Aus der Klinik für Gastroenterologie mit Sektionen Infektiologie und Tropenmedizin

(I. Medizinische Klinik und Poliklinik)

des Zentrums für Innere Medizin

des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Klinikdirektor: Prof. Ansgar W. Lohse

Die Bedeutung von Zytokinen der TGF-β Familie für die Differenzierung von T-Zellen

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg vorgelegt von

Felix Rolf Stahl

aus Freiburg im Breisgau

Hamburg 2009

Angenommen von der Medizinischen	Fakultät
der Universität Hamburg am:	09.10.2009

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:	Herr PD Dr. C. Schramm
Prüfungsausschuss:2. Gutachter/in:	Herr Prof. Dr. A. Lohse
Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in:	Herr Prof. HW. Mittrücker

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

I. A	RBEITSHYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG	1
II. E	INLEITUNG	2
1. R	egulatorische T-Zellen	3
2. T-	Helfer-Zellen 17	6
3. Tr	ansforming Growth Factor beta Familie	8
3.1.	TGF-β1	12
3.2.	INHBA	13
3.3.	GDF2	13
3.4.	GDF8	14
3.D. 2.6	GDF9 GDF11	14
3.0.	GDFTT	14
4. Di	e Rolle von TGF- β 1 in der Immunologie und T-Zelldifferenzierung	15
5. Fo	bllistatine	18
III.	MATERIAL UND METHODEN	20
1. M	aterial	20
1.1.	Mäuse	20
1.2.	Geräte	20
1.3.	Software	21
1.4.	Materialien für Zellisolation	21
1.5.	Materialien für ELISA	21
1.6.	Materialien für RT-PCR	21
1.7.	Materialien für Western Blotting	22
1.8.	Antikörper, Dynabeads, MicroBeads, Zytokine und Enzyme	22
1.9.	Weiteres	23
1.10	. Verwendete Puffer	24
1.	10.1. Zellisolation	24
1.	10.2. FACS	24
1.	10.3. RT-PCR	25
1.	10.4. ELISA	25
1.	10.5. Western Blot	25
2. M	ethoden	28
2.1.	Herstellung von Einzelzellsuspensionen	28
2.2.	Spezifische Zellisolation	28
2.	2.1. Isolation CD4 ⁺ CD25 ⁻ Lymphozyten	28
2.	2.2. Isolation CD4 ⁺ CD25 ⁺ Lymphozyten	29
2.	2.3. Analyse der Zellreinheit nach der Zellisolation	30
2.3.	Zellkultivierung und <i>in vitro</i> Stimulation für Zelldifferenzierungsanalysen	32
2.4.	Restimulation für ELISA Messungen	32
2.5.	Zellkultivierung und in vitro Stimulation für Proliferationsanalyse	32
2.6.		33
2.	6.1. Zellrestimulation für intrazelluläre Zytokinfärbung	33

2.6.2. E	Extrazelluläre Färbung für FACS Analysen	33
2.6.3. F	Fixation, Permeabilisation und Foxp3 Färbung	34
2.6.4. F	Fixation, Permeabilisation und intrazelluläre Zytokinfärbung	34
2.6.5. (CFSE Färbung	34
2.6.6. 2	Zellanalyse mittels FACS	35
2.7. Rever	se Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	35
2.8. Enzyn	ne-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	37
2.9. Weste	ern Blotting	37
2.9.1. <i>i</i>	Auftrennung der Zellen in Zytoplasma und Nukleus	37
2.9.2. E	Elektrophoresegel	38
2.9.3. <i>I</i>	Aufbereitung der Proben und Gelelektrophorese	38
2.9.4. i	Überführung der Proteine auf Nitrozellulosemembranen	38
2.9.5.	Nachweis von FSTL3	38
2.9.6.	Stripping der Nitrozellulosemembranen	39
2.9.7.	Nachweis von Actin	39
2.9.8. F	Proteindetektion	39
2.10. Statist	tische Analysen	39
		40
IV. ERGEI	BNI35E	40
1. Semiquan	titative Expressionsanalyse von Rezeptoren und Zytokinen	40
1.1. RNS-F	Expressionsanalyse von Rezeptoren und Zytokinen	40
1.1.1. 7	Гур I Rezeptoren	41
1.1.2. 7	Гур II Rezeptoren	42
1.1.3. (Co-Rezeptoren, Furin-Konvertase	43
1.1.4. Z	Zytokine	44
1.1.5. F	Follistatine	45
1.2. Protei	n-Expressionsanalyse FSTL3	46
1.2.1. Z	Zellkern	47
1.2.2. 2	Zytoplasma	48
1.2.3. k	Kulturüberstände	49
1.2.4. F	Posttranslationale Modifikation von FSTL3	49
2. Funktione	lle Analyse von GDF2. 8. 9 und 11. FST. FSTL3. INHBA und TGF-81	51
2.1. Prolife	erationanalyse	51
2.2. Zelldif	ferenzierungsanalvse	54
2.2.1. 2	Zelldifferenzierung in T _{rec} Zellen	54
2.2.2. 2	Zelldifferenzierung in $T_H 17$ Zellen	56
V. DISKU	SSION	59
1. Die Rolle	der TGF-β Familie bei T _{req} Zellen	61
1.1. Furin		67
2. Die Rolle	von Follistatinen bei T _{reg} Zellen	68
3. Die Rolle	der TGF-β Familie bei T _H 17 Zellen	70
VI. ZUSAI	MMENFASSUNG	71
VII. LITER	ATURVERZEICHNIS	72

VIII.	DANKSAGUNG	85
IX.	LEBENSLAUF	86
Х.	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	87

Abbildungsverzeichnis

T _{reg} Funktionsmechanismen	5
Signaltransduktion der TGF-	10
T-Zelldifferenzierung in T _{reg} und T _H 17 Zellen	17
Zellisolation	31
RT-PCR Typ I Rezeptoren	41
RT-PCR Typ II Rezeptoren	42
RT-PCR Co-Rezeptoren, Furin-Konvertase	43
RT-PCR Zytokine	44
RT-PCR Follistatine	45
FSTL3 Proteinexpression im Zellkern	47
FSTL3 Proteinexpression im Zytoplasma	48
FSTL3 in Zellkulturüberständen	49
N-Glykosylierungsbindungsstellen von FSTL3	50
O-Glykosylierungsbindungsstellen von FSTL3	50
Zellproliferation unter Zusatz verschiedener	
TGF-β Familienmitglieder (a)	52
Zellproliferation unter Zusatz verschiedener	
TGF-β Familienmitglieder (b)	53
Zelldifferenzierung zu T _{reg} Zellen unter Zusatz	
verschiedener TGF-	55
Zelldifferenzierung zu T _H 17 Zellen (a)	57
Zelldifferenzierung zu T _H 17 Zellen (b)	58
Die Bedeutung der Expression von TGFBR3 und ALK4	
bei der Signalvermittlung von INHBA bei	
CD4 ⁺ CD25 ⁻ und CD4 ⁺ CD25 ⁺ T-Zellen	65
	T_{reg} Funktionsmechanismen Signaltransduktion der TGF-β Familienmitglieder T-Zelldifferenzierung in T _{reg} und T _H 17 Zellen Zellisolation RT-PCR Typ I Rezeptoren RT-PCR Typ II Rezeptoren RT-PCR Co-Rezeptoren, Furin-Konvertase RT-PCR Zytokine RT-PCR Follistatine FSTL3 Proteinexpression im Zellkern FSTL3 Proteinexpression im Zytoplasma FSTL3 in Zellkulturüberständen N-Glykosylierungsbindungsstellen von FSTL3 O-Glykosylierungsbindungsstellen von FSTL3 Zellproliferation unter Zusatz verschiedener TGF-β Familienmitglieder (a) Zellproliferenzierung zu T _{reg} Zellen unter Zusatz verschiedener TGF-β Familienmitglieder Zelldifferenzierung zu T _H 17 Zellen (a) Zelldifferenzierung zu T _H 17 Zellen (b) Die Bedeutung der Expression von TGFBR3 und ALK4 bei der Signalvermittlung von INHBA bei CD4 ⁺ CD25 ⁻ und CD4 ⁺ CD25 ⁺ T-Zellen

Tabellenverzeichnis

Tabelle II-a	TGF-β Familie	8
Tabelle II-b	Rezeptoren der TGF-β Familie	9
Tabelle II-c	Signaltransduktion der TGF-β Familienmitglieder	9
Tabelle II-d	Ligand-Rezeptor-Smad Interaktionen der TGF-β Familie	11
Tabelle III-a	Primer für RT-PCR	37

Abkürzungsverzeichnis

-/-	knockout		
APC	<i>Allp</i> hyco <i>c</i> yanin		
BMP	bone morphogenic protein		
bzw.	beziehungsweise		
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat		
CD	Cluster of Differentiation (Differenzierungsmarker an Zelloberflächen)		
cDNS	komplementäre Desoxyribonukleinsäure		
CFSE	Carboxy-Fluoresceindiacetatsuccinimidylester		
DMSA	Dimercaptobernsteinsäure		
DNS	Desoxyribonukleinsäure		
EDTA	<i>E</i> thylen <i>d</i> iamin <i>t</i> etraessigsäure		
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay		
FACS	fluorescence activated cell sorting (Durchflusszytometrie)		
FITC	Fluorescein		
Foxp3	forkhead-box protein 3		
FST	Follistatin		
FSTL	Follistatin-like		
GDF	growth differentiation factor		
HRP	Horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)		
IFN-γ	Interferon-gamma		
IL .	Inter/eukin		
INHBA	Inhibin betaA (= Activin A)		
k	kilo		
kDa	<i>k</i> ilo <i>Da</i> lton		
min	Minute		
mRNS	<i>m</i> essenger- <i>R</i> ibo <i>n</i> uklein <i>s</i> äure		
naïv	undifferenziert		
NCBI	" <i>N</i> ational Center for Biology Information", 8600 Rockville Pike, Bethesda,		
nm	nanometer		
	Polymerase Chain Praction (Polymerase-Kettenreaktion)		
	Physics crythrin		
	Priycoery(IIIII) Para form aldobyd		
	Phorbol 12 Marietat 12 Apotat		
	Privipul-12-Mylistat-13-Acetat Powerse Polymerses Chain Peaction (Powerse Polymerses		
RT-FCR	Kettenreaktion)		
sec	Sekunde		
TGF-β	transforming growth factor beta		
T _H 17 Zelle	T-Helfer-Zelle 17		
T _{reg} Zelle	regulatorische T-Zelle		
ZNS	Zentrales Nervensystem		

I. Arbeitshypothese und Fragestellung

Fremdorganismen das Die körpereigene Abwehr gegen wird durch Immunsystem vermittelt. Die Unterscheidung zwischen fremden und körpereigenen Strukturen (Antigenen) ist ein komplexer, bis jetzt unvollständig Weiterhin ein Gleichgewicht zwischen verstandener Vorgang. muss proinflammatorischen und immunsupprimierenden Faktoren vorliegen. Diese Mechanismen sind zum Beispiel im Rahmen von autoimmunen Erkrankungen aber auch bei der Abwehr gegen maligne Tumoren von grosser Bedeutung. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Differenzierung von naïven T-Zellen in regulatorische T-Zellen (T_{req}) und T-Helfer Zellen 17 (T_H 17). Diese Zellpopulationen sind insbesondere aus zwei Gründen von besonderem Interesse. Zum einen haben sie äusserst gegensätzliche Funktionen. Während T_{rea} Zellen eine immunsupprimierende Bedeutung zugeschrieben wird, sind T_H17-Zellen mit proinflammatorischen Vorgängen in Verbindung zu bringen. Beide Zellpopulationen benötigen zur Differenzierung aus naïven T-Zellen transforming growth factor beta1 (TGF-\beta1). TGF-\beta1 ist der bekannteste Vertreter der aus einer Vielzahl von Zytokinen bestehenden TGFß Familie. Die strukturelle Verwandschaft der Zytokine innerhalb der TGFß Familie gibt Familie eine Rolle bei der T-Zelldifferenzierung in T_{reg} Zellen und T_H17 Zellen spielen. Es wurde deshalb untersucht, welche Zytokine hierzu in der Lage sein könnten und welche Rezeptoren der TGF-β Familie eine Rolle spielen.

II. Einleitung

Die Immunologie befasst sich mit den Grundlagen der körperlichen Abwehr gegen Mikroorganismen und andere Antigene. Diese Abwehr ist eine Kombination aus vielen mit einander vernetzen funktionellen Systemen, die aus zellulären und nicht-zellulären Komponenten bestehen. Es wird zwischen angeborener und erworbener Immunität unterschieden. Wichtige Vertreter der erworbenen Immunität sind T-Lymphozyten (T, für den Reifungsort dieser Zellen im *T*hymus). Diese Zellen sind essentieller Bestandteil Antigenspezifischer immunologischer Reaktionen.

Das Immunsystem muss in der Lage sein, zwischen fremden und körpereigenen Antigenen unterscheiden zu können. Nur so kann ein Fremdorganismus vom Körper bekämpft, und gleichzeitig gesunde körpereigene Strukturen unbeschadet bleiben. Hierbei sind Toleranz bezüglich Antigene, körpereigener und ein Gleichgewicht zwischen antiinflammatorischen und pro-inflammatorischen Faktoren notwendig. Dieses Gleichgewicht wird von der Regulation der Qualität sowie der Intensität der immunologischen Reaktion auf ein Antigen erhalten. Diese Regulation wird insbesondere durch regulatorische T-Zellen (T_{reg}, T_H3, T_r1) vermittelt. Diese Zellen haben eine immunsupprimierende Wirkung und stehen im Zentrum der Kontrolle über effektorische T-Zell Reaktionen. Eine gestörte Immunregulation kann somit zu autoimmunen Erkrankungen, aber auch schwacher Abwehr gegen Fremdantigene oder maligne Tumoren führen.

Im Gegensatz zu regulatorischen T-Zellen sind T-Helfer-Zellen 1, 2 und 17 (T_H1 , T_H2 und T_H17) als wichtige Aktivatoren der immunologischen Reaktion zu bezeichnen und werden deshalb auch Effektor T-Zellen genannt.

Die Differenzierung von T-Zellen in diese unterschiedlichen Subpopulationen ist ein komplexer Vorgang, der unter anderem durch die Wirkung von bestimmten Zytokinen determiniert wird. Ein wichtiges Zytokin ist der transforming growth factor beta1 (TGF- β 1), welcher sowohl für T_{reg} Zellen aber auch für T_H17-Zellen relevant ist.

TGF- β 1 ist das zuerst beschriebene Zytokin der sogenannten TGF- β Familie. Es gibt spezifische Rezeptoren für die TGF- β Familie, deren Aktivierung durch den entsprechenden Liganden zur Aktivierung einer intrazellulären Signalkaskade führt.

Die Follistatin Familie zählt nicht zur TGF- β Familie, ist jedoch auf Grund ihrer Interaktion mit dieser von Bedeutung. Einige Vertreter dieser Familie sind in der Lage Zytokine der TGF- β Familie zu binden und deren Funktion zu beeinflussen.

1. Regulatorische T-Zellen

Regulatorische T-Zellen sind essentieller Bestandteil bei der Erhaltung der Balance zwischen Toleranz und Effektor-Reaktion. CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T-Zellen sind die wichtigsten Vertreter dieser Zellpopulation und ihre suppressive Funktion wird durch die Kombination mehrerer Mechanismen vermittelt.

Die Existenz von regulatorischen T-Zellen wurde bereits 1970 postuliert (Gershon und Kondo 1970), jedoch machte erst die Charakterisierung dieser Zellen durch die Expression bestimmter Oberflächenmoleküle, sowie einem spezifischen Transkriptionsfaktor, die genauere wissenschaftliche Untersuchung dieser Zellen möglich.

Es wurden unterschiedliche Zellpopulationen als regulatorische T-Zellen beschrieben. Zum einen sind hierbei IL-10 produzierende Zellen zu nennen, welche auch regulatorische T-Zellen Typ 1 (T_r1) bezeichnet werden (Roncarolo et al. 2006). T-Helfer Zellen 3 (T_H3) produzieren TGF- β 1 (Faria und Weiner 2005). Im Weiteren werden nun Foxp3⁺ T_{reg} Zellen beschrieben, da diese in dieser Abreit untersucht wurden.

Generell können T_{reg} Zellen in natürliche (nT_{reg}), sowie induzierte (iT_{reg}) eingeteilt werden. nTreg Zellen reifen im Thymus, während aus naïven T-Zellen in der Peripherie iT_{reg} Zellen entstehen können (Bluestone und Abbas 2003). Die Reifung von nT_{rea} Zellen findet zu einem frühen Zeitpunkt der Entwicklung im Thymus statt, und die Manipulation der Thymusreifung führt zu Autoimmunerkrankungen (Yunis et al. 1967; Kojima et al. 1976; Kojima et al. 1980; Taguchi et al. 1980; Taguchi und Nishizuka 1981; Tung et al. 1987; Tung et al. 1987). Eine immunsupprimierende Wirkung wurde primär bei CD4⁺ T-Zellen dargestellt (Herbelin et al. 1998), und man geht derzeit davon aus, dass der bedeutsame Teil der nT_{reg} Zellen CD4⁺ ist (Tang und Bluestone 2008). Des Weiteren exprimieren nTregs konstitutiv die a-Kette des Interleukin-2 Rezeptors, welcher auch als CD25 bezeichnet wird (Asano et al. 1996). CD25 wird jedoch auch auf aktivierten T-Zellen exprimiert, die keine T_{req} Zellen, T-Zellen sind (Waldmann 1986). sondern aktivierte Bezüglich der T_{req} Zellen, spricht man derzeit extrazellulären Identifikation von von CD4⁺CD25⁺ T-Zellen (Yi et al. 2006), jedoch mit dem Problem, dass es auch CD4⁺CD25⁺ T-Zellen gibt, welche keine T_{reg} Zellen sind. Die Verwandtschaft zwischen Tr1, TH3 und iTrea Zellen und den nTrea Zellen ist im einzelnen noch nicht geklärt (Wan und Flavell 2007).

Es gibt weitere Marker für T_{reg} Zellen wie z. B. das zytotoxische T-lymphozytär assoziierte Antigen 4 (CTLA-4) (Takahashi et al. 2000), sowie dem Glucokortikoid-induzierten Tumor Nekrose Faktor Rezeptor-verwandtem Gen (GITR) (Shimizu et al. 2002).

Der bedeutsamste Marker für T_{reg} Zellen ist derzeit jedoch der Transkriptionsfaktor "forkhead-box protein 3" (Foxp3) (Fontenot et al. 2005), welcher allerdings im Gegensatz zu den bereits erwähnten Markern, intrazellulär vorliegt. Mutationen im Foxp3-Gen führen beim Menschen zum "Immun-Dysregulation, Polyendokrinopathie, Enteropathie, X-Chromosom

Syndrom" (IPEX) (Bennett et al. 2001). Ein Defekt im homologen murinen Gen wurde bei den sogenannten "scurfy" Mäusen entdeckt und führt bei diesen zu lymphoproliferativen Syndromen und Störungen in der Immun-Hömeostase (Brunkow et al. 2001; Wildin et al. 2001). Kurz nach der Entdeckung der Assoziation zwischen diesen Syndromen und dem Foxp3 Gen, wurde Foxp3 als der essentielle Transkriptionsfaktor von Treg Zellen beschrieben (Hori et al. 2003; Khattri et al. 2003). Des Weiteren wird Foxp3 spezifisch in CD4⁺CD25⁺ T-CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Zellen exprimiert und nur T-Zellen haben eine regulatorische Funktion, nicht jedoch CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻ T-Zellen (Fontenot et al. 2003). Allerdings gibt es auch Foxp3⁺-Zellen, welche nicht CD25 exprimieren, aber trotzdem regulatorische Funktion haben, was für die Relevanz der Expression von Foxp3 in T_{reg} Zellen spricht (Fontenot et al. 2005). An dieser Stelle müssen relevante Unterschiede zwischen Maus und Mensch angemerkt werden. Es gibt bei der Maus nur eine Spleissvariante des Foxp3-Gens, und diese wird nur von Treg Zellen exprimiert. Beim Menschen gibt es zwei vom Foxp3-Gen kodierte Proteine, wobei bei einem der Produkte das Exon 2 nicht translatiert wird. Dies hat Folgen bezüglich der Spezifität der Identifikation von T_{reg} Zellen beim Menschen. Während die Foxp3-Expression in der Maus nur bei Treg Zellen zu finden ist, kann beim Menschen auch bei nicht-T_{reg} Zellen Foxp3 induziert werden (Walker et al. 2003; Allan et al. 2005). Dies macht die Identifikation von T_{reg} Zellen im Menschen komplizierter als bei der Maus.

1998 wurde erstmals gezeigt, dass CD4⁺CD25⁺ Zellen *in vitro* in der Lage sind die Proliferation von CD4⁺CD25⁻ Zellen zu hemmen (Thornton und Shevach 1998). Mittlerweile werden viele unterschiedliche Mechanismen diskutiert mit welchen Tregs ihre Suppressor-Funktion ausüben:

Es gibt Hinweise dafür, dass T_{reg} Zellen über Zell-Zell Kontakt supprimieren. So wurde *in vitro* gezeigt, dass über "gap junctions" (=Zell-Zell-Kanäle) ein Austausch von zytoplasmatischem cAMP zwischen T_{reg} Zellen und effektorischen T-Zellen (T_{eff} Zelle) stattfindet, und dieser Austausch für die Suppressor-Funktion der T_{reg} Zellen wichtig ist (Bopp et al. 2007). Andererseits konnte *in vivo* während der Suppression keine dauerhafte Interaktion zwischen T_{reg} und T_{eff} Zelle festgestellt werden (Tang et al. 2006).

 T_{reg} Zellen interagieren nicht nur direkt mit T_{eff} Zellen, sondern auch mit "Antigen Präsentierenden Zellen" (APC). So konnte gezeigt werden, dass T_{reg} Zellen die Produktion von indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) von APCs stimulieren (Puccetti und Grohmann 2007). Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) ist ein immunsuppressives Enzym (Mellor und Munn 2004; Munn und Mellor 2004). Diese IDO Induktion ist stark mit der Expression von CTLA-4 assoziiert (Puccetti und Grohmann 2007). CTLA-4 defiziente Mäuse entwickeln wenige Tage nach Geburt eine lymphoproliferative Erkrankung (Tivol et al. 1995; Waterhouse et al. 1995). Die T_{reg} Zellpopulation dieser Mäuse bleibt unverändert und diese Zellen zeigen *in vitro* auch suppressive Wirkung (Tang et al. 2004). Auch in anderen *in vitro* Modellen konnte die Bedeutung von CTLA-4 nicht bestätigt werden (Thornton und Shevach 1998). Jedoch konnte kürzlich

gezeigt werden, dass deren Funktion *in vivo* eingeschränkt ist (Friedline et al. 2009).

Des Weiteren gibt es eine grosse Anzahl von Zytokinen, welche für die Funktion von T_{reg} Zellen verantwortlich sein sollen. Hierbei sind insbesondere Interleukin-10 (IL-10) und TGF- β 1 zu nennen. Aber auch hier gibt es widersprüchliche Ergebnisse aus unterschiedlichen Experimenten. Zum einen gibt es Veröffentlichungen mit *in vitro* Versuchen, bei welchen IL-10 und TGF- β 1 keine Rolle bei der Suppression zu spielen scheinen (Takahashi et al. 1998; Thornton und Shevach 1998). Jedoch gibt es auch einige *in vitro* Modelle in welchen die Relevanz von TGF- β 1 deutlich wird (Nakamura et al. 2001; You et al. 2006). Andererseits gibt es Hinweise für (Belkaid et al. 2006; Li et al. 2007) aber auch gegen (Balasa et al. 2000; Kullberg et al. 2005) die Relevanz dieser Zytokine in *in vivo* Modellen.

Zuletzt wurde auch Interleukin-35 (IL-35) als ein neues, von T_{reg} Zellen sezerniertes, essentielles Interleukin beschrieben (Collison et al. 2007).

Eine weitere Theorie entstand durch die Tatsache, dass T_{reg} konstitutiv CD25 exprimieren. Wie bereits erwähnt ist CD25 ein Bestandteil des Interleukin-2 (IL-2) Rezeptors. T_{reg} Zellen bilden selbst kein IL-2. Die Zugabe von IL-2 in Suppressions-Versuchen (hier wird die Proliferation von CD4⁺CD25⁻ Zellen unter dem Einfluss von T_{reg} Zellen gemessen) hebt die Suppression von T_{reg} Zellen auf (Thornton und Shevach 1998). Aus diesem Grund wird vermutet, dass T_{reg} Zellen IL-2 konsumieren und somit den umliegenden Zellen entziehen (Thornton und Shevach 1998; Pandiyan et al. 2007).

Zusammenfassend lässt sich davon ausgehen, dass nicht ein einzelner Mechanismus, sondern vielmehr das Zusammenspiel aus mehreren Mechanismen die immunsuppressive Aktivität von T_{reg} Zellen ermöglichen; zum einem über direkten Zell-Zell Kontakt, des Weiteren über die Sekretion von Zytokinen und zuletzt über IL-2 Verbrauch (Abbildung II-a). Es sind jedoch weitere Mechanismen denkbar.





(a) direkter Zell-Zell Kontakt, (b) Zytokin-vermittelte Suppression, (c) IL-2 Verbrauch. T_{reg}: regulatorische T-Zelle, T_{effector}: effektorische T-Zelle, APC : Antigen präsentierende Zelle. Verändert nach (Scheffold et al. 2007).

2. T-Helfer-Zellen 17

T-Helfer-Zellen 17 (T_H17) sind neben T_H1 und T_H2 Zellen eine neu beschriebene, zu den Effektor T-Zellen zugehörige, Zellpopulation. Sie bilden proinflammatorische Zytokine, wie z.B. Interleukin-17 und exprimieren typischerweise den Transkriptionsfaktor "retinoid acid-related orphan receptor $\gamma t^{"}$ (ROR γt). Es wird ihnen eine grosse Relevanz bei der inflammatorischen Reaktion auf pathogene Keime, aber auch bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen zugesprochen.

