktion

Mit TGF- $\beta$  und IL-27 differenzierte Th-Zellen produzierten höhere Konzentrationen von TNF- $\alpha$  als mit TGF- $\beta$  allein differenzierte Zellen (Abbildung 8a). Das Niveau der mit TGF- $\beta$  und IL-27 induzierten Zellen erreichte 6h nach Restimulation ungefähr das von Th0 Zellen. Nur mit IL-27 differenzierten Zellen produzierten das höchste Niveau von TNF- $\alpha$ , welches ca. doppelt so hoch war wie das von Th0 oder mit TGF- $\beta$  und IL-27 differenzierten Zellen.

Auch hier korrelierte eine Steigerung der applizierten IL-27 Dosis mit einer Steigerung der TNF- $\alpha$  Produktion im untersuchten Bereich. Allerdings konnte diese Steigerung erst ab einer Konzentration von 5 ng/ml IL-27 beobachtet werden (Abbildung 8b).

Diese Ergebnisse stehen wieder eher im Kontrast zu der Induktion von IL-10+ Tr1 Zellen durch TGF- $\beta$  und IL-27, weil TNF- $\alpha$  als ein proinflammatorisches Zytokin betrachtet wird. TNF- $\alpha$  löst systemische Effekte wie Fieber aus, ist an der lokalen Entzündungsreaktion durch eine Erhöhung der Permeabilität der Gefäßwände beteiligt und spielt auch in der Pathogenese des septischen Schocks eine Rolle. Allerdings sollte man auch die Relationen im Blick behalten, weil mit TGF- $\beta$  und IL-27 differenzierte Zellen ihre TNF- $\alpha$  Produktion nur bis auf ein Th0 Niveau steigern können, das als „neutral“ oder basal gilt. Somit mag der Unterschied zu der TNF- $\alpha$  Produktion von iTreg signifikant sein, aber *in vivo* vermutlich keine signifikanten proinflammatorischen Effekte bewirken, da das sehr niedrige TNF- $\alpha$  Produktionsniveau von iTreg mit IL-27 „nur“ auf das immer noch niedrige, basale Produktionsniveau der Th0 angehoben wird.

#### 4.7 Th1 induzierende Eigenschaften von IL-27 im Zusammenspiel mit TGF- $\beta$

Wie bereits erwähnt, ist IL-27 über STAT1 ebenfalls in der Lage, T-bet zu induzieren, was die frühe Th1 Differenzierung unterstützen kann und somit auch die Produktion von IFN- $\gamma$  steigert (Takeda et al. 2003; Owaki et al. 2006a). In diesem Zusammenhang interessierte es uns, ob IL-27 auch noch bei gleichzeitiger Gabe von TGF- $\beta$  diese Th1 permissiven Eigenschaften zeigen konnte.

Unter den von uns genutzten Bedingungen konnte IL-27 alleine, wie erwartet, die Produktion des zentralen Th1 Zytokins IFN- $\gamma$  steigern. Dabei sorgte IL-27 6h nach Restimulation für ein um ca. Faktor 5 erhöhtes IFN- $\gamma$  Niveau im ELISA als unter Th0 Bedingungen. TGF- $\beta$  allein erzeugte eine noch signifikant niedrigere IFN- $\gamma$  Produktion als bei Th0 Zellen, während das Niveau der mit TGF- $\beta$  und IL-27 differenzierten Zellen, wie auch bei TNF- $\alpha$ , dem der Th0 Zellen entsprach.

Dieser Effekt wurde bereits in sehr ähnlicher Weise nach nur 24h Polarisierung auf mRNA Ebene deutlich. Schon zu diesem Zeitpunkt erzeugte IL-27 für sich alleine die deutlich höchsten Expressionslevel von T-bet und IFN- $\gamma$  mRNA. Die Polarisierung unter TGF- $\beta$  und IL-27 Bedingungen zeigte zu diesem Zeitpunkt noch höhere Werte als unter Th0 Bedingungen oder mit TGF- $\beta$  alleine.

Insgesamt blieb das Niveau der IFN- $\gamma$  Produktion, sowie die Expression von T-bet und IFN- $\gamma$  mRNA, jedoch in Anbetracht der bekannten Th1 induzierenden Eigenschaften von IL-27 (selbst ohne TGF- $\beta$ ) auf erstaunlich niedrigem Niveau. Diese Reaktion ist vermutlich der Verwendung von  $\alpha$ -IFN- $\gamma$  während der Differenzierung geschuldet, die eine Selbstverstärkung verhinderte. Tatsächlich differenzierten wir einmal Zellen ohne  $\alpha$ -IFN- $\gamma$  und untersuchten auch diese Zellen nach 24h für T-bet und IFN- $\gamma$  mRNA, was in vielfach erhöhten Expressionsniveaus von IFN- $\gamma$  und T-bet mRNA resultierte (Daten nicht gezeigt), allerdings unter ungefährer Beibehaltung der eben beschriebenen Relationen.

#### 4.8 Aktivierung von STAT Proteinen durch IL-27

Nachdem in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass IL-27 die Foxp3 Expression von mit TGF- $\beta$  differenzierten Zellen supprimieren kann, galt unser besonderes Interesse dem dahinter liegenden Mechanismus. Innerhalb unserer Arbeitsgruppe hatten wir



bereits gezeigt, dass die Foxp3 Expression unabhängig von STAT1 ist (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis wurde unabhängig von unserer Arbeitsgruppe durch Neufert et al. bestätigt (Neufert et al. 2007). Für die von IL-27 induzierte Aktivierung von STAT1 konnte auch schon gezeigt werden konnte, dass sie die Expression des Th2 Transkriptionsfaktors GATA3 hemmen kann (Yoshimoto et al. 2007), genau wie die Th17 Differenzierung (Batten et al. 2006; Stumhofer et al. 2006) oder die IL-2 Produktion unter Th0 und Th1 Bedingungen (Villarino et al. 2006a; Owaki et al. 2006b). Weiterhin wird T-bet über STAT1 induziert (Takeda et al. 2003).

Da einerseits für IL-27 Effekte in T-Lymphozyten auf die Aktivierung von STAT1 und STAT3 durch IL-27 am wichtigsten gelten, andererseits über die Folgen der Aktivierung von STAT3 noch weniger bekannt war und außerdem für IL-6 schon gezeigt werden konnte, dass es Foxp3 STAT3 abhängig inhibiert, fokussierte ich die Untersuchung auf eine potentielle Rolle von STAT3. Zuerst wollte ich analysieren, ob die Differenzierung mit TGF- $\beta$  bereits einen Einfluss auf die Fähigkeit von IL-27 hat STAT1 und STAT3 zu phosphorylieren. Dies war nicht der Fall (Abbildung 10).

#### 4.9 Nachweis der transienten Herunterregulation von STAT3 durch siRNA1 und siRNA2

Zur Untersuchung des Effekts von STAT3 auf die Foxp3 Expression bedienten wir uns der transienten Herunterregulation von STAT3 durch Nukleofektion mit siRNA. Zum Nachweis des Erfolgs und zur Kontrolle, dass die siRNA nicht unspezifisch ebenso STAT1 herunterregulierte, wurden nach 48h gewonnene Zell-Lysate im Western Blot auf die Expressionsniveaus für STAT3, STAT1 und  $\beta$ -Actin analysiert. Es zeigte sich, dass siRNA-1 und siRNA-2, aber nicht siRNA-3, die STAT3 Expression effektiv unterdrücken konnten, während die STAT1 Expression konstant blieb (Abbildung 11).

#### 4.10 Die Inhibition von Foxp3 durch IL-27 ist zumindest teilweise STAT3 abhängig und führt zu einer Verstärkung der STAT1 vermittelten Signalwege

Nachdem etabliert war, dass die Nukleofektion mit siRNA-1 und siRNA-2 zu einer effektiven transienten Herunterregulation spezifisch von STAT3, aber nicht von STAT1

fürte, konnten die nukleofektierten Zellen in der Durchflusszytometrie auf ihre Foxp3 Expression untersucht werden. Als Kontrolle wurden mit TGF- $\beta$  und IL-6 polarisierte Zellen eingesetzt, weil von IL-6 schon bekannt war, dass es die Foxp3 Expression abhängig von STAT3 supprimiert. IL-6 konnte die Foxp3 Expression effektiver unterdrücken als IL-27. Es zeigte sich weiterhin, dass durch die Nukleofektion mit der siRNA (im Vergleich zu nur mit Kontroll-RNA nukleofizierten Zellen) die Fähigkeit von IL-27 signifikant reduziert war, die durch TGF- $\beta$  induzierte Foxp3 Expression zu inhibieren. Allerdings konnte das maximale Niveau der Foxp3 Expression (nur TGF- $\beta$ , Nukleofektion ohne RNA oder mit Kontroll-RNA) bei gleichzeitiger Gabe von IL-27 mit siRNA1 nicht erreicht werden, d.h. der Effekt von IL-27 konnte durch gegen STAT3 gerichtete siRNA nur partiell aufgehoben werden.

