

T-ZELL POLARISIERUNG BEI DER HUMANEN TUBERKULOSE:
CHARAKTERISIERUNG DER ROLLE VON SUPPRESSOR OF
CYTOKINE SIGNALING (SOCS)-3 BEI DER AKTIVIERUNG UND
DIFFERENZIERUNG VON CD4⁺ T-ZELLEN.

Dissertation

Zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften
des Fachbereichs Biologie, der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften,
der Universität Hamburg

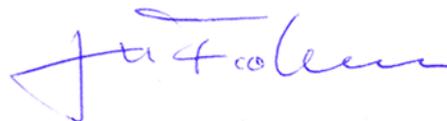
vorgelegt von

Katja Kleinsteuber
aus Chemnitz

Hamburg, 2012

Genehmigt vom Fachbereich Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Prof. Dr. B. FLEISCHER
Weitere Gutachterin der Dissertation:
Priv.-Doz. Dr. M. Breloer
Tag der Disputation: 23. März 2012

Hamburg, den 08. März 2012



Professor Dr. J. Fromm
Vorsitzender des Promotionsausschusses
Biologie

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	v
Abstract	vi
Abkürzungsverzeichnis	viii
1 Einleitung	1
1.1 Rolle von T-Zellen bei der Immunantwort	1
1.2 Aktivierung von T-Zellen	1
1.3 Polarisierung von CD4 ⁺ T-Zellen	3
1.3.1 T _H 1, T _H 2 und T _H 17 Zellen	3
1.3.2 Differenzierung von CD4 ⁺ T-Zellen	4
1.3.3 Der JAK/STAT-Signalweg	4
1.3.4 Rolle von STAT-Molekülen bei der Differenzierung von CD4 ⁺ T-Zellen	5
1.3.5 Die Familie der SOCS Proteine	6
1.3.6 Regulation von CD4 ⁺ T-Zellen durch SOCS3	7
1.4 Die humane Tuberkulose	8
1.5 Kontrolle von <i>M. tuberculosis</i> durch das Immunsystem	9
1.5.1 Alveolare Makrophagen	9
1.5.2 T-Zell Antwort	10
1.5.3 Granulome	12
1.5.4 Verlust der Immunkontrolle	12
1.6 „Erschöpfung“ von T-Zellen	12
1.7 SOCS3 Expression in T-Zellen von Tuberkulose-Patienten und LTBI	14
1.8 Zielsetzung	14
2 Material	16
2.1 Antikörper und Apoptosemarker	16
2.2 Enzyme	17
2.3 Geräte	17
2.4 Kits	18
2.5 Oligonukleotide	18
2.6 Peptide	18
2.7 Plasmide	19

2.8	Puffer und Medien	19
2.8.1	Zellkultur- und Nährmedien	19
2.8.2	Westernblot	20
2.8.3	Durchflusszytometrie	22
2.8.4	sonstige Lösungen	23
2.8.5	Weitere Chemikalien und Lösungen	23
2.9	Software	23
2.10	Stimulantien	24
2.11	Verbrauchsmaterialien	24
3	Methoden	26
3.1	Spender	26
3.2	Isolierung von PBMCs aus Vollblut oder Buffycoat	26
3.3	Kryokonservierung von PBMCs und Zelllinien	26
3.4	Bestimmung der Zellzahl	27
3.5	Oberflächenfärbung von PBMCs und T-Zellen für die Durchflusszytometrie	27
3.6	Intrazelluläre Färbung von PBMCs und T-Zellen für die Durchflusszytometrie	27
3.7	Fluoreszenzmarkierung des anti-SOCS3 Antikörpers	28
3.8	Durchflusszytometrische Analyse der SOCS3 Expression	29
3.9	Magnetisch aktivierte Zell-Sortierung (MACS)	29
3.10	<i>In vitro</i> Stimulation von PBMCs und T-Zellen	29
	Stimulation von PBMCs für die Quantifizierung der SOCS3 Expression	29
	Restimulation zur Bestimmung des Zytokinprofils von T-Zell Klonen	30
3.11	T-Zell-Makrophagen Koinkubation	30
3.12	T-Zell-Klonierung von CD4 ⁺ CD161 ⁺ T-Zellen mittels Einzelzellsortierung	31
3.13	Transformation von <i>E. coli</i> mit der KCM-Methode	32
3.14	Plasmidpräparationen aus <i>E. coli</i>	32
3.15	SOCS3 Westernblot	32
3.16	Modulierung der SOCS3 Expression in humanen primären CD4 ⁺ T-Zellen durch lentivirale Transduktion	33
	3.16.1 Klonierung von humanem SOCS3 in LeGO-iG2	35
	3.16.2 Klonierung von SOCS3-spezifischen shRNAs in LeGO-G	36
	3.16.3 Kultivierung von HEK293T-Zellen	37
	3.16.4 Herstellung von lentiviralen Partikeln	39
	3.16.5 Transduktion von CD4 ⁺ T-Zellen mit lentiviralen Partikeln	40
	Stimulation der T-Zellen	40
	Retronektin-Transduktion	40
	Spin-Infektion	41

3.16.6	Durchflusszytometrische Analyse der transduzierten Zellen	41
3.17	Markierung von CD4 ⁺ T-Zellen mit <i>Cell Proliferation Dye 649</i>	41
3.18	Apoptosefärbung	42
3.19	Cytometric Bead Array (CBA)	42
3.20	Durchflusszytometrische Analyse der STAT-Phosphorylierung	43
3.21	Statistische Analyse	44
4	Ergebnisse	45
4.1	SOCS3 Expression in humanen T-Zellen und polarisierten T-Zell Klonen	45
4.1.1	Etablierung einer durchflusszytometrischen Methode zur Analyse der intrazellulären SOCS3 Proteinkonzentration	45
4.1.2	Vergleich der SOCS3 <i>ex vivo</i> Expression in primären, humanen T-Zell-Subpopulationen	47
4.1.3	Expression von SOCS3 in aktivierten T-Zellen nach <i>in vitro</i> Stimulation	48
4.1.4	Expression von SOCS3 in T-Zellen nach Koinkubation mit Mykobakterieninfizierten Makrophagen	48
4.1.5	Expression von SOCS3 in zytokinproduzierenden CD4 ⁺ T-Zellen nach Kurzzeitstimulation	50
4.1.6	Expression von SOCS3 in T-Zell Klonen mit distinktem Zytokinprofil	52
4.1.7	Expression von SOCS3 in Vorläufern von T _H 17 Zellen	54
4.2	Modulierung der SOCS3 Expression in primären, humanen CD4 ⁺ T-Zellen mittels lentiviraler Transduktion	54
4.2.1	Etablierung lentiviraler Transduktion von CD4 ⁺ T-Zellen	55
	Tranduktion von CD4 ⁺ T-Zellen mit unterschiedlichen Viruskonzentrationen	55
	Vergleich von Retronektin-basierter Transduktion und <i>Spin</i> -Infektion	56
	Optimierung der T-Zell Aktivierung vor der Transduktion	57
4.2.2	Transduktionseffizienz und SOCS3 Expression in CD4 ⁺ T-Zellen nach lentiviraler Transduktion	57
4.2.3	SOCS3 hemmt die Proliferation von transduzierten CD4 ⁺ T-Zellen	58
4.2.4	Kein Einfluss von SOCS3 auf die Apoptose transduzierter CD4 ⁺ T-Zellen	60
4.2.5	Geringer Einfluss von SOCS3 auf die Aktivierbarkeit der transduzierten CD4 ⁺ T-Zellen	62
4.2.6	SOCS3 induziert erhöhte IL-17 Expression in transduzierten CD4 ⁺ T-Zellen	63
4.2.7	SOCS3 blockiert STAT3, STAT4 und STAT5 Phosphorylierung in transduzierten CD4 ⁺ T-Zellen	65
4.2.8	<i>Knock-down</i> von SOCS3 in CD4 ⁺ T-Zellen mittels shRNA	66
4.3	Einfluss von IL-7 auf die SOCS3 Expression humaner CD4 ⁺ T-Zellen	67

4.3.1	IL-7 verbessert die Viabilität und Proliferation von CD4 ⁺ T-Zellen in der <i>in vitro</i> Kultur	67
4.3.2	IL-7 reduziert die SOCS3 Expression von CD4 ⁺ T-Zellen	67
4.3.3	IL-7 hat keinen Einfluss auf den antiproliferativen Effekt von SOCS3 auf transduzierte CD4 ⁺ T-Zellen	68
5	Diskussion	71
5.1	SOCS3 Expression in T-Zell-Subpopulationen und nach T-Zell-Aktivierung	72
5.2	Einfluss der SOCS3 Expression auf die T-Zell Polarisierung	73
5.3	T _H 17 Polarisierung in der Tuberkulose-Infektion	77
5.4	Einfluss der SOCS3 Expression auf die T-Zell Proliferation	77
5.5	Einfluss von IL-7 auf die SOCS3 Expression	78
5.6	Ausblick	79
6	Anhang	80
6.1	Nukleotidsequenz humanes SOCS3, mRNA (NM_003955)	80
	Abbildungsverzeichnis	81
	Danksagung	92

Zusammenfassung

CD4⁺ T-Zellen spielen eine zentrale Rolle bei der Immunantwort gegen Infektionen. Insbesondere bei der Tuberkulose, ausgelöst durch das intrazelluläre Bakterium *Mycobacterium tuberculosis*, wird der effektive Immunschutz durch CD4⁺ T-Zellen vermittelt. IFN γ -produzierende T_H1 Zellen haben hierbei einen entscheidenden Anteil. Die meisten *M. tuberculosis*-infizierten Personen sind durch eine funktionale T-Zell Antwort geschützt, aber etwa 5 - 10 % der Infizierten entwickeln im Laufe ihres Lebens eine aktive Tuberkulose.

SOCS3 reguliert den Zytokin-induzierten JAK/STAT-Signalweg und ist mit der T-Zell-Aktivierung und -Polarisierung assoziiert. Eine hohe Expression von SOCS3 in T-Zellen korreliert mit einer aktiven Tuberkulose-Erkrankung, während eine niedrige SOCS3 Expression mit dem Immunschutz korreliert. Außerdem spielt SOCS3 in chronisch viralen Infektionen eine zentrale Rolle bei der sogenannten „Erschöpfung“ (*exhaustion*) von T-Zellen, die eine funktionelle Immunantwort verhindert.

In dieser Arbeit sollten die Regulationsmechanismen von SOCS3 für die Aktivierung und Polarisierung von humanen CD4⁺ T-Zellen gesunder Spender und latent *M. tuberculosis* infizierter Personen (LTBI) untersucht werden. Hierfür wurde eine quantitative SOCS3-Proteinanalyse, basierend auf der Durchflusszytometrie, entwickelt, um die SOCS3 Expression in primären T-Zellen und T-Zell Klonen zu bestimmen. SOCS3 war *ex vivo* in T-Zellen exprimiert und die *M. tuberculosis*-spezifische Aktivierung der T-Zellen führte zur Erhöhung der SOCS3 Expression. Die Koinkubation von *M. tuberculosis*-spezifischen PBMCs und Mykobakterien-infizierten autologen Makrophagen führte dagegen zu einer transienten Reduktion der SOCS3 Expression. Die Polarisierung von CD4⁺ T-Zellen zu T_H2 und T_H17 T-Zell Klonen war mit einer Erhöhung der SOCS3 Expression assoziiert. Diese Zunahme wurde auch in T_H17 Vorläuferzellen (CD161⁺ T-Zellen) nachgewiesen. Mit Hilfe eines lentiviralen Transduktionsansatzes wurde das SOCS3 Protein in primären T-Zellen überexprimiert, was zu einer Zunahme der Expression von IL-17 führte. Zusätzlich inhibierte die erhöhte SOCS3 Expression die Proliferation der T-Zellen, was ein Hinweis auf eine „Erschöpfung“ dieser T-Zellen ist.

IL-7, ein beschriebener Inhibitor der SOCS3 Expression und Modulator der murinen T-Zell „Erschöpfung“, hatte einen positiven Einfluss auf die Viabilität und Proliferation humaner CD4⁺ T-Zellen. Dieser Effekt wurde allerdings nicht in T-Zellen beobachtet, die exogen SOCS3 überexprimierten.

Diese Studie zeigt, dass die SOCS3 Regulation in T-Zellen ein wichtiger Prozess bei der Immunpolarisierung ist, was einen Einfluss auf die Immunantwort während der *M. tuberculosis* Infektion haben könnte. Auch die Bedeutung der SOCS3-induzierten T-Zell „Erschöpfung“ sollte als Faktor bei der Tuberkulose in Betracht gezogen werden. In diesem Fall könnte eine Behandlung mit IL-7 bei der Tuberkulose positive Effekte haben.

Abstract

CD4⁺ T cells are crucial for the immune response against several infectious diseases, especially tuberculosis, which is caused by the intracellular bacterium *Mycobacterium tuberculosis*. Most *M. tuberculosis*-infected people are latently infected without developing any symptoms. Only about 5 - 10 % of infected people develop active tuberculosis during lifetime. For an efficient immune response CD4⁺ T helper type 1 (T_H1) cells, producing the effector cytokine IFN γ , are essential.

SOCS3 regulates cytokine-induced JAK/STAT signaling and affects the regulation of T-cell activation and polarization. In tuberculosis infection a high SOCS3 expression correlates with active tuberculosis disease, while a low SOCS3 expression indicates a protective immune response. Additionally SOCS3 induces T-cell exhaustion in chronic viral infections, that impairs the functional immune response.

In this study regulation of human CD4⁺ T-cell activation and polarization was analyzed in T-cells from healthy donors and latently *M. tuberculosis*-infected persons (LTBI) to characterize the influence of SOCS3 expression on the *M. tuberculosis*-specific immune response. For analysis of SOCS3 expression in primary T cells and T-cell clones, a flow cytometry-based quantitative assay was established. SOCS3 was expressed in T cells *ex vivo*, and mycobacteria-specific activation of T cells caused an upregulation of SOCS3 expression. Coincubation of *M. tuberculosis*-specific PBMCs together with mycobacteria-infected autologous macrophages revealed a transient reduction of SOCS3 expression.

T-cell polarization towards T_H2 and T_H17 was associated with increased SOCS3 Expression. This was observed in T_H17 precursor cells (CD161⁺ T cells) as well. SOCS3 protein was overexpressed in primary T cells using a lentiviral transduction approach, thereby revealing an increased IL-17 expression. Additionally the overexpression of SOCS3 caused an inhibition of T-cell proliferation, which indicates exhaustion of the T cells.

Recently IL-7 was identified as a inhibitor of SOCS3 expression and modulator of murine T cell exhaustion. In the present study IL-7 had a beneficial effect on viability and proliferation of human T cells. However, this effect was not observed in T cells overexpressing SOCS3.

In conclusion these results indicate that regulation of SOCS3 in T cells is important for immune polarization and is therefore assumed to influence the immune response during *M. tuberculosis* infection. T-cell exhaustion may be involved in tuberculosis as well. These results indicate, that IL-7 might be beneficial for tuberculosis therapy.

Abkürzungsverzeichnis

APZ	Antigenpräsentierende Zelle
bp	Basenpaar
CD	Cluster of Differentiation
CMV	Cytomegalovirus
DC	<i>dendritic cell</i> (Dendritische Zelle)
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
eGFP	enhanced grün-fluoreszierendes Protein
ER	endoplasmatisches Retikulum
FKS	fötales Kälberserum
HBV	Hepatitis B Virus
HCV	Hepatitis C Virus
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HPI	Heinrich-Pette-Institut, Hamburg
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IRES	interne ribosomale Eintrittsstelle
kDa	Kilodalton
LCMV	Lymphozytäres Choriomeningitis Virus
LeGO	Lentiviral Gene Ontology
LTBI	latent Tuberkulose-infizierte Person
MDR	Multi Drug-Resistant
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MOI	<i>Multiplicity of Infection</i>
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i> (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerase-Ketten-Reaktion)
PFA	Paraformaldehyd
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
R	Rezeptor
RT	Raumtemperatur
SFFV	Spleen Focus-Forming Virus
SOCS3	Suppressor of Cytokine Signaling 3
TB	Tuberkulose
UKE	Universitätskrankenhaus Hamburg-Eppendorf
XDR	<i>Extensively Drug-Resistant</i>

1 Einleitung

1.1 Rolle von T-Zellen bei der Immunantwort

Die adaptive Immunantwort ist essentiell bei der Bekämpfung vieler Infektionserkrankungen. Die sogenannten T-Zellen (Thymus-gereifte Lymphozyten) sind hierbei entscheidend, da sie die adaptive Immunantwort koordinieren. Es werden zwei Hauptarten von T-Zellen unterschieden: die $CD4^+$ T-Helferzellen (T_H) und die $CD8^+$ zytotoxischen T-Zellen. Die wichtigsten Aufgaben der $CD4^+$ T-Zellen sind die Aktivierung von Makrophagen und anderen Immunzellen durch die Expression von Effektormolekülen (Zytokine) und die Regulation der B-Zell-Differenzierung (*Bone Marrow* (Knochenmark)-gereifte Lymphozyten) zur koordinierten Expression von pathogenspezifischen Antikörpern (zusammengefasst von Paul und Seder [1]). Eine weitere Art der $CD4^+$ T-Zellen, die sogenannten regulatorischen T-Zellen, beenden Immunreaktionen durch Inhibition von Effektor-T-Zellen [2]. Die Kontrolle der Immunreaktion durch inhibierende Mechanismen ist äußerst wichtig bei der Regulation einer Immunantwort, damit körpereigenen Zellen durch die immunologischen Effektorfunktionen nicht geschädigt werden. Eine solche Immunreaktion gegen das eigene Gewebe wird als Autoimmunität bezeichnet und kann zu schweren Krankheitsbildern führen (u. a. Multiple Sklerose, rheumatoide Arthritis und Systemischer Lupus Erythematosus).

Im Gegensatz zu $CD4^+$ T-Zellen ist die Hauptaufgabe der $CD8^+$ T-Zellen die direkte Eliminierung von entarteten und infizierten Zellen. Hierfür produzieren sie zytotoxische Proteine, wie Granzyme und Perforin, welche die Apoptose in der Zielzelle einleiten. Zusätzlich exprimieren $CD8^+$ T-Zellen Fas Ligand (FasL) auf der Zelloberfläche, welches über Interaktionen mit dem Todesrezeptor Fas, Caspasen in der Zielzelle aktiviert und so ebenfalls die Apoptose in der Zielzelle einleitet (zusammengefasst von Harty et al [3]).

1.2 Aktivierung von T-Zellen

Der T-Zell Rezeptor erkennt ausschließlich prozessierte Peptidantigene, die mit Molekülen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (*major histocompatibility complex*, MHC) assoziiert sind [4]. Der T-Zell-Rezeptor besteht aus einem kovalent verknüpften Heterodimer, das für die Antigenspezifität verantwortlich ist. Die Korezeptoren CD4 und CD8 sorgen für die optimale

Bindung an einen spezifischen MHC-Peptid-Komplex. Akzessorische Membranmoleküle, wie der CD3-Komplex, sind für die intrazelluläre Signaltransduktion essentiell.

Der T-Zell Rezeptor von CD4⁺ T-Zellen bindet spezifisch Peptid:MHC Klasse II Komplexe. Nur professionelle antigenpräsentierende Zellen (APZ), wie Dendritische Zellen (*dendritic cell*, DC), Monozyten/Makrophagen und B-Zellen, besitzen MHC II Moleküle. Die APZ präsentieren die Peptide auf der Zelloberfläche, nachdem die extrazellulären Antigene durch Endozytose aufgenommen, intrazellulär prozessiert und an MHC II Moleküle gebunden wurden [5].

Die Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen erfolgt durch die Bindung des T-Zell-Rezeptors an Peptid:MHC Klasse I Komplexe, die auf allen kernhaltigen Zellen vorkommen können. Die Peptidantigene entstehen aus zytosolischen Proteinen durch proteasomale Prozessierung und anschließende Bindung an MHC I Moleküle im endoplasmatischen Retikulum (ER) [6].

Die Aktivierung über den T-Zell-Rezeptor ist jedoch nicht ausreichend für die vollständige Aktivierung der T-Zellen. Sogenannte kostimulatorische Moleküle auf der Zelloberfläche von APZs vermitteln ein zweites, aktivierendes Signal. Zu den wichtigsten kostimulatorischen Molekülen gehören Mitglieder der B7-Familie, B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86), die von aktivierten APZ verstärkt exprimiert werden [7] und mit dem CD28-Moleküle auf der Oberfläche der T-Zellen interagieren (zusammengefasst von Lenschow et al [8]). Eine durch beide Signale vollständig aktivierte T-Zelle beginnt zu proliferieren und Effektorzytokine zu exprimieren [9]. Eines der wichtigsten Effektorzytokine ist IL-2, welches die Proliferation der T-Zellen durch autokrine und parakrine Mechanismen induziert. Gleichzeitig exprimieren die aktivierten T-Zellen auch den IL-2 Rezeptor (CD25) auf der Oberfläche [10], sowie weitere Moleküle, die für die Fortsetzung der Immunreaktion essentiell sind. Eines dieser Moleküle ist CD40 Ligand (CD40L oder CD154), das nach Stimulation transient auf der T-Zell Oberfläche exprimiert wird und *in vitro* für der Nachweis aktivierter T-Zellen verwendet wird. CD40L interagiert mit dem Rezeptor CD40 auf der Zelloberfläche von APZs. Diese Interaktion führt zu einer zusätzlichen Verstärkung der T-Zell Aktivierung [11]. Nach einer vollständigen Aktivierung erfolgt eine Differenzierung der T-Zellen zu Effektorzellen oder Gedächtniszellen, die im Fall einer erneuten Stimulation mit demselben Antigen nicht mehr auf kostimulatorische Signale durch APZ angewiesen sind (zusammengefasst von Seder und Ahmed [12]).

Um Schäden am körpereigenen Gewebe durch eine anhaltende T-Zellantwort zu verhindern, unterliegt die Aktivierung ebenfalls negativen Regulationsmechanismen. Hierfür exprimieren T-Zellen unter anderem das CTLA-4-Molekül (*Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4* oder CD152), das ein Mitglied der CD28 Familie ist. CTLA-4 wird nach Stimulation auf der Oberfläche von T-Zellen exprimiert und bindet ebenfalls an die genannten B7-Moleküle, vermittelt jedoch im Gegensatz zu CD28 ein inhibitorisches Signal. Dieses führt zur Beendigung der T-Zell Aktivierung (zusammengefasst von Waterhouse et al [13]). Ein weiterer inhibitorischer Rezeptor der CD28-Familie ist PD-1 (*programmed death-1*), der die Proliferation und Zytokinproduktion von T-Zellen durch Bindung an seine Liganden (PD-L1 und PD-L2) verhindert [14].

1.3 Polarisierung von CD4⁺ T-Zellen

1.3.1 T_H1, T_H2 und T_H17 Zellen

Eine Infektion mit einem Pathogen führt zur Aktivierung von Antigen-spezifischen naiven CD4⁺ T-Zellen. Anschließend findet die Differenzierung zu funktionellen Effektor-T-Zellen statt (Abbildung 1.1). Diese aktivierten T-Zellen produzieren Effektormoleküle, die für die Pathogen-Bekämpfung nötig sind. Es gibt verschiedene Pathogene, die unterschiedliche Infektionsstrategien haben. Viren und einige Bakterien, wie *M. tuberculosis* und *Listeria monocytogenes* vermehren sich intrazellulär, während Helminthen (Würmer), wie *Schistosoma mansoni* und *Strongyloides stercoralis*, sich extrazellulär vermehren. T_H1-Zellen produzieren hauptsächlich IFN γ als Effektorzytokin, welches die Aktivierung von Makrophagen vermittelt. Daher sind T_H1-Zellen entscheidend für eine protektive Immunantwort gegen intrazelluläre Viren und Bakterien. T_H2-Zellen produzieren hauptsächlich IL-4, IL-5 und IL-13 als Effektorzytokine, welche für die Aktivierung von B-Zellen, Eosinophilen und Mastzellen verantwortlich sind. T_H2 Zellen sind wichtig für die Bekämpfung von extrazellulären Pathogenen [15].

Seit einigen Jahren ist die Existenz eines weiteren Subtyps der CD4⁺ T-Zellen bekannt: die T_H17 Zellen, die IL-17 als Effektorzytokin exprimieren [16, 17]. Die genaue Aufgabe bei der

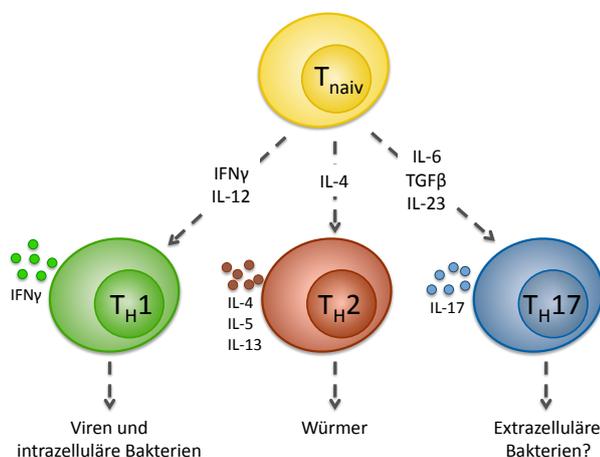


Abbildung 1.1: Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen. Die Infektion mit einem Pathogen führt zur Aktivierung von naiven CD4⁺ T-Zellen (T_{naiv}). Das umgebende Zytokinmilieu beeinflusst die Differenzierung in verschiedene T-Helferzell Subtypen (T_H). Die Zytokine werden, je nach Art des Pathogens, von Zellen des angeborenen Immunsystems sekretiert. IFN γ und IL-12 sorgen für eine Differenzierung der naiven T-Zellen zu T_H1 Zellen. Diese bekämpfen intrazelluläre Pathogene, wie Viren und einige Bakterien mit Hilfe des Effektorzytokins IFN γ . T_H2 Zellen entstehen in Anwesenheit von IL-4 und bekämpfen extrazelluläre Parasiten, wie Würmer, mit Hilfe der Effektorzytokine IL-4, IL-5 und IL-13. T_H17 Zellen entstehen in Anwesenheit von IL-6, TGF β und IL-23. Diese Zellen werden durch die Produktion des Effektorzytokins IL-17 charakterisiert. Die genaue Funktion ist noch unbekannt, vermutlich haben sie eine protektive Funktion gegen Infektionen mit extrazellulären Bakterien.

Abwehr von Infektionserregern ist noch nicht vollständig geklärt. Eine Hypothese ist, dass diese Zellen wichtig für die Immunantwort gegen extrazelluläre Bakterien sind [18, 19]. Prinzipiell induzieren T_H17 Zellen eine proinflammatorische Immunantwort, sowie die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und sind mit der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen, wie Multipler Sklerose und rheumatoider Arthritis assoziiert (zusammengefasst in Weaver et al [20]). Humane T_H17 Zellen entwickeln sich aus einer Vorläuferpopulation, die durch die Expression des Oberflächenmoleküls CD161 gekennzeichnet ist [21]. Das murine Äquivalent zu CD161, NK1.1, ist nicht mit der T_H17 Differenzierung assoziiert. Die Differenzierung zu einem der Subtyp blockiert gleichzeitig die Differenzierung der anderen Subtypen, was die Polarisierung der Immunantwort noch verstärkt.

1.3.2 Differenzierung von $CD4^+$ T-Zellen

Der wichtigste Faktor bei der T-Zell Differenzierung ist das Zytokinmilieu, das die T-Zellen umgibt (Abbildung 1.1). Bei einer Infektion mit Viren oder intrazellulären Bakterien sezernieren beispielsweise Makrophagen $IFN\gamma$ und IL-12. Diese Zytokine sorgen für eine T_H1 Polarisierung, die wiederum für die Bekämpfung von Viren und intrazellulären Bakterien essentiell ist. IL-4 führt zur Differenzierung von T_H2 Zellen und die Kombination der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6 und IL-23 mit dem antiinflammatorischen Zytokin TGF β führt zur Differenzierung von T_H17 Zellen [22, 23]. Die Wirkung der Zytokine wird durch Bindung an die spezifischen Rezeptoren auf der Oberfläche der T-Zellen vermittelt. Die Zytokin-Rezeptor-Bindung aktiviert eine Signalkaskade, den sogenannten Janus Tyrosin-Kinase (JAK)/*Signal Transducers and Activators of Transcription* (STAT)-Signalweg und verändert so das Transkriptionsprofil der T-Zellen.

1.3.3 Der JAK/STAT-Signalweg

Rezeptoren der Typ I und II Zytokinrezeptor-Familie (z. B. IL-2, IL-4, IL-7, $IFN\alpha$, $IFN\gamma$ und IL-10) übermitteln extrazelluläre Signale über den JAK/STAT Signalweg ins Innere der Zelle (Abbildung 1.2). Zytokinrezeptoren bestehen aus jeweils zwei Untereinheiten, die durch Bindung eines Zytokins dimerisieren. Durch die Konformationsänderung befinden sich JAKs, die in einer inaktiven Form mit dem cytosolischen Teil des Rezeptors assoziiert sind, in räumlicher Nähe zueinander und aktivieren sich durch gegenseitige Phosphorylierung selbst. Anschließend phosphorylieren die aktivierten JAKs Tyrosinreste im cytoplasmatischen Rezeptorteil. Phosphorylierte Tyrosinreste werden generell von sogenannten Src Homologie 2 (SH2) Domänen gebunden. STAT-Moleküle, die in einer inaktiven Form im Zytoplasma vorliegen, binden nun mit ihrer SH2 Domäne an den Rezeptor und werden durch die Rezeptor-assoziierten JAKs ebenfalls phosphoryliert und somit aktiviert. Dies führt zur Dimerisierung der STAT-Moleküle, die sich vom Rezeptor lösen und in den Zellkern wandern. Dort wirken sie als Transkripti-

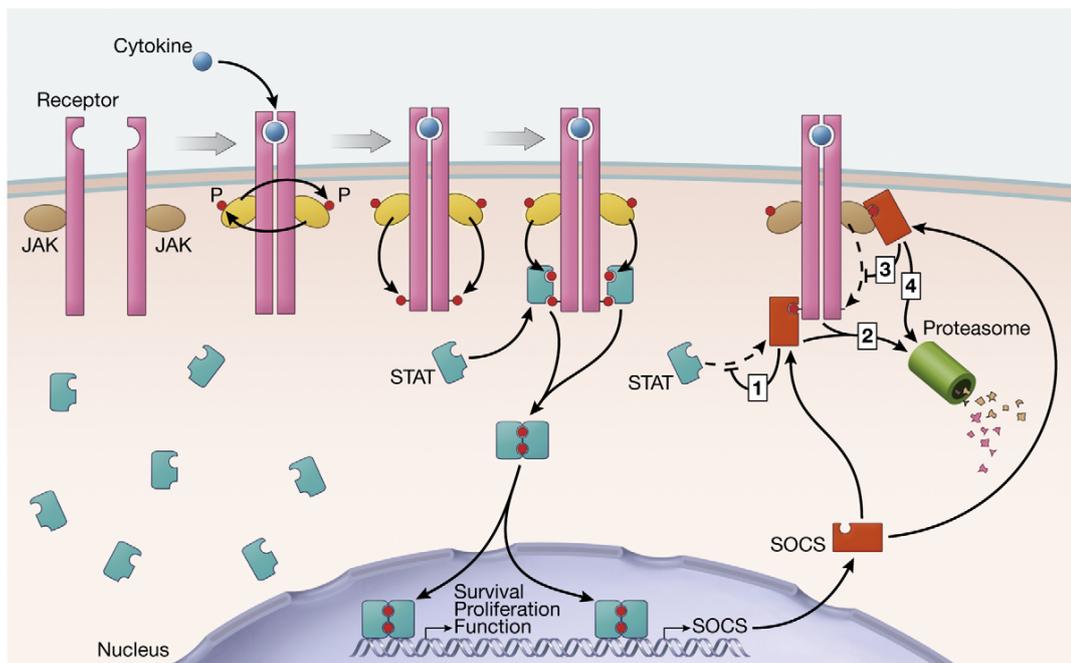


Abbildung 1.2: Der JAK/STAT Signalweg. Durch Bindung eines Zytokins an seinen Rezeptor dimerisieren die Rezeptoruntereinheiten. Dadurch aktivieren sich JAK-Moleküle durch gegenseitige Phosphorylierung (P) zunächst selbst und anschließend den cytoplasmatischen Teil des Rezeptors. An die Phosphorylierungsstellen binden STAT-Moleküle mit ihrer SH2-Domäne und werden anschließend durch JAK-vermittelte Phosphorylierung aktiviert. Nach Dimerisierung der STATs wandern diese in den Zellkern und aktivieren die Transkription von Zytokin-abhängigen Genen. Die Aktivierung des JAK/STAT Signalweges führt auch zur Expression von *Suppressor of Cytokine Signaling* (SOCS) Molekülen, die den Signalweg über einen Rückkopplungsmechanismus beenden. Inhibitionsmechanismen: (1) Bindung an phosphorylierte Tyrosine des Rezeptors, STAT-Moleküle können nicht mehr binden. (2) Degradierung des Rezeptors durch SOCS-vermittelte Ubiquitinierung und Migration zum Proteasom. (3) Bindung an phosphorylierte Tyrosine von JAKs und Blockierung der Rezeptor-Aktivierung. (4) Degradierung von JAKs durch SOCS-vermittelte Ubiquitinierung und Migration zum Proteasom (Quelle: Palmer und Restifo, *Trends in Immunology* 2009 [24]).

onsfaktoren für eine Vielzahl von Genen [15]. Die Zytokin-aktivierten STAT-Moleküle spielen daher eine wichtige Rolle bei der T-Zell Differenzierung.

Jedes zelluläre Signal muss nach Aktivierung wieder beendet werden, um eine Kontrolle der Zellreaktionen zu ermöglichen. Daher führt die STAT-Aktivierung gleichzeitig zur Expression von inhibitorischen Proteinen, welche die Signaltransduktion über einen Rückkopplungsmechanismus beenden können. Hierzu gehört *Suppressor of Cytokine Signaling* (SOCS) 3, das zur Familie der SOCS-Proteine gehört (Abbildung 1.2).

1.3.4 Rolle von STAT-Molekülen bei der Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen

Die Familie der STAT-Moleküle besteht aus sieben Mitgliedern (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b und STAT6), die von verschiedenen Zytokinen spezifisch aktiviert werden können. Die IL-12-induzierte T_H1 Differenzierung wird von STAT4 durch Aktivierung von T_H1-assoziierten Genen wie IFN γ und IL-18R 1 und gleichzeitiger Blockierung von T_H2-assoziierten

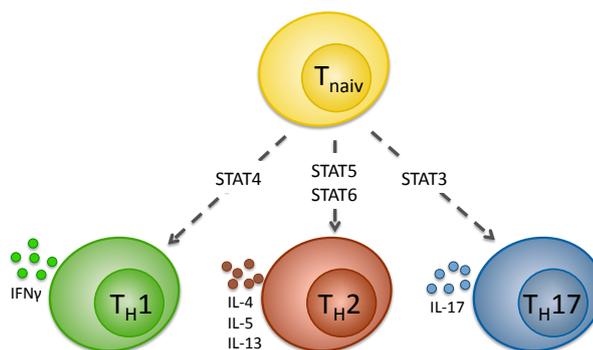


Abbildung 1.3: Einfluss von STAT-Molekülen auf die Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen. Die Zytokin-vermittelte Aktivierung von verschiedener STAT-Moleküle führt zur differentiellen Transkription von Zytokin-abhängigen Genen und somit zur T-Zell Differenzierung.

Genen vermittelt [25] (Abbildung 1.3).

IL-4 aktiviert STAT6, den Hauptregulator der T_H2 Differenzierung. In humanen Zellen aktiviert dieses STAT-Molekül die Expression von über 80 % der IL-4 regulierten Gene [26], während bei Mäusen der Anteil geringer ist [27]. Eines der Zielgene von STAT6 ist GATA3, der Haupttranskriptionsfaktor von T_H2 Zellen [26]. Neben STAT6 spielt auch IL-2-induziertes STAT5 eine Rolle in der frühen Phase der T_H2 Differenzierung [28].

Die T_H17 Differenzierung ist mit der Aktivierung von STAT3 assoziiert (Abbildung 1.3), da zum einen die T_H17-polarisierenden Zytokine IL-6 und IL-23 STAT3 aktivieren und zum anderen die T-Zell-spezifische Deletion von STAT3 die Expression von IL-17 und IL-21, einem weiteren T_H17-abhängigem Zytokin, beeinträchtigt. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass IL-17, IL-21 und ROR γ t, der Haupttranskriptionsfaktor von T_H17 Zellen, direkte Zielgene von STAT3 sind (zusammengefasst in O'Shea et al [25]).

1.3.5 Die Familie der SOCS Proteine

Die SOCS Familie besteht aus acht Proteinen (SOCS1 - 7 und *Cytokine-inducible Src Homology 2 Domain (SH2)-containing Protein (CISH)*). Alle Proteine haben eine konservierte Struktur, die aus einem variablen N-Terminus, einer SH2-Domäne und einer C-terminalen SOCS Box besteht (Abbildung 1.4) [29, 30]. SOCS1 und SOCS3 besitzen zusätzlich eine Kinase-inhibierende Region (KIR) und eine N-terminal verlängerte (*extended*) SH2-Subdomäne (N-ESS), die beide essentiell für die Funktion der Proteine sind (Abbildung 1.4) [30].

Die SH2 Domäne ist von zentraler Bedeutung für die Inhibition des JAK/STAT-Signalweges, da sie an die phosphorylierten Tyrosinreste des Rezeptors oder der JAK-Moleküle bindet [31, 32] (Abbildung 1.2, (1) + (3)). Dieser Mechanismus verhindert die Bindung und Aktivierung der STAT-Moleküle. Darüber hinaus sind noch zwei weitere Mechanismen bekannt, mit denen



Abbildung 1.4: Schematische Struktur der SOCS Proteine. Alle Mitglieder der SOCS Familie besitzen eine variable N-terminale Domäne, eine SH2-Domäne, sowie die C-terminale SOCS Box. Eine Kinase-inhibierende Region (KIR) und eine N-terminal verlängerte (*extended*) SH2-Subdomäne (N-ESS) besitzen nur SOCS1 und SOCS3. Quelle: Dimitriou et al, *Immunological Reviews* 2008 [30].

SOCS-Moleküle ihre inhibitorisch Funktion ausüben: erstens kann die KIR von SOCS1 und SOCS3 als Pseudosubstrat-Inhibitor für JAK wirken und somit die Aktivierung der STAT-Moleküle durch JAK verhindern [33, 34]. Zweitens vermittelt die SOCS Box die Ubiquitinierung von Bindungspartnern und den SOCS Molekülen selbst, was zur proteasomalen Degradation der Moleküle führt [35] (Abbildung 1.2, (2) + (4)).

SOCS3 hat eine essentielle Funktion bei der Embryogenese, da SOCS3-defiziente Mäuse noch vor der Geburt sterben, wahrscheinlich durch Defekte bei der Plazentaentwicklung [36]. Die SOCS1-Defizienz ist ebenfalls lethal, hier sterben die Mäuse kurz nach der Geburt [37].

1.3.6 Regulation von CD4⁺ T-Zellen durch SOCS3

SOCS3 reguliert die Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen. Die Expression des Proteins wird von einer Vielzahl von Zytokinen (z. B. IFN α , IFN γ , IL-2, IL-6 und IL-10) induziert, was zur Inhibition der Zytokinstimulation führt (negative Rückkopplung). Im Gegensatz zu SOCS1 bindet SOCS3 nicht direkt an aktivierte JAK-Proteine [32]. Die Haupt-Bindungspartner von SOCS3 sind das Glykoprotein (gp)130 und die allgemeine γ -Kette, beides Untereinheiten vieler Zytokinrezeptoren (z. B. IL-2-Rezeptor (R), IL-4R, IL-6R, IL-7R, IL-11R, IL-12R, IL-27R). Es wurde gezeigt, dass SOCS3 an gp130 spezifisch über das phosphorylierte Tyrosin (Y) an der Position 759 (Y759) bindet. An dieser Stelle konkurriert es mit der Protein-Tyrosin Phosphatase SHP2, einem weiteren regulatorischen Protein, um die Bindung an den Rezeptor [32, 38, 39].