T_H17 Zellen wurden auf Grund ihres charakteristischen Zytokinprofiles und insbesondere der Eigenschaft Interleukin-17 (IL-17) zu produzieren zwischen 2003 und 2006 als neue Zellpopulation definiert (Murphy et al. 2003; Langrish et al. 2005; McKenzie et al. 2006; Weaver et al. 2006). Interleukin-23 (IL-23) war bei der Entdeckung dieser Zellpopulation von zentraler Bedeutung. T_H17 Zellen exprimieren den IL-23 Rezeptor und bilden neben IL-17 charakteristischerweise auch Interleukin-21 (IL-21), sowie Interleukin-22 (IL-22) (Chung et al. 2006; Liang et al. 2006; Zheng et al. 2007).

IL-17 wurde erstmals 1995 als ein von T-Zellen produziertes Zytokin beschrieben (Yao et al. 1995). Es gibt sechs Mitglieder der IL-17 Familie (IL-17A, B, C, D, E und F), wobei T_H17 Zellen IL-17A und IL-17F produzieren. Diese IL-17 Zytokine bilden IL-17A oder IL17F Homodimere, aber auch IL17-A/F Heterodimere. IL-17 Dimere sind in der Lage die Chemokinexpression von Epithelzellen zu induzieren (Liang et al. 2007). Bereits 1995 wurde die Eigenschaft von IL-17, andere Zellen zur Produktion von proinflammatorische Zytokinen wie Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-8 (IL-8) zu stimulieren, beschrieben (Yao et al. 1995). IL-17 spielt eine wichtige Rolle bei Autoimmunerkrankungen wie z.B. chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Fujino et al. 2003; Annunziato et al. 2007), Multipler Sklerose (Lock et al. 2002; Komiyama et al. 2006; Tzartos et al. 2008), Psoriasis (Teunissen et al. 1998; Wilson et al. 2007) und rheumatoider Arthritis (Lubberts 2003). Ausserdem konnte gezeigt werden, das IL-17 bei der Abwehr von extrazellulären pathogenen Mikroorganismen wie Klebsiella pneumoniae, Toxoplasmosis gondii und Candida albicans funktionell ist (Ye et al. 2001; Huang et al. 2004; Kelly et al. 2005; Aujla et al. 2008).

IL-21 ist erst kurz nach dem entsprechendem Rezeptor im Jahr 2000 entdeckt worden (Parrish-Novak et al. 2000). Es handelt sich hierbei nicht um ein speziell von T_H17 Zellen gebildetes Interleukin, vielmehr wird IL-21 von mehreren unterschiedlichen Zellen des Immunsystems gebildet (Parrish-Novak et al. 2000; Coquet et al. 2007). Allerdings ist die Produktion von IL-21 durch T_H17 Zellen insofern relevant, als dass es wichtige Funktion bei deren Entwicklung übernimmt. So steht die Differenzierung von naïven T-Zellen in T_H17 Zellen unter dem Einfluss von IL-21 (Korn et al. 2007; Nurieva et al. 2007; Zhou et al. 2007); auch im Sinne einer autokrinen Selbststimulation. Des Weiteren lässt die verbreitete Expression des IL-21 Rezeptors auf Zellen des Immunsystems auf

nennenswerte Bedeutung bei Immunantworten schliessen (Ouyang et al. 2008). IL-21 spielt zum einen bei der B-Zell Funktion (B, für den Reifungsort dieser Zellen in der *B*ursa Fabricii von Vögeln bzw. *"b*one marrow" = Knochenmark) eine wichtige Rolle (Ozaki et al. 2002; Suto et al. 2002; Ozaki et al. 2004), zum anderen induziert es die Produktion von Interferon-γ (IFN-γ) bei T_H1 Zellen und Natürlichen Killerzellen (NK) (Strengell et al. 2002; Monteleone et al. 2005). Ähnlich wie IL-17 ist auch IL-21 mit Erkrankungen autoimmuner Genese assoziiert. Dies konnte beim Systemischen Lupus erythematodes (Ozaki et al. 2004; Herber et al. 2007; Sawalha et al. 2008), Morbus Crohn (Monteleone et al. 2005) und einem Mausmodell für Diabetes mellitus Typ I (King et al. 2004) gezeigt werden.

IL-22 ist eines der zur Interleukin-10 (IL-10) Familie gehörenden Interleukine und wurde im Jahr 2000 von Dumoutier und Kollegen zuerst beschrieben (Dumoutier et al. 2000). IL-22 wird von mehreren Zellpopulationen gebildet, somit auch von T_H1 und T_H2 Zellen, jedoch zu einem bedeutend grösserem Umfang von T_H17 Zellen (Chung et al. 2006; Liang et al. 2006). Es hat proinflammatorische Funktion (Wolk et al. 2004; Boniface et al. 2005) und konnte mit Autoimmunerkrankungen wie chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Andoh et al. 2005; Brand et al. 2006; te Velde et al. 2007), Psoriasis (Boniface et al. 2005; Wolk et al. 2006) und rheumatoider Arthritis (Ikeuchi et al. 2005) assoziiert werden.

 T_H17 Zellen exprimieren den IL-23 Rezeptor, jedoch scheint IL-23 keine Rolle bei der Differenzierung von T_H17 Zellen zu spielen (Bettelli et al. 2006). Vielmehr expandiert und stabilisiert IL-23 die T_H17 Zellpopulation, während IL-23 defiziente Mäuse eine verminderte Population an IL-17 produzierenden Zellen besitzen (Murphy et al. 2003; Langrish et al. 2005). Ausserdem spielt es eine wichtige Rolle bei einem Mausmodell für die Multiple Sklerose (Cua et al. 2003).

Neben dem typischen Zytokinproduktionsmuster zeichnen sich $T_H 17$ Zellen durch die Expression des Transkriptionsfaktors "retinoid acid-related orphan receptor $\gamma t^{"}$ (ROR γt) aus (Ivanov et al. 2006; Wilson et al. 2007). So führt auch die Expression von ROR γt in naïven T-Zellen zur Induktion von IL-17 und dem IL-23 Rezeptor (Ivanov et al. 2006; Zhou et al. 2008).

3. Transforming Growth Factor beta Familie

1978 wurde der transforming growth factor beta (TGF- β) erstmals als Komponente des "sarcoma growth factor" beschrieben, welcher Zellen zum Wachstum bringen kann (de Larco und Todaro 1978; Moses et al. 1981; Anzano et al. 1983). Daraufhin wurde eine ganze Reihe von Proteinen beschrieben, welche auf Grund von Sequenzhomologien und ähnlichen Struktureigenschaften miteinander verwandt sind, und somit die TGF- β Familie bilden. Hierbei ist insbesondere die Positionierung von sieben Cysteinresten zu nennen, welche den sogenannten "Cystein-Knoten" bilden (Sun und Davies 1995).

Die TGF- β Familie besteht derzeit aus 39 Zytokinen welche in "bone morphogenic proteins" (BMP), "growth differentiation factors" (GDF), Inhibinen sowie Activinen, TGF- β Isoformen, "Glial cell line-derived neurotrophic factors" (GDNF) dem Anti-Müller-Hormon (AMH) sowie den "left-right determination factors" (LEFTY) gruppiert werden können (Tabelle II-a) (Chang et al. 2002).

BMP	GDF	Inhibine Activine	TGF-β	GDNF	andere
BMP2	GDF1	INHA	TGF-β1	ARTN	AMH
BMP3	GDF2 (BMP9)	INHBA	TGF-β2	GDNF	LEFIY1
BMP4	GDF3	INHBB	TGF-β3	NRTN	LEFTY2
BMP5	GDF5	INHBC		PSPN	
BMP6	GDF6 (BMP13)	INHBE			
BMP7	GDF7 (BMP12)				
BMP8A	GDF8 (MSTN)				
BMP8B	GDF9				
BMP10	GDF10				
BMP14 (GDF12)	GDF11 (BMP11)				
BMP15	GDF14				
BMP16 (NODAL)	GDF15				

Tabelle II-a TGF-β Familie

Die TGF- β Familie lässt sich klassifizieren in bone morphogenic proteins (BMP), growth differentiation factors (GDF), Inhibine/Activine und transforming growth factor beta Isoformen (TGF- β). Einige Zytokine besitzen mehrere Bezeichnungen (in "()" angegeben). AMH = Anti-Müller-Hormon; ARTN = Artemin; GDNF = glial cell line-derived neurotrophic factors; INHA = Inhibin alpha, INHB = Inhibin beta; INHBA = Inhibin beta A (= Activin A); INHBB = Inhibin beta B (= Activin B); INHBC = Inhibin beta C (= Activin C); INHBE = Inhibin beta E (= Activin E); LEFTY = left-right determination factor; MSTN = Myostatin; NODAL = Nodal; NRTN = Neurturin; PSPN = Persephin; TGFB = transforming growth factor beta

Mitglieder der TGF- β Familie werden in einer biologisch latenten Form sezerniert. So wird die Hauptdomäne vom TGF- β 1 von dem Propeptid "latency associated peptide" (LAP) maskiert. Erst durch die Abspaltung des Propeptids durch die Furin-Konvertase (FURIN), einer Endoprotease, wird TGF- β 1 aktiv (Lawrence et al. 1984; Gentry et al. 1988; Dubois et al. 2001; Chang et al. 2002).

Die Signaltransduktion der TGF-β Familie wird zuerst über zwei Rezeptortypen, und dann intrazellulär über die Aktivierung von Smad's (Name kombiniert aus "Sma" (caenorhabditis elegans) und "Mad" (Drosophola melanogaster)) vermittelt. Die meisten Liganden binden primär an einen der Typ II Rezeptoren und sekundär an den passenden Typ I Rezeptor. Es gibt fünf Typ II Rezeptoren und sieben Typ I Rezeptoren (Tab. 2). Die Typ I Rezeptoren wurden zur Vereinfachung der Nomenklatur als "activin receptor-like kinases" (ALK1-7) zusammengefasst. Weiterhin gibt es noch TGF- β Co-Rezeptoren, wie z.B. Cripto (Gray et al. 2006) und auch Typ III Rezeptoren wie den "transforming growth factor beta receptor 3" (TGFBR3) (Lopez-Casillas et al. 1993) und Endoglin (CD105) welche insbesondere bei der Signalvermittlung der TGF- β Isoformen eine Rolle spielen (Barbara et al. 1999; Koleva et al. 2006) (Tabelle II-b).

Typ I Rezeptor	Typ II Rezeptor	Typ III Rezeptor
ALK1 (ACVRL1)	TGFBR2	TGFBR3
ALK2 (ACVR1)	ACVR2A	Endoglin
ALK3 (BMPR1A)	ACVR2B	_
ALK4 (ACVR1B)	BMPR2	
ALK5 (TGFBR1)	AMHR2	
ALK6 (BMPR1B)		
ALK7 (ACVR1C)		

Tabelle II-b Rezeptoren der TGF-β Familie

ALK = activin receptor-like kinase; ACVRL1 = activin A receptor type II-like 1; ACVR1 = activin A receptor, type I; BMPR1A = bone morphogenetic protein receptor, type IA; ACVR1B = activin A receptor, type IB; TGFBR1 = ransforming growth factor, beta receptor I; BMPR1B = bone morphogenetic protein receptor, type IB; ACVR1C = activin A receptor, type IC; TGFBR2 = transforming growth factor, beta receptor II; ACVR2A = activin A receptor, type IIA; ACVR2B = activin A receptor, type IIB; BMPR2 = bone morphogenetic protein receptor, type IIA; ACVR2B = activin A receptor, type IIB; BMPR2 = bone morphogenetic protein receptor, type II; AMHR2 = anti-Mullerian hormone receptor, type II; TGFBR3 = transforming growth factor, beta receptor III

Typ II Rezeptoren können mit unterschiedlichen Typ I Rezeptoren interagieren. Diese Rezeptoren sind gleichzeitig Serin/Threonin–Kinasen, und die Bindung eines extrazellulären Liganden an einen Typ II Rezeptor führt dann zur Heteromerisierung mit dem passenden Typ I Rezeptor und dessen intrazellulären Transphosphorylierung. Daraufhin kommt es zur Phosphorylierung des entsprechenden Smad Proteins. Es gibt 8 Smad's, welche sich in R-Smad's (*r*eceptor-regulated Smad's), I-Smad's (*i*nhibitory Smad's) und dem Co-Smad (*c*ommon mediator Smad) einteilen lassen (Tabelle II-c).

R-Smad	I-Smad	Co-Smad
Smad 2/3 Smad 1/5/8	Smad 6/7	Smad 4

Tabelle II-c Signaltransduktion der TGF-β Familienmitglieder

Die intrazelluläre Signaltransduktion der TGF- β Familienmitglieder wird über Smad's vermittelt. Smad = Name kombiniert aus "Sma" (caenorhabditis elegans) und "Mad" (Drosophola melanogaster); R-Smad = *r*eceptor-regulated Smad's; I-Smad's = (*i*nhibitory Smad's); Co-Smad (*c*ommon mediator Smad)

Phosphorylierte Smad's können in Verbindung mit dem Co-Smad direkt im Zellkern die Transkription von Genen regulieren. Dies geschieht insbesondere

über die Interaktion mit DNS-bindenden Trankriptionsfaktoren (Abbildung II-b) (Derynck und Zhang 2003).



Abbildung II-b Signaltransduktion der TGF-β Familienmitglieder Smad = Name kombiniert aus "Sma" (caenorhabditis elegans) und "Mad" (Drosophola melanogaster); R-Smad = *r*eceptor-regulated Smad's; P = phosphoryliert, X = Transkriptionsfaktor. Verändert nach (Derynck und Zhang 2003)

Die Tatsache, dass 39 Zytokine über 12 unterschiedliche kombinierbare Rezeptoren wirken, und diese über unterschiedliche Smad's das entsprechende Signal zum Zellkern geben, lässt eine Vielzahl an Variationen zu. Für viele, jedoch nicht alle TGF- β Familienmitglieder sind die bevorzugten Rezeptoren und passenden Smad's beschrieben (Tab. 4). Einige Typ I Rezeptoren interagieren bevorzugt mit bestimmten Smad's. So führt die Ligandenbindung an ALK4 und ALK5 meist zu einer Smad2 und 3 Aktivierung, während ALK2, ALK3 und ALK6 bevorzugt Smad1, 5 und 8 aktivieren (Moustakas et al. 2001) (Tabelle II-d).

Ligand	Typ II	Typ I / Co	Smad
	Rezeptor	Rezeptor	
BMP2	BMPR2/ACVR2A	ALK 3/6	Smad 1/5/8
BMP3	ACVR2A	ALK 4	Smad 2/3
BMP4	BMPR2/ACVR2A	ALK 3/6	Smad 1/5/8
BMP5			
BMP6	BMPR2/ACVR2A		Smad 1/5/8
	BMPR2/ACVR2A		Smad 1/5/8
BMP10			
BMP14 (GDF12)			
BMP15	BMPR2	ALK 6	Smad 1/5/8
BMP16 (NODAL)	ACVR2B	ALK 7	Smad 2/3
		ALK 4 / cripto	
GDF1	ACVR2B	ALK 4	Smad 2/3
GDF2 (BMP9)	BMPR2/ACVR2A	ALK 1	Smad 1/5/8
GDF3		ALK 4/7 / cripto	
GDF5	BMPR2/ACVR2A	ALK 3/6	Smad 1/5/8
GDF6 (BMP13)			
GDF7 (BMP12)			
GDF8 (MSTN)	ACVR2B	ALK 4/5	Smad 2/3
	BMPR2		Smad 2/3
GDF10 GDF11 (BMD11)			Smad 2/3
GDF14			
GDF15			
INHA	ACVR2A/ACVR2B		
INHBA	ACVR2A/ACVR2B	ALK 4	Smad 2/3
INHBB	ACVR2B	ALK 4	Smad 2/3
INHBC			
INHBE			
TGF-β1	TGFBR2	ALK 5	Smad 2/3
TOF 00	TGFBR2	ALK 1 / Endoglin	Smad 1/5/8
TGF-β2	IGFBR2	ALK 5	Smad 2/3
		ALK 1 / Endoglin	Smad 1/5/8
IGF-p3		ALK 5	Smad 2/3 Smad 1/5/8
ARTN			
GDNF			
NRTN			
PSPN			Smad 1/5/8
AMH	AMHR2	ALK 2/3/6	-
LEFTY1		Crypto	
LEFTY2		Crypto	

 Tabelle II-d
 Ligand-Rezeptor-Smad Interaktionen der TGF-β Familie

BMP = bone morphogenic protein; GDF = growth differentiation factor; TGF- β = transforming growth factor beta Isoformen; AMH = Anti-Müller-Hormon; ARTN = Artemin; GDNF = glial cell line-derived neurotrophic factors; INHA = Inhibin alpha, INHB = Inhibin beta; INHBA = Inhibin beta A (= Activin A); INHBB = Inhibin beta B (= Activin B); INHBC = Inhibin beta C (= Activin C); INHBE = Inhibin beta E (= Activin E); LEFTY = left-right determination factor; MSTN = Myostatin; NODAL = Nodal; NRTN = Neurturin; PSPN = Persephin;

TGFB = transforming growth factor beta; ALK = activin receptor-like kinase; ACVRL1 = activin A receptor type II-like 1; ACVR1 = activin A receptor, type I; BMPR1A = bone morphogenetic protein receptor, type IA; ACVR1B = activin A receptor, type IB; TGFBR1 = ransforming growth factor, beta receptor I; BMPR1B = bone morphogenetic protein receptor, type IB; ACVR1C = activin A receptor, type IC; TGFBR2 = transforming growth factor, beta receptor II; ACVR2A = activin A receptor, type IIA; ACVR2B = activin A receptor, type IIB; BMPR2 = bone morphogenetic protein receptor, type IIB; BMPR2 = bone morphogenetic protein receptor, type II; AMHR2 = anti-Mullerian hormone receptor, type II; Smad = Name kombiniert aus "Sma" (caenorhabditis elegans) und "Mad" (Drosophola melanogaster).Nach (Attisano et al. 1992; Mazerbourg et al. 2005; Andersson et al. 2006; David et al. 2007)

Auβerdem gibt es noch andere von der TGF-β Familie aktivierbare Signalmoleküle, welche nicht direkt Smad-abhängig sind. Es kommt insbesondere auch zur Aktivierung mitogenaktivierter Proteinkinasen (MAPK) wie z.B. der P38-mitogenaktivierten Proteinkinasen (p38 MAPK) und c-Jun Nterminalen Kinasen (JNK) (Moustakas und Heldin 2005).

Die Funktionen der Zytokine der TGF-β Familie sind vielfältig. Sie werden in einer Vielzahl von unterschiedlichen biologischen Vorgängen, wie z.B. Zellwachstum, Apoptose, Zelldifferenzierung, Zellmigration, Produktion von extrazellulärer Matrix, Angiogenese, Immunabwehr und bei der Organentwicklung in Zusammenhang gebracht (Massague et al. 2000).

Im Weiteren wird eine Auswahl an TGF- β Familienmitgliedern vorgestellt, welche auf Grund ihrer Rezeptorbindungseigenschaften (GDF2, 8, 9 und 11) oder ihrer beschriebenen Bedeutung bei inflammatorischen Prozessen (INHBA und die funktionellen Antagonisten FST und FSTL3) in dieser Arbeit untersucht wurden. Die immunologische Bedeutung von TGF- β wird in Kapitel II.4. erläutert. Generell besteht eine nahezu 100%ige Homologie bei den TGF- β Familienmitgliedern zwischen Maus und Mensch.

3.1. TGF-β1

TGF^β1 ist der zuerst beschriebene Vertreter der TGF-^β Familie, und einer der TGF-ß Isoformen. So sind neben TGF-ß1 auch TGF-ß2 und TGF-ß3 in diesem und Differenzierung in mesenchymalem Gewebe zu finden, wie z.B. Binde-, Knochen- und Knorpelgewebe, aber auch im Muskel, Herz, Blutgefässen, Lunge, Niere, Darm, Leber, Auge, ZNS und Zellen des hämatopoetischen Systems (Heine et al. 1987; Lehnert und Akhurst 1988; Krieglstein et al. 1995; Krieglstein et al. 1998). Neben dieser Vielzahl von Funktionen bei der Gewebedifferenzierung wird TGF-β1 häufig mit pathologischen Fibrosierungsvorgängen bei einer Vielzahl von Erkrankungen assoziiert (Wynn 2008).

Mäuse mit defekter TGF- β 1 Bildung entwickeln etwa zwei Wochen nach Geburt eine heftige inflammatorische Zellantwort, welche zu Lymphozyteninfiltration in mehreren Organen, Gewebenekrosen und schliesslich zum Tod der Mäuse nach wenigen Tagen führt. Diese Modelle machen den Zusammenhang zwischen TGF- β 1 und Immunregulation sowie Entstehung von Autoimmunerkrankungen deutlich (Shull et al. 1992; Kulkarni et al. 1993). TGF- β 1 und dessen Isoformen sind derzeit die einzig beschriebenen Liganden des Typ II Rezeptors TGFBR2 (Mazerbourg et al. 2005). Mit der Bindung an TGFBR2 kann TGF- β 1 sowohl an die Typ I Rezeptoren ALK5, aber auch an ALK1 binden. Dies führt entweder zur Aktivierung von Smad2 und 3 (bei der Bindung an ALK5) oder von Smad1, 5 und 8 (bei der Bindung an ALK1). Hierbei scheint die Zellexpression von TGF- β Co-Rezeptoren eine wichtige Rolle zu spielen. So führt die Co-Expression von Endoglin zur bevorzugten Bindung des TGF- β 1 an ALK1 und somit zu Aktivierung von Smad1, Smad5 und Smad8 (Lebrin et al. 2004; Blanco et al. 2005).

3.2. INHBA

INHBA wurde 1986 von Ling und Kollegen erstmals als ein Homodimer aus zwei über eine Disulfidbrücke verbundene Inhibin beta A Untereinheiten beschrieben und die Bezeichnung Activin A vorgeschlagen. Diesem Zytokin wurde primär eine stimulierende Wirkung der "Follikel stimulierendes Hormon" (FSH) Sekretion zugesprochen (Ling et al. 1986; Ling et al. 1986; Vale et al. 1986). Später wurden noch viele Funktionen in anderen Organsystemen nachgewiesen. Hierzu zählen zum Beispiel Funktionen in der Erythropoese und Angiogenese, beim Zellzyklus von Neuronen, bei der Embryogenese, der Leberregeneration und Gewebeheilung (Maeshima et al. 2008).

Im Bezug auf diese Arbeit ist allerdings insbesondere die Rolle von INHBA bei inflammatorischen Prozessen zu erwähnen. So konnte gezeigt werden, dass die akute Phase Proteine Interleukin-1 β (IL-1 β) und Tumor Nekrose Faktoralpha (TNF- α) die Produktion von INHBA stimulieren (Shao et al. 1992). Jones und Kollegen konnte weiterhin feststellen, dass es in Mäusen nach Injektion von Lipopolysacchariden (LPS) zu einem schnellen Anstieg von INHBA im Blut kommt, und dass diese Sekretion durch den Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) und dem "Myeloid differentiation primary response gene 88" (MyD88) vermittelt wird. In diesem Modell wurden durch Zugabe von Follistatin, einem funktionellen Antagonisten zu INHBA (siehe Kapitel II.5.), die Blutspiegel von IL-1 β , IL-6 und TNF- α moduliert. Dies spricht für eine Funktion von INHBA bei akuten systemischen inflammatorischen Prozessen (Jones et al. 2007).

INHBA kann an den ACRV2B und ALK4 binden und somit Smad2 und 3 aktivieren (siehe Tabelle II-d).

3.3. GDF2

GDF2, auch BMP9 genannt, wird in der Ratte vorwiegend in der Leber produziert (Miller et al. 2000). Jedoch konnte auch GDF2 im Rückenmark nachgewiesen werden, wo er die cholinerge Differenzierung im ZNS und die Bildung von Acetylcholin unterstützt (Lopez-Coviella et al. 2000). Weiterhin induziert GDF2 Knochenwachstum und die Differenzierung mesenchymaler Zellen in Knorpelgewebe (Majumdar et al. 2001; Kang et al. 2004). Zuletzt wurden Funktionen im Glucosemetabolismus nachgewiesen (Murphy et al. 2003). David und Kollegen konnten die Interaktion mit den Typ II-Rezeptoren BMPR2 und ACVR2A, sowie dem Typ I-Rezeptor ALK1 zeigen (David et al. 2007). Hierdurch kommt es zu einer Aktivierung von Smad1, 5 und 8.

3.4. GDF8

1997 wurde GDF8 als ein neues Mitglied der TGF-β Familie beschrieben. Er wurde insbesondere im Skelettmuskel nachgewiesen und hat dort eine wachstumshemmende Funktion (McPherron et al. 1997). Dies erklärt auch, weshalb GDF8 häufig unter dem Namen Myostatin zu finden ist.

GDF8 bindet an den Typ II-Rezeptor ACVR2B und rekrutiert dann entweder die Typ I-Rezeptoren ALK4 oder ALK5. Die Bindung an diese Rezeptoren führt zur Phosphorylierung von Smad2 und Smad3 (Rebbapragada et al. 2003).

3.5. GDF9

Die Expression von GDF9 mRNS konnte vor allem in der Oozyte und Follikeln gezeigt werden (McGrath et al. 1995; Aaltonen et al. 1999; Bodensteiner et al. 1999). GDF9 spielt somit auch bei der frühen Follikelreifung eine wichtige Rolle (Dong et al. 1996). Des Weiteren wird die Hormonausschüttung der Granulosazellen durch GDF9 reguliert, und auch die Ovulation steht unter dem Einfluss dieses Proteins (Elvin et al. 1999; Vitt et al. 2000).

BMPR2 ist der Typ II-Rezeptor, und ALK5 der Typ I-Rezeptor an den GDF9 bevorzugt bindet. Dadurch kommt es zur Phosphorylierung von Smad2 und Smad3 (Mazerbourg und Hsueh 2006).

3.6. GDF11

GDF11 wurde mit früher Organentwicklung und Skelettstrukturierung in Zusammenhang gebracht. So steht z.B. die Nierenentwicklung, aber auch der Verschluss der Kiefer-Gaumen-Spalte unter dem Einfluss dieses Faktors (McPherron et al. 1999; Esquela und Lee 2003).

GDF11 bindet an die Typ II-Rezeptoren ACVR2A und ACVR2B und die Typ I-Rezeptoren ALK4 und ALK5 und aktiviert daraufhin Smad2 und Smad3 (Oh et al. 2002; Andersson et al. 2006).