Als Erklärung für dieses Phänomen sind primär zwei Mechanismen möglich. Einerseits ist es denkbar, dass die Suppression der Foxp3 Expression durch IL-27 nicht nur über STAT3 vermittelt wird und deswegen die Inhibierung trotz effektiver Herunterregulation von STAT3 nicht völlig aufgehoben werden konnte. Andererseits sollte berücksichtigt werden, dass die Herunterregulation mit siRNA nur von vorübergehender Natur ist und die Zellen sich nach der Nukleofektion auch noch geteilt haben. Wie sich Teilungen auf die Wirkung der siRNA auswirken, ist nicht völlig klar, genauso wie die Frage, wie lange die Zeitspanne „vorübergehend“ effektiv dauert. Ebenfalls zu beachten ist, dass die Halbwertszeit von STAT3 ca. 8,5 h beträgt (Siewert et al. 1999) und somit in den ersten Stunden nach der Nukleofektion noch ausreichend STAT3 anwesend war, um IL-27 und IL-6 inhibitorisch auf die Foxp3 Expression wirken zu lassen. Auch dies könnte eine Erklärung für das nicht Erreichen derselben Foxp3 Expression sein, wie sie in nur mit TGF- $\beta$  behandelten Zellen erzielt wurde. Hier scheint sich eine spätere Gabe der Foxp3 beeinflussenden Zytokine (wie z.B. nach 48h) anzubieten, wenn STAT3 nachgewiesenermaßen effektiv runterreguliert ist. Allerdings lassen sich die Zellen nach diesem Zeitraum oft nicht mehr effektiv polarisieren.

Konsistent mit der erfolgreichen Herunterregulation von STAT3 war mein Befund eines anschließenden relativen Überwiegens des STAT1 Signalweges in diesen Zellen. Dies erkennt man beispielsweise daran, dass die Anzahl der IFN- $\gamma$  positiven Zellen bei mit IL-27 und TGF- $\beta$  behandelten Zellen unter Nukleofektion mit siRNA1 und siRNA2 um den Faktor 2,5 höher war als bei entsprechenden Zellen ohne Gabe von RNA oder bei mit Kontroll-RNA nukleofizierten Zellen.

#### 4.11 Ergebnisse in Zusammenschau mit neueren Erkenntnissen in der Literatur

Durch neuste Erkenntnisse, die nach Abschluss unserer experimentellen Phase veröffentlicht wurden, erscheinen die gewonnenen Daten in einem etwas veränderten Licht. Normalerweise hätte man angenommen, dass die Herunterregulation des spezifischsten Treg Markers Foxp3 durch IL-27 in Zellen resultiert, die eine deutlichere pro-inflammatorische Rolle haben. Allerdings konnte von Stumhofer et al. 2007 gezeigt werden, dass IL-6 und IL-27 STAT3 abhängig die IL-10 Produktion in Th-Zellen hochregulieren können. Passend dazu fanden Awasthi et al. 2007, dass von nTreg modifizierte Dendritische Zellen (DZ) IL-27 sezernieren, was für die Induktion von IL-10+ Tr1 Zellen sorgen könnte. TGF- $\beta$  amplifizierte in diesem System die Generierung von Tr1 Zellen. Mit diesen Entdeckungen könnte auch eine ältere Publikation von Stassen et al. (Stassen et al. 2004) neue Relevanz bekommen. Dort wurde gezeigt, dass die Integrin  $\alpha_4\beta_7$  exprimierende Subpopulation menschlicher CD4+CD25+ Treg direkt, also ohne Vermittlung über DZ, IL-10 produzierende Tr1 ähnliche Zellen induzierten. Somit müssen wir davon ausgehen, dass auch wir durch Differenzierung mit IL-27 und TGF- $\beta$  Foxp3- Tr1 Zellen induziert haben. In Unkenntnis dieser neuen Ergebnisse hatte ich während der experimentellen Phase die entstandenen Zellen nie bezüglich IL-10 charakterisiert.

In jedem Fall wird durch die Annahme, möglicherweise mit IL-10+ Tr1 Zellen gearbeitet zu haben, die Interpretation der verminderten Suppressionsfähigkeit der vermutlichen Tr1 Zellen im Vergleich zu nur mit TGF- $\beta$  differenzierten iTreg schwieriger. Zumindest kann festgehalten werden, dass auch mit TGF- $\beta$  und IL-27 differenzierte Zellen eine effektive Suppression vermittelt haben, wenn sie auch geringer war als jene von iTreg. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass Tr1 Zellen Suppression weniger direkt vermitteln als iTreg. Bei Tr1-Zellen ist bisher nur bekannt, dass sie ihre Suppression teilweise über TGF- $\beta$  und IL-10 vermitteln (Groux et al. 1997; Cottrez et al. 2000).

Von IL-10 wird angenommen, suppressive Eigenschaften hauptsächlich über Modulation von APZ zu vermitteln. So hindert IL-10 APZ an der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, wie IL-12, sowie der Expression von co-stimulatorischen Molekülen auf ihrer eigenen Oberfläche und induziert auch dadurch Anergie in Th-Zellen (Macatonia et al. 1993; Mitra et al. 1995; Moore et al. 2001). Bei

T-Zellen wird durch IL-10 direkt die Produktion von IL-2, TNF und IL-5 inhibiert (de Waal et al. 1993;Taga et al. 1993;Moore et al. 2001). IL-10 aktiviert nach Bindung an seinen Rezeptor Jak1, Tyk2, STAT1, STAT3 und in nicht-Makrophagen auch STAT5 (Finbloom and Winestock 1995). In einigen Zellen kann IL-10 SOCS3 induzieren (Ito et al. 1999;Cassatella et al. 1999). Die suppressiven Eigenschaften von IL-10 werden auf molekularer Ebene seiner Fähigkeit zugeschrieben, Gen Transkription zu verhindern und *de novo* Proteinsynthese zu induzieren. Dieser Mechanismus soll von STAT3 abhängig sein und wird im übrigen noch schlecht verstanden (Amezaga et al. 1992;Murray 2005).

Somit ist denkbar, dass Tr1 Zellen ihre Suppression nicht über dieselben Mechanismen vermitteln, wie Treg, also beispielsweise über die Konkurrenz für IL-2 oder den Transfer von cAMP über Gap junctions. Stattdessen wären sie möglicherweise für ihre Suppression eher auf die in den Proliferationsassays ebenfalls anwesenden APZs angewiesen. Weil diese jedoch mit 25 Gy bestrahlt waren, ist es unwahrscheinlich, dass die APZs auf eventuell von Tr1 Zellen sezerniertes IL-10 in vollem Ausmaße reagieren konnten und ihren möglichen „normalen“ Beitrag zur Proliferationshemmung der CD25- Zellen leisten konnten. Daraus würde sich das relativ geringe Suppressionspotential unserer fraglichen Tr1 Zellen erklären.

In diesem Zusammenhang verblüfft auch die Ähnlichkeit der genutzten Signaltransduktionswege von IL-10 und IL-27. Beide Zytokine aktivieren Jak1, Tyk1 sowie STAT1, STAT3 und STAT5, obwohl sie völlig unterschiedliche Rezeptoren nutzen. (Im Gegensatz zum IL-27 Rezeptor gehört der IL-10 Rezeptor zur Familie der Interferon Rezeptoren (Moore et al. 2001)). Diese Ähnlichkeit auf Signaltransduktionsebene könnte trotz der Rezeptorunterschiede auch ein Hinweis dafür sein, dass die beiden Zytokine biologisch ähnliche Funktionen ausüben.

In diesem Sinne hat es mich ebenfalls fasziniert, dass der Aktivierung von STAT3 durch IL-6 über gp130 derzeit auch eine wichtige Funktion für die Generierung von Th17 Zellen zugeschrieben wird (Nishihara et al. 2007). Dies ist bemerkenswert, da die gp130 Untereinheit den Rezeptoren für IL-6 und IL-27 gemeinsam ist (Boulay et al. 2003). Mittlerweile deuten zwar Hinweise darauf hin, dass nur mit TGF- $\beta$  und IL-6 differenzierte Th17 zusätzlich noch IL-10 produzieren und eher einen regulatorischen Phänotyp besitzen (McGeachy et al. 2007). Trotzdem verwunderte mich die gleichzeitige Relevanz von STAT3 für die Generierung von pro-inflammatorischen

Th17, sowie als wichtigster bisher bekannter Faktor für die Vermittlung der immunsuppressiven Effekte von IL-10.

Die biologischen Funktionen von STAT3 sind tiefgreifend und komplex. Mäuse, in denen STAT3 völlig fehlt, gehen um den 7. Tag ihrer Embryonalentwicklung zugrunde (Takeda et al. 1997). Neuroendokrinologisch vermittelt STAT3 unter anderem Effekte von Leptin mit Folgen für z.B. die Gewichtsregulation und die Schilddrüsenfunktion (Bates and Myers 2004). Auch im Immunsystem hat es sehr komplexe Wirkungen. Selektive Beeinträchtigung von STAT3 in Makrophagen und Neutrophilen in Mäusen sorgt für übermäßig aktivierte Makrophagen, die als Reaktion auf Endotoxin eine höhere Produktion von inflammatorischen Zytokinen an den Tag legen, mit oftmals letalen Ausgang. Zusätzlich erkrankten alle Tiere mit zunehmenden Alter an chronischer Enterocolitis. Dies wird teilweise darauf zurückgeführt, dass die Makrophagen nicht mehr auf IL-10 reagieren (Takeda et al. 1999).