SOCS3 ist *ex vivo* in naiven CD4⁺ T-Zellen exprimiert und wird nach Antigen-spezifischer Stimulation transient herunterreguliert, um die Aktivierung der T-Zellen zu verstärken [40]. SOCS3 bindet auch an CD28 und kann so die T-Zell-Rezeptor-abhängige IL-2 Produktion der T-Zellen regulieren [41, 42]. Untersuchungen im Zusammenhang mit der T_H1 und T_H2 Polarisierungen zeigen, dass eine erhöhte SOCS3 Expression mit der T_H2 Differenzierung in assoziiert ist [43] (Abbildung 1.5). Analog hierzu korreliert die SOCS3 Expression in T-Zellen von Patienten mit Asthma oder atopischer Dermatitis mit der Schwere der Erkrankung [43]. Chen et al [44] sehen dagegen bei SOCS3-defizienten T-Zellen keinen Einfluss auf die T_H1/T_H2 Polarisierung, sondern eine Zunahme der T_H17 Zellen. Diese Zunahme wird auf eine verstärkte und verlängerte Aktivierung des T_H17-assoziierten STAT3-Signalweges in Abwesenheit von SOCS3 zurückgeführt [45, 46]. Das bedeutet, dass die Anwesenheit von SOCS3 die T_H17-

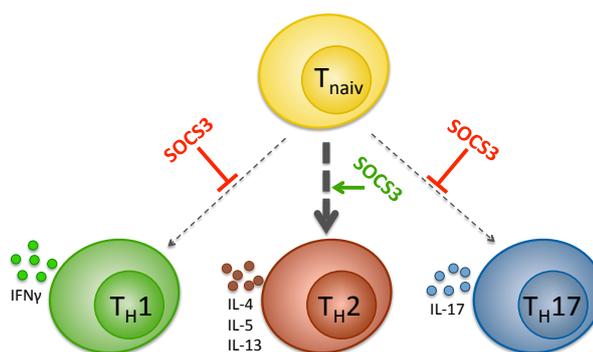


Abbildung 1.5: Einfluss von SOCS3 auf die Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen. Die Expression von SOCS3 blockiert die Polarisierung in Richtung T_H1 und T_H17 und induziert die T_H2 Polarisierung.

Polarisierung inhibiert (Abbildung 1.5). Analog hierzu blockiert SOCS3 die IL-12-induzierte STAT4-Aktivierung, was zur Inhibition der T_H1 Polarisierung führt [47, 43]. Die Aktivierung von IL-4-induziertem STAT6 dagegen wird durch SOCS3 nicht inhibiert, was die Assoziation der SOCS3 Expression mit der T_H2 Polarisierung erklärt (Abbildung 1.5) [47, 48].

Die SOCS3-Expression hat nicht nur einen Einfluss auf die Polarisierung von CD4⁺ T-Zellen, sondern kann auch zu einem Zustand der „Erschöpfung“ (*Exhaustion*) bei T-Zellen führen [49]. Hierbei sind die T-Zellen nicht mehr mit dem Antigen aktivierbar und führen keine Effektorfunktionen aus. Die Immunantwort ist daher wirkungslos.

1.4 Die humane Tuberkulose

Die humane Tuberkulose wird durch Infektion mit dem intrazellulären Bakterium *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) verursacht. Weltweit sind etwa 2 Milliarden Menschen mit diesem Bakterium infiziert und jährlich sterben etwa 1,5 Millionen Menschen an den Folgen der Erkrankung, darunter viele Kinder. Damit gehört Tuberkulose, zusammen mit HIV und Malaria, zu den tödlichsten Infektionserkrankungen weltweit. Besonders viele Tuberkulose-Fälle kommen in Regionen mit hoher Prävalenz für das humane Immundefizienz Virus (HIV) vor, da eine HIV-Infektion den Ausbruch einer Tuberkulose begünstigt. Hiervon sind vor allem Länder Afrikas, die südlich der Sahara liegen, betroffen. Die Zunahme von multiresistenten (*multi drug-resistant*, MDR) und extrem-resistenten (*extensively drug-resistant*, XDR) *M. tuberculosis* Stämmen führte in den letzten Jahren zu einer zusätzlichen Ausbreitung der Tuberkulose, die mit der Standardtherapie teilweise nicht mehr behandelbar ist.

Die Übertragung von *M. tuberculosis* erfolgt durch Aerosole, die z.B. beim Husten entstehen. Von den infizierten Personen entwickeln nur etwa 5 - 10 % im Laufe ihres Lebens eine aktive Tuberkulose. Das bedeutet, dass bei meisten Personen latent infiziert sind. Diese Personen werden daher als latente *M. tuberculosis* Infizierte (LTBI) bezeichnet. LTBI zeigen keine Symptome

und sind auch nicht infektiös. Interessanterweise sind bei den meisten Patienten mit aktiver Tuberkulose keine Anzeichen einer Immunsuppression zu erkennen [50], was darauf hindeutet, dass die *M. tuberculosis*-spezifischen Immunantwort bei diesen Personen zwar vorhanden, aber nicht wirksam ist.

Zur Zeit gibt es keine vollständig schützende Vakzine gegen eine Infektion mit *M. tuberculosis*. Der Anfang des 20. Jahrhunderts entwickelte Lebendimpfstoff *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) aus *M. bovis* [51] ist bei Erwachsenen nahezu wirkungslos. Lediglich bei Kindern schützt eine BCG-Impfung vor schweren Formen der Tuberkulose, wie Meningitis und Miliartuberkulose [52]. Daher werden in Endemiegebieten Neugeborene auch heute noch mit BCG immunisiert. Die Therapie einer Tuberkulose Erkrankung besteht aus einer Kombination mehrerer Antibiotika, meist Isoniazid, Rifampicin, Ethambutol und Pyrazinamid, die aufgrund des langsamen Wachstums von *M. tuberculosis* über einen Zeitraum von mindestens sechs Monaten durchgeführt wird.

Für den Nachweis einer Tuberkulose-Infektion mit dem Tuberkulin-Hauttest werden Antigene von Mycobakterien (Tuberkulin) unter die Haut gespritzt. Hatte die Person bereits Kontakt mit *M. tuberculosis* bildet sich eine fühlbare Hautschwellung aufgrund einer verzögerten Hypersensitivitätsreaktion [15]. Der Test kann jedoch auch bei BCG-geimpften Personen, sowie nach Kontakt mit sogenannten atypischen Mykobakterien, wie *M. bovis* und *M. avium* falsch-positiv ausfallen. Etwas spezifischer ist der Quantiferon-Test (QuantiFERON[®] TB Gold), mit dem freigesetztes IFN γ nach Stimulation von *M. tuberculosis*-spezifischen T-Zellen im peripheren Blut nachgewiesen wird. Ein neues Verfahren zur Diagnose einer Tuberkulose-Infektion ist der sogenannte Xpert MTB/RIF Tests, bei dem es sich um einen automatisierten, Real-Time PCR basierten *M. tuberculosis*-Nachweis handelt, mit dem sehr schnelle Ergebnisse (2 h) möglich sind. Gleichzeitig wird die Probe mit dieser Methode auf eine Rifampicin-Resistenz getestet [53].

1.5 Kontrolle von *M. tuberculosis* durch das Immunsystem

1.5.1 Alveolare Makrophagen

Die ersten Immunzellen, die nach einer Infektion Kontakt mit *M. tuberculosis* haben, sind Makrophagen in der Lunge (alveolare Makrophagen, Abbildung 1.6, Phase I). Die Bakterien werden phagozytiert können aber nicht getötet werden, da sie die Reifung des Phagolysosoms verhindern [54]. Für die Kontrolle der Infektion ist die Aktivierung der Makrophagen durch IFN γ essentiell [55]. Fehlt IFN γ , z. B. bei IFN γ *knock out* Mäusen oder bei Personen mit Mutationen im IFN γ -Rezeptor-Gen, führt dies zu einer hohen Suszeptibilität für mykobakterielle Infektionen [56, 57, 58]. Die Aktivierung von Makrophagen mit IFN γ führt zur Initiierung antimykobakterieller Effektormechanismen, wie die Produktion von reaktiven Stickstoffspezies

(NO) durch die induzierbare Stickstoffoxid-Synthetase (iNOS oder NOS2, [59]). $\text{TNF}\alpha$ ist ein weiteres wichtiges Effektorzytokin bei der akuten Infektion mit Mykobakterien, da es die Aktivierung von Makrophagen im Zusammenspiel mit $\text{IFN}\gamma$ verstärkt [60]. Meist führen diese Mechanismen aber nicht zur vollständigen Abtötung der Mykobakterien, da diese wiederum Möglichkeiten zu Abschwächung der Makrophagenaktivierung entwickelt haben. Beispielsweise können Mykobakterien die Sensitivität der Makrophagen für $\text{IFN}\gamma$ durch Induktion der SOCS1 und SOCS3 Expression vermindern, was zur Inhibition der Effektormechanismen führt [61]. An der Produktion von $\text{IFN}\gamma$ sind sowohl Zellen des angeborenen Immunsystems (NK-Zellen), als auch des erworbenen Immunsystems (T-Zellen) beteiligt.

1.5.2 T-Zell Antwort

Das erworbene Immunsystem, und speziell die Aktivität von T-Zellen, spielt bei der *M. tuberculosis* Infektion eine zentrale Rolle (Abbildung 1.6, Phase II). Dieser Zusammenhang wurde vor allem durch Koinfektionen mit HIV verdeutlicht. Eine HIV Infektion, die zum Verlust von CD4^+ T-Zellen führt, hat eine erhöhte Suszeptibilität für eine aktive Tuberkulose zur Folge [63, 64]. Geldmacher et al [65] haben darüber hinaus gezeigt, dass *M. tuberculosis*-spezifische CD4^+ T-Zellen von HIV bevorzugt infiziert und schon früh in der Infektion depletiert werden. Im Verlauf der Tuberkulose-Infektion wandern T-Zellen in die Lunge ein und spezifische CD4^+ T-Zellen werden durch Präsentation von *M. tuberculosis* Antigenen über den MHC-Klasse II Weg aktiviert. Mykobakterien induzieren eine starke IL-12 Produktion durch Makrophagen [66], was wiederum für die Differenzierung der CD4^+ T-Zellen in T-Helferzell Typ 1 ($\text{T}_{\text{H}1}$) Effektorzellen verantwortlich ist. Diese Zellen sezernieren $\text{IFN}\gamma$, welches die antimykobakteriellen Effektormechanismen der Makrophagen induziert.

Neben T-Zellen, die $\text{IFN}\gamma$ produzieren, spielt die gleichzeitige Produktion weiterer Zytokine eine Rolle bei der Immunantwort gegen *M. tuberculosis*. Sogenannte polyfunktionale T-Zellen, die mehr als ein Zytokin gleichzeitig produzieren, werden im Zusammenhang mit der funktionalen Immunantwort diskutiert. Hierbei handelt es sich vor allem um T-Zellen, die gleichzeitig $\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$ und IL-2 produzieren. Es ist noch nicht vollständig geklärt, ob diese T-Zellen Voraussetzung für eine protektive Immunantwort sind, oder mit der aktiven Krankheit assoziiert sind [67, 68, 69]. In einer Studie mit Kindern waren nur polyfunktionale T-Zellen, die zusätzlich GM-CSF produzierten, mit dem Immunschutz korreliert [70].

CD8^+ T-Zellen sind ebenfalls an der Immunantwort gegen *M. tuberculosis* beteiligt, aber vermutlich in einem geringeren Maße als CD4^+ T-Zellen. MHC Klasse I-defiziente Mäuse, die keine CD8^+ T-Zell-abhängige Immunantwort generieren können, zeigten eine erhöhte Suszeptibilität für Infektionen mit *M. tuberculosis* [71, 72]. Die Präsentation mykobakterieller Antigene auf MHC Klasse I Molekülen ist noch nicht vollständig verstanden, aber es ist möglich, dass die Translokation von *M. tuberculosis* aus dem Phagosom in das Zytosol eine Rolle spielt

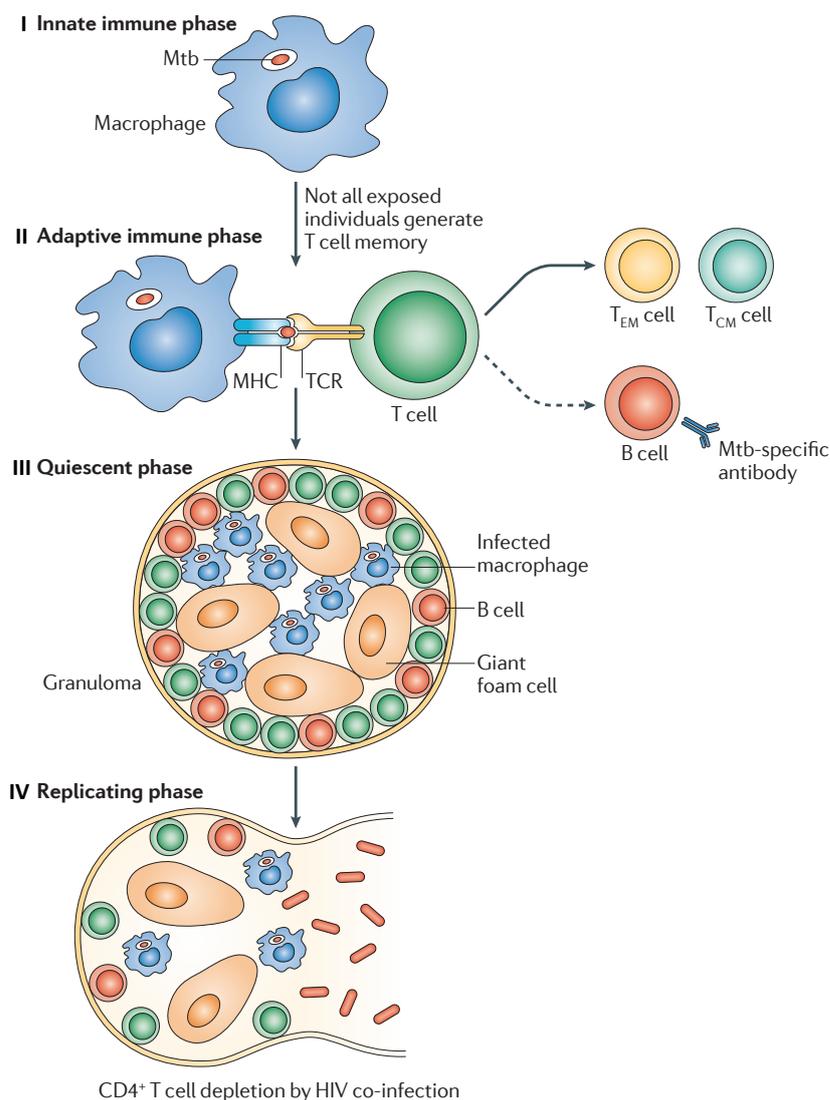


Abbildung 1.6: Immunantwort bei der Infektion mit *M. tuberculosis*. Der Status der Immunreaktion kann in vier Phasen unterteilt werden. Die Phasen I - III sind hierbei asymptomatisch. **Phase I: angeborene Immunantwort (innate immune phase).** Nach Inhalation von *M. tuberculosis* (Mtb) werden die Bakterien von alveolaren Makrophagen in der Lunge phagozytiert. Mtb inhibiert die Reifung der Phagosomen zu Phagolysosomen und persistiert im Makrophagen. **Phase II: adaptive Immunantwort (adaptive immune phase).** Mtb-spezifische T-Zellen werden durch infizierte Makrophagen aktiviert und differenzieren zu zentralen Gedächtniszellen (T_{CM}) und Effektor-Gedächtniszellen (T_{EM}). B-Zellen werden ebenfalls aktiviert und produzieren Mtb-spezifische Antikörper. **Phase III: Latenz (quiescent phase).** Granulome werden am Ort der Infektion gebildet, um die Replikation und Ausbreitung der Bakterien zu verhindern. Die Granulome bestehen in der zentralen Region aus infizierten Makrophagen und fettreichen Makrophagen (*Giant Foam Zellen*), die von T_{CM} und B-Zellen umgeben sind. In dieser Phase besteht ein Gleichgewicht zwischen der effektiven Kontrolle von Mtb und dem Schutz vor Immunpathologie durch die Immunantwort. Diese latente Phase der Infektion kann mehrere Jahre oder sogar lebenslang andauern. **Phase IV: Replikation (replication phase).** Der Verlust der Mtb-spezifischen T-Zell Antwort, z. B. durch eine Koinfektion mit HIV, führt zur unkontrollierten Replikation und Ausbreitung der Bakterien. In dieser Phase entstehen die klinischen Symptome einer aktiven Tuberkulose. TCR: *T cell receptor* (T-Zell Rezeptor), MHC: *Major Histocompatibility Complex* (Haupthistokompatibilitätskomplex) Quelle: Walzl et al, *Nature Reviews Immunology* 2011 [62].

[73, 74]. Die Effektorfunktionen von CD8⁺ T-Zellen sind zum einen die direkte Lyse infizierter Makrophagen und zum anderen die Produktion von IFN γ [75, 76, 77].

1.5.3 Granulome

In den meisten Fällen werden Mykobakterien von der Immunantwort des Wirtes nicht eliminiert, sondern nur an der Ausbreitung gehindert. Dadurch tritt die Infektion in die Latenzphase ein, die durch die Bildung von Granulomen gekennzeichnet ist (Abbildung 1.6, Phase III) [78]. Granulome sind eine Form der verzögerten Hypersensitivität, bei der T-Zell-abhängige Aktivierung von Makrophagen und Inflammation zur Zerstörung von Gewebe führen [15]. Diese Gewebszerstörung kann zur Bildung von sogenannten verkäsenden Granulomen führen, bei denen das Gewebe verflüssigt wird. Dennoch bietet diese Form der Immunantwort einen Schutz vor der Ausbreitung der Mykobakterien, da diese sich in einem abgegrenzten Bereich, umgeben von Immunzellen befinden und in der Proliferation stark eingeschränkt sind [78]. Ein Granulom besteht im zentralen Bereich aus infizierten Makrophagen und fettreichen Makrophagen (*Giant Foam Zellen*), die von aktivierten T- und B-Zellen umgeben sind [62]. Im Inneren von Granulomen kann *M. tuberculosis* über Jahre oder sogar lebenslang persistieren, ohne Krankheitssymptome zu verursachen.

1.5.4 Verlust der Immunkontrolle

Eine aktive Tuberkulose entsteht, wenn die immunologische Kontrolle von *M. tuberculosis* aus dem Gleichgewicht gerät, zum Beispiel durch den Verlust von CD4⁺ T-Zellen während einer HIV-Infektion (Abbildung 1.6, Phase IV). Die Mykobakterien können sich ungehindert vermehren und durch Eintritt in den Blutstrom kann sich die Krankheit auf andere Organe ausbreiten. Die Balance zwischen Kontrolle der Infektion und Schutz vor Immunpathologie wird durch regulatorische Moleküle wie PD-1 beeinflusst. Barber et al [14] haben gezeigt, dass PD-1 zwar die Aktivierung von Mykobakterien-spezifischen CD4⁺ T-Zellen vermindert, dadurch aber gleichzeitig das infizierte Gewebe vor Schäden durch Überaktivierung der T-Zellen schützt. Dieses Beispiel zeigt, dass die Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen für eine funktionale Immunantwort gegen *M. tuberculosis* genau ausbalanciert sein muss um eine aktive Tuberkulose zu verhindern.

1.6 „Erschöpfung“ von T-Zellen

Die „Erschöpfung“ von T-Zellen wurden bisher vor allem im Verlauf von chronischen viralen Infektionen, wie HIV, HCV und LCMV, vor bei CD8⁺ T-Zellen beschrieben [79, 80, 81, 82]. Dies führt zu einem teilweisen oder totalen Funktionsverlust der Zellen, der durch verminderte

Proliferation und Zytokinproduktion charakterisiert ist. Es gibt erste Hinweise, dass auch die Immunantwort gegen die Tuberkulose, als chronische bakterielle Infektion, zu einer „Erschöpfung“ von T-Zellen führen kann: so wurde bei Kindern mit Tuberkulose eine klonale Expansion von CD8⁺ T-Zellen identifiziert, die zwar *ex vivo* noch auf Stimulation reagieren, aber dennoch nicht in der Lage sind die Infektion zu kontrollieren [83]. Die Sezernierung von Perforin und Granulysin durch CD8⁺ T-Zellen ist in infiziertem Lungengewebe von Tuberkulose-Patienten im Vergleich zu gesundem Lungengewebe vermindert [84] und die Proliferation sowohl von CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen ist in Patienten mit aktiver Tuberkulose verringert [69].

Der Zustand der „Erschöpfung“ lässt sich mechanistisch von der Anergie unterscheiden, die durch antigenspezifische Stimulation von T-Zellen in Abwesenheit von kostimulatorischen Signalen entsteht [85]. Im Gegensatz zur „Erschöpfung“ entstehen anerge T-Zellen vor allem bei der ersten Stimulation von naiven T-Zellen in sehr kurzer Zeit. „Erschöpfte“ T-Zellen dagegen entstehen erst im Verlauf einer chronischen Infektion und die Dysfunktion der T-Zellen verstärkt sich mit der Zeit [86]. Die initiale Stimulation dieser T-Zellen unterscheidet sich hierbei vermutlich nicht von einer normalen T-Zell Aktivierung. Der Phänotyp dieser T-Zellen kann je nach Stärke der „Erschöpfung“ variieren. Effektorfunktionen, wie IL-2-Produktion und Proliferation der T-Zellen, gehen früh verloren, während die Fähigkeit zur IFN γ und TNF α Produktion erst in einem späteren Stadium nicht mehr vorhanden ist [87]. Im letzten Stadium der „Erschöpfung“ werden die Zellen apoptotisch und sterben [88, 89].

Ein Hauptmerkmal von „erschöpften“ T-Zellen ist die Expression inhibitorischer Rezeptoren wie das bereits erwähnte PD-1 auf der Zelloberfläche. Durch Blockierung des PD-1 Signalweges kann die „Erschöpfung“ der T-Zellen umgekehrt und damit die Effektorfunktionen wieder hergestellt werden [90]. Pellegrini et al [49] haben kürzlich in einem Mausmodell für chronisch-virale Infektionen gezeigt, dass die „Erschöpfung“ von virusspezifischen CD8⁺ T-Zellen auf eine erhöhte Expression von SOCS3 zurückzuführen ist. Die Behandlung der Mäuse mit dem Zytokin IL-7 führte zu einer Reduktion von SOCS3 auf Transkriptionsebene und Reaktivierung der funktionellen Eigenschaften der T-Zellen. IL-7 ist daher ein vielversprechender Kandidat für die Therapie von chronischen Infektionserkrankungen.

Zur Zeit sind die genauen Regulationsmechanismen, die zur „Erschöpfung“ von T-Zellen führen, noch nicht vollständig untersucht. Außerdem fokussierte sich die Forschung bisher hauptsächlich auf CD8⁺ T-Zellen bei viralen Infektionen. In einigen Studien wird der Verlust von Effektorfunktionen im Verlauf von chronischen Virusinfektionen auch bei CD4⁺ T-Zellen beschrieben [91, 92].

1.7 SOCS3 Expression in T-Zellen von Tuberkulose-Patienten und LTBI

Der Vergleich des Transkriptoms (d. h. aller exprimierten Gene innerhalb einer Zelle) in T-Zellen von Tuberkulose-Patienten, LTBI und nicht-infizierten Spendern mit Hilfe einer *Microarray*-Analyse, führte zur Identifizierung von Kandidatengenen, die zwischen den Studiengruppen differentiell exprimiert waren [93]. Eine Gruppe dieser Kandidatengene (PIM1, SOCS3, CISH, JAK3, MYC und IL2RA) ist mit dem JAK/STAT-Signalweg assoziiert, darunter auch Mitglieder der SOCS Familie. Die Expression dieser Kandidatengene ermöglichte eine Klassifizierung von Tuberkulose-Patienten und LTBI mit Hilfe einer Diskriminanzanalyse, einem Verfahren zur Unterscheidung von Gruppen anhand bestimmter Merkmale. Von den Kandidatengenen war SOCS3, neben Pim-1, das Gen mit der höchsten Signifikanz für eine differentielle Expression in Tuberkulose-Patienten, LTBI und nicht-infizierten Spendern. In T-Zellen von Tuberkulose-Patienten wurde eine erhöhte SOCS3 Expression im Vergleich zu LTBI nachgewiesen, allerdings war die Expression auch in nicht-infizierten Spendern erhöht. Dies weist auf eine Korrelation von Immunschutz und Herunterregulation der SOCS3 Expression hin. Die differentielle Expression von SOCS3 wurde bereits im Vollblut von Tuberkulose-Patienten und LTBI nachgewiesen, allerdings wurde hier keine nicht-infizierte Gruppe untersucht [94]. Die erhöhte SOCS3 Expression in der letztgenannten Studie verringerte sich nach der Tuberkulose-Therapie. Die Regulation von SOCS3 könnte einen Einfluss auf die Aktivierung und Polarisierung der Immunantwort bei der humanen Tuberkulose haben.

1.8 Zielsetzung

SOCS3 ist ein regulatorisches Protein in T-Zellen, dessen Expression mit der humanen Tuberkulose-Infektion assoziiert ist. Da die Voraussetzung für die Kontrolle von *M. tuberculosis* eine exakte Regulation von Aktivierung und Begrenzung der T-Zell Antwort ist, könnte die differentielle SOCS3 Expression in Tuberkulose-Patienten und LTBI auf Veränderungen der Aktivierung und Polarisierung von CD4⁺ T-Zellen hinweisen.

In dieser Arbeit sollte der Einfluss von SOCS3 auf die Aktivierung und Differenzierung humaner CD4⁺ T-Zellen näher charakterisiert werden, da hier, im Gegensatz zu murinen T-Zellen, nur wenig bekannt ist. Für die Analysen der SOCS3 Expression sollte eine Methode zur Quantifizierung der Proteinexpression etabliert werden, die anschließend zur Bestimmung der Expression von SOCS3 *ex vivo* und nach *in vitro* Restimulation angewendet werden konnte. Außerdem sollte die SOCS3 Expression von *M. tuberculosis*-spezifischen T-Zellen in einem Mykobakterien-spezifischen *in vitro* Infektionsmodell untersucht werden.

Um den Einfluss von SOCS3 auf die Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen zu untersuchen, sollte zum einen die SOCS3 Expression in polarisierten T-Zellen, die verschiedene Effektorzytokine exprimieren, untersucht werden und zum anderen die SOCS3 Expression in humanen T-Zellen

mit Hilfe lentiviraler Transduktion modifiziert werden (exogene Expression und Herunterregulation der endogenen Expression). Nach Modifikation der SOCS3 Expression sollte das Zytokinprofil der T-Zellen analysiert werden, um den Einfluss von SOCS3 auf die Polarisierung näher zu charakterisieren.

Ein weiteres Ziel war, die Wirkung von IL-7, einem SOCS3-modulierenden Zytokin, auf T-Zellen im Allgemeinen und solche mit exogener SOCS3 Expression zu untersuchen. Diese initiale Analyse des Einflusses von IL-7 auf die SOCS3-abhängige Polarisierung von humanen T-Zellen könnten wichtige Hinweise geben, ob durch eine Therapie mit IL-7 beim Menschen ein mit dem Mausmodell vergleichbarer Effekt auf die T-Zell-Antwort bei chronischen Infektionen erzielt werden könnte.

2 Material

2.1 Antikörper und Apoptosemarker

Alle Antikörper waren gegen humane Proteine gerichtet. Angegeben ist die eingesetzte Antikörpermenge [μL] pro *well* zur Färbung für die Durchflusszytometrie im Residualvolumen. Wenn nicht anders angegeben, stammen die Antikörper aus der Maus.

Antikörper	Markierung	$\mu\text{L/well}$	Firma
anti-CD3	APC	0,5	BD Biosciences
anti-CD3	PerCP	1	BD Biosciences
anti-CD4	APC	0,5	BD Biosciences
anti-CD4	APC-H7	0,5	BD Biosciences
anti-CD4	PerCP	1	BD Biosciences
anti-CD8	FITC	1	BD Biosciences
anti-CD14	APC	1	BD Biosciences
anti-IFN γ	FITC	0,1	BD Biosciences
anti-IFN γ	PE-Cy7	0,5	BD Biosciences
anti-TNF α	AlexaFluor700	0,01	BD Biosciences
anti-IL-4	PE	0,075	BD Biosciences
anti-IL-17	V450	0,2	BD Biosciences
anti-CD40L	APC	0,5	eBioscience
anti-CD40L	APC-eFluor780	0,5	eBioscience
anti-CD161	APC	1	BD Biosciences
anti-CD161	FITC	1	Miltenyi Biotec
anti-CD45RA	V450	0,25	BD Biosciences
anti-CCR7	PE-Cy7	0,025	BD Biosciences
anti-SOCS3 (Kaninchen)	nicht markiert	-	Abcam
anti- β -Aktin	nicht markiert	-	Santa Cruz Biotechnology
anti-Kaninchen Ig (Ziege)	HRP	-	DAKO
anti-Maus Ig (Kaninchen)	HRP	-	DAKO

Antikörper	Markierung	µL/well	Firma
anti-pSTAT3	Pacific Blue	0,5	BD Biosciences
anti-pSTAT4	AlexaFluor647	0,5	BD Biosciences
anti-pSTAT5	PerCP-Cy5.5	0,5	BD Biosciences
Annexin V	AlexaFluor647	2,5	BioLegend
7-AAD (BD Via-Probe)	-	2,5	BD Biosciences

2.2 Enzyme

BamHI <i>FastDigest</i>	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
Bsp120I <i>FastDigest</i>	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
Dpn I <i>FastDigest</i>	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
EcoRI <i>FastDigest</i>	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
NotI <i>FastDigest</i>	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
Sall <i>FastDigest</i>	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
XhoI <i>FastDigest</i>	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)

2.3 Geräte

BD FACS LSR II Durchflusszytometer	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
BD FACS Aria Zellsortierer	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
Corbett Real-Time PCR	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Nano Drop 2000c	Thermo Scientific (Schwerte, Deutschland)
γ-Bestrahlungsanlage (¹³⁷ Cs)	Steuerungstechnik & Strahlenschutz GmbH (Braunschweig, Deutschland)
BD IMag™ Magnet	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
QIAvac 24 Plus Vakuumsystem für DNA-Aufreinigung	Qiagen (Hilden, Deutschland)
QIAvac Verbindungssystem mit Abfallbehältern	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Laboport „N 811 KN.18“ (Vakuumpumpe für QIAvac)	KNF (Freiburg, Deutschland)
„Mr. Frosty“ Kryo-Einfriergefäß	Nalgene (Rochester, USA)

2.4 Kits

NucleoSpin Extract II	Machery-Nagel (Düren, Deutschland)
NucleoSpin Plasmid	Machery-Nagel (Düren, Deutschland)
BD IMag™ anti-Human CD4 magnetische Partikel	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
BD IMag™ anti-Human CD14 magnetische Partikel	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
Plasmid Plus Maxi Kit (Vakuum)	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2/Th17 Kit	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
<i>DyLight488 Microscale Labeling Kit</i>	Pierce (Rockford, USA)
<i>DyLight649 Microscale Labeling Kit</i>	Pierce (Rockford, USA)

2.5 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotid-Primer wurden von Sigma-Aldrich bezogen.

Primer	Sequenz (5' → 3')
SOCS3_BamHI_fw	GCGCGGATCCATGGTCACCCACAGCAAG
SOCS3_EcoRI_rv	GCGCGAATTCTTAAAGCGGGGCATCGTACT
pLKO-shRNA_fw	ACGGTATCGATCACGAGACTAGCCTCGAGC
pLKO-shRNA_Sall-mut_rv	TACTGCCATTTGTGTCGACGTCGAGAATTC

2.6 Peptide

Rv3407	T. Ottenhoff, Leiden University Medical
Latenzantigen von <i>M. tuberculosis</i>	Center (Leiden, Niederlande)
SOCS3 Peptid	Abcam (Cambridge, UK)
besteht aus den 26 C-terminalen Aminosäuren von SOCS3 (ab16199)	

2.7 Plasmide

Bei allen verwendeten Plasmiden handelte es sich um *high copy* Plasmide.

LeGO-G	B.Fehse, UKE (Hamburg, Deutschland)
LeGO-G2	B.Fehse, UKE (Hamburg, Deutschland)
LeGO-iG2	B.Fehse, UKE (Hamburg, Deutschland)
pMDLg/pRRE	Addgene (Cambridge, USA)
pRSV-Rev	Addgene (Cambridge, USA)
phCMV-GALV-C _{4070A}	C. Stocking, HPI (Hamburg, Deutschland)

2.8 Puffer und Medien

Alle Lösungen und Puffer wurden mit deionisiertem oder doppeldestilliertem Wasser angesetzt. Für sterile Anwendungen wurden hitzeunempfindliche Lösungen für 20 min bei 135 °C und 2 bar autoklaviert. Hitzesensitive Lösungen wurden sterilfiltriert (Porengröße 0,22 µm).

Fötale Kälberserum (FKS) wurde vor der Verwendung für 30 min auf 56 °C erhitzt, um Komplementfaktoren zu inaktivieren. Die Lagerung erfolgte bis zur Verwendung bei - 20 °C.

2.8.1 Zellkultur- und Nährmedien

HEK-Medium

DMEM + GlutaMAX™ + 4,5 g/L Glucose + Pyruvat	Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
+ 10 % Fötale Kälber Serum (FKS)	PAA (Pasching, Deutschland)
+ 25 mM HEPES	PAA (Pasching, Deutschland)
+ 1 % Penicillin/Streptomycin	PAA (Pasching, Deutschland)

T-Zell-Medium

X-Vivo 15 serumfreies Medium	LONZA (Köln, Deutschland)
+ 1 % Penicillin/Streptomycin	PAA (Pasching, Deutschland)

Makrophagen-Medium

RPMI 1640	PAA (Pasching, Deutschland)
+ 7,5 % FKS	PAA (Pasching, Deutschland)
+ 1 % L-Glutamin (200 mM)	PAA (Pasching, Deutschland)

Einfriermedium

FKS PAA (Pasching, Deutschland)
+ 20 % DMSO Sigma-Aldrich (München, Deutschland)

LB-Medium + Ampicillin für *E. coli*

1 L H₂O
+ 20 g LB-Medium Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
+ 100 µg/mL Ampicillin Roth (Karlsruhe, Deutschland)
hitzesensitiv, erst nach Autoklavieren zugeben

LB Agar für *E. coli*

1 L H₂O
+ 35 g LB-Agar Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
+ 100 µg/mL Ampicillin Roth (Karlsruhe, Deutschland)
hitzesensitiv, erst nach Autoklavieren zugeben

2.8.2 Westernblot**5x Probenpuffer**

H₂O
+ 50 mM Tris-Base Roth (Karlsruhe, Deutschland)
+ 2 % SDS Merck (Darmstadt, Deutschland)
+ 5 % Glycerin Merck (Darmstadt, Deutschland)
+ etwas Bromphenolblau Sigma-Aldrich (München, Deutschland)

→ pH 6,8 einstellen

→ vor Verwendung 100 µL 1M DTT (Gibco) mit 900 µL Probenpuffer mischen. DTT immer frisch zugeben.

4x Trenngel-Puffer (SDS-PAGE)

18 g Tris-Base Roth (Karlsruhe, Deutschland)
4 mL 10 % SDS Merck (Darmstadt, Deutschland)
ad 100 mL H₂O

→ pH 8,8 einstellen

4x Sammelgel-Puffer (SDS-PAGE)

6,06 g Tris-Base	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
4 mL 10 % SDS	Merck (Darmstadt, Deutschland)
ad 100 mL H ₂ O	
→ pH 6,8 einstellen	

15 % Trenngel für SDS-PAGE

1,2 mL H ₂ O	
+ 1,25 mL 4x Trenngel-Puffer	
+ 2,5 mL 30 % Acrylamid/0,8 % Bisacrylamid	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
+ 50 µL Ammoniumpersulfat (APS)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
+ 5 µL TEMED	Roth (Karlsruhe, Deutschland)

6 % Sammelgel für SDS-PAGE

2,7 mL H ₂ O	
+ 1,25 mL 4x Sammelgel-Puffer	
+ 1 mL 30 % Acrylamid/0,8 % Bisacrylamid	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
+ 50 µL Ammoniumpersulfat (APS)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
+ 5 µL TEMED	Roth (Karlsruhe, Deutschland)

10x Laufpuffer für SDS-PAGE

31 g Tris-Base	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
140 g Glycin	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
10 g SDS	Merck (Darmstadt, Deutschland)
ad 1 L H ₂ O	

10x CAPS Stammlösung für *semi-dry* Blots

0,05 M CAPS	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
ad 1 L H ₂ O	

1x CAPS-Puffer für *semi-dry* Blots

100 mL 10x CAPS

100 mL Methanol

NeoLab (Heidelberg, Deutschland)

ad 1 L H₂O**Blocklösung für Westernblot**

DPBS

PAN Biotech GmbH (Passau, Deutschland)

+ 3 % Bovines Serum Albumin (BSA)

Serva (Heidelberg, Deutschland)

+ 0,5 % Tween 20

Sigma-Aldrich (München-Deutschland)

Waschlösung für Westernblot

DPBS

PAN Biotech GmbH (Passau, Deutschland)

+ 0,2 % Tween 20

Sigma-Aldrich (München-Deutschland)

Verdünnungslösung für Primär- und Sekundärantikörper

DPBS

PAN Biotech GmbH (Passau, Deutschland)

+ 0,2 % Tween 20

Sigma-Aldrich (München, Deutschland)

+ 5 % Blocklösung für Westernblot

2.8.3 Durchflusszytometrie**4 % Paraformaldehyd (PFA)**

DPBS

PAN Biotech GmbH (Passau, Deutschland)

+ 4 % PFA

Serva (Heidelberg, Deutschland)

→ bei 60 °C lösen, danach vorsichtig öffnen

1x *Perm/Wash*-PufferH₂O+ 10 % 10x *Perm/Wash*-Puffer

BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)

Fixierungs- und Permeabilisierungspuffer*Cytofix/Cytoperm*-Puffer

BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)

2.8.4 sonstige Lösungen

10 x MACS-Puffer

DPBS	PAN Biotech GmbH (Passau, Deutschland)
+ 5 % BSA	Serva (Heidelberg, Deutschland)
+ 20 mM EDTA (500 mM, pH 8,0)	Calbiochem (Darmstadt, Deutschland)
→ vor Gebrauch mit sterilem DPBS 1:10 verdünnen	

Blocklösung für Retronektin Beschichtung

DPBS	PAN Biotech GmbH (Passau, Deutschland)
+ 2 % BSA	Serva (Heidelberg, Deutschland)

Waschlösung für Retronektinbeschichtung

HBSS -CaCl ₂ -MgCl ₂	Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
+ 25 mM HEPES	PAA (Pasching, Deutschland)

5x KCM

H ₂ O	
+ 0,5 M KCl	Merck (Darmstadt, Deutschland)
+ 0,15 M CaCl ₂	Merck (Darmstadt, Deutschland)
+ 0,25 M MgCl ₂	Merck (Darmstadt, Deutschland)

2.8.5 Weitere Chemikalien und Lösungen

2 x HBS	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
Chloroquin	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
Dithiothreitol (DTT)	Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
Humanserum (AB)	PAA (Pasching, Deutschland)
Polybren	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
Retronektin (1 mg/mL)	TaKaRa (Shiga, Japan)
Annexin V Bindungspuffer	BioLegend (DS Uithoorn, Niederlande)

2.9 Software

FCS Express V3	DeNovo Software (Los Angeles, USA)
----------------	------------------------------------

BD FACSDiva 6.0	BD (Heidelberg, Deutschland)
FlowJo V9.4	Tree Star Inc. (Ashland, USA)
GraphPad Prism 5	GraphPad Software Inc. (San Diego, USA)
FCAP <i>Array</i> Software v1.0	Soft Flow Inc. (Pecs, Ungarn)

2.10 Stimulantien

Stimulus	Stock	Endkonzentration	Firma
PMA	1 mg/mL (in DMSO)	10 ng/mL	Sigma-Aldrich
Ionomycin	1 mg/mL (in DMSO)	1 µg/mL	Sigma-Aldrich
Brefeldin A	1 mg/mL (in Ethanol)	5 µg/mL	Sigma-Aldrich
Dynabeads®	4 x 10 ⁷ Beads/mL	1 - 2 µL/ <i>well</i>	Invitrogen
Human T-Activator CD3/CD28			
PPD Tuberkulin	1 mg/mL	5 µg/mL	Statens Serum Institut
IL-2	15000 u/mL	20 u/mL	C. Steeg, BNI
IL-7	10 µg/mL	20 ng/mL	BioLegend

2.11 Verbrauchsmaterialien

96- <i>well</i> Rundbodenplatte (<i>CELLSTAR</i>)	Greiner Bio One (Frickenhausen, Deutschland)
24- <i>well</i> Gewebekulturplatte	Greiner Bio One (Frickenhausen, Deutschland)
24- <i>well</i> Zellkulturplatte #351147 für Transduktion, non-tissue culture treated	BD Falcon (Heidelberg, Deutschland)
Filter für Einzelzellsuspension (<i>CellTrics</i>)	PARTEC (Görlitz, Deutschland)
Sterilfilter (0,22 µm)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Sterilfilter Millex®-GV PVDF (<i>low protein binding</i>)	Millipore (Billerica, USA)
Trypanblau 0,4 %	Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
Zellkulturschalen für HEK-Zellen 10 cm #83.1802	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Zellkulturschalen für Bakterien, 10 cm	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
1 kB und 100 bp DNA-Marker	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
PageRuler™ Plus Protein Marker	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
Biocoll	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)

für Dichtegradientenzentrifugation

ECL-Lösung

Pierce (Rockford, USA)

HybondTM-ECL Nitrocellulose-Membran

GE Healthcare (Freiburg, Deutschland)

3 Methoden

3.1 Spender

Die Buffycoats (ca. 60 mL) stammten von Blutspenden gesunder, freiwilliger Spender, die im Universitätskrankenhaus Hamburg-Eppendorf rekrutiert wurden. Der Nachweis PPD-reaktiver Spender erfolgte nach Stimulation (16 h) mit 5 µg/ml PPD in Anwesenheit von 5 µg/mL Brefeldin A (Zugabe nach 1,5 h) und intrazellulärer Zytokinfärbung mit 0,5 µL anti-CD3 APC, 1 µL anti-CD4 PerCP, 0,1 µL anti-IFN γ FITC und 0,01 µL anti-TNF α AlexaFluor700 (s.3.6). Ab einer Frequenz von 0,05 % IFN γ /TNF α doppelpositiver CD4⁺ T-Zellen wurde der Spender als PPD-reaktiv bezeichnet.