4. Die Rolle von TGF-β1 in der Immunologie und T-Zelldifferenzierung

Neben den bereits erwähnten Funktionen im Rahmen von Fibrosierungsvorgängen und der Differenzierung mesenchymalen Gewebes, hat TGF- β 1 insbesondere in der Immunologie Bedeutung. Im Folgenden soll die Rolle des TGF- β 1 im Immunsystem zusammengefasst werden, vor allem mit Fokus auf die Bedeutung von TGF- β 1 bei der T-Zell Differenzierung in T_{reg} Zellen und T_H17 Zellen.

1986 konnte erstmals ein Einfluss des TGF-β1 auf Zellen des Immunsystems nachgewiesen werden. So wurde zum einen gezeigt, dass TGF-β1 die Proliferation von B-Zellen, sowie deren Immunglobulinsekretion hemmt (Kehrl et al. 1986); zum anderen aber auch die durch IL-2 stimulierte Proliferation von T-Zellen inhibiert (Kehrl et al. 1986). Daraufhin wurde in TGF-β1-defizienten Mäusen die Bedeutung dieses Zytokines in der Immunregulation insbesondere auch von T-Zellen unterstrichen (Shull et al. 1992; Kulkarni et al. 1993). Auch Mäuse, welche keinen bzw. einen dominant-negativen TGFBR2 auf T-Zellen exprimieren, entwickeln ein inflammatorisches Syndrom (Gorelik und Flavell 2000; Lucas et al. 2000; Li et al. 2006).

TGF- β 1 beeinflussst nicht nur die Proliferation bzw. Funktion einer bestehenden Zellpopulation, sondern auch deren Differenzierung. Naïve CD4⁺ T-Zellen können sich in Effektor T-Zellen (T_H1, T_H2 und T_H17), sowie in regulatorische T-Zellen (iT_{reg}, T_H3 und T_r1) differenzieren. Dies geschieht unter dem Einfluss mehrerer Faktoren. TGF- β 1 hemmt die Differenzierung naïver T-Zellen in T_H1 und T_H2 Zellen (Gorelik und Flavell 2002), ist jedoch ein wichtiger Bestandteil bei der Entstehung von T_{reg} sowie T_H17 Zellen.

Die Funktion von TGF- β 1 bei der Entstehung von T_{reg} Zellen ist im Einzelnen noch nicht komplett geklärt. Hier muss insbesondere zwischen nT_{reg} und iT_{reg} Zellen unterschieden werden. Es gibt einige Veröffentlichungen, welche die Relevanz von TGF- β 1 bei der Entstehung von nT_{reg} Zellen im Thymus eher niedrig einstufen. So wurde bei Mäusen mit fehlendem TGFBR2, dominantnegativem TGFBR2 bzw. keinem TGF- β 1 eine unveränderte oder sogar erhöhte T_{reg} Zellpopulation im Thymus beschrieben (Schramm et al. 2003; Huber et al. 2004; Mamura et al. 2004; Fahlen et al. 2005; Marie et al. 2005; Li et al. 2006; Marie et al. 2006). Allerdings konnte kürzlich von Liu und Kollegen in einem Mausmodell mit defizientem ALK5 gezeigt werden, dass die nT_{reg} Zellentstehung in den ersten Tagen der Thymusreifung von TGF- β 1 abhängig ist (Liu et al. 2008). Diese widersprüchlichen Ergebnisse lassen eine eindeutige Beschreibung der nT_{reg} Zelldifferenzierung derzeit nicht zu.

Die Bedeutsamkeit von TGF- β 1 bei der Entstehung von iT_{reg} Zellen in der Peripherie ist unumstritten. So konnte gezeigt zeigen, dass undifferenzierte CD4⁺CD25⁻ T-Zellen *in vitro* zu CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T_{reg} Zellen konvertiert werden können (Chen et al. 2003; Fantini et al. 2004). Es handelt sich dabei nicht um eine Expansion von CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺ T-Zellen, sondern um eine *de* *novo* Konversion aus CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ in CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T-Zellen (Wan und Flavell 2005). In Tiermodellen für Diabetes mellitus Typ I, bzw. Überexpression von dominant-negativem TGFBR2 in T-Zellen konnte die Bedeutung der *de novo* Konversion von iT_{reg} Zellen durch TGF- β 1 *in vivo* demonstriert werden (Huber et al. 2004; Peng et al. 2004). Die Quelle der TGF- β 1-Produktion für die Differenzierung in iT_{reg} Zellen ist noch nicht eindeutig identifiziert (Wan und Flavell 2007).

Anfang 2008 konnte Tone und Kollegen Bindungsstellen für den "Nuclear factor of activated T-cells" (NFAT) und Smad3 an Transkriptionsverstärkern für Foxp3 nachweisen (Tone et al. 2008). Da TGF- β 1 zur Induktion von Smad3 führt, konnte somit der Funktionsmechanismus von TGF- β 1 bei der Entstehung von iT_{reg} Zellen erklärt werden. Die Bindung von TGF- β 1 an TGFBR2 und ALK5 führt zur Phosphorylierung von Smad3, so dass diese Kombination vermutlich für die Foxp3 Induktion verantwortlich ist. Die sich im Thymus möglicherweise unabhängig von TGF- β 1 entwickelnden nT_{reg} Zellen könnten unter dem Einfluss anderer TGF- β Familienmitgliedern durch eine Smad3 Aktivierung entstehen (von Boehmer und Nolting 2008); dies konnte bis jetzt jedoch nicht gezeigt werden.

TGF-\beta1 hat jedoch neben der Induktion von Treg Zellen und Inhibition der Differenzierung naïver T-Zellen in T_H1 sowie T_H2 Zellen, nicht nur anti-Funktion, sondern durch die Förderung der inflammatorische T_H17 Zelldifferenzierung auch pro-inflammatorische Wirkung. So können in Kulturen aus naïven T-Zellen unter Zugabe von TGF- β 1 T_H17 Zellen gebildet werden. Hierzu ist jedoch die Kombination von TGF
ß1 mit anderen Zytokinen wie IL-6, aber auch IL-21 nötig (Bettelli et al. 2006; Mangan et al. 2006; Veldhoen et al. 2006; Korn et al. 2007). IL-6 wird hierbei eine entscheidende Rolle deutlich geringeren Konversion von naïven T-Zellen in Trea Zellen, als mit TGFβ1 allein. Dies lässt sich durch die Induktion des IL-23 Rezeptors und der Produktion von IL-21 bei naïven T-Zellen durch die Gabe von IL-6 erklären. Die IL-23 Rezeptorexpression und die IL-21 Produktion sind typische Merkmale von T_H17 Zellen. Somit führt die Addition von IL-6 in Kombination mit TGF-β1 zu einer besseren T_H17 Zellkonversion und einer schlechteren T_{rea} Zellkonversion (Ivanov et al. 2006; Korn et al. 2007; Zhou et al. 2007; Zhou et al. 2008). Die Entstehung dieser zwei Zellpopulationen scheint vom umgebenden Zytokinmilieu abzuhängen. So konnte gezeigt werden, dass die durch TGF-β1 induzierte T_{reg} Zell-spezifische Foxp3 Expression in T-Zellen durch direkte Interaktion mit ROR-yt (dem T_H17 Zell-spezifischen Transkriptionsfaktor), die IL-23 typischen T_H17 Zelleigenschaften, wie IL-17 Produktion und Rezeptorexpression, supprimieren kann (Zhou et al. 2008).



Abbildung II-c T-Zelldifferenzierung in T_{reg} und T_H17 Zellen Foxp3 = forkhead box protein 3; IL = Interleukin; IL-2R α = α -Kette des IL-2 Rezeptors, IL-23R = II-23 Rezeptor, ROR γ t = retinoic acid-related orphan receptor γ t, TGFB1 = transforming growth factor beta 1

5. Follistatine

INHBA induziert die Sekretion des Follikel stimulierenden Hormons (FSH) (Ling et al. 1986; Vale et al. 1986). Kurz nach der Beschreibung dieses Phänomens, wurde ein Protein beschrieben, welches die FSH-Sekretion inhibiert. Auf Grund dieser Eigenschaft wurde diesem Protein der Name Follistatin (FST) gegeben (Robertson et al. 1987; Ueno et al. 1987). FST ist strukturell nicht mit INHBA verwandt, und gehört auch nicht zur TGF- β Familie. Es handelt sich bei FST vielmehr um einen der Antagonisten der TGF- β Familie. Hierzu gehören z.B. auch Noggin und Chordin (Yanagita 2005). Dieser Antagonismus funktioniert über direkte Bindung an das Zytokin und Maskierung der Domäne mit der Rezeptorbindungsstelle (Thompson et al. 2005). Die Hemmung der FSH-Sekretion durch FST beruht somit vermutlich auf direkter Bindung und somit Neutralisierung von INHBA (Nakamura et al. 1990; Harrington et al. 2006). FST kann neben INHBA auch BMP2, 4, 6, 7 und 15 sowie GDF8 und 11 binden (Thompson et al. 2005).

Es gibt neben FST auch einige strukturverwandte Proteine, welche dann Follistatin-like 1, 2, 3, 4 und 5 (FSTL1, 2, 3, 4 und 5) genannt wurden.

Diese Proteine sind unterschiedlich gut beschrieben, so wurde FSTL1 mit Entzündungsvorgängen in Verbindung gebracht (Miyamae et al. 2006).

Über FSTL2 wurde bis jetzt wenig berichtet, aber es scheint bei der Embryonalentwicklung von Zebrafischen relevant zu sein (Dal-Pra et al. 2006). FSTL2 ist allerdings auch unter dem Namen "insulin-like growth factor binding protein 7" (*IGFBP7*) zu finden (nach NCBI). Die Expression dieses Proteins scheint von TGF- β 1 abhängig zu sein (Pen et al. 2008), und könnte eine Rolle bei der Tumorentstehung spielen. So wird eine Funktion als Tumor Supressor bei Kolonkarzinomen vermutet (Ruan et al. 2007).

FSTL3 wurde erstmals 1998 in Zusammenhang mit einer Form der B-Zell Leukämie beschrieben. Es trägt mehrere Namen, unter anderem "follistatinrelated gene" (FLRG) und "Follistatin-related gene protein" (FSRP). FSTL3 besteht aus 256 Aminosäuren und lieat in unterschiedlichen Gylcosylierungszuständen vor; es besitzt eine Strukturdomäne weniger als FST und keine "heparin-binding sequence" (HBS) (Tsuchida et al. 2000; Schneyer et al. 2001). Aus diesem Grund ist es auch nicht in der Lage wie FST an Zelloberflächen zu binden (Schnever et al. 2004). Jedoch zeigt es ähnliche FSTL3^{-/-} Mäuse sind überlebensfähig und zeigen vor allem Änderungen in der Glucosehomöostase und im Herzmuskel. Diese sind auf die fehlende Inhibition von INHBA und GDF8 zurückgeführt worden (Mukherjee et al. 2007). Interessanterweise wird die Transkription und Translation von FSTL3 durch TGF-β1, aber auch durch INHBA stimuliert (Bartholin et al. 2001; Maguer-Satta et al. 2001; Bartholin et al. 2002). Im Gegensatz zu FST scheint FSTL3 jedoch weniger sezerniert zu werden, ist dafür jedoch im Zellkern nachweisbar (Tortoriello et al. 2001). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass FSTL3 mit "ALL1 (acute lymphoblastic leukaemia) fused gene from chromosome 10" (AF10), einem Translokationspartner des Onkogens "mixed-lineage leukaemia" (MLL) interagiert, bzw. dessen Transkriptionsfunktion verstärkt. Die Bedeutung von AF10 ist jedoch unklar, und somit bleibt die Frage der Funktion von FSTL3 im Kern bis jetzt unbeantwortet (Kumar 2005; Forissier et al. 2007).

Weitere Gene mit Sequenzhomologien zu FST tragen FSTL4 und FSTL5 (nach NCBI), jedoch konnten diese Gene, bzw. die Genprodukte bis jetzt in noch keinen funktionellen Zusammenhang gebracht werden.

III.Material und Methoden

1. Material

1.1. Mäuse

Es wurden FVB/N Wildtypmäuse im Alter von 9-14 Wochen analysiert. Zur allogenen Stimulation mit CD3⁻ Zellen wurden Milzzellen aus C57/B6 Mäusen isoliert.

Tierversuchsanträge:

- G 97/06 Modulation CD4⁺CD25⁺ regulatorischer T-Zellen Huber/Schramm
- ORG 321 Organentnahme Schramm

1.2. Geräte		
Bestrahlung	Hans Wälisch Miller GmbH, S01065/3	
Brutschrank	CO ₂ Incubator, SANYO Biomedical, USA	
Computer	Dell Optiplex 755	
	Apple Power Mac G4	
Drucker	DPU-414 thermal printer	
	LaserJet 4L, Hewlett-Packard GmbH,	
	Deutschland	
Entwicklungsmaschine	Kodak X-OMAT 5000RA, Eastman Kodak	
	Company, Rochester, NY, USA	
Elektrophoreseapparaturen	BIOplastics, BIOzym, Niederlande	
ELISA Auslesegerät	Opsys MRX TC II, Dynex Technologies	
	GmbH, Deutschland	
FACSCanto [™]	BD Biosciences, USA	
FlexCycler	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf,	
	Deutschland	
Kühlschrank	Liebherr-International Deutschland GmbH	
Lichtmikroskop	Leica Microsystems DM IRB, Wetzlar GmbH,	
	Deutschland	
Mikrowelle	DURABRAND MW-17, Wal-Mart Stores,	
	Arkansas, USA	
Photometer	BIOPhotometer, Eppendorf, Deutschland	
PCR Cycler	DNA Engine Dyad Thermal Cycler; Bio-Rad	
	Laboratories; USA	
Rollgerät	stuart Roller Mixer SRT6, Barloworld Scientific Ltd,UK	
	·	

Scanner	GS-800 Calibrated Densitometer, Bio-Rad
	Laboratories GmbH, Deutschland
Spannungsregler	PowerPac Basic, Bio-Rad Laboratories
	GmbH, Deutschland
Sterilbank	BDK, Luft- und Reinraumtechnik GmbH,
	Deutschland
Tiefkühlgerät	NuAire, Inc, USA
UV Transilluminator	Gel Doc 2000, Bio-Rad Laboratories GmbH,
	Deutschland
Waage	KERN & Sohn GmbH, Bahlingen, Deutschland
Zentrifugen	C4-22, Jouan, Frankreich
	Centrifuge 5417R, Eppendorf, Deutschland

1.3. Software

BM Engels© 1992, University of Wisconsin,	
Genetics Madison, USA	
Copyright BD Biosciences	
Service de Biochimie et de Génétique	
Moléculaire Départment de Biologie Cellulaire	
et Moléculaire, Direction des Sciences de la	
Yie-CEA-France	
Bio-Rad Laboratories GmbH, Deutschland	
SPSS Inc., Chicago, USA	

1.4. Materialien für Zellisolation

Cell Strainer	BD Biosciences, USA	
Dynal MPC [®] -15 Magnet	Dynal Biotech, Norwegen	
MACS [®] Seperation	Miltenyi Biotec GmbH, Deutschland	
Columns		
Quadro MACS [™] Seperator	Miltenyi Biotec GmbH, Deutschland	

1.5. Materialien für ELISA

ELISA Kit	R&D Systems, Deutschland
Maus IL-17	
ELISA Mikroplatten	Thermo Fisher Scientific, Dänemark
Rotilabo [®] -Verschlussfilm	Carl Roth GmbH + Co, Deutschland
für Mikrotiterplatten	
TMB Plus READY-TO-USE	Kem-En-Tec Diagnostics A/S, Dänemark
Substrate	

1.6. Materialien für RT-PCR

Deckelkette für 0,2ml Kette	SARSTEDT AG & Co., Deutschland

Ethidiumbromidlösung	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland	
First Strand cDNA	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland	
Synthesis Kit		
for RT-PCR (AMV)		
Multiply [®] -µStrip 0,2ml Kette	SARSTEDT AG & Co., Deutschland	
NucleoSpin [®] RNA/Protein	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG,	
	Deutschland	
peqGOLD Leiter-Mix	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Deutschland	
Orange G		
Primer	Metabion GmbH, Deutschland	
Taq PCR Master Mix	QIAGEN, Deutschland	
UVette	Eppendorf, Deutschland	

1.7. Materialien für Western Blotting

Amersham Hyperfilm [™]	GE Healthcare Limited, UK		
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Bio-Rad Laboratories GmbH, Deutschland		
Aprotinin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland		
BCA-Protein-Assay-Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., USA		
Benzamidin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland		
Chromatographie Papier	Whatman International Ltd., England		
Elektrophoresekammer	Mini-PROTEAN® Tetra Cell, Bio-Rad		
	Laboratories GmbH, Deutschland		
Leupeptin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland		
Milchpulver	Spinnrad [®] , interTee Handels GmbH,		
	Norderstadt, Deutschland		
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland		
Nitrozellulosemembranen	Whatman International Ltd., England		
PMSF	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland		
Protran [®] Nitrozellulose	Whatman GmbH, Dassel, Deutschland		
Roti [®] -Lumin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland		
Rotiphorese [®] Gel 40 (Acrylamid)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland		
Temed	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland		

1.8. Antikörper, Dynabeads, MicroBeads, Zytokine und Enzyme

anti-Maus CD3e	Becton Dickinson Labware, New Jersey, USA
PE anti-Maus CD3	Becton Dickinson Labware, New Jersey, USA
PE anti-Maus CD4	Becton Dickinson Labware, New Jersey, USA
Biotin anti-Maus CD4	Becton Dickinson Labware, New Jersey, USA
FITC anti-Maus CD25	Becton Dickinson Labware, New Jersey, USA
Biotin anti-Maus CD25	Becton Dickinson Labware, New Jersey, USA
anti-Maus CD28	Becton Dickinson Labware, New Jersey, USA
PE anti-Maus CD105	Becton Dickinson Labware, New Jersey, USA
APC anti-Maus/Ratte Foxp3	eBioscience, Deutschland

PE anti-Maus IL-17 Becton Dickinson Labware, New Jersey, USA HRP Anti-Ziege Ig DakoCytomation, Dänemark anti-Maus FSTL3 R&D Systems, Deutschland anti-Actin (I-19) HRP Santa Cruz Biotechnology, USA anti-Maus B220 Invitrogen Dynal, Norwegen anti-Maus CD8 Invitrogen Dynal, Norwegen anti-Maus M-450 Epoxy Invitrogen Dynal, Norwegen Miltenyi Biotec GmbH, Deutschland anti-FITC MicroBeads Miltenyi Biotec GmbH, Deutschland anti-PE MicroBeads Streptavidin MicroBeads Miltenyi Biotec GmbH, Deutschland Rekombinantes Human TGF-β1 R&D Systems, Deutschland **Rekombinantes Maus FSTL3 R&D** Systems, Deutschland **Rekombinantes Maus FST288** R&D Systems, Deutschland Rekombinantes Maus INHBA R&D Systems, Deutschland Rekombinantes Human GDF8 PeproTech GmbH, Deutschland Rekombinantes Human GDF9 PeproTech GmbH, Deutschland Rekombinantes Human GDF11 PeproTech GmbH, Deutschland IL-6 wurde freundlicherweise der von Arbeitsgruppe um Herrn Professor Rose-John, Institut für Biochemie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel zur Verfügung gestellt (Scheller und Rose-John 2006) N-Glycanase[®] ProZyme, Inc., USA 1.9. Weiteres

Aqua ad iniectabilia	Baxter Deutschland GmbH
BD Cytofix/Cytoperm [™] Plus Fixation/Permeabilization Kit mit GolgiPlug [™]	Becton Dickinson Labware, New Jersey, USA
Bovines Serum Albumin	PAA Laboratories GmbH, Österreich
Chemikalien	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
	MERCK-Schuchardt, Deutschland
	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Fetales Bovines Serum	Biochrom AG, Deutschland
Filtrationssystem	Millipore Corporation, USA
Ionomycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Kunststoffwaren	Becton Dickinson Labware, New Jersey, USA
	Greiner Bio-One GmbH, Deutschland
	Sarstedt AG & Co, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Optik Labor Frischknecht, Deutschland
Panserin [™] 401	PAN Biotech GmbH, Deutschland
Penicillin, Streptomycin	PEN-STREP, Cambrex Bio Science Verviers Belgien

PMA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Paraformaldehyd	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Zellkulturplatten	Sarstedt, Inc. Newton, USA

1.10. Verwendete Puffer

PBS

- 2,7 mM KCl
- 1,5 mM KH₂PO₄
- 137 mM NaCl
- 8,1 mM Na₂HPO₄
- pH 7,3

1.10.1. Zellisolation

MACS Puffer

- PBS
- 0,5% BSA
- 2 mM EDTA

ACK Puffer

- 150 mM NH₄CI
- 10 mM KHCO₃
- 1,3 mM EDTA
- pH 7,4

Zellkulturmedium

- Panserin[™] 401
- 1% PEN-STREP

1.10.2. FACS

Perm/Wash[™]

- 1 Anteil Perm/Wash[™] 10x
- 9 Anteile H₂O

Fixationslösung

- PBS
- 2% PFA

Saponin Puffer für intrazelluläre Zytokinfärbung

- PBS
- 0,5% BSA
- 0,5% Saponin

1.10.3. RT-PCR

TBE

- 100ml TBE 10x
 - \circ 1 M Tris
 - o 0,83 M Borsäure
 - 10 mM EDTA
- 900ml H₂O

Kresolrot Gelladepuffer

- 50ml H₂O
- 6% Saccharose1mM Kresolrot

1.10.4. ELISA

Wasch Puffer

- PBS
- 0,05% Tween

Block-Lösung

- PBS
- 10% FBS

Stop-Lösung

• 2N H₂SO₄

1.10.5. Western Blot

Trenngel, Stocklösung

- 24 ml H₂O
- 30 ml Acrylamid 40%
- 25 ml 1,5M Tris pH 8,8
- 1 ml 10% SDS
- 20 ml Glycerol

Sammelgel, Stocklösung

- 74 ml H₂O
- 12,5 ml Acrylamid 40%
- 12,5 ml 1M Tris pH 6,8
- 1 ml 10% SDS

Laufpuffer

- 100 ml Laufpuffer 10x
 - 21H₂O
 - \circ 20 g SDS
 - $\circ \quad \text{288 g Glycin}$
 - \circ 60,6 g Trisbase
- 900 ml H₂O

Blotpuffer

- 100 ml Blotpuffer 10x
 - \circ 1 | H₂O
 - o 144 g Glycin
 - o 30,3 g Trisbase
- 200 ml Methanol
- 700 ml H₂O

TBS

- 100 ml TBS 10x
 - $\circ \quad 2\,I\,H_2O$
 - o 24,22 g Trisbase
 - o 175,32 g NaCl
 - Titration mit HCI 13M auf pH 7,6
- 900 ml H₂O

TBS/T

- TBS
- 0,05% Tween

Blocklösung

- TBS/T
- 5% Milchpulver

Stripping Lösung

- H₂O
- 100 mM 2-Mercaptoethanol
- 2% SDS
- 62,5 mM Tris-HCl pH 6,7

Puffer zur Zellauftrennung in Zytoplasma und Nukleus Puffer A (Zytoplasma)

- 10 mM Hepes-KOH pH 7,9
- 10 mM KCl
- 1,5 mM MgCl₂
- 0,5 mM DTT
- 0,5% NP-40
- Proteaseinhibitoren
 - Leupeptin
 Aprotinin
 Natriumorthovanadat
 Benzamidin
 PMSF
 μg/ml
 1,5µg/ml
 2mM
 2mM
 10mM

Puffer B (Nukleus)

- 20 mM Hepes-KOH pH 7,9
- 400 mM NaCl
- 1,5 mM MgCl₂

- 0,5 mM DTT
- 0,2 mM EDTA
- 15% Glycerol
- Proteaseinhibitoren

0	Leupeptin	1µg/ml
0	Aprotinin	1,5µg/ml
0	Natriumorthovanadat	2mM
0	Benzamidin	10mM
0	PMSF	1mM

2. Methoden

2.1. Herstellung von Einzelzellsuspensionen

Sämtliche Schritte wurden unter sterilen Bedingungen mit steril filtrierten Medien durchgeführt. Es wurden Zellsuspensionen aus der Milz von Mäusen hergestellt. Hierzu wurde die Milz der Maus entnommen und in MACS-Puffer auf Eis gelegt. Daraufhin wurde diese mit einem Spritzenkolben durch ein Nylonsieb mit einer Porengröße von 100µm (Cell Strainer) gerieben und der Durchfluss in einer Petrischale aufgefangen. Hierbei wurde wiederholt mit MACS-Puffer nachgespült. Die Suspension wurde dann in ein 50ml konisches Röhrchen überführt und abzentrifugiert (5min bei 1500U/min; C4-22, Jouan, Frankreich). Der Überstand dekantiert und das Pellet mit 1ml ACK-Puffer pro Milz resuspendiert und für 1min inkubiert. Diese Zellsuspension wurde dann mit 25ml MACS-Puffer aufgefüllt, durch ein Sieb (Cell Strainer) mit einer Porengrösse von 40µm gereinigt und wieder abzentrifugiert (5min bei 1500U/min; C4-22, Jouan, Frankreich). Nach dem Dekantieren wurde das Pellet in 5ml MACS-Puffer aufgenommen und die Zellzahl durch Verwendung einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Die Zellen wurden dann in einer Konzentration von 2*10⁸ Zellen pro ml aufgenommen.

2.2. Spezifische Zellisolation

Die Zellsuspension wurde nach den Methoden der magnetischen Zellisolation (MACS = magnetic adhesion cell sorting) und Dynabeads® Zellseperation in unterschiedliche Zellpopulationen aufgereinigt. Generell wurden die Zellen dazu, bei der magnetischen Zellisolation, mit markierten (Biotin, FITC oder PE) Primärantikörpern gegen das entsprechende Oberflächenmolekül, und daraufhin mit einem mit MicroBeads gekoppelten Sekundärantikörper gegen Biotin (Streptavidin) FITC oder PE inkubiert. Diese Zellsuspensionen wurden dann über eine sich in einem Magneten (Quadro MACS[™] Seperator) befindliche Säule (MACS® Seperation Column) gegeben und entweder der Durchfluss oder die in der Säule gebundenen Zellen weiterverarbeitet.