APZ, wie Makrophagen und dendritische Zellen, bei denen STAT3 pharmakologisch oder genetisch ausgeschaltet wurde, waren abnorm aktiviert und in der Lage anerge CD4<sup>+</sup> Zellen wieder volle Effektor-Funktionen ausführen zu lassen. Dies wird ebenfalls auf eine erhöhte Produktion von inflammatorischen Zytokinen wie IL-12 und Chemokinen wie RANTES zurückgeführt. Zusätzlich exprimierten diese APZ mehr MHCs-II, mehr B7.1 und B7.2 co-stimulatorische Moleküle und sie produzierten kein IL-10 (Cheng et al. 2003). Somit erscheint STAT3 bei APZ und Neutrophilen primär immunsuppressive Funktionen zu haben, die eng im Zusammenhang mit IL-10 stehen.

Das Bild wird noch komplexer, wenn man den Phänotyp von Mäusen betrachtet, bei denen STAT3 selektiv in CD4<sup>+</sup> Zellen ausgeschaltet wurde, wie von Liu X et al gezeigt. Diese Mäuse zeigen eine leicht verminderte Anzahl von CD4<sup>+</sup> Zellen mit einem leicht erhöhten Niveau von CD8<sup>+</sup> Zellen. Bei genauerer Analyse der CD4<sup>+</sup> Zellen zeigte sich ein vermehrter Anteil von Th1, IL-10<sup>+</sup>, sowie Foxp3<sup>+</sup> Zellen. Eine Erhöhung der Foxp3<sup>+</sup> und IFN- $\gamma$  produzierenden Th1 Zellen würde auch zu unseren Daten nach Herunterregulation von STAT3 passen, während die Erhöhung von IL-10<sup>+</sup> Zellen ein wenig verwundert. Passend zu der Hypothese, dass eine Aktivierung von STAT3 notwendig ist für die Generierung von Th17 Zellen, zeigten CD4<sup>STAT3<sup>-/-</sup></sup> Mäuse eine verminderte Anzahl von Th17 Zellen sowie für IL-17 und IFN- $\gamma$  doppelt positiven Zellen. Zusätzlich konnte weder eine EAE noch eine Experimentelle Autoimmune Uvoretinitis (EAU) in den Tieren induziert werden. Letzteres wurde auch in Zusammenhang mit einer verminderten Expression von  $\alpha$ 4/ $\beta$ 1-Integrinen gebracht, was

möglicherweise eine Lymphozytenmigration ins ZNS beeinträchtigt (Liu et al. 2008). Konträr zu diesen Ergebnissen konnten Wang R. et al. in einem System mit konstitutiv in CD4+ Zellen aktivierten STAT3 zeigen, dass dort die Anzahl von Foxp3+ Treg und IL-10+ Zellen erhöht war (Wang et al. 2007).

Somit lässt sich die Rolle von STAT3 in CD4+ Zellen bezüglich proinflammatorischer oder immunsuppressiver Eigenschaften bisher nicht eindeutig verallgemeinern. Trotzdem erscheint es mir möglich, dass STAT3 einerseits über IL-27 Foxp3 herunterreguliert, gleichzeitig aber ebenso Mechanismen in Gang setzen könnte, die von Foxp3 unabhängig supprimieren. Als erstes sollte allerdings auch unter Nutzung unseres Systems untersucht werden, ob mit TGF- $\beta$  und IL-27 tatsächlich IL-10+ Tr1 Zellen induziert werden, bevor man sich eingehender der Untersuchung der ihnen zur Verfügung stehenden suppressiven Mechanismen widmet.

## 5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde der Effekt des Zytokins Interleukin-27 (IL-27) auf die *in vitro* Generierung von murinen induzierten regulatorischen Th-Zellen (iTreg) untersucht. IL-27 gehört zur IL-12 Zytokinfamilie und ist ein heterodimeres Protein mit proinflammatorischen und immunsuppressiven Eigenschaften, das nach Bindung an seinen Rezeptor in Th-Zellen insbesondere die Transkriptionsfaktoren *signal transducer and activator of transcription 1* (STAT1) und STAT3 aktiviert. Regulatorische Th-Zellen (Treg) sind wichtig für die Immunhomöostase und ihnen wird unter anderem eine Rolle bei der Verhinderung von Autoimmunkrankheiten zugeschrieben. iTreg können aus naiven Th-Zellen durch Zugabe von IL-2 und Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) differenziert werden. *Forkhead box P3* (Foxp3) ist ein Transkriptionsfaktor, dessen Anwesenheit notwendig und ausreichend für die Hauptfunktion von Treg ist, nämlich andere CD4<sup>+</sup> Zellen in ihrer Proliferation und Effektorfunktion zu hemmen.

In den von mir durchgeführten Studien wurde die Interaktion von IL-27 und TGF- $\beta$  für die Differenzierung von iTreg analysiert. Bei naiven CD4<sup>+</sup> Zellen, die in der Gegenwart von IL-27 und TGF- $\beta$  differenziert wurden, wurde die Expression von Foxp3 effektiv inhibiert, im Gegensatz zu nur mit TGF- $\beta$  differenzierten Zellen. Diese Inhibition von Foxp3 durch IL-27 konnte durch Nukleofektion mit siRNA gegen STAT3 teilweise aufgehoben werden. Somit scheint die Inhibition der Foxp3 Expression zumindest teilweise von STAT3 abhängig zu sein. Durch die Herunterregulation von STAT3 mit der siRNA verstärkte sich die IFN- $\gamma$  Produktion, was vermutlich für ein Überwiegen des STAT1-Signalweges unter diesen Bedingungen spricht. Die Produktion der Zytokine IL-2, TNF- $\alpha$  und unter unseren Bedingungen auch IFN- $\gamma$ , steigerte sich bei mit TGF- $\beta$  und IL-27 differenzierten Zellen deutlich im Vergleich zu iTreg. Die Expression der mit Treg assoziierten Marker CTLA-4 und CD25 war in iTreg größer als bei zusätzlich mit IL-27 differenzierten Zellen. Die Fähigkeit von mit TGF- $\beta$  und IL-27 differenzierten Zellen, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Responderzellen in ihrer Proliferation zu hemmen, war im Vergleich zu iTreg vermindert. Allerdings vermittelten mit TGF- $\beta$  und IL-27 differenzierte Zellen noch eine deutliche Suppression. Laut aktueller Publikationen könnten letztere damit möglicherweise Tr1 Zellen darstellen, die das immunsuppressive Zytokin IL-10 produzieren. Es erscheint möglich, dass STAT3 einerseits die Foxp3 Expression herunterregulieren kann, andererseits aber andere unbekannte Mechanismen

in Gang setzt, die vielleicht Foxp3 unabhängig immunsuppressive Fähigkeiten vermitteln.



## 6 Abstract

### **IL-27 inhibits regulatory T-cells via STAT3**

In this thesis, the effect of the cytokine Interleukin-27 (IL-27) was investigated on the *in vitro* generation of murine inducible regulatory Th-cells (iTregs). IL-27 is a heterodimeric protein that belongs to the IL-12 family of cytokines and pro- and anti-inflammatory properties are attributed to it. IL-27 activates mainly the transcription factors *signal transducer and activator of transcription 1* (STAT1) and STAT3 after binding to its receptor. Regulatory Th-cells (Treg) are important for immune homeostasis and are implied in the protection against autoimmune diseases. iTregs can be induced from naïve CD4<sup>+</sup> cells by differentiation with IL-2 and TGF- $\beta$ . *Forkhead box P3* (Foxp3) is a transcription factor, the presence of which is necessary and sufficient for the main function of Tregs, namely to inhibit the proliferation and effector function of other CD4<sup>+</sup> cells.

In my studies the interaction of IL-27 and TGF- $\beta$  for the generation of iTreg was investigated. In naïve CD4<sup>+</sup> cells that were differentiated in the presence of IL-27 and TGF- $\beta$ , the expression of Foxp3 was effectively inhibited, compared to cells differentiated in the presence of TGF- $\beta$  alone. The inhibition of Foxp3 by IL-27 could be partially reversed by nucleofection with small interfering RNA (siRNA) targeted against STAT3, so that one can conclude that the inhibition of the expression of Foxp3 is at least partially dependent on STAT3. When STAT3 was down regulated via siRNA, the cells produced more IFN- $\gamma$ , indicating the possible prevalence of the STAT1 signaling pathway in this situation. The production of the cytokines IL-2, TNF- $\alpha$  and, using our conditions, IFN- $\gamma$  as well, increased considerably when naïve Th-cells were differentiated with TGF- $\beta$  and IL-27 compared to iTreg. The expression levels of the Treg markers CTLA-4 and CD25 were greater in iTreg than in cells differentiated in the additional presence of IL-27. The ability of naïve CD4<sup>+</sup> cells differentiated with IL-27 and TGF- $\beta$  to block proliferation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> responder cells was decreased compared to iTreg, although some significant suppression was still mediated by cells differentiated with TGF- $\beta$  and IL-27. According to recent publications, the latter cells could represent Tr1 cells, which produce the immunosuppressive cytokine IL-10. It seems possible that STAT3 is, on the one hand, able to down regulate the expression of Foxp3 and, on the other hand, able to initiate some unknown mechanisms, which might mediate immunosuppressive effects independently of Foxp3.

