Aus der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-, und Thoraxchirurgie
des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
AG Tsui

Direktor der Klinik:
Prof. Dr. med. Prof. h.c. Dr. h.c. Jakob R. Izbicki, FACS, FRCS Ed. Hon.

Einfluss von Hämoxygenase-1 auf die Differenzierung von $CD4^+$ T-Lymphozyten Typ T_H17 und T_{reg}

Dissertation

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

Julian Dutschmann

Hamburg, 2013

meinen Eltern

Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 09.04.2015

Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Tung Yu Tsui

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. Friedrich Thaiss

Inhalt

I EINLEITUNG 6

1. T-Lymphozyten 6

1.1 T-Helfer-Lymphozyten Typ 17 7

1.2 Regulatorische T-Lymphozyten 8

1.3 T-Helfer-Lymphozyten Typ1 und Typ2 9

2. Hämoxygenase 10

2.1 Enzymwirkung von HO-1 10

2.2 HO-1 als immunmodulatorisches Protein 11

3. HO-1 und $CD4^+$-T-Lymphozyten 13

3.1 Fragestellung 13

3.2 Vorgehensweise 14

II MATERIAL&METHODEN 15

1. Material 15

1.1 Mauslinie 15

1.2 Geräte und Einmalprodukte 15

1.3 Chemikalien 17

1.4 Antikörper & Cytokine 18

1.5 Hämoxygenase 19

2. Methoden 21

2.1 Genotypisierung der Versuchstiere durch PCR und Gelelektrophorese 21

2.2 Zellkultur 23

2.3 Überstandsanalyse mit ELISA 29

2.4 Statistik 30

III ERGEBNISSE 31

1. HO-1 Effekt nach Stimulation mit Anti-CD3/28-Antikörpern 31

1.1 IL-17-Produktion 31

1.2 Foxp3/CD25 Expression 33

2. Etablierung der Polarisation in T_H17- und T_{reg}-Richtung 34

2.1 Variation der Cytokinkonzentration 34

2.2 Anwendung des PTD-HO-1 34

3. Effekt von HO-1 auf $CD4^+$-T-Lymphozyten nach Stimulation und Polarisation . 36

3.1 T_H17-Lymphozyten 36

3.2 T_{reg}-Lymphozyten 40

IV DISKUSSION 43
1. Immunmodulatorische Wirkung von HO-1 43
2. Einfluss von HO-1 auf Differenzierung der T-Lymphozyten in T_H17/T_{reg} Richtung 44
2.1 HO-1 verstärkt die Differenzierung naiver T_H0 zu T_H17 44
2.2 HO-1 verstärkt die Differenzierung von T_H0 zu T_{reg} 46
3. Therapeutischer Einsatz von HO-1 48
V ZUSAMMENFASSUNG 50
VI ABKÜRZUNGEN 52
VII LITERATUR 54
VIII DANKSAGUNG 60
IX LEBENSLAUF 61
X EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG 62

I EINLEITUNG

Unser Körper ist täglich einer Vielzahl diverser Moleküle und Mikroorganismen ausgesetzt. Ob über die Luft oder in unserer Nahrung, viele Stoffe gelangen in unseren Körper und rufen die unterschiedlichsten Reaktionen hervor. Die Immunologie befasst sich nun mit der körpereigenen Abwehr und der Fähigkeit bei einer Vielzahl von Antigenen, Nützliche von Gefährlichen zu unterscheiden. Im besten Fall unterscheidet diese zwischen fremd und eigen, sowie zwischen gut und böse, und isoliert oder eliminiert verdächtige Moleküle.

1. T-Lymphozyten

Das Immunsystem des Menschen setzt sich aus angeborener und erworbener Immunität zusammen. Zellulärer Bestandteil der erworbenen oder auch als spezifisch bezeichneten Immunität sind unter anderem die im Thymus reifenden und daher T-Lymphozyten genannten Zellen. Diese T-Lymphozyten können entsprechend ihrer charakteristischen Oberflächenrezeptoren weiterhin in $CD4^+$-T-Lymphozyten und $CD8^+$-T-Lymphozyten unterteilt werden. Während die $CD8^+$-T-Lymphozyten eine Zellgruppe umschreiben, die auch Killer-Zellen genannt werden, da sie befallene Zellen zerstören, beschreibt der Begriff $CD4^+$-T-Lymphozyten die Gruppe der sogenannten T-Helfer(T_H)-Lymphozyten. Untergruppen dieser $CD4^+$-T-Lymphozyten spielen eine entscheidende Rolle in der Regulierung der Immunabwehr. Im Groben wird hierbei zwischen regulatorischen, immunsupprimierenden T-Lymphozyten (T_{reg}) und Effektor T-Lymphozyten (T_H1, T_H2, T_H17) unterschieden (Gajewski et al. 1989; Zhu & Paul 2010). Eine genaue Einteilung der Zellen in einzelne Untergruppen ist jedoch noch nicht vollständig geklärt. Hierbei ist nicht klar, ob und wieviele weitere Zelllinien vorhanden sind, da strittig ist, inwieweit Cytokinproduktion von einzelnen Zellen bzw. Zellen in verschiedenen Reifezuständen variiert werden kann. Alle Linien werden über ihre Oberflächenmoleküle und die Art ihrer Zytokinproduktion definiert, wobei diese jedoch nicht starr ist, sondern unter spezifischen Bedingungen wechselt, und daher bei einigen Linien zumindest im Frühstadium von einer „Plastizität“ der T-Lymphozyten ausgegangen werden muss (O’Shea & Paul 2010; L. Zhou et al. 2009). Die Reifung und Differenzierung der $CD4^+$-T-Lymphozyten ist ein komplexer Vorgang, der durch das Einwirken von Zytokinen determiniert wird und hierdurch ebenso beeinflusst werden kann.

Das Immunsystem betreffend gibt es diverse Erkrankungen die durch eine zu schwache oder überschießende Immunantwort gekennzeichnet sind. Das Verhältnis zwischen immunsupprimierenden und proinflammatorischen Faktoren ist hierbei gestört. Dies schlägt sich beispielsweise in Autoimmunerkrankungen oder dem ungehemmten Wachstum von Tumoren nieder. Auf diese Balance medikamentös Einfluss zu nehmen, stellt daher ein attraktives Forschungsziel dar.

1.1 T-Helfer-Lymphozyten Typ 17

T-Helfer-Lymphozyten Typ 17 sind eine Zellpopulation, die neben T_H1- und T_H2-Lymphozyten den Effektorzellen zugeordnet werden kann. Erst vor einigen Jahren neu beschrieben, wurden sie vor allem aufgrund ihrer charakteristischen Eigenschaft, der Interleukin-17-Produktion, als eigene Zellgruppe anerkannt. Ebenso wurden Erkrankungen die bisher T_H1 zugeschrieben wurden wie Experimentelle Autoimmunenzephalitis oder Kollagen-induzierte Arthritis der neuen Zelllinie zugeordnet (Harrington et al. 2006). Heute wird ihnen eine große Relevanz bei der inflammatorischen Reaktion auf pathogene Keime, jedoch auch bei der Entstehung verschiedener Autoimmunerkrankungen, Allergien und Abstoßungsreaktionen zugesprochen. Ihr Anteil an der Gesamtmenge der $CD4^+$-T-Lymphozyten bei gesunden Erwachsenen beträgt ca. 1%.

Interleukin 17 wurde zuerst 1995 von Yao et al. beschrieben. Man unterscheidet 6 Untertypen von IL-17: A bis F. T_H17 bilden hiervon IL-17 Typ A und Typ F. Ausserdem zeichnen sie sich durch die Expression des IL-23-Rezeptors aus. Für die Differenzierung in die T_H17-Richtung benötigen die naiven T-Helfer-Lymphozyten TGFβ und vor allem IL-6. Dies kann unter Einsatz der o.g. Zytokine auch in vitro in Zellkulturexperimenten erreicht werden und wird als Polarisation bezeichnet. In unseren Versuchen konnten wir jedoch auch ohne Einsatz von TGFβ eine gleichwertige T_H17 Population erzielen (III.3.1.2).

Eine interessante Eigenschaft der T_H17 ist ihre phänotypische und funktionelle Plastizität. Nach der Differenzierung naiver $CD4^+$-T-Lymphozyten zu T_H17 wurde neben der typischen Produktion von IL-17 zuletzt auch die Bildung von IFNγ, IL-4 und FoxP3 beobachtet, wodurch sich diese Zelllinie als besonders variabel erweist (Wilke et al. 2011).

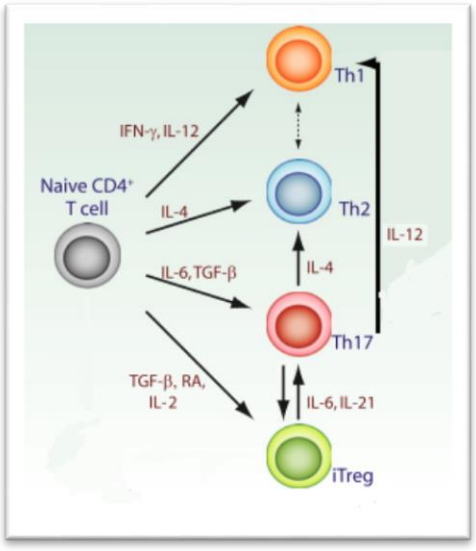

Abb.1: Differenzierungsspektrum naiver CD4+-T-Lymphozyten und involvierte Cytokine. Es sind die 4 Haupt-Differenzierungslinien T_H1, T_H2, T_H17 und T_{reg} und ihre bekannten Polarisationscytokine dargestellt. Zudem dargestellt ist die Plastizität einiger Zelllinien untereinander. Die Möglichkeit eines Klassenwechsels zwischen T_H17 und T_{reg}, als auch zwischen T_H1 und T_H2 wurde beobachtet. Ebenfalls ein Wechsel von T_H17 zu T_H2 und T_H1 unter Einfluss spezifischer Cytokinumfelde. Abbildung bearbeitet aus Zhou et al. „Plasticity of $CD4^+$ T cell lineage differentiation."

1.2 Regulatorische T-Lymphozyten

Ihrem Namen entsprechend modulieren regulatorische T-Lymphozyten die Balance zwischen Toleranz und Effektorzellaktivität. Bereits 1970 wurde von Gershon und Kondo das Vorhandensein einer immunosuppressiven Population von Lymphozyten in Betracht gezogen (Gershon & Kondo 1970; Gershon & Kondo 1971). Trotz der frühen „Entdeckung" konnte jedoch bisher keine sichere Methode gefunden werden diese Zellgruppe eindeutig abzugrenzen. Lange wurde postuliert, das Oberflächenantigen CD25 würde das Vorkommen der T_{reg} zuverlässig repräsentieren. So sprach man von $CD4^+CD25^+$ T_{reg}. Im Laufe der Zeit zeigte sich jedoch, dass es sowohl CD25 negative T_{reg} gibt, als auch CD25 positive Zellen, die keine suppressive Funktion aufweisen. 1998 wurde von Suri-Payer et al. zuerst gezeigt, dass $CD4^+CD25^+$ T-Lymphozyten in vitro eine Proliferation $CD4^+CD25^-$ T-Lymphozyten hemmen. Verschiedene mögliche Mechanismen dieser suppressiven Wirkung werden seitdem diskutiert. Hierbei spielt sowohl der Zell-Zell Kontakt eine Rolle, als auch eine Wechselwirkung über Zytokinausschüttung. Generell können natürliche (nT_{reg}) und adaptive bzw. induzierte T_{reg} (iT_{reg}) unterschieden werden. Natürliche T_{reg} entwickeln sich im Zuge der T-Zell Reifung im Thymus, wohingegen adaptive T_{reg} in der Peripherie induziert werden (Bluestone & Abbas 2003).

Andere Marker für T_{reg}-Lymphozyten sind z.B. das zytotoxische T-lymphozytär assoziierte Antigen 4 (CTLA-4)(Takahashi et al. 2000) sowie der Glukokortiokoid-induzierte Tumor Nekrose Faktor Rezeptor (GITR) (Fontenot et al. 2003). Der heute verlässlichste Faktor um regulatorische T-Lymphozyten zu charakterisieren ist der intrazellulär vorkommende Transkriptionsfaktor „forkhead-box protein 3"(FoxP3) (Wan & Flavell 2005). In dieser Arbeit wurden $FoxP3^+$ T_{reg} untersucht, daher möchte ich in der Folge auf diese Zellen näher eingehen.

Fontenot et al. postulierten 2003, dass FoxP3 spezifisch von $CD4^+CD25^+$ T-Lymphozyten exprimiert wird und eine regulatorische Wirkung allein von $CD4^+CD25^+FoxP3^+$-T-Lymphozyten ausgeht. $CD4^+CD25^+FoxP3^-$-T-Lymphozyten hätten diese Wirkung nicht. Andere Zellen die eine regulatorische Funktion aufweisen, könnten negativ für CD25 sein, seien jedoch immer positiv für die Expression von FoxP3, was die zentrale Relevanz dieses Transkriptionsfaktors für die regulatorische Funktion der T_{reg} bestätige (Ziegler & Buckner 2009). Ein weiteres Indiz hierfür sind die von Bennett et al. beschriebene Autoimmunerkrankung IPEX (immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome) bei FoxP3-defizienten Mäusen (Fontenot et al. 2005). Bei etwa der Hälfte der Menschen mit besagtem Syndrom, konnte eine Mutation im FoxP3-Transkriptionsfaktor entdeckt werden, welche zu Reduktion oder völliger Abwesenheit regulatorischer T-Lymphozyten führte.

Die Differenzierung naiver T-Lymphozyten zu T_{reg} wird nach gängiger Meinung mittels TGFβ eingeleitet. Ebenso wird eine Relevanz von Interleukin-2 (IL-2) diskutiert, da das Oberflächenmolekül CD25 ein Synonym für den IL-2-Rezeptor ist. Dies konnte sich in in vitro Experimenten jedoch nicht bewahrheiten (Cheng et al. 2011).

1.3 T-Helfer-Lymphozyten Typ1 und Typ2

Um Immunität zu gewährleisten nutzt der Körper ein komplexes Zusammenspiel diverser Zellreihen. Neben den hier bereits beschriebenen, erst relativ neu entdeckten Zelllinien T_H17 und T_{reg} bestehen die Typen T_H1 und T_H2. Die Entscheidung zu welcher Linie sich naive T-Lymphozyten entwickeln wird maßgeblich durch das regionale Zytokinumfeld bestimmt.

T_H1-Lymphozyten benötigen für ihre Differenzierung vornehmlich ein Umfeld aus IL-12 und IFNγ. Diese werden durch Antigen präsentierende Zellen (APC) dargeboten. Die wichtigste Gruppe der APC sind hierfür die dendritischen Zellen (DC). Ihrerseits zeichnen sie sich durch die Produktion von IFNγ und TNFα aus und aktivieren Makrophagen zur Eliminierung intrazellulärer Pathogene.

T_H2-Lymphozyten dienen der Aktivierung von B-Zellen. Zusätzlich können sie einen Isotypenwechsel der reifen B-Zellen auslösen. Über die von B-Zellen produzierten Antikörper dienen auch T_H2-Lymphozyten durch die Aktivierung der humoralen Immunität der Abwehr extrazellulärer Pathogene. Durch eine verstärkte Produktion von IgE wird T_H2 vor allem ein Zusammenhang mit allergischen Prozessen nachgesagt. Sie benötigen für ihre Differenzierung hauptsächlich Interleukin-4 und -2. Selbstständig produzieren sie IL-4, IL-5 und IL-13. Ebenfalls wird eine anti-inflammatorische Funktion über die Produktion von IL-10 und TGFβ und die damit Verbundene Suppression von T_H1 diskutiert (Luckheeram et al. 2012).

Die Existenz weiterer Zelllinien wird diskutiert. Es ist jedoch nicht abschließend geklärt, ob in diesem Zusammenhang von eigenen Zelllinien oder Entwicklungsstufen bereits etablierter Zellgruppen gesprochen werden sollte.

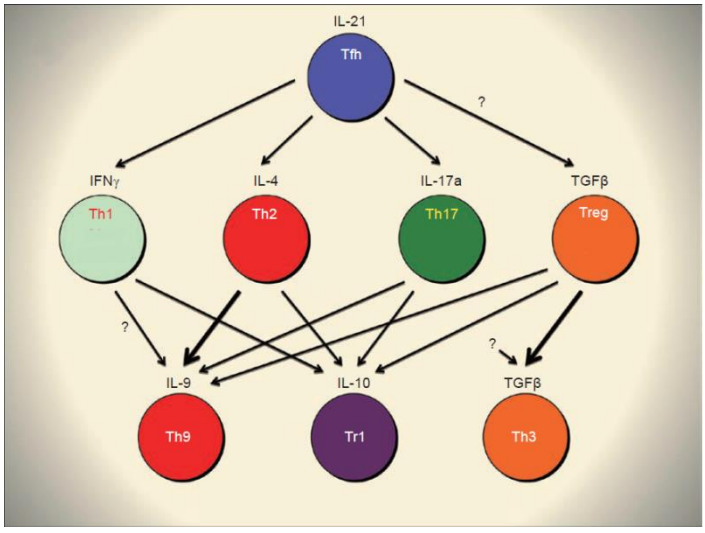

Abb.2: T-Helferzelllinien und Untergruppen mit zugehöriger Zytokinproduktion. Abbildung verändert aus Zhu et.al „Heterogeneity and plasticity of T-helper cells „ (2010)

2. Hämoxygenase

2.1 Enzymwirkung von HO-1

Die Hämoxygenase oder HSP32, ist ein körpereigenes Protein mit katalytischer Aktivität, dessen diverse Funktionen noch weiterer Aufklärung bedürfen. Zuerst beschrieben wurde das Molekül bereits 1969 von Tenhunen et al., wobei er den Aufbau als Tetrapyrrolring beschrieb und die Funktion der Hämoxygenase als geschwindigkeitsbestimmenden Schritt im Abbau von Häm nachweisen konnte. Dabei bewirkt die Hämoxygenase die Oxidation der α-Methenbrücke des Häm zu Kohlenstoffmonoxid, wobei Biliverdin und Eisen äquimolar freigesetzt werden. Zum Ablauf der Reaktion werden molekularer Sauerstoff, sowie NADPH als Reduktionsäquivalent und Cytochrom P450 benötigt. In der Folge wird das Biliverdin durch die Biliverdinreduktase zu Bilirubin reduziert (Soares & Bach 2009)

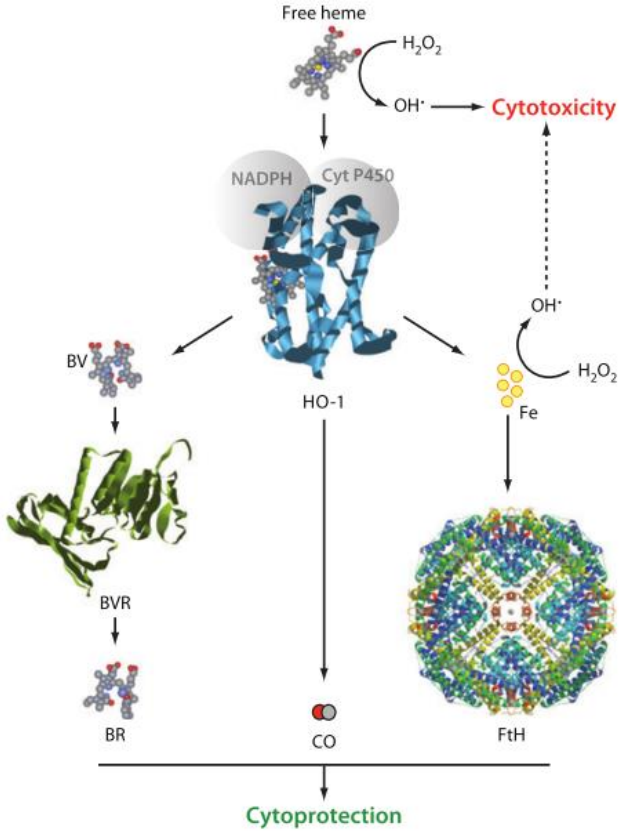

Abb.3: Abbau von Häm durch HO-1 in seine Produkte Biliverdin (BV), Kohlenmonoxid (CO), sowie Eisen (Fe). Sowohl HO-1, als auch seinen enzymatischen Produkten wird eine zytoprotektive Wirkung nachgesagt. (Abbildung aus Gozzelino et al. 2010)

2.2 HO-1 als immunmodulatorisches Protein

Im menschlichen Körper waren bisher zwei Isoformen der Hämoxygenase bekannt. Das hier untersuchte HO-1 ist ein unter anderem in Antwort auf oxidativen Stress induzierbares Protein. HO-2 dagegen ist ein kontinuierlich gebildetes Protein und nicht induzierbar. Erst vor relativ kurzer Zeit wurde ein bisher wenig untersuchtes Isomer, HO-3 beschrieben (McCoubrey et al. 1997). Andere Arbeitsgruppen kamen zu dem Schluss, es gebe kein funktionelles HO-3 Gen, lediglich Pseudogene aus HO-2 Transkription (Hayashi et al. 2004).