Es wurden CD4⁺ T-Zellen untersucht. Diese wurden in CD4⁺CD25⁻ und CD4⁺CD25⁺ getrennt um im Weiteren unterschiedliche Analysen durchzuführen.

2.2.1. Isolation CD4⁺CD25⁻ Lymphozyten

Eine Zellsuspension mit einer Konzentration von 2*10⁸ Zellen pro ml wurde im Verhältnis 1:100 mit FITC anti-Maus CD25 bei 4°C über 15min in Dunkelheit inkubiert. Daraufhin wurde mit 25ml MACS-Puffer aufgefüllt und die Zellsuspension zentrifugiert (5min bei 1500U/min; C4-22, Jouan, Frankreich). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wieder in einer Konzentration von 2*10⁸ Zellen pro ml aufgenommen und im Verhältnis von 1:10 mit anti-FITC MicroBeads bei 4°C über 15min in Dunkelheit inkubiert. Nach Zentrifugation (5min bei 1500U/min; C4-22, Jouan, Frankreich) und Dekantierung wurde das

Pellet in 5ml MACS-Puffer aufgenommen und über die zuvor mit 3ml MACS-Puffer equilibrierte Säule (MACS® Seperation Column) gegeben. Der Durchfluss enthält CD25⁻ Zellen. Die Säule wurde drei Mal mit 3ml MACS-Puffer nachgespült um die Reinheit der CD25⁺ Zellen zu erhöhen, da diese ebenfalls verwendet wurden (Kapitel III.2.2.2). Die Zellzahl der Suspension im Durchfluss wurde mit einer Neubauer Zählkammer ermittelt. Nach erneuter Zentrifugation (5min bei 1500U/min; C4-22, Jouan, Frankreich) und Verwerfung des Überstandes wurden die Zellen in einer Konzentration von 1*10⁸ Zellen pro ml aufgenommen und mit Biotin anti-Maus CD4 im Verhältnis 1:800 bei 4°C über 15min in Dunkelheit inkubiert. Daraufhin wurde mit 25ml MACS-Puffer aufgefüllt und die Zellsuspension zentrifugiert (5min bei 1500U/min; C4-22, Jouan, Frankreich). Nun wurden die Zellen wieder in einer Konzentration von 1*10⁸ Zellen pro ml aufgenommen und mit Streptavidin microbeads im Verhältnis von 1:40 bei 4°C über 15min in Dunkelheit inkubiert. Daraufhin wurde mit 25ml MACS-Puffer aufgefüllt und die Zellsuspension erneut zentrifugiert (5min bei 1500U/min; C4-22, Jouan, Frankreich). Die Zellen wurden in 5ml MACS-Puffer aufgenommen und über eine Säule (MACS® Seperation Column) gegeben. Die Säule wurde drei Mal mit 3ml MACS-Puffer nachgespült und das Eluat wurde verworfen. Um die Zellreinheit zu erhöhen, wurden die in der Säule gebundenen Zellen mit 5ml MACS-Puffer über eine zweite Säule gegeben und der Spülvorgang wiederholt. Die Zellen in dieser zweiten Säule waren nun $CD4^+CD25^-$.

2.2.2. Isolation CD4⁺CD25⁺ Lymphozyten

Die in der Säule bei der CD25 Isolation (Kapitel III.2.2.1) gebliebenen Zellen aus der CD4⁺CD25⁻ Isolation wurden erneut über eine Säule gegeben und dann in einem 15ml Reaktionsgefäss weiterverarbeitet. Die CD4 Isolation erfolgte nach dem Prinzip der negativen Selektion, d.h. Zellen, welche B220⁺, CD8⁺ und (M-450 Epoxy)⁺ waren, wurden aus der Suspension entfernt. B220 ist eine Marker für B-Zellen, M-450 Epoxy für Makrophagen. Nach Ermittlung der Zellzahl mit einer Neubauer Zählkammer wurden die zuvor abzentrifugierten (5min bei 1500U/min; C4-22, Jouan, Frankreich) Zellen in 1ml MACS-Puffer aufgenommen. Etwa 60% dieser Zellen sind nicht CD4⁺CD25⁺; entsprechend diesem prozentualen Anteil der Zellen, wurden diese mit Dynabeads in folgendem Verhältnis inkubiert (4°C über 30min, auf Rollgerät):

- 2 Dynabeads anti-Maus B220 pro Zelle
- 1 Dynabead anti-Maus CD8 pro Zelle
- 1 Dynabead anti-Maus M-450 Epoxy pro Zelle

Die Zellsuspension wurde mit 8ml MACS-Puffer aufgefüllt und resuspendiert. Das Reaktionsgefäss wurde für 2min in einen Magneten (Dynal MPC®-15 Magnet) positioniert. Die mit Dynabeads markierten Zellen wurden vom Magneten angezogen und nicht markierte Zellen konnten abpipetiert und in ein neues Reaktiongefäss überführt werden. Dieser Schritt wurde wiederholt. Die Zellen waren somit CD4⁺CD25⁺.
2.2.3. Analyse der Zellreinheit nach der Zellisolation

Nach der Isolation wurde die Reinheit, sowie die Foxp3 Expression dieser Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt (Abbildung III-a). Die für die dargestellten Ergebnisse verwendeten Zellen zeigten nach der Isolation folgende Reinheiten:

CD4⁺CD25⁻ Zellen hatten eine Reinheit von 94% bis 98%. Diese waren zwischen 2,5% bis 4,5% Foxp3⁺.

CD4⁺CD25⁺ Zellen hatten eine Reinheit von 80% bis 85%. Diese waren zwischen 87% und 89% Foxp3⁺.

Somit enthält die CD4⁺CD25⁻ Zellpopulation fast keine Foxp3⁺ T_{reg} Zellen, während CD4⁺CD25⁺ Zellpopulation nahezu vollständig aus Foxp3⁺ T_{reg} Zellen besteht.

Die Diskrepanz bei den CD4⁺CD25⁺ Zellen zwischen der hohen Foxp3 Expression und der Zellreinheit im Bezug auf CD4 und CD25, ist vermutlich ein methodisches Problem. Wahrscheinlich waren die Zellen reiner im Bezug auf CD25, als tatsächlich in der FACS Analyse gemessen. Grund hierfür könnte die Isolationsmethode dieser Zellen sein. Die Zellen wurden nach der CD25 Isolation über einen längeren Zeitraum bei Tageslicht verarbeitet. Da die CD25 Isolation mit einem FITC gekoppeltem Antikörper durchgeführt wird, lässt die Intensität des Farbstoffs über den Isolationszeitraum nach. Auch eine Nachfärbung am Ende der Isolation zeigte keine bessere Färbung. Denkbar wäre hier, dass die Antikörperinkubation gesättigt waren und es sich somit zwar um CD25⁺ Zellen handelt, diese aber nicht mehr intensiv im FITC Kanal strahlen. An dieser Stelle ist nochmals zu erwähnen, dass es auch CD25⁺Foxp⁻ Zellen gibt, und somit war diese T_{reg} Zellisolationmethode auf Grund der hohen Foxp3 Expression zufriedenstellend.

Die in diesem Kapitel beschriebenen methodischer Techniken, sind im Bezug auf die Interpretation der Ergebnisse zu bedenken. Zum einen sind die Zellsuspensionen hinsichtlich zellulärer Verunreinigung zu beachten. Des Weiteren ist zu bemerken, dass die Zellen zur spezifischen Isolation mit Antikörpern inkubiert werden (anti-CD4, anti-CD25). Es ist denkbar, dass die Inkubation der Zellen mit den jeweiligen Antikörpern am entsprechenden Rezeptor auch eine direkte Wirkung auf die Zelle hat. Somit wäre die Aktivierung von intrazellulären Signalkaskaden denkbar. Weiterhin beansprucht die Zellisolation eine Dauer von mehreren Stunden. Die Zellen waren somit gewissen Temperaturschwankungen und mechanischen Reizen ausgesetzt. Diese Belastung ist höchst wahrscheinlich "Stress" für die Zellen und geht möglicherweise mit einer Zellaktivierung einher.





Repräsentative Analyse der nach obigem Protokoll isolierten Zellen aus Milzzellen von FVB Wildtypmäusen. Angaben in Prozent. Frisch isolierte Zellen wurden CD4 PE, CD25 FITC und Foxp3 APC gefärbt und mittels FACS analysiert. Die Reinheit CD4⁺CD25⁻ Zellen lag zwischen 94% und 98%, diese waren zwischen 2,5% und 4,5% Foxp3⁺. Die Reinheit der CD4⁺CD25⁺ Zellen lag zwischen 80% und 85%, diese Zellen waren jedoch zwischen 87% und 89% Foxp3⁺.

2.3. Zellkultivierung und *in vitro* Stimulation für Zelldifferenzierungsanalysen

Sämtliche Schritte wurden unter sterilen Bedingungen mit steril filtrierten Medien durchgeführt. Murine CD4⁺CD25⁻ T-Zellen wurden in 96-well oder 24well Zellkulturplatten kultiviert und stimuliert. Dabei wurden die Zellen in einer Konzentration von 2*10⁶ Zellen pro ml in Zellkulturmedium aufgenommen und bei 96-well Zellkulturplatten á 200µl pro well (für FACS Analysen), bzw. bei 24well Zellkulturplatten á 1000µl pro well (für ELISA Messungen) ausplattiert.

Bei Zelldifferenzierungsanalysen wurden die Zellen kostimuliert. Hierzu wurden die Zellkulturplatten über 12 bis 24 Stunden mit anti-Maus CD3e Antikörpern in einer Konzentration von 2µg/ml PBS mit einem Volumen von 50µl (bei 96-well Kulturplatte) bzw. 250µl (bei 24-well Kulturplatte) bei 4°C beschichtet. Die Antikörperlösung wurde abpipettiert, das well mit 200µl (bei 96-well Kulturplatte) bzw. 1000µl (bei 24-well Kulturplatte) PBS gefüllt und wieder abpipettiert. Die Zellsuspension wurde mit anti-Maus CD28 Antikörpern in einer Konzentration von 2µg/ml versehen und dann ausplattiert. Je nach Versuch wurde dann das jeweilige Zytokin in entsprechender Konzentration hinzugefügt. Jede Zytokinkombination wurde zweifach angelegt und zur Auswertung vermischt um statistische Fehler gering zu halten. Die Zellen wurden über 96 Stunden bei 37°C kultiviert, dann abgenommen und entweder zur FACS Analyse vorbereitet, oder für ELISA Messungen erneut restimuliert.

2.4. Restimulation für ELISA Messungen

Die Zellen wurden nach primär viertägiger Zellkultivierung und Kostimulation unter sterilen Bedingungen in 2ml Reaktionsgefässe überführt und abzentrifugiert (5min bei 2500U/min, 4°C; Centrifuge 5417R, Eppendorf, Deutschland). Der Überstand wurde abpipettiert, die Zellen in 1ml Zellkulturmedium aufgenommen und mittels einer Neuenbauer Zählkammer ausgezählt. Dann wurden die Zellen noch zwei Mal gewaschen. Hierzu wurden die Zellen abzentrifugiert (5min bei 2500U/min, 4°C; Centrifuge 5417R, Eppendorf, Deutschland), der Überstand dekantiert, erneut 1ml Kulturmedium hinzugegeben und zentrifugiert. Der Vorgang wurde wiederholt. Die Zellen wurden erneut in einer Konzentration von 2*10⁶ Zellen pro ml auf vorher mit Antikörpern $(2\mu g/ml)$ beschichteten Zellkulturplatten anti-Maus CD3e ausplattiert und mit anti-Maus CD28 Antikörpern (2µg/ml) versehen. Nach 48 Stunden wurden die Zellen in 2ml Reaktionsgefässe überführt und abzentrifugiert (5min bei 2500U/min, 4°C; Centrifuge 5417R, Eppendorf, Deutschland). Die Überstände wurden in Stickstoff eingefroren und später weiterverarbeitet, die Zellen wurden verworfen.

2.5. Zellkultivierung und in vitro Stimulation für Proliferationsanalyse

Sämtliche Schritte wurden unter sterilen Bedingungen mit steril filtrierten Medien durchgeführt. Die Stimulation in diesen Versuchen erfolgte durch

akzessorische Zellen (AC) in Kombination mit 3µg/ml anti-CD3 Antikörper. Hierzu wurden CD3⁻ Milzzellen aus einer anderen Mauslinie (B6) isoliert und bestrahlt (20Gray), und in einer Konzentration von 2*10⁶ Zellen pro ml in Zellkulturmedium aufgenommen. CD4⁺CD25⁻ Milzzellen, der zu untersuchenden Mauslinie (FVB), wurden mit CFSE gefärbt und in einer Konzentration von 2*10⁶ Zellen pro ml in Zellkulturmedium aufgenommen. Die Zellen wurden in 96-well Zellkulturplatten kultiviert und stimuliert. Dabei wurden pro well 90µl der CFSE gefärbten CD4⁺CD25 Milzzellen (FVB/N) mit 10µl der bestrahlten CD3⁻ Milzzellen einer anderen Mauslinie (C57/B6) und 100µl Kulturmedium kombiniert. Hinzugegeben wurden die entsprechenden Zytokine in einer Konzentration von 10ng/ml, sowie 3µg/ml anti-CD3 Antikörper. Nach vier Tagen Kultivierung wurde die Proliferation der CD4⁺CD25⁻ Zellen analysiert. Um statistische Fehler gering zu halten. wurde iede Zytokinkombination mindestens dreifach angelegt und zur Auswertung vermischt.

2.6. FACS

Für Foxp3 Färbungen wurden die Zellen nach 96 stündiger Kultivierung direkt in 1,5ml Reaktionsgefässe überführt und gefärbt. Intrazelluläre Zytokinfärbungen wurden erst nach Restimulation durchgeführt. CFSE-Färbungen wurden vor Kultivierung der Zellen durchgeführt.

2.6.1. Zellrestimulation für intrazelluläre Zytokinfärbung

Die Zellen wurden aus den Kulturplatten in 1,5ml Reaktionsgefässe überführt und abzentrifugiert (5min bei 2500U/min, 4°C; Centrifuge 5417R, Eppendorf, Deutschland). Der Überstand wurde abpipettiert und die Zellen mit 1ml Zellkultumedium versetzt, danach wurde wieder zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde zwei Mal wiederholt, um Zellprodukte auszuwaschen. Schliesslich wurden die Zellen erneut in einer Konzentration von 2*10⁶ pro ml Zellkulturmedium aufgenommen und in neue, nicht mit anti-CD3 Antikörpern bekleideten Zellkultuplatten, ausplattiert. Restimuliert wurde mit Ionomycin (1000ng/ml) und PMA (50ng/ml) über fünf Stunden. Für die letzten 4,5 Stunden wurde zusätzlich 1µl/ml GolgiPlug[™] hinzugegeben. Dann wurden die Zellen in 1,5ml Reaktionsgefässe überführt.

2.6.2. Extrazelluläre Färbung für FACS Analysen

Die Zellen wurden abzentrifugiert (5min bei 2500U/min, 4°C; Centrifuge 5417R, Eppendorf, Deutschland), der Überstand abpipettiert und die Zellen in 100µl PBS aufgenommen. Zusätzlich wurde 1µl des Oberflächenantikörpers beigegeben und für 15 min bei 4°C in Dunkelheit inkubiert. Dann wurde 1ml PBS hinzugefügt, die Zellen erneut abzentrifugiert (5min bei 2500U/min, 4°C; Centrifuge 5417R, Eppendorf, Deutschland), der Überstand abpipettiert und die Zellen in 1000µl PBS aufgenommen und erneut abzentrifugiert (5min bei 2500U/min, 4°C; Centrifuge 5417R, Eppendorf, Deutschland). Der Überstand würde abgenommen und die Zellen fixiert und permeabilisiert.

2.6.3. Fixation, Permeabilisation und Foxp3 Färbung

Die sich in den 1,5ml Reaktionsgefässen befindlichen Zellen wurden 20min mit 100µl Cytofix/Cytoperm[™] bei 4°C in Dunkelheit fixiert und permeabilisert. Danach wurde das Cytofix/Cytoperm[™] zwei Mal Perm/Wash[™] ausgewaschen. Hierzu wurde 1ml Perm/Wash[™] in jedes Gefäss gegeben und zentrifugiert (5min bei 2500U/min, 4°C; Centrifuge 5417R, Eppendorf, Deutschland). Der Überstand wurde abpipettiert und erneut Perm/Wash[™] in jedes Gefäss gegeben, zentrifugiert (5min bei 2500U/min, 4°C; Centrifuge 5417R, Eppendorf, Deutschland) und der Überstand abgenommen. Gefärbt wurde in 20µl Perm/Wash[™] mit 1µl APC anti-Maus/Ratte Foxp3 für 12 Stunden. Dann wurde wie nach der Fixation und Permeabilisation zwei Mal der Antikörper ausgewaschen und die Zellen zur FACS Analyse in 400µl PBS aufgenommen.

2.6.4. Fixation, Permeabilisation und intrazelluläre Zytokinfärbung

Die sich in den 1,5ml Reaktionsgefässen befindlichen Zellen wurden 20min mit 500µl Fixationslösung bei 4°C in Dunkelheit fixiert. Dann wurde zwei Mal die Fixationslösung ausgewaschen. Hierzu wurde 1ml PBS in jedes Gefäss gegeben und zentrifugiert (5min bei 2500U/min, 4°C; Centrifuge 5417R, Eppendorf, Deutschland). Der Überstand wurde abpipettiert und erneut PBS in jedes Gefäss gegeben, zentrifugiert (5min bei 2500U/min, 4°C; Centrifuge Eppendorf. Deutschland) und der Überstand abgenommen. 5417R. Permeabilisiert und gefärbt wurde in 20µl Saponin Puffer mit 1µl des jeweiligen Antikörpers über 15 min bei 4°C. Dann wurde, wie nach der Fixation, zwei Mal der Antikörper ausgewaschen und die Zellen zur FACS Analyse in 400µl PBS aufgenommen.

2.6.5. CFSE Färbung

Diese Färbung wurde vor Kultivierung der Zellen durchgeführt. Der Farbstoff wird von den Zellen aufgenommen und bei Zellteilung in die jeweilgen Tochterzellen aufgeteilt. So nimmt mit jedem Proliferationschritt die Intensität der Fluoreszenz in der Zelle ab und eine Zellteilung kann nachgewiesen werden.

Die Zellen wurden hierzu nach der Isolation in einer Konzentration von 10*10⁶ Zellen pro ml in PBS in einem 15ml Reaktionsgefäss aufgenommen. Dann wurde 4µl CFSE Gemisch (100µl CFSE (1mM in DMSA) und 100µl PBS) hinzugegeben, resuspendiert und über 6min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Färbevorgang wurde mit der Zugabe von FBS im gleichen Volumenverhältnis zu PBS gestoppt. Dann wurde das Reaktionsgefäss mit Zellkulturmedium aufgefüllt, zentrifugiert (1500U/min, 5min; C4-22, Jouan, Frankreich) und der Überstand dekantiert. Dieser Vorgang wurde zwei Mal wiederholt, und dann die Zellen zur Kultivierung in gewünschter Konzentration in Zellkulturmedium aufgenommen. Nach Kultivierung wurden die Zellen in 1,5ml Reaktionsgefässe überführt. Die sich in den 1,5ml Reaktionsgefässen befindlichen Zellen wurden 20 min mit 500µl Fixationslösung bei 4°C in Dunkelheit fixiert. Dann wurde die Fixationslösung zwei Mal ausgewaschen. Hierzu wurde 1ml PBS in jedes Gefäss gegeben und zentrifugiert (5min bei 2500U/min, 4°C; Centrifuge 5417R, Eppendorf, Deutschland). Der Überstand wurde abpipettiert und erneut PBS in jedes Gefäss gegeben, zentrifugiert (5min bei 2500U/min, 4°C; Centrifuge 5417R, Eppendorf, Deutschland) und der Überstand abgenommen. Schliesslich wurden die Zellen zur FACS Analyse in 400µl PBS resuspendiert.

2.6.6. Zellanalyse mittels FACS

Gefärbte und fixierte Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie (FACS Canto[™]; BD Biosciences, USA) analysiert. Die Bearbeitung erfolgte mit BD FACSDiva Software 5.0.1 (BD Biosciences, USA). Hierbei wurden die zum Zeitpunkt der Kulturabnahme noch lebende Zellpopulation optimal im Vorwärts-Seitwärtsstreulicht eingestellt. Es wurden zur gualitativen sowie bzw. quantitativen Analyse dieser Population mindestens 10000 Zellen aufgezeichnet. Zur optimalen Einstellung des FACS Gerätes wurden ungefärbte Proben, sowie Isotypkontrollen mit dem jeweiligen floureszierenden Zusatz verwendet.

2.7. Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Aus murinen T-Zellen wurde RNS isoliert. Hierzu wurde das RNS Isolations Kit "NucleoSpin® RNA/Protein" (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG) verwendet und die Isolation erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

Die isolierte RNS wurde mittels einer Reversen Transkriptase in cDNS umgeschrieben. Hierzu wurde das cDNS Synthese Kit "First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)" (Roche Diagnostics GmbH) verwendet und die Umschreibung erfolgte nach den Empfehlungen des Herstellers.

Die PCR wurde mit einer Taq Polymerase durchgeführt. Hierzu wurde das PCR Kit "Taq PCR Master Mix" (Qiagen) nach dem Protokoll des Herstellers verwendet. Zusätzlich wurde jeder Probe 3µl Kresolrot Gelladepuffer hinzugegeben. Die Proben wurden in "Multiply® -µStrip 0,2ml Kette" pipettiert.

Die Primersequenzen wurden mit Hilfe der Software "Amplify 1.2" und "DNA StriderTM 1.2" generiert. Die Nukleotidsequenzen der mRNS des jeweiligen zu untersuchenden Produktes wurden der Datenbank des NCBI (National Center for Biotechnology Information) entnommen und nach Empfehlung der Software die optimalen Primersequenzen ermittelt. Die Primer wurden von der Metabion GmbH synthetisiert. Zur Ermittlung der optimalen Annealingtemperatur des jeweiligen Primerpaares wurden PCRs mit Temperaturgradienten durchgeführt. Hierzu wurde cDNS aus RNS kompletter Milzlysate verwendet. Die Annealingtemperaturen des Temperaturgradienten lagen zwischen 52°C und 70°C. Bei der Temperatur, bei der ausschliesslich eine DNS Bande im vorher berechneten Bereich lag, wurden später die PCRs durchgeführt (Tabelle III-a). Die PCRs wurden nach folgendem Schema mit Hilfe eines Thermal Cyclers

durchgeführt:

• Erste Denaturierung bei 94°C über 3min

- Amplifikation in 35 Zyklen
 - Denaturierung bei 94°C über 30sec
 - Annealing bei Primerspezifischer Temperatur (Tabelle III-a) über 30sec
 - Elongation bei 72°C über 30sec
- Abschliessende Elongation bei 72°C über 5min
- Kühlung auf 4°C

Gen	NCBI	Ann	(bps)		Oligonukleotidsequenz	Pos. in
	Accession				5	der
	Nr					mRNS
	INI.					IIIKING
	NM 009612	63°C	190	fw	ccaaacteetteggaggageeag	588-611
	1111_000012	00 0	100	rev	tcanatoccttcangatgageoug	752-775
	NM 007394	56°C	182	fw	cttctctaagcatcaacgatgagaet	307-329
	1111_007.004	00 0	102	rev	qqaaqqacttccctttaqtqqqc	464-486
ALK3	NM 009758	63°C	229	fw	actatgateatettetecagetacttttac	902-931
/ 12/ 10		00 0		rev		1097-1128
ALK4	NM 007395	59°C	198	fw		155-177
, <u>L</u> . ()		00 0	100	rev	ctggggaccctgaggtcaatcttg	327-350
ALK5	NM 009370	63°C	171	fw	caactaaccttaatcctataaa	360-382
				rev	ccctctgaaatgaaagggcgat	507-528
ALK6	NM 007560	63°C	196	fw	actcctacccattctttatactcc	4766-4790
				rev	acctttccatccataaaccaadaad	4935-4959
ALK7	NM 0010333	56°C	222	fw		953-975
	69			rev	gacacacagetgggagatggtc	1151-1172
TGFBR2	NM 009371	63°C	200	fw	accatagctgtcatcatcatcttc	862-885
				rev	gatagacagcagctccatattatag	1035-1059
ACVR2A	NM 007396	60°C	201	fw	atagtctacctggaatgaagcatga	1323-1347
-			-	rev	tatgccaatcctctagccatggt	1499-1521
ACVR2B	NM 007397	69°C	233	fw	ggcctctcatacctgcatgaggatgtgccg	1006-1035
-				rev	ggctccttccagcacctcaggggccatgta	1207-1236
BMPR2	NM 007561	56°C	173	fw	tcactgcacagtgtgctgaggaga	1490-1514
	_			rev	agaggaataatctgggtaaggccc	1637-1660
AMHR2	NM_144547	56°C	208	fw	ctggcagccctggcttaccctcacggggcg	1555-1584
				rev	tactcatttacatacacctgaacagtgtcg	1731-1760
TGFB1	NM_011577	66°C	184	fw	atgccgccctcggggctgcggctac	866-892
				rev	ggcgagccttagtttggacaggat	1024-1047
INHBA	NM_008380	66°C	191	fw	cccgatgtcacccagccggtgccc	386-409
				rev	cttcctggctgtgcctgactcggc	551-574
GDF2	NM_019506	59°C	152	fw	tgccgtgaagcggtgggtcaggg	736-758
				rev	ttggagaagacaacaaagaaggg	863-885
GDF8	NM_010834	66°C	212	fw	gaggggctgtgtaatgcatgtgcg	212-235
				rev	gagccatcactgctgtcatccctc	397-421
GDF9	NM_008110	63°C	199	fw	gccttagctctcaggcttctactg	185-208
				rev	gtagagtgctctggagtcaggctgc	357-381
GDF11	NM_010272	63°C	237	fw	ccttcggcctgtgccccgcccagcca	576-601
				rev	ggcgttgatctcgattccccagttgc	785-810
FST	NM_008046	63°C	227	fw	gcagcaccggccggctgagcacc	311-333
				rev	ctgggcccttccaggtgatgttgg	512-535
FSTL1	NM_008047	69°C	215	fw	gccgtcacagagaagggggggggcccacg	219-245
				rev	gcagacaactgggctggcagatgg	408-431
FSTL2	NM_008048	69°C	174	fw	cccaggtcagcaagggcacctgcg	473-496
(IGFBP7)				rev	gtccgctgaactccagagtgatccc	620-644

FSTL3	NM_031380	70°C	220	fw rev	gctgggggggccgtccacactgcgagtgcg ccacaaggcacgactggggacgcgggc	336-364 527-553
FSTL4	NM_177059	69°C	223	fw rev	ggaggtgtgcaggccccgctacatgcc gtgggagcggctgtctgcggctctgg	454-480 649-674
FSTL5	NM_178673	63°C	199	fw rev	cgggcactccttatgtctctccagacgg gctgccatagatgttgtactggtgggc	2474-2501 2644-2670
TGERD2	NM 011578	63°C	210	fini		1166 1197
TGFBR3	NM_011378	03 C	219	rev	cgtcactgggctgtagccattgtcc	1358-1382
ENG (CD105)	NM_007932	63°C	155	fw rev	ggtggaactcatccagagccgaac cgcagagctaagttgcaactgaggg	1872-1895 2000-2024
FURIN	NM_011046	59°C	256	fw rev	gcggaagtgcattgttgaaatcc cccaatcattaaacccatcagcagag	1732-1754 1960-1985
ACTB	NM_007393	59°C	287	fw rev	tcatgaagtgtgacgttgacatcc cctagaagcatttgcggtgcacga	924-947 1185-1208

Tabelle III-aPrimer für RT-PCR

Ann = Annealing Temperatur des Primerpaares; (bps) = Anzahl der DNS-Basenpaare des PCR Produktes; fw = Primer forward; rev = Primer reverse; Pos. in der mRNS = Postion des Primers in der mRNS Seqeunz; ALK = activin receptor-like kinase; TGFBR2 = transforming growth factor, beta receptor II; ACVR2A = activin A receptor, type IIA; ACVR2B = activin A receptor, type IIB; BMPR2 = bone morphogenetic protein receptor, type II; AMHR2 = anti-Mullerian hormone receptor, type II; TGFBR3 = transforming growth factor, beta receptor III; ENG = Endoglin; TGFB1 = transforming growth factor, beta1; INHBA = Inhibin, beta A (= Activin A); BMP = bone morphogenic protein; GDF = growth differentiation factor; FST = Follistatin; FSTL = Follistatin-like; IGFBP7 = insulin-like growth factor binding protein 7; ACTB = actin, beta

Die DNS Fragmente wurden per Gelelektrophorese nach ihrer Grösse aufgetrennt. Hierzu wurden 1%ige Agarosegele mit 0,003% Ethidiumbromid, in TBE gelöst, verwendet. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 10V pro Zentimeter durchgeführt. Als Standard wurde "peqGOLD Leiter-Mix Orange G" verwendet. Ausgelesen wurden die Gele mit einem UV-Transilluminator (Gel Doc 2000, Bio-Rad Laboratories GmbH) und weiterverarbeitet mit "Quantity One 4.6.3".