Die Studie erfolgte mit Zustimmung der Ethikkommission (Ärztchammer Hamburg, WF-007/09).

3.2 Isolierung von PBMCs aus Vollblut oder Buffycoat

Vollblut oder Buffycoat (als Nebenprodukt von Blutspenden) wurde bei Raumtemperatur im Verhältnis 1:2 mit sterilem PBS verdünnt. Mit dem verdünnten Blut wurden je 15 ml Biocoll (Biochrom AG) überschichtet und für 30 min bei 1500 rpm und Raumtemperatur (RT) ohne Bremse zentrifugiert. Der Leukozytenring wurde in ein neues Röhrchen überführt und mit sterilem, kaltem PBS auf 50 ml aufgefüllt. Die Leukozyten wurden mittels Zentrifugation für 20 min, bei 1200 rpm, 4 °C sedimentiert und anschließend zweimal mit sterilem, kaltem PBS gewaschen (Zentrifugation für 12 min bei 1200 rpm und 4 °C).

3.3 Kryokonservierung von PBMCs und Zelllinien

Für die Langzeit-Lagerung in flüssigem Stickstoff wurden die Zellen in 500 µl sterilem FKS aufgenommen und anschließend 500 µl Einfrierlösung (FCS + 20 % DMSO) tropfenweise zugegeben. Die Zellen wurden mit Hilfe eines „Mr. Frosty“ Kryo-Einfriergefäßes (Nalgene), das eine konstante Abkühlgeschwindigkeit von 1 °C/Minute ermöglicht, zunächst auf -80 °C abgekühlt und nach 24 Stunden in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen wurden die Zellen zunächst in 9 ml sterilem, kaltem PBS + 10 % FCS gegeben und für 12 min bei 1500 rpm und 4 °C sedimentiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal

mit sterilem, kaltem PBS gewaschen (Zentrifugation für 12 min bei 1500 rpm und 4 °C) und die Zellzahl bestimmt.

3.4 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellen wurden in 1 mL PBS oder Medium aufgenommen und mit 0,04 % Trypanblau (Gibco), zur Färbung toter Zellen, verdünnt. Anschließend wurden 10 µL der Zellsuspension in eine Neubauer-Zählkammer (0,1 × 0,0025 mm²) überführt und die Zellzahl mit Hilfe folgender Formel bestimmt:

$$\text{Zellen/mL} = \text{Zellen in einem Großquadrat} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

3.5 Oberflächenfärbung von PBMCs und T-Zellen für die Durchflusszytometrie

Alle Schritte der Oberflächenfärbung wurden in 96-well Zellkulturplatten durchgeführt. Wenn das Volumen der Zellsuspension mehr als 50 µL betrug, wurden die Zellen vor der Färbung für 5 min bei 1500 rpm und 4 °C sedimentiert und der Überstand anschließend abgeworfen. Die entsprechenden Antikörper wurden im Residualvolumen zugegeben, mit den Zellen resuspendiert und für 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Zum Waschen wurden pro well 180 µL PBS zugegeben und die Platte für 5 min bei 1500 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgeworfen und die Zellen in 100 µL PBS resuspendiert. Die durchflusszytometrische Analyse wurde mit dem LSR II durchgeführt.

3.6 Intrazelluläre Färbung von PBMCs und T-Zellen für die Durchflusszytometrie

Alle Schritte der intrazellulären Färbung wurden in 96-well Zellkulturplatten und auf Eis durchgeführt. Die Zellen wurden für 5 min bei 1500 rpm und 4 °C sedimentiert und der Überstand anschließend abgeworfen. Zur gleichzeitigen Fixierung und Permeabilisierung wurden die Zellen in 100 µL CytoFix/CytoPerm Lösung (BD Biosciences) resuspendiert und für 25 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen für 5 min bei 1700 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand abgeworfen. Die Zellen wurden zweimal mit je 180 µL Perm/Wash Puffer (BD Biosciences; 10x Konzentrat vor Gebrauch mit destilliertem Wasser verdünnen) gewaschen (Zentrifugation für je 5 min bei 1700 rpm und 4 °C). Anschließend wurden die entsprechenden Antikörper im Residualvolumen zugegeben und mit den Zellen resuspendiert. Nach 30 min Inkubation im Dunkeln wurde erneut zweimal mit Perm/Wash Puffer gewaschen (Zentrifugation

für je 5 min bei 1700 rpm und 4 °C) und die Zellen anschließend in 100 µL PBS aufgenommen. Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte mit dem LSR II.

3.7 Fluoreszenzmarkierung des anti-SOCS3 Antikörpers

Für die durchflusszytometrische Analyse von SOCS3 wurde der polyklonale anti-SOCS3 Antikörper aus Kaninchen von Abcam (ab16030) verwendet, der vom Hersteller u. a. für den spezifischen Nachweis von humanem SOCS3 in der Durchflusszytometrie beschrieben ist. Der Antikörper wurde mit Hilfe des *DyLight Microscale Labeling Kits* (Pierce) entweder mit DyLight 488 oder DyLight 649 markiert. Hierfür wurden 8 µL Borat-Puffer zu 100 µL Antikörper (1 mg/mL) gegeben und gut gemischt. Falls sich Kristalle im Borat-Puffer gebildet hatten, wurden diese vor Zugabe zum Antikörper bei 70 °C gelöst. Nach Mischen des Antikörpers mit dem DyLight Fluoreszenzfarbstoff erfolgte die Bindung des Farbstoffes an den Antikörper für 1 h bei RT im Dunkeln. Die Aufreinigungsmatrix wurde mit 100 µL PBS äquilibriert (45 sec bei 4000 rpm und RT in der Tischzentrifuge) und nicht-gebundener Fluoreszenzfarbstoff durch Bindung an die Matrix entfernt. Nach Elution des markierten Antikörpers wurde die Matrix mit 50 µL PBS gespült (je 45 sec bei 4000 rpm und RT in der Tischzentrifuge) und diese Fraktion mit dem eluierten Antikörper vereinigt. Die Optimale Antikörperkonzentration wurde mittels Titration des Antikörpers durch intrazelluläre Färbung von PBMCs ermittelt. Tabelle 3.1 zeigt die Antikörperkonzentration der einzelnen Chargen, die für die intrazelluläre Färbung von PBMCs und T-Zellen eingesetzt wurden.

Tabelle 3.1: Optimale Menge des fluoreszenzmarkierten anti-SOCS3 Antikörpers für die intrazelluläre Färbung von PBMC und T-Zellen

Fluoreszenzfarbstoff	Charge	µL/Ansatz
DyLight 488	1	0,2
	2	0,75
	3	0,1
	4	0,4
	5	0,1
	6	0,25
	7	0,2
	8	1
DyLight 649	1	2
	2	0,75
	3	0,1

3.8 Durchflusszytometrische Analyse der SOCS3 Expression

Die Zellen wurden wie im Abschnitt 3.6 beschrieben fixiert, permeabilisiert und anschließend mit dem fluoreszenzmarkierten anti-SOCS3 Antikörper (eingesetzte Menge s. 3.7) gefärbt. Für die Analyse der Spezifität wurde der Antikörper mit dem SOCS3-Peptid (bestehend aus den 26 C-terminalen Aminosäuren von SOCS3, Abcam) oder einem Kontrollpeptid (Rv3407 von *M. tuberculosis*, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von T. Ottenhoff) für 30 min bei RT unter Schütteln (600rpm) vorinkubiert.

3.9 Magnetisch aktivierte Zell-Sortierung (MACS)

Für die Anreicherung von CD4⁺ T-Zellen, sowie CD14⁺ Monozyten wurde das IMag System von BD verwendet. PBMCs wurden für 5 min bei 1500 rpm und 4 °C sedimentiert und der Überstand anschließend dekantiert. Die Zellen wurden in 1 mL MACS-Puffer aufgenommen und erneut sedimentiert. Pro 1×10^7 Zellen wurden 12,5 µl anti-CD4 oder 50 µL anti-CD14 magnetische Partikel (beide BD Biosciences) zugeben und mit der Pipette resuspendiert. Die Zellen wurden für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 1 mL MACS-Puffer zugegeben und die Zellsuspension in ein steriles FACS-Röhrchen überführt. Je Röhrchen wurden maximal 8×10^7 Zellen verwendet. Das Röhrchen wurde für 10 min in den IMag-Magneten gestellt, so dass die magnetisch markierten Zellen an der Rückseite des Röhrchens adherierten. Der Überstand wurde vorsichtig mit einer langen Pipettenspitze abgenommen und die Zellen in 1 mL frischem MACS-Puffer resuspendiert. Das Röhrchen wurde für weitere 5 min im IMag-Magneten inkubiert und anschließend der Überstand abgenommen. Die übrigen Zellen wurden erneut in 1 mL frischem MACS-Puffer aufgenommen und im IMag-Magneten für 5 min inkubiert. Nachdem der letzte Überstand abgenommen worden war, wurde das Pellet in 1 mL T-Zell-Medium aufgenommen und die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Die Reinheit der angereicherten Zellen wurde durchflusszytometrisch nach Oberflächenfärbung (s. 3.5) mit Hilfe des LSR II bestimmt. Für CD4⁺ T-Zellen wurden folgende Antikörper verwendet: 1 µL anti-CD3 PerCP, 0,5 µL anti-CD4 APC und 1 µL anti-CD8 FITC. Für CD14⁺ Monozyten wurden folgende Antikörper verwendet: 1 µL anti-CD3 PerCP und 1 µL CD14 APC. Die Reinheit war bei allen Experimenten >95 %.

3.10 *In vitro* Stimulation von PBMCs und T-Zellen

Stimulation von PBMCs für die Quantifizierung der SOCS3 Expression

Pro Ansatz wurden 2×10^5 PBMCs in 200 µL T-Zell-Medium in einer 96-well Rundbodenplatte mit 5 µg/mL PPD Tuberkulin oder 1 µL anti-CD3/CD28 stimuliert. Die Zellen wurden

nach 2 h, 4 h, 8 h, 24 h und 48 h fixiert und permeabilisiert (s. 3.6). Die Färbung und durchflusszytometrische Analyse wurde für alle Proben gleichzeitig durchgeführt, um äußere Einflüsse auf die Analyse der MFI zu minimieren. Es wurden folgende Antikörper verwendet: 0,5 µL anti-CD40L APC (eBioscience) und anti-SOCS3 DyLight488. Die SOCS3 Expression wurde in den CD40L⁺ und CD40L⁻ Zellen bestimmt. Im Gegensatz hierzu wurde die SOCS3 Expression nach 6 Tagen PPD-Stimulation in den gesamten Lymphozyten bestimmt, da CD40L hier nur noch schwach exprimiert war.

Restimulation zur Bestimmung des Zytokinprofils von T-Zell Klonen

Die Zellen wurden im *well* resuspendiert und 5×10^4 - 2×10^5 Zellen in einer 96-*well* Zellkulturplatte in 200 µL T-Zell-Medium mit 10 ng/mL PMA und 1 µg/mL Ionomycin stimuliert. Gleichzeitig wurde Brefeldin A zugegeben, um die Sekretion der Zytokine zu stoppen. Nach 6 h (CD4⁺ T-Zellen nach lentiviraler Transduktion) oder 16 h (T-Zell Klone) wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und gefärbt (s. 3.6). Folgende Antikörper wurden für die Färbung verwendet: 0,5 µL anti-CD40L APC-eFluor780 (eBioscience), 0,01 µL anti-TNF α AlexaFluor700 (BD Biosciences), 0,5 µL anti-IFN γ PE-Cy7 (BD Biosciences), 0,075 µL anti-IL-4 PE (BD Biosciences) und 0,2 µL anti-IL-17 V450 (BD Biosciences).

3.11 T-Zell-Makrophagen Koinkubation

Für dieses Experiment wurden frische PBMCs von PPD⁺ Spendern eingesetzt. $1,2 \times 10^7$ Zellen wurde in einer 24-*well* Zellkulturplatte (1×10^6 Zellen/mL) in je 2 mL T-Zell-Medium mit 2 µg/mL PPD für sechs Tage stimuliert. Zusätzlich wurden $3,7 \times 10^7$ Zellen ohne PPD kultiviert. Gleichzeitig wurden autologe Monozyten *in vitro* zu Makrophagen-artigen Zellen ausdifferenziert. Hierfür wurden 1×10^5 CD14⁺ Monozyten/pro *well* (angereichert mit dem IMag System, s. 3.9) einer 96-*well* Flachbodenplatte in 200 µL Makrophagen-Medium für sechs Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Dies induzierte die Adhärenz der Zellen und somit die Differenzierung der Monozyten in Makrophagen. An Tag 6 wurden die Makrophagen mit GFP-exprimierenden *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin (BCG-GFP,MOI 5) für 3 h infiziert. Als Kontrolle wurden nicht-infizierte Makrophagen verwendet. Anschließend wurden PPD-stimulierte oder nicht-stimulierte PBMCs (5×10^5 Zellen/*well*) in Makrophagen-Medium zugegeben und für unterschiedliche Zeiträume mit den Makrophagen kokultiviert. Zu den entsprechenden Zeitpunkten wurden die PBMCs abgenommen und die SOCS3 Expression durch intrazelluläre Färbung mit 0,5 µL anti-CD40L APC und anti-SOCS3 FITC (Menge s. Tabelle 3.1) durchflusszytometrisch quantifiziert.

3.12 T-Zell-Klonierung von CD4⁺CD161⁺ T-Zellen mittels Einzelzellsortierung

T-Zell Klone können *in vitro* durch Expansion einer Vorläuferzelle generiert werden. Hierbei entstehen Klone, die ein charakteristisches Zytokinprofil aufweisen. Die Einzelzellsortierung mittels Durchflusszytometrie bietet hierbei die Möglichkeit die Zellen zusätzlich nach Oberflächenmarkern zu sortieren. Damit die sortierten Zellen wachsen, werden sie polyklonal mit anti-CD3/CD28 in Anwesenheit von IL-2 und radioaktiv-bestrahlten antigenpräsentierenden Zellen (APZ) stimuliert. Die APZ bieten hierbei eine zusätzliche Kostimulation und sorgen für eine „zelluläre Umgebung“ der sortierten T-Zellen. Die Bestrahlung der APZ mit γ -Strahlen führt zu einem Wachstumsstillstand dieser Zellen, so dass nur die sortierten T-Zellen proliferieren können.

Die Klonierung der T-Zellen erfolgte mit PBMCs gesunder Spender. Für die Einzelzellsortierung wurden zunächst 2×10^7 Zellen mit anti-CD4 APC-H7 (BD; 0,5 μ L/ 1×10^6 Zellen) und anti-CD161 FITC (Miltenyi Biotec; 1 μ L/ 1×10^6 Zellen) im Residualvolumen gefärbt und anschließend in 2 mL T-Zell-Medium resuspendiert. Für die Kompensation des Durchflusszytometers wurden zusätzlich Einzelfärbungen mit 0,5 μ L anti-CD4 APC-H7 und 1 μ L anti-CD161 FITC (je 5×10^5 Zellen) durchgeführt. Direkt vor der Einzelzellsortierung erfolgte die Filtration der Zellen durch einen Filter für Einzelzellsuspensionen (*CellTrics* 50 μ m, Partec). Gleichzeitig wurden PBMCs eines zweiten Spenders vorbereitet, um als APZ für die sortierten Zellen zu dienen. Da die T-Zellen bei dieser Methode polyklonal stimuliert wurden, war die Verwendung von autologen APZ nicht zwingend notwendig, da das Zytokinprofil durch die APZ nicht beeinflusst wurde (unpublizierte Ergebnisse der Arbeitsgruppe). Von den PBMCs des zweiten Spenders wurden 1×10^8 Zellen für 600 s in einer Cäsiumquelle (γ -Strahlung) auf Eis bestrahlt. Anschließend wurden die APZ in T-Zell-Medium ($5,6 \times 10^5$ Zellen/mL) resuspendiert und 1,11 μ L/mL anti-CD3/CD28 Dynabeads (Invitrogen), sowie 20 U/mL IL-2 zugegeben. Je 180 μ L dieser Zellsuspension wurden in die inneren 60 *wells* einer 96-*well* Rundbodenplatte vorgelegt, was pro *well* 1×10^5 APZ, 0,2 μ L anti-CD3/CD28 Dynabeads und 4 U IL-2 entsprach. In die äußere Reihe *wells* wurden je 200 μ L steriles PBS gegeben. Dies verhinderte die Verdunstung von Medium, die in den äußeren *wells* am stärksten ist. Mit Hilfe des FACS Aria III Durchflusszytometers erfolgte die Sortierung von CD4⁺CD161⁺ T-Zellen in die Platten (Reinheit >90 %), wobei folgende Platten und Zellzahlen sortiert wurden: 1 Platte mit 0 Zellen/*well*, 1 Platte mit 1 Zelle/*well*, 2 Platten mit 2 Zellen/*well*, 2 Platten mit 3 Zellen/*well*, 2 Platten mit 5 Zellen/*well*, und 1 Platte mit 10 Zellen/*well*.

Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂ für sieben Tage. Nach Zugabe von 20 U/mL IL-2 wurden die Zellen für weitere sieben Tage inkubiert. Anschließend wurden die Platten mit Hilfe eines Lichtmikroskopes auf wachsende Klone untersucht. Für die Analyse des Zytokinprofils wurden nur Klone verwendet, die in Platten mit <37 % positiven *wells* gewachsen waren. Bei

einer höheren Anzahl positiver Klone pro Platte ist die Wahrscheinlichkeit gering, dass die Klone aus einer Vorläuferzelle gewachsen sind.

Die Analyse des Zytokinprofils erfolgte nach *in vitro* Restimulation mit PMA/Ionomycin (s. 3.10) und intrazellulärer Färbung (s. 3.6) mit 0,5 µL anti-CD40L APC-eFluor780 (eBiosciences), 0,01 µL anti-TNF α AlexaFluor700 (BD Biosciences), 0,5 µL anti-IFN γ PE-Cy7 (BD Biosciences), 0,2 µL anti-IL-17 V450 (BD Biosciences) und 0,075 µL anti-IL-4 PE (BD Biosciences).

3.13 Transformation von *E. coli* mit der KCM-Methode

Pro Transformationsansatz wurde ein Reaktionsgefäß mit kompetenten *E. coli* TOP10 Bakterien (100 µL) auf Eis aufgetaut. 20 µL 5 x KCM (0,5 M KCl + 0,15 M CaCl $_2$ + 0,25 M MgCl $_2$ in H $_2$ O) wurden mit der DNA (10 µL Ligationsansatz oder 50 ng Plasmid-DNA) gemischt und mit H $_2$ O auf 100 µL aufgefüllt. Anschließend wurden die Bakterien zugegeben und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach weiteren 10 min bei RT wurde der Transformationsansatz auf Platten mit LB-Agar + Ampicillin (100 µg/mL) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Zur Langzeitkonservierung transformierter *E. coli* wurden Glycerolstocks angelegt. Hierfür wurden 850 mL einer *E. coli* Flüssigkultur mit 150 µL Glycerol gemischt und bei -70 °C gelagert.

3.14 Plasmidpräparationen aus *E. coli*

Flüssigkulturen (1,8 mL) wurden aus Einzelkolonien oder Glycerolstocks angeimpft und für 16 h bei 37 °C kultiviert. Die Isolation der Plasmide erfolgte mit dem *NucleoSpin Plasmid* Kit (Machery-Nagel) nach Herstellerangaben. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte mit 50 µL H $_2$ O.

Für die Isolation von Plasmid-DNA zur Herstellung lentiviraler Partikel wurde das Plasmid Plus Maxi Kit (Qiagen) zusammen mit der QIAvac Vakuumtechnologie (Qiagen) nach Herstellerangaben verwendet. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte mit 400 µL H $_2$ O.

3.15 SOCS3 Westernblot

Für den Nachweis des SOCS3 Proteins im Westernblot wurden 3 x 10 6 CD4 $^+$ T-Zellen (7,5 x 10 5 Zellen/mL) in einer 96-well Rundbodenplatte für 2 Tage mit anti-CD3/CD28 (2 µL/well) stimuliert. Nach Sedimentation (5 min bei 1500 rpm und 4 °C) erfolgte die Zelllyse durch Zugabe von 150 µL Probenpuffer, Homogenisierung mit Spritze und Kanüle und Denaturierung für 15 min bei 70 °C. Die Zelltrümmer wurden mittels Zentrifugation für 10 min bei 12000 rpm und RT (Tischzentrifuge) entfernt und die Proteine des Zelllysates mit Hilfe eines 15 % Polyacrylamidgels aufgetrennt. Die Proteine wurden anschließend mit Hilfe eines *semi-dry* Blotsystems auf

eine Nitrozellulosemembran (GE Healthcare) transferiert (40 min bei 140 mA). Nach Überprüfung des Transfers mit Ponceau-Rot erfolgte die Blockierung freier Bindungsstellen auf der Membran für 1 h bei RT mit Blockierungspuffer (PBS + 3 % BSA + 0,5 % Tween 20). Für den gleichzeitigen Nachweis von SOCS3 und β -Aktin wurde die Membran auf der Höhe der 35 kDa Bande des Markers auseinandergeschnitten. Anschließend wurde der untere Teil der Membran mit anti-SOCS3 (Kaninchen, 0,5 μ g/mL in 10 mL PBS + 0,2 % Tween 20 + 5 % Blockierungspuffer verdünnt) und der obere Teil der Membran mit anti- β -Aktin (Maus, 0,5 μ g/mL in 10 mL PBS + 0,2 % Tween 20 + 5 % Blockierungspuffer verdünnt) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Für die Analyse der Spezifität wurde der anti-SOCS3 Antikörper mit dem SOCS3-Peptid (Abcam) 30 min bei RT unter Schütteln (600rpm) vorinkubiert. Nach zwei Waschschritten von je 10 min mit Waschpuffer (PBS + 0,2 % Tween 20) wurden die Sekundärantikörper zugegeben (SOCS3: Ziege anti-Kaninchen Ig HRP, 1:2000; β -Aktin: Kaninchen anti-Maus Ig HRP, jeweils in 10 mL PBS + 0,2 % Tween 20 + 5 % Blockierungspuffer verdünnt) und für 45 min bei RT inkubiert. Die Entwicklung des Westernblots erfolgte mit 1 mL ECL-Lösung (Pierce) für 5 min.

3.16 Modulierung der SOCS3 Expression in humanen primären CD4⁺ T-Zellen durch lentivirale Transduktion

Mit Transduktion wird eine Methode bezeichnet, bei der Gene über virale Vektoren in Zellen eingeschleust werden. Es können verschiedene Arten genetisch modifizierter Viren für diese Technik verwendet werden. In den letzten Jahren hat sich vor allem die Verwendung von Retroviren etabliert, da diese ein relativ kleines und einfaches Genom haben. Zudem werden die transferierten Gene durch Einbau in das Genom der Zielzelle stabil exprimiert. Häufig werden Lentiviren, die auf HIV basieren verwendet. Das Genom der Viren wird soweit reduziert und verändert, dass die Viruspartikel zwar noch Zellen infizieren können, aber keine Replikation und somit Vermehrung der Viren mehr stattfindet. Die transgenen Viruspartikel werden mit Hilfe einer sogenannten Verpackungszelllinie, meist HEK293T-Zellen, produziert (Abbildung 3.1). Hierfür werden die Zellen mit dem Expressionsplasmid transient transfiziert, welches das zu transferierende Gen enthält. In dieser Arbeit wurden die sogenannten *Lentiviral Gene Ontology* (LeGO)-Vektoren verwendet (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von B. Fehse, UKE Hamburg) [95]. Diese Plasmide enthält die regulatorischen Elemente für die Verpackung, aber keine strukturellen und regulatorischen Proteine des Virus. Die Replikation in der Zielzelle ist damit ausgeschlossen. Das Expressionsplasmid wird daher zusammen mit weiteren Plasmiden transfiziert, welche für die strukturellen und regulatorischen Proteine der Lentiviren kodieren. Für infektiöse Viruspartikel werden folgende lentivirale Gene benötigt:

gag Kern und Matrix-Proteine des Nukleokapsids
 pol Reverse Transkriptase, Protease, Integrase und Ribonuklease
 rev Protein, das den Export der ungespleißten, viralen RNA aus dem Kern vermittelt
 env Hüllprotein

Das env stammt allerdings meist nicht von HIV, sondern von anderen Viren (CMV u. a.). Mit dem Hüllprotein wird die Spezifität der Viren für verschiedene Zelltypen (Tropismus) festgelegt. Durch Veränderung dieses Proteins können verschiedene Zellen effektiv infiziert werden. Die Viruspartikel werden 24 - 48 h nach Transfektion Verpackungszellen aus dem Zellkulturüberstand geerntet. Mit diesen transgenen Viren werden Zielzellen infiziert, die anschließend das transferierte Gen stabil exprimieren (Abbildung 3.1). Diese Zellen werden meist durch die gleichzeitige Expression eines Fluoreszenzmarkers identifiziert. Dieser ist ebenfalls im Expressionsplasmid kodiert.

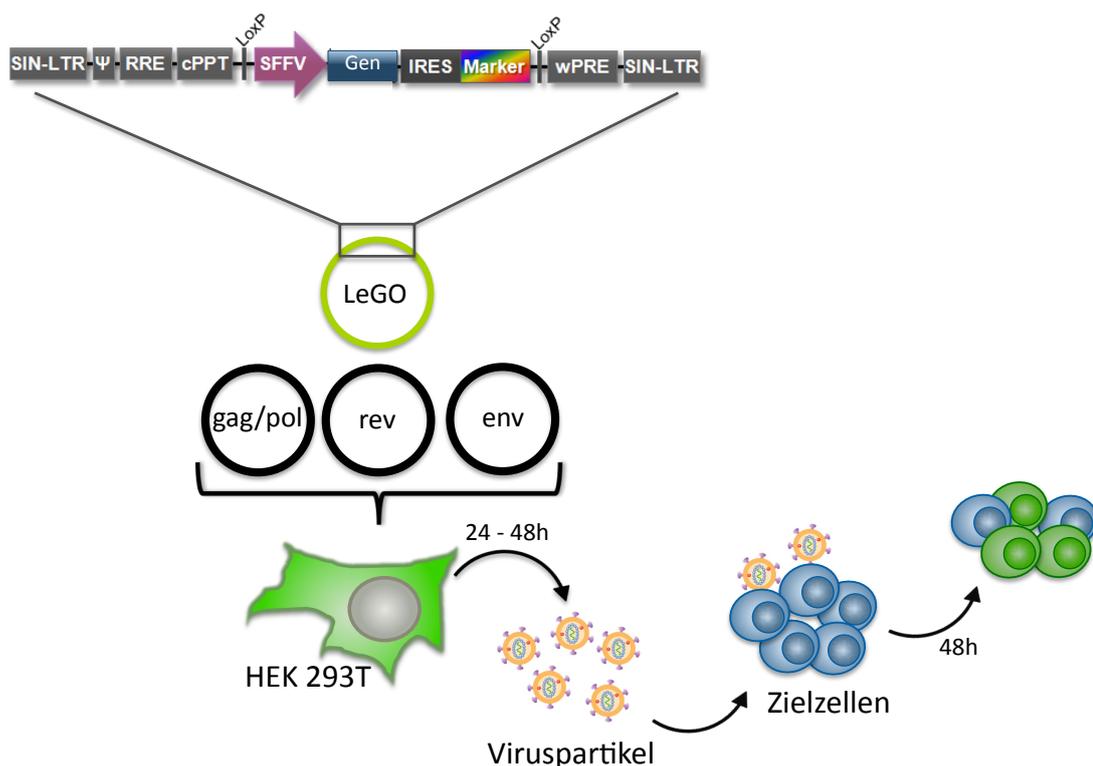


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der lentiviralen Transduktion. Die Verpackungszelllinie HEK293T wird mit dem Expressionsplasmid (LeGO) und mit den Plasmiden für die strukturellen und regulatorischen Proteine der Viruspartikel (gag/pol, rev und env) transient transfiziert. Nach 24 - 48 h werden die Viruspartikel aus dem Überstand geerntet. Nach Infektion der Zielzellen wird das transferierte Gen, sowie ein Fluoreszenzmarker exprimiert. LTR: *long terminal repeat*, ψ : Verpackungssignal, RRE: *rev responsive element*, cPPT: *central polypurin tract*, IRES: interne ribosomale Eintrittsstelle, wPRE: *woodchuck posttranscriptional regulatory element*.

3.16.1 Klonierung von humanem SOCS3 in LeGO-iG2

Für die Herstellung von transgenen, lentiviralen Partikeln wurde das humane SOCS3-Gen (NM_003955, Sequenz s. Anhang) in den lentiviralen Expressionsvektor LeGO-iG2 kloniert. In diesem Vektor steht das Protein unter der Kontrolle des konstitutiven *Spleen Focus-Forming Virus* (SFFV)-Promoters (Abbildung 3.2a). Bei Transkription von SOCS3 wird eine bicistronische mRNA generiert, die zusätzlich das Gen des *enhanced* grün-fluoreszierenden Proteins (eGFP) unter der Kontrolle einer internen ribosomalen Eintrittsstelle (IRES) beinhaltet. Dadurch wird eGFP gleichzeitig mit SOCS3 exprimiert und die SOCS3 transduzierten Zellen können durchflusszytometrisch anhand der eGFP-Expression identifiziert werden. Als Kontrollvektor wurde LeGO-G2 verwendet (Abbildung 3.2b), da LeGO-iG2 ohne Insert nicht als Kontrollvektor verwendet werden kann, da ein Gen unter der Kontrolle einer IRES ohne vorgeschaltetes Gen nur sehr ineffizient exprimiert wird.

SOCS3 wurde mittels PCR aus genomischer DNA mit folgender Zusammensetzung amplifiziert:

31,5 µL	H ₂ O
10 µL	5 x HF Puffer
1 µL	dNTPs (10 mM)
1 µL	SOCS3_BamHI_fw (10 µM)
1 µL	SOCS3_EcoRI_rv (10 µM)
5 µL	gDNA
0,5 µL	Phusion-Polymerase (2 u/µL)
<hr/>	
50 µL	gesamt

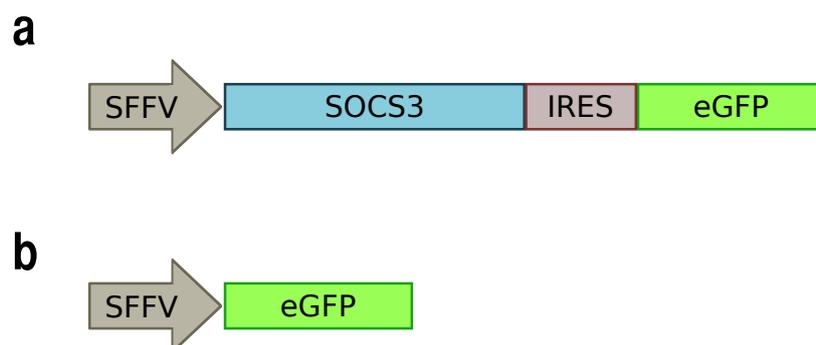


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung von LeGO-iG2-SOCS3 und LeGO-G2. (a) LeGO-iG2-SOCS3. Die SFFV (*Spleen Focus-Forming Virus*)-abhängige Transkription des Vektors führt zur Generierung einer bicistronischen mRNA. Die Translation des eGFP wird von einer IRES (Interne ribosomale Eintrittsstelle) initiiert. **(b)** Kontrollvektor LeGO-G2.

Hierfür wurden die Oligonukleotid-Primer SOCS3_BamHI_fw und SOCS3_EcoRI_rv verwendet, die gleichzeitig die Restriktionsschnittstellen BamHI und EcoRI an die DNA-Sequenz anfügen. Die *Phusion*-Polymerase verfügt über eine Korrekturlesefunktion und ist daher weniger fehleranfällig bei der Amplifikation als *Taq*-Polymerasen. Folgendes Programm wurde verwendet: Initiale Denaturierung für 30 sec bei 98 °C, 35 Zyklen mit 10 sec bei 98 °C und 30 sec bei 72 °C, finale Elongation für 5 min bei 72 °C. Das PCR-Produkt hatte eine Größe von 702 bp und wurde mit Hilfe des *NucleoSpin Extract II Kits* (Machery-Nagel) aufgereinigt.

Das PCR-Produkt und der Vektor wurden jeweils mit den Restriktionsenzymen BamHI und EcoRI (FastDigest, Fermentas) für 5 min bei 37 °C geschnitten. Anschließend erfolgte die Ligation mit dem *Rapid DNA Ligation Kit* (Fermentas) für 5 min bei RT. Das Ligationsprodukt wurde in *E. coli* TOP10 mit der KCM-Methode (s. 3.13) transformiert und mittels Ampicillin-haltigem LB-Agar selektiert. Positive Klone wurden nach Isolierung der Plasmid-DNA (*NucleoSpin Plasmid Kit*, Machery-Nagel) mittels Restriktionsverdau mit BamHI und EcoRI nachgewiesen (700 bp DNA-Fragment) und mittels Sequenzierung bestätigt.

3.16.2 Klonierung von SOCS3-spezifischen shRNAs in LeGO-G

Für die Herunterregulierung von SOCS3 wurden fünf SOCS3-spezifische shRNAs (Thermo Scientific) getestet. Die Umklonierung der shRNAs aus dem pLKO-Vektor in den LeGO-G-Vektor wurde mit Änderungen nach dem Protokoll von Michael Milsom durchgeführt. Hierbei erfolgte nicht nur die Integration der shRNA in den LeGO-G-Vektor, sondern auch der Austausch des murinen U6-Promoters gegen den humanen U6-Promoter des pLKO-Vektors (Abbildung 3.3). Die shRNAs wurden mittels PCR mit folgender Zusammensetzung amplifiziert.



Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der Klonierung von shRNAs aus pLKO in LeGO-G. Die shRNA wird zusammen mit dem humanen (h)U6-Promoter aus dem pLKO-Vektor ausgeschnitten und in den LeGO-G-Vektor kloniert. Hierbei wird der murine (m)U6-Promoter durch den hU6-Promoter ersetzt.

33 µL	H ₂ O
10 µL	5 x GC-Puffer (Phusion-Polymerase)
1 µL	dNTPs (10 mM)
2,5 µL	DMSO (= 5 %)
1 µL	pLKO-shRNA_fw (10 µM)
1 µL	pLKO-shRNA_SalI-mut_rv (10 µM)
1 µL	pLKO (50 ng/µL)
0,5 µL	Phusion-Polymerase (2 u/µL)
<hr/>	
50 µL	gesamt

Bei den beiden Oligonukleotid-Primer sind universell, so dass sie zur Amplifikation jeder shRNA im pLKO-Vektor eingesetzt werden können. Der rv-Primer mutiert XhoI an Position 313 des pLKO-Vektors (Abbildung 3.4a) zu SalI (Abbildung 3.4b, Position 362). Für die Amplifikation wurde folgendes Programm verwendet: Initiale Denaturierung für 30 sec bei 98 °C, 35 Zyklen mit 10 sec bei 98 °C, 30 sec bei 60 °C und 30 sec bei 72 °C, finale Elongation für 5 min bei 72 °C. Das PCR-Produkt hatte eine Größe von 380 bp (Abbildung 3.4b). Nach Aufreinigung der PCR-Produkte mit dem *Nucleo Spin Extract II* Kit (Machery-Nagel) erfolgte der Restriktionsverdau mit Dpn I, NotI und SalI (*FastDigest*, Fermentas) für 15 min bei 37 °C. DpnI degradiert hierbei den methylierten Ausgangsvektor, so dass es nicht zu Religationen bei der Transformation kommt. Der LeGO-G-Vektor (Abbildung 3.4c) wurde mit den Restriktionsenzymen Bsp120I (kompatibel zu NotI, *FastDigest*, Fermentas) und XhoI (kompatibel zu SalI, *FastDigest*, Fermentas) für 5 min bei 37 °C geschnitten. Anschließend erfolgte die Ligation mit dem *Rapid DNA Ligation Kit* (Fermentas) für 5 min bei RT. Das Ligationsprodukt wurde in *E. coli* TOP10 mit der KCM-Methode transformiert (s. 3.13). Positive Klone wurden nach Isolierung der Plasmid-DNA (NucleoSpin Plasmid Kit, Machery-Nagel) mittels Restriktionsverdau mit EcoRI nachgewiesen. Der leere LeGO-G-Vektor, sowie der pLKO-Vektor besitzen jeweils eine Schnittstelle für EcoRI, während LeGO-G mit integrierter shRNA zwei Schnittstellen aufweist. Daher entstehen beim Restriktionsverdau positiver Klone zwei Fragmente (1,3 kb und 6,5 kb).

3.16.3 Kultivierung von HEK293T-Zellen

Bei HEK293T handelt es sich um eine adhärenente humane embryonale Nierenzelllinie (*Human Embryonic Kidney*) die bei lentiviralen Transduktionssystemen häufig als Verpackungszelllinie für die viralen Partikel verwendet wird. Die Zellen wurden mit HEK-Medium in 10 cm Zellkulturschalen (Sarstedt) kultiviert. Alle zwei Tage wurden die Zellen im Verhältnis 1:10 verdünnt. Hierfür wurde das alte Medium abgenommen und die Zellen mit 3 mL vorgewärmtem (37 °C) PBS gewaschen. Anschließend wurde 1 ml vorgewärmtes Trypsin-EDTA (PAA) zugegeben

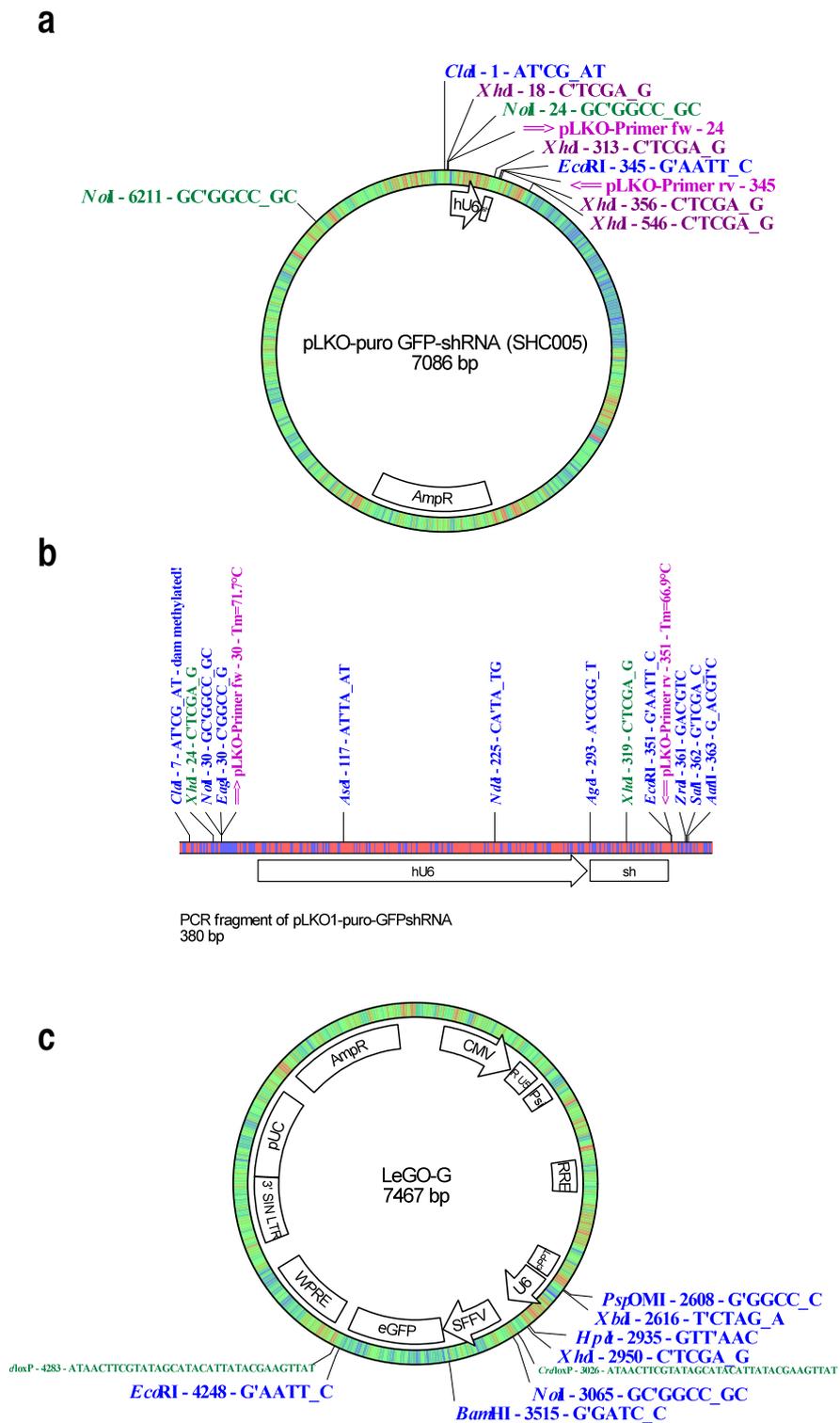


Abbildung 3.4: Vektorkarten von pLKO und LeGO-G. Restriktionsschnittstellen: blau, grün und lila Primerbindungsstellen: pink **(a)** Vektorkarte von pLKO mit shRNA-Sequenz. Dargestellt sind die Restriktionsschnittstellen im Bereich des humanen U6-Promoters (U6), sowie die Primerbindungsstellen. AmpR: Ampicillin-Resistenzgen **(b)** PCR-Produkt des pLKO-Vektors. **(c)** Vektorkarte von LeGO-G. Dargestellt sind die Restriktionsschnittstellen im Bereich des murinen U6-Promoters (U6).

und die Zellen durch Klopfen vom Schalenboden abgelöst. Die Zellen wurden mit Hilfe einer Pipette vereinzelt und das Trypsin durch Zugabe von 9 mL Medium inaktiviert. 1 mL der Zellsuspension wurde mit 9 mL frischem Medium weiterkultiviert. Die Zellen wurden für maximal 30 Passagen kultiviert.