Die Gene der Hämoxygenase, HMOX-1 und HMOX-2 sind bei den meisten lebenden Organismen zu finden und müssen daher sehr früh in der Evolution entstanden sein. Der Fakt, dass sich dieses Molekül bei allen diesen Organismen erhalten hat, ist ein Indiz für eine übergeordnete Relevanz der Hämoxygenase (Poss & Tonegawa 1997).

Dies wird ebenfalls deutlich, betrachtet man die Auswirkungen einer Hämoxygenase-Defizienz. Es sind bisher nur zwei Fälle von HO-Defizienz beim Menschen bekanntgeworden. Ein Patient litt hierbei massiv unter Fieber, Ausschlag und Anämie und starb bereits im Alter von 6 Jahren an einem Schlaganfall. Auffällig war eine Hepatomegalie und Asplenie (Yachie et al. 1999; Kawashima et al. 2002; Koizumi 2007; Radhakrishnan et al. 2011). Es ist also anzunehmen, dass ein Mangel an diesem Protein mit menschlichem Leben im Grunde nicht vereinbar ist. Das seltene Auftreten dieser Erkrankung ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass Embryonen mit HO Gendefizienz ein spätes Stadium der Schwangerschaft erst gar nicht erreichen und der Grund des Schwangerschaftsabbruchs daher nicht untersucht wird.

Ein Meilenstein in der Untersuchung der Hämoxygenase war die Zucht Hämoxygenase-defizienter Mäuse. Auch bei Mäusen überlebt lediglich ein Bruchteil der Individuen. Im Gegensatz zu ihren heterozygoten Schwestertieren wirken die HO-defizienten Tiere deutlich kleiner, kränker und schwächer, wobei in der Sektion eine massive Splenomegalie beobachtet werden konnte.

Neben der Nutzung dieser sogenannten „Knock-out“-Mäuse können die Effekte der Hämoxygenase ebenfalls durch eine Stimulation beziehungsweise Inhibition dieser untersucht werden. Die gängigen hierbei genutzten Moleküle, beispielsweise die Metalloporphyrine Tin-Protoporphyrin (SnPP) und Zink-Protoporphyrin (ZnPP), wirken jedoch relativ unselektiv (Grundemar & Ny 1997). So beeinflussen sie auch andere Enzyme wie zum Beispiel NO-Synthetase und Guanylatcyclase, was die Aussagekraft derartiger Studien infrage stellt. Eine weitere Möglichkeit stellt die Methode dar, künstliches Protein direkt in die Zellen zu befördern (J Ma et al. 2009).

Die antioxidative Wirkung von HO-1 entsteht beispielsweise dadurch, dass die cytotoxische Wirkung von Häm durch dessen Abbau aufgehoben wird. Die dabei entstehenden Produkte wirken ihrerseits cytoprotektiv (Yamashita et al. 2004; Nakao et al. 2008). Hervorzuheben ist hierbei CO, da es beispielsweise durch seine hemmende Wirkung auf Tumor Nekrose Faktor-α(TNFα) direkt antiapoptotisch wirkt (T.-Y. Tsui et al. 2007). Es wird jedoch vermutet, dass auch das Enzym HO selbst eine antioxidative Wirkung entfaltet, selbst wenn der Mechanismus bisher ungeklärt blieb.

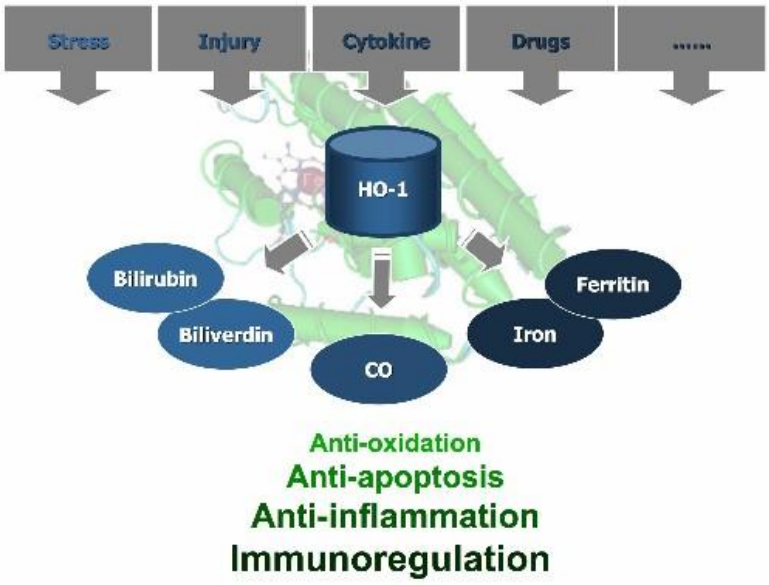

Abb.4: Darstellung des Immunomodulatorischen Spektrums im Zusammenhang mit HO-1. Abbildung von Dr. Tung-Yu Tsui, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

3. HO-1 und $CD4^+$-T-Lymphozyten

Aktuelle Studien zeigen einen Effekt der Hämoxygenase auf die diversen Zelllinien der $CD4^+$-T-Lymphozyten. Sowohl eine Beeinflussung der Proliferation als auch der Differenzierung der naiven Zellen in ihre Untergruppen wird hier postuliert (Amersi et al. 1999; Blancou et al. 2011).

Wie bereits zuvor besprochen, können Effektor-T-Lymphozyten in T_H1, T_H2 und T_H17 unterteilt werden. Ein erster Einfluss auf T-Lymphozyten wurde bereits 1998 von Woo et al. untersucht, wobei eine in vivo Erhöhung von HO1 zu einer Verringerung der Zahl an $CD4^+$-T-Lymphozyten führte. Hierzu wurden Mäuse mit dem Metalloporphyrin CoPP behandelt. In einer Zellkultur wurde später eine Verringerte Zahl T-Lymphozyten bei erhöhter HO-1 Menge festgestellt.

Araujo et al. konnten diesen Effekt 2003 in einer in vivo Studie mit herztransplantierten Mäusen nachweisen. Die Mäuse mit erhöhter HO-1 Konzentration im Blut zeigten verringerte T-Lymphozytenzahlen und ein verlängertes Transplantatüberleben. Yamashita et al. veröffentlichten 2004 dass Biliverdin, ein Produkt des Hämabbaus durch die Hämoxygenase sich über eine Unterdrückung der Effektor-T-Lymphozyten protektiv auf das Transplantatüberleben auswirkt. Dies lässt auf einen protektiven Effekt der Hämoxygenase selbst rückschließen.

In vorangehenden Studien konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass durch den Einsatz von PTD-HO-1 (besprochen in Kapitel II.1.5), einem künstlichen Protein, die Konzentration an HO-1 intrazellulär gesteigert werden kann und der Anteil an T-Helfer-Lymphozyten Typ 1 deutlich vermindert wird. Dieser Effekt von HO-1 auf T_H1 wurde bereits unter anderen Versuchsbedingungen beobachtet. Ein Effekt auf weitere T-Zelltypen wurde ebenfalls bereits beobachtet.

3.1 Fragestellung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem Einfluss eines körpereigenen Proteins, der Hämoxygenase-1, auf die durch Polarisation erzielte Differenzierung von naiven $CD4^+$-T-Lymphozyten in T-Helfer-Lymphozyten Typ 17 und regulatorische T-Lymphozyten. Eine immunomodulatorische Wirkung dieses Proteins auf die in der Immunantwort beteiligten Zellen wurde, obschon der Mechanismus nach wie vor unklar blieb, bereits mehrfach beobachtet (Xia et al. 2008), und soll in dieser Arbeit genauer untersucht werden. Insbesondere durch das Auftreten T-Zell-bedingter Erkrankungen erscheint die Möglichkeit das T-Zell System unseres Körpers zu manipulieren reizvoll. Eventuell ist diese Arbeit ein weiterer Schritt zum Verständnis und der Beherrschung dieser Erkrankungen.

3.2 Vorgehensweise

Zu diesem Zweck werden naive $CD4^+$-T-Lymphozyten aus den Milzen von Mäusen isoliert und in T_H17 oder T_{reg} Richtung polarisiert. Nach dem Etablieren der optimalen Versuchsbedingungen wurden die Polarisationen zum Einen bei HO-1 defizienten ($hmox^{(-/-)}$) Mäusen getestet, zum anderen wurden Zellen von Wildtyp Mäusen ($hmox^{(+/+)}$) mit und ohne exogener HO-1 Zuführung untersucht. Auf diese Weise wurden die Effekte eines Mangels, als auch eines Überschusses an HO-1 untersucht.

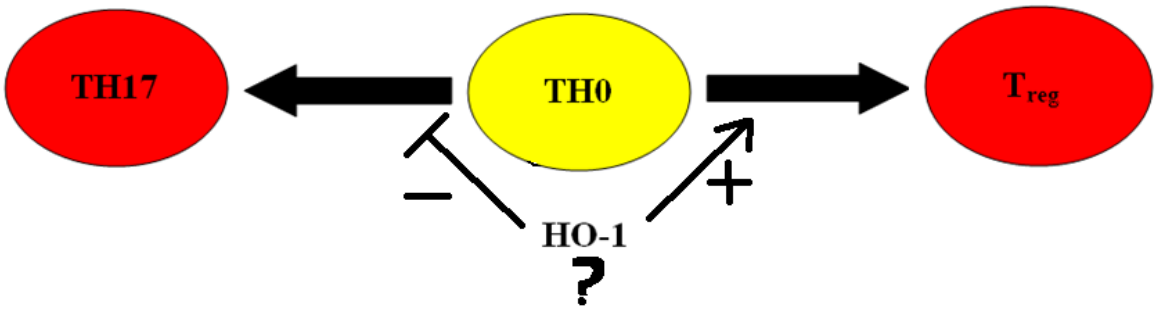

Abb.5: Darstellung der möglichen Wirkung von HO-1 auf die T-Zell Differenzierung

II MATERIAL&METHODEN

1. Material

1.1 Mauslinie

Zur Versuchsdurchführung wurden Milzzellen von acht bis zwölf Wochen alten Mäusen der Linie Balb/c_2008 entnommen, die für das HO-1-Gen „hmox“ homozygot positiv ($hmox^{(+/+)}$) bzw. homozygot negativ ($hmox^{(-/-)}$) waren. Die für die Versuche genutzten Mäuse entstammten einer Zucht von einer das hmox-Allel betreffend heterozygoten Balb/c Gattung (Yet 1999). Bedingt durch eine geringe Überlebensrate der HO-1 defizienten gezüchteten Tiere (Poss & Tonegawa 1997) wurden für Vorexperimente Balb/c-Mäuse gleichen Alters verwendet. Die Mäuse wurden durch PCR aus Schwanzbiopsien genotypisiert. (siehe II 2.1)

Tierversuchsantrag: G09/100

1.2 Geräte und Einmalprodukte

Gerät	Artikelbezeichnung und Hersteller
Absaugpumpe	Miniport, Servox, Deutschland
Bench	HS 18/2, Heraeus, Deutschland
Computer, Excel, Word	Dell
	Microsoft Office 2007
Durchflusszytometer & FACS-Röhrchen	FACS Canto II, BD, USA
	BD FACSDiva Software v6.1.2
	Röhre 5ml, Sarstedt, Deutschland
Elektrophoresekammer	
ELISA Reader	Infinite M200, TECAN Group AG, Schweiz
	Magellan v6.4
	i-control v1.6
Filter	Falcon 40µm/70µm, BD Biosciences, USA
Gel-Kammer	
Handschuhe	Peha-Soft, Hartmann, Deutschland
Inkubator	HeraCell, Heraeus, Deutschland
Gefrierschrank	Liebherr comfort, -80°C Schrank

Kulturplatten	24 well Multidish, Thermo Fisher Scientific, USA
Küvetten	Falcon Pipet 5ml/10ml, BD Labware, USA
MACS Zellseparationssystem	QuadroMACS, Miltenyi Biotech, Deutschland
	LS Columns, Miltenyi Biotech, Deutschland
Mikroskop	IX 50, Olympus, Japan
Netzteil	
PCR-Röhrchen	8er PCR Ketten, Sarstedt, Deutschland
Pinzette	312R, 560R, Aesculap
Pipetten & -spitzen	Eppendorf research, Deutschland
	10µl, Roth, Deutschland 200µl, 1ml, Sarstedt, Deutschland
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Deutschland
Röhrchen	Cellstar Tubes 15ml, greiner bio-one Cellstar Tubes 50ml, greiner bio-one Safe-Lock Tubes 1,5ml, Eppendorf, Deutschland Safe Seal Tube 1,5ml, Sarstedt, Deutschland
Schere	BC 131
Thermocycler	T3, Biometra, AnalytikJena, Deutschland
	Mastercycler, Eppendorf, Deutschland
UV-Kammer	BioDoc II, Biometra, AnalytikJena, Deutschland
	BioDocAnalyze 2.0, v2.26.11.4
Vortex	IKA MS3 basic
	Certomat, B.Braun, Deutschland
Waage	Adventurer, OHAUS, USA
Zählkammer	Marienfeld, Deutschland
Zentrifuge	5804R,5810R, eppendorf, Deutschland

1.3 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Bovines Serum Albumin	PAA, Österreich
DPBS	Life Technologies, USA
Erylyselösung: • **Ammoniumchlorid, 8,29g** • **Kaliumhydrogencarbonat, 1g** • **EDTA/Titriplex, 0,372g** • **Aqua dest., 1L**	
FACS-Waschmedium: • **PBS, 9,55g** • **BSA, 5g** • **NaN_3, 1g** • **Aqua dest., 1L**	
Fix-Perm Lösung	FOXP3 Fix/Perm Buffer, Biolegend
Golgistop	BD Golgistop, BD Biosciences, USA
HBSS	Life Technologies, USA
IL-17 Analyse Kit	Mouse IL-17 Platinum ELISA, eBioscience, USA
Ionomycin	Sigma-Aldrich, USA
Kulturmedium: • **RPMI 1640 +GlutaMAX –I,** • **+10% FCS, heat inactivated, 56°C, 30'** • **+Pen. (100U/ml), Strept.(100µg/ml)** • **+β-Mercaptoethanol 50µM**	Life Technologies, USA
MACS Lösung: • **MACS BSA Stock Solution** • **autoMACS Rinsing Solution**	Miltenyi Biotech, Deutschland
Omniscript RT Kit	Quiagen, Niederlande
Permeabilisations-Lösung	FOXP3 Perm Buffer, Biolegend
Phorbol-Myristate-Acetate	Fluka Analytical
RNEasy Kit	Quiagen, Niederlande
Trypanblau	Trypan Blue Stain 0,4%, Life Technologies, USA

1.4 Antikörper & Cytokine

Antikörper	Klonnummer und Hersteller
Anti Biotin Microbeads	Miltenyi Biotech, Deutschland
Anti-IL-4	11B11, Biolegend, USA
Anti-Mouse CD3e	145-2C11, eBioscience, USA
Anti-Mouse CD28	37.51, eBioscience, USA
Anti-Mouse IFN-γ	XMG 1.2, Biolegend, USA
$CD4^+$ T-Cell Biotin Antibody Cocktail	Miltenyi Biotech, Deutschland
CD4-APC	GK1.5, APC Conjugated anti-mouse CD4, eBioscience, USA
CD4-PerCp	RM4-5, PerCP-Cy5.5 conjugated anti-mouse CD4, eBioscience, USA
CD25-PE	PC61.5, Anti-Mouse CD25 PE, eBioscience, USA
FoxP3-APC	150D, Alexa Fluor ® 647 anti-mouse/rat/human FOXP3, Biolegend, USA
Human TGF-β-1	Peprotech, USA
IgG1-APC	MOPC-21, AlexaFluor 647 IgG1, Biolegend, USA
IgG1-PE	eBRG1, PE conjugated Rat IgG1 isotype control, eBioscience, USA
IL17-PE	TC11-18H10.1, PE anti-mouse IL-17A, Biolegend, USA
Mouse-IL-6	Peprotech, USA
Murine-IL-12	Peprotech, USA

1.5 Hämoxygenase

Das in unserem Labor hergestellte künstliche HO-1 Protein besaß zusätzlich eine „protein transduction domain“ (PTD-HO-1), was die Aufnahme des Proteins in die Zellen ermöglicht. Der Mechanismus dieses Prozesses ist in der Folge dargestellt.

Protein Transduktion kann als Prozess beschrieben werden der es ermöglicht Moleküle in Zellen zu transportieren, die beispielsweise durch ihre Größe bedingt nicht auf endozytotische Weise in die Zellen gelangen können. Die verstärkte Aufnahme in Zellen der an das HI Virus angelehnten TAT Peptidsequenz entdeckten Green und Loewenstein erstmals 1988. Die Möglichkeit andere Moleküle mit diesem Peptid einzuschleusen wurde 1999 beschrieben (Schwarze 1999). Eine in unserem Labor neu entwickelte PTD mit der Aminosäuresequenz YARAAARQARA wurde nach den Angaben von J. Ma hergestellt (J Ma et al. 2009).

Zunächst wurde ein Expressionsvektor produziert um die Gene der PTD und HO-1 kombiniert in DNA einschleusen zu können. Zu diesem Zweck wurden dem Expressionsplasmid pET-28b(+) DNA Fragmente zur Kodierung von PTD und HO-1 eingesetzt.

Im Anschluss wurden durch das zelleigene Proteinbiosynthesesystem in E.coli-Bakterien die Proteine synthetisiert. Die Bakterien und somit ebenso das PTD-HO-1 wurden in Kultur vermehrt. Nach dem Zentrifugieren der Zellsuspension und Lyse des entstandenen Zellpellets konnten in der Folge die gesuchten Proteine in hoher Konzentration aus dem Zelllysat extrahiert und bei -80°C konserviert werden.