2.8. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

ELISAs wurden mit Kits von R&D Systems entsprechend des Protokolls des Herstellers durchgeführt. Allerdings wurde als Substrat Lösung "TMB Plus READY-TO-USE" (Kem-En-Tec Diagnostics) verwendet. Die Proben wurden mit dem ELISA-Auslesegerät "Opsys MRX TC II" (Dynex Technologies GmbH) bei einer Wellenlänge von 450nm ausgelesen und weiterverarbeitet. Um Messungenauigkeiten des ELISAs auszugleichen wurden für jede Probe drei Bestimmungen durchgeführt.

2.9. Western Blotting

2.9.1. Auftrennung der Zellen in Zytoplasma und Nukleus

Hierzu wurden Zellen in 1,5ml Reaktionsgefässen mit 500µl Puffer A versehen und für 20min auf Eis inkubiert. Nach 20 Sekunden vortexen wurde die Suspension zentrifugiert (4000U/min bei 4°C, 3min). Der Überstand wurde als

zytoplasmatischer Extrakt in neue Reaktionsgefässe überführt und zur späteren Weiterverarbeitung in Stickstoff eingefroren. Zum Pellet wurde 100µl Puffer B hinzugegeben und bei 4°C über 20min in einem Rotator inkubiert. Zentrifugieren bei 14000U/min bei 4°C über 7min trennte den nukleären Extrakt von Zellresten. Der Überstand, der nukleäre Extrakt, wurde in neue Reaktionsgefässe überführt und zur späteren Weiterverarbeitung in Stickstoff eingefroren.

2.9.2. Elektrophoresegel

Trenn- und Sammelgel wurden durch Zugabe von APS und Temed zur Polymerisierung angeregt. Pro Gel wurde 5ml Trenngel mit 12,5µl APS und 6,25µl Temed, bzw. 2,5ml Sammelgel mit 10µl APS und 5µl Temed versehen und in entsprechender Reihenfolge zur Polymerisierung in die Glasform überführt.

2.9.3. Aufbereitung der Proben und Gelelektrophorese

Für semiquantitative Analysen wurde mit den Proben eine Proteinbestimmung durchgeführt. Hierzu wurde das BCA-Protein-Assay-Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) entsprechend der Empfehlung des Herstellers verwendet. Die Proben wurden dann entsprechend ihrer Proteinkonzentration verdünnt, so dass in allen Proben vergleichbar viel Protein vorhanden war. 80µl einer Proteinprobe wurde in einem 1,5ml Reaktionsgefäss mit 20µl Lämmlipuffer 5x versehen, resuspendiert und bei 95°C über 5 Minuten erhitzt. Danach wurde die Probe bis zum Auftragen auf das Gel auf Eis gehalten. Die Elektrophoresekammer wurde mit Laufpuffer gefüllt und die Gele eingespannt. Pro Gelline wurden 20µl der Probe eingesetzt. Die Elektrophorese wurde primär, bis zum Beginn der Probenauftrennung im Trenngel, bei 100V, die restliche Elektrophorese wurde bei 160V durchgeführt.

2.9.4. Überführung der Proteine auf Nitrozellulosemembranen

Dieser Vorgang wurde ebenfalls in einer Elektrophoresekammer durchgeführt, allerdings mit Blotpuffer und auf Eis. Es wurde hierbei ein Strom von 300mA über einen Zeitraum von 60 Minuten angelegt. Nach diesem Vorgang wurde die Nitrozellulose für 15 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet, dann beschriftet und die Marker des aufgetragenen Standards nachgezogen.

2.9.5. Nachweis von FSTL3

Die Nitrozellulosemembranen wurden über einen Zeitraum von einer Stunde bei Raumtemperatur in Blockpuffer geblockt. Die Inkubation erfolgte über 12 Stunden bei 4°C in 5ml Blockpuffer in einem 50ml Reaktionsgefäss mit der vom Hersteller empfohlenen Konzentration des Antikörpers (FSTL3 0,2µg/ml). Danach wurden überschüssige Antikörper ausgewaschen. Hierzu wurde nach Dekantierung des Blockpuffer-Antikörper Gemisches, das Reaktionsgefäss mit TBS/T gefüllt, über 5min inkubiert und das TBS/T dekantiert. Dieser Vorgang wurde drei Mal durchgeführt. Die Inkubation der Nitrozellulosemembranen mit dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper wurde bei Raumtemperatur über eine Stunde in 5ml Blockpuffer in einem 50ml Reaktionsgefäss mit der vom Hersteller empfohlenen Konzentration (HRP Anti-Ziege Ig) durchgeführt. Danach wurden ebenfalls, wie bereits beschrieben, überschüssige Antikörper ausgewaschen.

2.9.6. Stripping der Nitrozellulosemembranen

Nach Detektion eines Proteins wurden die Nitrozellulosemembranen mit TBS/T wurden die Nitrozellulosemembranen gewaschen. Hierzu in 50ml Reaktionsgefässe gegeben, das Reaktionsgefäss mit TBS/T gefüllt, über 5min inkubiert, und TBS/T dekantiert. Danach wurden die Nitrozellulosemembranen unter Bewegung über 10min bei 70°C in Stripping Lösung inkubiert. Bei diesem Vorgang werden die noch anheftenden Antikörper von der Membran gelöst (stripping = engl. die Ablösung). Nach diesem Vorgang vier Mal mit TBS/T gewaschen (Kapitel III.2.9.5). Vor Inkubation mit einem neuen Antikörper wurden die Nitrozellulosemembranen über einen Zeitraum von 30min bei Raumtemperatur in Blockpuffer geblockt.

2.9.7. Nachweis von Actin

Actin wurde als Haushaltsgen bestimmt. Zur Detekion von Actin wurde ein HRP-gekoppelter Primärantikörper verwendet. Die Inkubation mit dem Antikörper erfolgte über zwei Stunden bei Raumtemperatur in 5ml Blockpuffer in einem 50ml Reaktionsgefäss mit der vom Hersteller empfohlenen Konzentration des Antikörpers (5µl auf 5ml Blockpuffer).

2.9.8. Proteindetektion

Zur Detektion, der mit Antikörper versehenen Proteinen, wurde die Nitrozellulosemembranen drei Mal mit TBS/T gewaschen. Hierzu wurden die Membranen in 50ml Reaktionsgefässe gegeben, das Reaktionsgefäss mit TBS/T gefüllt, über 5min inkubiert und das TBS/T dekantiert. Danach wurden die Nitrozellulosemembranen mit 3ml Roti®-Lumin Gemisch (Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland) über 5 Minuten inkubiert und in der Dunkelkammer mit Hilfe eine Fotofilmes (Amersham Hyperfilm[™], GE Healthcare Limited, UK) und einer Entwicklungsmaschine (Kodak X-OMAT 5000RA, Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA) die Lichtemission dokumentiert.

2.10. Statistische Analysen

Für Vergleiche zweier Gruppen wurde bei stetigen Daten der zweiseitige Wilcoxon-Test und bei kategorialen Daten der χ 2-Unabhängigkeits-Test der Software SPSS (Chicago, USA) verwendet. Das Signifikanzniveau α wurde bei 0,05 festgelegt.

IV. Ergebnisse

1. Semiquantitative Expressionsanalyse von Rezeptoren und Zytokinen

Diese Experimente wurden als Voruntersuchung durchgeführt, um zu klären, ob unterschiedliche Expressionsmuster von Rezeptoren, Zytokinen und anderen Proteinen zwischen Foxp3⁺ T_{reg} Zellen und undifferenzierten Foxp3⁻ T-Zellen bestehen. Hierzu wurde primär die RNS-Expression analysiert. In einem zweiten Schritt sollten mögliche Unterschiede mittels anderer Methoden belegt werden um dann die funktionelle Relevanz zu untersuchen.

Bei diesen Analysen wurde ein Vergleich zwischen CD4⁺CD25⁺ und CD4⁺CD25⁻ T-Zellen durchgeführt. CD4⁺CD25⁺ Zellen wurden stellvertretend für Foxp3⁺ T_{reg} Zellen und CD4⁺CD25⁻ Zellen stellvertretend für Foxp3⁻ Zellen verwendet. Die CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ Zellpopulation enthält zu einem grossen Anteil undifferenzierte Zellen und keine T_{reg} Zellen.

1.1. RNS-Expressionsanalyse von Rezeptoren und Zytokinen

Bei diesen Analysen wurde mit Hilfe von Reverser Polymerasekettenreaktion ein semiquantitativer Vergleich zwischen CD4⁺CD25⁺ und CD4⁺CD25⁻ T-Zellen durchgeführt.

Die Zellen wurden aus Milzen von FVB/N Wildtyp Mäusen isoliert und daraus RNS gewonnen. Diese wurde in cDNS umgeschrieben und zur Durchführung der PCRs verwendet. Es wurde bei jeder DNS-Auftrennung im Agarosegel ein Standard zu Orientierung der DNS-Fragmentgrösse verwendet. Die gezeigten Banden lagen im Bereich der zuvor errechneten Fragmentgrösse (Tabelle III-a). Als Haushaltsgen wurde immer Actin (ACTB) verwendet.

1.1.1. Typ I Rezeptoren

Die Analyse der Typ I Rezeptoren zeigte eine reproduzierbar verminderte RNS-Expression von ALK4 bei CD4⁺CD25⁺ im Vergleich zu CD4⁺CD25⁻ Zellen. Jedoch konnten zwischen diesen Zellpopulationen keine reproduzierbaren RNS-Expressionsunterschiede von ALK1, ALK2, ALK3, ALK5, ALK6 und ALK7 festgestellt werden (Abbildung IV-a).





Semiquantitative RT-PCRs aus Milzzelllysaten; repräsentative Ergebnisse aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten. (bps) = Anzahl der Basenpaare - Lage der DNS-Bande auf dem Agarosegel; ALK = activin receptor-like kinase; Actin = actin, beta

1.1.2. Typ II Rezeptoren

Die Analyse der Typ II Rezeptoren zeigte eine reproduzierbar leicht erhöhte Expression von BMPR2 bei CD4⁺CD25⁺ verglichen mit CD4⁺CD25⁻ Zellen. AMHR2 zeigte eine reproduzierbar verminderte RNS-Expression bei CD4⁺CD25⁺ im Vergleich zu CD4⁺CD25⁻ Zellen. Jedoch konnten zwischen diesen Zellpopulationen keine reproduzierbaren RNS-Expressionsunterschiede von TGFBR2, ACVR2A und ACVR2B festgestellt werden (Abbildung IV-b).





Semiquantitative RT-PCRs aus Milzzelllysaten; repräsentative Ergebnisse aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten. (bps) = Anzahl der Basenpaare - Lage der DNS-Bande auf dem Agarosegel; TGFBR2 = transforming growth factor beta receptor II; ACVR2A = activin A receptor, type IIA; ACVR2B = activin A receptor, type IIB; BMPR2 = bone morphogenetic protein receptor, type II; AMHR2 = anti-Mullerian hormone receptor, type II; Actin = actin, beta

1.1.3. Co-Rezeptoren, Furin-Konvertase

Die Analyse von TGFBR3 ergab eine reproduzierbar verminderte RNS-Expression bei CD4⁺CD25⁺ im Vergleich zu CD4⁺CD25⁻ Zellen. FURIN zeigte eine reproduzierbar geringere RNS-Expression bei CD4⁺CD25⁺ als bei CD4⁺CD25⁻ Zellen. Jedoch konnte zwischen diesen Zellpopulationen kein reproduzierbarer RNS-Expressionsunterschied von ENG festgestellt werden (Abbildung IV-c).



Abbildung IV-c RT-PCR Co-Rezeptoren, Furin-Konvertase

Semiquantitative RT-PCRs aus Milzzelllysaten; repräsentative Ergebnisse aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten. (bps) = Anzahl der Basenpaare - Lage der DNS-Bande auf dem Agarosegel; TGFBR3 = transforming growth factor beta receptor III; ENG = Endoglin; FURIN = Furin-Konvertase; Actin = actin, beta

1.1.4. Zytokine

Die Analyse einer Auswahl an Zytokinen der TGF-β Familie ergab eine tendenziell verminderte RNS-Expression von GDF9 und GDF11 bei CD4⁺CD25⁺ im Vergleich zu CD4⁺CD25⁻ Zellen. Jedoch konnten zwischen diesen Zellpopulationen keine reproduzierbaren RNS-Expressionsunterschiede von TGFB1, INHBA, GDF2 und GDF8 festgestellt werden (Abbildung IV-d).





Semiquantitative RT-PCRs aus Milzzelllysaten; repräsentative Ergebnisse aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten. (bps) = Anzahl der Basenpaare - Lage der DNS-Bande auf dem Agarosegel; TGFB1 = transforming growth factor, beta1; INHBA = Inhibin, beta A (= Activin A); GDF = growth differentiation factor; Actin = actin, beta

1.1.5. Follistatine

Die Anaylse der Follistatine zeigte eine reproduzierbare deutlich erhöhte RNS-Expression von FSTL2, FSTL3 und FSTL4 bei CD4⁺CD25⁺ verglichen mit CD4⁺CD25⁻ Zellen. Jedoch konnten zwischen diesen Zellpopulationen keine reproduzierbaren RNS-Expressionsunterschiede von FST, FSTL1 und FSTL5 festgestellt werden (Abbildung IV-e).



Abbildung IV-e RT-PCR Follistatine

Semiquantitative RT-PCRs aus Milzzelllysaten; repräsentative Ergebnisse aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten. (bps) = Anzahl der Basenpaare - Lage der DNS-Bande auf dem Agarosegel; FST = Follistatin; FSTL = Follistatin-like; IGFBP7 = insulin-like growth factor binding protein 7; Actin = actin, beta

1.2. Protein-Expressionsanalyse FSTL3

Auf Grund der unterschiedlichen RNS-Expression von FSTL3 zwischen CD4⁺CD25⁺ und CD4⁺CD25⁻ Zellen wurde das Expressionsmuster von FSTL3 auf Proteinebene mittels Western Blotting analysiert. Hierzu wurden CD4⁺CD25⁺ und CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus Milzen von FVB/N Wildtypmäusen isoliert und dann in Kultur mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern kostimuliert. Direkt nach der Isolation (also nicht kostimuliert), bzw. nach einem und drei Tagen wurden die Zellen in Nuklei und Zytoplasma aufgetrennt und die Proteine extrahiert. Zellkulturüberstände wurden ebenfalls am ersten und drittten Tag nach Kostimulation entnommen.

Zusätzlich wurde als Kontrolle rekombinantes FSTL3 (R&D Systems, Deutschland) aufbereitet. FSTL3 hat eine kalkulierte Molekularmasse von 26kDa, jedoch bildet rekombinantes FSTL3 laut Hersteller auf Grund von zusätzlicher Glykosylierung ein Fragment bei etwa 38kDa. Da FSTL3 im Nucleus in einem weniger glykosyliertem Zustand vorliegt (Saito et al. 2005), wurde weiterhin eine deglykosylierte Form von FSTL3 verwendet. Hierzu wurde rekombinantes FSTL3 mittels einer N-Glycanase (ProZyme, Inc., USA) über 24 Stunden deglycosyliert. Dieses Produkt sollte eine Molekularmasse von 26kDa (R&D Systems) bzw. 27kDa (Hayette et al. 1998) haben.

1.2.1. Zellkern

Aus den Kernextrakten der Zellisolate konnte mit einem FSTL3 Antikörper sowohl bei CD4⁺CD25⁺ als auch bei CD4⁺CD25⁻ Zellen reproduzierbar eine Doppelbande bei etwa 30 bzw. 32kDa nachgewiesen werden. Diese waren sowohl bei stimulierten als auch bei unstimulierten Zellen zu sehen. Bei CD4⁺CD25⁺ Zellen konnte nach Stimulation zusätzlich ein Protein mit der Masse von etwa 24kDa nachgewiesen werden. Diese waren bei CD4⁺CD25⁻ Zellen jedoch nicht zu sehen. Keine der Banden der Zellkernextrakte zeigte die gleiche Masse von FSTL3 (R&D Systems, Deutschland), bzw. Ndeglycosyliertem FSTL3 (Abbildung IV-f). Die unterschiedliche Intensität der in der Abbildung dargestellten Actinbanden spricht für unterschiedlich aufgetragene Proteinkonzentrationen. Obwohl die Actinbanden am ersten und dritten Tag der Kultivierung bei den CD4⁺CD25⁻ Zellen intensiver sind, als bei den CD4⁺CD25⁺ Zellen, ist bei diesen keine Bande mit FSTL3 Antikörper bei 24kDa zu sehen. Es handelt sich also um ein spezifisch bei CD4⁺CD25⁺ nachweisbares Protein.



Abbildung IV-f FSTL3 Proteinexpression im Zellkern

repräsentative Ergebnisse aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten. FSTL3 = Follistatin-like 3; rmFSTL3 = rekombinantes murines Follistatin-like 3; N-deglyc. = FSTL3 nach N-Deglycosylierung; Actin = actin, beta; S = Standard; kDa = kilo Dalton

1.2.2. Zytoplasma

Es konnte weder bei CD4⁺CD25⁺ noch bei CD4⁺CD25⁻ Zellen FSTL3 im Zytoplasma nachgewiesen werden (Abbildung IV-g).



Abbildung IV-g FSTL3 Proteinexpression im Zytoplasma

repräsentative Ergebnisse aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten. FSTL3 = Follistatin-like 3; rmFSTL3 = rekombinantes murines Follistatin-like 3; N-deglyc. = FSTL3 nach N-Deglycosylierung; Actin = actin, beta; S = Standard; kDa = kilo Dalton

1.2.3. Kulturüberstände

Es konnte weder bei CD4⁺CD25⁺ noch bei CD4⁺CD25⁻ Zellen FSTL3 im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden (Abbildung IV-h).



Abbildung IV-h FSTL3 in Zellkulturüberständen

repräsentative Ergebnisse aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten. FSTL3 = Follistatin-like 3; rmFSTL3 = rekombinantes murines Follistatin-like 3; N-deglyc. = FSTL3 nach N-Deglycosylierung; Actin = actin, beta; S = Standard; kDa = kilo Dalton

1.2.4. Posttranslationale Modifikation von FSTL3

Der Nachweis eines Proteins im Zellkern CD4⁺CD25⁺ Zellen mitttels FSTL3 Antikörper mit einer geringeren Molekularmasse als N-deglycosyliertes FSTL3 lässt an weitere postranslationale Modifikationen dieses Proteins denken. So ist denkbar, dass im Zellkern ein vollständig unmodifiziertes Protein vorliegt, während das N-deglycosylierte FSTL3 noch andere posttranslationale Modifikationen trägt und somit eine grössere Molekularmasse besitzt. Hierbei sind insbesondere auch O-Glycosylierungen relevant. Aus diesem Grund wurde die Möglichkeit einer weiteren posttranslationalen Modifikation von FSTL3 untersucht.

Die Technische Universität, Dänemark (http://www.cbs.dtu.dk/cbs) bietet Programme zur Berechnung der Bindungsstellen für die posttranslationale Modifikation von Proteinen. Mit Hilfe dieser Programme kann die Wahrscheinlichkeit berechnet werden. welcher Stelle einer an Aminosäureseguenz es zur Bindung von Zuckern kommt. Eine Analyse der Bindungstellen Aminosäureseguenz von FSTL3 ergab zwei für N-Glycosylierung (Abbildung IV-i) und viele eher weniger wahrscheinliche Bindungsstellen für O-Glykosylierungen an (Abbildung IV-j).



NetNGlyc 1.0: predicted N-glycosylation sites in FSTL3





NetOGlyc 3.1: predicted O-glycosylation sites in FSTL3

Abbildung IV-j O-Glykosylierungsbindungsstellen von FSTL3 NetNGlyc 3.1 Server der Technischen Universität, Dänemark zeigt mehrere potentielle, sich aber unter dem Schwellenwert befindliche Bindungsstellen für O-Glykosylierung. O-glycosylation potential = Potenzial für O-Glykosylierung; sequence position = Position der errechneten Glykosylierungsstelle; Threshold = Schwellenwert des Potentiales

2. Funktionelle Analyse von GDF2, 8, 9 und 11, FST, FSTL3, INHBA und TGF- β 1

In den folgenden Experimenten sollte die Wirkung einiger der zuvor analysierten Zytokine auf die Differenzierung naïver T-Zellen untersucht werden. Die Auswahl der analysierten Zytokine begründet sich mit deren bereits in der Literatur beschriebenen Eigenschaften sowie den Ergebnissen aus Kapitel IV.1. So wurde gezeigt, dass TGF-B1 sowohl antiproliferativ wirkt, als auch bei der Differenzierung von T-Zellen wichtig ist. INHBA hat bereits beschriebene Rollen im Rahmen von Entzündungsvorgängen und ist ein Ligand des bei CD4⁺CD25⁺ im Vergleich zu CD4⁺CD25⁻ T-Zellen vermindert exprimierten Typ I Rezeptors ALK4 (Kapitel IV.1.1.1). GDF8, GDF9 und GDF11 sind, neben den TGF-ß Isoformen, die einzig beschriebenen Liganden des Typ I Rezeptors ALK5 und führen somit zur Phosphorylierung von Smad2 und 3. Sie lassen aus diesem Grund eine TGF-ß ähnliche intrazelluläre Signalaktivierung vermuten. Außerdem liegt eine verminderte RNS-Expression von GDF9 und GDF11 bei CD4⁺CD25⁺ im Vergleich zu CD4⁺CD25⁻ Zellen vor (Kapitel IV.1.1.4). GDF2 ist ein Ligand des Typ I Rezeptors ALK1, welcher neben ALK5 handelt es sich auf Grund der ALK1 Bindung und somit der Smad1, 5 und 8 Phosphorylierung um einem andern TGF-β1 Signalweg. FST und auch FSTL3 sind funktionelle Antagonisten einiger TGF-ß Familienmitglieder; insbesondere von INHBA, GDF8 und GDF11. Des Weiteren werden einige Follistatine, insbesondere auch FSTL3 vermehrt bei CD4⁺CD25⁺ im Vergleich zu CD4⁺CD25⁻ Zellen exprimiert (Kapitel IV.1.1.5).

2.1. Proliferationanalyse

In diesem Experiment wurde die Wirkung von GDF2, 8, 9, und 11, Follistatin, Follistatin-like 3, INHBA und TGF-β1 auf die Proliferation von CD4⁺CD25⁻ Zellen analysiert. Hierzu wurden CFSE gefärbte CD4⁺CD25⁻ Zellen aus Milzen von FVB/N Wildtyp Mäusen isoliert und allogen mit bestrahlten (25 Gray) CD3⁻ Zellen aus Milzen von C57/B6 Wildtyp Mäusen im Verhältnis 10:1 und 3µg/ml anti-CD3 Antikörper für vier Tage stimuliert. Zusätzlich wurden die jeweiligen Proteine in einer Konzentration von 10ng/ml, bzw. PBS im gleichen Volumen als Kontrolle, appliziert. CFSE verteilt sich intrazellulär und kann mittels FACS im FITC Kanal ausgelesen werden. Mit jeder Zellteilung halbiert sich die CFSE Konzentration in den jeweiligen Zellen und es kommt zu einer geringeren Intensität der Färbung. Diese Methode lässt eine optische Darstellung der Zellproliferation zu. Zellen mit der höchsten Intensität haben sich nach vier Tagen Kultivierung nicht geteilt. Je höher der Anteil dieser Zellen ist, desto geringer ist die Proliferation.