3.16.4 Herstellung von lentiviralen Partikeln

Für die Herstellung wurden HEK293T-Zellen als Verpackungszelllinie verwendet. 5×10^6 HEK-Zellen wurden in einer 10 cm Schale ausgesät und nach 20 h mit einem der Expressionsvektoren (LeGO-G2, LeGO-iG2 oder LeGO-G) und den Vektoren für die regulatorischen und strukturellen Proteine der viralen Partikel mit Hilfe der Kalziumphosphat-Methode transfiziert. Hierfür wurden die Vektoren zunächst in 450 μ L H₂O verdünnt. Anschließend wurden 50 μ L CaCl₂ (2,5 M) zugegeben und die Mischung unter gleichzeitigem „Blubbern“ mit einer 1 mL Pipette zu 500 μ L 2 x HBS (Sigma-Aldrich) getropft. Es wurden folgende Mengen der einzelnen Vektoren verwendet:

Plasmid	pro Schale
Expressionsvektor	20 μ g
pMDLg/pRRE (gag/pol)	10 μ g
pRSV-Rev (rev)	5 μ g
phCMV-GALV-C _{4070A} (Membranprotein)	5 μ g

Der Transfektionsansatz inkubierte für 20 min bei RT. In dieser Zeit wurde das Medium der HEK-Zellen gegen 8 mL frisches HEK-Medium + 25 μ M Chloroquin ausgetauscht. Anschließend wurde der Transfektionsansatz zu den Zellen getropft. Nach 6 h bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde das Medium gegen 8 mL frisches HEK-Medium ohne Chloroquin ausgetauscht. Nach weiteren 24 h wurde der erste virushaltige Überstand abgenommen, sterilfiltriert (*low protein-binding* Sterilfilter (Millipore)) und 8 mL frisches HEK-Medium zu den Zellen gegeben. Nach 48 h wurde der zweite virushaltige Überstand abgenommen, sterilfiltriert und die Zellen entsorgt. Die Lagerung der Überstände erfolgte bei -80 °C.

Die Abschätzung der Konzentration infektiöser Partikel erfolgte mittels Infektion von HEK293T-Zellen mit verschiedenen Mengen der Virusüberstände. In einer 24-well Platte wurden 5×10^4 Zellen in 500 μ L HEK-Medium ausgesät. Nachdem die Zellen für 2 - 5 h adheriert waren, wurden 0,5 μ L, 1 μ L, 5 μ L und 50 μ L der einzelnen Virusüberstände zugegeben und die Zellen in Anwesenheit von Polybren (8 μ g/mL) für 1 h bei 2200 rpm und RT zentrifugiert. Nach Inkubation der infizierten Zellen für 6 - 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde das Medium gegen frisches HEK-Medium ohne Polybren ausgetauscht und die Zellen weiter bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Drei Tage nach Transfektion erfolgte die durchflusszytometrische

Quantifizierung der eGFP⁺ Zellen. Hierfür wurde das Medium abgenommen und die Zellen in 200 µL PBS resuspendiert. Der Virustiter berechnete sich auf der Grundlage folgender Formel:

$$\text{Infektiöse Einheiten/mL} = \frac{\text{Anzahl ausgesäeter Zellen} \times \text{Anteil transduzierter Zellen}}{\text{Volumen des Überstandes}}$$

Der Virustiter wurde anhand des Ansatzes berechnet, dessen Anteil transduzierter Zellen zwischen 5 und 25 % lag, da bei höheren Transduktionsraten Mehrfachintegrationen auftreten und der Titer dadurch unterschätzt wird [96].

3.16.5 Transduktion von CD4⁺ T-Zellen mit lentiviralen Partikeln

Stimulation der T-Zellen

Aus frisch isolierten PBMCs (s. 3.2) gesunder Spender wurden CD4⁺ T-Zellen mittels MACS angereichert (s. 3.9). Die T-Zellen wurden in einer 96-well Rundbodenplatte für 2 Tage polyklonal aktiviert. Hierfür wurden je $1,5 \times 10^5$ Zellen/well in 200 µL T-Zell-Medium mit 2 µL anti-CD3/CD28 Dynabeads (8×10^4 Beads pro well) und 20 U/mL IL-2 stimuliert.

Retronektin-Transduktion

Vor der Transduktion wurden 24-well Zellkulturplatten (BD Falcon) mit Retronektin ($9 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) beschichtet. Hierfür wurden pro well 18 µg Retronektin in 500 µL sterilem PBS zugegeben und für 2 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Das Retronektin wurde abgenommen und 500 µL Blocklösung (PBS +2 % BSA) zugegeben. Nach Inkubation von 30 min bei RT oder über Nacht bei 4 °C wurden die wells mit je 1 mL Waschlösung (HBSS +2,5 % 1M HEPES) gewaschen. Zur Lagerung wurde 1 mL Waschlösung pro well zugegeben und die Platten bei 4 °C bis zu einer Woche aufbewahrt.

Am Tag der Transduktion wurden die Virusüberstände im Wasserbad (37 °C) aufgetaut und anschließend auf Eis gelagert. Das entsprechende Volumen der Virusüberstände für eine MOI 10 wurde in die Retronektin-beschichteten wells gegeben und für 1 h bei 2200 rpm und 4 °C zentrifugiert. Pro Zentrifugationsschritt wurden 250 - 750 µL Virusüberstand eingesetzt. Betrug das Volumen weniger als 250 µL wurde der Virusüberstand mit HEK-Medium verdünnt, überstieg das Volumen 750 µL wurde der Virusüberstand auf mehrere Zentrifugationsschritte aufgeteilt. Bei der Berechnung der MOI wurde berücksichtigt, dass bei jedem Zentrifugationsschritt etwa 50 % der Viruspartikel an die Plattenoberfläche binden. Für die Transduktion von $2,5 \times 10^5$ Zellen mit einer MOI 10 wurden daher je 5×10^6 Viruspartikel eingesetzt.

Die T-Zellen wurden resuspendiert, in einem 15 mL Röhrchen vereinigt und für 5 min bei 1500 rpm und RT sedimentiert. Die Zellen wurden in vorgewärmtem T-Zell-Medium +20 U/mL IL-2 aufgenommen (5×10^5 Zellen/mL). Anschließend wurden je 500 µL der Zellsuspension in

die *wells* gegeben ($= 2,5 \times 10^5$ Zellen). Nach Inkubation für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden die Zellen resuspendiert, in ein 15 mL Röhrchen überführt und für 5 min bei 1500 rpm und RT zentrifugiert. Das Medium wurde abgenommen und die Zellen in 1,2 mL frischem T-Zell-Medium +20 U/mL IL-2 aufgenommen und auf 6 *wells* einer 96-well Rundbodenplatte aufgeteilt (je 200 µL pro *well*). Nach weiteren 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde die Transduktionseffizienz der Zellen durchflusszytometrisch bestimmt.

Spin-Infektion

Die T-Zellen wurden nach zwei Tagen Stimulation resuspendiert, in einem 15 mL Röhrchen vereinigt und für 5 min bei 1500 rpm und RT sedimentiert. Die Zellen wurden in vorgewärmtem T-Zell-Medium +20 U/mL IL-2 +8 µg/mL Polybren aufgenommen (5×10^5 Zellen/mL) und je 500 µL der Zellsuspension in die *wells* gegeben ($= 2,5 \times 10^5$ Zellen). Anschließend erfolgte die Zugabe von $2,5 \times 10^6$ Viruspartikeln (MOI 10). Die Zellen wurden für 1 h bei 1500 rpm und RT zentrifugiert und anschließend für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Der Mediumwechsel und die Analyse der Transduktionseffizienz erfolgte analog zur Retronektin-Transduktion.

3.16.6 Durchflusszytometrische Analyse der transduzierten Zellen

Zwei Tage nach Transduktion wurden die Zellen durchflusszytometrisch auf eGFP-Fluoreszenz analysiert. Für weitere Analysen, wie SOCS3 Expression, Proliferation, Apoptose und Zytokinexpression, wurden die eGFP⁺ Zellen des SOCS3-Transduktionsansatzes mit einem Analysefenster ausgewählt (im Folgenden SOCS3-transduzierte Zellen genannt). Zusätzlich gab es zwei Arten von Kontrollzellen: zum einen die Zellen, welche mit dem Kontrollvektor LeGO-G2 behandelt worden waren. Hier wurden die eGFP⁺ Zellen für weitere Analyse ausgewählt (im Folgenden Kontrollvektor-transduzierte Zellen genannt). Zum anderen gab es Zellen, die nicht mit Virus behandelt worden waren. Hier wurden die eGFP⁻ Zellen für weitere Analysen ausgewählt (Im Folgenden untransduzierte Zellen genannt).

3.17 Markierung von CD4⁺ T-Zellen mit *Cell Proliferation Dye 649*

Die Analyse der Proliferation von SOCS3-transduzierten T-Zellen erfolgte durch Markierung mit dem *Cell Proliferation Dye 649* (eBioscience) direkt vor der Transduktion. Dieser Proliferationsfarbstoff passiert die Zellmembran und bindet irreversibel an primäre Amine von intrazellulären Proteinen. Bei der Zellteilung wird der Farbstoff auf beide Tochterzellen verteilt und die Fluoreszenz daher halbiert. Die Fluoreszenz wird durch Anregung mit dem roten Laser (633 nm) und Detektion mit einem 660/20 Bandpass Filter nachgewiesen (äquivalent zu APC oder AlexaFluor647). Damit ist dieser Farbstoff mit eGFP kompatibel.

Für die Markierung wurden T-Zellen zwei Tagen nach Stimulation resuspendiert, in einem 15 mL Röhrchen vereinigt und für 5 min bei 1500 rpm und RT sedimentiert. Anschließend wurden 1×10^6 - 5×10^6 T-Zellen in 500 μ L PBS (RT) resuspendiert und 500 μ L Stocklösung des Proliferationsfarbstoffes (10 μ M in PBS, RT) zugegeben. Nach Inkubation für 10 min bei 37 °C im Dunkeln wurden 5 mL kaltes PBS +10 % Humanserum (PAA) zugegeben und für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen sedimentiert (5 min bei 1500 rpm und 4 °C) und zweimal mit je 1 mL kaltem PBS + 10 % Humanserum gewaschen (Zentrifugation für 5 min bei 1500 rpm und 4 °C). Nach einem weiteren Waschschrift mit 1 mL T-Zell-Medium wurden die Zellen in T-Zell-Medium (5×10^5 Zellen/mL) aufgenommen.

3.18 Apoptosefärbung

Die Färbung wurde mit AlexaFluor647 Annexin V und 7-AAD durchgeführt. Annexin V bindet an Phosphatidylserin auf der Außenseite der Zelle, was einen frühen Schritt im Apoptoseprozess einer Zelle darstellt. 7-AAD kann die Membran von toten Zellen passieren und interkaliert in die DNA. Durch eine Färbung dieser beiden Marker können früh-apoptotische Zellen (Annexin V⁺/7-AAD⁻) von nekrotischen Zellen (Annexin V⁺/7-AAD⁺) unterschieden werden.

Pro *well* wurden 1×10^5 Zellen in einer 96-*well* Rundbodenplatte für 5 min bei 1500 rpm und 4 °C sedimentiert. Der Überstand wurde abgeworfen und die anschließend zweimal mit je 200 μ L PBS gewaschen (Zentrifugation für 5 min bei 1500 rpm und 4 °C). Die Färbung erfolgte nach Zugabe von 50 μ L Annexin V Bindungspuffer (BioLegend) mit 2,5 μ L AlexaFluor647 Annexin V (BioLegend) und 2,5 μ L 7-AAD (BD Via-Probe) für 15 min bei RT im Dunkeln. Anschließend wurden die Proben ohne weiteres Waschen im LSR II analysiert.

3.19 Cytometric Bead Array (CBA)

Die Bestimmung der Zytokinkonzentration im Überstand transduzierter T-Zellen erfolgte mit Hilfe des *human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kits* (BD), mit dem gleichzeitig sieben Zytokine quantifiziert werden können (IL-2, IFN γ , TNF, IL-4, IL-17, IL-10 und IL-6). Hierbei binden spezifische Antikörper, die an fluoreszierende *Beads* gekoppelt sind, an die Zytokine. Die Detektion erfolgt nach dem Prinzip eines *Sandwich-ELISA* mit Hilfe eines PE-gekoppelten Detektions-Antikörpers. Die Zytokinkonzentration wurde durchflusszytometrisch mit Hilfe von Standards für die einzelnen Zytokine bestimmt.

Mittels FACS-Sortierung wurden die eGFP⁺ Zellen der Kontrollvektor- und SOCS3-transduzierten T-Zellen zwei Tage nach Transduktion angereichert. Die Reinheit betrug >90 %. Zur Kontrolle wurden zusätzlich die eGFP⁻ Zellen der untransduzierten T-Zellen angereichert,

damit diese Zellen ebenfalls den Sortierungsprozess durchlaufen hatten. Nach Stimulation der sortierten Zellen für 3 Tage mit 10 ng/mL PMA und 1 µg/mL Ionomycin, wurden je 130 µL Überstand abgenommen und bis zur Durchführung des CBA bei -20 °C gelagert.

Für die Durchführung des CBA wurden die Standards in 2 mL *Assay Diluent* (=Top Standard) für 15 min bei RT (nicht vortexen) gelöst und eine serielle Verdünnung durchgeführt (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, und 1:256). Damit ergaben sich folgende Konzentrationen für die Standards: 5000 pg/mL (Top Standard), 2500 pg/mL, 1250 pg/mL, 625 pg/mL, 312,5 pg/mL, 156 pg/mL, 80 pg/mL, 40 pg/mL und 20 pg/mL. *Assay Diluent* ohne Standard diene als Negativkontrolle. Pro Ansatz wurden 8 µL von jedem *Capture Bead* (Flasche A1 - A7) in ein Röhrchen gegeben und sorgfältig gemischt. Die Färbung der Überstände erfolgte in 96-well Platten. Je Probe (in Doppelansätzen) wurden 50 µL der gemischten *Capture Beads* in ein well der Platte gegeben und 50 µL des Standards oder der Überstände zugefügt. Nach Zugabe von 50 µL PE-gekoppeltem Detektions-Antikörper und Mischen mit einer Pipette erfolgte die Inkubation für 3 h bei RT im Dunkeln. Anschließend wurden die *Beads* für 5 min bei 1500 rpm und 4 °C sedimentiert und der Überstand abgeworfen. Nach Waschen mit 180 µL Waschpuffer (Zentrifugation für 5 min bei 1500 rpm und 4 °C) wurden die *Beads* in 100 µL Waschpuffer aufgenommen und durchflusszytometrisch mit Hilfe des LSR II analysiert. Die Datenanalyse erfolgte mittels *FCAP Array Software* (BD). Aufgrund der verminderten Proliferation nach SOCS3-Transduktion wurden die absoluten Zytokinkonzentrationen dieses Ansatzes durch Multiplikation mit dem Proliferationsfaktor (2,8) auf die Zellmengen der Kontrollansätze normalisiert.

3.20 Durchflusszytometrische Analyse der STAT-Phosphorylierung

Drei Tage nach Transduktion wurden 2×10^5 Zellen/well in einer 96-well Rundbodenplatte in 100 µL T-Zell-Medium für 20 min mit IFN α (100 ng/mL) stimuliert (37 °C, 5 % CO $_2$). Anschließend wurden die Zellen sofort in 100 µL warmem 4 % PFA (37 °C) resuspendiert und für 10 min bei 37 °C und 5 % CO $_2$ fixiert. Nach Sedimentation der Zellen (5 min bei 1700 rpm und 4 °C) und Abwerfen des Überstandes erfolgte die Permeabilisierung der Zellen durch Zugabe von 150 µL Permeabilisierungspuffer III (BD) und Inkubation für 30 min auf Eis. Anschließend wurden die Zellen erneut sedimentiert (5 min bei 1700 rpm und 4 °C), der Überstand abgeworfen und die Zellen zweimal mit je 200 µL kaltem PBS +5 % FKS gewaschen. Die Färbung der phosphorylierten STAT-Moleküle erfolgte im Residualvolumen mit 0,5 µL anti-STAT3 Pacific Blue, 0,5 µL anti-STAT4 AlexaFluor647 und 0,5 µL anti-STAT5 PerCP-Cy5.5 (alle BD) für 30 min auf Eis im Dunkeln. Nach zwei weiteren Waschschritten mit je 200 µL kaltem PBS +5 % FKS (5 min bei 1700 rpm und 4 °C) wurden die Zellen in 100 µL PBS +5 % FKS aufgenommen und mit Hilfe des LSR II analysiert.

3.21 Statistische Analyse

Der Students t-Test wurde für den statistischen Vergleich von zwei unabhängigen Gruppen verwendet. Für abhängige Gruppen wurde der paired t-Test angewendet. Bei nicht-Normalverteilung der Werte (ermittelt mit dem Kolmogorov-Smirnoff Test auf Normalverteilung) wurde der Mann-Whitney U Test (unabhängige Werte) oder der Wilcoxon-Signed Rank Test (abhängige Werte) verwendet. Signifikanzen wurden mit folgenden p-Werten beschrieben:

$p > 0,1$ nicht signifikant

$p \leq 0,1$ Tendenz

$p \leq 0,05$ *

$p \leq 0,01$ **

$p \leq 0,005$ ***

4 Ergebnisse

Die Ergebnisse sind in drei Abschnitte unterteilt. Im ersten Abschnitt wird die SOCS3 Expression in CD4⁺ T-Zellen *ex vivo* und nach *in vitro* Restimulation beschrieben. Im zweiten Abschnitt wird die Etablierung der lentiviralen Transduktion von CD4⁺ T-Zellen erläutert und der Einfluss der Überexpression von SOCS3 auf die Aktivierung und das Zytokinprofil der T-Zellen dargestellt. Hier werden auch die untersuchten shRNAs vorgestellt, die zur Herunterregulation der SOCS3 Expression generiert wurden. Im dritten Abschnitt wird der Einfluss des Zytokins IL-7 auf die Viabilität von CD4⁺ T-Zellen im Allgemeinen und solchen, die SOCS3 überexprimieren, beschrieben.

4.1 SOCS3 Expression in humanen T-Zellen und polarisierten T-Zell

Klonen

4.1.1 Etablierung einer durchflusszytometrischen Methode zur Analyse der intrazellulären SOCS3 Proteinkonzentration

Im ersten Schritt wurde ein quantitativer durchflusszytometrischer Test zum Nachweis des SOCS3 Proteins etabliert. Hierfür wurde ein kommerziell-erhältlicher, polyklonaler Kaninchen-Antikörper ausgewählt. Dieser Antikörper ist spezifisch für ein Peptid, das aus den C-terminalen 26 Aminosäuren des humanen SOCS3 Proteins (im Weiteren SOCS3 Peptid genannt) besteht. Für die Detektion in der Durchflusszytometrie wurde der Antikörper mit den Fluoreszenzfarbstoffen DyLight488 oder DyLight649 markiert.

Für die intrazelluläre Färbung von humanen PBMCs wurden verschiedene Konzentrationen des anti-SOCS3 Antikörpers ausgetestet. Dies führte zur dosisabhängigen Zunahme der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI). Abbildung 4.1a zeigt die MFI in der Lymphozytenpopulation für ungefärbte PBMCs und bei Färbung mit 10 µg/ml Antikörper. Die Spezifität des Antikörpers wurde im Westernblot untersucht. Das Molekulargewicht des SOCS3 Proteins beträgt 27 kDa. Die Expression von SOCS3 wurde in aktivierten CD4⁺ T-Zellen untersucht, welche SOCS3 besonders stark exprimieren. Es waren zwei Banden nachweisbar (Abbildung 4.1b, linke Spur): eine auf der Höhe von etwa 25 kDa, was mit dem Molekulargewicht des SOCS3 Proteins übereinstimmt und eine unterhalb der 25 kDa Bande.

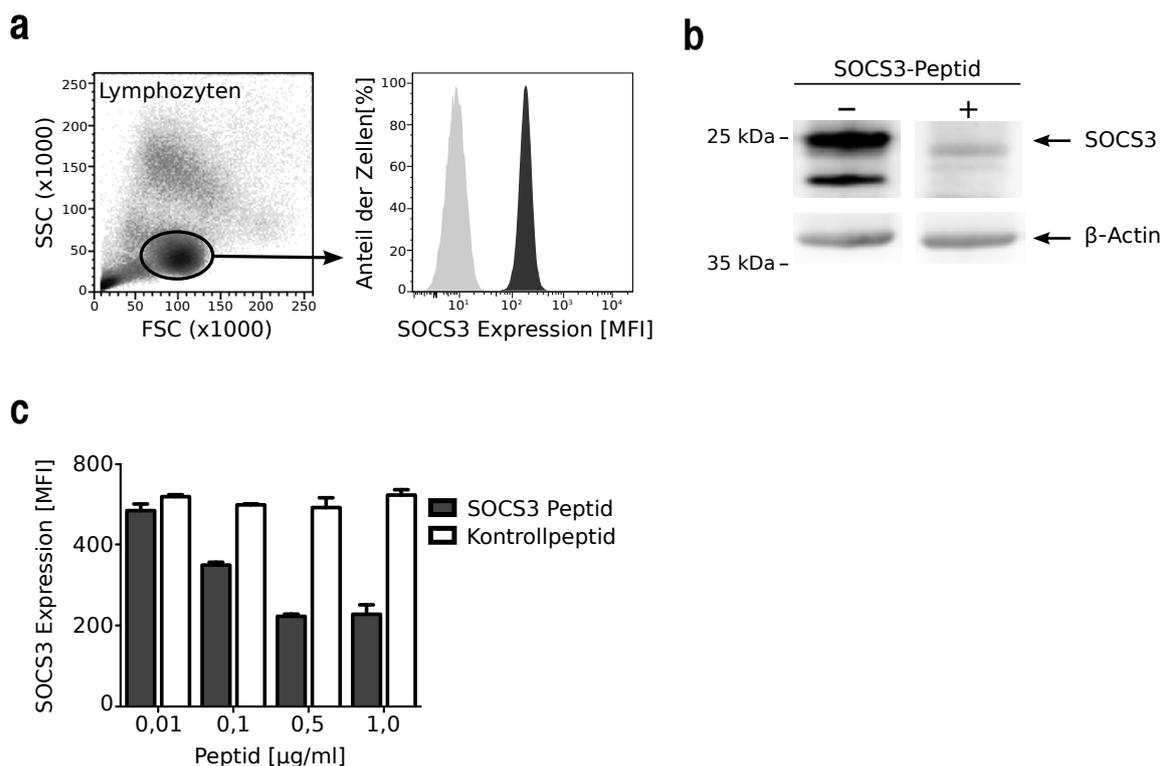


Abbildung 4.1: Spezifische Detektion des SOCS3 Proteins in humanen Lymphozyten mittels Durchflusszytometrie. (a) PBMCs wurden *ex vivo* intrazellulär mit 10 $\mu\text{g/mL}$ AlexaFluor488-markiertem anti-SOCS3 Antikörper gefärbt (schwarze Kurve) oder ungefärbt (graue Kurve) analysiert. Im FSC/SSC Dot-Plot wurden die Lymphozytenpopulation ausgewählt und die SOCS3 Expression mit Hilfe der medianen Fluoreszenzintensität (MFI) analysiert. **(b)** Nachweis von SOCS3 im Westernblot. CD4^+ T-Zellen wurden für 2 Tage mit anti-CD3/CD28 stimuliert und das SOCS3 Protein im Zelllysät mit dem anti-SOCS3 Antikörper nachgewiesen (links). Die rechte Spur zeigt die Proteine nach Vorinkubation des anti-SOCS3 Antikörpers mit dem SOCS3-Peptid. Der Nachweis von β -Actin dient als Ladekontrolle. **(c)** Dosisabhängige Blockierung der Antikörperbindung. Nach Vorinkubation von 10 $\mu\text{g/mL}$ anti-SOCS3 Antikörper mit verschiedenen Konzentrationen des SOCS3 Peptids (schwarz) oder eines Kontrollpeptids (weiß) wurden PBMCs intrazellulär gefärbt und die Bindung des Antikörpers analysiert.

Die Zugabe des SOCS3-Peptides führte zur Blockierung der Antikörper-Bindung im Westernblot, wodurch beide Banden kaum mehr sichtbar waren (Abbildung 4.1b, rechte Spur). Das zeigt, dass diese Proteine vom anti-SOCS3 Antikörper spezifisch gebunden werden. Bei der durchflusszytometrischen Analyse führte die intrazelluläre Färbung von PBMCs mit dem anti-SOCS3 Antikörper nach Vorinkubation mit dem SOCS3-Peptid zu einer dosisabhängigen Reduktion der MFI (Abbildung 4.1c). Bei einer Peptidkonzentration von 0,5 $\mu\text{g/ml}$ war die maximale Blockierung der Antikörperbindung erreicht (60 % Reduktion). Dagegen veränderte sich die MFI nach Inkubation des Antikörpers mit einem unspezifischen Kontrollpeptid (Rv3407) nicht (Abbildung 4.1c). In den folgenden Experimenten wurde mit Hilfe des anti-SOCS3 Antikörpers die SOCS3 Expression in humanen T-Zellen charakterisiert.

4.1.2 Vergleich der SOCS3 *ex vivo* Expression in primären, humanen T-Zell-Subpopulationen

Eine Studie im Mausmodell weist darauf hin, das SOCS3 *ex vivo* in naiven T-Zellen stärker exprimiert wird als in differenzierten T-Zellen [40]. Um die SOCS3 Expression in humanen T-Zell-Subpopulationen zu charakterisieren wurde die *ex vivo* Expression in naiven (T_{naiv}) und Effektor-T-Zellen (T_{Eff}), sowie in Zentralen- und Effektor-Memoryzellen (T_{ZM} und T_{EM}) durchflusszytometrisch analysiert. Diese vier T-Zell-Subpopulationen wurden mit Hilfe der Oberflächenmarker CCR7 und CD45RA unterschieden (Abbildung 4.2). Die Interferenz der Fluoreszenzen wurde durch die Auswahl von Fluoreszenzmarkern, die sich möglichst wenig gegenseitig beeinflussen (V450, FITC und PE-Cy7), minimiert.

Alle vier Populationen exprimierten das SOCS3 Protein. Die Expression war für T_{naiv} und T_{ZM} vergleichbar, während die Expression in T_{EM} und T_{Eff} im Vergleich zu den beiden anderen Subpopulationen leicht verringert war (Abbildung 4.2).

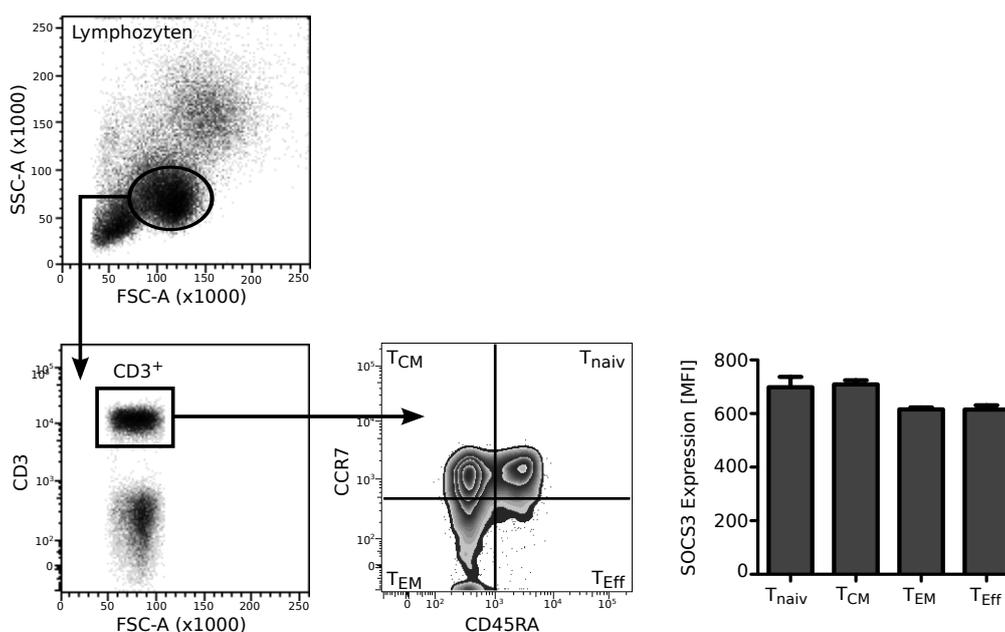


Abbildung 4.2: Ex vivo SOCS3 Expression in T-Zell Subpopulationen. PBMCs wurden mit anti-SOCS3, anti-CD3, anti-CCR7 und anti-CD45RA gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Die Lympozytenpopulation wurde mit Hilfe des FSC/SSC ausgewählt. Anschließend erfolgte die Analyse der $CD3^+$ Lympozyten auf die Oberflächenmarker CD45RA und CCR7. Die SOCS3 Expression wurde mit Hilfe der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) in naiven- (T_{naiv} ; $CD45RA^+ CCR7^+$), zentralen Memory- (T_{ZM} ; $CD45RA^- CCR7^+$), Effektor Memory- (T_{EM} ; $CD45RA^- CCR7^-$) und Effektor-T-Zellen (T_{Eff} ; $CD45RA^+ CCR7^-$) quantifiziert. Dargestellt sind die kombinierten Ergebnisse von zwei Experimenten.

4.1.3 Expression von SOCS3 in aktivierten T-Zellen nach *in vitro* Stimulation

In T-Zellen kann die Induktion der SOCS3 Expression durch Stimulation mit Zytokinen wie IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-27 and IFN γ [46, 97, 98] oder durch Antigen-spezifische Stimulation über den T-Zell-Rezeptor ausgelöst werden [40]. Daher wurde untersucht, ob die Stimulation mit *M. tuberculosis* Antigen ebenfalls zu einer Regulation der SOCS3 Expression in humanen T-Zellen führt. Nach *in vitro* PPD-Stimulation von PBMCs gesunder PPD-reaktiver Spender erfolgte die durchflusszytometrische Quantifizierung der SOCS3 Expression in den aktivierten T-Zellen im Zeitverlauf. Für die Unterscheidung von aktivierten und nicht-aktivierten T-Zellen wurde der Oberflächenmarker CD40L (CD154) verwendet, der von aktivierten T-Zellen transient exprimiert wird (maximale Expression zwischen 8 und 24 h nach Stimulation, Abbildung 4.3a). In den aktivierten Zellen (CD40L⁺) kam es nach 4 h zu einer Erhöhung der SOCS3 Expression im Vergleich zu den nicht-aktivierten T-Zellen (CD40L⁻). Die maximale SOCS3 Expression war nach 48 h erreicht (Abbildung 4.3b, oben). Zum Vergleich mit der antigenspezifischen PPD-Stimulation wurde eine polyklonale Stimulation der PBMCs mit anti-CD3/CD28 durchgeführt. Dies führte zu einem größeren Anteil CD40L⁺ Zellen, als bei der PPD-Stimulation (Abbildung 4.3a), aber zu einer vergleichbaren Expressionskinetik von SOCS3 (Abbildung 4.3b, unten). Abbildung 4.3c zeigt die kombinierten Ergebnisse von vier unabhängigen Experimenten. In PPD-stimulierten PBMCs war die SOCS3 Expression nach 48 h im Mittel etwa 1,5-fach erhöht, während sie nach anti-CD3/CD28 Stimulation etwa 2-fach erhöht war (Abbildung 4.3c). Die Erhöhung der SOCS3 Expression war noch sechs Tage nach PPD-Stimulation nachweisbar (Abbildung 4.3d). Hier wurde die SOCS3 Expression in den gesamten Lymphozyten bestimmt, da zu diesem Zeitpunkt kein CD40L mehr exprimiert war. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die Expression von SOCS3 in humanen PBMCs T-Zell Rezeptor-abhängig induziert wurde. Die Stimulation führte zu einer Erhöhung der SOCS3 Expression für mindestens sechs Tage.

4.1.4 Expression von SOCS3 in T-Zellen nach Koinkubation mit Mykobakterien-infizierten Makrophagen

Aktivierte *M. tuberculosis*-spezifische T-Zellen und deren Interaktion mit *M. tuberculosis*-infizierten Makrophagen sind von zentraler Bedeutung für die Suszeptibilität gegen Tuberkulose. *M. tuberculosis* beeinflusst die infizierten Makrophagen in verschiedener Hinsicht. Um zu untersuchen wie sich die Interaktion von aktivierten T-Zellen und infizierten Makrophagen auf die Expression von SOCS3 auswirkt, wurde die SOCS3 Expression in einem *in vitro* Modell untersucht. Nach PPD-Stimulation von PBMCs gesunder PPD-reaktiver Spender für 6 Tage, wurden die PBMCs anschließend mit BCG-infizierten autologen Makrophagen inkubiert (Abbildung 4.4a). Die Bestimmung der SOCS3 Expression erfolgte durchflusszytometrisch im Zeitverlauf. Die Koinkubation mit BCG-infizierten Makrophagen führte nach 3 h zu einer

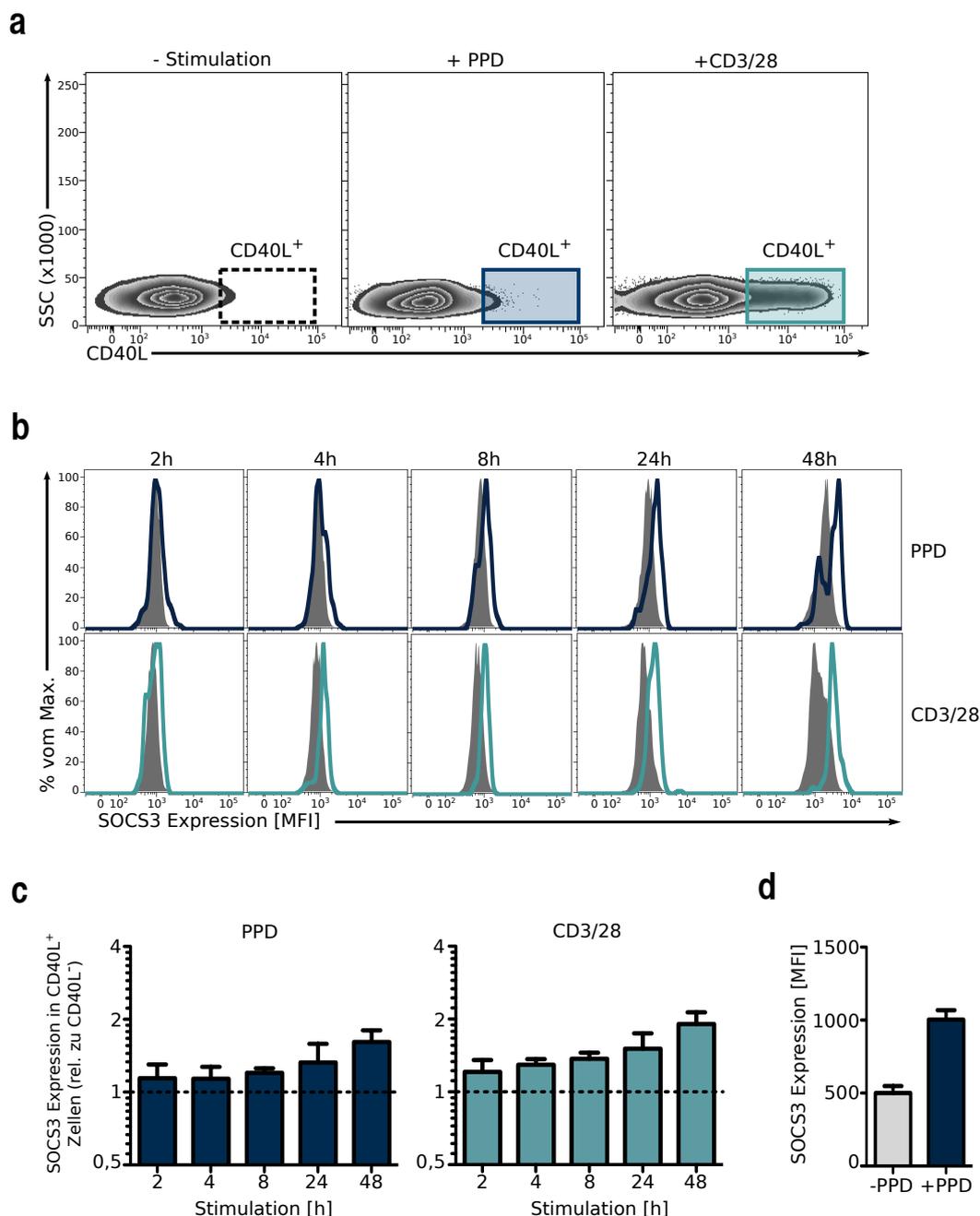


Abbildung 4.3: SOCS3 Expression nach T-Zell-Rezeptor-spezifischer *in vitro* Stimulation. PBMCs von PPD-reaktiven Spendern wurden mit PPD oder mit anti-CD3/CD28 stimuliert und die SOCS3 Expression im Zeitverlauf durchflusszytometrisch mit Hilfe der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) quantifiziert. **(a)** Darstellung der CD40L-Expression mit und ohne PPD- oder anti-CD3/CD28 Stimulation (8 h). Die Analysefenster zeigen die CD40L⁺ Zellen für die SOCS3 Bestimmung an. gestrichelt = unstimuliert, blau = CD40L⁺ PPD, türkis = CD40L⁺ anti-CD3/CD28. Die übrigen Zellen sind CD40L⁻ (grau). **(b)** SOCS3 Expression nach PPD- (obere Reihe) und anti-CD3/CD28 Stimulation (untere Reihe) im Zeitverlauf für ein repräsentatives Experiment von vier Experimenten. Die Histogramme zeigen CD40L⁻-Zellen (grau) im Vergleich mit CD40L⁺-Zellen (blau: PPD; türkis: anti-CD3/CD28). **(c)** SOCS3 Expression verschiedener Spender nach PPD oder anti-CD3/CD28 Stimulation im Zeitverlauf (n=4). Die SOCS3 Expression der CD40L⁺-Zellen ist relativ zur SOCS3 Expression der CD40L⁻-Zellen dargestellt. Die gestrichelte Linie zeigt die Expression der CD40L⁻-Zellen zum jeweiligen Zeitpunkt. **(d)** SOCS3 Expression in PPD-stimulierten (blau) und nicht-stimulierten (grau) T-Zellen nach sechs Tagen Stimulation. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von drei Experimenten.