Abschließend wurde eine Analyse mit SDS-PAGE (Abb.6) und Western Blot durchgeführt um die Effizienz und Reinheit der Proteinbildung zu erfassen. Die intakte Funktion der vermehrten HO-1 wurde durch einen Farbumschlag bei Biliverdinbildung im Rahmen des Hämabbau nachgewiesen.

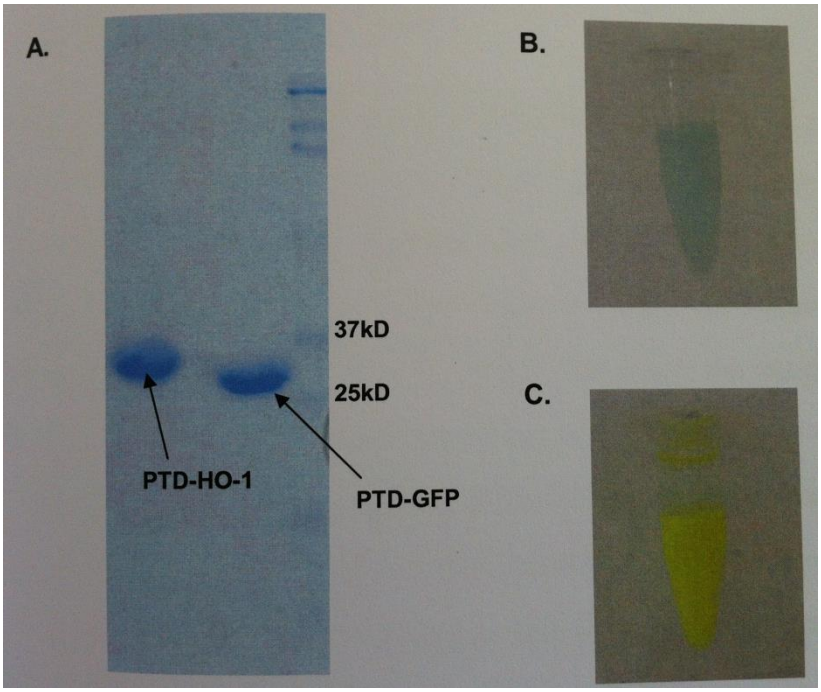

Abb.6: Bildung und Konzentrierung von PTD-gebundenen Proteinen A)SDS-PAGE für PTD-HO-1 und eine Kontrollgruppe B)aufgereinigtes PTD-HO-1 Protein C) aufgereinigtes PTD-GFP Protein der Kontrollgruppe. *Abbildung der PhD Arbeit von Dr. Tao Xu entnommen.*

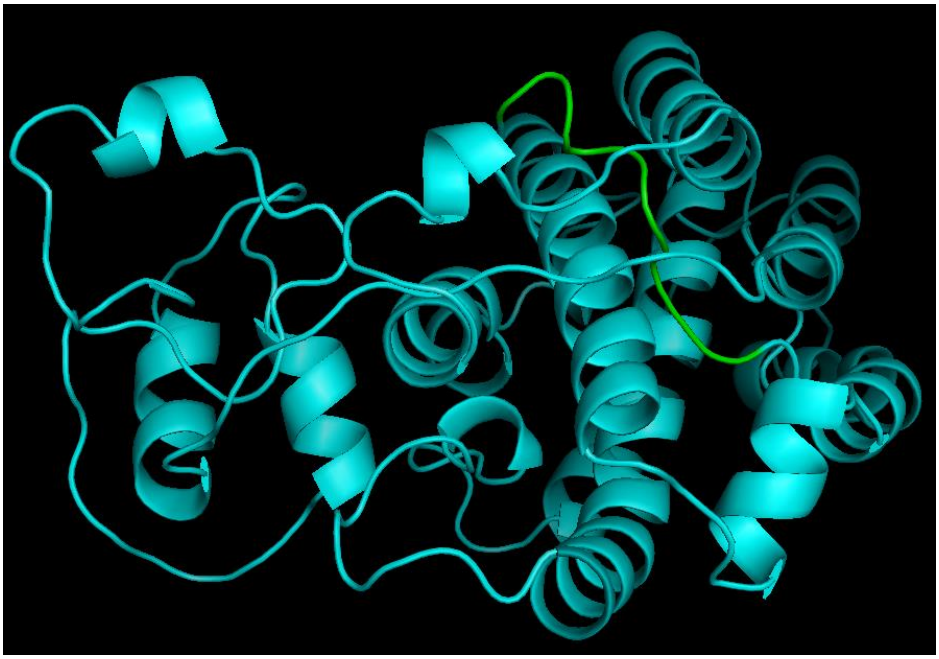

Abb.7: 3D-Struktur von PTD-HO1. Grün dargestellt ist die Protein-transduction-domain, wohingegen das türkise Molekül HO-1 darstellt.

2. Methoden

2.1 Genotypisierung der Versuchstiere durch PCR und Gelelektrophorese

2.1.1 Genveränderung

Zur Erzeugung einer HO1-defizienten Mauslinie wurde das ursprüngliche HO-1 Gen mittels eines „Targeting construct“ manipuliert. Hierbei wurde das im HO-1 Gen befindliche Exon 3 durch eine Neomycin-Kassette ersetzt. Durch das Fehlen von Exon 3 im neu enstandenen Gen (siehe Abb.8), kann kein funktionierendes HO-1 Protein mehr generiert werden.

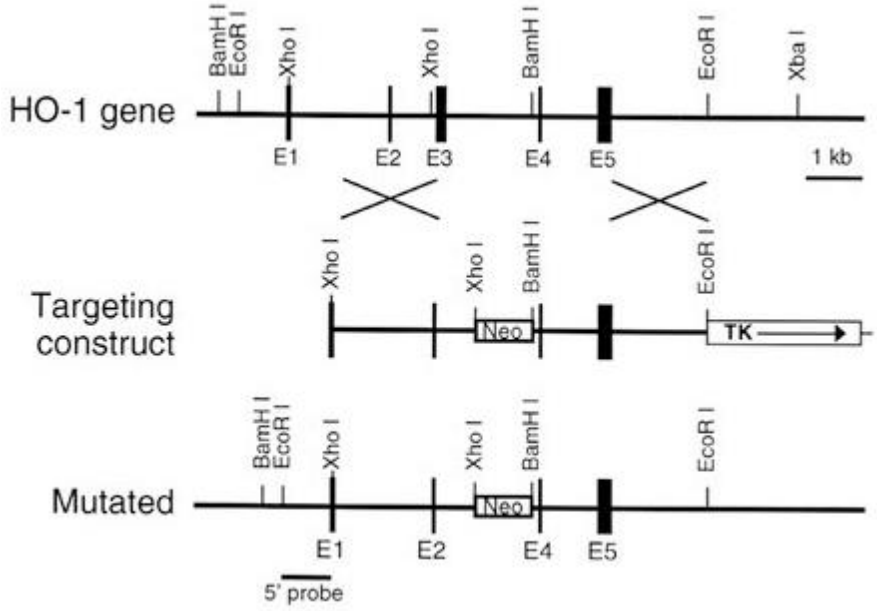

Abb.8: Abbildung aus Yet et al. 1999

2.1.2 PCR der Schwanzbiopsien

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) dient der Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen. Die bahnbrechende Möglichkeit zur experimentellen Untersuchung dieser Sequenzen entwickelte Kary Mullis 1984. Zunächst wird ein DNA-Doppelstrang durch Erhitzen denaturiert. In der Folge werden Primer zugesetzt, welche die Gebiete eingrenzen die vermehrt werden sollen. Bei Zugabe von DNA-Polymerase und Desoxyribonucleosidtriphosphaten (dNTP) werden nun Kettenabschnitte vermehrt. Diese Schritte können beliebig oft wiederholt werden.

Die zu untersuchende DNA wurde aus Schwanzbiopsien der frisch geborenen Tiere gewonnen. Hiernach wurde das speziell für diesen Zweck entwickelte „DirectPCR® Lysis Reagent Tail“ der Firma peqlab zur Lyse des Gewebes genutzt. Das gewonnene Lysat konnte in der Folge direkt zur PCR genutzt werden.

2.1.3 Gelelektrophorese

Der Nachweis der durch PCR amplifizierten DNA erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Bei dieser Methode wandern geladene Teilchen in einem magnetischen Feld. Die DNA ist aufgrund ihrer Phosphatreste negativ geladen und wandert durch die in unserem Fall 1%-Agarosegelmatrix zur Anode. Die zurückgelegte Distanz ist hierbei umgekehrt proportional zur Größe der Fragmente. Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurden die Fragmente mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid gefärbt. Der Farbstoff haftet hierbei spezifisch an den DNA-Basen und wird unter UV-Licht sichtbar gemacht. Als Referenz der DNA-Fragmentgröße wurde parallel zu den zu untersuchenden Proben eine DNA-Leiter in die Testkammer eingefügt.

Abbildung 9 zeigt exemplarisch das Ergebnis einer Gelelektrophorese zur Bestimmung des Vorhandenseins des HO-1 Gens hmox. Bei 400bp dargestellt ist die Bande einer Neomycin-Insertionskassette. Diese tragen alle von uns genetisch modifizierten Mäuse, ob Knock-out- (hmox (-/-)) oder Hybrid-Tier (hmox (-/+)), nicht jedoch die Wildtypmäuse (hmox (+/+)). Die untere Fragmentreihe entspricht einer Länge von 456 Basenpaaren, welches im Bereich von Exon 3 im hmox-Gen liegt. Hierbei ist bei Wildtyp-Tieren eine „dicke“ Bande zu erwarten, bei Hybridtieren eine durch die auf die Hälfte reduzierte Menge der DNA dünnere Bande und bei Knock-out Tieren sollte diese Bande fehlen.

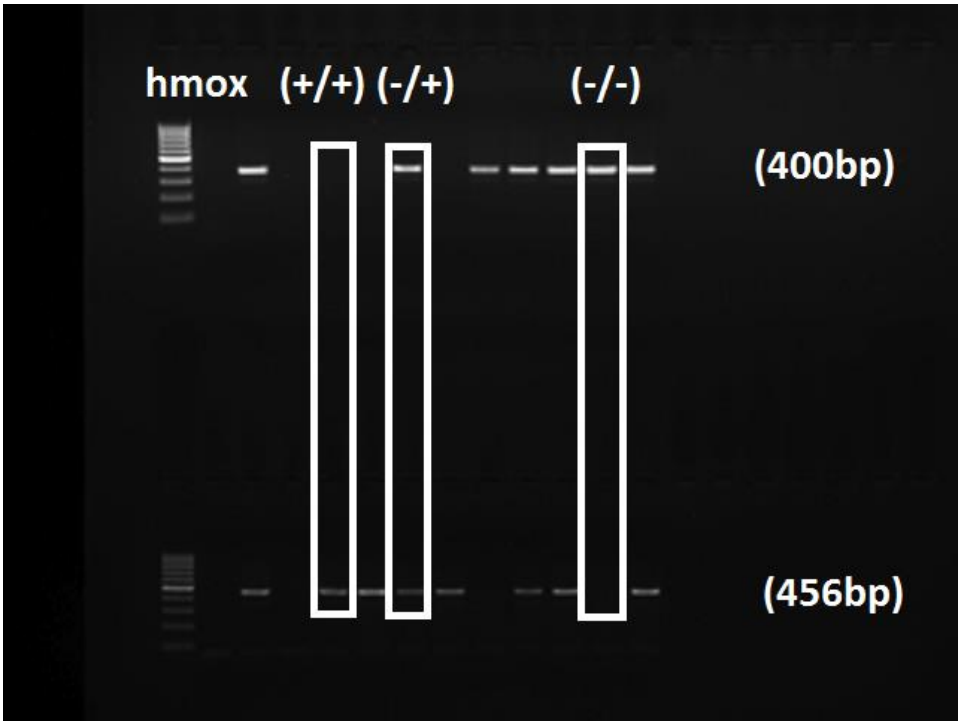

Abb.9: Beispielhafte Auswertung einer Gelelektrophorese zur Bestimmung des hmox-Status der Versuchstiere. Erklärung siehe Text.

2.2 Zellkultur

2.2.1 Organentnahme

Die acht bis zehn Wochen alten Mäuse wurden durch zuströmendes CO_2 final betäubt. Nach zervikaler Dislokation wurde eine Splenektomie durchgeführt, und die Milz zum Transport in HBSS-Medium auf Eis gelegt.

2.2.2 Isolation der $CD4^+$ T-Lymphozyten

Zur Herstellung einer Milzzell-Suspension wurden die Milzen mit einer anatomischen Schere kleingeschnitten und in einen 70µm Filter überführt. Durch diesen wurden die Milzzellen mit einem Stößel in ein Röhrchen gepresst. Dieser Vorgang wurde noch drei- bis viermal wiederholt und jeweils mit 5ml HBSS gespült. Der Zweck dieser Methode war die mechanische Isolation der Splenozyten bzw. die Eliminierung des Bindegewebes aus der Suspension.

Die Milzzellsuspension wurde zunächst bei 4°Celsius und 200g für sieben Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt. Da für unsere Experimente die Suspension keine Erythrozyten enthalten sollte resuspendierten wir das Zellpellet mit 10ml Erylysepuffer und zentrifugierten erneut. Nach dem Absaugen des Überstandes wurden die Splenozyten in 10ml MACS-Puffer gründlich resuspendiert. Um vereinzelte Zellhaufen zu entfernen, wurde die entstandene Suspension durch einen feineren Filter (40µm Porengröße) geleitet. Nach diesem Vorgang wurde die Zellzahl bestimmt. Nach erneutem Waschen der Zellen wurden – der MACS Zellisolations Anleitung folgend – der Zellzahl entsprechend MACS-Puffer und ein biotinylierter Antikörpercocktail zugegeben und die Zellsuspension bei 4°Celsius für 10 Minuten inkubiert. Die biotinylierten Antikörper richteten sich gegen CD8a, (Ly-2, ratIgG2a), CD 11b (Mac-1) (rat IgG2b), CD45R (B220) (rat IgG2a), DX5 (rat IgM), Ter-119 (rat IgGsb), so dass praktisch nur $CD4^+$ T-Lymphozyten nicht mit Antikörpern beladen wurden. In der Folge gaben wir erneut MACS-Puffer und Anti-Biotin-Microbeads hinzu und inkubierten für 15 Minuten bei 4°C. Bei diesem Schritt koppelten sich die magnetisch aktiven, kupferhaltigen „Microbeads“ an die mit Biotin markierten Zellen.

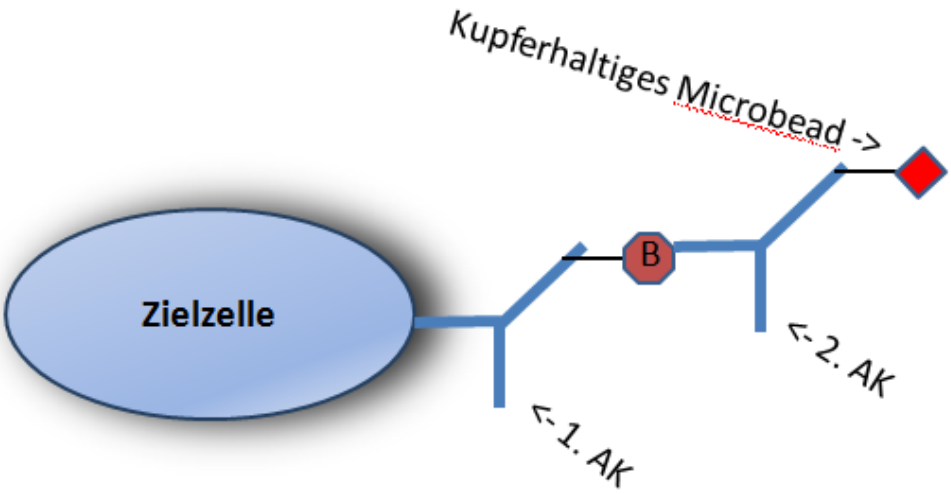

Abb.10: Darstellung der Markierung einer Zelle durch primären Biotin-Antikörper und kupfergebundenem Anti-Biotin-Sekundärantikörper in Vorbereitung auf magnetische Zellseparation

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen erneut gewaschen um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Das nach dem Absaugen entstandene Pellet wurde mit einem Milliliter MACS-Puffer resuspendiert und in eine vorher mit MACS-Puffer gespülte MACS-Säule gegeben. Diese Säule war eingespannt in einen MACS Quadro Magneten der Firma Miltenyi Biotech. (siehe Abb. 10) Die Suspension wurde hierbei aufgetrennt. Alle mit MicroBeads markierten Moleküle wurden im oberen Teil der Säule in einem Schaumstoff-Schwamm durch das vorhandene Magnetfeld aufgehalten. Der Durchlauf aller nicht markierten Zellen wurde aufgefangen. Sobald der Milliliter durchgelaufen war wurde mit 3ml MACS-Puffer nachgespült und das Spülen zweimal wiederholt. Nahezu alle unerwünschten Zellen blieben bei dieser Methode im Röhrchen zurück und die erstellte Zellsuspension beinhaltete CD4 positive T-Lymphozyten mit hoher Reinheit. Diese wurde in vorangehenden Arbeiten durchflusszytometrisch überprüft und lag bei ca. 98%. Weitere Informationen zu dieser Methode finden sich im Skript des Herstellers.

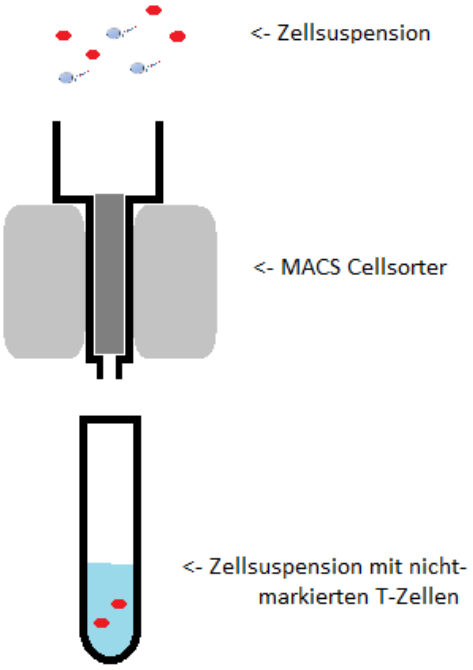

Abb.11: Bei der magnetischen Zellseparation werden die wie in Abb.10 dargestellten, magnetisch markierten Zellen zusammen mit unmarkierten Zellen durch ein Magnetfeld geleitet. Dem Prinzip der negativen Selektion folgend nutzten wir die nicht markierten, nicht im Magnetfeld aufgehaltenen Zellen für unsere weiteren Experimente

2.2.3 Stimulation und Polarisation

Der nun erhaltenen Zellsuspension wurden 10µl für eine erneute Zellzählung entnommen. Es wurde wieder zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Nun wurde mit Kulturmedium resuspendiert, sodass eine Konzentration von einer Million Zellen pro Milliliter Suspension erreicht wurde. Die Zellen wurden nun bei 4° für eine Stunde inkubiert. Während dieser Zeit wurde eine Multi-well Kulturplatte beschichtet. Hierzu wurden in jede Kammer 150µl HBSS gegeben, welchem zur Stimulation der Zellen Anti-CD3 und Anti-CD28 in einer Konzentration von 1µg Antikörper pro einer Million Zellen zugesetzt wurden. Die beschichtete Platte wurde bei 37°C und 5% CO2 inkubiert.