Es konnte nur bei TGF-β1 eine Auswirkung auf die Zellproliferation nachgewiesen werden. Ausschliesslich dieses Zytokin führte bei jedem Versuch

zu einer (wenn auch nicht signifikanten) geringeren Proliferation der Zellen im Vergleich zur Kontrolle mit PBS. GDF2, GDF8, GDF9 und GDF11 sowie FST, FSTL3 und INHBA zeigten keinen reproduzierbaren Einfluss auf die Proliferation CD4⁺CD25⁻ T-Zellen (Abbildung IV-k, Abbildung IV-I).







Abbildung IV-I Zellproliferation unter Zusatz verschiedener TGF-β Familienmitglieder (b) Repräsentative Ergebnisse aus vier (GDF2, GDF8, GDF9, GDF11, FSTL3) bzw. drei (FST, INHBA, TGFβ1) unabhängigen Experimenten. Angegeben ist der prozentuale Anteil nicht proliferierter Zellen der ausgezählten Gesamtpopulation. Counts = Gezählte Ereignisse im Bereich der zum Zeitpunkt der Zellkulturabnahme noch lebenden Zellen

2.2. Zelldifferenzierungsanalyse

In diesen Experimenten wurde die Wirkung von GDF2, 8, 9 und 11, Follistatin, Follistatin-like 3, INHBA und TGF- β 1 auf die Zelldifferenzierung von CD4⁺CD25⁻ T-Zellen analysiert. Hierbei sollte die Frage beantwortet werden, ob neben TGF- β 1 auch andere Zytokine der TGF- β Familie oder Follistatine die Entstehung von T_{reg} oder T_H17 Zellen induzieren oder inhibieren.

2.2.1. Zelldifferenzierung in T_{reg} Zellen

Zytokine wurden auf eine mögliche Bedeutung bei der Entstehung von T_{reg} Zellen analysiert. Hierzu wurden CD4⁺CD25⁻ Zellen über vier Tage mit anti-CD3 Antikörper (2µg/ml) und anti-CD28 Antikörper (2µg/ml) kostimuliert. Zusätzlich wurden die jeweiligen Proteine in einer Konzentration von 10ng/ml (ausgenommen TGF- β 1, welches gegen die restlichen Proteine in einer Konzentration von 0ng/ml, 0,1ng/ml, und 2,0ng/ml austitriert wurde), bzw. PBS im gleichen Volumen als Kontrolle, appliziert. Am letzten Tag der Zellkultivierung wurden die Zellen mittels FACS auf Foxp3 Expression untersucht.

Denkbar wäre eine Foxp3 Induktion allein durch die Applikation der Zytokine; sowie die Verstärkung der Foxp3 Induktion von TGF-β1 durch ein weiteres Zytokin, aber auch die Inhibition der TGF-β1 vermittelten Foxp3 Induktion durch eines der Zytokine. Aus diesem Grund wurden die Zytokine mit unterschiedlichen TGF-β1 Konzentrationen kombiniert.

TGF- β 1 differenziert CD4⁺CD25⁻ T-Zellen zu Foxp3⁺ T_{reg} Zellen. Die Addition von INHBA (Activin A) zu TGF- β 1 (in einer Konzentration von 2ng/ml) führte reproduzierbar zu einer erhöhten (wenn auch nicht signifikanten) Differenzierung in Foxp3⁺ T_{reg} Zellen. Unter Zugabe von GDF11 konnten in einzelnen Versuchen eine erhöhte Foxp3-Expression nachgewiesen werden, die jedoch nicht zuverlässig reproduzierbar war. GDF2, GDF8 und GDF9, FST und FSTL3 zeigten keine reproduzierbare Wirkung bezüglich der Foxp3 Expression (Abbildung IV-m).



Repräsentative Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten. Angegeben sind der prozentuale Anteil Foxp3⁺ Zellen der ausgezählten Gesamtpopulation nach vier Tagen Zellkultivierung unter Kostimluation und Zugabe des jeweiligen Zytokines. Die gezeigten Zellen waren CD4⁺. Counts = Gezählte Ereignisse im Bereich der lebenden Zellen

2.2.2. Zelldifferenzierung in T_H17 Zellen

Die Rolle der Zytokine bei der Entstehung von T_H17 Zellen wurde analysiert. Hierbei wurden die Zellen zum Einen mittels intrazellulären IL-17 Färbungen (FACS) untersucht und zum Anderen wurden Zellkulturüberstände mit Hilfe von ELISA analysiert. Primär wurden CD4⁺CD25⁻ Zellen über vier Tage mit anti-CD3 Antikörper (2µg/ml) und anti-CD28 Antikörper (2µg/ml) kostimuliert. Zusätzlich wurden die jeweiligen Zytokine in einer Konzentration von 10ng/ml allein, aber auch in Kombination mit IL-6 (20ng/ml) appliziert. PBS im gleichen Volumen der Zytokine wurde als negative Kontrolle verwendet. Am vierten Tag der Zellkultivierung wurden die Zellen restimuliert und IL-17 mittels FACS (Restimulation über fünf Stunden mit PMA und Ionomycin) oder ELISA (Restimulation über 48 Stunden mit anti-CD3 sowie anti-CD28 Antikörpern) gemessen.

FACS Analysen der kultivierten Zellen zeigten auch in der positiv Kontrollgruppe (TGF- β in Verbindung mit IL-6 (Bettelli et al. 2006; Zhou et al. 2008)) eine sehr niedrige oder keine IL-17 Expression. Es konnte mit keinem der Zytokine allein, oder in Kombination mit IL-6 eine (im Vergleich zur Isotyp Kontrolle) nennenswerte IL-17 Produktion nachgewiesen werden.

Exemplarisch wird im Folgenden die per FACS einmalig gemessene, schwache IL-17 Expression von über vier Tage mit TGF- β 1 und IL-6 stimulierten CD4⁺CD25⁻ Zellen dargestellt (Abbildung IV-n). Nur die Kombination aus 5ng/ml TGF- β 1 und 20ng/ml IL-6 zeigte eine überzeugende IL-17 Expression.





Zelldifferenzierung: Ergebnisse aus einem Experiment. Diese waren nicht reproduzierbar. Angegeben sind der prozentuale Anteil IL-17⁺ Zellen der ausgezählten Gesamtpopulation nach vier Tagen Zellkultivierung unter Kostimluation und fünf Stunden Restimulation mit PMA und Ionomycin. FSC = forward scatter (Vorwärtsstreulicht)

Auch in Zellkulturüberständen konnten mittels ELISA nur sehr geringe Konzentrationen an IL-17 gemessen werden. Die Ergebnisse des Experimentes konnten nicht reproduziert werden und lassen somit keine Aussage bezüglich der Wirkung der untersuchten Zytokine auf die Differenzierung in T_H 17 Zellen zu (Abbildung IV-o).



Abbildung IV-o Zelldifferenzierung zu T_H17 Zellen (b)

Ergebnisse aus einem Experiment. Dieses war nicht reproduzierbar. Angegeben sind die mittels ELISA ermittelten Mediane aus drei ELISA Messungen aus einem Versuch. CD4⁺CD25⁻ Zellen wurden nach vier Tagen Zellkultivierung unter Kostimluation und Zugabe des jeweiligen Zytokines aus der Kultur abgenommen und für 48 Stunden restimuliert. Aus den Kulturüberständen der restimulierten Zellen wurde IL-17 bestimmt. Auch die Addition von IL-6 zeigte keine erhöhten IL-17 Produktionen.

V. Diskussion

Die Entstehung von unterschiedlichen T-Zellpopulationen aus naïven T-Zellen hat eine grosse Bedeutung in der Aufrechterhaltung der immunologischen Abwehr gegen Antigene. So ist eine stabile Population an T_{reg} und T_H17 Zellen essentiell um die Hömeostase des immunologischen Systems beizubehalten. Eine Störung dieses Gleichgewichtes kann zu Erkrankungen führen. Des Weiteren muss im Falle einer akuten Immunantwort, am Ort der Antigenpräsentation, ein adäquates Milieu aus pro- und anti-inflammatorischen Faktoren gebildet werden. Die angemessene Regulation dieser Faktoren entscheidet über die akute Entstehung einer Erkrankung. Mit Hilfe der dargestellten Untersuchungen sollte der Mechanismus der Zelldifferenzierung, von zwei für diesen Vorgang wichtigen Populationen, T_{reg} und T_H17 Zellen, erörtert werden. Hierbei wurden zum einen möglicherweise relevante Zytokine, aber auch deren potenzielle Rezeptoren untersucht.

Ein hypothetischer Ansatz war, dass diese Zellpopulationen im Rahmen ihrer Differenzierung aus naïven T-Zellen ihre Rezeptorexpression verändern und somit unter dem Einfluss differenter Zytokine stehen. Die Entstehung von T_{reg} und $T_H 17$ Zellen ist von TGF- β 1 abhängig. Deshalb wurden diese Zellpopulationen auf die Expression der Rezeptoren der TGF- β Familie untersucht, um Hinweise auf relevante Signalmechanismen und bedeutsame Zytokine zu bekommen.

Des Weiteren sollte geklärt werden, ob von CD4⁺ T-Zellen sezernierte Zytokine bei der Differenzierung oder der Erhaltung des Zellphänotypes eine Rolle spielen. Die Analyse der Expression dieser Zytokine von diesen Zellpopulationen und die darauf folgende funktionelle Untersuchung sollte hierbei einen Hinweis geben.

Auf Grund der strukturellen Verwandschaft der Zytokine innerhalb der TGF- β Familie sollte die Bedeutung verschiedener TGF- β Familienmitglieder bei der T-Zelldifferenzierung untersucht werden. Für die Induktion von Foxp3 aus naïven T-Zellen ist die Bindung von TGF- β 1 an TGFBR2 und ALK5 notwendig. Dies führt zu einer Phosphorylierung von Smad3, welches schliesslich an Transkriptionsverstärkern für Foxp3 bindet und somit den T_{reg} Zelltypus determiniert. Es sind neben den TGF- β Isoformen keine Liganden des TGFBR2 beschrieben. Deshalb wurden potentielle Liganden des ALK5 analysiert, die zu einer Phosphorylierung von Smad3 führen. Hierzu gehören GDF8, GDF9 und GDF11. GDF2 ist in dieser Hinsicht auf Grund der Bindung an ALK1, dem zweiten von TGF- β 1 verwendeten Typ I Rezeptor, und einer Phosphorylierung von Smad1, 5 und 8 als ein gegensätzlich wirkendes Zytokin zu sehen. Auch die untersuchten Follistatine sind als antagonistische Faktoren zu verstehen. INHBA führt, neben der beschrieben Bedeutung bei inflammatorischen Prozessen, zu einer Phosphorylierung von Smad3. Somit wurde eine Reihe von Faktoren untersucht, welche potentiellen Einfluss auf die eigentlich TGF- β 1 abhängige Entstehung von T_{reg} und T_H17 Zellen haben könnten.

1. Die Rolle der TGF- β Familie bei T_{reg} Zellen

Auf Grund der hohen Anzahl an untersuchten Faktoren sind die Ergebnisse dieser Arbeit in einzelne Funktionsabläufe, aber auch als komplexes Zusammenspiel dieser Faktoren zu interpretieren. Im Folgenden werden die essentiellen Ergebnisse in Verbindung mit entsprechender Fachliteratur dargestellt um daraufhin einen möglichen funktionellen Zusammenhang zu skizzieren.

Die bereits beschriebenen Eigenschaften von TGF- β 1 im Bezug auf T-Zellen konnten bestätigt werden. So zeigten T-Zellen unter dem Einfluss von TGF- β 1 eine reduzierte Proliferation von CD4⁺CD25⁻ Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Dies belegt den anti-proliferativen Effekt dieses Zytokines (Abbildung IV-k, Abbildung IV-I). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass CD4⁺CD25⁻ Zellen *in vitro* unter der Wirkung von TGF- β 1 zu Foxp3⁺ T_{reg} Zellen konvertieren. Dies entspricht dem aktuellen Stand der Literatur (Wan und Flavell 2007).

INHBA ist ein Ligand von ALK4 und zeigte in Kombination mit TGF- β 1 eine höhere Konversion zu T_{reg} Zellen aus CD4⁺CD25⁻ T-Zellen, als TGF- β 1 allein (Abbildung IV-m). Dieser Effekt war zwar reproduzierbar, jedoch nach drei Versuchen nicht signifikant. INHBA führte allein in diesen Versuchen nicht zu einer Foxp3 Induktion und zeigte auch keinen Einfluss auf die Zellproliferation. Unterschiede zu den von Huber et al. gewonnenen Ergebnissen, bei denen auch für INHBA eine geringe, aber signifikante Foxp3 Induktion gesehen wurde, bleiben unklar. Eventuell kommen den Stimulationsbedingungen oder unterschiedlichen Chargen der Zytokine hierbei eine Rolle zu teil (Huber et al. in press).

GDF11 ist ein Ligand von ALK4 und ALK5 und zeigte zum Teil eine erhöhte Konversion zu T_{reg} Zellen aus CD4⁺CD25⁻ T-Zellen (Abbildung IV-m). Dies war jedoch nicht zuverlässig reproduzierbar. Zusätzlich zeigte sich die Expression von GDF11 bei T_{reg} Zellen im Vergleich zu CD4⁺CD25⁻ Zellen vermindert.

GDF8 und GDF9 sind potentielle Liganden des ALK5. Beide Zytokine zeigten ebenso wie GDF2 keine Auswirkung auf die Differenzierung oder Proliferation von T-Zellen (Abbildung IV-m).

Die RNS-Expression von TGFBR3 fand sich bei CD4⁺CD25⁺ verglichen mit CD4⁺CD25⁻ T-Zellen erniedrigt (Abbildung IV-c). TGFBR3 wurde 1993 von Lopez-Casillas und Kollegen erstmals beschrieben (Lopez-Casillas et al. 1993), und ist auch unter dem Namen Betaglycan bekannt. Dieser Rezeptor besitzt selbst keine Kinasefunktion, beeinflusst jedoch die Bindung von Liganden an TGF- β Rezeptoren (Lopez-Casillas et al. 1993; Lewis et al. 2000). Mehrere Funktionen von TGFBR3 sind in diesem Zusammenhang von Bedeutung. Zum Einen erhöht die Expression des TGFBR3 die Affinität von TGF- β 1 zu seinen entsprechenden Rezeptoren. Zum Anderen wird die Expression von TGFBR3 unter dem Einfluss von TGF- β 1 supprimiert. Hierbei wurden phosphoryliertes Smad2 und 3 als intrazelluläre Inhibitoren der TGFBR3 Expression erkannt (Hempel et al. 2008). Da T_{reg} Zellen unter dem Einfluss von TGF- β 1 entstehen,

ist die verminderte Expression von TGFBR3 bei T_{reg} Zellen im Vergleich zu $CD4^+CD25^-$ Zellen möglicherweise auf dieses Zytokin zurückzuführen. Neben TGF- β wurde auch Inhibin (INH) als potentieller Ligand des TGFBR3 beschrieben (Bernard et al. 2002). INHBA konkurriert kompetitiv mit Inhibinen um die Bindung an ACVR2A und ACVR2B. Inhibine binden bei Co-Expression von TGFBR3 mit einer erhöhten Affinität an ACVR2A und ACVR2B und verdrängen somit INHBA vom Rezeptor. Folglich ist die Expression von TGFBR3 als funktioneller Antagonismus der INHBA Wirkung zu verstehen (Lewis et al. 2000; Bernard et al. 2002).

Die RNS-Expression von ALK4 ist bei CD4⁺CD25⁺ im Vergleich zu CD4⁺CD25⁻ T-Zellen vermindert (Abbildung IV-a). ALK4 gehört zu den sieben Typ I GDF1, 3, 8 und 11 sowie INHBB als Liganden dieses Rezeptors, bzw. die bevorzugte Interaktion mit ACVR2A und ACVR2B beschrieben (Tabelle II-d). Somit kommt es bei Bindung eines Liganden dieses Rezeptors zu einer Phosphorylierung von Smad2 und 3. Die Expression von ALK4 in T-Zellen des Thymus wurde bereits untersucht. So konnte Rosendahl und Kollegen 2003 zeigen, dass ALK4 im Thymus exprimiert wird. Insbesondere doppelt negative (CD4 CD8), aber auch, jedoch in geringerem Maße, doppelt positive (CD4⁺CD8⁺) und einfach positive (CD4⁺CD8⁻ oder CD4⁻CD8⁺) T-Zellen diesen Rezeptor. Rosendahl ging exprimieren dabei nicht auf die Rezeptorexpression von ALK4 bei regulatorischen T-Zellen ein, jedoch zeigten CD25⁺ Zellen keine signifikanten Expressionsunterschiede zu CD25⁻ Zellen. In diesen Experimenten wurden Antikörper gegen eine intrazelluläre Domäne des Rezeptors verwendet, das Alter der Mäuse lag bei 10 Wochen (Rosendahl et al. 2003). Auch Licona und Kollegen konnten bei jüngeren Tieren ALK4 vor allem bei doppelt negativen, und in geringerem Umfang auch bei einfach und doppelt positiven T-Zellen des Thymus nachweisen. Bei diesen Untersuchungen allerdings mittels RT-PCR auf mRNS Ebene. Auch hier wurde nicht auf die Expression dieses Rezeptors bei T_{reg} Zellen eingegangen (Licona et al. 2006). Im Thymus reifende T-Zellen zeigen vermutlich eine andere Rezeptorexpression als T-Zellen in peripheren lymphatischen Organen wie der Milz. So ist die verminderte ALK4 Expression peripherer T_{reg} Zellen im Vergleich zu CD4⁺CD25⁻ Zellen an dieser Stelle neu beschrieben.

Die RNS-Expression von BMPR2 ist bei CD4⁺CD25⁺ verglichen mit CD4⁺CD25⁻ Zellen leicht erhöht (Abbildung IV-b). BMPR2 ist ein Typ II Rezeptor der TGF-β Familie und bindet BMP2, 4, 6, 7 und 15 sowie GDF2, 5 und 9 und führt durch seine Fähigkeit, mit ALK1, 3, 5 und 6 zu heteromerisieren zur Phosphorylierung von Smad1, 5 und 8, aber auch Smad2 und 3. Dies hängt von dem jeweiligen Zytokin und Typ I Rezeptor ab (Tabelle II-d).

Mutationen im BMPR2 kodierenden Gen werden mit der vererbbaren "familiären primären pulmonalen Hypertonie" in Zusammenhang gebracht (Deng et al. 2000; Lane et al. 2000; Machado et al. 2001). Diesem Rezeptor wurde bis jetzt noch keine Bedeutung in der Immunologie zugeschrieben. Die RNS-Expression von AMHR2 ist bei CD4⁺CD25⁺ verglichen mit CD4⁺CD25⁻ Zellen erniedrigt (Abbildung IV-b). 1994 wurde erstmals der AMHR2 von Baarends und Kollegen beschrieben. Schon damals wurde das Anti Müller Hormon (AMH) als Ligand identifiziert. So werden diesem Typ II Rezeptor der TGF-β Familie auch vorwiegend Bedeutung bei der Reifung des männlichen Urogenitaltraktes zugesprochen (Baarends et al. 1994). Mutationen im AMHR2-Gen führen zum Müller-Gang-Persistenzsyndrom (di Clemente und Belville 2006). Mehrere Typ I Rezeptoren (ALK2, 3 und 6) interagieren mit AMHR2 (Tabelle II-d).

Die erhöhte Konversion von T_{reg} Zellen aus CD4⁺CD25⁻ T-Zellen durch die Kombination aus INHBA und TGF- β 1, in Verbindung mit der Verminderung der Expression von ALK4 und TGFBR3 in T_{reg} Zellen im Vergleich zu CD4⁺CD25⁻ Zellen, suggeriert eine funktionelle Verbindung zwischen diesen Faktoren. INHBA ist ein Ligand von ALK4 und ein Zytokin, welches zu Smad3 Phosphorylierungen führen kann. Somit ist eine verstärkte Induktion bezüglich dieser Smad3 Aktivierung durch die Kombination von TGF- β 1 mit INHBA im Vergleich zu TGF- β 1 ohne INHBA denkbar. Diese erhöhte Konzentration von intrazellulären phosphorylierten Smad3 könnte zu einer gesteigerten Induktion von Foxp3 und somit der Entstehung von T_{reg} Zellen führen. Somit ist denkbar, dass die Entstehung von T_{reg} Zellen aus CD4⁺CD25⁻ T-Zellen auch unter dem Einfluss von INHBA steht.

Es gilt zu klären, ob sowohl nT_{reg} als auch iT_{reg} Zellen TGFBR3 unter dem Einfluss von TGF-B1 vermindert exprimieren. Somit würden Trea Zellen im Vergleich zu CD4⁺CD25⁻ T-Zellen auch primär empfindlicher auf INHBA reagieren. Es ist auch denkbar, dass INHBA durch Smad3 Phosphorylierung selbst an dieser TGFBR3 Suppression mitwirkt. In diesem System würde ALK4 im Sinne eines negativen Rückkopplungsmechanismus bei T_{reg} Zellen herunter reguliert werden. Bindungsfähigkeit um der erhöhten INHBA entgegenzuregulieren. Dies würde einem Abwehrmechanismus von Treg Zellen und CD4⁺CD25⁻ T-Zellen gegen den Einfluss von INHBA entsprechen und eine INHBA-induzierte Smad2/3 Aktivierung verhindern (Abbildung V-a). Diese Theorie ist im Weiteren zu untersuchen. Somit ist zum einen zu zeigen, dass TGFBR3 und ALK4 nicht nur als RNS vermindert bei T_{rea} Zellen im Vergleich zu CD4⁺CD25⁻ T-Zellen exprimiert, sondern dass auch diese Rezeptoren tatsächlich auf der Zelloberfläche unterschiedlich präsentiert werden. Durch Unterdrückung der TGFBR3 Expression (z.B. TGFBR3^{-/-} in T-Zellen) könnte die Wirkung von INHBA auf CD4⁺CD25⁻ T-Zellen analysiert werden. Denkbar wäre eine Konversion zu T_{reg} Zellen auch ohne TGF-β. Möglicherweise hat INHBA sogar diese gezeigte konversionsverstärkende Wirkung zu Treg Zellen in Verbindung mit TGF- β , da TGF- β an TGFBR3 bindet und somit Bindungsstellen für Inhibine belegen. Somit wäre die Affinität von Inhibinen an ACVR2A und ACVR2B nicht erhöht und INHBA könnte seine Wirkung an diesen Rezeptoren in Verbindung mit ALK4 ausüben. Es ist jedoch zu bemerken, dass GDF8 als ein weiterer ALK4 Ligand und potentieller Aktivator des Smad3 Signalweges,

keinen reproduzierbaren Einfluss auf die Differenzierung zu T_{reg} Zellen hatte. Jedoch war mit GDF11 allein gelegentlich eine erhöhte Konversionsrate zu sehen. Ob diese erhöhte Konversion durch die Bindung an ALK4 oder ALK5 vermittelt wird, ist ohne weitere Untersuchungen nicht zu beweisen. Da sowohl ALK4 als auch GDF11 von T_{reg} Zellen im Vergleich zu CD4⁺CD25⁻ Zellen vermindert exprimiert werden, ist ein funktioneller Zusammenhang dieser Faktoren zu vermuten.





Abbildung V-a Die Bedeutung der Expression von TGFBR3 und ALK4 bei der Signalvermittlung von INHBA bei CD4⁺CD25⁻ und CD4⁺CD25⁺ T-Zellen

Dargestellt ist eine Skizze über die theoretisch mögliche Auswirkung der unterschiedlichen Rezeptorexpression bei CD4⁺CD25⁻ T-Zellen und T_{reg} Zellen:

INHBA konkurriert mit INH um die Bindung an ACVR2A und ACVR2B. INHBA benötigt ALK4 um seine Wirkung durch Smad2/3 Aktivierung zu entfalten. INH trägt nicht zur Smad2/3 Aktivierung bei.

Die Expression von TGFBR3 auf CD4⁺CD25⁻ T-Zellen erhöht die Affinität von INH an ACVR2A und ACVR2B, verdrängt INHBA von diesen Rezeptoren, so dass die INHBA-vermittelte Smad2/3 Aktivierung gestört ist. Auch bei T_{reg} Zellen ist die INHBA Signalvermittlung beeinträchtigt. Zwar wird hier kein TGFBR3 exprimiert, jedoch benötigt INHBA neben ACVR2A oder ACVR2B auch ALK4 um seine Wirkung zu entfalten. ALK4 wird jedoch bei T_{reg} Zellen vermindert exprimiert.

ACVR2A = activin A receptor, type IIA; ACVR2B = activin A receptor, type IIB; ALK = activin receptor-like kinase; INH = Inhibin; INHBA = Inhibin, beta A (= Activin A); TGF- β 1 = transforming growth factor, beta1; TGFBR3 = transforming growth factor, beta receptor III; Smad = Name kombiniert aus "Sma" (caenorhabditis elegans) und "Mad" (Drosophola melanogaster)
Die Untersuchung von GDF8, GDF9 und GDF11 als potentielle Liganden von ALK5 sollte klären. ob Zvtokine mit TGF-β1 ähnlichen Rezeptorbindungseigenschaften auch vergleichbare Effekte bei der Т-Zelldifferenzierung haben. Tatsächlich haben diese aber keine einheitliche Wirkung auf T-Zellen. Zwar wird GDF9 und GDF11 vermindert bei Treg Zellen im Vergleich zu CD4⁺CD25 T-Zellen exprimiert, jedoch zeigte keiner der drei Faktoren einen reproduzierbaren Einfluss auf die Proliferation oder Differenzierung von T-Zellen. Dabei sind mehrere Gesichtspunkte zu betrachten. Zum einen binden GDF8, GDF9 und GDF11 nicht an den für die TGF-ß Isoformen spezifischen TGFBR2, sondern an andere Typ II Rezeptoren. Weiterhin binden einige dieser Zytokine neben ALK5 auch an weitere Typ I Rezeptoren wie zum Beispiel ALK4. Ausserdem wurden die beschriebenen Rezeptorbindungseigenschaften von GDF8, 9 und 11 nicht direkt bei T-Zellen nachgewiesen (Oh et al. 2002; Rebbapragada et al. 2003; Andersson et al. 2006; Mazerbourg und Hsueh 2006). Ob es durch diese unterschiedlichen Rezeptorinteraktionen auch in T-Zellen überhaupt zu Smad3 Phosphorylierungen kommt ist somit fraglich. Zumindest scheint die Fähigkeit eines Zytokins an ALK5 zu binden nicht mit der Wirkung von TGF-β1 durch Bindung an ALK5 gleichzusetzen zu sein. Dieser theoretische Ansatz hat sich folglich nicht bestätigt. Allerdings ist auch auf Grund der Differenz der Rezeptorexpression zwischen den untersuchten Zellpopulationen in Kombination mit der Tatsache, das Zytokine mit mehreren Rezeptoren interagieren, keine stringente Signalaktivierung zu erwarten. Vielmehr scheint die Fähigkeit eines Liganden, an mehreren Rezeptoren binden zu können die Vielfältigkeit der Signalvermittlung zu erhöhen. So ist die Induktion von Foxp3 durch TGF-β1 vermutlich komplexer, als die alleinige Smad3 Phosphorylierung. In diesem Zusammenhang sind alternative TGF-B Signalwege wie die Aktivierung von mitogenaktivierte Proteinkinasen (MAPK) wie z.B. die P38mitogenaktivierte Proteinkinasen (p38 MAPK) und c-Jun N-terminale Kinasen (JNK) zu erwähnen. Insbesondere die Aktivierung des p38 MAPK Signalweges scheint bei der Induktion von T_{reg} Zellen aus CD4⁺CD25⁻ T-Zellen notwendig zu sein (Adler et al. 2007; Adler und Steinbrink 2008; Huber et al. 2008).