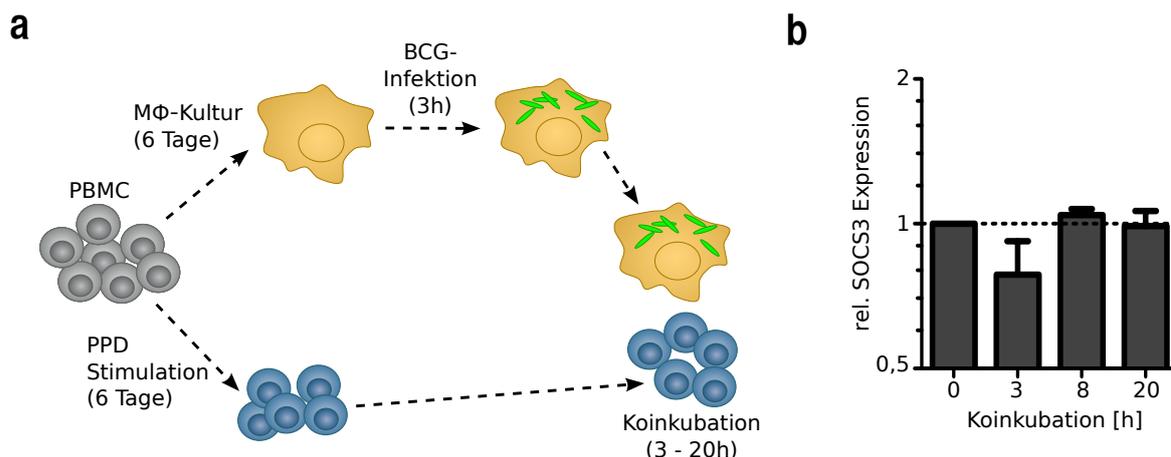


Abbildung 4.4: SOCS3 Regulation in PPD-spezifischen T-Zellen nach Koinkubation mit BCG-infizierten Makrophagen. (a) Schematischer Aufbau des Versuchs. PBMCs von PPD-reaktiven Spendern wurden sechs Tage mit PPD stimuliert. Gleichzeitig wurden autologe Monozyten *in vitro* zu Makrophagen-artigen Zellen ausdifferenziert. Nach Infektion der Makrophagen mit BCG-GFP an Tag 6 erfolgte die Koinkubation mit den aktivierten Lymphozyten. Die SOCS3 Expression wurde durchflusszytometrisch im Zeitverlauf mit Hilfe der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) quantifiziert. (b) Dargestellt ist die SOCS3 Expression in aktivierten T-Zellen (CD40L⁺), koinkubiert mit BCG-GFP infizierten Makrophagen, relativ zur SOCS3 Expression in den aktivierten T-Zellen, koinkubiert mit nicht-infizierten Makrophagen zum jeweiligen Zeitpunkt (gestrichelte Linie). Dargestellt sind die kombinierten Ergebnisse von drei Experimenten.

transienten Reduktion der SOCS3 Expression um etwa 20 % in aktivierten T-Zellen (CD40L⁺) im Vergleich zur Koinkubation von aktivierten T-Zellen mit nicht-infizierten Makrophagen (Abbildung 4.4b). Im weiteren Zeitverlauf war kein Expressionsunterschied zwischen aktivierten und nicht aktivierten T-Zellen nachweisbar.

4.1.5 Expression von SOCS3 in zytokinproduzierenden CD4⁺ T-Zellen nach Kurzzeitstimulation

Im nächsten Schritt sollte die SOCS3 Expression in T_H1, T_H2 und T_H17 Zellen verglichen werden. Nach Stimulation von PBMCs gesunder Spender für 36 h mit anti-CD3/CD28 wurde die SOCS3 Expression durchflusszytometrisch bestimmt. Dieser Zeitpunkt wurde gewählt, da die SOCS3 Expression nach anti-CD3/CD28 Stimulation hier erhöht (siehe 4.1.3) und gleichzeitig die Zytokinsekretion am stärksten war (Daten nicht gezeigt). Die stimulierten Zellen wurden mit anti-CD4 und intrazellulär mit anti-SOCS3 sowie entweder mit anti-TNF α , anti-IFN γ , anti-IL-2, anti-IL-4 oder anti-IL-17 gefärbt. Um die gegenseitige Beeinflussung der fluoreszenzmarkierten Antikörper möglichst gering zu halten, erfolgte die SOCS3-Färbung immer nur zusammen mit einem Zytokin-spezifischen Antikörper. Die SOCS3 Expression wurde jeweils in den Zytokin-positiven und -negativen CD4⁺ T-Zellen bestimmt. Die Vorgehensweise bei der Analyse der Zellen ist in Abbildung 4.5a dargestellt. Die SOCS3 Expression war in TNF α -, IFN γ - und IL-2-produzierenden T-Zellen im Vergleich zu den negativen T-Zellen erhöht (Abbildung

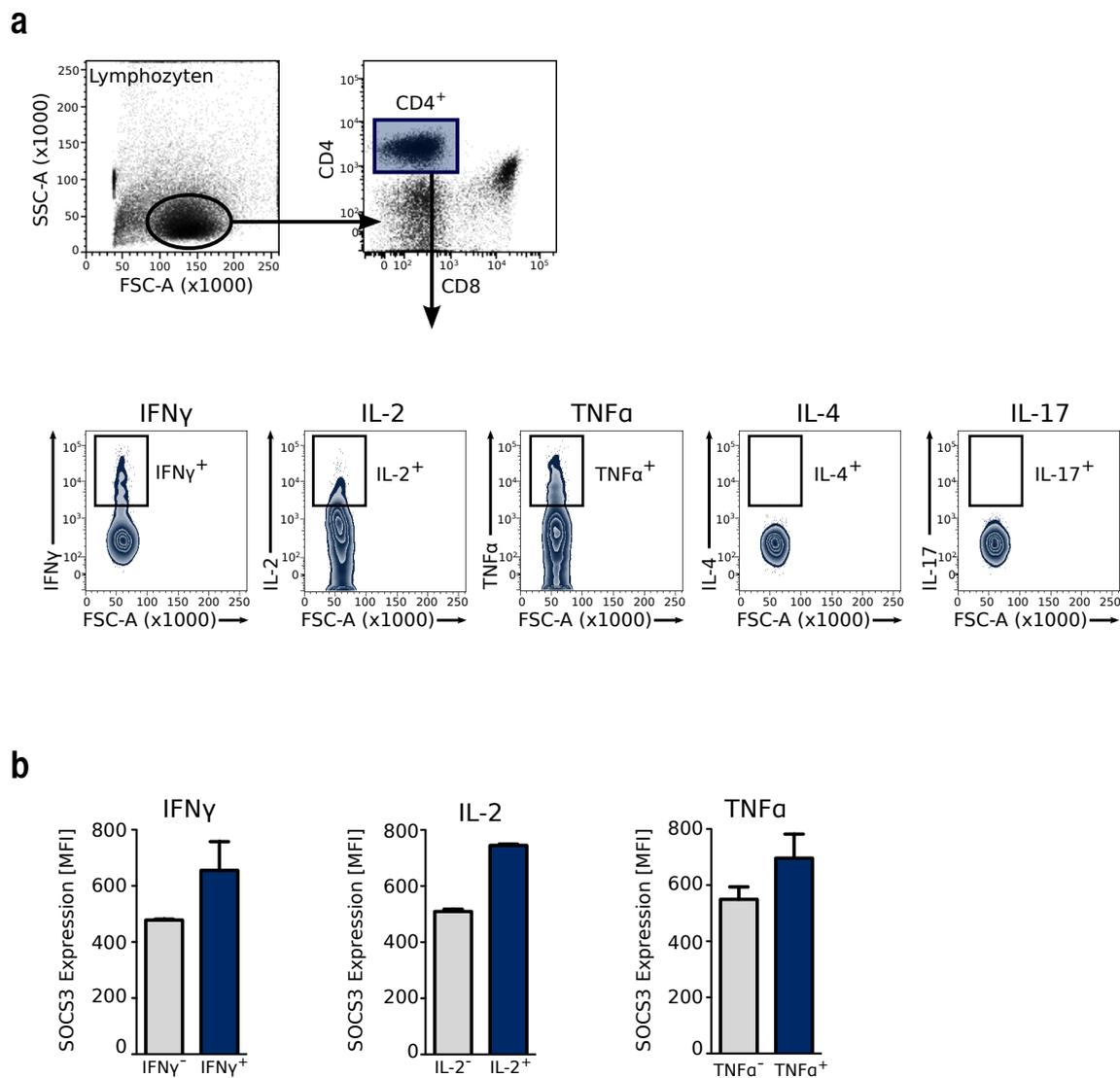


Abbildung 4.5: SOCS3 Expression in IFN γ -, IL-2- und TNF α -produzierenden CD4⁺ T-Zellen. PBMCs wurden für 36 h mit anti-CD3/CD28 stimuliert. Anschließend erfolgte die Quantifizierung der SOCS3 Expression in Zytokinproduzierenden CD4⁺ T-Zellen. **(a)** Schema für die Auswahl der analysierten Zellpopulationen. Die Auswahl der Lymphozytenpopulation erfolgte mit Hilfe des FSC/SSC Graphen. Anschließend wurden die Zytokinexpression in den CD4⁺ T-Zellen analysiert. Die Analysefenster zeigen die Zytokin-positiven Zellen (IFN γ ⁺, IL-2⁺, TNF α ⁺, IL-4⁺, IL-17⁺), die übrigen sind Zytokin-negative Zellen (IFN γ ⁻, IL-2⁻ und TNF α ⁻). **(b)** SOCS3 Expression in IFN γ ⁻, IL-2⁻ und TNF α ⁻-Zellen (grau) und IFN γ ⁺, IL-2⁺ und TNF α ⁺-Zellen (blau) T-Zellen als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI). Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von drei Experimenten.

4.5b). Diese Zellen wiesen vergleichbare SOCS3-Konzentrationen auf. IL-4 und IL-17 wurden durch die Kurzzeitstimulation kaum induziert (<0,05 %, Abbildung 4.5). Daher wurde im Folgenden ein T-Zell Klonierungsansatz eingesetzt, um IL-4- und IL-17-produzierende T-Zellen zu generieren.

4.1.6 Expression von SOCS3 in T-Zell Klonen mit distinktem Zytokinprofil

Bei T-Zell Klonen handelt es sich um eine homogene T-Zell Population, die durch Proliferation aus einer Vorläuferzelle entsteht. Die T-Zell Klone wurden aus CD4⁺CD161⁺ T-Zellen generiert, da diese T-Zell Population im Menschen die Vorläufer von T_H17 Zellen darstellt [21] und der Anteil IL-17 produzierender T-Zellen bei einer Klonierung dieser T-Zell Population signifikant gesteigert werden kann (unpublizierte Ergebnisse der Arbeitsgruppe). Vor der Analyse der SOCS3 Expression wurde zunächst das Zytokinprofil der einzelnen Klone charakterisiert. Hierbei ergab sich ein heterogenes Expressionsmuster für die untersuchten Zytokine (TNF α , IFN γ , IL-4 und IL-17). Alle generierten Klone exprimierten TNF α und nahezu alle Klone (>98 %) exprimierten zusätzlich mindestens ein weiteres Zytokin. Die meisten T-Zell Klone wiesen ein komplexes Zytokinprofil auf, dass durch die gleichzeitige Expression mehrerer Zytokine charakterisiert war. Abbildung 4.6 zeigt das Zytokinprofil von sechs exemplarischen T-Zell Klonen. Klon 1 besteht überwiegend aus TNF α /IFN γ /IL-4-dreifachpositiven Zellen, Klon 2 überwiegend aus TNF α /IL-17-doppelpositiven Zellen, Klon 3, 4 und 6 überwiegend aus TNF α -einfachpositiven Zellen und Klon 5 aus TNF α /IFN γ /IL-17-dreifachpositiven und TNF α /IFN γ -doppelpositiven Zellen.

Für die Analyse der SOCS3 Expression wurden die Klone auf Grundlage der Zytokinexpression in Gruppen eingeteilt. Eine hohe Expression bezeichnete >1 % positive Zellen für IFN γ , IL-4 und IL-17. Für TNF α lag die Grenze höher (>30 %), da alle Klone >1 % TNF α -produzierende Zellen aufwiesen. Die SOCS3 Expression wurde ohne vorherige Restimulation der Klone durchflusszytometrisch bestimmt. Obwohl die SOCS3 Expression der einzelnen Klone heterogen war, lag die mediane SOCS3 Expression beim Vergleich von Klonen mit hoher und niedriger TNF α und IFN γ Expression auf vergleichbarem Niveau (Abbildung 4.7 erster und zweiter Graph). Dagegen wurde in T-Zell Klonen, die eine hohe Expression von IL-4 oder IL-17 aufwiesen, eine signifikant erhöhte SOCS3 Expression (p=0,004 für IL-4 und p=0,001 für IL-17) nachgewiesen, verglichen mit Klonen, die eine niedrige Expression dieser Zytokine aufwiesen (Abbildung 4.7, dritter und vierter Graph). Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die SOCS3 Expression in T_H2 und T_H17 Zellen von T-Zell Klonen erhöht ist. Allerdings konnte nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, dass auch die Generierung der T-Zell Klone per se einen Einfluss auf die SOCS3 Expression hatte. Daher wurden die Befunde von Cosmi et al [21] genutzt, welche CD4⁺CD161⁺ T-Zellen als Vorläuferpopulation von T_H17 Zellen im Menschen identifiziert haben, um die SOCS3 Expression *ex vivo* in T_H17 Vorläuferzellen zu bestimmen.

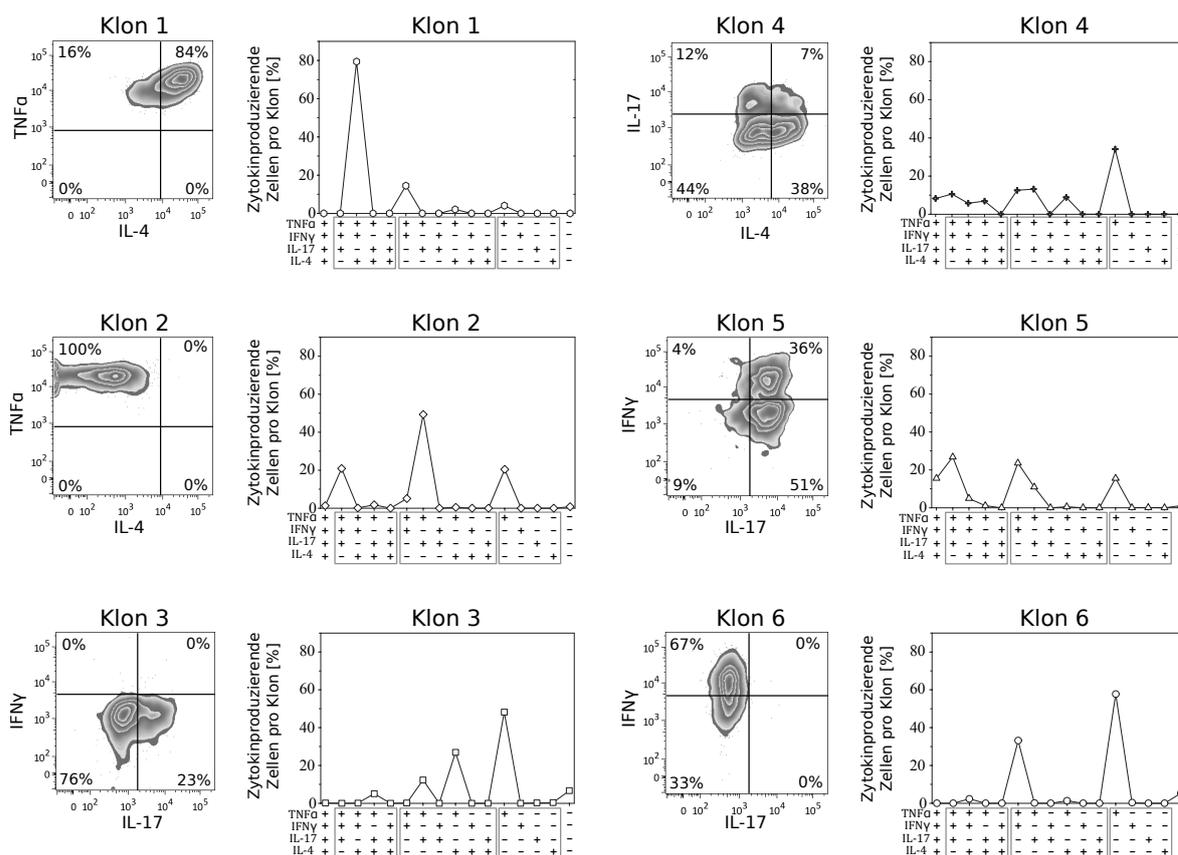


Abbildung 4.6: Zytokinprofil von sechs exemplarischen CD4⁺CD161⁺ T-Zell Klonen. Die Expression der Zytokine IFN γ , IL-17, TNF α und IL-4 in T-Zell Klonen wurde nach Restimulation mit PMA/Ionomycin in aktivierten T-Zellen (CD40L⁺) ermittelt. Dargestellt ist pro Klon jeweils ein exemplarischer Dichte-Graph und das vollständige Zytokinprofil. Das Zytokinprofil zeigt den Anteil der Zellen pro Klon, die ein, zwei oder drei Zytokine gleichzeitig produzieren.

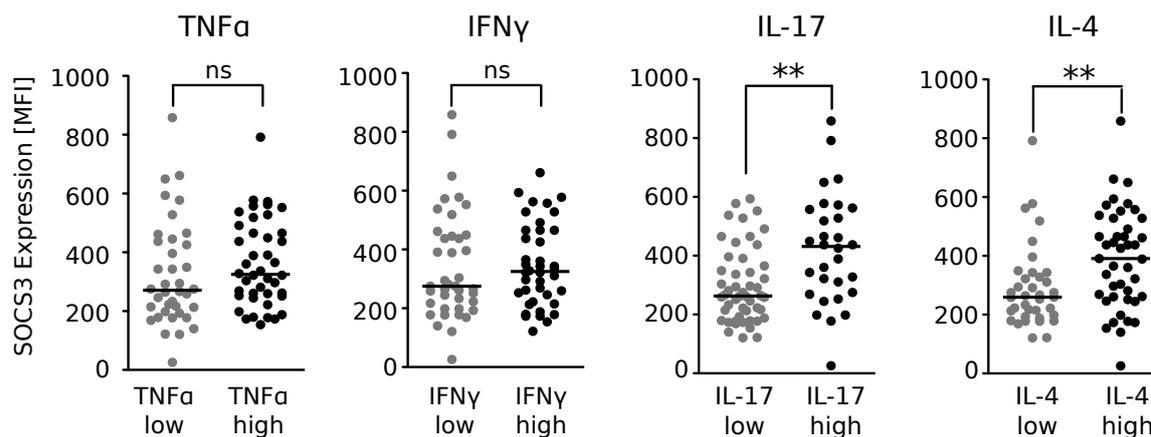


Abbildung 4.7: SOCS3 Expression in T-Zell Klonen mit distinktem Zytokinprofil. Die T-Zell Klone (n=80) wurden anhand ihrer Zytokinexpression in Gruppen eingeteilt. Jeder Punkt repräsentiert einen Klon mit niedriger (grau) oder hoher (schwarz) Expression des entsprechenden Zytokins. Die Expression wurde definiert als low <30% und high >30% für TNF α und als low <1% und high >1% für IFN γ , IL-17 und IL-4. Die durchflusszytometrische Analyse der SOCS3 Expression erfolgte mit Hilfe der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) (** = p<0,01; Mann-Whitney U Test).

4.1.7 Expression von SOCS3 in Vorläufern von T_H17 Zellen

PBMCs von gesunden Spendern wurden *ex vivo* mit anti-CD4, anti-CD161 und anti-SOCS3 gefärbt. Die SOCS3 Expression wurde anschließend durchflusszytometrisch in CD4⁺CD161⁺ und CD4⁺CD161⁻ Zellen quantifiziert (Abbildung 4.8a). Die CD4⁺CD161⁺ Zellen, welche die T_H17 Vorläuferpopulation bilden [21], zeigten eine erhöhte SOCS3 Expression (p=0,017) verglichen mit den CD4⁺CD161⁻ Zellen (Abbildung 4.8a). Um eine gegenseitige Beeinflussung der Fluoreszenzfarbstoffe auszuschließen, wurde die SOCS3 Expression in einem Kontrollansatz in CD4⁺CD45RA⁺ und CD4⁺CD45RA⁻ T-Zellen bestimmt (Abbildung 4.8b). Diese Populationen sind nicht mit der Polarisierung von T-Zellen assoziiert, sondern beschreiben naive und Effektor T-Zellen (s. Abbildung 4.2). Der anti-CD45RA Antikörper wurde mit der gleichen Fluoreszenzmarkierung wie anti-CD161 verwendet (FITC). Die SOCS3 Expression war in den CD4⁺CD45RA⁺ T-Zellen leicht vermindert (Abbildung 4.8b), wodurch eine Erhöhung der SOCS3 MFI aufgrund einer Interferenz der Fluoreszenzfarbstoffe von anti-CD161 und anti-SOCS3 ausgeschlossen werden konnte.

4.2 Modulierung der SOCS3 Expression in primären, humanen CD4⁺ T-Zellen mittels lentiviraler Transduktion

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss von SOCS3 auf verschiedene funktionelle Parameter von CD4⁺ T-Zellen untersucht. Dies sollte durch exogene Expression und Herunterregulation von SOCS3 in primären, humanen CD4⁺ T-Zellen mit Hilfe eines lentiviralen Transduktionsansatzes durchgeführt werden (Details s. Material und Methoden). Diese Methode ermöglicht einen

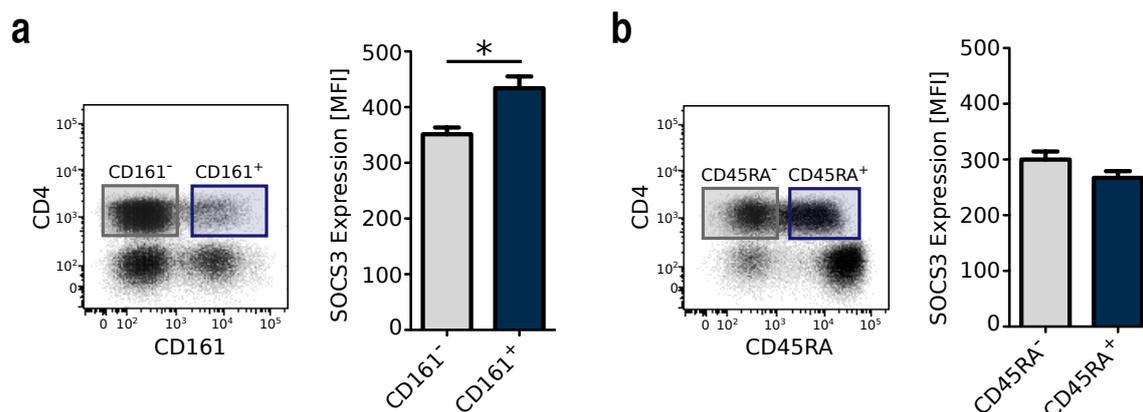


Abbildung 4.8: SOCS3 Expression in T_H17 Vorläuferzellen. (a) PBMCs von wurden *ex vivo* mit anti-SOCS3, anti-CD4 und anti-CD161 gefärbt. Die SOCS3 Expression wurde durchflusszytometrisch mit Hilfe der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) in den CD4⁺CD161⁻ (grau) und CD4⁺CD161⁺ Zellen (blau) quantifiziert. Dargestellt ist ein repräsentatives von vier Experimenten (* = p<0,05; paired t-Test). (b) SOCS3 Expression in einer Kontroll-T-Zellpopulation. PBMCs wurden mit anti-SOCS3, anti-CD4 und anti-CD45RA gefärbt. Die SOCS3 Expression wurde durchflusszytometrisch mit Hilfe der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) in den CD4⁺CD45RA⁻ (grau) und CD4⁺CD45RA⁺ Zellen (blau) quantifiziert. Dargestellt ist ein repräsentatives von drei Experimenten.

Gen-Transfer, der die Zellen kaum beeinflusst. Dies ist vor allem für primäre Zellen vorteilhaft, bei denen der Gen-Transfer mit anderen Methoden (Elektroporation, lipid-basierte Transfektion) sehr ineffektiv ist. Für die Transduktion von CD4⁺ T-Zellen wurde ein lentivirales System verwendet, das auf den sogenannten LeGO-Vektoren [95] basiert. Die Expressionsvektoren kodierten für das *enhanced green fluorescent protein* (eGFP), wodurch transduzierte Zellen im Durchflusszytometer nachgewiesen werden können.

4.2.1 Etablierung lentiviraler Transduktion von CD4⁺ T-Zellen

Für die Etablierung der lentiviralen Transduktion wurde der Kontrollvektor LeGO-G2 verwendet, durch den das *enhanced green fluorescent protein* (eGFP) unter der Kontrolle eines SFFV-Promoters konstitutiv exprimiert wird. Lentiviren können prinzipiell auch Zellen infizieren, die sich nicht in der Teilungsphase befinden, allerdings wurde das in eigenen Experimenten nicht beobachtet (Daten nicht gezeigt). Daher wurden die T-Zellen vor der Transduktion polyklonal mit anti-CD3/CD28 und IL-2 aktiviert.

Transduktion von CD4⁺ T-Zellen mit unterschiedlichen Viruskonzentrationen

Die Bestimmung der optimalen Viruskonzentration zur Transduktion von CD4⁺ T-Zellen wurde durch Infektion mit verschiedenen *multiplicities of infection* (MOI) durchgeführt. Für die Bestimmung der MOI wurden HEK-Zellen mit Virusüberständen infiziert und die Konzentration der infektiösen Einheiten bestimmt (Details s. Material und Methoden).

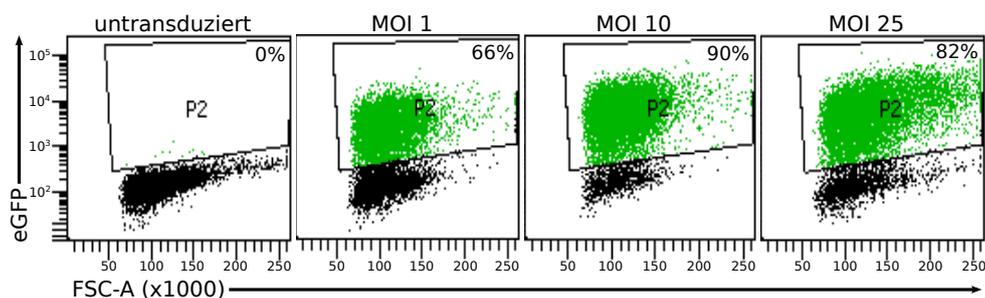


Abbildung 4.9: Effizienz lentiviraler Transduktion von CD4⁺ T-Zellen mit verschiedenen Viruskonzentrationen. CD4⁺ T-Zellen wurden mit verschiedenen *Multiplicities of Infection* (MOI) des Kontrollvektors LeGO-G2 transduziert (MOI 1, MOI 10 und MOI 25). Zwei Tage nach Transduktion erfolgte die durchflusszytometrische Analyse der Zellen. Der Anteil eGFP⁺ Zellen (grün) zeigt die Effizienz der Transduktion. Dargestellt sind die viablen Zellen (FSC/SSC).

Für die Transduktion wurden CD4⁺ T-Zellen, die von PBMCs gesunder Spender stammten, zwei Tage nach polyklonaler Stimulation mit MOI 1, MOI 10 und MOI 25 des Kontrollvektors infiziert. Die Bestimmung der Transduktionseffizienz erfolgte zwei Tage nach Transduktion durchflusszytometrisch durch Analyse der eGFP-Fluoreszenz (Abbildung 4.9). Untransduzierte Zellen wurden als Kontrolle verwendet. MOI 10 führte zu 90 % transduzierten Zellen (Abbildung 4.9). Eine höhere MOI steigerte die Transduktionseffizienz nicht. In den folgenden Experimenten wurden die Virusüberstände daher mit einer MOI 10 eingesetzt.

Vergleich von Retronektin-basierter Transduktion und *Spin*-Infektion

Zur Optimierung der lentiviralen Transduktion wurden zwei verschiedene Methoden zur Infektion ausgetestet. Zum einen die Retronektin-basierte, bei der die Oberfläche der Zellkulturplatten mit dem Fibronektin-Fragment Retronektin beschichtet werden und anschließend die Viren an das Retronektin binden. Danach werden die zu transduzierenden Zellen zugegeben. Zum anderen gibt es die Möglichkeit die Virusüberstände in Anwesenheit von Polybren direkt zu den Zellen zu geben und die Infektion durch einen Zentrifugationsschritt zu steigern (*Spin*-Infektion). Beide Methoden wurden für die Transduktion von T-Zellen mit dem Kontrollvektor getestet. Die Transduktionseffizienz lag mit der Retronektin-basierten Methode bei etwa 90 %, während mit der *Spin*-Infektion wesentlich weniger Zellen transduziert waren (42 %, Abbildung 4.10). Dies zeigt, dass die Retronektin-basierte Methode für die Transduktion von humanen T-Zellen besser geeignet ist. Die folgenden Experimente wurden daher ausschließlich mit dieser Methode durchgeführt.

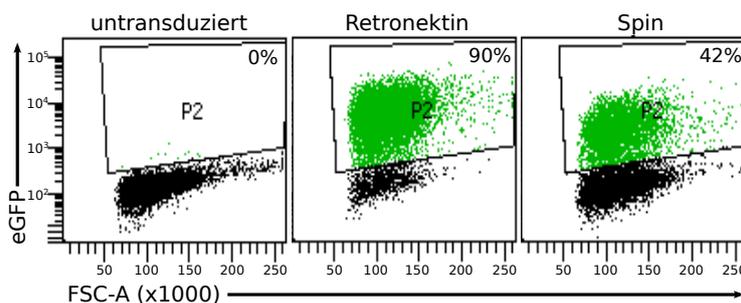


Abbildung 4.10: Vergleich von Retronektin- und Spin-Infektion zur Transduktion von CD4⁺ T-Zellen. Zwei Tage nach Transduktion des Kontrollvektors LeGO-G2 (MOI 10) mittels Retronektin- oder Spin-Infektion erfolgte die durchflusszytometrische Analyse der T-Zellen. Der Anteil eGFP⁺ Zellen (grün) zeigt die Effizienz der Transduktion. Dargestellt sind die viablen Zellen (FSC/SSC).

Optimierung der T-Zell Aktivierung vor der Transduktion

Um die Bedingungen für eine optimale Transduktion bei gleichzeitig minimaler Vorstimulationszeit zu bestimmen, wurden CD4⁺ T-Zellen mit dem Kontrollvektor an Tag 1, Tag 2 oder Tag 3 nach Stimulation transduziert. Abbildung 4.11a zeigt, dass der Anteil transduzierter Zellen an Tag 2 oder Tag 3 nach Stimulation am höchsten ist (etwa 50 %). Die Transduktion an Tag 1 nach Stimulation war dagegen zu früh, hier lag der Anteil transduzierter Zellen nur bei 20 %. In den nachfolgenden Experimenten wurden die T-Zellen nach zwei Tagen Voraktivierung transduziert.

IL-2 ist ein wichtiger Wachstumsfaktor für T-Zellen. Um zu untersuchen, ob die Anwesenheit von IL-2 einen Einfluss auf die Transduktionseffizienz der T-Zellen hat, wurden CD4⁺ T-Zellen für 2 Tage in An- oder Abwesenheit von IL-2 (20 u/mL) kultiviert. Abbildung 4.11b zeigt, dass IL-2 keinen Einfluss auf die Transduktionseffizienz hatte. Höhere IL-2 Konzentration (200 u/mL) beeinflussten die Transduktionseffizienz ebenfalls nicht (Daten nicht gezeigt).

4.2.2 Transduktionseffizienz und SOCS3 Expression in CD4⁺ T-Zellen nach lentiviraler Transduktion

Für die Transduktion von SOCS3 wurde das humane SOCS3 Gen mittels spezifischer Restriktionsschnittstellen in den lentiviralen Expressionsvektor LeGO-iG2 kloniert, der zusätzlich für eGFP kodiert. (Details s. Material und Methoden). Als Kontrollvektor für die Transduktion wurde LeGO-G2 verwendet, der nur für eGFP kodiert. Zwei Tage nach Transduktion erfolgte die durchflusszytometrische Quantifizierung des Anteils transduzierter Zellen. Die Transduktionseffizienz des Kontrollvektors lag in dem gezeigten Experiment bei 79 %, die Transduktionseffizienz des SOCS3-Vektors lag bei 58 % (Abbildung 4.12a).

Die SOCS3 Expression wurde ebenfalls zwei Tage nach Transduktion durchflusszytometrisch

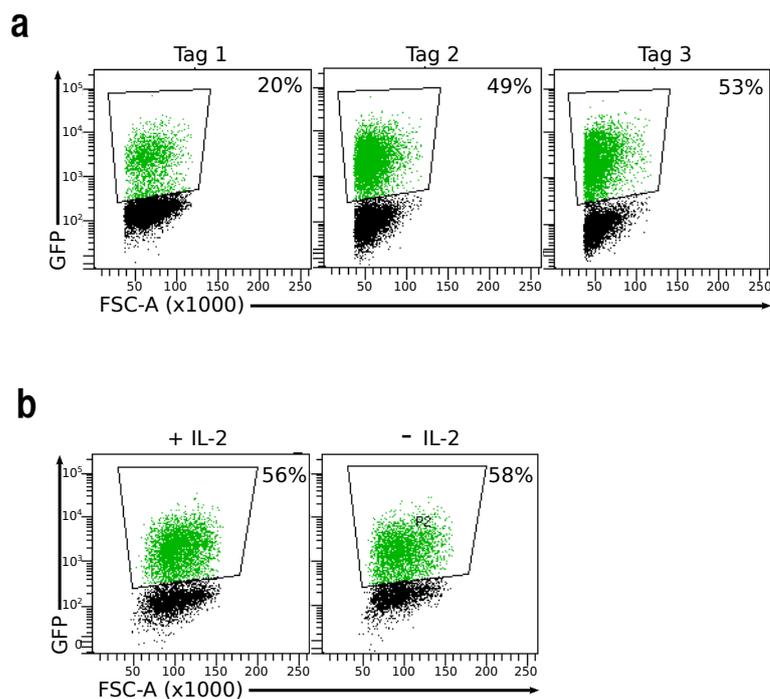


Abbildung 4.11: Test verschiedener Bedingungen für die Vorstimulation von CD4⁺ T-Zellen zur lentiviralen Transduktion. Zwei Tage nach Transduktion des Kontrollvektors LeGO-G2 erfolgte die durchflusszytometrische Analyse der Zellen. Der Anteil eGFP⁺ Zellen (grün) zeigt die Effizienz der Transduktion. Dargestellt sind die viablen Zellen (FSC/SSC). **(a)** Vergleich verschiedener Vorstimulationszeiten. CD4⁺ T-Zellen wurden vor der Transduktion mit anti-CD3/CD28 und IL-2 stimuliert. Die Transduktion mit dem Kontrollvektor LeGO-G2 (MOI 10) erfolgte entweder an Tag 1, Tag 2 oder Tag 3 nach Stimulation. **(b)** Vergleich verschiedener IL-2-Konzentrationen. Die Stimulation der CD4⁺ T-Zellen erfolgte zwei Tage vor Transduktion mit anti-CD3/CD28 mit und ohne Zugabe von IL-2.

analysiert (Abbildung 4.12b). In den SOCS3-transduzierten T-Zellen (Definition s. Material und Methoden) war die SOCS3 Expression im Vergleich zu den Kontrollvektor-transduzierten und den untransduzierten T-Zellen in diesem Experiment etwa 2,7-fach erhöht (Abbildung 4.12b). Generell lag der relative Anstieg der SOCS3 Expression zwischen 1,6- und 2,7-fach. Die SOCS3 Expression in den eGFP⁻ Zellen desselben Ansatzes war vergleichbar mit den nicht-transduzierten (Daten nicht gezeigt). Dies zeigte, dass die Erhöhung der SOCS3 Expression spezifisch nur in den eGFP⁺ Zellen nachweisbar war.

4.2.3 SOCS3 hemmt die Proliferation von transduzierten CD4⁺ T-Zellen

Die Stabilität der Transduktion wurde durch die Bestimmung des Anteils transduzierter Zellen im Zeitverlauf untersucht. Dabei zeigte sich, dass der Anteil der SOCS3-transduzierten Zellen stark abnahm (in dem gezeigten Experiment von 41 % an Tag 2 nach Transduktion auf 7 % an Tag 6 nach Transduktion, Abbildung 4.13). Der Anteil der Kontrollvektor-transduzierter Zellen blieb in diesem Zeitraum dagegen nahezu unverändert (hier bei 60 %, Abbildung 4.13). Der kontinuierliche Rückgang des Anteils eGFP⁺ Zellen nach SOCS3 Transduktion könnte auf eine

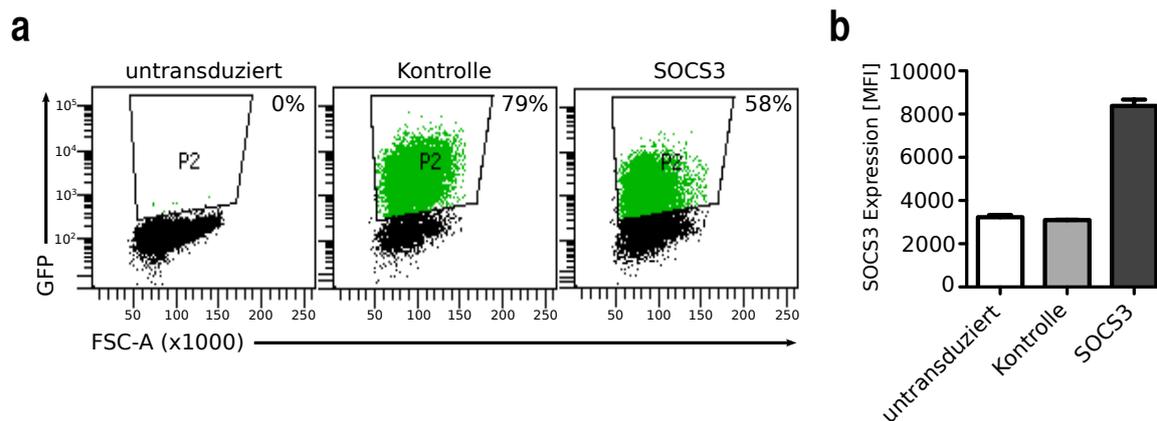


Abbildung 4.12: Überexpression von SOCS3 in CD4⁺ T-Zellen mittels lentiviraler Transduktion. CD4⁺ T-Zellen wurden entweder mit dem Kontrollvektor LeGO-G2 oder dem SOCS3-Vektor transduziert. **(a)** Durchflusszytometrische Analyse der T-Zellen zwei Tage nach Transduktion. Der Anteil eGFP⁺ Zellen (grün) zeigt die Effizienz der Transduktion für ein repräsentatives von sechs Experimenten. Dargestellt sind die viablen Zellen (FSC/SSC). **(b)** SOCS3 Expression zwei Tage nach Transduktion für ein repräsentatives von vier Experimenten. Die Analyse erfolgte durchflusszytometrisch nach intrazellulärer Färbung der Zellen mit AlexaFluor649-markiertem anti-SOCS3. Dargestellt ist die SOCS3 Expression in der eGFP⁻ Population der untransduzierten T-Zellen und der eGFP⁺ Population der Kontrollvektor- und SOCS3-transduzierten T-Zellen als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI).

unterschiedliche Proliferation der transduzierten (eGFP⁺) und nicht-transduzierten (eGFP⁻) Zellen zurückzuführen sein. Um dies zu testen wurden T-Zellen vor der Transduktion mit einem Proliferationsfarbstoff (*Cell Proliferation Dye eFluor670*, s. Material und Methoden) markiert. Die Proliferation wurde anschließend drei und fünf Tage nach Transduktion durchflusszytometrisch bestimmt. Abbildung 4.14a zeigt die Proliferation der Kontrollvektor-transduzierten Zellen im Vergleich zu den SOCS3-transduzierten Zellen. Die MFI des Proliferationsfarbstoffes bei den SOCS3-transduzierten T-Zellen war drei Tage nach Transduktion etwas höher, als bei den Kontrollvektor-transduzierten T-Zellen. Das bedeutet, dass die SOCS3-transduzierten T-Zellen weniger proliferiert sind (Abbildung 4.14a). An Tag 5 war der Unterschied signifikant (Abbildung 4.14a). Die Analyse von vier unabhängigen Experimenten zeigte, dass die Proliferation der SOCS3-transduzierten T-Zellen im Vergleich zu den Kontrollvektor-transduzierten T-Zellen an Tag 5 nach Transduktion durchschnittlich 2,8-fach geringer war (Abbildung 4.14b). Die Transduktion selbst führte zu einer leichten Induktion der Proliferation, da die Kontrollvektor-transduzierten T-Zellen im Vergleich zu den untransduzierten T-Zellen etwas mehr proliferierten (Abbildung 4.14b). Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass SOCS3-transduzierte T-Zellen eine verminderte Proliferation aufwiesen. Eine mögliche Ursache für die könnte die Induktion von Apoptose in den SOCS3-transduzierten T-Zellen sein, daher wurde im nächsten Schritt die Apoptose untersucht.