Nach einstündiger Inkubation wurden die Zellen zunächst auf die beschichtete Platte gegeben, und zwar 500.000 Zellen pro Kammer. Es wurden je nach Experiment Lösungen mit diversen Cytokinen angesetzt. Um verstärkt T_H17-Lymphozyten zu gewinnen wurden die Zellen mit Interleukin 6 (IL-6), Anti-Interleukin-4 (Anti-IL-4), Anti-Interferon-Gamma (Anti-IFNγ) und teilweise Transformal-Growth-Factor-beta (TGFβ) behandelt. Um die Differenzierung in regulatorische T-Lymphozyten zu verstärken wurden die Zellen mit TGFβ, Anti-IL-4 und Anti-IFNγ versetzt. Die Cytokine wurden im jeweils gleichen Volumen zugegeben.

Abschliessend wurden bei einigen Versuchen Proteinlösungen angesetzt. Hierzu wurden HO-1 und in der Kontrollgruppe BSA in einer Konzentration von 200ng/ml genutzt, und in gleichen Volumina den Zellen zugeführt. Die Zellen wurden hiernach wieder in den Inkubator eingebracht und 3 Tage inkubiert.

2.2.4 Restimulation

An Tag 3 wurde zunächst restimuliert, um die intrazelluläre Cytokinkonzentration der Zielzellen zu erhöhen, und die spätere Analyse der Zellen zu erleichtern. Jeder Kammer wurden 250µl Medium abgesaugt und 250µl frische Nährlösung zugegeben. Dieser Nährlösung wurden je Kammer 10µl PMA, 0,5µl Ionomycin und 0,3µl Golgistop® zugesetzt. Phorbolmyristatacetat, ein Tumorpromotor, dient der unspezifischen Erhöhung der Biosynthese über Aktivierung der Proteinkinase C. Ähnliche Wirkung erzielt Ionomycin durch eine Verstärkung der Cytokinbiosynthese. Die Wirkung von Golgistop® beruht auf einem hemmendem Einfluss auf den an der Produktion exozytotischer Vesikel beteiligten Golgi-Apparat, wodurch die intrazelluläre Konzentration der Cytokine ansteigen und eine Analyse der Zellen mittels Durchflusszytometrie erleichtert werden sollte.

Nach 6h Inkubationszeit wurden die Zellen inklusive Überstand in FACS(Durchflusszytometrie-)-Röhrchen pipettiert und gewaschen. Hierzu wurde zunächst zentrifugiert und das entstandene Pellet mit FACS-Waschpuffer resuspendiert um übrige Cytokine und Stimulanzien zu entfernen. Im Anschluss wurden die Zellen diverse Male gewaschen und zur Fixation mit Fix/Perm- beziehungsweise Permpuffer (BioLegend) behandelt. Neben der Fixation wurden hierbei die intrazellulären Kompartimente für hinzugefügte Antikörper mittels Permeabilisierung zugänglich gemacht. Eine detailliertere Darstellung findet sich im Protokoll des Herstellers

2.2.5 Anfärben der Zellen

Die Zellen wurden zelllinienspezifisch angefärbt. Von den Zellsuspensionen wurden Proben entnommen, die mit einer Extra-Färbung als Isotyp-Kontrollen dienten.

Bei den Zellen der T_H17-Gruppe wurden das von ihnen produzierte Interleukin-17 und das Oberflächen-Antigen CD-4 angefärbt. Bei regulatorischen T-Lymphozyten wurden der intrazelluläre Transkriptionsfaktor FoxP3, sowie die Oberflächen-Antigene CD25 und CD4 markiert. Es wurden fluoreszenzmarkierte Antikörper genutzt. Typische Fluorochrome die zur Anfärbung genutzt wurden waren Phycoerytrhin (PE), Allophycocyanin (APC) sowie Peridin-Chlorophyll-Protein (PerCP) die an jeweils selektive Antikörper gegen die zu untersuchenden Moleküle gebunden waren.

Zum Anfärben wurden den einzelnen Röhrchen jeweils Perm-Puffer mit den jeweiligen Farbstoffen in gleichen Volumina zugegeben. Im Anschluss wurden die Röhrchen für 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die Zellen mit 600µl FACS-Waschpuffer gewaschenund in 400µl FACS-Waschpuffer resuspendiert.

FACS-Antikörper	Klonnummer	Konzentration	Verdünnung
Anti-Mouse CD4 APC	GK1.5	0,2mg/ml	1:100
Anti-Mouse CD25 PE	PC61.5	0,2mg/ml	1:50
PerCP-Cy5.5 anti-mouse CD4 (L3T4)	RM4-5	0,2mg/ml	1:100
Alexa Fluor® 647 anti-mouse/rat/human FOXP3	150D	60µg/ml	1:50
Alexa Fluor® 647 Mouse IgG1, κ isotype ctrl (ICFC)	MOPC-21	0,5mg/ml	1:50
PE Mouse IgG1, κ isotype Ctrl	MOPC-21	0,2mg/ml	1:50
PE anti-mouse IL-17A	TC11-18H10.1	0,2mg/ml	1:50

Tab.1: Konzentrationen verwendeter farbgekoppelter Antikörper

2.2.6 Durchflusszytometrie

Bei der Methode der Durchflusszytometrie können Zellen anhand ihrer Größe, Granulation sowie Ihrer Fluoreszenz aufgetrennt werden. Das Durchflusszytometer saugt die Zellsuspension an und misst die Größe und Granulation, sowie spezifische Fluoreszenzeigenschaften der einzeln durchlaufenden Zellen durch das Anlegen einer entsprechenden Spannung oder die Ablenkung eines auf die Zelle gerichteten Laserstrahls. Als Ergebnis erhält man eine Grafik, in der Größe und Granulation gegeneinander aufgetragen sind. Hierbei können Zellgruppen zum Beispiel dem Grad Ihrer Proliferation nach unterschieden werden. In einem zweiten Schritt können die bei der Färbung genutzten Fluoreszenzen in die Darstellung einbezogen werden. Bei richtiger Anwendung dieser Methode können auf diese Weise Zellen je nach Anfärbung, ihrer Merkmale entsprechend aufgetrennt werden.

Die Kontrollfärbung dient hierbei als Hilfe, die Kompartimente zuverlässig voneinander abzugrenzen. Das Resultat der unspezifischen Antikörperbindung der Isotypkontrolle wird hierbei mit dem Ergebnis der spezifischen Färbung verglichen.

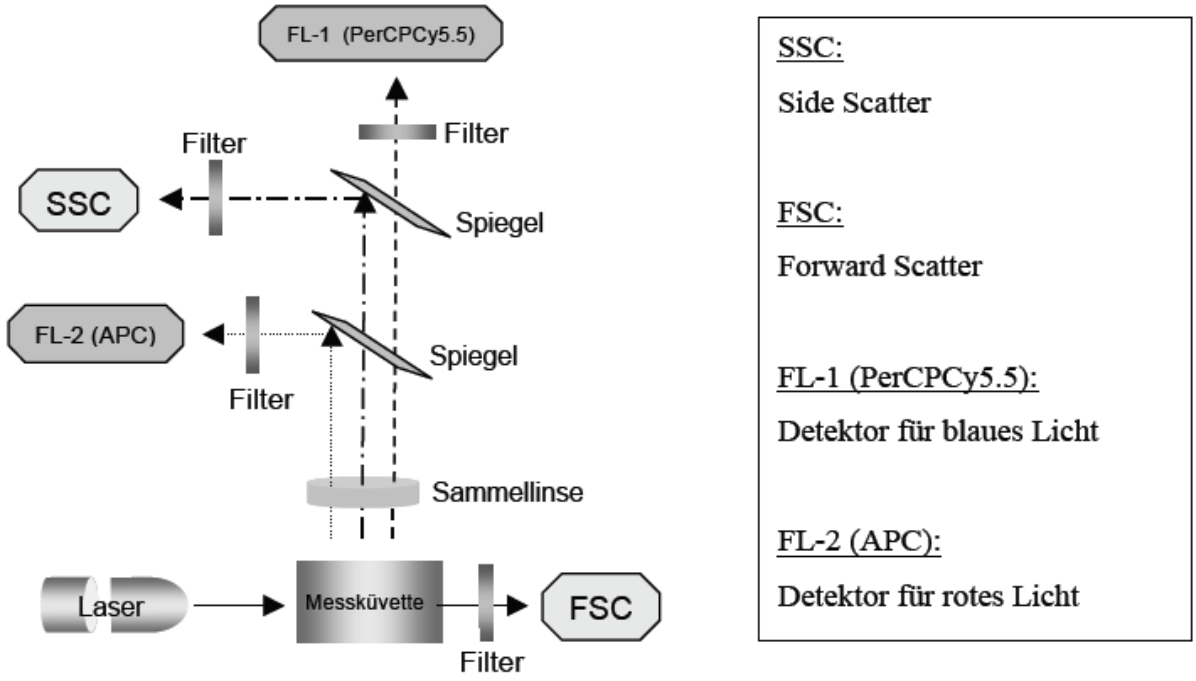

Abb.12: Prinzip der Durchflusszytometrie. Bild aus „Einfluss der HO-1 auf die Polarisation naiver $CD4^+$-T-Lymphozyten in T_H1-Richtung“ (Anna-Lena Kleppin, 2011)

2.3 Überstandsanalyse mit ELISA

Nach Abschluss der Zellanalysen wurde der jeweils aufgefangene Überstand mittels ELISA untersucht. Enzyme-linked Immunosorbent Assay stellt ein Verfahren dar, mit dessen Hilfe spezifische Antigene quantitativ nachgewiesen werden können. In meinen Experimenten wurde die spezielle Variante des Double-Antibody Sandwich ELISA angewandt. Hierbei wird das zu untersuchende Antigen, in unserem Fall Interleukin 17, auf eine mit Antikörper beschichtete Mikrotiterplatte aufgetragen (a). An das gebundene Antigen (b) wird ein zweiter, mit Biotin gekoppelter Antikörper aufgetragen (c) und anschließend wird ein an Biotin bindendes Enzym zugegeben (d), welches ein Substrat abbaut und dadurch eine Farbreaktion hervorruft (e). Von der Stärke der Farbreaktion kann durch Vergleich mit einer Standardkurve auf die Ausgangskonzentration des Antigens rückgeschlossen werden. Für die Versuche wurde das Kit Mouse IL-17 Platinum ELISA von eBioscience genutzt. Nähere Informationen sind im Protokoll des Herstellers zu finden.

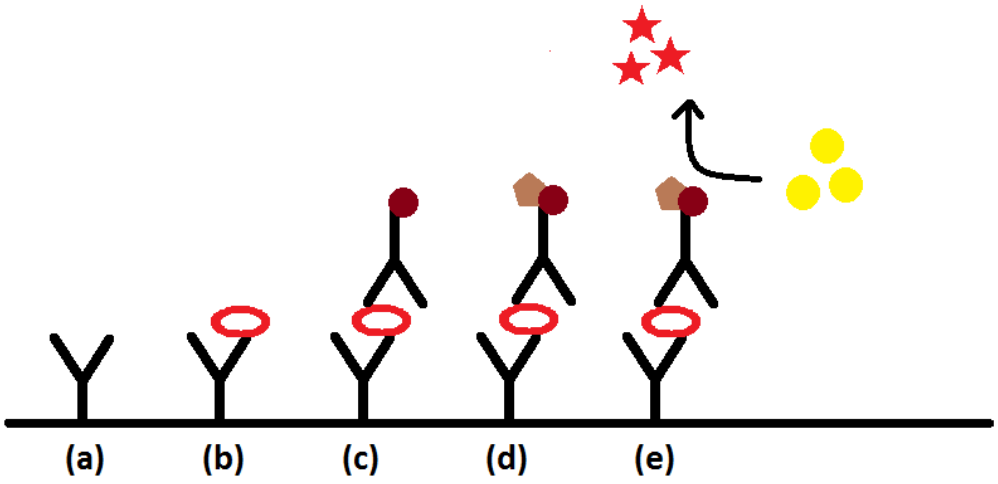

Abb.13: Prinzip des Sandwich-ELISA. Erläuterung siehe Text.

2.4 Statistik

Die Experimente wurden jeweils paarweise durchgeführt um Ergebnisse durch eine Kontrollgruppe besser bewerten zu können. Die Anzahl der Versuche ist jeweils als „n“ angegeben.

Nach Abschluss der Experimente wurden die einzelnen Ergebnisse in Kohorten zusammengefasst. Experimente die unter gleichen Konditionen durchgeführt wurden, wurden zusammengenommen. Experimente die nicht auswertbar waren wurden der Statistik entnommen.

Die Kohorten wurden anschließend statistisch ausgewertet. Es wurde das Programm Excel von Microsoft genutzt und mit diesem der arithmetische Mittelwert, sowie die Standardabweichung vom Mittelwert (SEM) errechnet. Abschliessend wurden die Differenzen zwischen Test- und Kontrollgruppe mittels student-t-Test auf statistische Signifikanz hin untersucht. Hierbei wurde ein Signifikanzniveau von 5% (p=0,05) als relevant festgelegt.

$$SEM = \frac{s_{n-1}}{\sqrt{n}} \qquad t = \frac{\left|\bar{d}\right|}{SEM_d}$$

III ERGEBNISSE

1. HO-1 Effekt nach Stimulation mit Anti-CD3/28-Antikörpern

Um einen modulatorischen Effekt der Hämoxygenase-1 auf die Differenzierung der naiven $CD4^+$-T-Lymphozyten in T_H17 und T_{reg}-Richtung zu untersuchen, analysierten wir zunächst den Anteil der Zellen, die lediglich nach der gängigen Stimulation mit Anti-CD3 und Anti-CD28, IL-17a und FoxP3 exprimierten. Bei T_H17-Lymphozyten diente als Marker eine erhöhte Produktion von IL-17 gegenüber der Restpopulation. Bei regulatorischen T-Lymphozyten entsprach dies dem intrazellulären Transkriptionsfaktor FoxP3 beziehungsweise dem zellulären Oberflächenmolekül CD25. Dabei verglichen wir T-Helfer-Lymphozyten HO-1-defizienter Mäuse mit den Zellen ihrer Wildtyp-Schwestertiere. Zusätzlich verwendeten wir das rekombinante Fusionsprotein PTD-HO-1 um auf diese Weise die intrazelluläre Menge des Proteins zu erhöhen. Als erhöhte Produktion galt ein Abweichen von einer Isotypenkontrolle in der Durchflusszytometrie.

1.1 IL-17-Produktion

Bei der Auswertung im Durchflusszytometer zeigte sich der Trend, dass Zellen von HO-1 defizienten Tieren gegenüber den Wildtyp-Mäusen eine tendenziell verringerte Interleukin 17 Produktion aufwiesen (-21%; p=0,22). Eine statistische Signifikanz konnte bei der geringen Anzahl der auswertbaren Versuche (n=5) nicht erreicht werden.

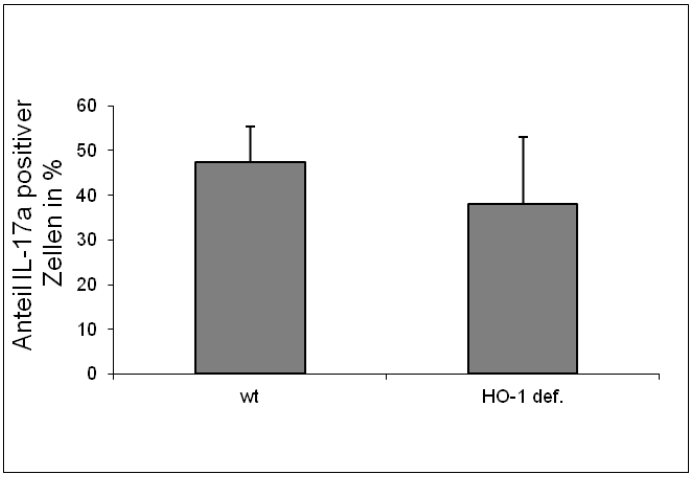

Abb.14: Darstellung der HO-1 Defizienz auf die Differenzierung stimulierter CD4+-T-Lymphozyten in T_H17 Richtung. Der Anteil IL-17a positiver Zellen war bei HO-1-defizienten Mäusen verglichen mit Wildtyp-Tieren (nicht signifikant) verringert.

Bei Versuchen mit dem Einsatz des künstlichen PTD-HO-1 wurde diese Tendenz bestätigt. Bei Zellen von Balb/c Mäusen, die nach Stimulation zusätzlich 200µg/ml HO-1 Protein erhielten, zeigte sich nach 3 Tagen Inkubationszeit und Restimulation gegenüber der mit BSA behandelten Kontrollgruppe eine tendenziell gesteigerte IL-17 Produktion (+18%; p=0,37; n=13). Eine statistische Signifikanz konnte hierbei jedoch ebenfalls nicht erreicht werden.

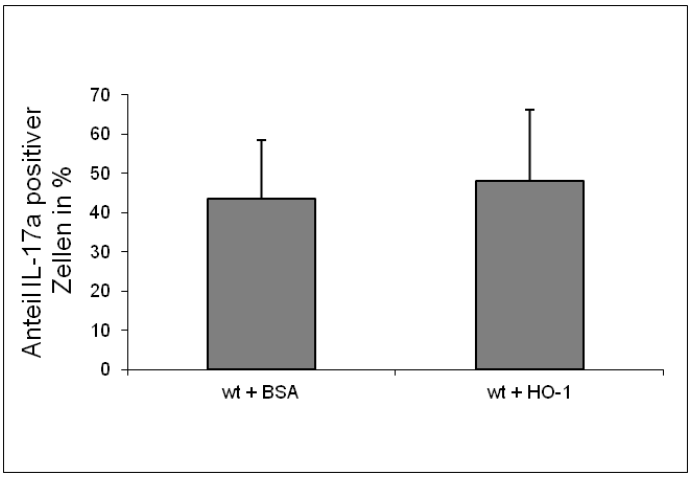

Abb.15: Darstellung der HO-1 Wirkung auf die Differenzierung stimulierter Zellen in T_H-17 Richtung. Vergleich zwischen Zugabe von BSA bzw. HO-1 zu Zellen von Wildtyp Mäusen.

1.2 Foxp3/CD25 Expression

Bei diesen Experimenten unterschied sich lediglich die schließliche Anfärbung von der in III.1.1 dargestellten Versuchsreihe. Mit Hilfe fluoreszenzkonjugierter Antikörper wurde durchflusszytometrisch der Gehalt an Foxp3 und CD25 der einzelnen Zellen untersucht, wobei die Zellen für Ihre Einteilung sowohl hoch positiv für Foxp3 als auch für CD25 sein mussten. Die erzielten Ergebnisse nach alleiniger Stimulation, glichen sich zwischen den mit HO-1 defizienten Mäusen erreichten Daten und den Experimenten mit künstlichem Protein. In beiden Fällen gab es keinen signifikanten Unterschied, jedoch wurde tendenziell eine Erhöhung der FoxP3-Expression bei erhöhter HO-1 Konzentration ermittelt. Der Anteil an FoxP3/CD25 positiven Lymphozyten der $hmox^{(-/-)}$ Mäuse war im Mittel um 9% verringert gegenüber der Kontrollgruppe (p=0,26; n=7). In absoluten Zahlen entsprach dies 1,77% gegenüber 2,07%. Bei Versuchen mit PTD-HO1 zeigte sich gegenüber der Kontrollgruppe bei Zugabe von 200µg/ml PTD-HO-1 eine um 23% erhöhte Anzahl FoxP3/CD25 positiver Zellen an der Gesamtheit der $CD4^{+}$-T-Lymphozyten. (p=0,16; n=13). Absolut entsprach dies 1,99% gegenüber 1,79%.