## 7 Referenzen

- 1) Afkarian M, Sedy JR, Yang J, Jacobson NG, Cereb N, Yang SY, Murphy TL, Murphy KM. T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4<sup>+</sup> T cells. *Nat Immunol* 2002;3:549-557.
- 2) Aggarwal S, Ghilardi N, Xie MH, de Sauvage FJ, Gurney AL. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *Journal of Biological Chemistry* 2003;278:1910-1914.
- 3) Agnello D, Lankford CS, Bream J, Morinobu A, Gadina M, O'Shea JJ, Frucht DM. Cytokines and transcription factors that regulate T helper cell differentiation: new players and new insights. *J Clin Immunol* 2003;23:147-161.
- 4) Akbari O, Stock P, DeKruyff RH, Umetsu DT. Role of regulatory T cells in allergy and asthma. *Curr Opin Immunol* 2003;15:627-633.
- 5) Amezcaga MA, Bazzoni F, Sorio C, Rossi F, Cassatella MA. Evidence for the involvement of distinct signal transduction pathways in the regulation of constitutive and interferon gamma-dependent gene expression of NADPH oxidase components (gp91-phox, p47-phox, and p22-phox) and high-affinity receptor for IgG (Fc gamma R-1) in human polymorphonuclear leukocytes. *Blood* 1992;79:735-744.
- 6) Annacker O, Pimenta-Araujo R, Burlen-Defranoux O, Barbosa TC, Cumano A, Bandeira A. CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10. *J Immunol* 2001;166:3008-3018.
- 7) Apostolou I, von Boehmer H. In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells. *Journal of Experimental Medicine* 2004;199:1401-1408.
- 8) Awasthi A, Carrier Y, Peron JP, Bettelli E, Kamanaka M, Flavell RA, Kuchroo VK, Oukka M, Weiner HL. A dominant function for interleukin 27 in generating interleukin 10-producing anti-inflammatory T cells. *Nat Immunol* 2007;8:1380-1389.
- 9) Azuma T, Takahashi T, Kunisato A, Kitamura T, Hirai H. Human CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells suppress NKT cell functions. *Cancer Res* 2003;63:4516-4520.
- 10) Bacon CM, McVicar DW, Ortaldo JR, Rees RC, O'Shea JJ, Johnston JA. Interleukin 12 (IL-12) induces tyrosine phosphorylation of JAK2 and TYK2: differential use of Janus family tyrosine kinases by IL-2 and IL-12. *J Exp Med* 1995;181:399-404.
- 11) Barrat FJ, Cua DJ, Boonstra A, Richards DF, Crain C, Savelkoul HF, de Waal-Malefyt R, Coffman RL, Hawrylowicz CM, O'Garra A. In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4<sup>(+)</sup> T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines. *J Exp Med* 2002;195:603-616.
- 12) Bates SH, Myers MG. The role of leptin-->STAT3 signaling in neuroendocrine function: an integrative perspective. *J Mol Med* 2004;82:12-20.

- 13) Batten M, Li J, Yi S, Kljavin NM, Danilenko DM, Lucas S, Lee J, de Sauvage FJ, Ghilardi N. Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17-producing T cells. *Nat Immunol* 2006;7:929-936.
- 14) Bentley GA, Mariuzza RA. The structure of the T cell antigen receptor. *Annu Rev Immunol* 1996;14:563-590.
- 15) Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 2006;441:235-238.
- 16) Bopp T, Becker C, Klein M, Klein-Hessling S, Palmethofer A, Serfling E, Heib V, Becker M, Kubach J, Schmitt S, Stoll S, Schild H, Staeger MS, Stassen M, Jonuleit H, Schmitt E. Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J Exp Med* 2007;204:1303-1310.
- 17) Boulay JL, O'Shea JJ, Paul WE. Molecular phylogeny within type I cytokines and their cognate receptors. *Immunity* 2003;19:159-163.
- 18) Boussiotis VA, Tsai EY, Yunis EJ, Thim S, Delgado JC, Dascher CC, Berezovskaya A, Rousset D, Reynes JM, Goldfeld AE. IL-10-producing T cells suppress immune responses in anergic tuberculosis patients. *J Clin Invest* 2000;105:1317-1325.
- 19) Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paepfer B, Clark LB, Yasayko SA, Wilkinson JE, Galas D, Ziegler SF, Ramsdell F. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet* 2001;27:68-73.
- 20) Brustle A, Heink S, Huber M, Rosenplanter C, Stadelmann C, Yu P, Arpaia E, Mak TW, Kamradt T, Lohoff M. The development of inflammatory T(H)-17 cells requires interferon-regulatory factor 4. *Nat Immunol* 2007;8:958-966.
- 21) Cantor H, Boyse EA. Functional subclasses of T lymphocytes bearing different Ly antigens. II. Cooperation between subclasses of Ly+ cells in the generation of killer activity. *J Exp Med* 1975;141:1390-1399.
- 22) Carrier Y, Yuan J, Kuchroo VK, Weiner HL. Th3 cells in peripheral tolerance. I. Induction of Foxp3-positive regulatory T cells by Th3 cells derived from TGF-beta T cell-transgenic mice. *J Immunol* 2007a;178:179-185.
- 23) Carrier Y, Yuan J, Kuchroo VK, Weiner HL. Th3 cells in peripheral tolerance. II. TGF-beta-transgenic Th3 cells rescue IL-2-deficient mice from autoimmunity. *J Immunol* 2007b;178:172-178.
- 24) Cassatella MA, Gasperini S, Bovolenta C, Calzetti F, Vollebregt M, Scapini P, Marchi M, Suzuki R, Suzuki A, Yoshimura A. Interleukin-10 (IL-10) selectively enhances CIS3/SOCS3 mRNA expression in human neutrophils: evidence for an IL-10-induced pathway that is independent of STAT protein activation. *Blood* 1999;94:2880-2889.

- 25) Chai JG, Xue SA, Coe D, Addey C, Bartok I, Scott D, Simpson E, Stauss HJ, Hori S, Sakaguchi S, Dyson J. Regulatory T cells, derived from naive CD4+CD25- T cells by in vitro Foxp3 gene transfer, can induce transplantation tolerance. *Transplantation* 2005;79:1310-1316.
- 26) Chakraborty N, Bilgrami S, Maness L, Guo C, Perez-Diez A, Mukherji B, Tutschka P. Myeloablative chemotherapy with autologous peripheral blood stem cell transplantation for metastatic breast cancer: immunologic consequences affecting clinical outcome. *Bone Marrow Transplant* 1999;24:837-843.
- 27) Chen W, Jin W, Wahl SM. Engagement of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) induces transforming growth factor beta (TGF-beta) production by murine CD4(+) T cells. *J Exp Med* 1998;188:1849-1857.
- 28) Chen WJ, Jin WW, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM. Conversion of peripheral CD4(+)CD25(-) naive T cells to CD4(+)CD25(+) regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *Journal of Experimental Medicine* 2003;198:1875-1886.
- 29) Cheng F, Wang HW, Cuenca A, Huang M, Ghansah T, Brayer J, Kerr WG, Takeda K, Akira S, Schoenberger SP, Yu H, Jove R, Sotomayor EM. A critical role for Stat3 signaling in immune tolerance. *Immunity* 2003;19:425-436.
- 30) Chu CY, Rana TM. Small RNAs: regulators and guardians of the genome. *J Cell Physiol* 2007;213:412-419.
- 31) Cong Y, Weaver CT, Lazenby A, Elson CO. Bacterial-reactive T regulatory cells inhibit pathogenic immune responses to the enteric flora. *J Immunol* 2002;169:6112-6119.
- 32) Cosmi L, Liotta F, Lazzeri E, Francalanci M, Angeli R, Mazzinghi B, Santarlasci V, Manetti R, Vanini V, Romagnani P, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F. Human CD8+CD25+ thymocytes share phenotypic and functional features with CD4+CD25+ regulatory thymocytes. *Blood* 2003;102:4107-4114.
- 33) Cottrez F, Hurst SD, Coffman RL, Groux H. T regulatory cells 1 inhibit a Th2-specific response in vivo. *J Immunol* 2000;165:4848-4853.
- 34) Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, Evdemon-Hogan M, Conejo-Garcia JR, Zhang L, Burow M, Zhu Y, Wei S, Kryczek I, Daniel B, Gordon A, Myers L, Lackner A, Disis ML, Knutson KL, Chen L, Zou W. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 2004;10:942-949.
- 35) de Waal MR, Yssel H, de Vries JE. Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4+ T cell clones and resting T cells. Specific inhibition of IL-2 production and proliferation. *J Immunol* 1993;150:4754-4765.
- 36) Dembic Z, Haas W, Weiss S, McCubrey J, Kiefer H, von BH, Steinmetz M. Transfer of specificity by murine alpha and beta T-cell receptor genes. *Nature* 1986;320:232-238.