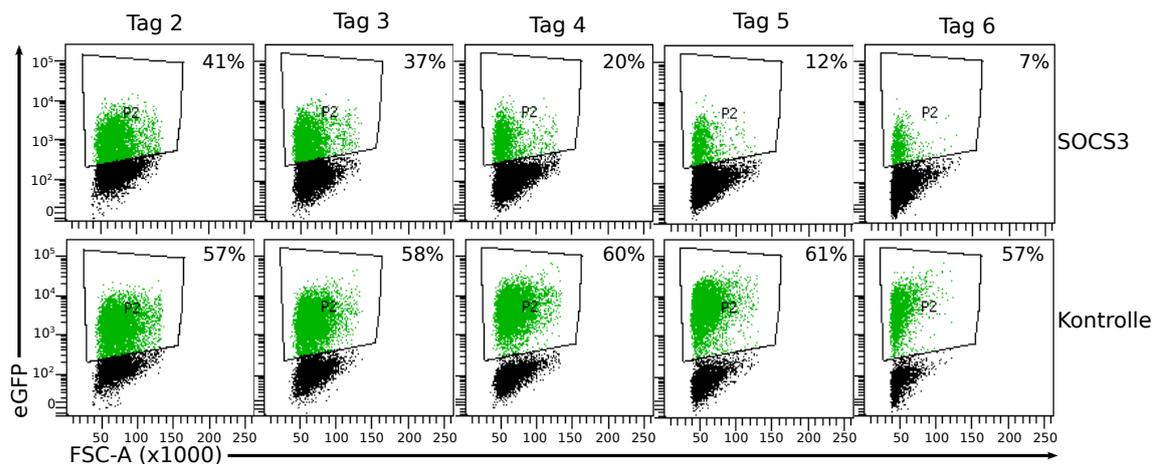


Abbildung 4.13: Transduktionseffizienz nach SOCS3 Transduktion im Zeitverlauf. CD4⁺ T-Zellen wurden entweder mit dem SOCS3-Vektor oder dem Kontrollvektor LeGO-G2 transduziert. Dargestellt ist die durchflusszytometrische Analyse der T-Zellen an Tag 2 bis Tag 6 nach Transduktion für ein repräsentatives von drei Experimenten. Der Anteil eGFP⁺ Zellen (grün) zeigt die Effizienz der Transduktion. Dargestellt sind die viablen Zellen (FSC/SSC).

4.2.4 Kein Einfluss von SOCS3 auf die Apoptose transduzierter CD4⁺ T-Zellen

Der Einfluss der SOCS3 Transduktion auf die Apoptose der T-Zellen wurde 5 Tage nach Transduktion mit drei verschiedenen Analysen untersucht: erstens wurde der Anteil toter Zellen im FSC/SSC verglichen. Zweitens wurde die frühe Apoptose und drittens die Nekrose untersucht. Die Marker Annexin V und 7-AAD wurden für die Unterscheidung von früh-apoptotischen (Annexin V⁺/7-AAD⁻) und nekrotischen (Annexin V⁺/7-AAD⁺) Zellen verwendet. Im FSC/SSC Graphen können viable Zellen von toten anhand ihrer Morphologie unterschieden werden (Abbildung 4.15a). Die Zellen im Analysefenster für tote Zellen sind alle Annexin V⁺/7-AAD⁺ und somit nekrotisch (Daten nicht gezeigt). Es waren keine Unterschiede im Anteil viabler Zellen nach SOCS3 Transduktion im Vergleich mit den Kontrollansätzen zu erkennen (Abbildung 4.15a).

Die viablen Zellen, wie in Abbildung 4.15a gezeigt, wurden auf frühe Apoptose, sowie Nekrose untersucht. Es waren keine Unterschiede im Anteil apoptotischer oder nekrotischer Zellen zu erkennen (Abbildung 4.15b), daher ist es unwahrscheinlich, dass die verminderte Proliferation auf eine SOCS3-induzierte Erhöhung der Apoptose zurückzuführen ist.

Eine weitere Ursache könnte eine unterschiedliche Aktivierbarkeit der SOCS3-transduzierten T-Zellen und Kontrollzellen sein. Dies könnte dazu führen, dass SOCS3-transduzierte T-Zellen auf Stimulation nicht so gut reagieren können, wie Kontrollzellen. Diese Möglichkeit wurde als Nächstes getestet

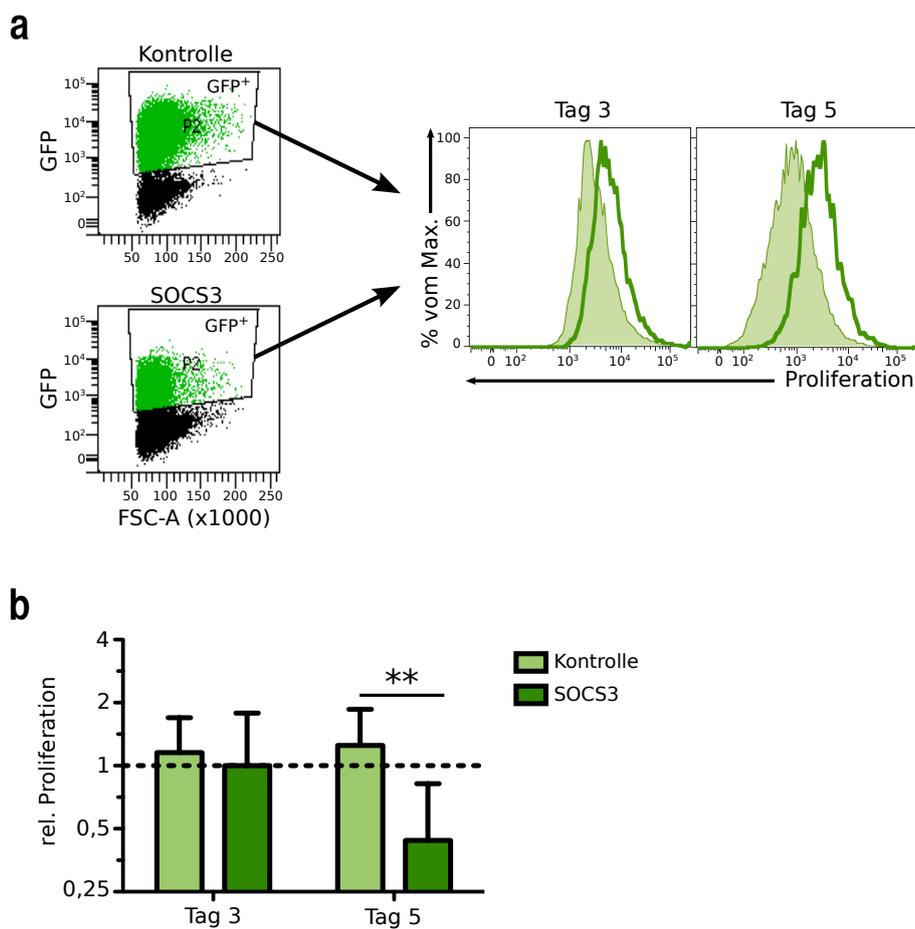


Abbildung 4.14: Proliferation von CD4⁺ T-Zellen nach Überexpression von SOCS3. Die Proliferation der T-Zellen wurde drei und fünf Tage nach Transduktion mit dem Kontrollvektor LeGO-G2 oder dem SOCS3-Vektor analysiert. **(a)** Die Dot Plots zeigen die viablen Zellen (FSC/SSC). Die Analyse der Proliferation erfolgte für die eGFP⁺ Zellen der Kontrollvektor- (hellgrün schattiert) und SOCS3-transduzierten Ansätze (dunkelgrüne Linie). Dargestellt ist ein exemplarisches von vier Experimenten. **(b)** Vergleich der relativen Proliferation von Kontrollvektor- (hellgrün) und SOCS3-transduzierten T-Zellen (dunkelgrün) im Vergleich zu den untransduzierten T-Zellen (gestrichelte Linie). Dargestellt sind die kombinierten Ergebnisse von 4 unabhängigen Experimenten. (**= $p < 0,01$, paired t-Test)

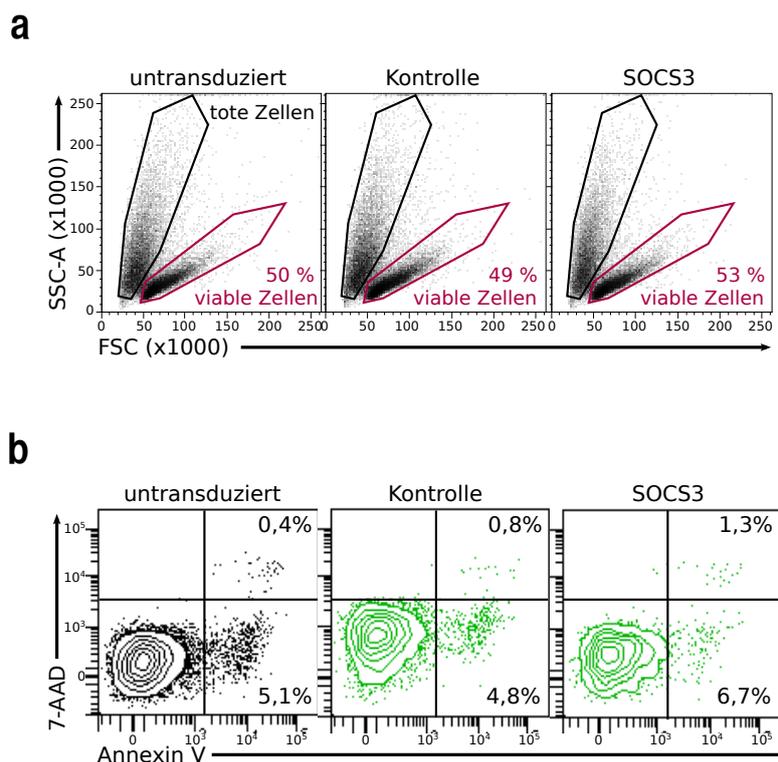


Abbildung 4.15: Analyse der Apoptose nach Überexpression von SOCS3. CD4⁺ T-Zellen wurden entweder mit dem Kontrollvektor LeGO-G2 oder dem SOCS3-Vektor transduziert. Fünf Tage nach Transduktion erfolgte die Analyse der toten, apoptotischen und nekrotischen Zellen. **(a)** Dargestellt sind die viablen (rotes Analysefenster) und toten Zellen (schwarzes Analysefenster) im Dot Plot für ein repräsentatives Experiment von vier Experimenten. **(b)** Dargestellt ist die durchflusszytometrische Analyse der Färbung mit Annexin V und 7-AAD fünf Tage nach Transduktion für ein repräsentatives Experiment von zwei Experimenten. Bei den untransduzierten T-Zellen erfolgte die Analyse in den eGFP⁻ Zellen (schwarz), bei den Kontrollvektor- und SOCS3-transduzierten T-Zellen in den eGFP⁺ Zellen (grün).

4.2.5 Geringer Einfluss von SOCS3 auf die Aktivierbarkeit der transduzierten CD4⁺ T-Zellen

Um die Aktivierbarkeit der SOCS3-transduzierten T-Zellen zu untersuchen, wurde der Anteil aktivierter Zellen (CD40L⁺) in SOCS3-transduzierten T-Zellen und Kontrollzellen nach 6 h PMA/Ionomycin oder anti-CD3/CD28 Stimulation verglichen. Die Analyse erfolgte zwei Tage nach Transduktion. Die Stimulation mit PMA/Ionomycin führte in allen drei Ansätzen zur Expression von CD40L auf mehr als 85 % der Zellen (Abbildung 4.16a). Die Stimulation mit anti-CD3/CD28 führte zur Expression von CD40L auf etwa 50 % der untransduzierten und Kontrollvektor-transduzierten T-Zellen (Abbildung 4.16b). SOCS3-transduzierte T-Zellen exprimierten etwas weniger CD40L (hier 39 %) (Abbildung 4.16b). Dieses Ergebnis zeigt, dass sich die Aktivierbarkeit von SOCS3-transduzierten T-Zellen kaum von den Kontrollzellen unterscheidet.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die Überexpression von SOCS3 zu einer Inhi-

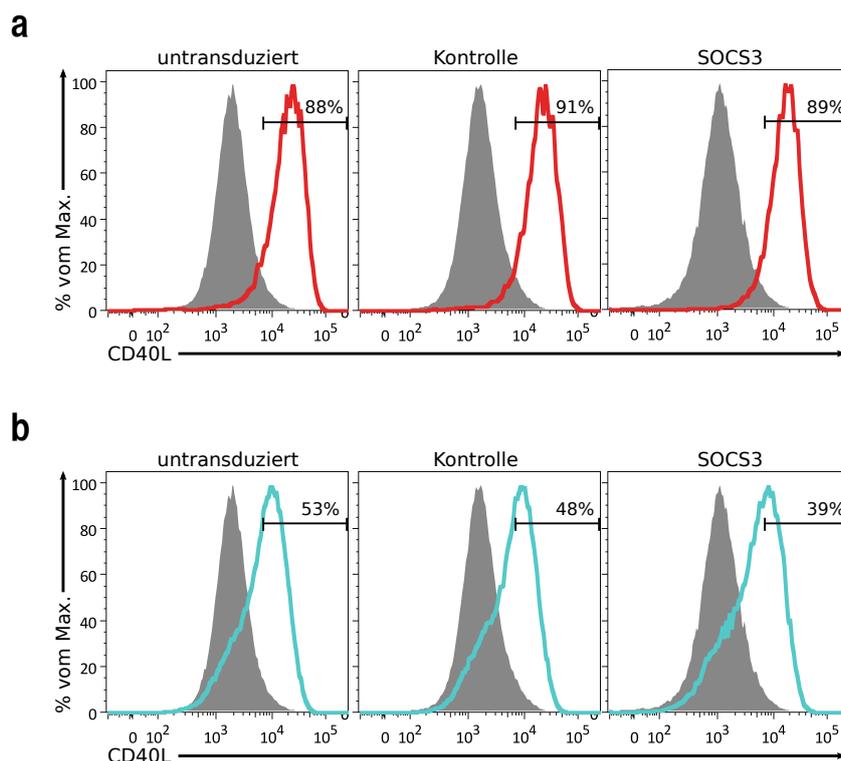


Abbildung 4.16: CD40L Expression von CD4⁺ T-Zellen nach Überexpression von SOCS3. CD4⁺ T-Zellen wurden mit dem Kontrollvektor LeGO-G2 oder dem SOCS3-Vektor transduziert. Zwei Tage nach Transduktion erfolgte die Stimulation für 6 h und anschließende intrazelluläre Färbung von CD40L. **(a)** Dargestellt ist die CD40L Expression von T-Zellen ohne Stimulation (grau schattiert) und nach PMA/Ionomycin Stimulation (rot) für ein repräsentatives von vier Experimenten. **(b)** Dargestellt ist die CD40L Expression von T-Zellen ohne Stimulation (grau schattiert) und nach anti-CD3/28 Stimulation (türkis) für ein repräsentatives von drei Experimenten.

bition der Proliferation führt, die jedoch nicht auf eine gesteigerte Apoptose zurückzuführen ist. Die verminderte Aktivierung nach anti-CD3/CD28 Stimulation könnte aber die Proliferation der T-Zellen nach Transduktion, zumindest teilweise, beeinflussen. Im nächsten Schritt habe ich das Zytokinprofil nach SOCS3 Transduktion analysiert, um einen Einfluss auf die Polarisierung von T-Zellen zu untersuchen.

4.2.6 SOCS3 induziert erhöhte IL-17 Expression in transduzierten CD4⁺ T-Zellen

Die SOCS3-transduzierten T-Zellen und die Kontrollzellen wurden zwei Tage nach Transduktion für 6 h mit PMA/Ionomycin unter Zugabe von Brefeldin A restimuliert. Die Zytokinexpression wurde mittels intrazellulärer Zytokinfärbung für TNF α , IFN γ , IL-4 und IL-17 in den aktivierten (CD40L⁺) Zellen analysiert. Generell wurden in den einzelnen Experimenten 30 - 95 % TNF α -positive T-Zellen, 12 - 47 % IFN γ -positive T-Zellen und 0,2 - 8 % IL-17-positive T-Zellen, aber kaum IL-4-positive Zellen (<0,05 %, Daten nicht gezeigt) induziert. Um die Zytokinexpression mehrerer Experimente vergleichen zu können, wurde die relative Expression, bezogen auf die untransduzierten Zellen analysiert (Abbildung 4.17). Die SOCS3- und

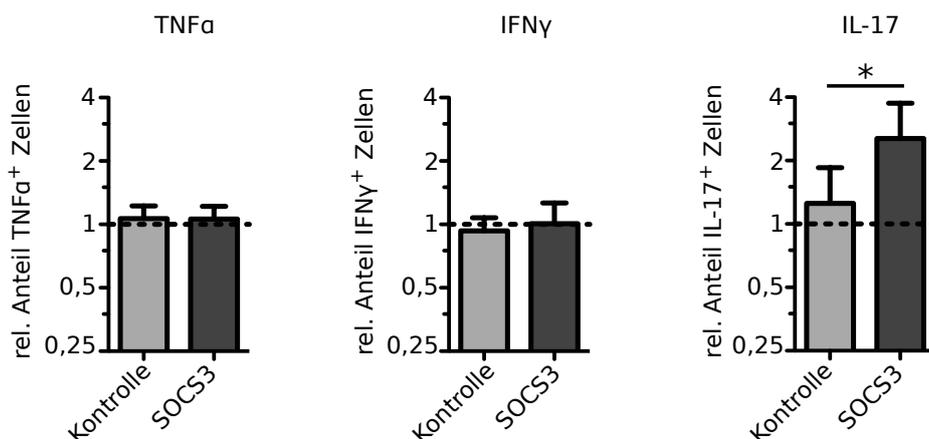


Abbildung 4.17: Analyse der Zytokinexpression von CD4⁺ T-Zellen nach Überexpression von SOCS3 mittels intrazellulärer Zytokinfärbung. CD4⁺ T-Zellen wurden mit dem Kontrollvektor LeGO-G2 oder dem SOCS3-Vektor transduziert. Zwei Tage nach Transduktion erfolgte die intrazelluläre Zytokinfärbung nach PMA/Ionomycin Restimulation (6 h). Dargestellt ist der relative Anteil TNFα-, IFNγ- und IL-17-produzierender Zellen in der eGFP⁺ Population von Kontrollvektor- (grau) und SOCS3-transduzierten (schwarz) T-Zellen im Vergleich zur eGFP⁺ Population von untransduzierten T-Zellen (gestrichelte Linie). Dargestellt sind die kombinierten Ergebnisse von acht unabhängigen Experimenten (*=p<0,05, Wilcoxon Signed Rank Test).

Kontrollvektor-transduzierten Zellen zeigten keine differentielle Expression der Zytokine TNFα und IFNγ. Die IL-17 Expression dagegen war in den SOCS3-transduzierten Zellen im Mittel signifikant erhöht (p=0,023, Wilcoxon Signed Rank Test, n=8, Abbildung 4.17). Die IL-17 Expression war auch in den Kontrollvektor-transduzierten Zellen leicht, aber nicht signifikant, erhöht. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass die lentivirale Transduktion per se einen Einfluss auf die IL-17 Expression hat.

Zusätzlich zur intrazellulären Bestimmung der Zytokinexpression wurde die Zytokinkonzentration in den T-Zell Kulturüberständen drei Tage nach Restimulation mit PMA/Ionomycin mittels CBA quantifiziert. Aufgrund der verminderten Proliferation der SOCS3-transduzierten T-Zellen erfolgte eine Normalisierung auf die unterschiedlichen Zellmengen der einzelnen Ansätze (Details s. Material und Methoden). In der unstimulierten Kontrolle waren keine Zytokine nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Nach Normalisierung lag die Konzentration für TNFα bei den SOCS3-transduzierten T-Zellen niedriger, als bei Kontrollzellen (Abbildung 4.18). Die IFNγ Konzentration war bei allen drei Ansätzen vergleichbar (Abbildung 4.18). Die IL-17 Konzentration dagegen lag bei den SOCS3-transduzierten T-Zellen etwa 2,5-fach höher als bei den Kontrollzellen (Abbildung 4.18). In einem zweiten unabhängigen Experiment war die gleiche Tendenz für IL-17 zu beobachten, allerdings lagen hier auch die Konzentrationen für TNFα und IFNγ leicht über der Konzentration der Kontrollzellen. Die Induktion von IL-17 in den SOCS3-transduzierten T-Zellen war jedoch etwa 3-fach stärker als für TNFα und IFNγ (Daten nicht gezeigt). IL-4 war in den Überständen nicht nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

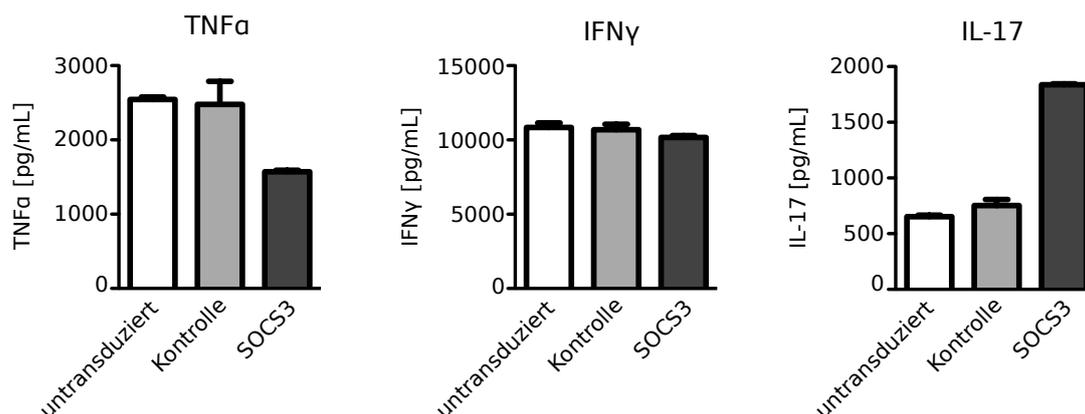


Abbildung 4.18: Analyse der Zytokinexpression von CD4⁺ T-Zellen nach Überexpression von SOCS3 mittels CBA. CD4⁺ T-Zellen wurden mit dem Kontrollvektor LeGO-G2 oder dem SOCS3-Vektor transduziert. Zwei Tage nach Transduktion erfolgte die FACS-Sortierung der eGFP⁺ Population von Kontrollvektor- und SOCS3-transduzierten Zellen, sowie der eGFP⁻ Population von untransduzierten T-Zellen. Nach Stimulation mit PMA/Ionomycin für drei Tage wurde die Zytokinexpression in den Überständen mittels CBA analysiert. Dargestellt ist ein exemplarisches von zwei Experimenten. Die Zytokinkonzentrationen für SOCS3-transduzierte T-Zellen (schwarz) sind nach Normalisierung mit dem Proliferationsfaktor dargestellt.

Zusammenfassend zeigten diese Daten, dass die Überexpression von SOCS3 in CD4⁺ T-Zellen zu einer verstärkten Induktion des T_H17-assoziierten Zytokins IL-17 führte. Eine Möglichkeit zur Erklärung der differentiellen Induktion der Zytokine ist die unterschiedliche Regulation von STAT-Molekülen durch SOCS3. STAT Moleküle wiederum regulieren Zytokin-abhängig die Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen. Daher wurde der Einfluss von SOCS3 auf die Aktivierung von STAT-Molekülen untersucht.

4.2.7 SOCS3 blockiert STAT3, STAT4 und STAT5 Phosphorylierung in transduzierten CD4⁺ T-Zellen

Um die Wirkung der SOCS3 Transduktion auf die Aktivierung von STAT3, STAT4 und STAT5 zu untersuchen, erfolgte die durchflusszytometrische Analyse der STAT-Phosphorylierung nach Aktivierung mit IFN α in Kontrollvektor- und SOCS3-transduzierten T-Zellen drei Tage nach Transduktion. IFN α wurde ausgewählt, da es den stärksten induzierenden Effekt auf die Phosphorylierung der STAT-Moleküle in T-Zellen hatte (unpublizierte Ergebnisse der Arbeitsgruppe). In Abbildung 4.19 ist die STAT-Phosphorylierung in den eGFP⁺ T-Zellen nach IFN α Stimulation im Vergleich zu den unstimulierten Zellen dargestellt. Die Kontrollvektor-transduzierten T-Zellen zeigten die stärkste Induktion für STAT3 (50 % Zunahme) und STAT4 (24 % Zunahme), während die Induktion für STAT5 gering war (8 %). In den SOCS3-transduzierten T-Zellen erfolgte keine Aktivierung der STAT-Moleküle (<5 % Zunahme). Zusätzlich war die Phosphorylierung bei den unstimulierten SOCS3-transduzierten T-Zellen im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollzellen verringert (STAT3 20 %, STAT4 26 % und STAT5 37 % Reduktion).

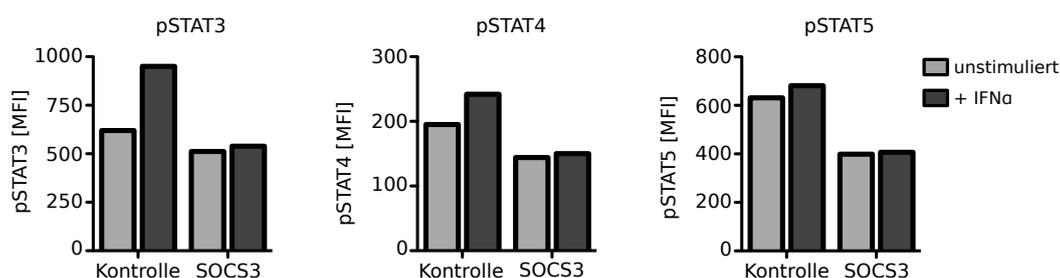


Abbildung 4.19: Phosphorylierung von STAT-Molekülen nach Überexpression von SOCS3. Die Analyse erfolgte drei Tage nach Transduktion mit dem Kontrollvektor LeGO-G2 oder dem SOCS3-Vektor. Nach 20 min Stimulation mit IFN α wurden die Zellen mit anti-phosphoryliertem (p)STAT3, anti-pSTAT4 und anti-pSTAT5 gefärbt und die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) durchflusszytometrisch quantifiziert. Dargestellt ist die STAT Phosphorylierung für Zellen ohne Stimulation (grau) und nach IFN α Stimulation (schwarz) für ein repräsentatives von zwei Experimenten.

Dies legt nahe, dass SOCS3 die IFN α -induzierte Aktivierung von STAT3 und STAT4, sowie die Basisphosphorylierung von STAT4 und STAT5 inhibiert.

4.2.8 Knock-down von SOCS3 in CD4⁺ T-Zellen mittels shRNA

Für die Herunterregulation von endogenem SOCS3 in CD4⁺ T-Zellen sollten spezifische shRNAs identifiziert werden. Hierfür wurden fünf kommerziell erhältliche shRNAs (Thermo Scientific) getestet. Diese wurden zunächst aus dem pLKO-Vektor in den LeGO-G-Vektor kloniert. Dabei wurde gleichzeitig der murine U6 Promoter von LeGO-G gegen den humanen U6 Promoter von pLKO ausgetauscht (Details s. Material und Methoden). Anschließend erfolgte die Transduktion von CD4⁺ T-Zellen mit den shRNAs. Als Kontrollvektor diente LeGO-G2. Der Anteil transduzierter Zellen lag für alle shRNAs, sowie für den Kontrollvektor bei >70 % (Abbildung 4.20). Nach Bestimmung der SOCS3 Expression in den transduzierten Zellen zeigte sich jedoch keine konsistente Herunterregulation der Proteinexpression (Daten nicht gezeigt), weshalb keine weiteren Experimente mit diesen shRNAs durchgeführt wurden

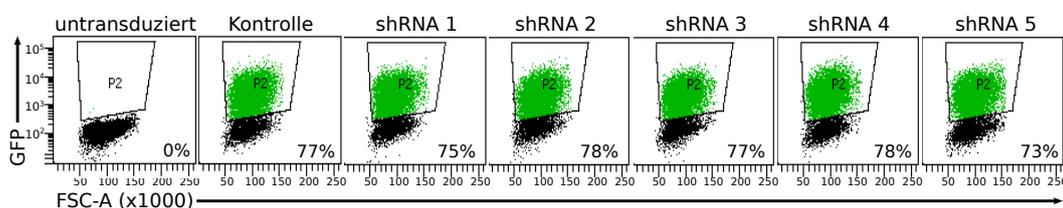


Abbildung 4.20: Effizienz der Transduktion von fünf SOCS3-spezifischen shRNAs. CD4⁺ T-Zellen wurden mit dem Kontrollvektor LeGO-G2 oder einem von fünf SOCS3-spezifischen shRNA-Vektoren transduziert und nach zwei Tagen durchflusszytometrisch analysiert. Der Anteil an eGFP⁺ Zellen (grün) zeigt die Effizienz der Transduktion. Dargestellt sind die viablen Zellen (FSC/SSC).

4.3 Einfluss von IL-7 auf die SOCS3 Expression humaner CD4⁺ T-Zellen

IL-7 wird bereits in klinischen Studien im Zusammenhang mit chronischen Infektionserkrankungen als Therapie getestet [99, 100]. Für murine CD8⁺ T-Zellen wurde gezeigt, dass IL-7 die SOCS3 Expression herunterregulieren kann. Bisher ist jedoch nur wenig über die Grundlagen der Wirkung von IL-7 auf humane T-Zellen bekannt. Daher wurde der Einfluss von IL-7 auf humane CD4⁺ T-Zellen im Allgemeinen und nach SOCS3 Transduktion untersucht.

4.3.1 IL-7 verbessert die Viabilität und Proliferation von CD4⁺ T-Zellen in der *in vitro* Kultur

Nach Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen mit anti-CD3/CD28 und IL-2 nahm die Viabilität der T-Zellen im Verlauf der Kultur ab, was sich durch eine Verminderung des Anteils viabler Zellen im FSC/SSC Dot Plot auszeichnete. Abbildung 4.21a zeigt im linken Dot Plot Auswahlfenster für die viablen T-Zellen. Der Anteil viabler T-Zellen reduzierte sich in dem gezeigten Experiment von etwa 60 % an Tag 2 der Kultur auf unter 10 % an Tag 7 (Abbildung 4.21a). Bei täglicher Zugabe von 20 ng/mL IL-7 stabilisierte sich der Anteil viabler T-Zellen hier bei etwa 40 % (Abbildung 4.21a Diagramm). Die Proliferation der T-Zellen erhöhte sich durch IL-7 Zugaben um das Vierfache (Abbildung 4.21b). Die Dot Plots in Abbildung 4.21a zeigen die T-Zellen im FSC/SSC mit und ohne IL-7. Die Analyse ergab, dass die Zugabe von IL-7 nicht nur zu einer Zunahme des Anteils viabler Zellen, sondern auch zu morphologischen Veränderungen führte. Sowohl die Zellgröße (FSC) als auch die Granularität (SSC) nahm bei IL-7 Gabe zu (Abbildung 4.21c, $p=0,013$ für die Zellgröße). Eine mögliche Erklärung für den Einfluss von IL-7 auf die Proliferation und Viabilität könnte die Beeinflussung der SOCS3 Expression sein. Daher wurde im Folgenden die Regulation der SOCS3 Expression durch IL-7 untersucht.

4.3.2 IL-7 reduziert die SOCS3 Expression von CD4⁺ T-Zellen

CD4⁺ T-Zellen wurden mit anti-CD3/CD28 in An- und Abwesenheit von IL-7 kultiviert. Nach fünf Tagen wurde die SOCS3 Expression durchflusszytometrisch bestimmt. Die Zugabe von IL-7 reduzierte die SOCS3 Expression um etwa ein Drittel (Abbildung 4.22a). Dennoch war die SOCS3 Expression nach Transduktion von SOCS3 auch in Anwesenheit von IL-7 im Vergleich zu den Kontrollzellen erhöht (Abbildung 4.22b). Dies zeigt, dass IL-7 die endogene SOCS3 Expression in humanen T-Zellen hemmt, nicht aber die Überexpression nach lentiviraler Transduktion. Die reduzierte SOCS3 Expression könnte die Ursache für die verstärkte Proliferation nach IL-7 Zugabe sein. Um den Einfluss von IL-7 auf die exogene Überexpression von SOCS3 zu untersuchen erfolgte im nächsten Schritt die Analyse der Proliferation von CD4⁺ T-Zellen nach Transduktion in Anwesenheit von IL-7.

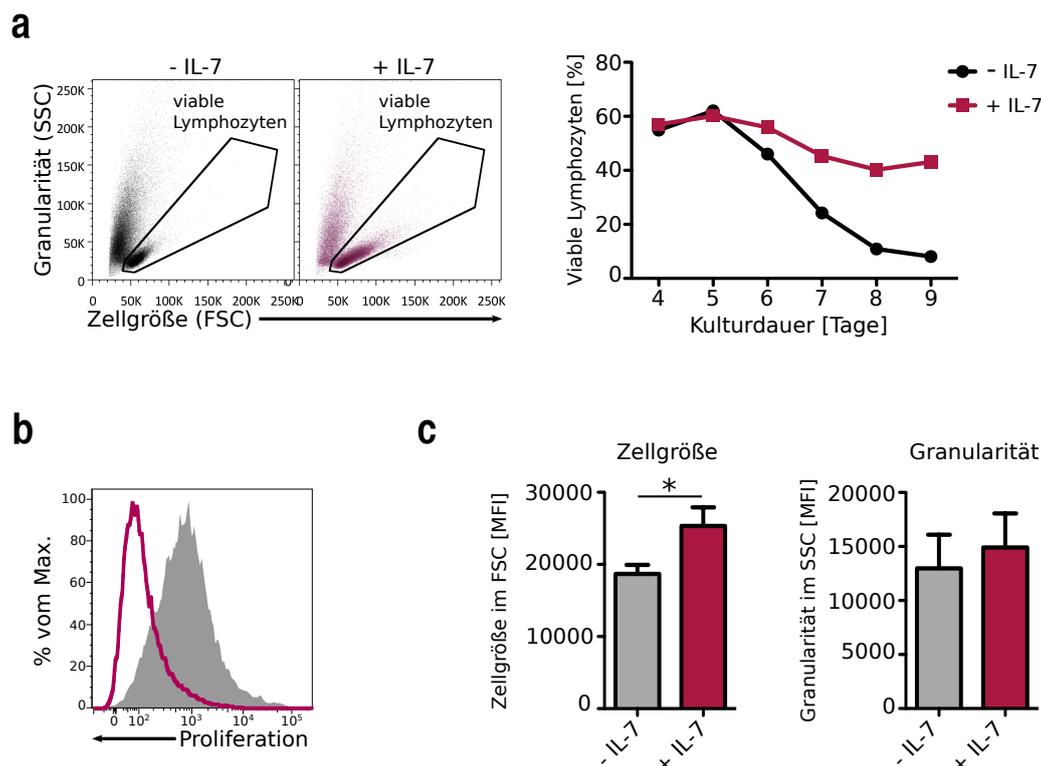


Abbildung 4.21: Einfluss von IL-7 auf die Viabilität und Morphologie von CD4⁺ T-Zellen. CD4⁺ T-Zellen wurden *in vitro* mit anti-CD3/CD28 ohne Zugabe (schwarz) und mit Zugabe (rot) von IL-7 stimuliert. Die Zugabe von IL-7 (20 ng/mL) erfolgte täglich. **(a)** Der Anteil viabler Zellen wurde zwischen Tag 4 und Tag 9 nach Stimulation mit anti-CD3/CD28 durchflusszytometrisch mit Hilfe des FSC/SSC Dot Plots mit der angezeigten Auswahl analysiert. Dargestellt ist ein repräsentatives von zwei Experimenten. **(b)** Die Analyse von Größe (FSC) und Granularität (SSC) der Zellen erfolgte acht Tage nach Stimulation mit anti-CD3/CD28 durch Quantifizierung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) viabler Zellen (Auswahl der Zellen wie in a). Dargestellt sind die kombinierten Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten (*= $p < 0,05$, paired t-Test). **(c)** Proliferation der T-Zellen mit Zugabe (rote Linie) und ohne Zugabe (grau schattiert) von IL-7. Die T-Zellen wurden vor der Stimulation mit anti-CD3/CD28 mit einem Proliferationsfarbstoff gefärbt und die Proliferation nach acht Tagen durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist ein repräsentatives von zwei Experimenten.

4.3.3 IL-7 hat keinen Einfluss auf den antiproliferativen Effekt von SOCS3 auf transduzierte CD4⁺ T-Zellen

Die Proliferation der transduzierten T-Zellen wurde an Tag 5 durchflusszytometrisch bestimmt. Die SOCS3-transduzierten T-Zellen zeigten bei Zugabe von IL-7 keine Veränderung in der Proliferation, während die Proliferation der Kontrollzellen etwa um den Faktor 4 zunahm (Abbildung 4.23a). Die Auswertung von zwei unabhängigen Experimenten zeigte, dass sich die relative Proliferation der SOCS3-transduzierten T-Zellen in Anwesenheit von IL-7 sogar noch weiter reduzierte als bei der Zellkultur ohne IL-7 (Abbildung 4.23b). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die SOCS3-transduzierten Zellen bei Zugabe von IL-7 von den untransduzierten Zellen im gleichen *well* noch schneller überwachsen werden. Die Expression des IL-7 Rezeptors war durch die Transduktion nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt). Diese

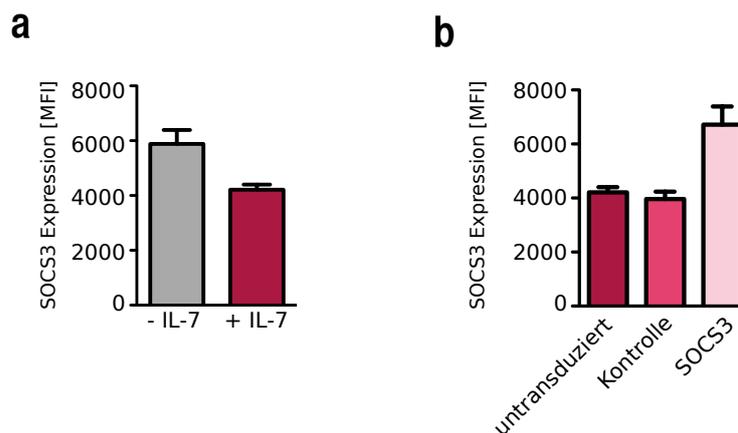


Abbildung 4.22: Einfluss von IL-7 auf die SOCS3-Expression von CD4⁺ T-Zellen. (a) SOCS3 Expression in CD4⁺ T-Zellen nach fünf Tagen Stimulation mit anti-CD3/CD28 in An- und Abwesenheit von IL-7 als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) für ein repräsentatives von zwei Experimenten. (b) SOCS3 Expression in Anwesenheit von IL-7 zwei Tage nach Transduktion von CD4⁺ T-Zellen mit SOCS3 als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) für ein repräsentatives von zwei Experimenten. Zum Vergleich sind untransduzierte und Kontrollvektor-transduzierte T-Zellen dargestellt.

Ergebnisse zeigen, dass IL-7, trotz der Herunterregulation von SOCS3, keinen Einfluss auf den antiproliferativen Effekt von exogenem SOCS3 hat.

Die Morphologie der transduzierten T-Zellen in An- und Abwesenheit von IL-7 wurde durchflusszytometrisch mittels FSC/SSC bestimmt (Abbildung 4.24a). Die Kontrollvektor-transduzierten T-Zellen zeigten in Anwesenheit von IL-7 eine Zunahme der Zellgröße (40 %) und Granularität (30 %) (Abbildung 4.24b). Die SOCS3-transduzierten eGFP⁺ T-Zellen dagegen zeigten eine deutlich schwächere Zunahme der Zellgröße (20 %) und Granularität (10 %), während die eGFP⁻ Zellen aus dem gleichen *well* nicht beeinflusst waren (Abbildung 4.24b).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass IL-7 die Proliferation und Viabilität von humanen CD4⁺ T-Zellen durch Herunterregulation von endogenem SOCS3 verbessert. Die exogene SOCS3 Expression nach lentiviraler Transduktion ist dagegen nicht beeinflusst. Dies zeigt, dass die SOCS3 Expression von IL-7 auf Transkriptionsebene reguliert wird.