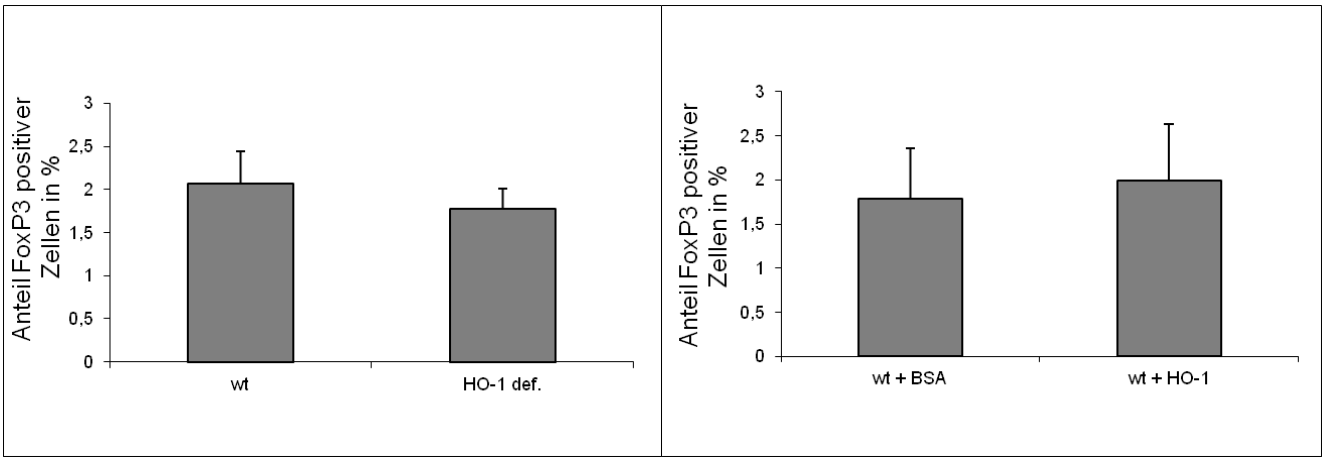

Abb.16: Vergleich des Anteils FoxP3/CD25-exprimierender Zellen. *Links:* zwischen Wildtyp-Maus und HO-1 defizientem Tier zeigt sich eine um 12% verringerte Anzahl Foxp3/CD25 positiver Zellen bei HO-1 Defizienz(p=0,26; n=7) *Rechts:* zwischen Wildtyp Zellen, die mit HO-1 beziehungsweise BSA behandelt wurden zeigt sich eine um 17% erhöhte Anzahl Foxp3 positiver Zellen bei der HO-1 Gruppe (p=0,15; n=14).

2. Etablierung der Polarisation in T_H17- und T_{reg}-Richtung

Um den Effekt von Hämoxygenase-1 auf die Differenzierung naiver $CD4^+$-T-Lymphozyten adäquat untersuchen zu können, mussten zunächst die optimalen Versuchsbedingungen ermittelt werden. Basierend auf Erkenntnissen früherer in unserem Labor durchgeführter Vesuche wurden einige grundlegende Versuchsbedingungen wie zum Beispiel die ideale Zelldichte und eine dreitägige Inkubationszeit übernommen und nicht näher untersucht.

Untersucht wurden zunächst verschiedene Konzentrationen und Kombinationen von Cytokinen, um eine optimale Polarisation der naiven $CD4^+$-T-Lymphozyten zu erreichen. Außerdem wurde die Menge an künstlichem HO-1 Protein (PTD-HO-1) und zusätzlich der optimale Zeitpunkt und die Applikationsform ermittelt.

2.1 Variation der Cytokinkonzentration

Bei der Polarisation für die T_H17-Zelllinie wurden verschiedene Konzentrationen an Transformal-Growth-Factor-β (TGFβ) und Interleukin 6 getestet. Das jeweils nicht zu testende Cytokin sowie die Stimulationsbedingungen (Anti-CD3 und Anti-CD28 Konzentration) und die Gabe von Anti-Interferon-γ und Anti-Interleukin-4 wurden konstant gehalten. Bei regulatorischen T-Lymphozyten wurde lediglich die Konzentration von TGFβ variiert. Jeweils für Polarisationen in Richtung der T_H17- und T_{reg}-Zelllinie wurden die drei am besten erscheinenden Varianten der Cytokinkonzentrationen ausgewählt und in weiteren Versuchsreihen untersucht. (Daten nicht gezeigt)

2.2 Anwendung des PTD-HO-1

Die Menge an zuzugebender künstlicher Hämoxygenase-1 (PTD-HO-1) wurde in einer eigenen Testreihe ermittelt. Hierbei wurden verschiedene Konzentrationen des Proteins in Experimenten bei T-Helfer-Lymphozyten 17 und regulatorischen T-Lymphozyten getestet, bei denen jeweils die beste Polarisation erreicht wurde. Die getesteten Proteinmengen waren 0, 100, 200, 500 und 1000 Mikrogramm auf eine Million $CD4^+$ T-Lymphozyten. Um allein den Effekt von HO-1 zu erfassen und diesen nicht durch Nebeneffekte einer Proteinzugabe an sich verfälscht zu wissen, wurde eine Kontrollgruppe eingeführt bei der ein bestenfalls völlig funktionsloses Protein in gleicher Konzentration zugegeben wurde. Hierfür wurde Bovines Serumalbumin (BSA) genutzt.

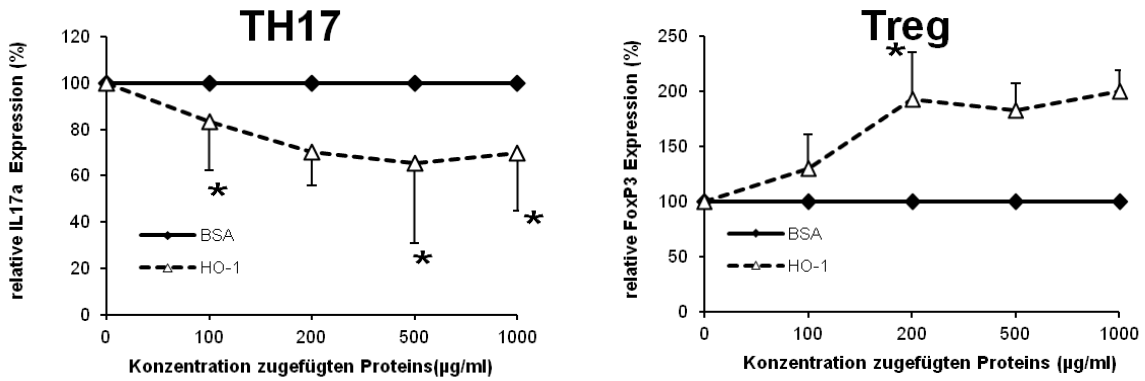

Abb.17: Expressionen der zelllinienspezifischen Marker unter Zugabe verschiedener Mengen PTD-HO-1 bzw. BSA. Die Ergebnisse unter BSA dienten hierbei als Kontrollgruppe und wurden zur vereinfachten Darstellung auf einen Wert von 100 gesetzt. *Links:* Expression von IL17a, einem Marker für T_H17. Ein signifikant verringerter Anteil IL-17a positiver Zellen bei 100 (p=0,04), 500 (p=0,01) und 1000µg/ml (p=0,04) HO-1 Zugabe (n=3). *Rechts:* Expression von FoxP3, einem Marker für T_{reg}. Eine signifikante Erhöhung der FoxP3 positiven Zellen unter HO-1 Einfluss bei 200µg/ml (p=0,04; n=3).

Anschliessend wurde für die weiteren Versuche eine Proteinmenge von 200µg/ml ausgewählt, da bereits bei dieser Konzentration der Effekt von HO-1 deutlich erkennbar war. Wie in Abbildung 17 zu erkennen ist spiegelt sich dies bei T_H17 Polarisation in einer deutlichen, jedoch nicht signifikanten Verringerung der IL-17a positiven Zellen wieder (p=0,06; n=3). Bei der Polarisation regulatorischer T-Lymphozyten zeigte sich eine Erhöhung des Anteils FoxP3 positiver Zellen (p=0,04; n=3).

Ebenfalls getestet wurde der optimale Zeitpunkt der Zugabe der Polarisationscytokine und Proteinzugabe. Die Proteine wurden entweder vor, nach oder zur selben Zeit mit der Polarisaion zugeführt, wobei Zeitabstände von -24 bis +24 Stunden überprüft wurden. Gleichzeitig wurden verschiedene Temperaturen getestet bei denen die Zellen in dieser Zeit gehalten wurden. Es wurde zum einen die Zugabe bei annähernd 0°C getestet, desweiteren bei Zimmertemperatur (20°C) oder nach vorheriger Inkubation auf Körpertemperatur (37°C). In dieser Testreihe zeigte sich jedoch keine nennenswerte Verbesserung der überprüften Kennwerte zu unserer vorheriger Vorgehensweise, die Zellen zunächst auf Raumtemperatur zu halten und Proteine direkt nach Polarisation zuzuführen, woraufhin diese beibehalten wurde. (Daten nicht gezeigt)

3. Effekt von HO-1 auf CD4$^+$-T-Lymphozyten nach Stimulation und Polarisation

Im ersten Teil dieses Kapitels wurden HO-1 defiziente Mäuse mit Geschwistertieren aus einem Wurf verglichen, um genetische Differenzen zwischen den Mäusen möglichst gering zu halten.

Im zweiten Abschnitt des Kapitels wurden Zellen von Balb-c-Mäusen mit künstlichem PTD-HO-1 beziehungsweise die Kontrollgruppe mit BSA in gleicher Konzentration behandelt. Hierbei wurde bedingt durch die genetischen Unterschiede zwischen den Zuchtlinien die Polarisation geringfügig angepasst.

3.1 T_H17-Lymphozyten

3.1.1 Analyse HO-1-defizienter Zellen mittels Durchflusszytometrie

Es wurden zur Stimulation zunächst konstant jeweils 1 ng/ml Anti-CD3 und Anti-CD28 zugesetzt. Ebenso konstant wurden bei der Polarisation in T_H17 Richtung jeweils 2µg/ml Anti-IL-4 und Anti-IFN-γ zugegeben, sowie 2,5 ng/ml TGFβ. Variabel wurden 5 beziehungsweise 10ng/ml IL-6 zugegeben.

Es zeigte sich bei der Polarisation mit 5ng/ml IL-6 ein unter HO-1 Mangel signifikant vermindertes T_H17 Aufkommen (-38%; p=0,01; n=4). Bei der zweiten Polarisation mit 10ng/ml IL-6 war bei der geringen Anzahl der Experimente (n=3) keine nennenswerte Differenz zwischen Test- und Kontrollgruppe erkennbar.

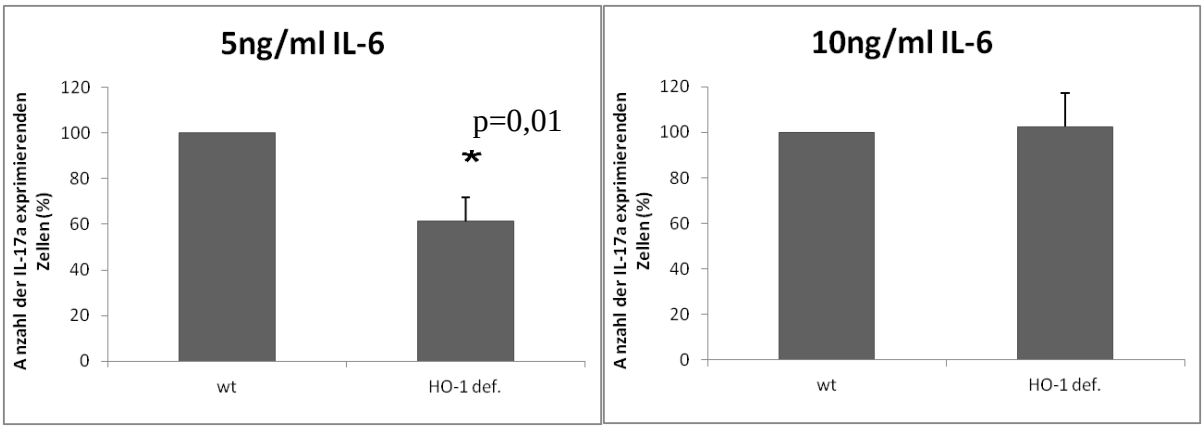

Abb.18: Vergleich der IL-17a Expression von Wildtyp Mäusen und HO-1-defizienten Tieren nach Polarisation mit 5 bzw. 10ng/ml IL-6. Während bei der niedrigeren IL-6 Konzentration (5ng/ml) HO-1 defiziente Zellen deutlich weniger IL-17 exprimierten (p=0,01; n=4), lag bei höherer IL-6 Konzentration (10ng/ml) kein signifikanter Unterschied vor.

3.1.2 Durchflusszytometrische Analyse der Zellen von Balb-c Mäusen nach Zugabe von PTD-HO-1

Die folgende Untersuchungsreihe wurde durchgeführt um die Ergebnisse aus dem vorangehenden Experiment zu untermauern. Hierzu wurde nach der Polarisation für T_H17 künstliches HO-1 Protein zugefügt. Es wurden diverse Konzentrationen getestet (Daten nicht gezeigt) und abschließend die drei „besten“ in weiteren Experimenten näher untersucht. Es wurde sich für eine Polarisation mit nur 1ng/ml TGFβ sowie 10ng/ml IL-6 entschieden. Als wirksamer erwiesen sich sogar Polarisationen die gänzlich auf TGFβ verzichteten. Hierbei wurden 10 bzw 20ng/ml IL-6 eingesetzt. Die Zytokinzugabe unterscheidet sich in diesem Kapitel von vorangehenden da die hier genutzte Mauslinie genetisch geringfügig von zuvor genutzten abweicht. Zur Überprüfung der Ergebnisse wurde eine Kontrollgruppe mit BSA behandelt. Ein Beispiel einer durchflusszytometrischen Untersuchung ist in Abbildung 19 dargestellt.

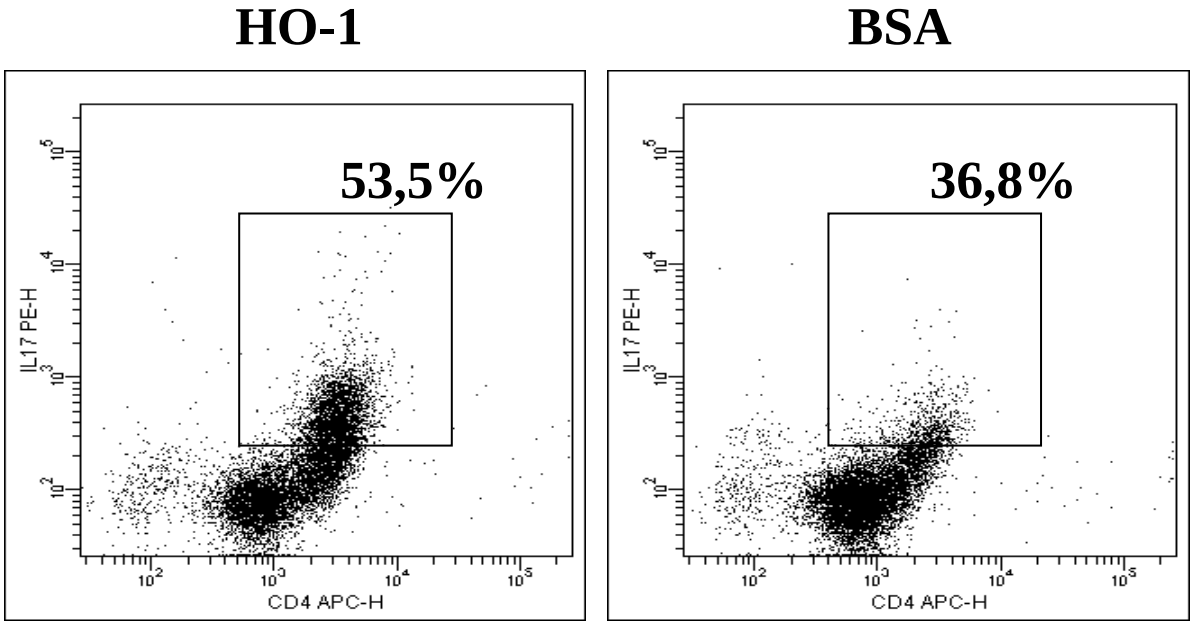

Abb.19: Ergebnisse einer durchflusszytometrischen Untersuchung. IL-17 Anteil einer jeweils mit HO1 bzw. BSA behandelten Probe. Polarisiert wurde mit 20ng/ml IL-6, 2µg/ml Anti-IFNγ und 2µg/ml Anti-IL-4.

In zwei von drei Testreihen konnte eine nicht signifikante Tendenz aufgezeigt werden (Abb.20) – ähnlich dem Ergebnis mit HO-1 defizienten Mäusen – dass Hämoxygenase-1 die Differenzierung in T_H17 Richtung verstärkt. Bei einer Polarisierung mit 20ng/ml IL-6 konnte eine 33% Zunahme von IL-17 beobachtet werden (p=0,03, n=10).

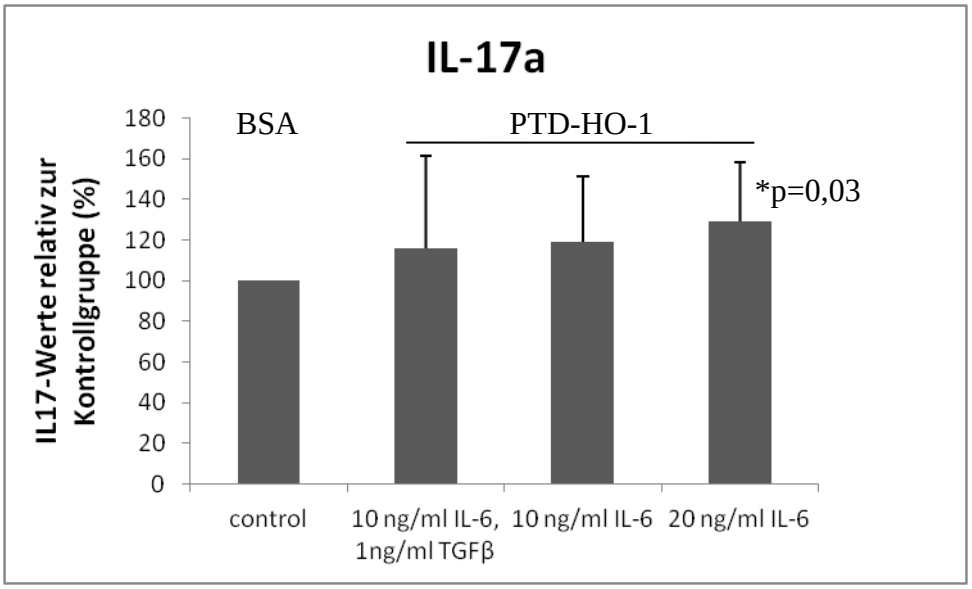

Abb.20: Drei Testreihen unterschiedlicher T_H17 Polarisationen unter HO-1 Einfluss und jeweilige statistische Resultate im Vergleich zu einer auf 100% gesetzten Kontrollgruppe (BSA). (10ng/ml IL-6, 1ng/ml TGFβ: +16%, p=0,54, n=9; 10ng/ml IL-6: +19%, p=0,15, n=13; 20ng/ml IL-6: +33%, p=0,03, n=10)

3.1.3 Überstandsanalyse mittels Sandwich-ELISA

Zusätzlich zu intrazellulären IL-17 Messungen nahmen wir eine Messung des sezernierten IL-17 in den Zellkulturüberständen vor.