- 37) Dieckmann D, Plottner H, Berchtold S, Berger T, Schuler G. Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med* 2001;193:1303-1310.
- 38) Diehl S, Rincon M. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. *Mol Immunol* 2002;39:531-536.
- 39) Ferber IA, Lee HJ, Zonin F, Heath V, Mui A, Arai N, O'Garra A. GATA-3 significantly downregulates IFN-gamma production from developing Th1 cells in addition to inducing IL-4 and IL-5 levels. *Clin Immunol* 1999;91:134-144.
- 40) Ferretti S, Bonneau O, Dubois GR, Jones CE, Trifilieff A. IL-17, produced by lymphocytes and neutrophils, is necessary for lipopolysaccharide-induced airway neutrophilia: IL-15 as a possible trigger. *J Immunol* 2003;170:2106-2112.
- 41) Finbloom DS, Winestock KD. IL-10 induces the tyrosine phosphorylation of tyk2 and Jak1 and the differential assembly of STAT1 alpha and STAT3 complexes in human T cells and monocytes. *J Immunol* 1995;155:1079-1090.
- 42) Floess S, Freyer J, Siewert C, Baron U, Olek S, Polansky J, Schlawe K, Chang HD, Bopp T, Schmitt E, Klein-Hessling S, Serfling E, Hamann A, Huehn J. Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells. *PLoS Biol* 2007;5:e38.
- 43) Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003;4:330-336.
- 44) Gavin MA, Rasmussen JP, Fontenot JD, Vasta V, Manganiello VC, Beavo JA, Rudensky AY. Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. *Nature* 2007;445:771-775.
- 45) Gershon RK. A disquisition on suppressor T cells. *Transplant Rev* 1975;26:170-185.
- 46) Gershon RK, Kondo K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* 1970;18:723-737.
- 47) Ghilardi N, Kljavin N, Chen Q, Lucas S, Gurney AL, de Sauvage FJ. Compromised humoral and delayed-type hypersensitivity responses in IL-23-deficient mice. *J Immunol* 2004;172:2827-2833.
- 48) Ghiringhelli F, Menard C, Martin F, Zitvogel L. The role of regulatory T cells in the control of natural killer cells: relevance during tumor progression. *Immunol Rev* 2006;214:229-238.
- 49) Gorelik L, Fields PE, Flavell RA. Cutting edge: TGF-beta inhibits Th type 2 development through inhibition of GATA-3 expression. *J Immunol* 2000;165:4773-4777.
- 50) Grossman WJ, Verbsky JW, Barchet W, Colonna M, Atkinson JP, Ley TJ. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity* 2004;21:589-601.

- 51) Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, Roncarolo MG. A CD4<sup>+</sup> T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 1997;389:737-742.
- 52) Happel KI, Zheng M, Young E, Quinton LJ, Lockhart E, Ramsay AJ, Shellito JE, Schurr JR, Bagby GJ, Nelson S, Kolls JK. Cutting edge: roles of Toll-like receptor 4 and IL-23 in IL-17 expression in response to *Klebsiella pneumoniae* infection. *J Immunol* 2003;170:4432-4436.
- 53) Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT. Interleukin 17-producing CD4<sup>+</sup> effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 2005;6:1123-1132.
- 54) Hayday A, Tigelaar R. Immunoregulation in the tissues by gammadelta T cells. *Nat Rev Immunol* 2003;3:233-242.
- 55) Hirota K, Hashimoto M, Yoshitomi H, Tanaka S, Nomura T, Yamaguchi T, Iwakura Y, Sakaguchi N, Sakaguchi S. T cell self-reactivity forms a cytokine milieu for spontaneous development of IL-17<sup>+</sup> Th cells that cause autoimmune arthritis. *J Exp Med* 2007;204:41-47.
- 56) Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003;299:1057-1061.
- 57) Huang CT, Workman CJ, Flies D, Pan XY, Marson AL, Zhou G, Hipkiss EL, Ravi S, Kowalski J, Levitsky HI, Powell JD, Pardoll DM, Drake CG, Vignali DAA. Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity* 2004a;21:503-513.
- 58) Huang W, Na L, Fidel PL, Schwarzenberger P. Requirement of interleukin-17A for systemic anti-*Candida albicans* host defense in mice. *J Infect Dis* 2004b;190:624-631.
- 59) Ihle JN. Cytokine receptor signalling. *Nature* 1995;377:591-594.
- 60) Infante-Duarte C, Horton HF, Byrne MC, Kamradt T. Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. *J Immunol* 2000;165:6107-6115.
- 61) Inobe J, Slavlin AJ, Komagata Y, Chen Y, Liu L, Weiner HL. IL-4 is a differentiation factor for transforming growth factor-beta secreting Th3 cells and oral administration of IL-4 enhances oral tolerance in experimental allergic encephalomyelitis. *Eur J Immunol* 1998;28:2780-2790.
- 62) Ito S, Ansari P, Sakatsume M, Dickensheets H, Vazquez N, Donnelly RP, Lerner AC, Finbloom DS. Interleukin-10 inhibits expression of both interferon alpha- and interferon gamma- induced genes by suppressing tyrosine phosphorylation of STAT1. *Blood* 1999;93:1456-1463.
- 63) Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, Cua DJ, Littman DR. The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$  directs the differentiation program of proinflammatory IL-17<sup>+</sup> T helper cells. *Cell* 2006;126:1121-1133.
- 64) Jonuleit H, Schmitt E, Kakirman H, Stassen M, Knop J, Enk AH. Infectious tolerance: human CD25(+) regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4(+) T helper cells. *J Exp Med* 2002;196:255-260.

- 65) Jonuleit H, Schmitt E, Schuler G, Knop J, Enk AH. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med* 2000;192:1213-1222.
- 66) Karim M, Feng G, Wood KJ, Bushell AR. CD25+CD4+ regulatory T cells generated by exposure to a model protein antigen prevent allograft rejection: antigen-specific reactivation in vivo is critical for bystander regulation. *Blood* 2005;105:4871-4877.
- 67) Khattri R, Cox T, Yasayko SA, Ramsdell F. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol* 2003;4:337-342.
- 68) Knoechel B, Lohr J, Zhu S, Wong L, Hu D, Ausubel L, Abbas AK. Functional and molecular comparison of anergic and regulatory T lymphocytes. *J Immunol* 2006;176:6473-6483.
- 69) Korn T, Bettelli E, Gao W, Awasthi A, Jager A, Strom TB, Oukka M, Kuchroo VK. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature* 2007.
- 70) Kurata H, Lee HJ, O'Garra A, Arai N. Ectopic expression of activated Stat6 induces the expression of Th2-specific cytokines and transcription factors in developing Th1 cells. *Immunity* 1999;11:677-688.
- 71) Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA, Cua DJ. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 2005;201:233-240.
- 72) Laouar Y, Sutterwala FS, Gorelik L, Flavell RA. Transforming growth factor-beta controls T helper type 1 cell development through regulation of natural killer cell interferon-gamma. *Nat Immunol* 2005;6:600-607.
- 73) Le Gros G, Ben Sasson SZ, Seder R, Finkelman FD, Paul WE. Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells. *J Exp Med* 1990;172:921-929.
- 74) Levy DE, Darnell JE, Jr. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3:651-662.
- 75) Li CX, Parker A, Menocal E, Xiang S, Borodyansky L, Fruehauf JH. Delivery of RNA interference. *Cell Cycle* 2006;5:2103-2109.
- 76) Liang S, Alard P, Zhao Y, Parnell S, Clark SL, Kosiewicz MM. Conversion of CD4+ CD25- cells into CD4+ CD25+ regulatory T cells in vivo requires B7 costimulation, but not the thymus. *J Exp Med* 2005;201:127-137.
- 77) Liang SC, Tan XY, Luxenberg DP, Karim R, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M, Fouser LA. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med* 2006;203:2271-2279.

- 78) Lim HW, Hillsamer P, Banham AH, Kim CH. Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *J Immunol* 2005;175:4180-4183.
- 79) Lin JT, Martin SL, Xia L, Gorham JD. TGF-beta 1 uses distinct mechanisms to inhibit IFN-gamma expression in CD4<sup>+</sup> T cells at priming and at recall: differential involvement of Stat4 and T-bet. *J Immunol* 2005;174:5950-5958.
- 80) Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG, Thomson JM, Song JJ, Hammond SM, Joshua-Tor L, Hannon GJ. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 2004;305:1437-1441.
- 81) Liu J, Guan X, Ma X. Regulation of IL-27 p28 gene expression in macrophages through MyD88- and interferon-gamma-mediated pathways. *J Exp Med* 2007a;204:141-152.
- 82) Liu X. STAT3 activation inhibits human bronchial epithelial cell apoptosis in response to cigarette smoke exposure. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;353:121-126.
- 83) Liu X, Lee YS, Yu CR, Egwuagu CE. Loss of STAT3 in CD4<sup>+</sup> T cells prevents development of experimental autoimmune diseases. *J Immunol* 2008;180:6070-6076.
- 84) Liu X, Park JK, Jiang F, Liu Y, McKearin D, Liu Q. Dicer-1, but not Loquacious, is critical for assembly of miRNA-induced silencing complexes. *RNA* 2007b;13:2324-2329.
- 85) Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25:402-408.
- 86) Liyanage UK, Moore TT, Joo HG, Tanaka Y, Herrmann V, Doherty G, Drebin JA, Strasberg SM, Eberlein TJ, Goedegebuure PS, Linehan DC. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol* 2002;169:2756-2761.
- 87) Lockhart E, Green AM, Flynn JL. IL-17 production is dominated by gammadelta T cells rather than CD4 T cells during Mycobacterium tuberculosis infection. *J Immunol* 2006;177:4662-4669.
- 88) Lohoff M, Mittrucker HW, Prechtel S, Bischof S, Sommer F, Kock S, Ferrick DA, Duncan GS, Gessner A, Mak TW. Dysregulated T helper cell differentiation in the absence of interferon regulatory factor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:11808-11812.
- 89) Lucas S, Ghilardi N, Li J, de Sauvage FJ. IL-27 regulates IL-12 responsiveness of naive CD4<sup>+</sup> T cells through Stat1-dependent and -independent mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:15047-15052.
- 90) Macatonia SE, Doherty TM, Knight SC, O'Garra A. Differential effect of IL-10 on dendritic cell-induced T cell proliferation and IFN-gamma production. *J Immunol* 1993;150:3755-3765.