Die Beschreibung der Rezeptor- und Zytokinexpression bei T_{rea} Zellen und CD4⁺CD25⁻ T-Zellen verdeutlicht das komplexe Zusammenspiel dieser vielen Faktoren. So sind Rückkopplungsmechanismen wie beispielsweise bei TGFBR3, ALK4 und INHBA denkbar. Die Unterschiede bei der Expression von BMPR2, AMHR2, TGFBR3 und ALK4 zwischen T_{req} Zellen und CD4⁺CD25⁻ Tverdeutlicht. zwei sehr Zellen dass es sich um unterschiedliche Zellpopulationen handelt, welche unterschiedliche Funktionen haben sowie auch unter verschiedenen Einflüssen stehen. Trea Zellen reagieren vermutlich auf Zytokine der TGF-β Familie in einer ganz unterschiedlichen Weise verglichen mit CD4⁺CD25⁻ T-Zellen. Dies stellt dar, wie durch die Interaktion einiger Faktoren eine sehr komplexe und vielfältige Kommunikation zwischen Zellen und Organismus sichergestellt sein kann.

1.1. Furin

Die RNS-Expression von Furin zeigte sich in T_{req} Zellen im Vergleich zu CD4⁺CD25⁻ T-Zellen leicht erniedrigt (Abbildung IV-c). Die Furin-Konvertase (FURIN), ist eines von derzeit sieben beschriebenen Mitgliedern der Proprotein Konvertasen (PC = "proprotein convertase"). Diese zeichnen sich durch die Eigenschaft aus, Zytokine durch endoproteasischen Umbau in ihre aktive Form zu überführen (Taylor et al. 2003). Andersson und Kollegen zeigten, dass aktivierte T_{reg} Zellen in der Lage sind CD4⁺Foxp3⁻ T-Zellen zu Foxp3⁺T_{reg} Zellen zu konvertieren. Dies wurde damit erklärt, dass diese Treg Zellen TGF-β1 zusammen mit "latency associated peptide" (LAP) auf der Zelloberfläche präsentieren (Andersson et al. 2008). LAP wird von Furin abgespalten und führt somit TGF-β1 in seine aktive biologische Form über (Dubois et al. 2001). Mäuse mit Furin Mangel sind nicht überlebensfähig und versterben auf Grund mehrerer morphologischer Missbildungen innerhalb der ersten 12 Tage (Roebroek et al. 1998). Dies spricht führt die Relevanz dieses Enzymes. 2008 konnte Pesu und Kollegen die Rolle von Furin in T-Zellen mit Hilfe eines Mausmodelles analysieren. Die von ihm beschriebenen Mäuse haben eine Furin Deletion im CD4 Promoter, mit der Konsequenz, dass die T-Zellen dieser Mäuse kein Furin bilden. Diese Mäuse bilden nach etwa sechs Monaten ein tödliches, inflammatorisches Syndrom, welches auf eine Störung der Immuntoleranz zurückgeführt wird. Ursache hierfür ist, zumindest partiell, eine gestörte Funktion der T_{rea} Zellen. Diese Zellen bilden im Vergleich zu Wildtyp T_{reg} Zellen nicht weniger TGF- β 1, jedoch sind sie nicht in der Lage CD4⁺Foxp3⁻ T-Zellen zu T_{reg} Zellen zu konvertieren. Wahrscheinlich sind niedrigere Spiegel an biologisch aktivem TGF- β 1 hierfür verantwortlich (Pesu et al. 2008).

Eine geringere Furin Produktion von T_{reg} Zellen im Vergleich zu CD4⁺CD25⁻ Zellen spricht für eine geringere Aktivierung von inaktivem TGF- β 1 durch T_{reg} Zellen. Trotzdem sind diese Zellen scheinbar in der Lage, mit Hilfe von TGF- β 1 T_{reg} Zellen aus CD4⁺Foxp3⁻ T-Zellen zu generieren (Andersson et al. 2008). Die Expression von Furin zeigte sich bei T_{reg} Zellen nicht gänzlich supprimiert. Somit sind möglicherweise auch geringere Furin-Konzentrationen für die TGF- β 1 abhängige *de novo* Entstehung von T_{reg} Zellen aus CD4⁺Foxp3⁻ T-Zellen mittels T_{reg} Zellen ausreichend.

2. Die Rolle von Follistatinen bei T_{reg} Zellen

Die Expressionsanalyse der Follistatine bei CD4⁺CD25⁻ T-Zellen und T_{reg} Zellen zeigte bei mehreren Vertretern dieser Familie eine erhöhte mRNS-Expression in T_{reg} Zellen. So waren bei FSTL2, 3 und 4 jedoch nicht bei FST, FSTL1 und 5 eine verstärkte Expression der RNS für dieses Protein bei T_{reg} Zellen nachzuweisen. Die Hinzugabe zur Zellkultur des Hauptvertreters dieser Gruppe, des Follistatins, aber auch von FSTL3, konnte diesen Proteinen keinen Effekt bei der T-Zelldifferenzierung oder Proliferation zuschreiben (Abbildung IV-e, Abbildung IV-I und Abbildung IV-m).

FSTL3 wurde auf Grund der erhöhten RNS-Expression bei Trea Zellen im Vergleich mit CD4⁺CD25⁻ Zellen genauer mittels Western Blotting untersucht (Abbildung IV-f). Hayette und Kollegen beschrieben FSTL3 nach N-Deglykosylierung als ein Protein mit einer Molekularmasse von 27kDa (Hayette et al. 1998). Die Bedeutung anderer posttranslationaler Modifizierung dieses Proteins ist allerdings nicht bekannt. Die Analyse der Aminosäuresequenz von FSTL3 ergab viele potentielle, jedoch eher unwahrscheinliche Bindungsstellen für O-Glykosylierungen (Abbildung IV-j). Es konnten sowohl bei T_{req} Zellen, als auch bei CD4⁺CD25⁻ T-Zellen Proteine im Westernblot nachgewiesen werden, welche vermutlich einen Glykosylierungszustand zwischen dem rekombinanten (glykosylierten) und dem N-deglykosylierten FSTL3 darstellen. Die zusätzliche Bande bei 24kDa bei Treg Zellen könnte eine weitere noch nicht posttranslational modifizierte Form von FSTL3 sein. Allerdings ist auch die eigentlich berechnete Molekularmasse des nicht modifizierten FSTL3 mit 26kDa grösser als das hier nachgewiesene Protein. Denkbar ist, dass es sich bei dem 24kDa Protein um eine Spleissvariante des FSTL3 Genes handelt. Auf Grund Strukturverwandschaft unter der den Follistatinen wäre auch eine Kreuzreaktivität des FSTL3 Antikörpers mit anderen Follistatinen, wie beispielsweise FSTL2 oder FSTL4 möglich. Der reproduzierbare Nachweis dieses Proteins spricht jedoch für eine selektive Expression dieses Proteins bei T_{reg} Zellen und unterstützt die Ergebnisse der RNS-Expressionsanalysen.

Da FSTL3 nicht im Zytosol und auch nicht in Kulturüberständen nachweisbar war, scheint es als sezerniertes Protein bei den untersuchten T-Zellen nur eine geringe Rolle zu spielen. Diese These wird durch die Analyse der T-Zelldifferenzierung und Proliferation unterstützt. Hier war kein Effekt durch Hinzugabe von FSTL3 nachweisbar.

Zur weiteren Bearbeitung der Fragestellung, ob FSTL3 im Zellkern bei T_{reg} Zellen stärker exprimiert ist, als bei undifferenzierten T-Zellen, und welche Funktion dieses hat, wären FSTL3^{-/-} Mäusen genauer zu untersuchen. FSTL3^{-/-} Mäuse sind bereits von Mukherjee und Kollegen generiert worden, allerdings beschrieb diese Arbeitsgruppe keine Veränderungen im Immunsystem (Mukherjee et al. 2007). Die strukturelle Verwandtschaft unter den Vertretern der Follistatin Familie lässt vermuten, dass diese Proteine auch funktionelle Gemeinsamkeiten besitzen. So ist z.B. die Eigenschaft, TGF- β Familienmitglieder funktionell zu antagonisieren, sowohl für FST als auch für FSTL3 beschrieben. Für FSTL3, aber auch für FSTL2 ist eine Induktion durch TGF- β 1 beschrieben (Bartholin et al. 2001; Maguer-Satta et al. 2001; Pen et al. 2008). Denkbar wären weitere bis jetzt noch nicht beschriebene Funktionen der Follistatine.

Das Phänomen, dass TGF- β 1 einige Follistatine induzieren kann und gleichzeitig ein essentieller Wachstumsfaktor bei der Entstehung von T_{reg} Zellen in der Peripherie ist, lässt Raum für Spekulationen bezüglich des funktionellen Zusammenhanges zwischen TGF- β 1, T_{reg} Zellen und Follistatinen. So ist auch die Fähigkeit von FSTL3, die Transkription von Genen mit zu beeinflussen ein Hinweis auf die Funktion bei der Zellregulation (Forissier et al. 2007). Dieses, in Kombination mit den Ergebnissen dieser Arbeit, sprechen für eine Funktion von Follistatinen (zumindest von FSTL3, da dieses nur im Zellkern und weder im Zytosol noch in Kulturüberständen nachgewiesen werden konnte) im Zellkern von T-Zellen.

So ist die Tatsache, dass FSTL2, 3 und 4 bei T_{reg} Zellen deutlich erhöht exprimiert werden, ein Ansatz für weitere Untersuchungen. Es muss geklärt werden, ob auch andere Zellen des lymphatischen Systems Gene für diese Proteine exprimieren, oder ob es sich dabei um eine spezifische Eigenschaft von T_{reg} Zellen handelt. Weiterhin ist zu zeigen, dass sich diese erhöhte RNS Expression auch tatsächlich auf Proteinebene auswirkt und welche Faktoren oder Stimulatoren dafür notwendig sind. So ist zu untersuchen, ob TGF- β 1 auch in T-Zellen die Expression der Follistatine beeinflusst. Wichtig ist auch die Beantwortung der Frage, ob diese dann sezerniert werden, oder vielmehr im Zellkern oder im Zytoplasma ihre Funktion ausüben.

3. Die Rolle der TGF- β Familie bei T_H17 Zellen

Ziel dieser Arbeit war die Analyse der Bedeutung einiger TGF- β Familienmitglieder bei der T-Zelldifferenzierung in T_{reg} aber auch in T_H17 Zellen. Die Funktion dieser Zytokine bei der T_H17 Zellenstehung bleibt an dieser Stelle ungeklärt. Es konnte durch Kultivierung mit TGF- β 1 und IL-6 nicht verlässlich aus CD4⁺CD25⁻ Zellen eine angemessene T_H17 Zellpopulation generiert werden (Abbildung IV-n, Abbildung IV-o). Möglicherweise waren die Rahmenbedingungen für diese Zellkultivierungen nicht optimal. Ohne diesen Kontrollwert kann keine Aussage über die Wirkung der anderen untersuchten Zytokine und Follistatine getroffen werden.

Die T-Zellkultivierung unterliegt vielen Faktoren und ist ein artifizielles System, welches für die jeweilige Zellpopulation optimiert werden kann. So sind in der Literatur teilweise auch andere als in dieser Arbeit angewante Kulturbedingungen beschrieben. Beispielsweise verwendete Bettelli und Kollegen 2006 zur Optimierung der T_H17 Zellkultivierung neutralisierende Antikörper gegen IL-4, IFN- γ und IL-12/23 p40. Weiterhin applizierte er an unterschiedlichen Tagen IL-2 (Bettelli et al. 2006).

VI. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Rolle der TGF- β Familienmitglieder bei der Entstehung von Foxp3⁺ T_{reg} Zellen und T_H17 Zellen aus CD4⁺CD25⁻ T-Zellen untersucht. Hierbei wurde eine Auswahl an Zytokinen auf mögliche inhibierende oder induzierende Funktionen analysiert. Des Weiteren wurde die Expression der Rezeptoren der TGF- β Familie, sowie die Expression einer Auswahl an Zytokinen und Follistatinen bei diesen Zellpopulationen untersucht.

Es konnte die Funktion von TGF-β1 als essentieller Wachstumsfaktor bei der Entstehung von T_{reg} Zellen, sowie dessen anti-proliferative Wirkung bestätigt werden. INHBA wurde als potentieller Differenzierungsfaktor von T_{reg} Zellen identifiziert; jedoch lediglich in Assoziation mit TGF-β1. Des Weiteren wurden neue Gene beschrieben, welche im Rahmen der Differenzierung von CD4⁺CD25⁻ T-Zellen zu Foxp3⁺ T_{reg} Zellen unterschiedlich exprimiert werden. TGFBR3 zeigte sich bei Foxp3⁺ T_{reg} Zellen im Vergleich zu CD4⁺CD25⁻ T-Zellen vermindert exprimiert, ein Phänomen, welches möglicherweise auf die Wirkung von TGF-β1 zurückzuführen ist. ALK4 konnte als ein weiterer Rezeptor identifiziert werden, welcher bei Foxp3⁺ T_{reg} Zellen im Vergleich zu CD4⁺CD25⁻ T-Zellen vermindert exprimiert ist. INHBA ist ein Ligand von ALK4, so ist ein Rückkopplungsmechanismus zwischen den Faktoren TGF-β1, TGFBR3, ALK4 und INHBA eine mögliche Erklärung für diese Expressionsunterschiede. Dieser Mechanismus und die Wirkung von INHBA sollte in zukünftigen Experimenten genauer analysiert werden.

GDF8, GDF9 und GDF11 als mögliche Liganden des ALK5 waren nicht in der Lage, die Funktion von TGF- β 1 zu ersetzen. So ist die Rolle von TGF- β 1 bei der T-Zelldifferenzierung hervorzuheben, welches als essentieller Faktor nicht durch andere Familienmitglieder ersetzt werden kann. Die vielfältigen Interaktionsmöglichkeiten zwischen Zytokinen und Rezeptoren der TGF- β Familie bilden ein komplexes Kommunikationsnetzwerk zwischen Zellen und Organismus, welches auch über die entsprechende Rezeptorexpression determiniert werden könnte.

Es konnte erstmals eine erhöhte Expression von FSTL2, FSTL3 und FSTL4 bei Foxp3⁺ T_{reg} Zellen im Vergleich zu CD4⁺CD25⁻ T-Zellen beschrieben werden. Dies könnte für eine Bedeutung der Follistatine bei der Entwicklung oder Funktion von Foxp3⁺ T_{reg} Zellen sprechen. FSTL3 wird *in vitro* nicht von Foxp3⁺ T_{reg} Zellen sezerniert und übt somit seine Wirkung wahrscheinlich im Zellkern über Modifikation der Genexpression, eventuell sogar des Foxp3 Gens aus. Möglicherweise, haben mehrere Follistatine regulatorische Funktionen innerhalb der Zelle. Dies sollte in weiteren Experimenten mit konditionalen FTSL3^{-/-} Mäusen und durch RNS Interferenz untersucht werden.

VII. Literaturverzeichnis

Aaltonen, J., et al. (1999). "Human growth differentiation factor 9 (GDF-9) and its novel homolog GDF-9B are expressed in oocytes during early folliculogenesis." <u>J Clin</u> <u>Endocrinol Metab</u> **84**(8): 2744-50.

Adler, H. S., et al. (2007). "Activation of MAP kinase p38 is critical for the cell-cyclecontrolled suppressor function of regulatory T cells." <u>Blood</u> **109**(10): 4351-9.

Adler, H. S. und Steinbrink, K. (2008). "MAP kinase p38 and its relation to T cell anergy and suppressor function of regulatory T cells." <u>Cell Cycle</u> 7(2): 169-70.

Allan, S. E., et al. (2005). "The role of 2 FOXP3 isoforms in the generation of human CD4+ Tregs." <u>J Clin Invest</u> **115**(11): 3276-84.

Andersson, J., et al. (2008). "CD4+ FoxP3+ regulatory T cells confer infectious tolerance in a TGF-beta-dependent manner." <u>J Exp Med</u> **205**(9): 1975-81.

Andersson, O., et al. (2006). "Growth differentiation factor 11 signals through the transforming growth factor-beta receptor ALK5 to regionalize the anterior-posterior axis." <u>EMBO Rep</u> 7(8): 831-7.

Andoh, A., et al. (2005). "Interleukin-22, a member of the IL-10 subfamily, induces inflammatory responses in colonic subepithelial myofibroblasts." <u>Gastroenterology</u> **129**(3): 969-84.

Annunziato, F., et al. (2007). "Phenotypic and functional features of human Th17 cells." J Exp Med **204**(8): 1849-61.

Anzano, M. A., et al. (1983). "Sarcoma growth factor from conditioned medium of virally transformed cells is composed of both type alpha and type beta transforming growth factors." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **80**(20): 6264-8.

Asano, M., et al. (1996). "Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation." <u>J Exp Med</u> **184**(2): 387-96.

Attisano, L., et al. (1992). "Novel activin receptors: distinct genes and alternative mRNA splicing generate a repertoire of serine/threonine kinase receptors." <u>Cell</u> **68**(1): 97-108.

Aujla, S. J., et al. (2008). "IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia." <u>Nat Med</u> **14**(3): 275-81.

Baarends, W. M., et al. (1994). "A novel member of the transmembrane serine/threonine kinase receptor family is specifically expressed in the gonads and in mesenchymal cells adjacent to the mullerian duct." <u>Development</u> **120**(1): 189-97.

Balasa, B., et al. (2000). "IL-10 deficiency does not inhibit insulitis and accelerates cyclophosphamide-induced diabetes in the nonobese diabetic mouse." <u>Cell Immunol</u> **202**(2): 97-102.

Barbara, N. P., et al. (1999). "Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor-beta superfamily." <u>J Biol Chem</u> **274**(2): 584-94.

Bartholin, L., et al. (2001). "FLRG, an activin-binding protein, is a new target of TGFbeta transcription activation through Smad proteins." <u>Oncogene</u> **20**(39): 5409-19.

Bartholin, L., et al. (2002). "Transcription activation of FLRG and follistatin by activin A, through Smad proteins, participates in a negative feedback loop to modulate activin A function." <u>Oncogene</u> **21**(14): 2227-35.

Belkaid, Y., et al. (2006). "Natural regulatory T cells and parasites: a common quest for host homeostasis." Immunol Rev **212**: 287-300.

Bennett, C. L., et al. (2001). "The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3." <u>Nat Genet</u> **27**(1): 20-1.

Bernard, D. J., et al. (2002). "Inhibin binding protein (InhBP/p120), betaglycan, and the continuing search for the inhibin receptor." <u>Mol Endocrinol</u> **16**(2): 207-12.

Bettelli, E., et al. (2006). "Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells." <u>Nature</u> **441**(7090): 235-8.

Blanco, F. J., et al. (2005). "Interaction and functional interplay between endoglin and ALK-1, two components of the endothelial transforming growth factor-beta receptor complex." <u>J Cell Physiol</u> **204**(2): 574-84.

Bluestone, J. A. und Abbas, A. K. (2003). "Natural versus adaptive regulatory T cells." <u>Nat Rev Immunol</u> **3**(3): 253-7.

Bodensteiner, K. J., et al. (1999). "Molecular cloning of the ovine Growth/Differentiation factor-9 gene and expression of growth/differentiation factor-9 in ovine and bovine ovaries." <u>Biol Reprod</u> **60**(2): 381-6.

Boniface, K., et al. (2005). "IL-22 inhibits epidermal differentiation and induces proinflammatory gene expression and migration of human keratinocytes." <u>J Immunol</u> **174**(6): 3695-702.

Bopp, T., et al. (2007). "Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression." <u>J Exp Med</u> **204**(6): 1303-10.

Brand, S., et al. (2006). "IL-22 is increased in active Crohn's disease and promotes proinflammatory gene expression and intestinal epithelial cell migration." <u>Am J Physiol</u> <u>Gastrointest Liver Physiol</u> **290**(4): G827-38.

Brunkow, M. E., et al. (2001). "Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse." <u>Nat Genet</u> **27**(1): 68-73.

Chang, H., et al. (2002). "Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-beta superfamily." <u>Endocr Rev</u> **23**(6): 787-823.

Chen, W., et al. (2003). "Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3." J Exp Med **198**(12): 1875-86.

Chung, Y., et al. (2006). "Expression and regulation of IL-22 in the IL-17-producing CD4+ T lymphocytes." <u>Cell Res</u> **16**(11): 902-7.

Collison, L. W., et al. (2007). "The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function." <u>Nature</u> **450**(7169): 566-9.

Coquet, J. M., et al. (2007). "IL-21 is produced by NKT cells and modulates NKT cell activation and cytokine production." <u>J Immunol</u> **178**(5): 2827-34.

Cua, D. J., et al. (2003). "Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain." <u>Nature</u> **421**(6924): 744-8.

Dal-Pra, S., et al. (2006). "Noggin1 and Follistatin-like2 function redundantly to Chordin to antagonize BMP activity." <u>Dev Biol</u> **298**(2): 514-26.

David, L., et al. (2007). "Identification of BMP9 and BMP10 as functional activators of the orphan activin receptor-like kinase 1 (ALK1) in endothelial cells." <u>Blood</u> **109**(5): 1953-61.

de Larco, J. E. und Todaro, G. J. (1978). "Growth factors from murine sarcoma virustransformed cells." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **75**(8): 4001-5.

Deng, Z., et al. (2000). "Familial primary pulmonary hypertension (gene PPH1) is caused by mutations in the bone morphogenetic protein receptor-II gene." <u>Am J Hum</u> <u>Genet</u> **67**(3): 737-44.

Derynck, R. und Zhang, Y. E. (2003). "Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling." <u>Nature</u> **425**(6958): 577-84.

di Clemente, N. und Belville, C. (2006). "Anti-Mullerian hormone receptor defect." <u>Best</u> <u>Pract Res Clin Endocrinol Metab</u> **20**(4): 599-610.

Dong, J., et al. (1996). "Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis." <u>Nature</u> **383**(6600): 531-5.

Dubois, C. M., et al. (2001). "Evidence that furin is an authentic transforming growth factor-beta1-converting enzyme." <u>Am J Pathol</u> **158**(1): 305-16.

Dumoutier, L., et al. (2000). "Cloning and characterization of IL-10-related T cellderived inducible factor (IL-TIF), a novel cytokine structurally related to IL-10 and inducible by IL-9." <u>J Immunol</u> **164**(4): 1814-9.

Elvin, J. A., et al. (1999). "Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary." Mol Endocrinol **13**(6): 1035-48.

Esquela, A. F. und Lee, S. J. (2003). "Regulation of metanephric kidney development by growth/differentiation factor 11." <u>Dev Biol</u> **257**(2): 356-70.

Fahlen, L., et al. (2005). "T cells that cannot respond to TGF-beta escape control by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells." <u>J Exp Med</u> **201**(5): 737-46.

Fantini, M. C., et al. (2004). "Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7." J Immunol **172**(9): 5149-53.

Faria, A. M. und Weiner, H. L. (2005). "Oral tolerance." Immunol Rev 206: 232-59.

Fontenot, J. D., et al. (2003). "Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells." <u>Nat Immunol</u> **4**(4): 330-6.

Fontenot, J. D., et al. (2005). "Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3." <u>Immunity</u> **22**(3): 329-41.

Forissier, S., et al. (2007). "AF10-dependent transcription is enhanced by its interaction with FLRG." <u>Biol Cell</u> **99**(10): 563-71.

Friedline, R. H., et al. (2009). "CD4+ regulatory T cells require CTLA-4 for the maintenance of systemic tolerance." J Exp Med **206**(2): 421-34.

Fujino, S., et al. (2003). "Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease." <u>Gut</u> **52**(1): 65-70.

Gentry, L. E., et al. (1988). "Molecular events in the processing of recombinant type 1 pre-pro-transforming growth factor beta to the mature polypeptide." <u>Mol Cell Biol</u> **8**(10): 4162-8.

Gershon, R. K. und Kondo, K. (1970). "Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes." <u>Immunology</u> **18**(5): 723-37.

Gorelik, L. und Flavell, R. A. (2000). "Abrogation of TGFbeta signaling in T cells leads to spontaneous T cell differentiation and autoimmune disease." <u>Immunity</u> **12**(2): 171-81.

Gorelik, L. und Flavell, R. A. (2002). "Transforming growth factor-beta in T-cell biology." <u>Nat Rev Immunol</u> **2**(1): 46-53.

Gray, P. C., et al. (2006). "Cripto binds transforming growth factor beta (TGF-beta) and inhibits TGF-beta signaling." <u>Mol Cell Biol</u> **26**(24): 9268-78.

Harrington, A. E., et al. (2006). "Structural basis for the inhibition of activin signalling by follistatin." <u>EMBO J</u> **25**(5): 1035-45.