Die Messwerte entsprechen den Ergebnissen relativ zur Kontrollgruppe (Wildtyp), wobei die Werte für HO-1-Defizienz aus 4 Experimenten gemittelt wurden. Das Resultat für künstliches HO-1 wurde hierbei aus 9 Experimenten gemittelt.

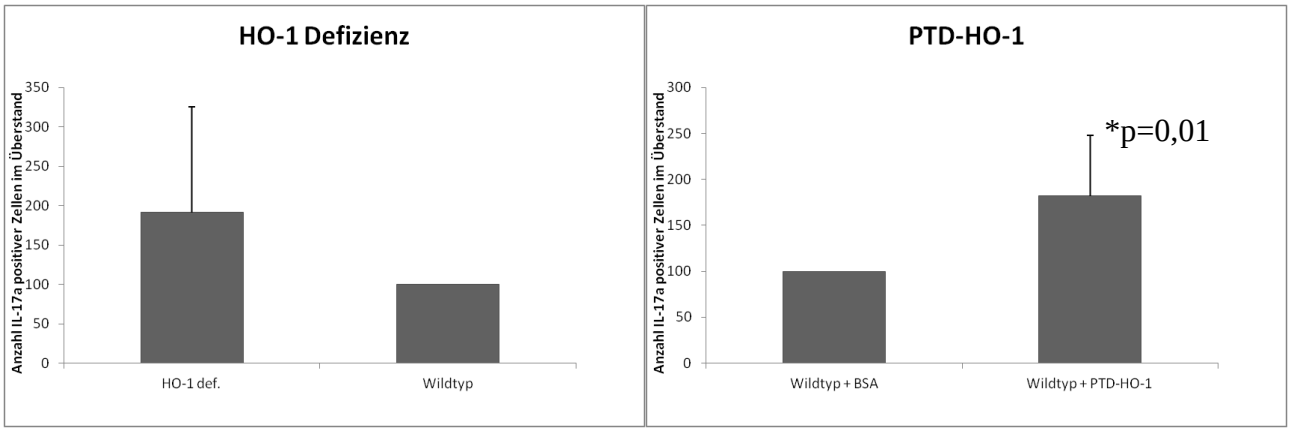

Abb.21: durchschnittliche Messwerte für IL-17 in Kulturüberständen in Relation zum Wildtyp (Kontrollgruppe). *Links:* Zellen HO-1 defizienter Tiere (n=4, p=0,39); *Rechts:* Wildtyp Zellen jeweils mit BSA oder PTD-HO-1 behandelt (n=9, p =0,01).

Wie in Abbildung 21 erkennbar, konnte eine modulatorische Wirkung des Proteins HO-1 auf die Differenzierung der $CD4^+$-T-Lymphozyten bestätigt werden. In den Experimenten mit künstlichem HO-1 konnte wie bereits in Kapitel 3.1.2 veranschaulicht werden, dass eine erhöhte Konzentration HO-1 zu einer verstärkten Differenzierung zu T_H17 Lymphozyten bzw. zu einer erhöhten IL-17 Produktion führt. Im ELISA beobachteten wir eine relative Erhöhung gegenüber der Wildtyp-Kohorte um 82% bei einer Fehlerwahrscheinlichkeit von 0,014 (n=9).

Dem entgegen steht das Resultat der Experimente mit HO-1-defizienten Tieren, bei dem trotz verringerter Menge an funktionierendem HO-1 Protein ein nicht signifikant erhöhte Konzentration an IL-17 im Überstand gegenüber der Wildtyp-Kontrollgruppe gemessen wurde. Durch die geringe Anzahl an Experimenten (n=4) wurde hierbei allerdings nur eine Konfidenz von 62% erreicht.

3.2 T_{reg}-Lymphozyten

3.2.1 Analyse HO-1-defizienter Mäuse mittels Durchflusszytometrie

Bei regulatorischen T-Lymphozyten wurden zwei Konzentrationen von TGFβ getestet. Die Stimulation mit Anti-CD3 und Anti-CD28 wurde stets konstant gehalten. Sowohl bei 5, als auch bei 10ng/ml TGFβ zeigte sich die klare Tendenz, dass durch HO-1 ein erhöhtes Aufkommen an regulatorischen T-Lymphozyten erreicht wird. Bei einer Polarisation von 5ng/ml TGFβ zeigte sich bei relativen Werten auch ein signifikanter Unterschied von 48% im Verhältnis zur Kontrollgruppe.(P=0,01;n=4). Für 10ng/ml zeigte sich hierbei eine nicht signifikante Differenz von 8% (n=3).

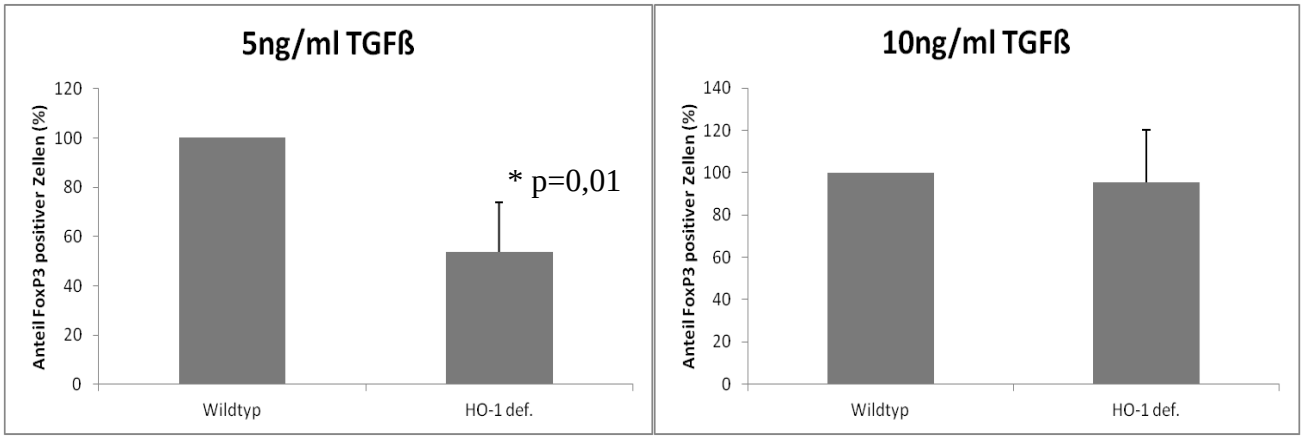

Abb.22: Relative FoxP3-Expression im Vergleich zwischen Zellen einer Wildtyp-Kontrollgruppe und Zellen HO-1 defizienter Tiere. Es zeigt sich eine verminderte Expression bei HO-1-Defizienz. *Links:* Polarisation mit 5ng/ml TGFβ (p=0,01; n=4); *Rechts:* Polarisation mit 10ng/ml TGFβ (p=0,79; n=3).

3.2.2 FACS bei Zugabe von PTD-HO1

Bei der Polarisation in T_{reg}-Richtung wurden verschiedene Konzentrationen an TGFβ getestet. Drei Konzentrationen wurden nach den Vorexperimenten durch weiterführende Versuche näher untersucht. In all diesen Testreihen konnten signifikante Ergebnisse erzielt werden. Bei Konzentrationen von 2, 3 und 5ng/ml konnte jeweils eine Signifikanz von 0,1 beobachtet werden.

Bei einer Konzentration von 2ng/ml TGFβ zeigte sich eine Steigerung der FoxP3 Expression um +87% (p=0,01; n=11). Bei 3ng/ml betrug diese Steigerung bereits +150% (p=0,01; n=9) und bei 5ng/ml wurde sogar eine Steigerung um +252% beobachtet (p=0,01; n=14).

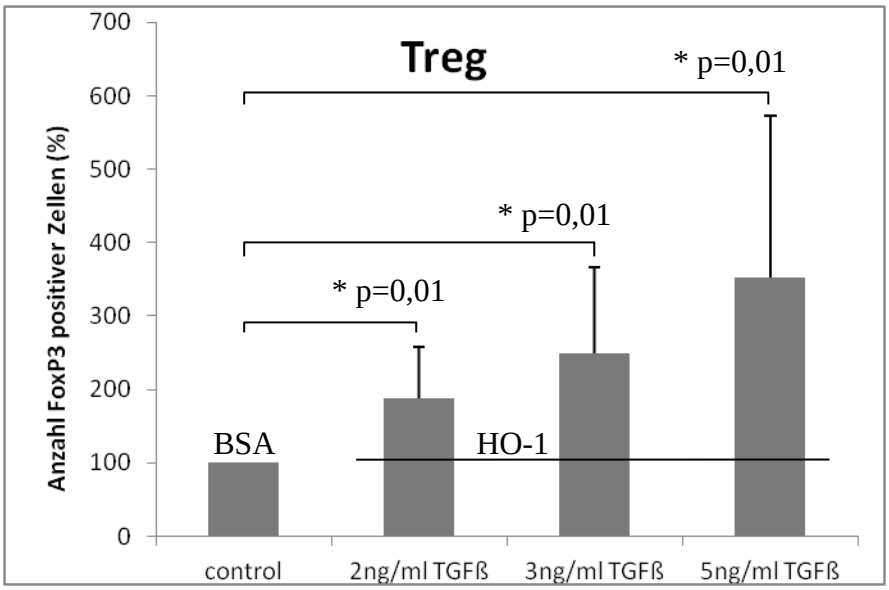

Abb.23: Relative Anteile HO-1 behandelter regulatorischer T-Lymphozyten im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe (BSA) bei Polarisation mit 2(n=11), 3(n=9) oder 5ng/ml(n=14) TGFβ. Gemessen an Zellen von Balb-c-Mäusen. Es wurde jeweils ein p-Wert von 0,01 erreicht.

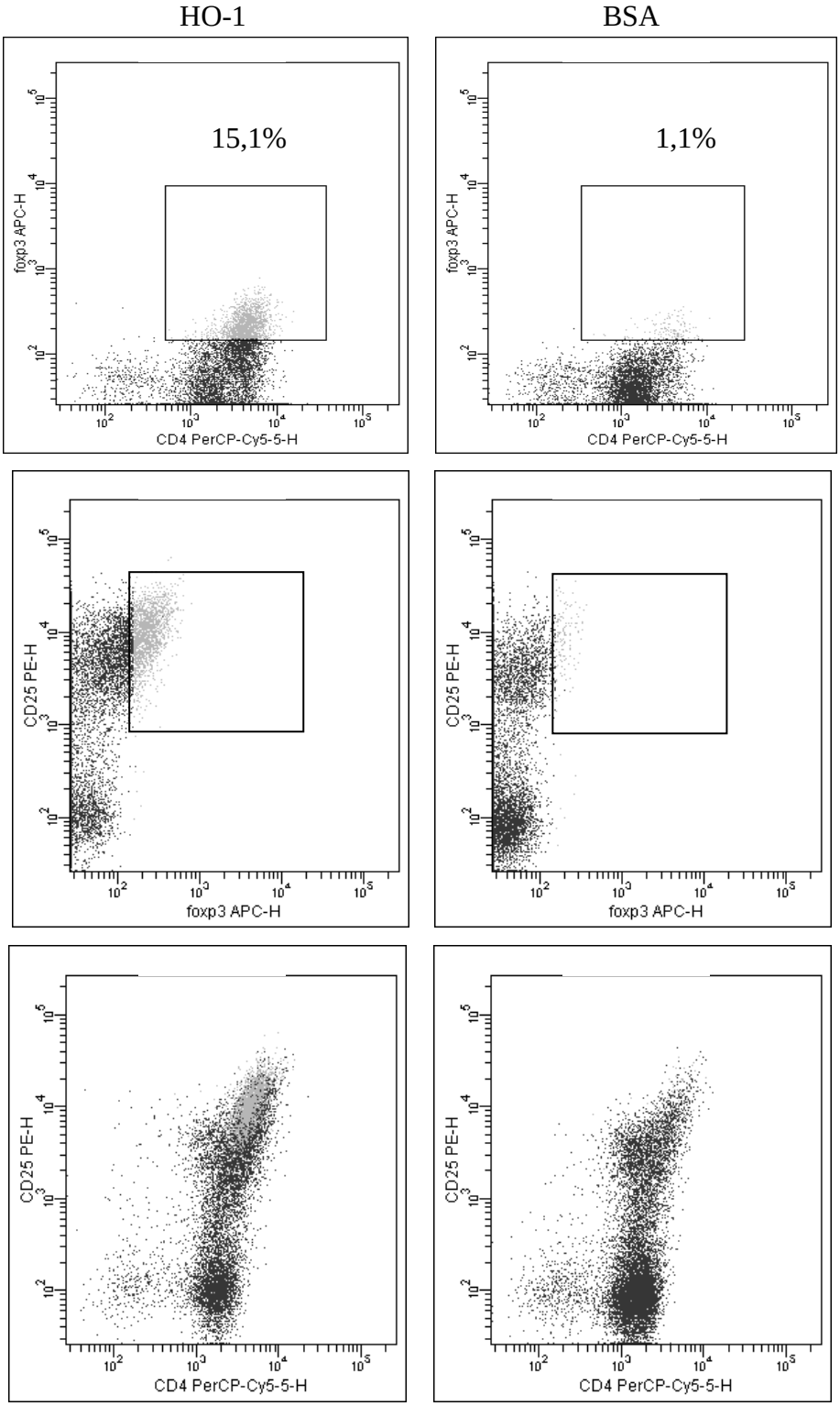

Abb.24: Exemplarisches Resultat einer durchflusszytometrischen Untersuchung. Dargestellt sind die Anteile der CD4+/FoxP3+ Zellen an der Gesamtheit der T-Zellen. Da ein Kriterium für die Bezeichnung als regulatorische T-Lymphozyt die Positivität für CD25 ist, ist dies ebenfalls dargestellt. Die Polarisation erfolgte hier mit 5ng/ml TGFβ, 2µg/ml Anti-IFNγ und 2µml Anti-IL-4.

IV DISKUSSION

1. Immunmodulatorische Wirkung von HO-1

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, ist die Hämoxygenase noch lange nach ihrer ersten Beschreibung 1969 auf ihre enzymatische Wirkung, im Hämstoffwechsel auftretendes Häm zu Biliverdin, Eisen und Kohlenstoffmonoxid abzubauen, reduziert worden. Später wurde aufgezeigt, dass eine immunmodulatorische Wirkung von HO-1 auf dem Abbau des cytotoxischen Moleküls Häm, sowie der Produktion der Moleküle CO, Eisen und Biliverdin beruht, denen eine antiinflammatorische Aktivität und Cytoprotektion nachgesagt wird. Diese Meinung vertreten nach wie vor international diverse Arbeitsgruppen (Paine et al. 2010).

Die schützende Wirkung der HO-1 wurde zunächst dadurch begründet, dass das Protein als Antwort auf viele unterschiedliche zellulär-oxidative Stressoren induziert wird. Experimentell konnte auch eine erhöhte HO-1 Konzentration nach Zugabe von Schwermetallen und inflammatorischen Zytokinen beobachtet werden (Burt et al. 2010).

In diversen Studien konnte in Tiermodellen eine schützende Wirkung der Hämoxygenase aufgezeigt werden. Beispielsweise nach Gabe von CoPP, einem gängigen experimentellen HO-1-Induktor, konnte in Studien zu Organtransplantationen ein verbessertes Transplantatüberleben festgestellt werden. Hierbei wurde die verbesserte Funktion auf eine Verringerung der Ischämie und Reperfusions-Schäden, sowie die Abstoßung des Transplantats zurückgeführt (Yang et al. 2004).

Weiterhin wurde nach einer Erhöhung der HO-Induktion eine Verringerung des Aufkommens an Adipositas und eine Verstärkung der Insulin-Sensitivität beobachtet (Li et al. 2008).

Ebenso konnte eine Verbesserung der Symptome in Modellen zu Autoimmunerkrankungen wie Diabetes mellitus Typ1 und Multipler Sklerose beobachtet werden (Chora et al. 2007).

Neuere Forschungen weisen auch auf eine immunmodulatorische Wirkung des Moleküls Hämoxygenase selbst hin. Obschon der genaue Prozess dieser Wirkung noch nicht gänzlich verstanden ist, weisen einige Arbeiten insbesondere auf einen Zusammenhang mit $CD4^+$-T-Zellen hin (George et al. 2008; Biburger et al. 2010)

Die HO-1 Wirkung im Menschen ist bisher wenig untersucht. Bisher gibt es lediglich eine Studie die sich mit diesem Thema befasst hat (Shoskes et al. 2005). Weitere Aufschlüsse liefert jedoch die Untersuchung der sehr seltenen humanen HO-1 Defizienz. Bei dieser Erkrankung, die bisher lediglich bei 2 Patienten festgestellt wurde, traten diverse Symptome auf, die bereits im sehr jungen Alter zum Tode der Patienten führte.

2. Einfluss von HO-1 auf Differenzierung der T-Lymphozyten in T_H17/T_{reg} Richtung

2.1 HO-1 verstärkt die Differenzierung naiver T_H0 zu T_H17

In meinen *in-vitro* Experimenten konnte ich teilweise eine verstärkte, HO-1 induzierte Differenzierung naiver $CD4^+$-T-Lymphozyten(T_H0) in T_H17-Richtung beobachten.

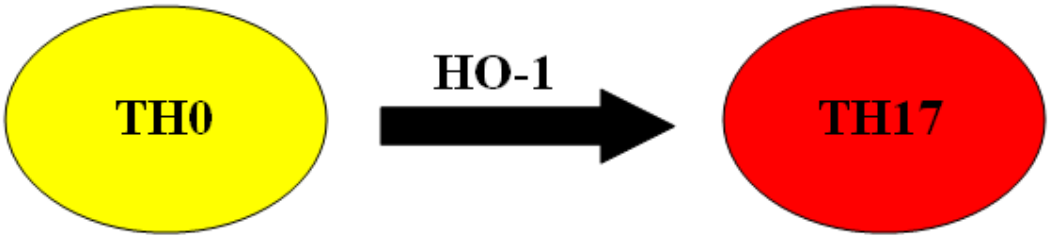

Abb. 25: Darstellung der vermuteten, teilweise signigikant stimulierenden Wirkung von HO-1 auf die Differenzierung naiver T-Lymphozyten zu T_H17

Betrachtet man das Zusammenspiel von HO-1 und T_H17, ist in unserer in-vitro Studie durch HO-1 eine signifikante Verstärkung der Differenzierung in T_H17 Richtung zu beobachten gewesen. Sowohl intrazellulär durch durchflusszytometrische Analyse der IL-17 Menge bei Zellkulturen mit Zellen HO-1 defizienter Tiere (III.3.1.1), als auch bei Wildtyp-Zellen, welche mit BSA bzw. künstlichem HO-1 behandelt wurden (III.3.1.2). Hierbei zeigte eine Versuchsreihe eine signifikante Erhöhung von T_H17, 2 Zellreihen zeigten eine tendenziell erhöhte T_H17-Population. Schliesslich konnte ebenfalls durch die Messung von extrazellulärem IL-17 im Kulturüberstand eine Steigerung der Differenzierung zu T_H17 mittels ELISA nachgewiesen werden (III.3.1.3). Weitere Experimente lieferten ähnliche, jedoch nicht signifikante Ergebnisse (III.1.1; III.3.1.2). Einige Versuchsreihen lieferten zwar gegensätzliche, jedoch keine signifikanten Ergebnisse. Trotz positiver Ergebnisse kann man daher wohl keine endgültige Aussage über den Effekt von HO-1 auf die Differenzierung von $CD4^+$-T-Lymphozyten in T_H17-Richtung treffen.