- 91) Mahnke K, Schmitt E, Bonifaz L, Enk AH, Jonuleit H. Immature, but not inactive: the tolerogenic function of immature dendritic cells. *Immunology and Cell Biology* 2002;80:477-483.
- 92) Malley R, Srivastava A, Lipsitch M, Thompson CM, Watkins C, Tzianabos A, Anderson PW. Antibody-independent, interleukin-17A-mediated, cross-serotype immunity to pneumococci in mice immunized intranasally with the cell wall polysaccharide. *Infect Immun* 2006;74:2187-2195.
- 93) Manavalan JS, Kim-Schulze S, Scotto L, Naiyer AJ, Vlad G, Colombo PC, Marboe C, Mancini D, Cortesini R, Suci-Foca N. Alloantigen specific CD8+. *Int Immunol* 2004;16:1055-1068.
- 94) Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO, Hatton RD, Wahl SM, Schoeb TR, Weaver CT. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 2006;441:231-234.
- 95) McGeachy MJ, Bak-Jensen KS, Chen Y, Tato CM, Blumenschein W, McClanahan T, Cua DJ. TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. *Nat Immunol* 2007;8:1390-1397.
- 96) McGuirk P, Mills KH. Pathogen-specific regulatory T cells provoke a shift in the Th1/Th2 paradigm in immunity to infectious diseases. *Trends Immunol* 2002a;23:450-455.
- 97) McGuirk P, Mills KH. Pathogen-specific regulatory T cells provoke a shift in the Th1/Th2 paradigm in immunity to infectious diseases. *Trends Immunol* 2002b;23:450-455.
- 98) Mendez S, Reckling SK, Piccirillo CA, Sacks D, Belkaid Y. Role for CD4(+) CD25(+) regulatory T cells in reactivation of persistent leishmaniasis and control of concomitant immunity. *J Exp Med* 2004;200:201-210.
- 99) Mills KH. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? *Nat Rev Immunol* 2004;4:841-855.
- 100) Min B, Prout M, Hu-Li J, Zhu J, Jankovic D, Morgan ES, Urban JF, Jr., Dvorak AM, Finkelman FD, LeGros G, Paul WE. Basophils produce IL-4 and accumulate in tissues after infection with a Th2-inducing parasite. *J Exp Med* 2004;200:507-517.
- 101) Misra N, Bayry J, Lacroix-Desmazes S, Kazatchkine MD, Kaveri SV. Cutting edge: human CD4+CD25+ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells. *J Immunol* 2004;172:4676-4680.
- 102) Mitra RS, Judge TA, Nestle FO, Turka LA, Nickoloff BJ. Psoriatic skin-derived dendritic cell function is inhibited by exogenous IL-10. Differential modulation of B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) expression. *J Immunol* 1995;154:2668-2677.
- 103) Molet S, Hamid Q, Davoine F, Nutku E, Taha R, Page N, Olivenstein R, Elias J, Chakir J. IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108:430-438.

- 104) Moore KW, de Waal MR, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001;19:683-765.
- 105) Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986;136:2348-2357.
- 106) Murray PJ. The primary mechanism of the IL-10-regulated antiinflammatory response is to selectively inhibit transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:8686-8691.
- 107) Nakae S, Komiyama Y, Nambu A, Sudo K, Iwase M, Homma I, Sekikawa K, Asano M, Iwakura Y. Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses. *Immunity* 2002;17:375-387.
- 108) Nakamura K, Kitani A, Fuss I, Pedersen A, Harada N, Nawata H, Strober W. TGF-beta 1 plays an important role in the mechanism of CD4+CD25+ regulatory T cell activity in both humans and mice. *J Immunol* 2004;172:834-842.
- 109) Nakamura K, Kitani A, Strober W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med* 2001;194:629-644.
- 110) Neufert C, Becker C, Wirtz S, Fantini MC, Weigmann B, Galle PR, Neurath MF. IL-27 controls the development of inducible regulatory T cells and Th17 cells via differential effects on STAT1. *Eur J Immunol* 2007;37:1809-1816.
- 111) Nishihara M, Ogura H, Ueda N, Tsuruoka M, Kitabayashi C, Tsuji F, Aono H, Ishihara K, Huseby E, Betz UA, Murakami M, Hirano T. IL-6-gp130-STAT3 in T cells directs the development of IL-17+ Th with a minimum effect on that of Treg in the steady state. *Int Immunol* 2007;19:695-702.
- 112) Nouri-Aria KT, Wachholz PA, Francis JN, Jacobson MR, Walker SM, Wilcock LK, Staple SQ, Aalberse RC, Till SJ, Durham SR. Grass pollen immunotherapy induces mucosal and peripheral IL-10 responses and blocking IgG activity. *J Immunol* 2004;172:3252-3259.
- 113) Ouyang W, Lohning M, Gao Z, Assenmacher M, Ranganath S, Radbruch A, Murphy KM. Stat6-independent GATA-3 autoactivation directs IL-4-independent Th2 development and commitment. *Immunity* 2000;12:27-37.
- 114) Ouyang W, Ranganath SH, Weindel K, Bhattacharya D, Murphy TL, Sha WC, Murphy KM. Inhibition of Th1 development mediated by GATA-3 through an IL-4-independent mechanism. *Immunity* 1998;9:745-755.
- 115) Owaki T, Asakawa M, Fukai F, Mizuguchi J, Yoshimoto T. IL-27 induces Th1 differentiation via p38 MAPK/T-bet- and intercellular adhesion molecule-1/LFA-1/ERK1/2-dependent pathways. *J Immunol* 2006a;177:7579-7587.
- 116) Owaki T, Asakawa M, Kamiya S, Takeda K, Fukai F, Mizuguchi J, Yoshimoto T. IL-27 suppresses CD28-mediated [correction of medicated] IL-2 production through suppressor of cytokine signaling 3. *J Immunol* 2006b;176:2773-2780.

- 117) Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat Immunol* 2007;8:1353-1362.
- 118) Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, Wang Y, Hood L, Zhu Z, Tian Q, Dong C. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 2005;6:1133-1141.
- 119) Peters L, Meister G. Argonaute proteins: mediators of RNA silencing. *Mol Cell* 2007;26:611-623.
- 120) Pflanz S, Hibbert L, Mattson J, Rosales R, Vaisberg E, Bazan JF, Phillips JH, McClanahan TK, de Waal MR, Kastelein RA. WSX-1 and glycoprotein 130 constitute a signal-transducing receptor for IL-27. *J Immunol* 2004;172:2225-2231.
- 121) Pflanz S, Timans JC, Cheung J, Rosales R, Kanzler H, Gilbert J, Hibbert L, Churakova T, Travis M, Vaisberg E, Blumenschein WM, Mattson JD, Wagner JL, To W, Zurawski S, McClanahan TK, Gorman DM, Bazan JF, de Waal MR, Rennick D, Kastelein RA. IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EB13 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells. *Immunity* 2002;16:779-790.
- 122) Piccirillo CA, Shevach EM. Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells. *J Immunol* 2001;167:1137-1140.
- 123) Rengarajan J, Mowen KA, McBride KD, Smith ED, Singh H, Glimcher LH. Interferon Regulatory Factor 4 (IRF4) Interacts with NFATc2 to Modulate Interleukin 4 Gene Expression. *J Exp Med* 2002;195:1003-1012.
- 124) Rosas LE, Satoskar AA, Roth KM, Keiser TL, Barbi J, Hunter C, de Sauvage FJ, Satoskar AR. Interleukin-27R (WSX-1/T-cell cytokine receptor) gene-deficient mice display enhanced resistance to leishmania donovani infection but develop severe liver immunopathology. *Am J Pathol* 2006;168:158-169.
- 125) Rothbard JB, Geftter ML. Interactions between immunogenic peptides and MHC proteins. *Annu Rev Immunol* 1991;9:527-565.
- 126) Rubtsov YP, Rudensky AY. TGF beta signalling in control of T-cell-mediated self-reactivity. *Nature Reviews Immunology* 2007;7:443-453.
- 127) Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2004;22:531-562.
- 128) Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995;155:1151-1164.
- 129) Scharton TM, Scott P. Natural killer cells are a source of interferon gamma that drives differentiation of CD4+ T cell subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice. *J Exp Med* 1993;178:567-577.