Hayette, S., et al. (1998). "FLRG (follistatin-related gene), a new target of chromosomal rearrangement in malignant blood disorders." <u>Oncogene</u> **16**(22): 2949-54.

Heine, U., et al. (1987). "Role of transforming growth factor-beta in the development of the mouse embryo." <u>J Cell Biol</u> **105**(6 Pt 2): 2861-76.

Hempel, N., et al. (2008). "Expression of the type III TGF-beta receptor is negatively regulated by TGF-beta." <u>Carcinogenesis</u> **29**(5): 905-12.

Herbelin, A., et al. (1998). "Mature mainstream TCR alpha beta+CD4+ thymocytes expressing L-selectin mediate "active tolerance" in the nonobese diabetic mouse." <u>J</u> <u>Immunol</u> **161**(5): 2620-8.

Herber, D., et al. (2007). "IL-21 has a pathogenic role in a lupus-prone mouse model and its blockade with IL-21R.Fc reduces disease progression." <u>J Immunol</u> **178**(6): 3822-30.

Hori, S., et al. (2003). "Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3." <u>Science</u> **299**(5609): 1057-61.

Huang, W., et al. (2004). "Requirement of interleukin-17A for systemic anti-Candida albicans host defense in mice." <u>J Infect Dis</u> **190**(3): 624-31.

Huber, S., et al. (2004). "Cutting edge: TGF-beta signaling is required for the in vivo expansion and immunosuppressive capacity of regulatory CD4+CD25+ T cells." J Immunol **173**(11): 6526-31.

Huber, S., et al. (2008). "P38 MAP kinase signaling is required for the conversion of CD4+CD25- T cells into iTreg." <u>PLoS ONE</u> **3**(10): e3302.

Huber, S., et al. (in press). "Activin A promotes the TGF-beta induced conversion of CD4+CD25- T cells into Foxp3+ iTreg" <u>The Journal of Immunology</u>.

Ikeuchi, H., et al. (2005). "Expression of interleukin-22 in rheumatoid arthritis: potential role as a proinflammatory cytokine." <u>Arthritis Rheum</u> **52**(4): 1037-46.

Ivanov, II, et al. (2006). "The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells." <u>Cell</u> **126**(6): 1121-33.

Jones, K. L., et al. (2007). "Activin A is a critical component of the inflammatory response, and its binding protein, follistatin, reduces mortality in endotoxemia." <u>Proc</u> <u>Natl Acad Sci U S A</u> **104**(41): 16239-44.

Kang, Q., et al. (2004). "Characterization of the distinct orthotopic bone-forming activity of 14 BMPs using recombinant adenovirus-mediated gene delivery." <u>Gene Ther</u> **11**(17): 1312-20.

Kehrl, J. H., et al. (1986). "Transforming growth factor beta is an important immunomodulatory protein for human B lymphocytes." <u>J Immunol</u> **137**(12): 3855-60.

Kehrl, J. H., et al. (1986). "Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth." <u>J Exp Med</u> **163**(5): 1037-50.

Kelly, M. N., et al. (2005). "Interleukin-17/interleukin-17 receptor-mediated signaling is important for generation of an optimal polymorphonuclear response against Toxoplasma gondii infection." Infect Immun **73**(1): 617-21.

Khattri, R., et al. (2003). "An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells." <u>Nat Immunol</u> **4**(4): 337-42.

King, C., et al. (2004). "Homeostatic expansion of T cells during immune insufficiency generates autoimmunity." <u>Cell</u> **117**(2): 265-77.

Kojima, A., et al. (1976). "Spontaneous development of autoimmune thyroiditis in neonatally thymectomized mice." <u>Lab Invest</u> **34**(6): 550-7.

Kojima, A., et al. (1980). "Experimental production of possible autoimmune castritis followed by macrocytic anemia in athymic nude mice." <u>Lab Invest</u> **42**(4): 387-95.

Koleva, R. I., et al. (2006). "Endoglin structure and function: Determinants of endoglin phosphorylation by transforming growth factor-beta receptors." <u>J Biol Chem</u> **281**(35): 25110-23.

Komiyama, Y., et al. (2006). "IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis." <u>J Immunol</u> **177**(1): 566-73.

Korn, T., et al. (2007). "IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells." <u>Nature</u> **448**(7152): 484-7.

Krieglstein, K., et al. (1995). "Neural functions of the transforming growth factors beta." Int J Dev Neurosci **13**(3-4): 301-15.

Krieglstein, K., et al. (1998). "Glial cell line-derived neurotrophic factor requires transforming growth factor-beta for exerting its full neurotrophic potential on peripheral and CNS neurons." <u>J Neurosci</u> **18**(23): 9822-34.

Kulkarni, A. B., et al. (1993). "Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **90**(2): 770-4.

Kullberg, M. C., et al. (2005). "TGF-beta1 production by CD4+ CD25+ regulatory T cells is not essential for suppression of intestinal inflammation." <u>Eur J Immunol</u> **35**(10): 2886-95.

Kumar, T. R. (2005). "Too many follistatins: racing inside and getting out of the cell." <u>Endocrinology</u> **146**(12): 5048-51.

Lane, K. B., et al. (2000). "Heterozygous germline mutations in BMPR2, encoding a TGF-beta receptor, cause familial primary pulmonary hypertension. The International PPH Consortium." <u>Nat Genet</u> **26**(1): 81-4.

Langrish, C. L., et al. (2005). "IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation." <u>J Exp Med</u> **201**(2): 233-40.

Lawrence, D. A., et al. (1984). "Normal embryo fibroblasts release transforming growth factors in a latent form." <u>J Cell Physiol</u> **121**(1): 184-8.

Lebrin, F., et al. (2004). "Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGFbeta/ALK1 signal transduction." <u>EMBO J</u> **23**(20): 4018-28.

Lehnert, S. A. und Akhurst, R. J. (1988). "Embryonic expression pattern of TGF beta type-1 RNA suggests both paracrine and autocrine mechanisms of action." <u>Development</u> **104**(2): 263-73.

Lewis, K. A., et al. (2000). "Betaglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signalling." <u>Nature</u> **404**(6776): 411-4.

Li, M. O., et al. (2006). "Transforming growth factor-beta controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms." <u>Immunity</u> **25**(3): 455-71.

Li, M. O., et al. (2007). "T cell-produced transforming growth factor-beta1 controls T cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell differentiation." <u>Immunity</u> **26**(5): 579-91.

Liang, S. C., et al. (2006). "Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides." <u>J Exp Med</u> **203**(10): 2271-9.

Liang, S. C., et al. (2007). "An IL-17F/A heterodimer protein is produced by mouse Th17 cells and induces airway neutrophil recruitment." <u>J Immunol</u> **179**(11): 7791-9.

Licona, P., et al. (2006). "Inhibins are the major activin ligands expressed during early thymocyte development." <u>Dev Dyn</u> **235**(4): 1124-32.

Ling, N., et al. (1986). "Pituitary FSH is released by a heterodimer of the beta-subunits from the two forms of inhibin." <u>Nature</u> **321**(6072): 779-82.

Ling, N., et al. (1986). "A homodimer of the beta-subunits of inhibin A stimulates the secretion of pituitary follicle stimulating hormone." <u>Biochem Biophys Res Commun</u> **138**(3): 1129-37.

Liu, Y., et al. (2008). "A critical function for TGF-beta signaling in the development of natural CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells." <u>Nat Immunol</u>.

Lock, C., et al. (2002). "Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis." <u>Nat Med</u> **8**(5): 500-8.

Lopez-Casillas, F., et al. (1993). "Betaglycan presents ligand to the TGF beta signaling receptor." <u>Cell</u> **73**(7): 1435-44.

Lopez-Coviella, I., et al. (2000). "Induction and maintenance of the neuronal cholinergic phenotype in the central nervous system by BMP-9." <u>Science</u> **289**(5477): 313-6.

Lubberts, E. (2003). "The role of IL-17 and family members in the pathogenesis of arthritis." <u>Curr Opin Investig Drugs</u> **4**(5): 572-7.

Lucas, P. J., et al. (2000). "Disruption of T cell homeostasis in mice expressing a T cell-specific dominant negative transforming growth factor beta II receptor." <u>J Exp Med</u> **191**(7): 1187-96.

Machado, R. D., et al. (2001). "BMPR2 haploinsufficiency as the inherited molecular mechanism for primary pulmonary hypertension." <u>Am J Hum Genet</u> **68**(1): 92-102.

Maeshima, A., et al. (2008). "Activin A: autocrine regulator of kidney development and repair." <u>Endocr J</u> **55**(1): 1-9.

Maguer-Satta, V., et al. (2001). "Expression of FLRG, a novel activin A ligand, is regulated by TGF-beta and during hematopoiesis [corrected]." <u>Exp Hematol</u> **29**(3): 301-8.

Majumdar, M. K., et al. (2001). "BMP-2 and BMP-9 promotes chondrogenic differentiation of human multipotential mesenchymal cells and overcomes the inhibitory effect of IL-1." J Cell Physiol **189**(3): 275-84.

Mamura, M., et al. (2004). "CD28 disruption exacerbates inflammation in Tgf-beta1-/mice: in vivo suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells independent of autocrine TGF-beta1." <u>Blood</u> **103**(12): 4594-601.

Mangan, P. R., et al. (2006). "Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage." <u>Nature</u> **441**(7090): 231-4.

Marie, J. C., et al. (2005). "TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells." <u>J Exp Med</u> **201**(7): 1061-7.

Marie, J. C., et al. (2006). "Cellular mechanisms of fatal early-onset autoimmunity in mice with the T cell-specific targeting of transforming growth factor-beta receptor." Immunity **25**(3): 441-54.

Massague, J., et al. (2000). "TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders." <u>Cell</u> **103**(2): 295-309.

Mazerbourg, S., et al. (2005). "Identification of receptors and signaling pathways for orphan bone morphogenetic protein/growth differentiation factor ligands based on genomic analyses." J Biol Chem **280**(37): 32122-32.

Mazerbourg, S. und Hsueh, A. J. (2006). "Genomic analyses facilitate identification of receptors and signalling pathways for growth differentiation factor 9 and related orphan bone morphogenetic protein/growth differentiation factor ligands." <u>Hum Reprod Update</u> **12**(4): 373-83.

McGrath, S. A., et al. (1995). "Oocyte-specific expression of growth/differentiation factor-9." Mol Endocrinol **9**(1): 131-6.

McKenzie, B. S., et al. (2006). "Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway." <u>Trends Immunol</u> **27**(1): 17-23.

McPherron, A. C., et al. (1997). "Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member." <u>Nature</u> **387**(6628): 83-90.

McPherron, A. C., et al. (1999). "Regulation of anterior/posterior patterning of the axial skeleton by growth/differentiation factor 11." <u>Nat Genet</u> **22**(3): 260-4.

Mellor, A. L. und Munn, D. (2004). "Policing pregnancy: Tregs help keep the peace." <u>Trends Immunol</u> **25**(11): 563-5.

Miller, A. F., et al. (2000). "Bone morphogenetic protein-9. An autocrine/paracrine cytokine in the liver." J Biol Chem **275**(24): 17937-45.

Miyamae, T., et al. (2006). "Follistatin-like protein-1 is a novel proinflammatory molecule." J Immunol **177**(7): 4758-62.

Monteleone, G., et al. (2005). "Interleukin-21 enhances T-helper cell type I signaling and interferon-gamma production in Crohn's disease." <u>Gastroenterology</u> **128**(3): 687-94.

Moses, H. L., et al. (1981). "Transforming growth factor production by chemically transformed cells." <u>Cancer Res</u> **41**(7): 2842-8.

Moustakas, A., et al. (2001). "Smad regulation in TGF-beta signal transduction." <u>J Cell</u> <u>Sci</u> **114**(Pt 24): 4359-69.

Moustakas, A. und Heldin, C. H. (2005). "Non-Smad TGF-beta signals." <u>J Cell Sci</u> **118**(Pt 16): 3573-84.

Mukherjee, A., et al. (2007). "FSTL3 deletion reveals roles for TGF-beta family ligands in glucose and fat homeostasis in adults." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **104**(4): 1348-53.

Munn, D. H. und Mellor, A. L. (2004). "IDO and tolerance to tumors." <u>Trends Mol Med</u> **10**(1): 15-8.

Murphy, C. A., et al. (2003). "Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation." <u>J Exp Med</u> **198**(12): 1951-7. Nakamura, K., et al. (2001). "Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta." <u>J Exp Med</u> **194**(5): 629-44.

Nakamura, T., et al. (1990). "Activin-binding protein from rat ovary is follistatin." <u>Science</u> **247**(4944): 836-8.

Nurieva, R., et al. (2007). "Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells." <u>Nature</u> **448**(7152): 480-3.

Oh, S. P., et al. (2002). "Activin type IIA and IIB receptors mediate Gdf11 signaling in axial vertebral patterning." <u>Genes Dev</u> **16**(21): 2749-54.

Ouyang, W., et al. (2008). "The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation." Immunity **28**(4): 454-67.

Ozaki, K., et al. (2002). "A critical role for IL-21 in regulating immunoglobulin production." <u>Science</u> **298**(5598): 1630-4.

Ozaki, K., et al. (2004). "Regulation of B cell differentiation and plasma cell generation by IL-21, a novel inducer of Blimp-1 and Bcl-6." <u>J Immunol</u> **173**(9): 5361-71.

Pandiyan, P., et al. (2007). "CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells." <u>Nat Immunol</u> **8**(12): 1353-62.

Parrish-Novak, J., et al. (2000). "Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function." <u>Nature</u> **408**(6808): 57-63.

Pen, A., et al. (2008). "Glioblastoma-secreted factors induce IGFBP7 and angiogenesis by modulating Smad-2-dependent TGF-beta signaling." <u>Oncogene</u>.

Peng, Y., et al. (2004). "TGF-beta regulates in vivo expansion of Foxp3-expressing CD4+CD25+ regulatory T cells responsible for protection against diabetes." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **101**(13): 4572-7.

Pesu, M., et al. (2008). "T-cell-expressed proprotein convertase furin is essential for maintenance of peripheral immune tolerance." <u>Nature</u>.

Puccetti, P. und Grohmann, U. (2007). "IDO and regulatory T cells: a role for reverse signalling and non-canonical NF-kappaB activation." <u>Nat Rev Immunol</u> **7**(10): 817-23.

Rebbapragada, A., et al. (2003). "Myostatin signals through a transforming growth factor beta-like signaling pathway to block adipogenesis." <u>Mol Cell Biol</u> **23**(20): 7230-42.

Robertson, D. M., et al. (1987). "The isolation of polypeptides with FSH suppressing activity from bovine follicular fluid which are structurally different to inhibin." <u>Biochem</u> <u>Biophys Res Commun</u> **149**(2): 744-9.

Roebroek, A. J., et al. (1998). "Failure of ventral closure and axial rotation in embryos lacking the proprotein convertase Furin." <u>Development</u> **125**(24): 4863-76.

Roncarolo, M. G., et al. (2006). "Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans." <u>Immunol Rev</u> **212**: 28-50.

Rosendahl, A., et al. (2003). "Transforming growth factor-beta- and Activin-Smad signaling pathways are activated at distinct maturation stages of the thymopoeisis." <u>Int Immunol</u> **15**(12): 1401-14.

Ruan, W., et al. (2007). "IGFBP7 plays a potential tumor suppressor role in colorectal carcinogenesis." <u>Cancer Biol Ther</u> **6**(3): 354-9.

Saito, S., et al. (2005). "Differential biosynthesis and intracellular transport of follistatin isoforms and follistatin-like-3." <u>Endocrinology</u> **146**(12): 5052-62.

Sawalha, A. H., et al. (2008). "Genetic association of interleukin-21 polymorphisms with systemic lupus erythematosus." <u>Ann Rheum Dis</u> **67**(4): 458-61.

Scheffold, A., et al. (2007). "Competition for cytokines: T(reg) cells take all." <u>Nat</u> <u>Immunol</u> **8**(12): 1285-7.

Scheller, J. und Rose-John, S. (2006). "Interleukin-6 and its receptor: from bench to bedside." <u>Med Microbiol Immunol</u> **195**(4): 173-83.

Schneyer, A., et al. (2001). "Follistatin-related protein (FSRP): a new member of the follistatin gene family." <u>Mol Cell Endocrinol</u> **180**(1-2): 33-8.

Schneyer, A., et al. (2004). "Differential actions of follistatin and follistatin-like 3." <u>Mol</u> <u>Cell Endocrinol</u> **225**(1-2): 25-8.

Schramm, C., et al. (2003). "Impairment of TGF-beta signaling in T cells increases susceptibility to experimental autoimmune hepatitis in mice." <u>Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol</u> **284**(3): G525-35.

Shao, L., et al. (1992). "Regulation of production of activin A in human marrow stromal cells and monocytes." <u>Exp Hematol</u> **20**(10): 1235-42.

Shimizu, J., et al. (2002). "Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance." <u>Nat Immunol</u> **3**(2): 135-42.

Shull, M. M., et al. (1992). "Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease." <u>Nature</u> **359**(6397): 693-9.

Strengell, M., et al. (2002). "IL-21 up-regulates the expression of genes associated with innate immunity and Th1 response." <u>J Immunol</u> **169**(7): 3600-5.

Sun, P. D. und Davies, D. R. (1995). "The cystine-knot growth-factor superfamily." <u>Annu Rev Biophys Biomol Struct</u> 24: 269-91.

Suto, A., et al. (2002). "Interleukin 21 prevents antigen-induced IgE production by inhibiting germ line C(epsilon) transcription of IL-4-stimulated B cells." <u>Blood</u> **100**(13): 4565-73.

Taguchi, O., et al. (1980). "Autoimmune oophoritis in thymectomized mice: detection of circulating antibodies against oocytes." <u>Clin Exp Immunol</u> **40**(3): 540-53.

Taguchi, O. und Nishizuka, Y. (1981). "Experimental autoimmune orchitis after neonatal thymectomy in the mouse." <u>Clin Exp Immunol</u> **46**(2): 425-34.

Takahashi, T., et al. (1998). "Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state." <u>Int Immunol</u> **10**(12): 1969-80.

Takahashi, T., et al. (2000). "Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4." <u>J Exp Med</u> **192**(2): 303-10.

Tang, Q., et al. (2004). "Distinct roles of CTLA-4 and TGF-beta in CD4+CD25+ regulatory T cell function." <u>Eur J Immunol</u> **34**(11): 2996-3005.

Tang, Q., et al. (2006). "Visualizing regulatory T cell control of autoimmune responses in nonobese diabetic mice." <u>Nat Immunol</u> **7**(1): 83-92.

Tang, Q. und Bluestone, J. A. (2008). "The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation." <u>Nat Immunol</u> **9**(3): 239-44.

Taylor, N. A., et al. (2003). "Curbing activation: proprotein convertases in homeostasis and pathology." <u>FASEB J</u> **17**(10): 1215-27.

te Velde, A. A., et al. (2007). "Comparative analysis of colonic gene expression of three experimental colitis models mimicking inflammatory bowel disease." <u>Inflamm Bowel Dis</u> **13**(3): 325-30.

Teunissen, M. B., et al. (1998). "Interleukin-17 and interferon-gamma synergize in the enhancement of proinflammatory cytokine production by human keratinocytes." <u>J</u> Invest Dermatol **111**(4): 645-9.

Thompson, T. B., et al. (2005). "The structure of the follistatin:activin complex reveals antagonism of both type I and type II receptor binding." <u>Dev Cell</u> **9**(4): 535-43.

Thornton, A. M. und Shevach, E. M. (1998). "CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production." J Exp Med **188**(2): 287-96.

Tivol, E. A., et al. (1995). "Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4." <u>Immunity</u> **3**(5): 541-7.

Tone, Y., et al. (2008). "Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer." <u>Nat Immunol</u> **9**(2): 194-202.

Tortoriello, D. V., et al. (2001). "Human follistatin-related protein: a structural homologue of follistatin with nuclear localization." <u>Endocrinology</u> **142**(8): 3426-34.

Tsuchida, K., et al. (2000). "Identification and characterization of a novel follistatin-like protein as a binding protein for the TGF-beta family." <u>J Biol Chem</u> **275**(52): 40788-96.

Tung, K. S., et al. (1987). "Murine autoimmune oophoritis, epididymoorchitis, and gastritis induced by day 3 thymectomy. Autoantibodies." <u>Am J Pathol</u> **126**(2): 303-14.

Tung, K. S., et al. (1987). "Murine autoimmune oophoritis, epididymoorchitis, and gastritis induced by day 3 thymectomy. Immunopathology." <u>Am J Pathol</u> **126**(2): 293-302.

Tzartos, J. S., et al. (2008). "Interleukin-17 production in central nervous systeminfiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis." <u>Am J Pathol</u> **172**(1): 146-55.

Ueno, N., et al. (1987). "Isolation and partial characterization of follistatin: a singlechain Mr 35,000 monomeric protein that inhibits the release of follicle-stimulating hormone." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **84**(23): 8282-6.

Vale, W., et al. (1986). "Purification and characterization of an FSH releasing protein from porcine ovarian follicular fluid." <u>Nature</u> **321**(6072): 776-9.

Veldhoen, M., et al. (2006). "TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells." <u>Immunity</u> **24**(2): 179-89.

Vitt, U. A., et al. (2000). "Growth differentiation factor-9 stimulates proliferation but suppresses the follicle-stimulating hormone-induced differentiation of cultured granulosa cells from small antral and preovulatory rat follicles." <u>Biol Reprod</u> **62**(2): 370-7.

von Boehmer, H. und Nolting, J. (2008). "What turns on Foxp3?" Nat Immunol 9(2): 121-2.

Waldmann, T. A. (1986). "The structure, function, and expression of interleukin-2 receptors on normal and malignant lymphocytes." <u>Science</u> **232**(4751): 727-32.

Walker, M. R., et al. (2003). "Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25- T cells." <u>J Clin Invest</u> **112**(9): 1437-43.

Wan, Y. Y. und Flavell, R. A. (2005). "Identifying Foxp3-expressing suppressor T cells with a bicistronic reporter." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **102**(14): 5126-31.

Wan, Y. Y. und Flavell, R. A. (2007). "Yin-Yang' functions of transforming growth factor-beta and T regulatory cells in immune regulation." <u>Immunol Rev</u> **220**: 199-213.

Waterhouse, P., et al. (1995). "Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctla-4." <u>Science</u> **270**(5238): 985-8.

Weaver, C. T., et al. (2006). "Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties." <u>Immunity</u> **24**(6): 677-88.

Wildin, R. S., et al. (2001). "X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy." <u>Nat Genet</u> **27**(1): 18-20.

Wilson, N. J., et al. (2007). "Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells." <u>Nat Immunol</u> **8**(9): 950-7.

Wolk, K., et al. (2004). "IL-22 increases the innate immunity of tissues." <u>Immunity</u> **21**(2): 241-54.

Wolk, K., et al. (2006). "IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis." <u>Eur J Immunol</u> **36**(5): 1309-23.

Wynn, T. A. (2008). "Cellular and molecular mechanisms of fibrosis." <u>J Pathol</u> **214**(2): 199-210.

Yanagita, M. (2005). "BMP antagonists: their roles in development and involvement in pathophysiology." <u>Cytokine Growth Factor Rev</u> **16**(3): 309-17.

Yao, Z., et al. (1995). "Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells." <u>J Immunol</u> **155**(12): 5483-6.

Ye, P., et al. (2001). "Interleukin-17 and lung host defense against Klebsiella pneumoniae infection." <u>Am J Respir Cell Mol Biol</u> **25**(3): 335-40.

Yi, H., et al. (2006). "The phenotypic characterization of naturally occurring regulatory CD4+CD25+ T cells." <u>Cell Mol Immunol</u> **3**(3): 189-95.

You, S., et al. (2006). "Transforming growth factor-beta and T-cell-mediated immunoregulation in the control of autoimmune diabetes." <u>Immunol Rev</u> **212**: 185-202.

Yunis, E. J., et al. (1967). "Postthymectomy wasting associated with autoimmune phenomena. I. Antiglobulin-positive anemia in A and C57BL-6 Ks mice." <u>J Exp Med</u> **125**(5): 947-66.

Zheng, Y., et al. (2007). "Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis." <u>Nature</u> **445**(7128): 648-51.

Zhou, L., et al. (2007). "IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways." <u>Nat Immunol</u> **8**(9): 967-74.

Zhou, L., et al. (2008). "TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgammat function." <u>Nature</u> **453**(7192): 236-40.

VIII. Danksagung

Diese Arbeit wurde von 2007 bis 2008 im Rahmen eines Promotionsstipendiums des Graduiertenkolleg "Entzündung und Regeneration" der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Ansgar W. Lohse, Herrn PD Christoph Schramm und Herrn PD Johannes Herkel durchgeführt.

Herrn PD Christoph Schramm möchte ich für die Überlassung des Themas, außerordentliche Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit sowie ständige Gesprächs- und Hilfsbereitschaft danken.

Herrn Dr. Samuel Huber danke ich für praktische und thematische Betreuung dieser Arbeit sowie ständige Gesprächs- und Hilfsbereitschaft.

Herrn PD Johannes Herkel danke ich für Hilfe bei experimentell-praktischen und theoretischen Fragen sowie ständige Gesprächs- und Hilfsbereitschaft.

Herrn Prof. Ansgar W. Lohse möchte ich für Unterstützung dieser Arbeit, kritische Begutachtung von Daten sowie theoretische Weiterbildung im Rahmen des Laborseminars danken.

Herrn Dr. Hans-Joachim Paust danke ich für außerordentliche Hilfsbereitschaft bei der Durchführung intrazellulärer Zytokinfärbungen.

Marcial Sebode danke ich für ständige Gesprächs- und Hilfsbereitschaft, sowie freundschaftliche Zusammenarbeit.

Antonella Carambia, Marc Lüthgehetmann und Dorothee Schwinge danke ich für ständige Gesprächs- und Hilfsbereitschaft.

Marko Hilken, Helga Reschke, Martina Schulz und Meike Petersen danke ich für technische Assistenz und ständige Gesprächs- und Hilfsbereitschaft.

Der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg danke ich für die Förderung im Rahmen des Graduiertenkollegs "Entzündung und Regeneration".

Mein besonderer Dank gilt Gaby und Rolf, Maria und Karl sowie Reinhilde und Adolf. Ihnen widme ich diese Arbeit.

IX. Lebenslauf

X. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Datum

Felix Rolf Stahl