T_H17-Lymphozyten verdanken ihren Namen ihrer spezifischen Cytokinproduktion. Diese sezernieren vornehmlich IL-17. Ähnlich der T_H1-Linie wird der T_H17 Linie meist ein proinflammatorischer Effekt zugesprochen. Den erst seit kurzer Zeit als eigene Zelllinie anerkannten Zellen werden nun einige Krankheitsmodelle zugesprochen, die vorher als T_H1 bezogen galten. T_H17-Lymphozyten sind hierbei beispielsweise an der Kollagen-induzierten Arthritis, experimenteller Autoimmunenzephalopathie (EAE) und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (IBD) beteiligt.

In vielen dieser Modelle konnte eine protektive Rolle von HO-1 nachgewiesen werden. Paul et al. beobachteten nach CoPP-induzierter HO-1 Induktion eine Abschwächung des Entzündungsgeschehens und eine verminderte Apoptoserate. Chora et al. fanden 2007 bei ähnlicher Stimulation der HO-1 eine Abschwächung der neurologischen Symptome im EAE Modell. In einem weiteren Experiment wird diese Wirkung von HO-1 auf die T_H17 Differenzierung von Xia et al. untersucht, wobei sie zu gleichem Ergebnis gelangen.

Auch durch die Ergebnisse dieser Studien wird HO-1 allgemein als ein zytoprotektives, anti-inflammatorisches Molekül betrachtet. Die Ergebnisse meiner Experimente erscheinen hier paradox, da HO-1 durch die positive Wirkung auf die T_H17 Differenzierung der naiven T-Lymphozyten hier eine pro-inflammatorische Wirkung entwickelt. Unterschieden werden muss hier jedoch zwischen *in vitro* und *in vivo* Studien. Ein paradoxer Effekt von HO-1 in *in vitro* Studien wird ebenso von Xia et al. beschrieben. In folgenden Experimenten könnte mit Sicherheit ein Ziel die Aufklärung dieser gegensätzlichen HO-1 Wirkungen sein.

2.2 HO-1 verstärkt die Differenzierung von T_H0 zu T_{reg}

In meinen *in vitro* Experimenten konnte ich eine durch HO-1 verstärkte Differenzierung der naiven $CD4^+$-T-Lymphozyten (T_H0) in Richtung regulatorischer T-Lymphozyten (T_{reg}) beobachten.

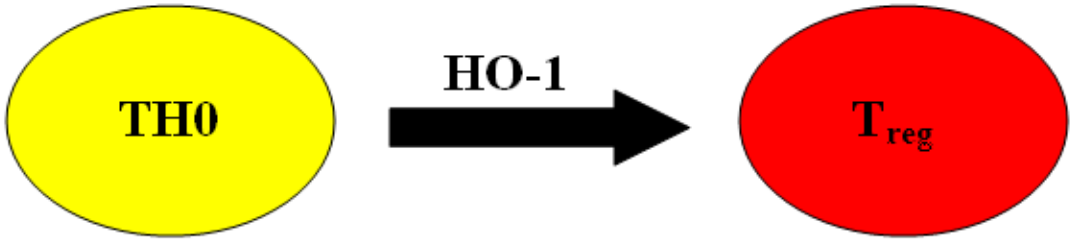

Abb. 26: Darstellung der beobachteten, stimulierenden Wirkung von HO-1 auf die Differenzierung naiver T-Lymphozyten zu regulatorischen T-Lymphozyten.

Die Beobachtung statistisch signifikant erhöhter T_{reg} Kompartimente zeigte sich insbesondere nach Stimulation und Polarisation der naiven T-Lymphozyten. Es konnte sowohl bei Zellen HO-1 defizienter Tiere (III.3.2.1), als auch bei künstlicher Zugabe von HO-1 zu Zellen von Wildtyp-Tieren (III.3.2.2) eine verstärkende Wirkung von HO-1 auf die T_{reg}-Differenzierung nachgewiesen werden. In Experimenten mit alleiniger Stimulation konnte eine gleichartige, jedoch nicht signifikante Tendenz beobachtet werden (III.1.2). Der geringe Anteil regulatorischer T-Lymphozyten an der Gesamtheit der $CD4^+$-T-Lymphozyten bei geringer Anzahl der Experimente kann hierbei eine Erklärung für den Mangel an Signifikanz darstellen.

Regulatorische T-Lymphozyten oder auch Suppressor-T-Zellen, stehen in einem gesunden Organismus im Gleichgewicht mit den inflammatorischen Zelllinien T_H1, T_H2 und T_H17 und hemmen deren Proliferation (Battaglia et al. 2006).

Die Wichtigkeit dieser T-Zell Balance zeigt sich insbesondere in Experimenten, in denen regulatorische T-Lymphozyten ausgeschaltet wurden. In der Folge entwickelten sich diverse inflammatorische Erkrankungen wie Gastritis, Thyreoiditis oder Pankreatitis (Vijayan 2010).

Der Zusammenhang zwischen der kontrollierten Bildung und Rekrutierung regulatorischer T-Lymphozyten und der HO-1 Konzentration ist allgemein umstritten. Die Mehrheit der an diesem Thema forschenden Arbeitsgruppen sieht eine positive Wirkung der HO-1 auf die T_{reg} Differenzierung als gegeben an. George et al. beobachteten in ihrer Studie in Abwesenheit von HO-1 sogar eine Aufhebung der unterdrückenden Wirkung der regulatorischen T-Lymphozyten.

Sun et al. beobachteten 2011 bei Ratten nach intraportaler HO-1 Zuführung mit Hilfe eines Adeno-assoziierten Virus (aaV) ein erhöhtes Aufkommen regulatorischer T-Lymphozyten, sowie verminderte Invasion von Effektor-T-Lymphozyten und ein im Endeffekt verbessertes Graft-Survival nach Lebertransplantation. Hierbei wird eine Verstärkung der Differenzierung zu T_{reg}-Lymphozyten durch HO-1 angenommen. Ähnliches berichteten Tsui et al. bei Herztransplantationen im Ratten-Modell (T.-Y. Tsui et al. 2003).

Dem gegenüber steht eine Studie von Zelenay et al. aus 2007, die schildern, dass eine HO-1 Aktivität für die Differenzierung und Funktion regulatorischer T-Lymphozyten nicht notwendig sei. Hierbei wurde unter anderem die Anzahl an T_{reg}-Lymphozyten zwischen Wildtyp und HO-1 defizienten Tieren gemessen, wobei sich kein Unterschied herausstellte. In der Studie wurde jedoch die absolute Zellzahl verglichen und ein Bezug zur Zahl der Splenozyten nicht eindeutig dargestellt. In unserem Experiment wurde als Bezugspunkt der Anteil der T_{reg} ($CD4^+/CD25^+/Foxp3^+$) an der $CD4^+$ Gesamtpopulation ermittelt. Ein Vergleich ist dadurch nicht direkt möglich. Zudem ist die Zahl der Experimente (n=3) in Zelenay's Studie zumindest als mögliche Fehlerquelle zu betrachten. Ebenso war die Menge an HO-1 mRNA in $CD25^+$ Zellen im Vergleich zu $CD25^-$ nicht erhöht, was gegen einen Zusammenhang von HO-1 und T_{reg} Differenzierung sprechen sollte. Zudem wurde ein Experiment mit CoPPix behandelten Mäusen durchgeführt. Hierunter sollte HO-1 induziert werden. Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte sich keine gesteigerte suppressive Funktion der T_{reg}-Lymphozyten. Da CoPP wie zuvor bereits besprochen jedoch aufgrund mangelnder Spezifität kein adäquater Induktor von HO-1 ist, können diese Ergebnisse schwer interpretiert werden. An dieser Stelle ist vermutlich ebenso noch Forschungsbedarf vorhanden, um die molekularen Wirkweisen des Enzyms HO-1 und den Bezug zu T-Lymphozyten weiter aufzudecken.

3. Therapeutischer Einsatz von HO-1

Seit eine protektive Wirkung von HO-1 nachgewiesen wurde, beschäftigen sich weltweit Arbeitsgruppen mit der Erforschung dieses Moleküls, um aus der Grundlagenforschung klinische Therapieverfahren zu entwickeln. Zunächst wurde die protektive Wirkung der Produkte des Hämabbaus entdeckt und in die klinische Erprobung überführt. Studien zeigten bei erhöhtem Serumbilirubinspiegel eine Verringerung der Rate von Herzerkrankungen. Es stellt sich jedoch die Frage, wie sicher sich eine alleinige Erhöhung der Bilirubinwerte darstellen würde. Syndrome in denen dies zu beobachten ist verlaufen zum Teil symptomlos wie der Icterus intermittens juvenilis (M.Meulengracht/Gilbert), können jedoch zum Teil letal enden wie Formen des Crigler-Najjar-Syndroms. Ein weiteres Produkt des Hämabbaus stellt Kohlenmonoxid (CO) dar. Mehrere Studien konnten eine in vielerlei Hinsicht protektive Wirkung von geringen Dosen CO nachweisen.

Ein positiver Effekt von HO-1 selbst ist in in vitro, wie in in vivo Tierstudien bereits weitreichend beobachtet worden. Die Übertragung auf den Menschen gestaltet sich hierbei jedoch schwierig, da die im Tierversuch häufig genutzten Induktoren der Hämoxgenase CoPP oder SnPP durch ihre toxischen Nebenwirkungen in der Verabreichung limitiert und zudem wenig selektiv sind (Meffert et al. 1994).

Gegenwärtig ist lediglich in einer Studie ein verbessertes postoperatives Outcome nach Nierentransplantation zu beobachten gewesen. Hierbei wurden Bioflavonoidgaben in 2 Konzentrationen mit einer Kontrollgruppe verglichen. In der Hochdosisgruppe korrelierte eine verbesserte Transplantatfunktion mit besserem neurologischem Ergebnis und erhöhten HO-1 Konzentrationen im Urin (Shoskes et al. 2005). Eine weitere Studie zeigte nach Hemingabe eine erhöhte HO-1 Konzentration im Plasma, und bewies somit die pharmakologische Induzierbarkeit der Hämoxygenase im Menschen (Bharucha et al. 2011).

Die Spezifität dieser HO-1 Induktoren, sowie deren Verträglichkeit und Überlegenheit gegenüber Placebo müssen noch näher untersucht werden.

Mit der Gentherapie beschreiben Tsui et al. in Tiermodellen eine weitere erfolgsversprechende Methode der HO-1 Induktion, welche jedoch noch nicht am Menschen erprobt wurde (T.-Y. Tsui et al. 2006).

Eine weitere Möglichkeit stellt die in meinen Tierexperimenten genutzte Methode der künstlichen zellpenetrierenden HO-1 Substitution mittels PTD-HO-1 dar. In in-vitro Modellen konnte bereits eine modulatorische Wirkung dieses Moleküls auf unterschiedliche T-Zell Subtypen festgestellt werden. Des Weiteren konnte von Ma et al. ein verbessertes Transplantatüberleben im Tierversuch und verringerte Ischämie- und Reperfusionsschäden beobachtet werden.

Aufgrund dieser Beobachtungen stellt dieses Verfahren ein in Zukunft interessantes Verfahren für die klinische Erprobung dar. Gegenüber den toxischen Nebenwirkungen der Porphyrine und den schwer einschätzbaren Folgen einer Gentherapie erscheint die Gabe von PTD-HO-1 als relativ sichere Behandlungsmethode. Bis zur klinischen Testung muss jedoch wie bereits erwähnt der molekulare Wirkmechanismus sowie Nebenwirkungen und Interaktionen weiter abgeklärt werden. Ebenso sind Unterschiede zwischen in-vitro und in-vivo Wirkungen nicht ungewöhnlich und eine Übertragung von Tiermodellstudien auf den Menschen ist nicht ohne weiteres möglich.

Der therapeutische Einsatz von HO-1 ist durch dessen protektives Wirkungsspektrum ein attraktives Forschungsziel in vielen klinischen Bereichen. Zunächst müssen jedoch die Regulationsmechanismen näher untersucht werden, sowie ein spezifischer ungefährlicher Induktor im Menschen.

V ZUSAMMENFASSUNG

Das Enzym Hämoxygenase-1 wurde seit seiner Erstbeschreibung 1969 vielfach untersucht. Fest etabliert ist seine Rolle im Häm-Abbau, worin es Häm zu Biliverdin, Eisen und Kohlenstoffmonoxid abbaut und dem es seinen Namen verdankt. Eine zusätzliche immunoregulatorische Wirkung wird erst seit kürzerer Zeit postuliert. Ein indirekter Effekt durch seine Abbauprodukte gilt als erwiesen, jedoch wird auch ein direkter anti-oxidatorischer, anti-apoptotischer und anti-inflammatorischer Effekt diskutiert. In dieser Arbeit wurde unter Zuhilfenahme von HO-1 defizienten Mäusen und einem künstlichen HO-Protein, im Vergleich mit „normalen" BalbC Mäusen der Effekt eines Überschusses sowie eines Mangels von HO-1 auf die Differenzierung naiver $CD4^+$-T-Lymphozyten in Richtung T_H17 und T_{reg} untersucht.

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse geben erstmals Hinweise auf eine HO-1 eigene Wirkung auf die Differenzierung naiver T-Lymphozyten in Richtung T_H17 und T_{reg}. Ein Problem bei der Deutung meiner Ergebnisse stellt die teilweise geringe Zahl der Versuche dar. Bedingt durch die hohe Sterblichkeit bei der Zucht der HO-1 defizienten Tiere konnten bei einer begrenzten Versuchszeit nicht immer ausreichend Experimente durchgeführt werden um signifikante Ergebnisse zu erzielen. Hinzu kommt als Fehlerquelle die subjektiv geprägte Auswertung von durchflusszytometrischen Analysen. Trotz allem sind die erzielten Ergebnisse glaubwürdig. HO-1 scheint die Differenzierung naiver $CD4^+$-T-Lymphozyten in Richtung T_H17 und T_{reg} zu verstärken. Die Regulation der Differenzierung durch HO-1 erscheint jedoch unklar. Möglicherweise stellt HO-1 eine indirekte Form der Regulation dar und andere noch unbekannte Faktoren beeinflussen die einzelnen Subtypen der T-Lymphozyten.

Ein weiteres Problem stellt die Methodik der Experimente dar. Allgemein kann ein in vitro Experiment nicht die komplexen Bedingungen nachstellen, die ein lebendiger Organismus im in vivo Experiment liefert. Eine Diskrepanz des HO-1 Effekts auf die Differenzierung zu T_H17 zwischen *in-vitro* und *in-vivo* Experimenten wurde wie im Kapitel Diskussion besprochen bereits von anderen Arbeitsgruppen beschrieben. Angesichts diverser durch T-Helferzellen verursachter Erkrankungen und Probleme (u.A. Transplantatabstoßung), erscheint die Möglichkeit durch HO-1 das Immunsystem zu regulieren reizvoll. Bei einer beim Menschen momentan nicht praktikablen Stimulation der HO-1 mit giftigen Induktoren besteht großes Interesse am therapeutischen Einsatz von PTD-HO-1. Dafür sollten die hier erreichten Resultate in weiteren *in-vitro* und *in-vivo* Versuchen validiert werden. Insbesondere der Wirkmechanismus von HO-1 stellt ein interessantes Ziel weiterer Forschung dar.

	Experiment	Vergleich	Signifikant pos.	Tendenz pos.	Keine Tendenz	Tendenz neg.
A) TH17	Stimulation III 1.1	$Hmox^{(+/+)}$ gg. $Hmox^{(-/-)}$		+21%		
		PTD-HO1 gg . BSA		+18%		
	Stimulation und Polarisation III 3.1.1 III 3.1.2	$Hmox^{(+/+)}$ gg. $Hmox^{(-/-)}$	+38%			
					~0	
		PTD-HO1 gg. BSA	+33%			
				+19%		
				+16%		
	ELISA III 3.1.3	$Hmox^{(+/+)}$ gg. $Hmox^{(-/-)}$				-91%
		PTD-HO1 gg. BSA	+82%			
B) T_{reg}	Stimulation III 1.2	$Hmox^{(+/+)}$ gg. $Hmox^{(-/-)}$		+9%		
		PTD-HO1 gg. BSA		+23%		
	Stimulation und Polarisation III 3.2.1 III 3.2.2	$Hmox^{(+/+)}$ gg. $Hmox^{(-/-)}$	+48%			
				+8%		
		PTD-HO1 gg. BSA	+252%			
			+150%			
			+87%			

Tab.2: Zusammenfassung der Ergebnisse bezüglich (A) T-Helfer-Lymphozyten Typ 17 und (B) regulatorischen T-Lymphozyten. Dargestellt ist unter Experiment, die Behandlung der Zellen, sowie das Kapitel der Experimente denen die Zahlen entstammen. Stimulation beschreibt die Behandlung mit CD3 und CD28, Polarisation die jeweilige Cytokinbehandlung zur gezielten Anregung der Differenzierung. Die Prozentzahlen entsprechen dem durchschnittlichen relativen Zellanteil der untersuchten Zellgruppe verglichen zwischen Test- und Kontrollgruppe. Signifikanzgrenze p=0,05. p- und n-Werte sowie nähere Informationen zu einzelnen Experimenten dem jeweiligen Kapitel Ergebnisse entnehmen.

VI ABKÜRZUNGEN

APC	Allophycocyanin
BR	Bilirubin
BSA	Bovines Serumalbumin
BV	Biliverdin
BVR	Biliverdinreduktase
CD	“Cluster of Differentiation”
CO	Kohlenstoffmonoxid
CoPP	Co Protoporphyrin
ELISA	“Enzyme linked Immunosorbent Assay“
EAE	Experimentelle Autoimmunenzephalomyelitis
FACS	“Fluorescence Activated Cell Sorting”
Fe2+	Eisen
Fix/Perm	Fixierungs- und Permeabilisationspuffer
FSC	“Forward Scatter”
Hmox	Gen der Hämoxygenase
HO	Hämoxygenase
IFNγ	Interferon-γ
IL	Interleukin
MACS	“Magnetic Cell Separation”
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
ml	Milliliter
PCR	“Polymerase Chain Reaction”
PerCP	Peridin Chlorophyll Phycoerythrin
Perm	Permeabilisationspuffer

PMA	Phorbolmyristatacetat
PTD	“Protein transduction domain”
SnPP	“Tin protoporphyrin”
SSC	“Side Scatter”
TGFβ	“Transforming Growth Factor-β”
T_H	T-Helferzelle
T_H0	naive T-Helferzelle
TNFα	Tumornekrosefaktor-α
T_{reg}	regulatorische T-Zelle
ZnPP	Zink Protoporphyrin

VII LITERATUR

Acuto, O., & Michel, F. (2003). CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. *Nature reviews. Immunology*, *3*(12), 939–51. doi:10.1038/nri1248

Amersi, F., Buelow, R., Kato, H., Ke, B., Coito, a J., Shen, X. D., Zhao, D., et al. (1999). Upregulation of heme oxygenase-1 protects genetically fat Zucker rat livers from ischemia/reperfusion injury. *The Journal of clinical investigation*, *104*(11), 1631–9. doi:10.1172/JCI7903

Araujo, J. A., Meng, L., Tward, A. D., Wayne, W., Zhai, Y., Lee, A., Ishikawa, K., et al. (2003). Systemic rather than local heme oxygenase-1 overexpression improves cardiac allograft outcomes in a new transgenic mouse. *Journal of Immunology*.