- 130) Schnurr M, Toy T, Shin A, Wagner M, Cebon J, Maraskovsky E. Extracellular nucleotide signaling by P2 receptors inhibits IL-12 and enhances IL-23 expression in human dendritic cells: a novel role for the cAMP pathway. *Blood* 2005;105:1582-1589.
- 131) Seder RA, Plaut M, Barbieri S, Urban J, Jr., Finkelman FD, Paul WE. Purified Fc epsilon R+ bone marrow and splenic non-B, non-T cells are highly enriched in the capacity to produce IL-4 in response to immobilized IgE, IgG2a, or ionomycin. *J Immunol* 1991;147:903-909.
- 132) Selvaraj RK, Geiger TL. A kinetic and dynamic analysis of Foxp3 induced in T cells by TGF-beta. *J Immunol* 2007;178:7667-7677.
- 133) Shevach EM, DiPaolo RA, Andersson J, Zhao DM, Stephens GL, Thornton AM. The lifestyle of naturally occurring CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells. *Immunol Rev* 2006;212:60-73.
- 134) Shin HC, Benbernou N, Esnault S, Guenounou M. Expression of IL-17 in human memory CD45RO+ T lymphocytes and its regulation by protein kinase A pathway. *Cytokine* 1999;11:257-266.
- 135) Shinkai K, Mohrs M, Locksley RM. Helper T cells regulate type-2 innate immunity in vivo. *Nature* 2002;420:825-829.
- 136) Siewert E, Muller-Esterl W, Starr R, Heinrich PC, Schaper F. Different protein turnover of interleukin-6-type cytokine signalling components. *Eur J Biochem* 1999;265:251-257.
- 137) Snapper CM, Paul WE. Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science* 1987;236:944-947.
- 138) Sonoda KH, Faunce DE, Taniguchi M, Exley M, Balk S, Stein-Streilein J. NK T cell-derived IL-10 is essential for the differentiation of antigen-specific T regulatory cells in systemic tolerance. *J Immunol* 2001;166:42-50.
- 139) Stassen M, Fondel S, Bopp T, Richter C, Muller C, Kubach J, Becker C, Knop J, Enk AH, Schmitt S, Schmitt E, Jonuleit H. Human CD25+ regulatory T cells: two subsets defined by the integrins alpha 4 beta 7 or alpha 4 beta 1 confer distinct suppressive properties upon CD4+ T helper cells. *Eur J Immunol* 2004;34:1303-1311.
- 140) Stenger S, Thuring H, Rollinghoff M, Bogdan C. Tissue expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to *Leishmania major*. *J Exp Med* 1994;180:783-793.
- 141) Stockinger B, Veldhoen M. Differentiation and function of Th17 T cells. *Curr Opin Immunol* 2007;19:281-286.
- 142) Stumhofer JS, Laurence A, Wilson EH, Huang E, Tato CM, Johnson LM, Villarino AV, Huang Q, Yoshimura A, Sehy D, Saris CJ, O'Shea JJ, Hennighausen L, Ernst M, Hunter CA. Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system. *Nat Immunol* 2006;7:937-945.

Stumhofer JS, Silver JS, Laurence A, Porrett PM, Harris TH, Turka LA, Ernst M, Saris CJ, O'Shea JJ, Hunter CA. Interleukins 27 and 6 induce STAT3-mediated T cell production of interleukin 10. *Nat Immunol* 2007;8:1363-1371.

143) Sumita N, Bito T, Nakajima K, Nishigori C. Stat3 activation is required for cell proliferation and tumorigenesis but not for cell viability in cutaneous squamous cell carcinoma cell lines. *Exp Dermatol* 2006;15:291-299.

144) Svoboda P. Off-targeting and other non-specific effects of RNAi experiments in mammalian cells. *Curr Opin Mol Ther* 2007;9:248-257.

145) Swain SL, Weinberg AD, English M, Huston G. IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *J Immunol* 1990;145:3796-3806.

146) Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 2000;100:655-669.

147) Szabo SJ, Sullivan BM, Stemmann C, Satoskar AR, Sleckman BP, Glimcher LH. Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN-gamma production in CD4 and CD8 T cells. *Science* 2002;295:338-342.

148) Taga K, Mostowski H, Tosato G. Human interleukin-10 can directly inhibit T-cell growth. *Blood* 1993;81:2964-2971.

149) Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, Sakaguchi N, Itoh M, Iwata M, Shimizu J, 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.

150) Takeda A, Hamano S, Yamanaka A, Hanada T, Ishibashi T, Mak TW, Yoshimura A, Yoshida H. Cutting edge: role of IL-27/WSX-1 signaling for induction of T-bet through activation of STAT1 during initial Th1 commitment. *J Immunol* 2003;170:4886-4890.

151) Takeda K, Clausen BE, Kaisho T, Tsujimura T, Terada N, Forster I, Akira S. Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils. *Immunity* 1999;10:39-49.

152) Takeda K, Noguchi K, Shi W, Tanaka T, Matsumoto M, Yoshida N, Kishimoto T, Akira S. Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:3801-3804.

153) Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* 1998;188:287-296.

154) Thornton AM, Shevach EM. Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J Immunol* 2000;164:183-190.

155) VanBuskirk AM, Burlingham WJ, Jankowska-Gan E, Chin T, Kusaka S, Geissler F, Pelletier RP, Orosz CG. Human allograft acceptance is associated with immune regulation. *J Clin Invest* 2000;106:145-155.

156) Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 2006;24:179-189.

157) Veldman C, Hohne A, Dieckmann D, Schuler G, Hertl M. Type I regulatory T cells specific for desmoglein 3 are more frequently detected in healthy individuals than in patients with pemphigus vulgaris. *J Immunol* 2004;172:6468-6475.

158) Vieira PL, Christensen JR, Minaee S, O'Neill EJ, Barrat FJ, Boonstra A, Barthlott T, Stockinger B, Wraith DC, O'Garra A. IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 2004;172:5986-5993.

159) Viguiere M, Lemaître F, Verola O, Cho MS, Gorochov G, Dubertret L, Bachelez H, Kourilsky P, Ferradini L. Foxp3 expressing CD4+CD25(high) regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells. *J Immunol* 2004;173:1444-1453.

160) Villarino A, Hibbert L, Lieberman L, Wilson E, Mak T, Yoshida H, Kastelein RA, Saris C, Hunter CA. The IL-27R (WSX-1) is required to suppress T cell hyperactivity during infection. *Immunity* 2003;19:645-655.

161) Villarino AV, Larkin J, III, Saris CJ, Caton AJ, Lucas S, Wong T, de Sauvage FJ, Hunter CA. Positive and negative regulation of the IL-27 receptor during lymphoid cell activation. *J Immunol* 2005;174:7684-7691.

162) Villarino AV, Stumhofer JS, Saris CJ, Kastelein RA, de Sauvage FJ, Hunter CA. IL-27 limits IL-2 production during Th1 differentiation. *J Immunol* 2006b;176:237-247.

163) Walker MR, Kasprovicz DJ, Gersuk VH, Benard A, Van LM, Buckner JH, Ziegler SF. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+. *J Clin Invest* 2003;112:1437-1443.

164) Wang R, Han G, Wang J, Song L, Chen G, Xu R, Yu M, Qian J, Shen B, Li Y. The role of STAT3 in antigen-IgG inducing regulatory CD4(+)Foxp3(+)T cells. *Cell Immunol* 2007;246:103-109.

165) Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, Murphy KM. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity* 2006;24:677-688.

166) Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR, Harrington LE. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol* 2007;25:821-852.

167) Weiner HL. Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells. *Microbes Infect* 2001;3:947-954.

168) Wildbaum G, Netzer N, Karin N. Tr1 cell-dependent active tolerance blunts the pathogenic effects of determinant spreading. *J Clin Invest* 2002;110:701-710.

169) Wildin RS, Ramsdell F, Peake J, Faravelli F, Casanova JL, Buist N, Levy-Lahad E, Mazzella M, Goulet O, Perroni L, Bricarelli FD, Byrne G, McEuen M, Proll S, Appleby M, Brunkow ME. X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and

endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat Genet* 2001;27:18-20.

170) Wirtz S, Becker C, Fantini MC, Nieuwenhuis EE, Tubbe I, Galle PR, Schild HJ, Birkenbach M, Blumberg RS, Neurath MF. EBV-induced gene 3 transcription is induced by TLR signaling in primary dendritic cells via NF-kappa B activation. *J Immunol* 2005;174:2814-2824.

171) Wurster AL, Tanaka T, Grusby MJ. The biology of Stat4 and Stat6. *Oncogene* 2000;19:2577-2584.

172) Yamashita M, Ukai-Tadenuma M, Miyamoto T, Sugaya K, Hosokawa H, Hasegawa A, Kimura M, Taniguchi M, DeGregori J, Nakayama T. Essential role of GATA3 for the maintenance of type 2 helper T (Th2) cytokine production and chromatin remodeling at the Th2 cytokine gene loci. *J Biol Chem* 2004;279:26983-26990.

173) Yang J, Murphy TL, Ouyang W, Murphy KM. Induction of interferon gamma production in Th1CD4+T cells: Evidence for two distinct pathways for promoter activation. *Faseb Journal* 1999;13:A647.

174) Yang XO, Panopoulos AD, Nurieva R, Chang SH, Wang D, Watowich SS, Dong C. STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. *J Biol Chem* 2007;282:9358-9363.

175) Yao Z, Kanno Y, Kerenyi M, Stephens G, Durant L, Watford WT, Laurence A, Robinson GW, Shevach EM, Moriggl R, Hennighausen L, Wu C, O'Shea JJ. Nonredundant roles for Stat5a/b in directly regulating Foxp3. *Blood* 2007;109:4368-4375.

176) Yoshimoto T, Paul WE. CD4pos, NK1.1pos T cells promptly produce interleukin 4 in response to in vivo challenge with anti-CD3. *J Exp Med* 1994;179:1285-1295.