Initiale Ergebnisse zur Zytokinexpression nach IL-7 Zugabe legen keine Wirkung von IL-7 auf das Zytokinprofil der T-Zellen nahe (Daten nicht gezeigt). Zur Zeit werden weitere Experimente in der Arbeitsgruppe durchgeführt, um diesen Punkt abschließend zu klären.

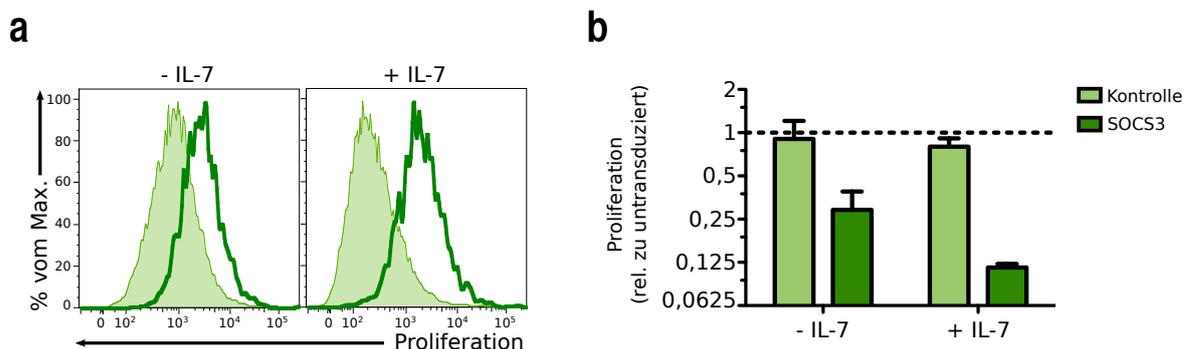


Abbildung 4.23: Einfluss von IL-7 auf die Proliferation von CD4⁺ T-Zellen nach Überexpression von SOCS3. Die Proliferation wurde fünf Tage nach Transduktion von T-Zellen mit dem Kontrollvektor LeGO-G2 oder dem SOCS3-Vektor analysiert. **(a)** Dargestellt sind die eGFP⁺ Zellen der Kontrollvektor- (hellgrün schattiert) und SOCS3-transduzierten (dunkelgrüne Linie) Ansätze für ein repräsentatives von zwei Experimenten. **(b)** Vergleich der relativen Proliferation von eGFP⁺ Kontrollvektor- (hellgrün) und SOCS3-transduzierten T-Zellen (dunkelgrün) im Verhältnis zu eGFP⁻ untransduzierten T-Zellen (gestrichelte Linie). Dargestellt sind die kombinierten Ergebnisse von 2 unabhängigen Experimenten.

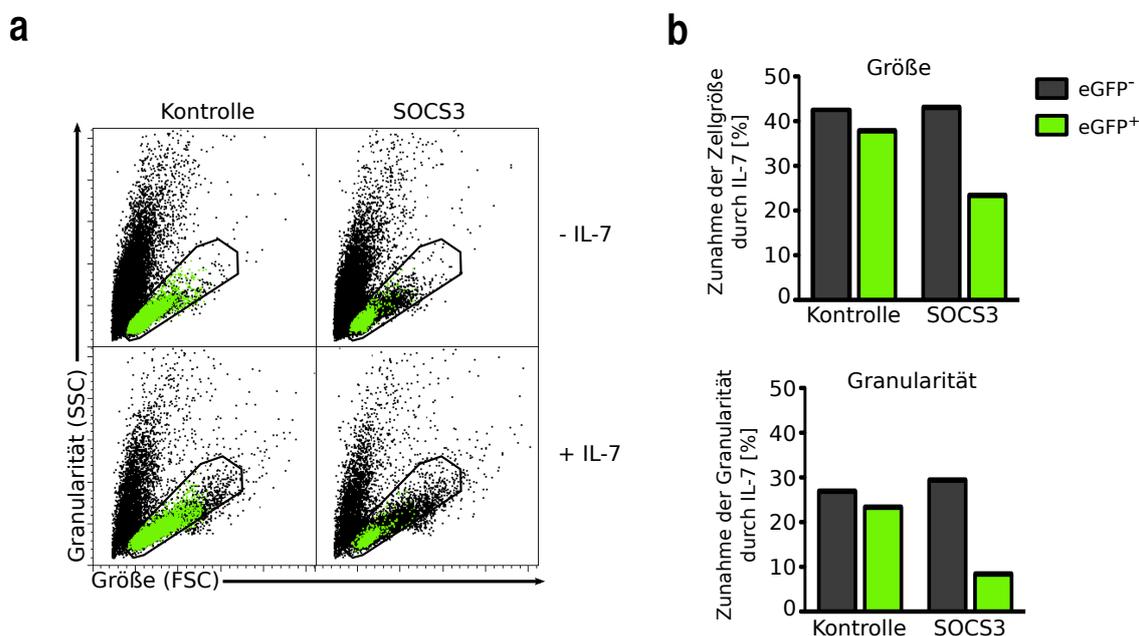


Abbildung 4.24: Einfluss von IL-7 auf Zellgröße und Granularität von CD4⁺ T-Zellen nach Überexpression von SOCS3. Sechs Tage nach Transduktion mit dem Kontrollvektor LeGO-G2 oder dem SOCS3 Vektor erfolgte die Quantifizierung der Zellgröße (FSC) und Granularität (SSC) mit Hilfe der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI). Dargestellt ist ein repräsentatives von drei Experimenten. **(a)** Auswahl der analysierten Zellen im Dot Plot. Die eGFP⁻ Zellen sind in schwarz, die eGFP⁺ Zellen sind in grün dargestellt. **(b)** Zunahme der Zellgröße und Granularität durch IL-7 Zugabe. Die eGFP⁻ Zellen sind in schwarz, die eGFP⁺ Zellen sind in grün dargestellt.

5 Diskussion

SOCS3 ist ein Protein, das die Aktivierung und Polarisierung von CD4⁺ T-Zellen beeinflusst [40, 44, 45, 101, 43, 42, 47]. Zwei unabhängige Studien mit Tuberkulose-Patienten und LTBI haben einen Zusammenhang zwischen der SOCS3 Expression und einer aktiven Tuberkulose gezeigt. Mistry et al [94] haben im Vollblut von Tuberkulose-Patienten eine erhöhte SOCS3 Expression identifiziert, die unter Therapie abnahm. Jacobsen et al [93] konnten zeigen, dass die SOCS3 Expression in T-Zellen von Tuberkulose-Patienten erhöht ist. SOCS3 gehörte zu einer Gruppe von Kandidatengenen, deren Expression in T-Zellen auf eine aktive Tuberkulose-Erkrankung hinwies. In nicht-infizierten Spendern war die SOCS3-Expression im Vergleich zu den LTBI ebenfalls erhöht. Dies weist darauf hin, dass die Herunterregulation der SOCS3 Expression während einer Tuberkulose-Infektion mit dem Immunschutz korreliert. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die Herunterregulation von SOCS3 die protektiven Eigenschaften der T-Zellen verbessert, während die erhöhte SOCS3 Expression zu funktionellen Veränderungen in der Immunantwort führen könnte. Diese Veränderungen könnten die Aktivierung oder Polarisierung von CD4⁺ T-Zellen betreffen, die bei der Tuberkulose Infektion von entscheidender Bedeutung für eine effektive Immunantwort sind [102, 103, 104]. Daher wurden in dieser Arbeit die Regulation von humanen CD4⁺ T-Zellen durch das SOCS3 Protein bei gesunden Spendern oder LTBI charakterisiert.

Für den intrazellulären Nachweis der SOCS3 Expression wurde ein durchflusszytometrischer Test etabliert. Im Vergleich zum Nachweis des Proteins mittels Westernblot erlaubt diese Methode eine einfachere Quantifizierung der Proteinexpression mit Hilfe der MFI des anti-SOCS3 Antikörpers. Im Vergleich zur quantitativen Real-Time PCR erlaubt diese Methode die Quantifizierung der Proteinexpression, die sich aufgrund von posttranslationalen Modifikationen von der mRNA Expression unterscheiden kann. Beim Nachweis im Westernblot waren zwei SOCS3-spezifische Banden erkennbar. Bei dem kleineren der beiden Proteine könnte es sich um eine modifizierte Form des SOCS3 Proteins handeln, die durch eine solche posttranslationale Modifikation verursacht wurde. Sasaki et al [105] haben gezeigt, dass unter Stressbedingungen die Translation einer SOCS3 Variante durch ein alternatives Startcodon induziert wird. Diese zweite Bande war nur in PBMCs und T-Zellen nachweisbar, Zelllinien, wie HEK293T und HeLa-Zellen, zeigten nur eine SOCS3-spezifische Bande (Daten nicht gezeigt). Ob diese modifizierte Form von SOCS3 einen funktionellen Einfluss auf die Aktivierung oder Polarisierung von CD4⁺ T-Zellen hat, sollte in zukünftigen Studien untersucht werden.

5.1 SOCS3 Expression in T-Zell-Subpopulationen und nach T-Zell-Aktivierung

Für murine T-Zellen wurde gezeigt, dass SOCS3 in naiven T-Zellen höher exprimiert ist als in *in vitro* differenzierten T-Zell Populationen [40, 47]. Die Antigen-spezifische Stimulation der naiven T-Zellen führte in diesem Modell zur transienten Herunterregulation des SOCS3 Proteins zwischen Tag 2 und Tag 4 nach Stimulation [40, 101]. In der vorliegenden Arbeit ergab der Vergleich der *ex vivo* SOCS3 Expression in humanen T-Zell Subpopulationen, dass das SOCS3 Protein sowohl in naiven (T_{naiv}), als auch in Memory- (T_{ZM} , T_{EM}) und Effektor-Zellen (T_{Eff}) in vergleichbarer Menge exprimiert ist (s. Abbildung 4.2). Der Vergleich der SOCS3 Expression in T_{naiv} , T_{ZM} , T_{EM} und T_{Eff} erfolgte in der vorliegenden Arbeit mit Zellen von gesunden Spendern. Zukünftig könnte ein Vergleich der SOCS3 Expression in T-Zellen von Tuberkulose-Patienten einen Aufschluss darüber geben, ob das SOCS3 Protein bei aktiver Erkrankung in einer der Subpopulation verstärkt exprimiert wird, oder ob ein genereller Anstieg der SOCS3 Expression in allen vier Subpopulationen für die gesteigerte Expression verantwortlich ist.

Die Antigen-spezifische Aktivierung von T-Zellen führte in dieser Arbeit zur Zunahme der SOCS3 Expression für einen Zeitraum von mindestens sechs Tagen (s. Abbildung 4.3). Dass im Gegensatz zu den publizierten Studien keine transiente Reduzierung der SOCS3 Expression erkennbar war, könnte auf Unterschiede in der SOCS3 Regulation zwischen humanen und murinen T-Zellen hinweisen. Die Diskrepanz, dass die „Antigen-erfahrenen“ T-Zell Subpopulationen (T_{ZM} , T_{EM} und T_{Eff}) und die naiven T-Zellen *ex vivo* vergleichbare SOCS3 Expressionen zeigten, obwohl die Stimulation von T-Zellen zu einer Erhöhung der SOCS3 Expression führte, könnte dadurch erklärt werden, dass die SOCS3 Expression nach dem Kontakt mit dem Antigen wieder auf den ursprünglichen Zustand gesenkt wird. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen nahe, dass die Herstellung der Ausgangsexpression von SOCS3 frühestens sechs Tage nach Stimulation geschieht. Daher könnte die erhöhte SOCS3 Expression in T-Zellen von Tuberkulose-Patienten durch die Aktivierung der T-Zellen mit dem Antigen während der aktiven Erkrankung verursacht werden. Es ist allerdings unwahrscheinlich, dass die Erhöhung der SOCS3 Expression nur auf eine Aktivierung der *M. tuberculosis*-spezifischen T-Zellen zurückzuführen ist, da die Frequenz der *M. tuberculosis*-spezifischen $CD4^+$ T-Zellen sehr gering ist (<1 %). Die Stimulation könnte aber als Nebeneffekt die SOCS3 Expression auch in anderen T-Zellen erhöhen. Dieser Effekt war in der vorliegenden Arbeit bei der PPD-Stimulation von T-Zellen nach sechs Tagen zu beobachten. Hier war die SOCS3 Expression in allen Lymphozyten erhöht, während die erhöhte SOCS3 Expression nach zwei Tagen Stimulation nur in $CD40L^+$ T-Zellen nachweisbar war.

Im Gegensatz zur erhöhten SOCS3 Expression nach Antigen-spezifischer Stimulation, führte die Koinkubation von PPD-stimulierten PBMCs mit BCG-infizierten Makrophagen zu einer

frühen (3 h) und transienten Reduktion der SOCS3 Expression in den aktivierten T-Zellen. Eine Erklärung für diese unterschiedlichen Beobachtung könnte sein, dass die transiente Herunterregulation von SOCS3 für die Interaktion der T-Zellen mit den Makrophagen notwendig ist und wie bei Yu et al [40] beschrieben, für eine bessere Aktivierbarkeit der T-Zellen sorgt. Es wäre möglich, dass bei Tuberkulose-Patienten die Fähigkeit der T-Zellen SOCS3 bei Interaktion mit infizierten Makrophagen zu reduzieren, durch die erhöhte SOCS3 Expression vermindert ist. Dies könnte die Aktivierung der Makrophagen und die Tötung der Bakterien einschränken. Die transiente Herunterregulation von SOCS3 in diesem Modell ist jedoch zeitlich nicht mit der Studie von Yu et al [40] zu vergleichen, die eine Reduktion im Zeitraum zwischen zwei und vier Tagen nach Stimulation beobachtet haben.

5.2 Einfluss der SOCS3 Expression auf die T-Zell Polarisierung

Die Korrelation von SOCS3 Expression und T_H17 Differenzierung wurde in dieser Arbeit in verschiedenen Ansätzen nachgewiesen. Die SOCS3 Expression war sowohl in IL-17-produzierenden T-Zell Klonen, als auch in T_H17 Vorläuferzellen ($CD4^+CD161^+$) erhöht (s. Abbildung 4.7 und 4.8). Die exogene Expression von SOCS3 in $CD4^+$ T-Zellen führte ebenfalls zu einer Erhöhung der IL-17 Produktion. Daher scheint SOCS3 in diesem Modell ein Marker für T_H17 Zellen zu sein.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit haben frühere Studien gezeigt, dass die SOCS3 Expression einen negativen Effekt auf die IL-17 Expression hat [44, 45, 46]. Die SOCS3 Expression wurde bisher ausschließlich mit einer T_H2 Differenzierung assoziiert, da eine erhöhte SOCS3 Expression in T_H2 Zellen [47, 42], sowie in T-Zellen von Patienten mit T_H2 -assoziierten Allergien nachweisbar war [43]. Die T-Zell Klone, die in dieser Arbeit analysiert wurden, zeigten in den IL-4-exprimierenden Zellen ebenfalls eine erhöhte SOCS3 Expression. Damit könnte SOCS3 in humanen T-Zellen sowohl ein Marker für T_H2 , als auch T_H17 Polarisierung sein.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde die SOCS3-abhängige Regulation der T_H2 Differenzierung nicht weiter untersucht, da IL-4-produzierende T-Zellen nur bei der T-Zell Klonierung und hier bei der Hälfte der Experimente auch nur in geringer Anzahl (<10 Klone) generiert werden konnten. Die Analyse der intrazellulären Zytokinexpression in SOCS3-transduzierten T-Zellen und nach Kurzzeitstimulation ergab keine IL-4-produzierenden T-Zellen. Mögliche Erklärungen könnten sein, dass die Kulturbedingungen für die T_H2 Induktion suboptimal waren (Blockierung der Polarisation durch $IFN\gamma$) oder, dass die T_H2 Frequenzen im peripheren Blut zu niedrig waren. Diese beiden Möglichkeiten könnten erklären, warum auch IL-17-produzierende T-Zellen in der Kurzzeitstimulation nicht nachweisbar waren.

Der Einfluss von SOCS3 auf die T-Zell Polarisierung beruht auf der Regulation von Intensität und Dauer des Zytokin-induzierten JAK/STAT Signalweges [106]. Hierbei verhindert

SOCS3 die Phosphorylierung der STAT-Moleküle durch JAKs entweder durch Bindung an den Zytokinrezeptor oder durch direkte Inhibition der JAKs [32]. Außerdem kann SOCS3 die Ubiquitinierung und somit den proteasomalen Abbau von Zielmolekülen vermitteln [35] (s. Einleitung Abschnitt 1.3.5). Die einzelnen STAT-Moleküle werden durch verschiedene Zytokine aktiviert und regulieren die Transkription von T_H1 , T_H2 oder T_H17 -spezifischen Genen. T_H1 Polarisierung wird durch IL-12-aktiviertes STAT4 induziert, während IL-4-aktiviertes STAT5 und STAT6 T-Zellen in Richtung T_H2 polarisieren. T_H17 Differenzierung wird mit IL-6- oder IL-23-induziertem STAT3 assoziiert (zusammengefasst von O'Shea et al [25]). Es gibt eine Vielzahl von Publikationen, welche ein komplexes Bild der Inhibition verschiedener STAT-Moleküle durch SOCS3 zeichnen. So wurde gezeigt, dass SOCS3 sowohl die Aktivierung von STAT3 [107, 98, 108], als auch STAT4 [48, 109] inhibieren kann. Dies legt nahe, dass SOCS3 die Polarisierung zu T_H1 über STAT4 und T_H17 über STAT3 blockiert. Dagegen wird die Aktivierung von STAT5 und STAT6 nicht beeinflusst, was die Differenzierung zu T_H2 ermöglicht [109, 47]. Widersprüchlich hierzu ist die Beobachtung einer aktuellen Studie, dass für die T_H2 Differenzierung neben STAT6 auch STAT3 eine essentielle Rolle spielt [110]. Die Autoren vermuten, dass ein Zusammenspiel verschiedener STAT-Moleküle für die T_H2 Differenzierung verantwortlich ist. Auch bei der T_H17 Differenzierung könnten neben STAT3 weitere STAT-Moleküle eine Rolle spielen. Die erhöhte SOCS3 Expression könnte einen alternativen Signalweg induzieren, der den inhibitorischen Effekt auf die STAT3-Aktivierung kompensiert.

Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass die STAT3-Aktivierung nicht in jedem Fall von SOCS3 blockiert wird, sondern spezifisch nur nach IL-6-Induktion. Nach Induktion durch IL-10 dagegen wird STAT3 nicht inhibiert [39]. Diese differentielle Regulation ist auf die Affinität von SOCS3 zu den Zytokinrezeptoren zurückzuführen. SOCS3 bindet an den IL-6-Rezeptor - genauer gesagt an die Untereinheit gp130 - aber nicht an den IL-10-Rezeptor [39]. Dies legt nahe, dass es sich bei der Regulation der STAT-Moleküle durch SOCS3 um eine Zytokin-spezifische Feinregulation handelt. Dies könnte den scheinbaren Widerspruch zwischen der Zunahme IL-17-produzierender T-Zellen nach SOCS3 Transduktion und der beobachteten Blockierung von STAT3, STAT4 und STAT5 erklären. Die STAT-Phosphorylierung wurde in dieser Arbeit nach $IFN\alpha$ Stimulation analysiert, da nach IL-6- oder IL-23-Stimulation (T_H17 assoziierte Zytokine) nur eine schwache Aktivierung der STAT-Moleküle nachweisbar war (unpublizierte Ergebnisse der Arbeitsgruppe). Daher könnten die Ergebnisse in diesem Fall eher eine unspezifische Blockierung der STAT-Moleküle darstellen, welche vermutlich keinen Einfluss auf die T-Zell Polarisierung hatte. Allerdings zeigt dieses Experiment auch, dass das überexprimierte SOCS3 funktionell ist und generell die STAT-Phosphorylierung inhibieren kann. Die Überexpression von SOCS3 führte auch zu einer Reduzierung der Basisphosphorylierung aller drei STAT-Moleküle. Somit scheint die SOCS3 Expression nicht nur einen Einfluss auf die akute Phosphorylierung nach Zytokinstimulation zu haben, sondern auch die Phosphorylierung im Ruhezustand zu verändern. Dieses könnte ebenfalls einen Einfluss auf

die Polarisierung der T-Zellen haben. Hierbei muss allerdings beachtet werden, dass es sich nicht um einen vollständigen Ruhezustand handelte, da die Zellen vor der Transduktion mit anti-CD3/CD28 und IL-2 polyklonal aktiviert wurden.

Neben der unterschiedlichen Affinität von SOCS3 zu verschiedenen Zytokinrezeptoren, sind auch andere Mechanismen für Regulation der STAT-Moleküle durch SOCS3 möglich. Brender et al [48] haben beschrieben, dass SOCS3 in den Zellen eines humanen T-Zell Lymphoms konstitutiv exprimiert ist, aber die STAT3 Phosphorylierung in diesen Zellen nicht inhibieren kann. Die Autoren führen diesen Effekt auf die Aktivität einer SOCS3-resistenten Kinase zurück, welche die STAT3-Aktivierung reguliert. Im Falle der beobachteten Assoziation von SOCS3- und IL-17 Expression wäre ein ähnlicher Effekt durch ein bisher nicht näher charakterisiertes Molekül denkbar.

Zusätzlich gibt es die Möglichkeit, dass SOCS3 die T-Zell Polarisierung STAT-unabhängig beeinflusst. Kryczek et al [111] haben gezeigt, dass humane IL-17⁺ T-Zellen stärker proliferieren als IL-17⁻ T-Zellen. Daher könnte die Zunahme der IL-17-Produktion bei Überexpression von SOCS3 auch darauf zurückzuführen sein, dass die Proliferation von T_H17 Zellen durch SOCS3 im Vergleich zu anderen T-Zellen weniger stark inhibiert wird und sich dadurch ihr Anteil in der Gesamtpopulation erhöht. Die stärkere Proliferation von IL-17⁺ T-Zellen könnte auch die Beobachtung erklären, dass Kontrollvektor-transduzierte T-Zellen im Vergleich zu nicht-transduzierten T-Zellen eine geringe Zunahme der IL-17 Expression zeigten. Dieser Effekt wurde bei IFN γ - und TNF α -produzierenden T-Zellen nicht beobachtet und könnte auf eine bevorzugte Infektion von stärker proliferierenden Zellen durch die Lentiviren zurückzuführen sein. Der Einfluss der Proliferation auf die SOCS3-induzierte T_H17 Polarisierung sollte in zukünftigen Experimenten analysiert werden.

Die Diskrepanz in der T_H17 Regulationen durch SOCS3 zwischen der vorliegenden Arbeit und früheren Studien kann verschiedene Ursachen haben. Zum einen wurde die IL-17 Expression in dieser Arbeit nach Überexpression von SOCS3 analysiert, während in anderen Studien SOCS3-defiziente Zellen analysiert wurden [44, 45, 46]. Die Effekte von Überexpression, bzw. Defizienz sind aber oft nur bedingt vergleichbar. Beispielsweise reagieren SOCS3-defiziente Leberzellen und Makrophagen verstärkt auf Stimulation mit IL-6, nicht jedoch mit IFN γ [98], während nach Überexpression die Stimulation beider Zytokine effizient inhibiert wird [106, 107]. Daher müsste die IL-17 Expression im vorliegenden Modell auch nach Reduktion der SOCS3 Expression untersucht werden. Für diese Untersuchungen wurden verschiedene SOCS3-spezifische shRNAs getestet, die jedoch keine reproduzierbare Reduktion der SOCS3 Expression zeigten (S. Abbildung 4.20). Die Identifizierung funktioneller shRNAs ist ein wichtiger nächster Schritt um die IL-17 Regulation durch SOCS3 weiter zu charakterisieren.

Ein weiterer Unterschied ist, dass in dieser Arbeit CD161⁺ T-Zellen für die Generierung der T-Zell Klone und die SOCS3 Quantifizierung in T_H17 Vorläufern analysiert wurden. Bei den Vergleichsstudien handelt es sich um murine Studien. Im Gegensatz zu humanen T_H17

Zellen ist in Mäusen das CD161 Äquivalent NK1.1 nicht mit der IL-17 Expression assoziiert, weshalb ein unterschiedlicher Ursprung von murinen und humanen T_H17-Zellen vermutet wird [21]. Daher könnte es sein, dass SOCS3 in der Differenzierung von murinen und humanen T_H17-Zellen unterschiedliche Funktionen hat.

In dieser Arbeit wurden nicht nur in den differenzierten Effektor T_H17 Zellen, sondern auch in den CD161⁺ T_H17 Vorläuferzellen höhere SOCS3 Expressionslevel nachgewiesen. Die erhöhte SOCS3 Expression in IL-17-produzierenden T-Zellen könnte hierbei sowohl die Ursache als auch die Folge der T_H17 Differenzierung sein. Cosmi et al [21] haben gezeigt, dass im peripheren Blut von Erwachsenen alle CD161⁺ den Phänotyp von Gedächtniszellen haben. Naive CD161⁺ T-Zellen konnten die Autoren nur aus Nabelschnurblut isolieren. T_H17 Effektorzellen entwickeln sich daher bei Erwachsenen ausschließlich aus Gedächtniszellen. Die erhöhte SOCS3 Expression, die in dieser Arbeit in den CD161⁺ T-Zellen nachgewiesen wurde, könnte daher in den ersten Lebensjahren bei der T_H17 Differenzierung von naiven zu Gedächtnis-T-Zellen entstanden sein. Im Erwachsenenalter könnte die erhöhte SOCS3 Expression dafür sorgen, dass die T_H17 Vorläuferzellen nur aktiviert werden, wenn ein T_H17-förderndes Milieu besteht. Zur genaueren Untersuchung dieses Vorgangs wäre es ein interessanter Ansatz die SOCS3 Expression in T-Zellen aus Nabelschnurblut zu bestimmen, um zu sehen, ob die SOCS3 Expression sich in naiven CD161⁺ und CD161⁻ T-Zellen noch nicht unterscheidet.

Da die Überexpression von SOCS3 die Proliferation der T-Zellen stark inhibierte, war es nicht möglich den Einfluss von SOCS3 auf die Polarisierung über längere Zeiträume zu beobachten. Die Analyse der Zytokinexpression war bis maximal drei Tage nach Transduktion durchführbar. Spätere Analysen waren durch den geringen Anteil eGFP⁺ Zellen erschwert. Aus dem gleichen Grund war die Generierung von T-Zell Klonen oder polarisierten T-Zell Linien nach SOCS3 Transduktionen nicht möglich. Da aber schon zwei Tage nach SOCS3-Transduktion eine Wirkung auf die IL-17 Expression messbar war, scheint SOCS3 die Polarisierung der CD4⁺ T-Zellen schon sehr früh zu beeinflussen. Dieses Ergebnis korreliert mit der Beobachtung, dass schon kurz nach der lentiviralen Transduktion primärer humaner T-Zellen mit ROR γ t, dem Haupt-Transkriptionsfaktor von T_H17 Zellen, IL-17-produzierende T-Zellen entstehen. Nach sechs Tagen war hier die maximale IL-17-Produktion erreicht [22].

CISH und SOCS1 wurden ebenfalls als differentiell exprimierte Gene bei TB-Patienten und LTBI identifiziert ([93] und unpublizierte Daten der eigenen Arbeitsgruppe), was darauf hinweist, dass vielleicht kein einzelnes Molekül, sondern mehrere Faktoren für die Regulation von CD4⁺ T-Zellen bei der Tuberkulose-Infektion eine Rolle spielen. Für eine genauere Charakterisierung wäre es wichtig weitere Mitglieder der SOCS Familie zu untersuchen. Der Einfluss von CISH auf die Immunpolarisierung ist bisher nur wenig untersucht, lediglich ein negativer Effekt auf STAT5 ist beschrieben [112]. SOCS1, das SOCS3 funktionell am ähnlichsten ist, induziert ebenfalls T_H17 Zellen und blockiert gleichzeitig T_H1 Zellen [113].

5.3 T_H17 Polarisierung in der Tuberkulose-Infektion

Die Korrelation der SOCS3 Expression mit der Expression des proinflammatorischen Zytokins IL-17 ist ein Hinweis darauf, dass die erhöhte SOCS3 Expression in T-Zellen von Tuberkulose-Patienten [93] *in vivo* zu einer T_H17 Polarisierung führen könnte. Über den Einfluss dieser Immunpolarisierung auf den Verlauf einer Tuberkulose-Infektion kann nur spekuliert werden. Obwohl im Normalfall *M. tuberculosis*-spezifische T_H1 Zellen für eine protektive Immunantwort verantwortlich sind, haben Gallegos et al [114] gezeigt, dass auch T_H17 Zellen einen Teilschutz vor einer *M. tuberculosis* Infektion vermitteln. T_H2 Zellen waren dagegen bedeutungslos [114]. Zudem können T_H17 Zellen die T_H1 Immunantwort gegen intrazelluläre Bakterien durch Modulation von dendritischen Zellen verstärken [115]. Diese Studien zeigen, dass die Induktion von T_H17 Zellen für die protektive Immunantwort nicht unbedingt nachteilig ist.

5.4 Einfluss der SOCS3 Expression auf die T-Zell Proliferation

In der vorliegenden Arbeit führte die exogene Expression von SOCS3 zu einer Inhibition der Proliferation, die nicht auf eine gesteigerte Apoptose zurückzuführen war (s. Abbildung 4.15). Eine reduzierte Proliferation ist ein Merkmal von „erschöpften“ T-Zellen (s. Einleitung, Abschnitt 1.6), die mit einer erhöhten SOCS3 Expression (zumindest bei murinen CD8⁺ T-Zellen) assoziiert sind [49]. SOCS3 inhibiert die Proliferation auch bei murinen T-Zellen [109, 40]. Day et al [69] haben eine verminderte Proliferation von *M. tuberculosis*-spezifischen T-Zellen in Patienten mit aktiver Tuberkulose beobachtet. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen nahe, dass diese verminderte Proliferation durch die erhöhte SOCS3 Expression in T-Zellen von Tuberkulose-Patienten [93] verursacht wird.

Cacalano et al [116] haben als möglichen Mechanismus eine Interaktion von SOCS3 mit dem Ras-Signalweg identifiziert, der die Proliferation von T-Zellen nach IL-2 Stimulation reguliert. Die Autoren zeigen, dass die Phosphorylierung von SOCS3 an zwei Tyrosinresten (Y204 und Y221) zur Interaktion mit dem Ras-Inhibitor p120RasGAP führt. Dies sorgt für die Aufrechterhaltung der Ras-abhängigen Proliferation. Nicht-phosphoryliertes SOCS3 dagegen inhibiert die Proliferation, da der Ras-Inhibitor frei ist. Die Reduktion der Proliferation nach SOCS3 Überexpression könnte daher auf dephosphoryliertes SOCS3 zurückzuführen sein. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich hierbei um einen nicht-physiologischen Prozess handelt, der durch die Transduktion verursacht wurde, da SOCS3 normalerweise sehr schnell nach der Expression phosphoryliert wird [116]. Vielleicht spiegelt dieses aber auch eine spezielle Form von SOCS3 wider, die andere regulatorische Eigenschaften als die phosphorylierte Variante aufweist. Insgesamt deuten diese Beobachtungen an, dass die Regulation von T-Zellen durch SOCS3 komplexer sein könnte, als bisher angenommen und SOCS3 nicht nur die Polarisierung, sondern gleichzeitig auch die „Erschöpfung“ von T-Zellen

reguliert.

Interessanterweise werden die gleichen Tyrosin-Reste, die für die Regulation der Proliferation durch SOCS3 verantwortlich sind (Y204 und Y221) mit der Proteinstabilität assoziiert [117]. So führt die Phosphorylierung von SOCS3 an diesen Positionen zu einer schnellen Degradierung des Proteins. Das dephosphorylierte Protein, das auch mit der Inhibition der Proliferation assoziiert ist, ist dagegen deutlich stabiler. Daher könnte die Dephosphorylierung des Proteins zu dem „erschöpften“ T-Zell Phänotyp bei chronischen Infektionen führen. Die Stabilität von SOCS3 wird zusätzlich durch weitere Faktoren, wie zum Beispiel die Pim-1 Kinase, die direkt an SOCS3 bindet, beeinflusst [118]. Pim-1 ist ein weiteres Gen, das in T-Zellen von TB-Patienten und LTBI differentiell exprimiert wird [93].

5.5 Einfluss von IL-7 auf die SOCS3 Expression

Die SOCS3-induzierte „Erschöpfung“ von murinen CD8⁺ T-Zellen wird bei chronischer Infektion mit dem Lymphozytären Choriomeningitis Virus (LCMV) beobachtet. Diese „Erschöpfung“ führt zu einer nicht-funktionellen Immunantwort, wodurch die Infektion nicht bekämpft werden kann [49]. Das Phänomen der T-Zell „Erschöpfung“ ist vor allem bei chronischen viralen Erkrankungen, wie HIV, HCV und LCMV untersucht [79, 81, 82] (s. Einleitung, Abschnitt 1.6). Aber auch für die Tuberkulose gibt es erste Hinweise, dass eine „Erschöpfung“ von CD8⁺ T-Zellen eine Rolle bei der Krankheit spielt [83, 84, 69]. Die „Erschöpfung“ von CD4⁺ T-Zellen ist jedoch bisher nur in einigen Studien im Zusammenhang mit viralen Infektionen untersucht [91, 92].

Die systemische Behandlung mit IL-7 führt bei LCMV-infizierten Mäusen zur Verbesserung der funktionellen Eigenschaften „erschöpfter“ T-Zellen und zur Zunahme funktioneller, Antigen-spezifischer T-Zellen [49]. Die Autoren konnten zeigen, dass dieser Effekt auf der reduzierten SOCS3 Expression durch IL-7 beruht. Die IL-7-Therapie wird bereits in einigen Human-Studien für den Einsatz bei chronischen Virusinfektionen, wie HIV [99, 100] getestet und wäre eine Option für die Behandlung von „erschöpften“ T-Zellen bei der Tuberkulose.

Analog zu CD8⁺ T-Zellen im Mausmodell wurde in der vorliegenden Arbeit verminderte SOCS3 Expression in humanen CD4⁺ T-Zellen durch IL-7-Behandlung beobachtet (s. Abbildung 4.22). Außerdem führte die Zugabe von IL-7 zu einer verbesserten Viabilität der T-Zellen, was sich durch eine gesteigerte Proliferation und veränderte Zellmorphologie zeigte (s. Abbildung 4.21). Die Zugabe von IL-7 zu SOCS3-transduzierten T-Zellen induzierte jedoch keinen dieser Effekte. Dieses ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass IL-7 die SOCS3 Expression auf Transkriptionsebene reguliert [49], so dass nur das endogene, nicht aber das exogene SOCS3 betroffen ist. Es ist unwahrscheinlich, dass diese „Resistenz“ der SOCS3-transduzierten Zellen gegenüber IL-7 durch eine verminderte Expression des IL-7 Rezeptors verursacht wird, da die Expression dieses Rezeptors auf der Zelloberfläche von SOCS3-transduzierten Zellen

unverändert war (Daten nicht gezeigt). In murinen B-Zellen sorgt SOCS1 dafür, dass die Zellen in bestimmten Stadien nicht auf die Stimulation mit IL-7 reagieren. Auch hier war die Expression des IL-7 Rezeptors unverändert [119]. In beiden Fällen sorgt die Modulation des IL-7 Signalweges durch die SOCS Proteine vermutlich für die IL-7-„Resistenz“ der Zellen. Daher sollte untersucht werden, ob die IL-7 Behandlung auch in T-Zellen von Tuberkulose-Patienten zu einer Reduktion von SOCS3 führt und welche weiteren Folgen dieses für die Effektorfunktionen (Aktivierung, Produktion von Effektorzytokinen) hat. Außerdem könnten bei der verminderten Funktion der T-Zellen bei der Tuberkulose auch mehrere Ursachen zusammenspielen. Beispielsweise wurde bei Kindern mit aktiver Tuberkulose eine klonale Expansion von CD8⁺ Effektor-T-Zellen beobachtet, die zwar nicht „erschöpft“, aber dennoch nicht in der Lage waren, die Infektion zu kontrollieren. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Spezifität der T-Zellen gegen ein Antigen gerichtet war, dass für die Kontrolle der Infektion nicht relevant war [83].

5.6 Ausblick

Bisher gibt es nur wenige Studien zur Regulation von humanen T-Zellen durch SOCS Moleküle. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen Unterschiede zwischen humanen und murinen Zellen bei der T-Zell Polarisierung nahe, die in zukünftigen Studien genauer charakterisiert werden sollten. Hierfür könnte der zugrunde liegende Regulationsmechanismus für die SOCS3-abhängige T_H17 Polarisierung z. B. durch Analyse der Haupt-Transkriptionsfaktoren (T-bet, GATA3 und ROR γ t) nach SOCS3 Überexpression sowie die Identifizierung des entscheidenden Signalweges für die Induktion der T_H17 Zellen untersucht werden. Es wäre interessant zu untersuchen, ob es sich bei der SOCS3 Variante, die im Westernblot nachgewiesen wurde, tatsächlich um die stressinduzierte Variante handelt [105] und was dieses Protein für einen Einfluss auf die T-Zell Aktivierung und Polarisierung hat. Um sich der Frage zu nähern, wie die erhöhte SOCS3 Expression in Tuberkulose-Patienten die T-Zell-Antwort beeinflusst, könnte der Einfluss von SOCS3 auf die T-Zell Aktivierung und Polarisierung von Tuberkulose-Patienten mit Hilfe der SOCS3 Transduktion untersucht werden. Vielleicht kann hier im Vergleich zu Zellen von gesunden Spendern ein differentieller Mechanismus identifiziert werden, der Hinweise auf die Ursache der erhöhten SOCS3 Expression gibt.