Battaglia, M., Gregori, S., Bacchetta, R., & Roncarolo, M. (2006). Tr1 cells : From discovery to their clinical application. *Seminars in Immunology*, *18*, 120–127. doi:10.1016/j.smim.2006.01.007

Bharucha, A. E., Camilleri, M., Lempke, M., Brunn, G. J., J, S., D, P., Zinsmeister, A. R., et al. (2011). Pharmacological activation of heme oxygenase-1 in humans. *Clin Pharmacol Ther.*, *87*(2), 187–190. doi:10.1038/clpt.2009.221.FIRST-IN-HUMAN

Biburger, M., Theiner, G., Schädle, M., Schuler, G., & Tiegs, G. (2010). Pivotal Advance: Heme oxygenase 1 expression by human CD4+ T cells is not sufficient for their development of immunoregulatory capacity. *Journal of leukocyte biology*, *87*(2), 193–202. doi:10.1189/jlb.0508280

Blancou, P., Tardif, V., Simon, T., Rémy, S., Carreño, L., Kalergis, A., & Anegon, I. (2011). Immunoregulatory Properties of Heme Oxygenase-1. (M. C. Cuturi & I. Anegon, Eds.)*Methods in Molecular Biology*, *677*(3), 247–268. doi:10.1007/978-1-60761-869-0

Bluestone, J. A., & Abbas, A. K. (2003). Natural versus adaptive regulatory. *Nature*, *3*(March), 3–7.

Bouma, G., & Strober, W. (2003). The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nature*, *3*(7), 521–33. doi:10.1038/nri1132

Burt, T. D., Seu, L., Mold, J. E., Kappas, A., & McCune, J. M. (2010). Naive human T cells are activated and proliferate in response to the heme oxygenase-1 inhibitor tin mesoporphyrin. *Journal of Immunology*, *185*(9), 5279–88. doi:10.4049/jimmunol.0903127

Chora, Â. A., Fontoura, P., Cunha, A., Pais, T. F., Cardoso, S., Ho, P. P., Lee, L. Y., et al. (2007). Heme oxygenase – 1 and carbon monoxide suppress autoimmune neuroinflammation. *Journal of Clinical Investigation*, *117*(2), 438–447. doi:10.1172/JCI28844DS1

Cheng, G., Yu, A., & Malek, T. R. (2011). T-cell tolerance and the multi-functional role of IL-2R signaling in T-regulatory cells. *Immunological reviews*, *241*(1), 63–76. doi:10.1111/j.1600-065X.2011.01004.x

Fontenot, J. D., Gavin, M. a, & Rudensky, A. Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nature immunology*, *4*(4), 330–6. doi:10.1038/ni904

Fontenot, J. D., Rasmussen, J. P., Williams, L. M., Dooley, J. L., Farr, A. G., & Rudensky, A. Y. (2005). Regulatory T Cell Lineage Specification by the Forkhead Transcription Factor Foxp3. *In Vitro*, *22*, 329–341. doi:10.1016/j.immuni.2005.01.016

Ford, K. G., Souberbielle, B. E., Darling, D., & Farzaneh, F. (2001). Protein transduction: an alternative to genetic intervention? *Gene therapy*, *8*(1), 1–4. doi:10.1038/sj.gt.3301383

Gajewski, T. F., Schell, S. R., Nau, G., & Fitch, F. W. (1989). Regulation of T-cell activation: differences among T-cell subsets. *Immunological reviews*, *111*(111), 79–110. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2534116

George, J. F., Braun, A., Brusko, T. M., Joseph, R., Bolisetty, S., Wasserfall, C. H., Atkinson, M. a, et al. (2008). Suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells is dependent on expression of heme oxygenase-1 in antigen-presenting cells. *The American journal of pathology*, *173*(1), 154–60. doi:10.2353/ajpath.2008.070963

Gershon, R. K., & Kondo, K. (1970). Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology*, *18*(5), 723–37. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1455602&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

Gershon, R. K., & Kondo, K. (1971). Infectious immunological tolerance. *Immunology*, *21*(6), 903–14. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1408252&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

Gozzelino, R., Jeney, V., & Soares, M. P. (2010). Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1. *Annual review of pharmacology and toxicology*, *50*, 323–354.

Grundemar, L., & Ny, L. (1997). Pitfalls using metalloporphyrins in carbon monoxide research. *Molecular Medicine Today*, *18*(June), 193–195.

Harrington, L. E., Mangan, P. R., & Weaver, C. T. (2006). Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage. *Current opinion in immunology*, *18*(3), 349–56. doi:10.1016/j.coi.2006.03.017

Hayashi, S., Omata, Y., (2004). Characterization of rat heme oxygenase-3 gene. Implication of processed pseudogenes derived from heme oxygenase-2 gene. *Gene*, 336(2):241-50.

Jozkowicz, A., Was, H., & Dulak, J. (2007). Heme Oxygenase-1 in Tumors: Is It a False Friend. *Antioxidants & Redox Signaling*, *9*, 2099–2117.

Kawashima, a. (2002). Heme oxygenase[ndash]1 deficiency: The first autopsy case. *Human Pathology*, *33*(1), 125–130. doi:10.1053/hupa.2002.30217

Kawashima, A., Oda, Y., Yachie, A., Koizumi, S., & Nakanashi, I. (2002). Heme oxygenase-1 deficiency: the first autopsy case. *Human Pathology*, *33*, 125–130.

Kim, E.-S., Yang, S.-W., Hong, D.-K., Kim, W.-T., Kim, H.-G., & Lee, S.-K. (2010). Cell-penetrating DNA-binding protein as a safe and efficient naked DNA delivery carrier in vitro and in vivo. *Biochemical and biophysical research communications*, *392*(1), 9–15. doi:10.1016/j.bbrc.2009.12.135

Koizumi, S. (2007). Human heme oxygenase-1 deficiency: a lesson on serendipity in the discovery of the novel disease. *Pediatrics international*.

Li, M., Kim, D. H., Tsenovoy, P. L., Peterson, S. J., Rezzani, R., Rodella, L. F., Aronow, W. S., et al. (2008). Treatment of Obese Diabetic Mice With a Heme Oxygenase Inducer Reduces Visceral and Subcutaneous Adiposity , Increases Adiponectin Levels , and Improves Insulin Sensitivity and Glucose Tolerance. *Diabetes*, *57*, 1526–1535. doi:10.2337/db07-1764.CFU-F

Luckheeram, R. V., Zhou, R., Verma, A. D., & Xia, B. (2012). $CD4^+$T cells: differentiation and functions. *Clinical & developmental immunology*, *2012*, 925135. doi:10.1155/2012/925135

Ma, J., Lau, C. K., Obed, a, Dada, a, Doenecke, a, Fan, S. T., Schlitt, H. J., et al. (2009). A cell penetrating heme oxygenase protein protects heart graft against ischemia/reperfusion injury. *Gene therapy*, *16*(3), 320–8. doi:10.1038/gt.2008.162

Magee, J. C., Debruyne, L. A., Buelow, R., & Bromberg, J. S. (1999). Gene Transfer of Immunosuppressive Peptides B2702 and RDP1257 Prolongs Allograft Survival: Evidence Suggesting a Role for Heme Oxygenase-1. *Transplantation Proceedings*, *31*, 1194.

McCoubrey, W. K., Huang, T. J., & Maines, M. D. (1997). Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *European journal of biochemistry*, *247*, 725–732.

Meffert, M. K., Haley, J. E., Schuman, E. M., Schulman, H., Madison, D. V, & Dell, O. (1994). Inhibition of Hippocampal Heme Oxygenase, Nitric Oxide Synthase, and Long-Term Potentiation by Metalloporphyrins. *Cell*, *13*, 1225–1233.

Naito, Y., Takagi, T., Uchiyama, K., & Yoshikawa, T. (2011). Heme oxygenase 1 : a novel therapeutic target for gastrointestinal diseases. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, *48*(2), 126–133. doi:10.3164/jcbn.10

Nakao, A., Kaczorowski, D. J., Sugimoto, R., Billiar, T. R., & McCurry, K. (2008). Application of Heme Oxygenase-1 , Carbon Monoxide and Biliverdin for the Prevention of Intestinal Ischemia / Reperfusion Injury. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, *42*(March), 78–88.

O'Shea, J. J., & Paul, W. E. (2010). Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. *Science*, *327*(5969), 1098–102. doi:10.1126/science.1178334

Paine, A., Eiz-Vesper, B., Blasczyk, R., & Immenschuh, S. (2010). Signaling to heme oxygenase-1 and its anti-inflammatory therapeutic potential. *Biochemical pharmacology*, *80*(12), 1895–1903. doi:10.1016/j.bcp.2010.07.014

Petrache, I., Otterbein, L. E., Alam, J., Wiegand, G. W., & Choi, M. K. (2000). Heme oxygenase-1 inhibits TNF- α -induced apoptosis in cultured fibroblasts. *American Journal of Physiology*, *278*, 312–319.

Poss, K., & Tonegawa, S. (1997). Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(September), 10919–10924.

Radhakrishnan, N., Yadav, S. P., Sachdeva, A., Pruthi, P. K., Sawhney, S., Piplani, T., Wada, T., et al. (2011). Human heme oxygenase-1 deficiency presenting with hemolysis, nephritis, and asplenia. *Journal of pediatric hematology/oncology*, *33*(1), 74–8. doi:10.1097/MPH.0b013e3181fd2aae

Schwarze, S. R. (1999). In Vivo Protein Transduction: Delivery of a Biologically Active Protein into the Mouse. *Science*, *285*(5433), 1569–1572. doi:10.1126/science.285.5433.1569

Shoskes, D., Lapierre, C., Cruz-Corerra, M., Muruve, N., Rosario, R., Fromkin, B., Braun, M., et al. (2005). Beneficial Effects of the Bioflavonoids Curcumin and Quercetin on Early Function in Cadaveric Renal Transplantation: A Randomized Placebo Controlled Trial. *Transplantation*, *80*(11), 1556–1559. doi:10.1097/01.tp.0000183290.64309.21

Soares, M. P., & Bach, F. H. (2009). Heme oxygenase-1: from biology to therapeutic potential. *Trends in molecular medicine*, *15*(2), 50–58. doi:10.1016/j.molmed.2008.12.004

Sun, L., Shi, T., Qiao, H., D, P., Jiang, X., Jiang, H., Krissansen, G. W., et al. (2011). Hepatic Overexpression of Heme Oxygenase-1 Improves Liver Allograft Survival by Expanding T Regulatory Cells. *Journal of Surgical Research*, *166*(2), e187–e194. doi:10.1016/j.jss.2010.11.917

Suri-Payer, E., Amar, a Z., Thornton, a M., & Shevach, E. M. (1998). CD4+CD25+ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells. *Journal of Immunology*, *160*(3), 1212–1218. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9570536

Takahashi, T., Tagami, T., Yamazaki, S., Uede, T., Shimizu, J., Sakaguchi, N., Mak, T. W., et al. (2000). Regulatory T Cells Constitutively Expressing Cytotoxic T Lymphocyte – associated Antigen 4. *Journal of Experimental Medicine*, *192*(2), 303–309.

Tenhunen, R., Marver, H. S., & Schmid, R. (1969). Microsomal Heme Oxygenase. *Journal of Biological Chemistry*, *244*(23), 6388–6394.

Tsui, T.-Y., Lau, C.-K., Ma, J., Glockzin, G., Obed, A., Schlitt, H.-J., & Fan, S.-T. (2006). Adeno-associated virus-mediated heme oxygenase-1 gene transfer suppresses the progression of micronodular cirrhosis in rats. *World journal of gastroenterology*, *12*(13), 2016–23. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16610050

Tsui, T.-Y., Obed, A., Siu, Y.-T., Yet, S.-F., Prantl, L., Schlitt, H. J., & Fan, S.-T. (2007). Carbon monoxide inhalation rescues mice from fulminant hepatitis through improving hepatic energy metabolism. *Shock*, *27*(2), 165–71. doi:10.1097/01.shk.0000239781.71516.61

Tsui, T.-Y., Wu, X., Lau, C.-K., Ho, D. W. Y., Xu, T., Siu, Y.-T., & Fan, S.-T. (2003). Prevention of chronic deterioration of heart allograft by recombinant adeno-associated virus-mediated heme oxygenase-1 gene transfer. *Circulation*, *107*(20), 2623–9. doi:10.1161/01.CIR.0000066911.03770.8D

Vijayan, V. (2010). Heme oxygenase-1 as a therapeutic target in inflammatory disorders of the gastrointestinal tract. *World Journal of Gastroenterology*, *16*(25), 3112–3119. doi:10.3748/wjg.v16.i25.3112

Vile, G. F., Basu-Modak, S., Waltner, C., & Tyrrell, R. M. (1994). Heme oxygenase 1 mediates an adaptive response to oxidative stress in human skin fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *91*(7), 2607–2610. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=43418&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

Wan, Y. Y., & Flavell, R. a. (2005). Identifying Foxp3-expressing suppressor T cells with a bicistronic reporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(14), 5126–31. doi:10.1073/pnas.0501701102

Wasserberg, N., Pileggi, A., Salgar, S. K., Ruiz, P., Ricordi, C., Inverardi, L., & Tzakis, A. G. (2007). Heme oxygenase-1 upregulation protects against intestinal ischemia/reperfusion injury: a laboratory based study. *International journal of surgery*, *5*(4), 216–24. doi:10.1016/j.ijsu.2006.06.001

Wilke, C. M., Bishop, K., Fox, D., & Zou, W. (2011). Deciphering the role of Th17 cells in human disease. *Trends in Immunology*, *32*(12), 603–611. doi:10.1016/j.it.2011.08.003

Woo, J., Iyer, S., (1998). Stress protein-induced immunosuppression: inhibition of cellular immune effector functions following overexpression of haem oxygenase (HSP 32). *Transplantation Immunology*, 6(2):84-93.

Xia, Z. W., Zhong, W. W., Meyrowitz, J. S., & Zhang, Z. L. (2008). The role of heme oxygenase-1 in T cell-mediated immunity: the all encompassing enzyme. *Current pharmaceutical design*, *14*(5), 454–64. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18289072

Yachie, A., Niida, Y., Wada, T., Igarashi, N., Kaneda, H., Toma, T., Ohta, K., et al. (1999). Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. *The Journal of clinical investigation*, *103*(1), 129–35. doi:10.1172/JCI4165

Yamashita, K., McDaid, J., Ollinger, R., Tsui, T.-Y., Berberat, P. O., Usheva, A., Csizmadia, E., et al. (2004). Biliverdin, a natural product of heme catabolism, induces tolerance to cardiac allografts. *FASEB Journal*, *18*(6), 765–7. doi:10.1096/fj.03-0839fje

Yang, Z. F., Tsui, T. Y., Ho, D. W., Tang, T. C., & Fan, S.-T. (2004). Heme oxygenase-1 potentiates the survival of small-for-size liver graft. *Liver transplantation*, *10*(6), 784–793. doi:10.1002/lt.20142

Yao, Z., & Fanslow, W. C. (1995). Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor. *Immunity*, *3*, 811–821.

Yet, S., Perrella, M. A., Layne, M. D., Hsieh, C., Maemura, K., Kobzik, L., Wiesel, P., et al. (1999). Hypoxia induces severe right ventricular dilatation and infarction in heme oxygenase-1 null mice Rapid. *Journal of Clinical Investigation*, 23–29.

Zelenay, S., Chora, A., Soares, M. P., & Demengeot, J. (2007). Heme oxygenase-1 is not required for mouse regulatory T cell development and function. *International immunology*, *19*(1), 11–8. doi:10.1093/intimm/dxl116

Zhou, L., Chong, M. M. W., & Littman, D. R. (2009). Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. *Immunity*, *30*, 646–655.

Zhu, J., & Paul, W. E. (2010). Heterogeneity and plasticity of T helper cells. *Cell research*, *20*(1), 4–12. doi:10.1038/cr.2009.138

Ziegler, S. F., & Buckner, J. H. (2009). FOXP3 and the regulation of Treg/Th17 differentiation. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, *11*(5), 594–598. doi:10.1016/j.micinf.2009.04.002

VIII DANKSAGUNG

Diese Arbeit wurde 2011 im Labor der Klinik und Poliklinik für Hepatobiliäre Chirurgie und Transplantationschirurgie (Direktor Prof. Dr. med. Björn Nashan) des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf durchgeführt und bis 2013 verschriftlicht.

Zunächst gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. Jacob R. Izbicki, für die Möglichkeit in seiner Klinik promovieren zu dürfen.

Ebenso danke ich meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. Tung Yu Tsui für die Möglichkeit in seiner Abteilung forschen zu dürfen, sowie für die äußerst hilfreiche fachliche Beratung während der experimentellen und schriftlichen Schaffensphase.

Außerordentlicher Dank gebührt Frau Dr. med. Viktoria Koren, für eine hervorragende Betreuung meiner Dissertation, sowohl bei der Einarbeitung in labortechnische Vorgänge, als auch der steten Motivation, dem eifrigen Korrekturlesen und der freundschaftlichen Zusammenarbeit. Danke für eine Hilfsbereitschaft, die mit Sicherheit weit über das gängige Maß an Einsatz bei der Betreuung von Doktorarbeiten hinaus geht.

Vielen Dank an Herrn Hua Li für seine hervorragende Arbeit und das Überlassen von PTD-HO-1.

Danke an das Laborteam um Frau Petra Tiede und Frau Claudia Goßler für unermüdliche Hilfe bei organisatorischen und technischen Fragen.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern für ihre unglaubliche Unterstützung während meinem gesamten Studium und während meiner Dissertation. Ihnen widme ich diese Arbeit.

IX LEBENSLAUF

Ausbildung

01/2011 – 07/2011	Forschung für eine Dissertation in der Klinik und Poliklinik für Hepatobiliäre Chirurgie, Prof. Nashan, Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf ("Einfluss von Hämoxygenase-1 auf die Differenzierung von $CD4^+$ T-Lymphozyten")
10/2008	Beginn des Studiums der Humanmedizin, Universität Hamburg
08/2008	Wehrdienst, Marine in Plön
06/2008	Abschluss: Abitur
04/2006	Escuela Goethe, Rosario, Argentinien
08/1999 – 06/2008	Gymnasium Paulinum in Münster

Famulaturen

09/2011	Praxis für Allgemein- und Sportmedizin, Dr. med. Greguletz, 48329 Havixbeck
07 – 09/2012	Massachusetts General Hospital, Boston, USA Department of Orthopaedic Surgery, Hand and Upper Extremity Service
04 – 05/2013	Klinikum Bremen Mitte, Bremen Abt. für Unfallchirurgie und Orthopädie

Praktisches Jahr

08 – 12/2013	Innere Medizin, Asklepios Klinik St.Georg, Hamburg
12/2013 – 03/2014	Chirurgie, Asklepios Klinik Barmbek, Hamburg
03/2014 – 07/2014	Orthopädie, Klinikum Bad Bramstedt, Bad Bramstedt

X EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig zur Zulassung zur Promotion beworben habe. Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Julian Dutschmann

Hamburg, September 2013