177) Yoshimoto T, Yoshimoto T, Yasuda K, Mizuguchi J, Nakanishi K. IL-27 suppresses Th2 cell development and Th2 cytokines production from polarized Th2 cells: a novel therapeutic way for Th2-mediated allergic inflammation. *J Immunol* 2007;179:4415-4423.

178) Yoshimura T, Takeda A, Hamano S, Miyazaki Y, Kinjyo I, Ishibashi T, Yoshimura A, Yoshida H. Two-sided roles of IL-27: induction of Th1 differentiation on naive CD4+ T cells versus suppression of proinflammatory cytokine production including IL-23-induced IL-17 on activated CD4+ T cells partially through STAT3-dependent mechanism. *J Immunol* 2006;177:5377-5385.

179) Zenclussen AC. Regulatory T cells in pregnancy. *Springer Semin Immunopathol* 2006;28:31-39.

180) Zhang ZX, Young K, Zhang L. CD3+CD4-CD8- alphabeta-TCR+ T cell as immune regulatory cell. *J Mol Med* 2001;79:419-427.

181) Zheng W, Flavell RA. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 1997;89:587-596.

182) Zhou L, Ivanov II, Spolski R, Min R, Shenderov K, Egawa T, Levy DE, Leonard WJ, Littman DR. IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol* 2007.

183) Zhou Q, Desta T, Fenton M, Graves DT, Amar S. Cytokine profiling of macrophages exposed to *Porphyromonas gingivalis*, its lipopolysaccharide, or its FimA protein. *Infect Immun* 2005;73:935-943.

184) Ziegler SF. FOXP3: of mice and men. *Annu Rev Immunol* 2006;24:209-226.



## 9 Abkürzungsverzeichnis

(m/v)	Masse pro Volumen
(v/v)	Volumen pro Volumen
Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
AK	Antikörper
AKP	Alkalische Phosphatase
APZ	Antigen-Präsentierende-Zelle
BSS	Instamed HANK's Salz Trockensubstanz
B-Zelle(n)	B-Lymphozyt(en)
BZR	B-Zell-Rezeptor
bzw.	beziehungsweise
C	Coulomb
ca.	circa
CAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CD	Cluster of differentiation
CDNA	<i>copy</i> DNA
CIA	Collagen induced Arthritis
CTLA	<i>cytotoxic T-lymphocyte antigen-4</i>
d	Tag(e)
d.h.	das heißt
DANN	Desoxyribonukleinsäure
DZ	Dendritische Zelle(n)
EAE	Experimentelle allergische Enzephalitis
EAU	Experimentelle allergische Uveitis
ECL	<i>enhanced chemoluminescent</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
FACS	Fluoreszenzsorter
FAM	6-Carboxyfluorescein
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocynat
Foxp3	<i>forkhead box protein 3</i>
FSC	<i>Forward Scatter</i>
G	Gramm
GATA3	GATA binding protein 3
GITR	<i>glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor</i>
Gy	Gray
H	Stunde(n)
H <sup>3</sup>	Tritium
HEPES	1-Piperazineethane sulfonic acid, 4-(2-hydroxyethyl)-monosodium salt
HPRT	Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase
HRP-linked	<i>horse raddish peroxidase linked</i>
HWZ	Halbwertszeit

IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IgG2, IgE	Entsprechend Immunglobulin der Klasse G2, E usw.
IL	Interleukin
IPEX	<i>immuno-dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome</i>
IRF	<i>Interferon regulatory factor</i>
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motifs</i>
ITreg	Induzierbare regulatorische T-Helfer Zelle
Jak	Janus Kinase
L	Liter
LAG	<i>lymphocyte activation antigen</i>
mAb	<i>monoclonal Antibody</i> = monoklonaler Antikörper
MACS	Magnetic cell sorting
ME	Mercaptoethanol
Mg	Milligramm
MHC(s)	<i>Major histocompatibility complex(es)</i> = Haupthistokompatibilitätskomplex(e)
Min	Minute(n)
MRNA	<i>messenger RNA</i>
NFAT	<i>Nuclear Factor of activated T-cells</i>
NK	Natürliche Killerzellen
NK-Zelle	Natürliche-Killer-Zelle
NTC	<i>no template control</i>
NTreg	Natürliche regulatorische T-Helfer Zelle
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> = Polymerasekettenreaktion
PNPP	4-Nitrophenyl phosphat Dinatrimsalz Hexahydrat
R	Rezeptor
rh	rekombinant human
rm	rekombinant murin
ROR $\gamma$ t	<i>retinoic orphan receptor <math>\gamma</math>t</i>
Rpm	Rounds per minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SDS	Sodium dodecyl sulphate
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SOCS3	<i>suppressor of cytokine signalling 3</i>
SSC	<i>Side Scatter</i>
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
TAMRA	Tetramethylrhodamine
TaqMan	<i>quantitative real time PCR</i>
T-bet	T-box expressed in T cells
TEMED	N,N,N',N'-Teramethyl-Ethylenediamine

---

TGF	<i>transforming growth factor</i>
Th1	T-Helfer Zelle vom Typ 1
Th17	T-Helfer Zelle vom Typ 17
Th2	T-Helfer Zelle vom Typ 2
Th3	T-Helfer Zelle vom Typ 3
Th-Zelle	T-Helfer Zelle
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
Tr1	Regulatorische T-Helfer Zelle vom Typ1
T-Zelle(n)	T-Lymphozyt(en)
TZR	T-Zell-Rezeptor
$\alpha$ - (vor Antikörper-Namen)	anti

## 10 Lebenslauf

### Vera Elisabeth Johanna Steinwald

Barfüßerstr. 46

35037 Marburg

Geboren: 10.01.1983 in Heidelberg

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

#### Schulbildung

1989 – 1993	Grundschule Höchst im Odenwald
1993 – 1999	Ernst-Göbel-Schule, Höchst im Odenwald Gymnasialzweig
1999 – 2001	Impington International Sixth Form College Cambridge, UK Abschluss: International Baccalaureate

#### Studium

10/2001 – 06/2008	Studium der Humanmedizin Philipps Universität Marburg
08/2003	Ärztliche Vorprüfung
06/2008	Abschluss: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Marburg, den

## 11 Verzeichnis der akademischen Lehrer:

Meine akademischen Lehrer waren die Damen/Herren in Marburg:

Arnold, Aumüller, Bals, Barth, Baum, Bien, Christiansen, Daut, Donner-Banzhof, Geks, Gemsa, Görg, Gotzen, Grau, Grimm, Gudermann, Hamer, Höglinger, Holst, Kill, Klose, Kühnert, Lang, Lehmke, Lill, Lohoff, Maisch, Max, Moll, Möller, Moosdorf, Müller, Mutters, Neubauer, Oertel, Printz, Renz, Ritter, Röhm, Röper, Rosenow, Schäfer, Schmidt, Schmitz, Schnabel, Seitz, Sommer, Sommer, Steininger, Vogelmeier, Voigt, von Löw, Wagner, Weihe, Westermann, Wulf

## 12 Danksagung

Tiefe Dankbarkeit gilt Prof. Dr. med. Michael Lohoff für die Möglichkeit diese Arbeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene durchführen zu dürfen. Zusätzlich möchte ich ihm und Dr. rer. nat. Magdalena Huber für ihre geduldige sowie ausgezeichnete wissenschaftliche und persönliche Unterstützung bei der Durchführung dieser Dissertation danken.

Für die Hilfe bei der Einarbeitung in die Laborarbeit, die professionelle Unterstützung bei der praktischen Durchführung und für die „Versüßung“ langer Stunden im Institut im Pilgrimstein, wie im BMFZ und während privater Treffen, danke ich den ehemaligen und gegenwärtigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Lohoff: Bärbel Casper, Anna Guralnik, Anne Brüstle, Evita Bothur, Dr. rer. nat. Christine Rosenplänter, Kerstin Kellner, Katharina Reinhard, Azita Mahiny, Cornelia Würz, Petra Sack, Nadine Bollig, Dr. med. Dimitry Cherkasov und Dr. med. Peter Kleeman.

Ingeborg Ebel und Trudel Weiser möchte ich für ihre Hilfe danken, die Sprache in dieser Arbeit „schön“ zu machen.

Ich danke Christina Hofmann, Julie Mertens, Martina Ehm, Katharina Hackenberg, Marina Diakonova, Nellina Sommerfeld und vielen anderen mehr für ihre Freundschaft, die mir Kraft gegeben hat.

Ein riesiges Dankschön auch an meine Eltern Anita und Dr. rer. oec. Bodo Steinwald und meinen Bruder Sven, die durch liebevolle Erziehung, Vorbild, sowie finanzielle und moralische Unterstützung maßgeblich zu den Erfolgen auf meinem bisherigen Lebensweg beigetragen haben.

## 13 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Interleukin-27 inhibiert die Entwicklung von regulatorischen T-Zellen über *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3)“ im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene unter Leitung von Prof. Dr. med. M. Lohoff mit Unterstützung durch Prof. Dr. med. M. Lohoff und Dr. rer. nat. Magdalena Huber ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Vorliegende Arbeit wurde im folgenden Publikationsorgan veröffentlicht:

International Immunology, 2008 Feb;20(2):223-34. Epub 2007 Dec

Marburg, den