6 Anhang

6.1 Nukleotidsequenz humanes SOCS3, mRNA (NM_003955)

ATG GTC ACC CAC AGC AAG TTT CCC GCC GCC GGG ATG AGC CGC CCC CTG GAC
ACC AGC CTG CGC CTC AAG ACC TTC AGC TCC AAG AGC GAG TAC CAG CTG GTG
GTG AAC GCA GTG CGC AAG CTG CAG GAG AGC GGC TTC TAC TGG AGC GCA GTG
ACC GGC GGC GAG GCG AAC CTG CTG CTC AGT GCC GAG CCC GCC GGC ACC TTT
CTG ATC CGC GAC AGC TCG GAC CAG CGC CAC TTC TTC ACG CTC AGC GTC AAG
ACC CAG TCT GGG ACC AAG AAC CTG CGC ATC CAG TGT GAG GGG GGC AGC TTC
TCT CTG CAG AGC GAT CCC CGG AGC ACG CAG CCC GTG CCC CGC TTC GAC TGC
GTG CTC AAG CTG GTG CAC CAC TAC ATG CCG CCC CCT GGA GCC CCC TCC TTC
CCC TCG CCA CCT ACT GAA CCC TCC TCC GAG GTG CCC GAG CAG CCG TCT GCC
CAG CCA CTC CCT GGG AGT CCC CCC AGA AGA GCC TAT TAC ATC TAC TCC GGG
GGC GAG AAG ATC CCC CTG GTG TTG AGC CGG CCC CTC TCC TCC AAC GTG GCC
ACT CTT CAG CAT CTC TGT CGG AAG ACC GTC AAC GGC CAC CTG GAC TCC TAT
GAG AAA GTC ACC CAG CTG CCG GGG CCC ATT CGG GAG TTC CTG GAC CAG TAC
GAT GCC CCG CTT TAG

Abbildungsverzeichnis

1.1	Differenzierung von CD4 ⁺ T-Zellen.	3
1.2	Der JAK/STAT Signalweg.	5
1.3	Einfluss von STAT-Molekülen auf die Differenzierung von CD4 ⁺ T-Zellen. . .	6
1.4	Schematische Struktur der SOCS Proteine.	7
1.5	Einfluss von SOCS3 auf die Differenzierung von CD4 ⁺ T-Zellen.	8
1.6	Immunantwort bei der Infektion mit <i>M. tuberculosis</i>	11
3.1	Schematische Darstellung der lentiviralen Transduktion.	34
3.2	Schematische Darstellung von LeGO-iG2-SOCS3 und LeGO-G2.	35
3.3	Schematische Darstellung der Klonierung von shRNAs aus pLKO in LeGO-G. .	36
3.4	Vektorkarten von pLKO und LeGO-G.	38
4.1	Spezifische Detektion des SOCS3 Proteins in humanen Lymphozyten mittels Durchflusszytometrie.	46
4.2	<i>Ex vivo</i> SOCS3 Expression in T-Zell Subpopulationen.	47
4.3	SOCS3 Expression nach T-Zell-Rezeptor-spezifischer <i>in vitro</i> Stimulation. . .	49
4.4	SOCS3 Regulation in PPD-spezifischen T-Zellen nach Koinkubation mit BCG- infizierten Makrophagen.	50
4.5	SOCS3 Expression in IFN γ -, IL-2- und TNF α -produzierenden CD4 ⁺ T-Zellen. .	51
4.6	Zytokinprofil von sechs exemplarischen CD4 ⁺ CD161 ⁺ T-Zell Klonen.	53
4.7	SOCS3 Expression in T-Zell Klonen mit distinktem Zytokinprofil.	54
4.8	SOCS3 Expression in T _H 17 Vorläuferzellen.	55
4.9	Effizienz lentiviraler Transduktion von CD4 ⁺ T-Zellen mit verschiedenen Vi- ruskonzentrationen.	56
4.10	Vergleich von Retronektin- und Spin-Infektion zur Transduktion von CD4 ⁺ T-Zellen.	57
4.11	Test verschiedener Bedingungen für die Vorstimulation von CD4 ⁺ T-Zellen zur lentiviralen Transduktion.	58
4.12	Überexpression von SOCS3 in CD4 ⁺ T-Zellen mittels lentiviraler Transduktion. .	59
4.13	Transduktionseffizienz nach SOCS3 Transduktion im Zeitverlauf.	60
4.14	Proliferation von CD4 ⁺ T-Zellen nach Überexpression von SOCS3.	61
4.15	Analyse der Apoptose nach Überexpression von SOCS3.	62

4.16	CD40L Expression von CD4 ⁺ T-Zellen nach Überexpression von SOCS3. . . .	63
4.17	Analyse der Zytokinexpression von CD4 ⁺ T-Zellen nach Überexpression von SOCS3 mittels intrazellulärer Zytokinfärbung.	64
4.18	Analyse der Zytokinexpression von CD4 ⁺ T-Zellen nach Überexpression von SOCS3 mittels CBA.	65
4.19	Phosphorylierung von STAT-Molekülen nach Überexpression von SOCS3. . .	66
4.20	Effizienz der Transduktion von fünf SOCS3-spezifischen shRNAs.	66
4.21	Einfluss von IL-7 auf die Viabilität und Morphologie von CD4 ⁺ T-Zellen. . . .	68
4.22	Einfluss von IL-7 auf die SOCS3-Expression von CD4 ⁺ T-Zellen.	69
4.23	Einfluss von IL-7 auf die Proliferation von CD4 ⁺ T-Zellen nach Überexpression von SOCS3.	70
4.24	Einfluss von IL-7 auf Zellgröße und Granularität von CD4 ⁺ T-Zellen nach Überexpression von SOCS3.	70

Literaturverzeichnis

- [1] PAUL, W.E. und SEDER, R.A. *Lymphocyte responses and cytokines*. Cell 76(2):241–51, **1994**
- [2] SAKAGUCHI, S. *Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance*. Cell 101(5):455–8, **2000**
- [3] HARTY, J.T., TVINNEREIM, A.R. und WHITE, D.W. *CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection*. Annu Rev Immunol 18:275–308, **2000**
- [4] DOHERTY, P.C. und ZINKERNAGEL, R.M. *H-2 compatibility is required for T-cell-mediated lysis of target cells infected with lymphocytic choriomeningitis virus*. J Exp Med 141(2):502–7, **1975**
- [5] BRYANT, P.W., LENNON-DUMÉNIL, A.M., FIEBIGER, E., LAGAUDRIÈRE-GESBERT, C. und PLOEGH, H.L. *Proteolysis and antigen presentation by MHC class II molecules*. Adv Immunol 80:71–114, **2002**
- [6] KLOETZEL, P.M. *The proteasome and MHC class I antigen processing*. Biochim Biophys Acta 1695(1-3):225–33, **2004**
- [7] HATHCOCK, K.S., LASZLO, G., PUCILLO, C., LINSLEY, P. und HODES, R.J. *Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: expression and function*. J Exp Med 180(2):631–40, **1994**
- [8] LENSCHOW, D.J., WALUNAS, T.L. und BLUESTONE, J.A. *CD28/B7 system of T cell costimulation*. Annu Rev Immunol 14:233–58, **1996**
- [9] SCHORLE, H., HOLTSCHKE, T., HÜNIG, T., SCHIMPL, A. und HORAK, I. *Development and function of T cells in mice rendered interleukin-2 deficient by gene targeting*. Nature 352(6336):621–4, **1991**
- [10] SAGERSTRÖM, C.G., KERR, E.M., ALLISON, J.P. und DAVIS, M.M. *Activation and differentiation requirements of primary T cells in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A 90(19):8987–91, **1993**
- [11] GREWAL, I.S. und FLAVELL, R.A. *CD40 and CD154 in cell-mediated immunity*. Annu Rev Immunol 16:111–35, **1998**
- [12] SEDER, R.A. und AHMED, R. *Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector and memory T cell generation*. Nat Immunol 4(9):835–42, **2003**
- [13] WATERHOUSE, P., MARENGÈRE, L.E., MITTRÜCKER, H.W. und MAK, T.W. *CTLA-4, a negative regulator of T-lymphocyte activation*. Immunol Rev 153:183–207, **1996**
- [14] BARBER, D.L., MAYER-BARBER, K.D., FENG, C.G., SHARPE, A.H. und SHER, A. *CD4 T cells promote rather than control tuberculosis in the absence of PD-1-mediated inhibition*. J Immunol 186(3):1598–607, **2011**
- [15] ABUL K ABBAS, A.H.L. und PILLAI, S. *Cellular and Molecular Immunology*, Band 6th Edition. Elsevier Inc., **2007**
- [16] HARRINGTON, L.E., HATTON, R.D., MANGAN, P.R., TURNER, H., MURPHY, T.L., MURPHY, K.M. und WEAVER, C.T. *Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages*. Nat Immunol 6(11):1123–32, **2005**

- [17] PARK, H., LI, Z., YANG, X.O., CHANG, S.H., NURIEVA, R., WANG, Y.H., WANG, Y., HOOD, L., ZHU, Z., TIAN, Q. und DONG, C. *A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17*. Nat Immunol 6(11):1133–41, **2005**
- [18] HAPPEL, K.I., DUBIN, P.J., ZHENG, M., GHILARDI, N., LOCKHART, C., QUINTON, L.J., ODDEN, A.R., SHELLITO, J.E., BAGBY, G.J., NELSON, S. und KOLLS, J.K. *Divergent roles of IL-23 and IL-12 in host defense against Klebsiella pneumoniae*. J Exp Med 202(6):761–9, **2005**
- [19] AUJLA, S.J., CHAN, Y.R., ZHENG, M., FEI, M., ASKEW, D.J., POCIASK, D.A., REINHART, T.A., MCALLISTER, F., EDEAL, J., GAUS, K., HUSAIN, S., KREINDLER, J.L., DUBIN, P.J., PILEWSKI, J.M., MYERBURG, M.M., MASON, C.A., IWAKURA, Y. und KOLLS, J.K. *IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia*. Nat Med 14(3):275–81, **2008**
- [20] WEAVER, C.T., HARRINGTON, L.E., MANGAN, P.R., GAVRIELI, M. und MURPHY, K.M. *Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties*. Immunity 24(6):677–88, **2006**
- [21] COSMI, L., DE PALMA, R., SANTARLASCI, V., MAGGI, L., CAPONE, M., FROSALI, F., RODOLICO, G., QUERCI, V., ABBATE, G., ANGELI, R., BERRINO, L., FAMBRINI, M., CAPRONI, M., TONELLI, F., LAZZERI, E., PARRONCHI, P., LIOTTA, F., MAGGI, E., ROMAGNANI, S. und ANNUNZIATO, F. *Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161+CD4+ T cell precursor*. J Exp Med 205(8):1903–16, **2008**
- [22] MANEL, N., UNUTMAZ, D. und LITTMAN, D.R. *The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgamma*. Nat Immunol 9(6):641–9, **2008**
- [23] VOLPE, E., SERVANT, N., ZOLLINGER, R., BOGIATZI, S.I., HUPÉ, P., BARILLOT, E. und SOUMELIS, V. *A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses*. Nat Immunol 9(6):650–7, **2008**
- [24] PALMER, D.C. und RESTIFO, N.P. *Suppressors of cytokine signaling (SOCS) in T cell differentiation, maturation, and function*. Trends Immunol 30(12):592–602, **2009**
- [25] O'SHEA, J.J., LAHESMAA, R., VAHEDI, G., LAURENCE, A. und KANNO, Y. *Genomic views of STAT function in CD4+ T helper cell differentiation*. Nat Rev Immunol 11(4):239–50, **2011**
- [26] ELO, L.L., JÄRVENPÄÄ, H., TUOMELA, S., RAGHAV, S., AHLFORS, H., LAURILA, K., GUPTA, B., LUND, R.J., TAHVANAINEN, J., HAWKINS, R.D., ORESIC, M., LÄHDESMÄKI, H., RASOOL, O., RAO, K.V., AITTOKALLIO, T. und LAHESMAA, R. *Genome-wide profiling of interleukin-4 and STAT6 transcription factor regulation of human Th2 cell programming*. Immunity 32(6):852–62, **2010**
- [27] CHEN, Z., LUND, R., AITTOKALLIO, T., KOSONEN, M., NEVALAINEN, O. und LAHESMAA, R. *Identification of novel IL-4/Stat6-regulated genes in T lymphocytes*. J Immunol 171(7):3627–35, **2003**
- [28] ZHU, J., COTE-SIERRA, J., GUO, L. und PAUL, W.E. *Stat5 activation plays a critical role in Th2 differentiation*. Immunity 19(5):739–48, **2003**
- [29] HILTON, D.J., RICHARDSON, R.T., ALEXANDER, W.S., VINEY, E.M., WILLSON, T.A., SPRIGG, N.S., STARR, R., NICHOLSON, S.E., METCALF, D. und NICOLA, N.A. *Twenty proteins containing a C-terminal SOCS box form five structural classes*. Proc Natl Acad Sci U S A 95(1):114–9, **1998**
- [30] DIMITRIOU, I.D., CLEMENZA, L., SCOTTER, A.J., CHEN, G., GUERRA, F.M. und ROTTAPEL, R. *Putting out the fire: coordinated suppression of the innate and adaptive immune systems by SOCS1 and SOCS3 proteins*. Immunol Rev 224:265–83, **2008**

- [31] RAM, P.A. und WAXMAN, D.J. *SOCS/CIS protein inhibition of growth hormone-stimulated STAT5 signaling by multiple mechanisms.* J Biol Chem 274(50):35553–61, **1999**
- [32] NICHOLSON, S.E., DE SOUZA, D., FABRI, L.J., CORBIN, J., WILLSON, T.A., ZHANG, J.G., SILVA, A., ASIMAKIS, M., FARLEY, A., NASH, A.D., METCALF, D., HILTON, D.J., NICOLA, N.A. und BACA, M. *Suppressor of cytokine signaling-3 preferentially binds to the SHP-2-binding site on the shared cytokine receptor subunit gp130.* Proc Natl Acad Sci U S A 97(12):6493–8, **2000**
- [33] SASAKI, A., YASUKAWA, H., SUZUKI, A., KAMIZONO, S., SYODA, T., KINJYO, I., SASAKI, M., JOHNSTON, J.A. und YOSHIMURA, A. *Cytokine-inducible SH2 protein-3 (CIS3/SOCS3) inhibits Janus tyrosine kinase by binding through the N-terminal kinase inhibitory region as well as SH2 domain.* Genes Cells 4(6):339–51, **1999**
- [34] YASUKAWA, H., MISAWA, H., SAKAMOTO, H., MASUHARA, M., SASAKI, A., WAKIOKA, T., OHTSUKA, S., IMAIZUMI, T., MATSUDA, T., IHLE, J.N. und YOSHIMURA, A. *The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop.* EMBO J 18(5):1309–20, **1999**
- [35] CALLUS, B.A. und MATHEY-PREVOT, B. *Interleukin-3-induced activation of the JAK/STAT pathway is prolonged by proteasome inhibitors.* Blood 91(9):3182–92, **1998**
- [36] ROBERTS, A.W., ROBB, L., RAKAR, S., HARTLEY, L., CLUSE, L., NICOLA, N.A., METCALF, D., HILTON, D.J. und ALEXANDER, W.S. *Placental defects and embryonic lethality in mice lacking suppressor of cytokine signaling 3.* Proc Natl Acad Sci U S A 98(16):9324–9, **2001**
- [37] MARINE, J.C., TOPHAM, D.J., MCKAY, C., WANG, D., PARGANAS, E., STRAVOPODIS, D., YOSHIMURA, A. und IHLE, J.N. *SOCS1 deficiency causes a lymphocyte-dependent perinatal lethality.* Cell 98(5):609–16, **1999**
- [38] SCHMITZ, J., WEISSENBACH, M., HAAN, S., HEINRICH, P.C. und SCHAPER, F. *SOCS3 exerts its inhibitory function on interleukin-6 signal transduction through the SHP2 recruitment site of gp130.* J Biol Chem 275(17):12848–56, **2000**
- [39] YASUKAWA, H., OHISHI, M., MORI, H., MURAKAMI, M., CHINEN, T., AKI, D., HANADA, T., TAKEDA, K., AKIRA, S., HOSHIJIMA, M., HIRANO, T., CHIEN, K.R. und YOSHIMURA, A. *IL-6 induces an anti-inflammatory response in the absence of SOCS3 in macrophages.* Nat Immunol 4(6):551–6, **2003**
- [40] YU, C.R., MAHDI, R.M., EBONG, S., VISTICA, B.P., GERY, I. und EGWUAGU, C.E. *Suppressor of cytokine signaling 3 regulates proliferation and activation of T-helper cells.* J Biol Chem 278(32):29752–9, **2003**
- [41] BANERJEE, A., BANKS, A.S., NAWIJN, M.C., CHEN, X.P. und ROTHMAN, P.B. *Cutting edge: Suppressor of cytokine signaling 3 inhibits activation of NFATp.* J Immunol 168(9):4277–81, **2002**
- [42] MATSUMOTO, A., SEKI, Y.I., WATANABE, R., HAYASHI, K., JOHNSTON, J.A., HARADA, Y., ABE, R., YOSHIMURA, A. und KUBO, M. *A role of suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3/CIS3/SSI3) in CD28-mediated interleukin 2 production.* J Exp Med 197(4):425–36, **2003**
- [43] SEKI, Y.I., INOUE, H., NAGATA, N., HAYASHI, K., FUKUYAMA, S., MATSUMOTO, K., KOMINE, O., HAMANO, S., HIMENO, K., INAGAKI-OHARA, K., CACALANO, N., O'GARRA, A., OSHIDA, T., SAITO, H., JOHNSTON, J.A., YOSHIMURA, A. und KUBO, M. *SOCS-3 regulates onset and maintenance of T(H)2-mediated allergic responses.* Nat Med 9(8):1047–54, **2003**
- [44] CHEN, Z., LAURENCE, A., KANNO, Y., PACHER-ZAVISIN, M., ZHU, B.M., TATO, C., YOSHIMURA, A., HENNIGHAUSEN, L. und O'SHEA, J.J. *Selective regulatory function of Socs3 in the formation of IL-17-secreting T cells.* Proc Natl Acad Sci U S A 103(21):8137–42, **2006**

- [45] KAGAMI, S.I., OWADA, T., KANARI, H., SAITO, Y., SUTO, A., IKEDA, K., HIROSE, K., WATANABE, N., IWAMOTO, I. und NAKAJIMA, H. *Protein geranylgeranylation regulates the balance between Th17 cells and Foxp3+ regulatory T cells.* *Int Immunol* 21(6):679–89, **2009**
- [46] QIN, H., WANG, L., FENG, T., ELSON, C.O., NIYONGERE, S.A., LEE, S.J., REYNOLDS, S.L., WEAVER, C.T., ROARTY, K., SERRA, R., BENVENISTE, E.N. und CONG, Y. *TGF-beta promotes Th17 cell development through inhibition of SOCS3.* *J Immunol* 183(1):97–105, **2009**
- [47] EGWUAGU, C.E., YU, C.R., ZHANG, M., MAHDI, R.M., KIM, S.J. und GERY, I. *Suppressors of cytokine signaling proteins are differentially expressed in Th1 and Th2 cells: implications for Th cell lineage commitment and maintenance.* *J Immunol* 168(7):3181–7, **2002**
- [48] BRENDER, C., LOVATO, P., SOMMER, V.H., WOETMANN, A., MATHIESEN, A.M., GEISLER, C., WASIK, M. und ØDUM, N. *Constitutive SOCS-3 expression protects T-cell lymphoma against growth inhibition by IFNalpha.* *Leukemia* 19(2):209–13, **2005**
- [49] PELLEGRINI, M., CALZASCIA, T., TOE, J.G., PRESTON, S.P., LIN, A.E., ELFORD, A.R., SHAHINIAN, A., LANG, P.A., LANG, K.S., MORRE, M., ASSOULINE, B., LAHL, K., SPARWASSER, T., TEDDER, T.F., PAIK, J.H., DEPINHO, R.A., BASTA, S., OHASHI, P.S. und MAK, T.W. *IL-7 engages multiple mechanisms to overcome chronic viral infection and limit organ pathology.* *Cell* 144(4):601–13, **2011**
- [50] FLYNN, J.L. und CHAN, J. *Immunology of tuberculosis.* *Annu Rev Immunol* 19:93–129, **2001**
- [51] CALMETTE, A. *Preventive Vaccination Against Tuberculosis with BCG.* *Proc R Soc Med* 24(11):1481–90, **1931**
- [52] TRUNZ, B.B., FINE, P. und DYE, C. *Effect of BCG vaccination on childhood tuberculous meningitis and miliary tuberculosis worldwide: a meta-analysis and assessment of cost-effectiveness.* *Lancet* 367(9517):1173–80, **2006**
- [53] BOEHME, C.C., NABETA, P., HILLEMANN, D., NICOL, M.P., SHENAI, S., KRAPP, F., ALLEN, J., TAHIRLI, R., BLAKEMORE, R., RUSTOMJEE, R., MILOVIC, A., JONES, M., O'BRIEN, S.M., PERSING, D.H., RUESCHGERDES, S., GOTUZZO, E., RODRIGUES, C., ALLAND, D. und PERKINS, M.D. *Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance.* *N Engl J Med* 363(11):1005–15, **2010**
- [54] ARMSTRONG, J.A. und HART, P.D. *Response of cultured macrophages to Mycobacterium tuberculosis, with observations on fusion of lysosomes with phagosomes.* *J Exp Med* 134(3 Pt 1):713–40, **1971**
- [55] FLESCHE, I. und KAUFMANN, S.H. *Mycobacterial growth inhibition by interferon-gamma-activated bone marrow macrophages and differential susceptibility among strains of Mycobacterium tuberculosis.* *J Immunol* 138(12):4408–13, **1987**
- [56] COOPER, A.M., DALTON, D.K., STEWART, T.A., GRIFFIN, J.P., RUSSELL, D.G. und ORME, I.M. *Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice.* *J Exp Med* 178(6):2243–7, **1993**
- [57] FLYNN, J.L., CHAN, J., TRIEBOLD, K.J., DALTON, D.K., STEWART, T.A. und BLOOM, B.R. *An essential role for interferon gamma in resistance to Mycobacterium tuberculosis infection.* *J Exp Med* 178(6):2249–54, **1993**
- [58] OTTENHOFF, T.H.M., DE BOER, T., VAN DISSEL, J.T. und VERRECK, F.A.W. *Human deficiencies in type-1 cytokine receptors reveal the essential role of type-1 cytokines in immunity to intracellular bacteria.* *Adv Exp Med Biol* 531:279–94, **2003**
- [59] BONECINI-ALMEIDA, M.G., CHITALE, S., BOUTSIKAKIS, I., GENG, J., DOO, H., HE, S. und HO, J.L.

- Induction of in vitro human macrophage anti-Mycobacterium tuberculosis activity: requirement for IFN-gamma and primed lymphocytes.* J Immunol 160(9):4490–9, 1998
- [60] FLYNN, J.L., GOLDSTEIN, M.M., CHAN, J., TRIEBOLD, K.J., PFEFFER, K., LOWENSTEIN, C.J., SCHREIBER, R., MAK, T.W. und BLOOM, B.R. *Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against Mycobacterium tuberculosis in mice.* Immunity 2(6):561–72, 1995
- [61] IMAI, K., KURITA-OCHIAI, T. und OCHIAI, K. *Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin infection promotes SOCS induction and inhibits IFN-gamma-stimulated JAK/STAT signaling in J774 macrophages.* FEMS Immunol Med Microbiol 39(2):173–80, 2003
- [62] WALZL, G., RONACHER, K., HANEKOM, W., SCRIBA, T.J. und ZUMLA, A. *Immunological biomarkers of tuberculosis.* Nat Rev Immunol 11(5):343–54, 2011
- [63] SELWYN, P.A., HARTEL, D., LEWIS, V.A., SCHOENBAUM, E.E., VERMUND, S.H., KLEIN, R.S., WALKER, A.T. und FRIEDLAND, G.H. *A prospective study of the risk of tuberculosis among intravenous drug users with human immunodeficiency virus infection.* N Engl J Med 320(9):545–50, 1989
- [64] WHO, W.H.O. *Global Tuberculosis Control 2011.* World Health Organization WHO, 2011
- [65] GELDMACHER, C., NGWENYAMA, N., SCHUETZ, A., PETROVAS, C., REITHER, K., HEEREGRAVE, E.J., CASAZZA, J.P., AMBROZAK, D.R., LOUDER, M., AMPOFO, W., POLLAKIS, G., HILL, B., SANGA, E., SAATHOFF, E., MABOKO, L., ROEDERER, M., PAXTON, W.A., HOELSCHER, M. und KOUP, R.A. *Preferential infection and depletion of Mycobacterium tuberculosis-specific CD4 T cells after HIV-1 infection.* J Exp Med 207(13):2869–81, 2010
- [66] SANO, K., HANEDA, K., TAMURA, G. und SHIRATO, K. *Ovalbumin (OVA) and Mycobacterium tuberculosis bacilli cooperatively polarize anti-OVA T-helper (Th) cells toward a Th1-dominant phenotype and ameliorate murine tracheal eosinophilia.* Am J Respir Cell Mol Biol 20(6):1260–7, 1999
- [67] WILKINSON, K.A. und WILKINSON, R.J. *Polyfunctional T cells in human tuberculosis.* Eur J Immunol 40(8):2139–42, 2010
- [68] CACCAMO, N., GUGGINO, G., JOOSTEN, S.A., GELSOMINO, G., DI CARLO, P., TITONE, L., GALATI, D., BOCCHINO, M., MATARESE, A., SALERNO, A., SANDUZZI, A., FRANKEN, W.P.J., OTTENHOFF, T.H.M. und DIELI, F. *Multifunctional CD4(+) T cells correlate with active Mycobacterium tuberculosis infection.* Eur J Immunol 40(8):2211–20, 2010
- [69] DAY, C.L., ABRAHAMS, D.A., LERUMO, L., JANSE VAN RENSBURG, E., STONE, L., O'RIE, T., PIENAAR, B., DE KOCK, M., KAPLAN, G., MAHOMED, H., DHEDA, K. und HANEKOM, W.A. *Functional capacity of Mycobacterium tuberculosis-specific T cell responses in humans is associated with mycobacterial load.* J Immunol 187(5):2222–32, 2011
- [70] MUELLER, H., DETJEN, A.K., SCHUCK, S.D., GUTSCHMIDT, A., WAHN, U., MAGDORF, K., KAUFMANN, S.H.E. und JACOBSEN, M. *Mycobacterium tuberculosis-specific CD4+, IFNgamma+, and TNFalpha+ multifunctional memory T cells coexpress GM-CSF.* Cytokine 43(2):143–8, 2008
- [71] FLYNN, J.L., GOLDSTEIN, M.M., TRIEBOLD, K.J., KOLLER, B. und BLOOM, B.R. *Major histocompatibility complex class I-restricted T cells are required for resistance to Mycobacterium tuberculosis infection.* Proc Natl Acad Sci U S A 89(24):12013–7, 1992
- [72] SOUSA, A.O., MAZZACCARO, R.J., RUSSELL, R.G., LEE, F.K., TURNER, O.C., HONG, S., VAN KAER, L. und BLOOM, B.R. *Relative contributions of distinct MHC class I-dependent cell populations in protection to tuberculosis infection in mice.* Proc Natl Acad Sci U S A 97(8):4204–8, 2000

- [73] HAGEDORN, M., ROHDE, K.H., RUSSELL, D.G. und SOLDATI, T. *Infection by tubercular mycobacteria is spread by nonlytic ejection from their amoeba hosts*. *Science* 323(5922):1729–33, **2009**
- [74] VAN DER WEL, N., HAVA, D., HOUBEN, D., FLUITSMA, D., VAN ZON, M., PIERSON, J., BRENNER, M. und PETERS, P.J. *M. tuberculosis and M. leprae translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells*. *Cell* 129(7):1287–98, **2007**
- [75] BARNES, P.F., ABRAMS, J.S., LU, S., SIELING, P.A., REA, T.H. und MODLIN, R.L. *Patterns of cytokine production by mycobacterium-reactive human T-cell clones*. *Infect Immun* 61(1):197–203, **1993**
- [76] SERBINA, N.V. und FLYNN, J.L. *Early emergence of CD8(+) T cells primed for production of type 1 cytokines in the lungs of Mycobacterium tuberculosis-infected mice*. *Infect Immun* 67(8):3980–8, **1999**
- [77] CHO, S., MEHRA, V., THOMA-USZYNSKI, S., STENGER, S., SERBINA, N., MAZZACCARO, R.J., FLYNN, J.L., BARNES, P.F., SOUTHWOOD, S., CELIS, E., BLOOM, B.R., MODLIN, R.L. und SETTE, A. *Antimicrobial activity of MHC class I-restricted CD8+ T cells in human tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(22):12210–5, **2000**
- [78] DORHOI, A., REECE, S.T. und KAUFMANN, S.H.E. *For better or for worse: the immune response against Mycobacterium tuberculosis balances pathology and protection*. *Immunol Rev* 240(1):235–51, **2011**
- [79] ZAJAC, A.J., BLATTMAN, J.N., MURALI-KRISHNA, K., SOURDIVE, D.J., SURESH, M., ALTMAN, J.D. und AHMED, R. *Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function*. *J Exp Med* 188(12):2205–13, **1998**
- [80] GALLIMORE, A., GLITHERO, A., GODKIN, A., TISSOT, A.C., PLÜCKTHUN, A., ELLIOTT, T., HENGARTNER, H. und ZINKERNAGEL, R. *Induction and exhaustion of lymphocytic choriomeningitis virus-specific cytotoxic T lymphocytes visualized using soluble tetrameric major histocompatibility complex class I-peptide complexes*. *J Exp Med* 187(9):1383–93, **1998**
- [81] WHERRY, E.J. und AHMED, R. *Memory CD8 T-cell differentiation during viral infection*. *J Virol* 78(11):5535–45, **2004**
- [82] VIRGIN, H.W., WHERRY, E.J. und AHMED, R. *Redefining chronic viral infection*. *Cell* 138(1):30–50, **2009**
- [83] JACOBSEN, M., DETJEN, A.K., MUELLER, H., GUTSCHMIDT, A., LEITNER, S., WAHN, U., MAGDORE, K. und KAUFMANN, S.H.E. *Clonal expansion of CD8+ effector T cells in childhood tuberculosis*. *J Immunol* 179(2):1331–9, **2007**
- [84] ANDERSSON, J., SAMARINA, A., FINK, J., RAHMAN, S. und GRUNDSTRÖM, S. *Impaired expression of perforin and granulysin in CD8+ T cells at the site of infection in human chronic pulmonary tuberculosis*. *Infect Immun* 75(11):5210–22, **2007**
- [85] SCHWARTZ, R.H. *A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy*. *Science* 248(4961):1349–56, **1990**
- [86] WHERRY, E.J., HA, S.J., KAECH, S.M., HAINING, W.N., SARKAR, S., KALIA, V., SUBRAMANIAM, S., BLATTMAN, J.N., BARBER, D.L. und AHMED, R. *Molecular signature of CD8+ T cell exhaustion during chronic viral infection*. *Immunity* 27(4):670–84, **2007**
- [87] WHERRY, E.J. *T cell exhaustion*. *Nat Immunol* 12(6):492–9, **2011**
- [88] MOSKOPHIDIS, D., LECHNER, F., PIRCHER, H. und ZINKERNAGEL, R.M. *Virus persistence in acutely infected immunocompetent mice by exhaustion of antiviral cytotoxic effector T cells*. *Nature* 362(6422):758–61, **1993**
- [89] WHERRY, E.J., BLATTMAN, J.N., MURALI-KRISHNA, K., VAN DER MOST, R. und AHMED, R. *Viral*

- persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment.* J Virol 77(8):4911–27, 2003
- [90] BARBER, D.L., WHERRY, E.J., MASOPUST, D., ZHU, B., ALLISON, J.P., SHARPE, A.H., FREEMAN, G.J. und AHMED, R. *Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection.* Nature 439(7077):682–7, 2006
- [91] BROOKS, D.G., TEYTON, L., OLDSTONE, M.B.A. und MCGAVERN, D.B. *Intrinsic functional dysregulation of CD4 T cells occurs rapidly following persistent viral infection.* J Virol 79(16):10514–27, 2005
- [92] KAUFMANN, D.E., KAVANAGH, D.G., PEREYRA, F., ZAUNDERS, J.J., MACKEY, E.W., MIURA, T., PALMER, S., BROCKMAN, M., RATHOD, A., PIECHOCKA-TROCHA, A., BAKER, B., ZHU, B., LE GALL, S., WARING, M.T., AHERN, R., MOSS, K., KELLEHER, A.D., COFFIN, J.M., FREEMAN, G.J., ROSENBERG, E.S. und WALKER, B.D. *Upregulation of CTLA-4 by HIV-specific CD4+ T cells correlates with disease progression and defines a reversible immune dysfunction.* Nat Immunol 8(11):1246–54, 2007
- [93] JACOBSEN, M., REPSILBER, D., KLEINSTEUBER, K., GUTSCHMIDT, A., SCHOMMER-LEITNER, S., BLACK, G., WALZL, G. und KAUFMANN, S.H.E. *Suppressor of cytokine signaling-3 is affected in T-cells from tuberculosis TB patients.* Clin Microbiol Infect 17(9):1323–31, 2011
- [94] MISTRY, R., CLIFF, J.M., CLAYTON, C.L., BEYERS, N., MOHAMED, Y.S., WILSON, P.A., DOCKRELL, H.M., WALLACE, D.M., VAN HELDEN, P.D., DUNCAN, K. und LUKEY, P.T. *Gene-expression patterns in whole blood identify subjects at risk for recurrent tuberculosis.* J Infect Dis 195(3):357–65, 2007
- [95] WEBER, K., BARTSCH, U., STOCKING, C. und FEHSE, B. *A multicolor panel of novel lentiviral "gene ontology"(LeGO) vectors for functional gene analysis.* Mol Ther 16(4):698–706, 2008
- [96] FEHSE, B., KUSTIKOVA, O.S., BUBENHEIM, M. und BAUM, C. *Pois(s)on—it's a question of dose..* Gene Ther 11(11):879–81, 2004
- [97] OWAKI, T., ASAKAWA, M., KAMIYA, S., TAKEDA, K., FUKAI, F., MIZUGUCHI, J. und YOSHIMOTO, T. *IL-27 suppresses CD28-mediated [correction of medicated] IL-2 production through suppressor of cytokine signaling 3.* J Immunol 176(5):2773–80, 2006
- [98] CROKER, B.A., KREBS, D.L., ZHANG, J.G., WORMALD, S., WILLSON, T.A., STANLEY, E.G., ROBB, L., GREENHALGH, C.J., FÖRSTER, I., CLAUSEN, B.E., NICOLA, N.A., METCALF, D., HILTON, D.J., ROBERTS, A.W. und ALEXANDER, W.S. *SOCS3 negatively regulates IL-6 signaling in vivo.* Nat Immunol 4(6):540–5, 2003
- [99] SERETTI, I., DUNHAM, R.M., SPRITZLER, J., AGA, E., PROSCHAN, M.A., MEDVIK, K., BATTAGLIA, C.A., LANDAY, A.L., PAHWA, S., FISCHL, M.A., ASMUTH, D.M., TENORIO, A.R., ALTMAN, J.D., FOX, L., MOIR, S., MALASPINA, A., MORRE, M., BUFFET, R., SILVESTRI, G., LEDERMAN, M.M. und ACTG 5214 STUDY TEAM. *IL-7 administration drives T cell-cycle entry and expansion in HIV-1 infection.* Blood 113(25):6304–14, 2009
- [100] LEVY, Y., LACABARATZ, C., WEISS, L., VIARD, J.P., GOUJARD, C., LELIÈVRE, J.D., BOUÉ, F., MOLINA, J.M., ROUZIOUX, C., AVETTAND-FÉNOËL, V., CROUGHS, T., BEQ, S., THIÉBAUT, R., CHÊNE, G., MORRE, M. und DELFRAISSY, J.F. *Enhanced T cell recovery in HIV-1-infected adults through IL-7 treatment.* J Clin Invest 119(4):997–1007, 2009
- [101] PILLEMER, B.B.L., XU, H., ORISS, T.B., QI, Z. und RAY, A. *Deficient SOCS3 expression in CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells and SOCS3-mediated suppression of Treg function.* Eur J Immunol 37(8):2082–9, 2007

- [102] ORME, I.M., ROBERTS, A.D., GRIFFIN, J.P. und ABRAMS, J.S. *Cytokine secretion by CD4 T lymphocytes acquired in response to Mycobacterium tuberculosis infection.* J Immunol 151(1):518–25, **1993**
- [103] MÜLLER, I., COBBOLD, S.P., WALDMANN, H. und KAUFMANN, S.H. *Impaired resistance to Mycobacterium tuberculosis infection after selective in vivo depletion of L3T4+ and Lyt-2+ T cells.* Infect Immun 55(9):2037–41, **1987**
- [104] ORME, I.M. und COLLINS, F.M. *Adoptive protection of the Mycobacterium tuberculosis-infected lung. Dissociation between cells that passively transfer protective immunity and those that transfer delayed-type hypersensitivity to tuberculin.* Cell Immunol 84(1):113–20, **1984**
- [105] SASAKI, A., INAGAKI-OHARA, K., YOSHIDA, T., YAMANAKA, A., SASAKI, M., YASUKAWA, H., KOROMILAS, A.E. und YOSHIMURA, A. *The N-terminal truncated isoform of SOCS3 translated from an alternative initiation AUG codon under stress conditions is stable due to the lack of a major ubiquitination site, Lys-6.* J Biol Chem 278(4):2432–6, **2003**
- [106] STARR, R., WILLSON, T.A., VINEY, E.M., MURRAY, L.J., RAYNER, J.R., JENKINS, B.J., GONDA, T.J., ALEXANDER, W.S., METCALF, D., NICOLA, N.A. und HILTON, D.J. *A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling.* Nature 387(6636):917–21, **1997**
- [107] SONG, M.M. und SHUAI, K. *The suppressor of cytokine signaling (SOCS) 1 and SOCS3 but not SOCS2 proteins inhibit interferon-mediated antiviral and antiproliferative activities.* J Biol Chem 273(52):35056–62, **1998**
- [108] LANG, R., PAULEAU, A.L., PARGANAS, E., TAKAHASHI, Y., MAGES, J., IHLE, J.N., RUTSCHMAN, R. und MURRAY, P.J. *SOCS3 regulates the plasticity of gp130 signaling.* Nat Immunol 4(6):546–50, **2003**
- [109] COHNEY, S.J., SANDEN, D., CACALANO, N.A., YOSHIMURA, A., MUI, A., MIGONE, T.S. und JOHNSTON, J.A. *SOCS-3 is tyrosine phosphorylated in response to interleukin-2 and suppresses STAT5 phosphorylation and lymphocyte proliferation.* Mol Cell Biol 19(7):4980–8, **1999**
- [110] STRITESKY, G.L., MUTHUKRISHNAN, R., SEHRA, S., GOSWAMI, R., PHAM, D., TRAVERS, J., NGUYEN, E.T., LEVY, D.E. und KAPLAN, M.H. *The transcription factor STAT3 is required for T helper 2 cell development.* Immunity 34(1):39–49, **2011**
- [111] KRYCZEK, I., ZHAO, E., LIU, Y., WANG, Y., VATAN, L., SZELIGA, W., MOYER, J., KLIMCZAK, A., LANGE, A. und ZOU, W. *Human TH17 cells are long-lived effector memory cells.* Sci Transl Med 3(104):104ra100, **2011**
- [112] MATSUMOTO, A., MASUHARA, M., MITSUI, K., YOKOUCHI, M., OHTSUBO, M., MISAWA, H., MIYAJIMA, A. und YOSHIMURA, A. *CIS, a cytokine inducible SH2 protein, is a target of the JAK-STAT5 pathway and modulates STAT5 activation.* Blood 89(9):3148–54, **1997**
- [113] TANAKA, K., ICHIYAMA, K., HASHIMOTO, M., YOSHIDA, H., TAKIMOTO, T., TAKAESU, G., TORISU, T., HANADA, T., YASUKAWA, H., FUKUYAMA, S., INOUE, H., NAKANISHI, Y., KOBAYASHI, T. und YOSHIMURA, A. *Loss of suppressor of cytokine signaling 1 in helper T cells leads to defective Th17 differentiation by enhancing antagonistic effects of IFN-gamma on STAT3 and Smads.* J Immunol 180(6):3746–56, **2008**
- [114] GALLEGOS, A.M., VAN HEIJST, J.W.J., SAMSTEIN, M., SU, X., PAMER, E.G. und GLICKMAN, M.S. *A gamma interferon independent mechanism of CD4 T cell mediated control of M. tuberculosis infection in vivo.* PLoS Pathog 7(5):e1002052, **2011**
- [115] BAI, H., CHENG, J., GAO, X., JOYEE, A.G., FAN, Y., WANG, S., JIAO, L., YAO, Z. und YANG, X. *IL-17/Th17*

- promotes type 1 T cell immunity against pulmonary intracellular bacterial infection through modulating dendritic cell function.* J Immunol 183(9):5886–95, **2009**
- [116] CACALANO, N.A., SANDEN, D. und JOHNSTON, J.A. *Tyrosine-phosphorylated SOCS-3 inhibits STAT activation but binds to p120 RasGAP and activates Ras.* Nat Cell Biol 3(5):460–5, **2001**
- [117] HAAN, S., FERGUSON, P., SOMMER, U., HIREMATH, M., MCVICAR, D.W., HEINRICH, P.C., JOHNSTON, J.A. und CACALANO, N.A. *Tyrosine phosphorylation disrupts elongin interaction and accelerates SOCS3 degradation.* J Biol Chem 278(34):31972–9, **2003**
- [118] PELTOLA, K.J., PAUKKU, K., AHO, T.L.T., RUUSKA, M., SILVENNOINEN, O. und KOSKINEN, P.J. *Pim-1 kinase inhibits STAT5-dependent transcription via its interactions with SOCS1 and SOCS3.* Blood 103(10):3744–50, **2004**
- [119] CORFE, S.A., ROTTAPPEL, R. und PAIGE, C.J. *Modulation of IL-7 thresholds by SOCS proteins in developing B lineage cells.* J Immunol 187(7):3499–510, **2011**

Danksagung

Ich danke meinen Gutachtern Prof. Bernhard Fleischer und Dr. Minka Breloer. Mein großer Dank gilt Marc Jacobsen, für die Betreuung, anregende Diskussionen und den unermüdlichen Zuspruch, den er manchmal leisten musste.

Für hervorragende Zusammenarbeit, tolles Arbeitsklima und emotionale Grey's Anatomy Abende gilt mein ganz besonderer Dank Stefanie Schattling und Kerrin Heesch. Birte Kretschmer danke ich für viele hilfreiche Vorschläge zur Gestaltung meiner Doktorarbeit.

Claudia Sander-Jülch danke ich für die schönen Sortergebnisse und dafür, dass sie mich immer wieder überraschen kann. Marlis Badusche danke ich für tatkräftige Unterstützung im Labor.

Bei Ulrike Mock möchte ich mich herzlich für die Unterstützung bei der lentiviralen Transduktion bedanken und dass sie immer für alle Fragen ein offenes Ohr hatte.

Ein großes Danke geht an alle Mitarbeiterinnen und die wenigen Mitarbeiter der Abteilung Immunologie, für eine angenehme Atmosphäre und die große Hilfsbereitschaft zu jeder Tages- und Nachtzeit.

Vielen Dank auch an euch: Vanessa Hörniß, Melanie Piedavent, Hendrik Roreger, und ganz besonders Klemens Engelberg.

Ganz zum Schluss geht noch ein großer Dank an meine Eltern, die mich immer unterstützen und an mich glauben und an meinen Großvater, Erich Kleinsteuber, für die Inspiration diesen Weg zu gehen.